



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**RAUL MARQUES NOVAIS**

**ANÁLISE ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS ISOLADOS DE**  
***SENNA SPECTABILIS* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOLINESTERÁSICO**

**UBERLÂNDIA**

**2019**

**RAUL MARQUES NOVAIS**

**ANÁLISE ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS ISOLADOS DE  
*SENNA SPECTABILIS* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOLINESTERÁSICO**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção de créditos na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (GQB056).

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

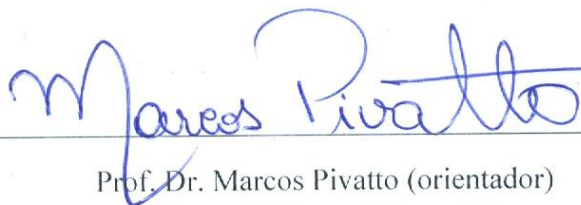
**UBERLÂNDIA**

**2019**

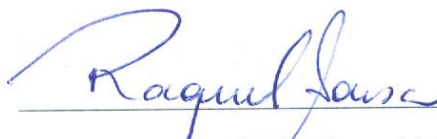
**RAUL MARQUES NOVAIS**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção de créditos na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (GQB056).

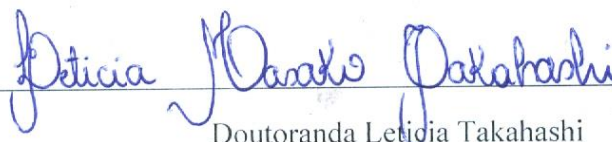
**COMISSÃO EXAMINADORA**



Prof. Dr. Marcos Pivatto (orientador)  
Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa  
Universidade Federal de Uberlândia



Doutoranda Leticia Takahashi  
Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, 20 de dezembro de 2019.

*Dedico essa pesquisa primeiramente a Deus, autor do meu destino e companheiro de todos os momentos.*

*Aos meus pais Renata e Ailton, à minha irmã Maria Eduarda e à minha avó Teresa que foram o suporte e o alicerce que me mantiveram de pé frente às adversidades.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que foi minha maior força nos momentos de angústia e adversidades. Sem ele, nada disso seria possível.

Ao prof. Dr. Marcos Pivatto, pela orientação exercida que além de todo conhecimento passado, se tornou pra mim uma referência de grande relevância.

À Mestre Thamires Rodrigues a quem faço questão de fazer menção ao título, pois foi com maestria que todo conhecimento, inspiração e amor pela pesquisa foram passados.

À prof<sup>a</sup> Dra. Amanda Danuello, pela redescoberta na ciência.

Ao instituto de química juntamente a todos os professores que foram responsáveis pelo conhecimento acumulado.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, pela disponibilidade bem como seu aluno Allisson Benatti Justino, pela realização dos ensaios de avaliação da atividade anticolinesterásica.

Aos meus amigos de graduação que foram muito importantes com seus conselhos e companheirismo, sem vocês seria difícil ter forças para continuar e finalizar o curso.

Às amigas que conheci durante minha IC, Gáveni, Karina, Marília, Michelle, Tiara e Vanessa, a quem devo grande parte de todo meu conhecimento e crescimento.

À minha família a qual tem uma importância fundamental na conquista desse sonho, essa realização é de vocês.

Ao meu pai, Antonio Ailton, por sempre fazer seu melhor e por todo apoio financeiro que foram fundamentais ao longo do curso.

À minha mãe, Renata, por todo apoio, compreensão e por todo amor, que por vezes foram alicerce seguro para que eu continuasse, você foi e é peça fundamental na minha vida.

À minha irmã por sempre me motivar a olhar além e por todo carinho demonstrado que me mantiverem de pé.

À minha avó Tereza que foi fundamental em cada etapa, pelo apoio financeiro, pelos conselhos muitas vezes carregados de sabedoria e por todo cuidado demonstrado comigo.

Aos meus avós maternos, Divino e Perpétua *in memoriam*, por todo carinho e pelo maior exemplo dado por vocês, a perseverança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento dos projetos.

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

*Johann Joachim Becher, 1669*

## RESUMO

Os produtos naturais são utilizados desde a antiguidade como uma forma de cura ou prevenção dos males humanos. Ao longo da história, os compostos obtidos de fontes naturais têm despertado grande interesse devido à complexidade das arquiteturas moleculares relacionada às disposições tridimensionais dos carbonos assimétricos e atividades biológicas associadas. Assim, por muito tempo, fármacos sintéticos foram inspirados nas estruturas de compostos de origem natural e que frequentemente são quirais, os quais foram produzidos na forma de racematos, ignorando as possíveis diferenças de atividade biológica que os diferentes estereoisômeros poderiam proporcionar. Dentro deste contexto, temos investido no estudo dos alcaloides piperidínicos presentes em *Senna spectabilis*, que apresentam três centros estereogênicos e comprovada atuação sobre o sistema nervoso central, além de apresentarem diversas atividades biológicas como, leishmanicida, antimalárica e anticolinesterásica. Nesse sentido, o presente estudo descreve o processo de isolamento dos alcaloides piperidínicos quirais a partir do extrato etanólico das flores da *Senna spectabilis*. Esse extrato foi submetido à extração líquido-líquido com hexano e diclorometano, sendo a segunda fração aquela com maior concentração de alcaloides. Essa fração foi submetida a diferentes procedimentos cromatográficos, de onde foram isolados os homólogos **1** e **2**, já descritos anteriormente em *S. spectabilis*, além dos dois novos compostos (**4** e **5**) também homólogos, cujas análises cromatográficas e espectrométricas realizadas indicam que são diastereoisômeros de **1** e **2**. Em seguida, a mistura contendo **4** e **5** foi submetida a reação de esterificação com cloreto de acetila, de onde foi obtido o composto **60**. Os compostos naturais e semissintéticos foram avaliados no ensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE) de onde foi possível observar que os alcaloides homólogos **1** ( $IC_{50} 0,62 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e **2** ( $IC_{50} 0,87 \pm 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), de mesma estereoquímica são mais potentes que os respectivos estereoisômeros **4** ( $IC_{50} 6,49 \pm 0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e **5** ( $IC_{50} 17,60 \pm 1,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Estes compostos apresentaram potencial de inibição da AChE da mesma ordem de grandeza que o controle positivo, galantamina ( $IC_{50} 1,50 \pm 0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), no entanto o derivado semissintético **60** foi considerado inativo ( $IC_{50} > 300,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Palavras chave:** *Senna spectabilis*. Alcaloides piperidínicos. Estereoquímica. Cromatografia. Espectrometria de massas. Anticolinesterásicos.

## ABSTRACT

Natural products have been used since ancient times as a way to cure or prevent human illness. Throughout history, compounds obtained from natural sources have aroused great interest due to the complexity of molecular arrangements associated with the three-dimensional dispositions of asymmetric carbons and their biological activities. Thus, for a long time, synthetic drugs were inspired by the structures of natural compounds, frequently chiral, which were produced in the form of racemates, ignoring the possible differences in biological activity that different stereoisomers could cause. Against this background, we have invested in the study of piperidine alkaloids present in *Senna spectabilis*, which have stereogenic centers and verified action on the central nervous system, as well as presenting various biological activities such as leishmanicide, antimalarial and anticholinesterase. In this sense, the present study describes the isolation process of chiral piperidine alkaloids from the ethanolic extract of *Senna spectabilis* flowers. This extract was submitted to liquid-liquid extraction with hexane and dichloromethane, being the second fraction with the highest concentration of alkaloids. This fraction was submitted to different chromatographic procedures, from which homologues **1** and **2**, previously described in *S. spectabilis*, were isolated, as well as the two new homologous compounds, whose chromatographic and spectrometric analyzes indicate that they are diastereoisomers of **1** and **2**. Then, the mixture containing **4** and **5** was subjected to an esterification reaction with acetyl chloride, obtaining compound **60**. The natural and semi-synthetic compounds were evaluated in the acetylcholinesterase (AChE) inhibition test, where it was possible to observe that homologous alkaloids **1** ( $IC_{50} 0.62 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and **2** ( $IC_{50} 0.87 \pm 0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), with the same stereochemistry are more potent than the respective stereoisomers **4** ( $IC_{50} 6.49 \pm 0.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and **5** ( $IC_{50} 17.60 \pm 1.90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). These compounds exhibited an AChE inhibition potential of the same order of magnitude as the positive control, galantamine ( $IC_{50} 1.50 \pm 0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), however the semi-synthetic derivative **60** was considered inactive ( $IC_{50} > 300.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Keywords:** *Senna spectabilis*. Piperidine alkaloids. Stereochemistry. Chromatography. Mass spectrometry. Anticholinesterase.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Senna spectabilis</i> : detalhes da planta, flores, frutos, sementes, casca e madeira.	19
Figura 2	Alcaloides piperidínicos isolados de <i>Senna spectabilis</i> .	21
Figura 3	Unidade de ACh internalizada nas estruturas de <b>6</b> e <b>7</b> .	21
Figura 4	Cristais do ácido tartárico separados por Pasteur.	22
Figura 5	Estereoisômeros: enantiômeros e diastereoisômeros.	23
Figura 6	As diferenças estereoquímicas e as respostas através da sensibilidade olfativa.	23
Figura 7	Diastereoisômeros do aspartame.	24
Figura 8	Modelo de Beckett para os estereoisômeros da adrenalina.	24
Figura 9	Estereoisômeros do fármaco verapamil.	25
Figura 10	Estereoisômeros do labetalol.	26
Figura 11	Estereoisômeros do propranolol.	27
Figura 12	Diastereoisômeros do captopril.	27
Figura 13	Racematos Tabela 1.	28
Figura 14	Propaganda alemã do medicamento Contergan <sup>®</sup> .	29
Figura 15	Enantiômeros da indacrinona	29
Figura 16	Estruturas dos enantiômeros da propafenona e fluoxetina.	30
Figura 17	Enantiômeros do tetramisol.	31
Figura 18	Interconversão unidirecional dos estereoisômeros do ibuprofeno.	32
Figura 19	Fármacos aprovados pelo <i>FDA</i> entre os anos de 1992–2008.	33
Figura 20	Porcentagem de fármacos liberados mundialmente entre os anos de 2001–2010.	33
Figura 21	Disposição geográfica da doença de Alzheimer.	34
Figura 22	Hidrólise da acetilcolina catalisada pela acetilcolinesterase.	35
Figura 23	Representação esquemática do comportamento da ACh com e sem inibição da AChE.	35
Figura 24	Agentes terapêuticos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer.	36
Figura 25	Enantiômeros da fisostigmina.	37
Figura 26	Diastereoisômero da galantamina.	38
Figura 27	Huperzina A isolada de <i>Huperzia serrata</i> .	38

Figura 28	Enantiômeros da rivastigmina.	39
Figura 29	Enantiômeros do donepezil.	40
Figura 30	Extração líquido-líquido do EEFl-Ss.	48
Figura 31	Aparato de Kipp modificado.	48
Figura 32	Preparação dos derivados acetilados dos alcaloides de <b>4</b> e <b>5</b> .	49
Figura 33	Sistema de refluxo utilizado na preparação dos ésteres.	49
Figura 34	Reações propostas para a geração de TNB.	51
Figura 35	Cromatoplaça da prospecção química (revelador ICIPt).	53
Figura 36	Procedimentos cromatográficos da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> para isolamento dos alcaloides.	53
Figura 37	Cromatoplaça das frações coletadas de RIC01.	54
Figura 38	Cromatograma (CG-EM) da fração RIC01-F <sub>114-265</sub> ( <b>1/2</b> e <b>4/5</b> ).	55
Figura 39	EM-IE de <b>1</b> .	55
Figura 40	EM-IE de <b>4</b> .	55
Figura 41	EM-IE de <b>2</b> .	56
Figura 42	EM-IE de <b>5</b> .	56
Figura 43	Cromatoplaça das frações coletadas de RIC02.	57
Figura 44	Cromatograma (CLAE-ELSD) da fração RIC02-F <sub>29-34</sub> em coluna analítica.	58
Figura 45	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide <b>1</b> .	58
Figura 46	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide <b>2</b> .	59
Figura 47	Cromatograma (CLAE-ELSD) da fração RIC02-F <sub>45-47</sub> em coluna analítica.	60
Figura 48	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide <b>4</b> .	61
Figura 49	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide <b>5</b> .	61
Figura 50	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>1</b> .	62
Figura 51	EM/EM-IES-(+) do íon molecular $m/z$ 298 [M + H] <sup>+</sup> (25 eV), observado para o alcaloide <b>1</b> .	63
Figura 52	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>2</b> .	64

Figura 53	EM/EM-IES-(+) do íon molecular $m/z$ 326 $[M + H]^+$ (25 eV), observado para o alcaloide <b>2</b> .	64
Figura 54	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>4</b> .	65
Figura 55	EM/EM-IES-(+) do íon molecular $m/z$ 298 $[M + H]^+$ (25 eV), observado para o alcaloide <b>4</b> .	66
Figura 56	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>5</b> .	67
Figura 57	EM/EM-IES-(+) do íon molecular $m/z$ 326 $[M + H]^+$ (25 eV), observado para o alcaloide <b>5</b> .	67
Figura 58	Análise conformacional dos alcaloides homólogos <b>4</b> e <b>5</b> .	68
Figura 59	Mecanismo de acilação dos alcaloides homólogos <b>4</b> e <b>5</b> .	69
Figura 60	EM-IES-(+) em alta resolução do derivado 3- <i>O</i> -acetil-6- <i>iso</i> -cassina ( <b>60</b> ).	70
Figura 61	EM/EM-IES-(+) do íon molecular $m/z$ 340 $[M + H]^+$ (25 eV), observado para o derivado 3- <i>O</i> -acetil-6- <i>iso</i> -cassina ( <b>60</b> )	71
Figura 62	Perfil de inibição da AChE para os alcaloides <b>1</b> e <b>4</b> .	72
Figura 63	Perfil de inibição da AChE para os alcaloides <b>2</b> e <b>5</b> .	72
Figura 64	Inibição da AChE pelos compostos <b>6</b> e <b>60</b> .	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação entre eutômero, distômero e a resposta biológica.	27
Tabela 2	Equipamentos disponíveis para realização desse trabalho.	46
Tabela 3	Massas obtidas da extração líquido-líquido do EEFl-Ss.	52
Tabela 4	Avaliação da atividade anticolinesterásica.	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh – Acetilcolina
- AChE – Acetilcolinesterase
- ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
- BChE – Butirilcolinesterase
- CC – Cromatografia em Coluna
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CG – Cromatografia a Gás
- CG-DIC – Cromatógrafo a Gás com Detector por Ionização em Chama
- CG-EM – Cromatografia a gás hifenada ao espectrômetro de massas
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DA – Doença de Alzheimer
- DTNB – 5,5-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
- EC<sub>50</sub> – Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
- ECA – Enzima Conversora de Angiostesina
- EEFI-Ss – Extrato Etanólico das Flores de *Senna spectabilis*
- ELSD - *evaporative light scattering detector*
- EM – Espectrometria de Massas
- EM- QTOF - Espectrometria de massa por tempo de voo
- EM-IE – Espectrometria de Massas por Ionização de Elétrons
- EM-IES – Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FE – Fase Estacionária
- FM – Fase Móvel
- HupA – Huperzina A
- IACHe – Inibidores da Acetilcolinesterase
- IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para inibição de 50% do parasita
- IClPt – Revelador Iodocloroplatinato
- IQ – Instituto de Química
- NuPpEN – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
- PN – Produtos Naturais
- R<sub>f</sub> – Fator de retenção

SNC – Sistema Nervoso Central

TCh – Tiocolina

TNB – ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

$t_R$  – tempo de retenção

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1	<i>Senna spectabilis</i> e os alcaloides piperidínicos	19
1.2	Estereoquímica de compostos bioativos	22
1.2.1	Racemato: eutômero e distômero	26
1.2.2	Racematos cujos estereoisômeros apresentam a mesma resposta biológica	30
1.2.3	Racematos cujos estereoisômeros atuam em alvos diferentes	30
1.2.4	Racematos em que os estereoisômeros se interconvertem	31
1.2.4.1	Unidirecional	31
1.2.4.2	Bidirecional	32
1.2.5	Regulamentação dos fármacos quirais	32
1.3	Doença de Alzheimer e os inibidores da Acetilcolinesterase	33
1.3.1	Alcaloides inibidores da ache	36
1.3.1.1	Fisostigmina	36
1.3.1.2	Galantamina	37
1.3.1.3	Huperzina A	38
1.3.1.4	Rivastigmina	39
1.3.1.5	Tacrina	39
1.3.1.6	Donepezil	40
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
2.1	Objetivos específicos	42
<b>3</b>	<b>MATERIAIS</b>	<b>43</b>
3.1	Solventes	43
3.2	Reagentes	43

3.3	Cromatografia	43
3.3.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	43
3.3.2	Preparo do revelador iodocloroplatinato (ICIPT)	44
3.3.3	Preparo do revelador dragendorff	44
3.3.4	Cromatografia em coluna (CC)	44
3.3.5	Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)	44
3.3.6	Cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM)	45
3.4	Análises espectrométricas e espectroscópicas	46
3.5	Equipamentos utilizados	46
4	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	47
4.1	Preparo do material vegetal e obtenção do extrato	47
4.2	Fracionamento do extrato etanólico das flores de <i>S. Spectabilis</i>	47
4.3	Metodologia sintética	48
4.3.1	Preparação do cloridrato	48
4.3.2	Síntese dos derivados acetilados	49
4.4	Atividade biológica	50
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	52
5.1	Fracionamento do extrato etanólico de <i>S. Spectabilis</i>	52
5.2	Análise do extrato etanólico e das frações de <i>S. Spectabilis</i>	52
5.3	Isolamento dos alcaloides da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	53
5.4	Elucidação estrutural dos alcaloides	62
5.4.1	Espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i>	62
5.4.1.1	Elucidação estrutural do alcaloide <b>1</b> por EM-IES	62
5.4.1.2	Elucidação estrutural do alcaloide <b>2</b> por EM-IES	63
5.4.1.3	Elucidação estrutural do alcaloide <b>4</b> por EM-IES	65



<b>5.4.1.4</b>	Elucidação estrutural do alcaloide <b>5</b> por EM-IES	66
<b>5.5</b>	Síntese dos derivados acetilados	68
<b>5.5.1</b>	Elucidação estrutural do derivado <b>60</b>	70
<b>5.6</b>	Atividade anticolinesterásica	71
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	74
	<b>REFERÊNCIAS</b>	75

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais (PN) são usados como fonte terapêutica no tratamento de diversas enfermidades pela humanidade há aproximadamente 5000 anos tendo como primeiro registro as tábuas de Clay (2400 a.C.) (DAVID et al., 2014) e, mesmo com o passar do tempo, continuam desempenhando um papel fundamental como medicamentos ou, ainda, como modelos no desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY et al., 2015).

De acordo com Yuliana e colaboradores (2011) o intervalo entre 1981 e 2002 gerou pelo menos 877 novos medicamentos dos quais 6% são PNs e outros 27% são de medicamentos derivados de produtos naturais. Atualmente, estimativas mostram que, ao longo dos últimos 34 anos, cerca de 60% de todos os fármacos aprovados tiveram sua origem em PNs (NEWMAN; CRAGG, 2016). Dados como estes têm atraído grande interesse para pesquisas de compostos bioativos (YULIANA et al., 2011).

Mesmo com o crescente interesse na pesquisa em PNs, apenas 5% de toda biodiversidade do planeta foi estudada. Além disso, muitos estudos não exploram todo o potencial químico e farmacológico das espécies (SARKER; NAHAR, 2012). Assim, a exploração racional da biodiversidade brasileira ainda é um tema recorrente e merece investimento visando a busca de novos compostos com potencial farmacológico (BOLZANI et al., 1999).

Essa exploração racional se faz ainda mais importante ao saber que o Brasil hoje conta com dois biomas que são considerados *hotspots*, (denominação dada para áreas com grande biodiversidade) ricas em espécies endêmicas, mas que apresentam alto nível de desmatamento, como o Cerrado e a Mata Atlântica (MMA, 2017).

Dificuldades como o baixo rendimento, o tempo necessário para o isolamento e purificação e a alta toxicidade dos compostos são barreiras a serem transpostas na pesquisa em PN (DAVID et al., 2014). Todavia, mesmo com todas essas dificuldades as pesquisas com PNs continuam crescendo e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos (NGO et al., 2013). Isso se deve em grande parte ao fato da complexidade estrutural que esses compostos apresentam como a presença de centros assimétricos e heterociclos, muitas vezes necessárias nas estruturas dos fármacos, para o reconhecimento biológico (FEHER; SCHIMIDT, 2003).

A presença de centros assimétricos pode conferir quiralidade à molécula, sendo um importante ponto a ser considerado no estudo farmacológico, uma vez que os estereoisômeros

podem apresentar diferenças consideráveis na atividade biológica, interferindo nas fases farmacodinâmica e farmacocinética (CHHABRA et al., 2019). Essas diferenças estão relacionadas ao fato de que receptores biológicos como as enzimas, apresentam sítios ativos estereoespecíficos que geralmente tem maior afinidade por um dos estereoisômeros (BROOKS et al., 2011).

### 1.1 *SENNA SPECTABILIS* E OS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS

*Senna spectabilis* (sin. *Cassia spectabilis* e *C. excelsa*) (Figura 1), pertence à família Fabaceae, de porte médio (6 a 9 metros). Popularmente é conhecida como são-joão, cássia do nordeste, canafistula-de-besouro e pau-de-ovelha. É uma árvore endêmica muito comum em regiões tropicais e subtropicais como o Cerrado (LORENZI, 2002).

**Figura 1** – *Senna spectabilis*: detalhes da planta, flores, frutos, sementes, casca e madeira



Fonte: Lorenzi (2002).

Do ponto de vista químico e farmacológico, *Senna spectabilis* é uma das espécies mais importantes dentro do gênero *Senna*, visto que é fonte de alcaloides piperidínicos que apresentam comprovada atividade biológica como: leishmanicida, antimalárica, anticolinesterásica, entre outras (LACERDA et al., 2018; DANUELLO et al., 2012; PIVATTO et al., 2014; VIEGAS JÚNIOR et al., 2005). A atividade sobre o sistema nervoso central (SNC), torna esses metabólitos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas (CASTRO et al., 2008). Assim, testes realizados em camundongos mostraram que estes compostos diminuíram a atividade cerebral atuando como ansiolíticos e sedativos (SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2011b)

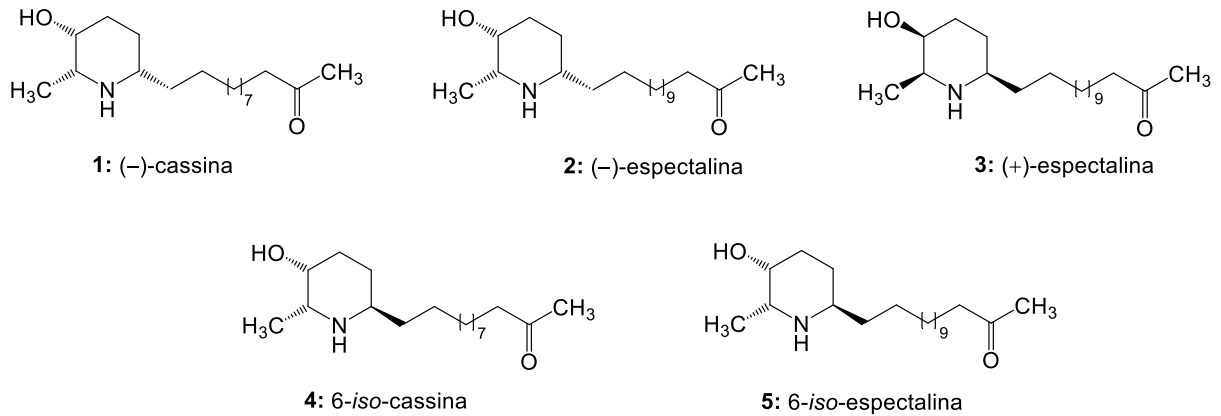
Os metabólitos de maior interesse nesta espécie são os alcaloides piperidínicos homólogos (-)-cassina (**1**) e (-)-espectralina (**2**) (Figura 2), que são majoritários e podem ser isolados dos extratos etanólicos dos diferentes órgãos da planta (PIVATTO et al., 2014).

O alcaloide **1** foi isolado pela primeira vez por Highet (1964), das folhas de *Cassia excelsa*, mas sua configuração absoluta só foi estabelecida por Rice e Coke (1966). Mais tarde Bolzani e colaboradores (1995), estudando as folhas de *C. spectabilis*, relataram o isolamento de diversos alcaloides piperidínicos e dentre eles a (-)-espectralina (**2**), que é homólogo de **1** (Figura 2) (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004).

É importante destacar ainda que alguns destes estudos foram realizados com as misturas dos homólogos (**1** e **2**) (MELO et al., 2014; CASTRO et al., 2016). No entanto, os ensaios biológicos dos homólogos separados, têm apresentado resultados com diferenças significativas (DANUELLO et al., 2012; PIVATTO et al., 2014; FREITAS et al., 2018; LACERDA et al., 2018).

Aliado a estes dados é importante ressaltar que ao longo dos estudos químicos realizados com *S. spectabilis*, Christofidis e colaboradores (1977) relataram o isolamento da (+)-espectralina (**3**) (Figura 2), que é enantiômero de **2** (homólogo de **1**). Estes autores também relataram o isolamento de um diastereoisômero de **1** (epímero no C-6), denominado 6-*iso*-cassina (**4**). Mais tarde, Viegas Júnior e colaboradores (2004) isolaram um homólogo de **4**, denominado 6-*iso*-espectralina (**5**) (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004).

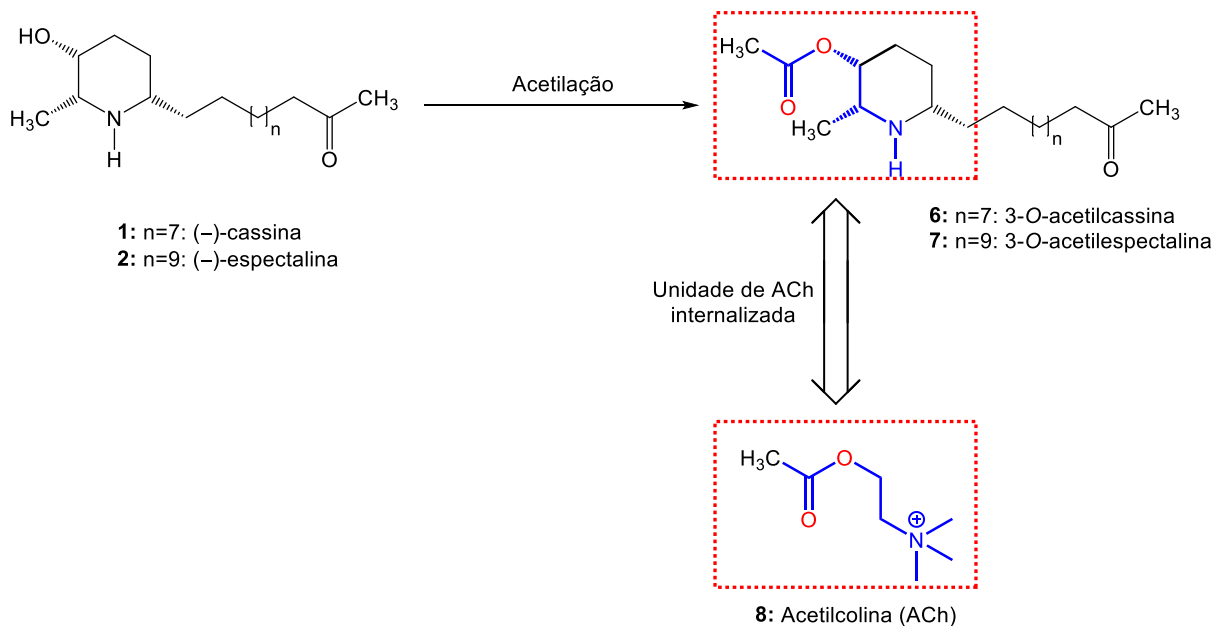
**Figura 2** – Alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis*



Fonte: o autor.

Segundo Freitas e colaboradores (2018), os alcaloides piperidínicos homólogos, obtidos de *S. spectabilis* apresentam atividade anticolinesterásica com potência diferente entre os homólogos **1** ( $IC_{50}$  0,29  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e **2** ( $IC_{50}$  0,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), o que mostra a importância do estudo destes compostos separadamente. Também foi observado em estudos anteriores que os derivados acetilados **6** e **7** apresentam uma unidade de acetilcolina (ACh) internalizada o que pode justificar a interação destes compostos com a acetilcolinesterase (AChE) (Figura 3) (CASTRO et al., 2008; DANUELLO et al., 2012; VIEGAS JÚNIOR et al., 2005).

**Figura 3** – Unidade de ACh internalizada nas estruturas de **6** e **7**

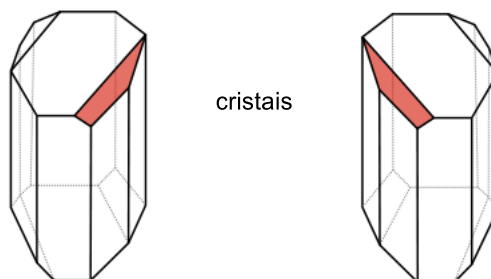
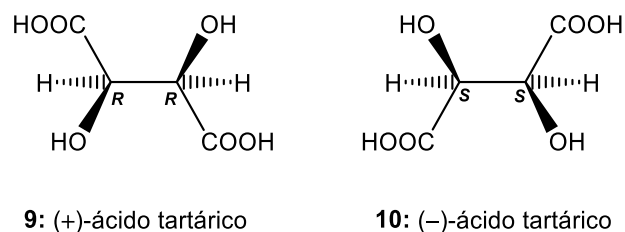


Fonte: o autor.

## 1.2 ESTEREOQUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Em 1849 Louis Pasteur conseguiu separar mecanicamente com o auxílio de uma lupa e pinça os enantiômeros do ácido tartárico e observou que os mesmos possuíam as mesmas propriedades físicas, diferenciando apenas no desvio do plano da luz polarizada, ali Pasteur havia descoberto espécies que ele denominou quirais (Figura 4) (GAL, 2017). A quiralidade remonta ao estereoisomerismo, que por definição é um tipo de isomeria ótica em que as moléculas são idênticas estruturalmente, apresentando diferenças apenas em seu arranjo tridimensional (CHHABRA et al., 2019).

**Figura 4** – Cristais do ácido tartárico separados por Pasteur

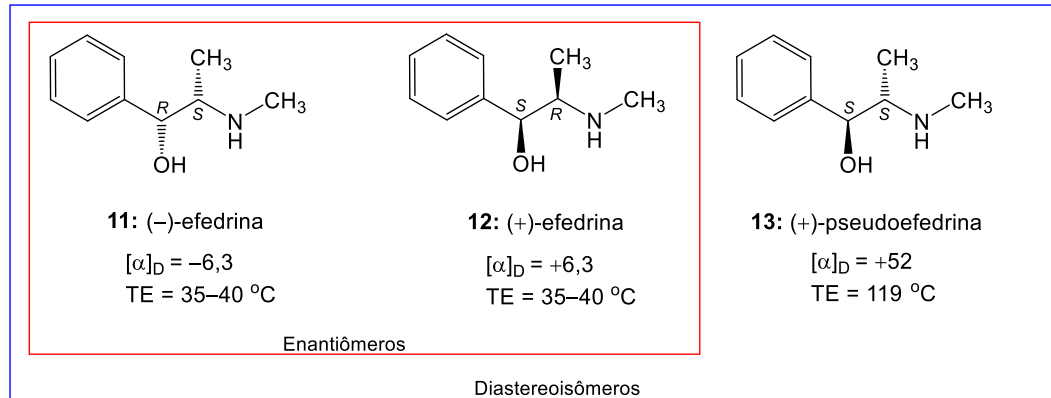


Fonte: modificado de Tobe (2003).

Os estereoisômeros podem ser divididos entre enantiômeros e diastereoisômeros. Os enantiômeros apresentam uma relação onde uma das moléculas é a imagem especular da outra, apresentando as mesmas propriedades físicas tais como temperatura de fusão, temperatura de ebulição, pKa, solubilidade, entre outros (CHHABRA et al., 2019). No entanto, os diastereoisômeros são aqueles estereoisômeros que não apresentam relação de objeto e imagem especular, ocorrendo apenas para espécies que contêm mais de um carbono assimétrico, gerando um fator de  $2^n$  estereoisômeros, sendo  $n$  o número de carbonos assimétricos na molécula (LIN et al., 2011). Diferente dos enantiômeros, os diastereoisômeros apresentam diferenças significativas em suas propriedades físicas (SOLOMONS; CRAIG, 2012). Na Figura 5 é mostrado um esquema para ilustrar as relações entre os diferentes estereoisômeros da efedrina utilizado como vasoconstritor (BELZARENA, 2006).

Os compostos **11**, **12** e **13** apresentam dois carbonos assimétricos, o que possibilitam a existência de até quatro estereoisômeros.

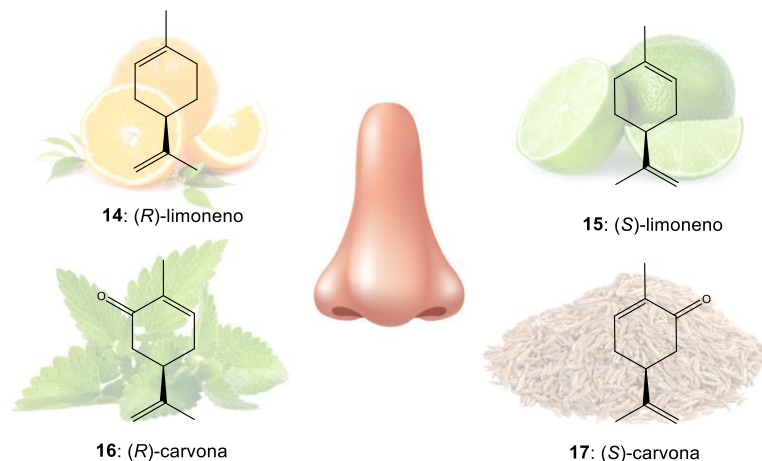
**Figura 5** – Estereoisômeros: enantiômeros e diastereoisômeros



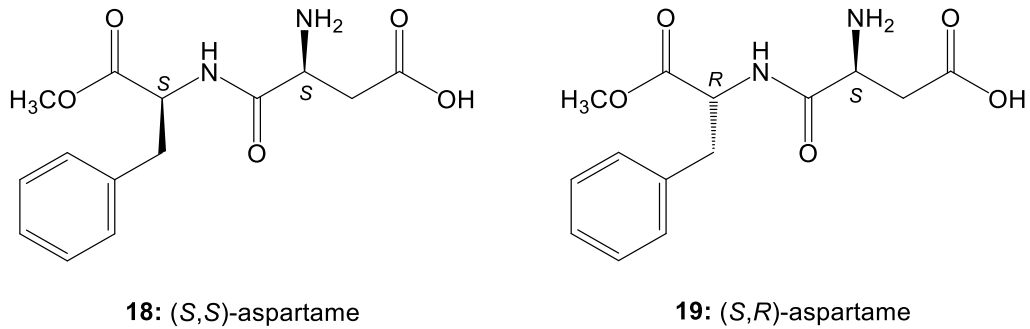
Fonte: o autor.

Mesmo com as mesmas propriedades físicas, enantiômeros podem apresentar comportamentos diferentes em relação a interação com sistemas biológicos (CHHABRA et al., 2019), isso fica claro quando comparamos o comportamento de moléculas como o limoneno (**14** e **15**) e a carvona (**16** e **17**) em suas diferentes configurações (Figura 6), que são distinguidas através do olfato humano (PATOČKA; DVOŘEK, 2004). De forma semelhante, os diastereoisômeros do aspartame apresentam respostas sensoriais diferentes ao paladar, enquanto o (*S,S*)-aspartame (**18**) apresenta um sabor doce, seu diastereoisômero (*S,R*)-aspartame (**19**) tem um sabor amargo desagradável (Figura 7) (BOUAYAD-GERVAIS; LUBELL, 2013).

**Figura 6** – As diferenças estereoquímicas e as respostas através da sensibilidade olfativa

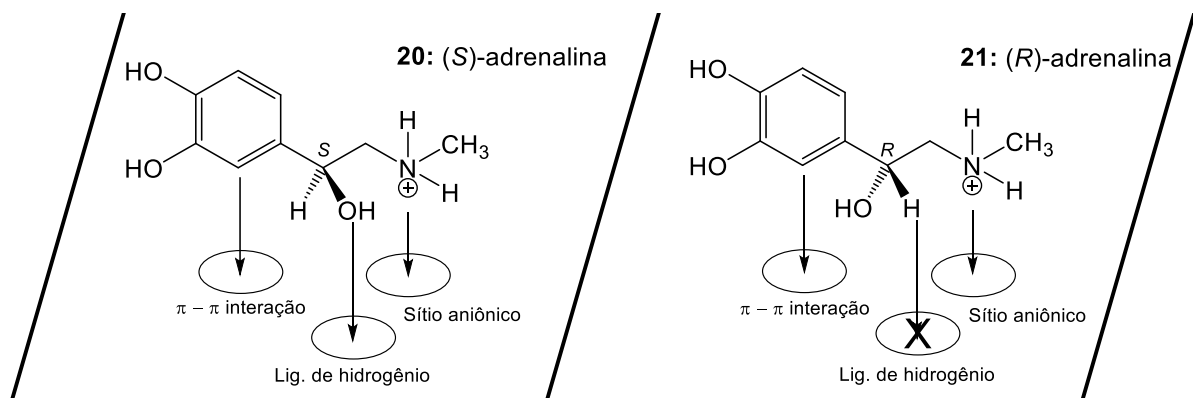


Fonte: o autor.

**Figura 7 – Diastereoisômeros do aspartame**

Fonte: o autor.

O corpo humano é repleto de componentes estereoespecíficos que interagem com substratos quirais de maneira estereoseletiva proporcionando respostas ao organismo de acordo com estas interações (SEKHON, 2013). Essa sensibilidade às diferenças químicas é que permite o reconhecimento dos diferentes aromas proporcionados pelos diferentes enantiômeros do limoneno e de carvona (BARREIRO, 1997). Sabe-se que com a mudança da configuração absoluta dos centros estereogênicos há a mudança no arranjo molecular, o que pode ser melhor visualizado pelo modelo de Beckett que mostra como essas alterações influenciam na interação do substrato com o sistema biológico. Através desse modelo é possível observar que a molécula da (*S*)-adrenalina (**20**) interage em três pontos com o biorreceptor. Assim, qualquer mudança na configuração absoluta do carbono assimétrico, como é o caso da (*R*)-adrenalina (**21**), impede que as ligações sejam complementares ao seu receptor (Figura 8) (BECKETT, 1959).

**Figura 8 – Modelo de Beckett para os estereoisômeros da adrenalina**

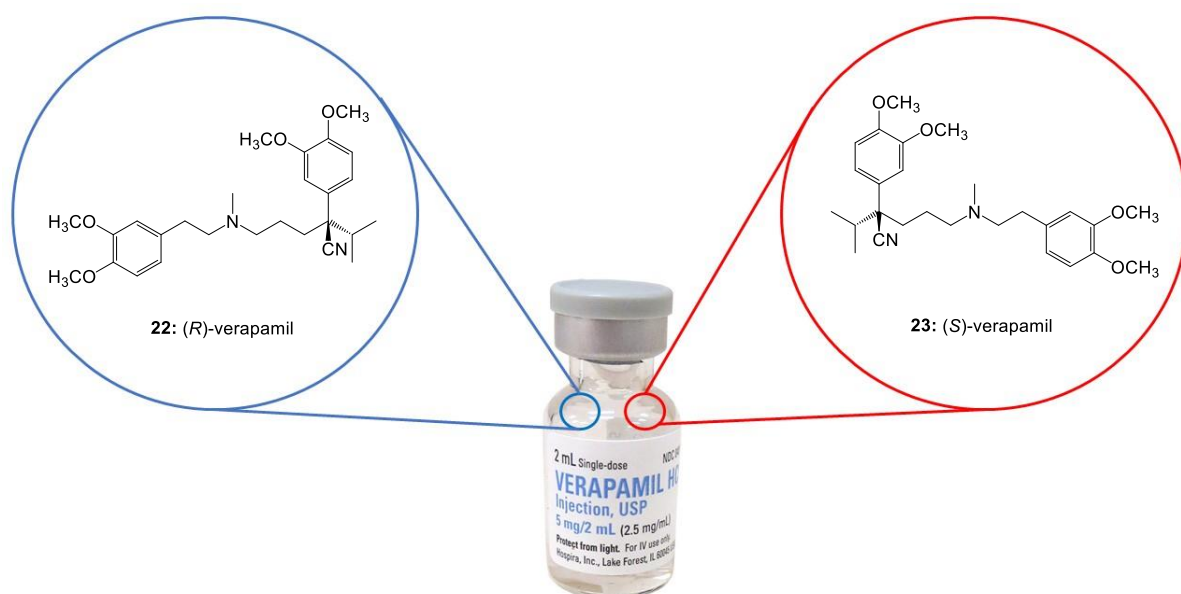
Fonte: modificado de Beckett (1959).



As diferenças na estereoquímica não se atêm apenas aos aromas ou sabores, ela possui amplo espaço no desenvolvimento de fármacos. Em 1986 Ariens escreveu que a estereoquímica era uma fonte de problemas para a química medicinal (RAPPOSELLI, 2011) entretanto, a quiralidade das moléculas passou a ser um importante aspecto a ser considerado no estudo e desenvolvimento de fármacos (ISLAM et al., 1997).

Os estereoisômeros podem apresentar diferenças nas fases farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação - ADME) e farmacodinâmica (interação com sistemas biológicos) (CHHABRA et al., 2019). Um exemplo de diferença farmacocinética, está relacionado a biodisponibilidade do verapamil, medicamento utilizado como anti-hipertensivo, em que o (*R*)-verapamil (**22**) é absorvido quase duas vezes mais rápido pelo metabolismo de primeira passagem no fígado, que o (*S*)-enantiômero (**23**) (SEKHON, 2013). No entanto, este fármaco é vendido na forma de racemato, mesmo sabendo que a potência do (*S*)-verapamil é cerca de 20 vezes superior ao (*R*)-verapamil (Figura 9) (NGUYEN et al., 2006).

**Figura 9** – Estereoisômeros do fármaco verapamil

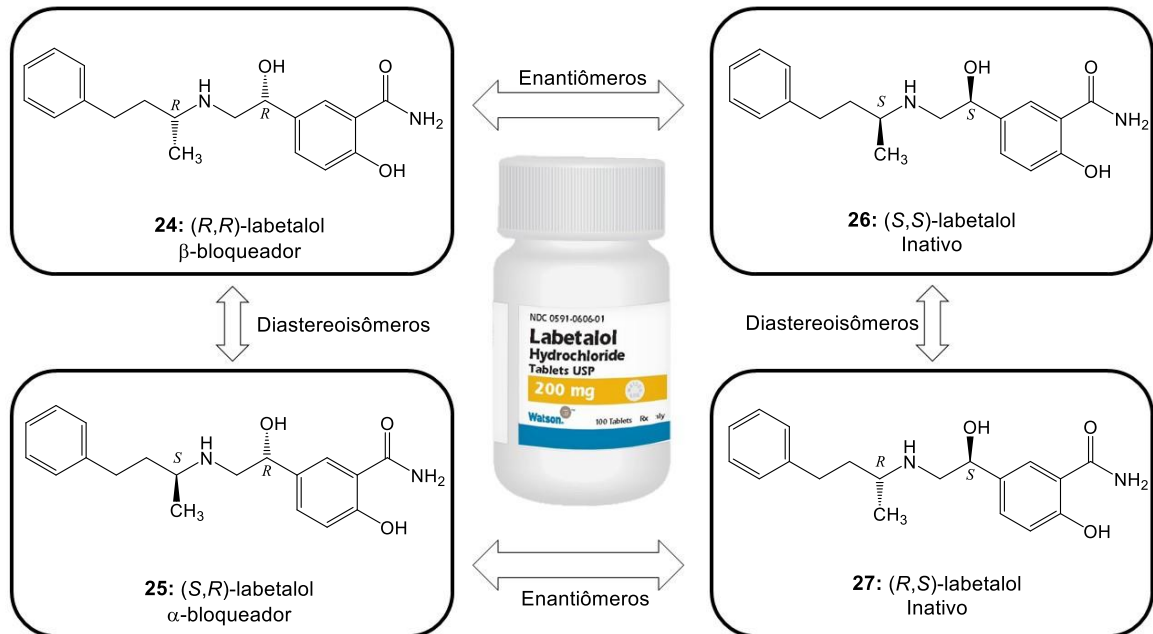


Fonte: o autor.

O labetalol é um fármaco anti-hipertensivo, que têm dois centros estereogênicos, e, portanto, quatro estereoisômeros diferentes. Destes, o (*R,R*)-labetalol (**24**) e o (*S,R*)-labetalol (**25**) são  $\beta$  e  $\alpha$  bloqueadores, respectivamente, enquanto que (*S,S*)-labetalol (**26**) e o

(*R,S*)-labetalol (**27**) são inativos, vale salientar que mesmo com essas diferenças o fármaco é vendido como uma mistura dos quatro estereoisômeros (Figura 10) (LIMA, 1997).

**Figura 10** – Estereoisômeros do labetalol



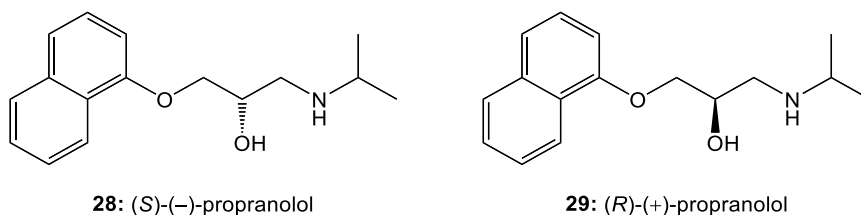
Fonte: o autor.

Dentre os fármacos que são comercializados em misturas racêmicas, aquelas moléculas responsáveis pela maior atividade biológica ou pela atividade desejada são chamados de eutômeros (enantiômero terapeuticamente útil de um fármaco, que apresenta maior afinidade e potência pelos receptores-alvo), e aquelas moléculas responsáveis pela atividade biológica indesejada são chamados de distômeros (enantiômero de menor, ou nenhuma afinidade pelo biorreceptor) (SEKHON, 2013; BARREIRO, 2015).

De acordo com Lima (1997), Nguyen e colaboradores (2006) e Sekhon (2013) as misturas racêmicas podem ser divididas da seguinte forma:

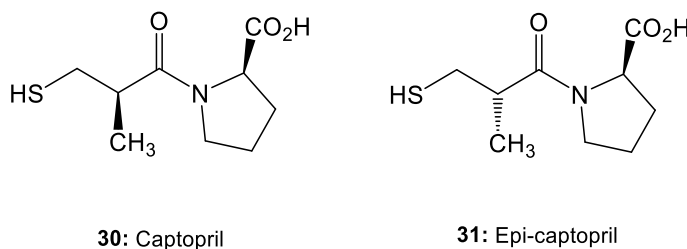
### 1.2.1 RACEMATO: EUTÔMERO E DISTÔMERO

O propranolol é um exemplo de β-bloqueador, utilizado para controle da pressão, em que o (*S*)-(-)-propranolol (**28**) (eutômero) é cerca de 100 vezes mais potente que o (*R*)-(+)-propranolol (distômero) (**29**) (Figura 11) (BORTOLOTTI; COLOMBO, 2009).

**Figura 11** – Estereoisômeros do propranolol

Fonte: O autor.

Os estereoisômeros do captopril, fármaco utilizado para o controle da pressão, representam um exemplo interessante, onde o captopril (**30**) é um potente inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), enquanto que o diastereoisômero epi-captopril (**31**) apresenta menor potencial de inibição da ECA (Figura 12) (NGUYEN et al., 2006; BARREIRO; FRAGA, 2015).

**Figura 12** – Diastereoisômeros do captopril

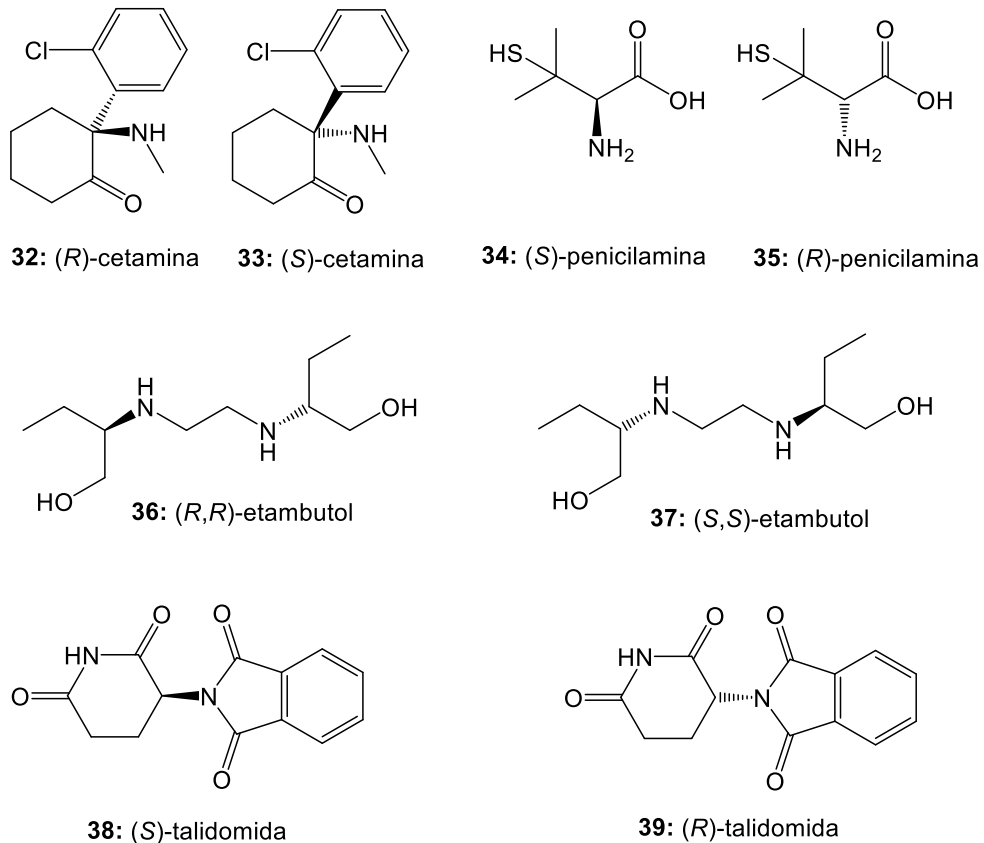
Fonte: O autor.

No entanto, dentro de algumas misturas racêmicas, um dos estereoisômeros pode apresentar efeito farmacológico, enquanto o distômero pode apresentar efeito adverso (Tabela 1) (SEKHON, 2013).

**Tabela 1** – Relação entre eutômero, distômero e a resposta biológica.

Fármaco	Eutômero	Resposta biológica	Distômero	Efeitos adversos
Cetamina®	(S)-(+)-Cetamina ( <b>32</b> )	Anestésico e analgésico	(R)-(-)-Cetamina ( <b>33</b> )	Alucinação e agitação
Penicilamina	(S)-Penicilamina ( <b>34</b> )	Antiartrítico	(R)-Penicilamina ( <b>35</b> )	Extremamente tóxico
Etambutol	(S,S)-Etambutol ( <b>36</b> )	Tuberculostático	(R,R)-Etambutol ( <b>37</b> )	Causa cegueira
Talidomida	(R)-Talidomida ( <b>38</b> )	Sedativo e efetivo contra enjoos matinais	(S)-Talidomida ( <b>39</b> )	Teratogênico

Fonte: Sekhon, 2013.

**Figura 13** – Racematos dos fármacos mostrados na Tabela 1

Fonte: o autor.

Merece destaque a tragédia que envolveu a talidomida (**38/39**). Nos anos 1950 foi tratada como um fármaco mágico, com características sedativa e hipnótica. Em 1956, teve seu lançamento no mercado farmacêutico sendo vendida como antigripal, logo depois a foi lançada como medicamento sedativo, o Contergran<sup>®</sup>, este medicamento veio junto de grandes estratégias publicitárias trazendo a ideia de que o fármaco em questão era seguro (Figura 14) (MORO; INVERNIZZI, 2017). Além destas características, a talidomida apresentava um grande atrativo para as gestantes, que era a capacidade de diminuir drasticamente o enjoo matinal. No entanto, o uso desse medicamento causou a má formação fetal de 10 a 15 mil crianças, sendo que destas cerca de 40% morreram no primeiro ano de vida (VIANNA et al., 2014).

Com sua fabricação proibida logo no início da década de 60 a talidomida mostrou ser um trágico exemplo da importância e necessidade de se estudar os fármacos quirais em maior profundidade, sendo o marco para o aumento da rigidez pelos órgãos regulamentatórios dos fármacos quirais (MORO; INVERNIZZI, 2017).

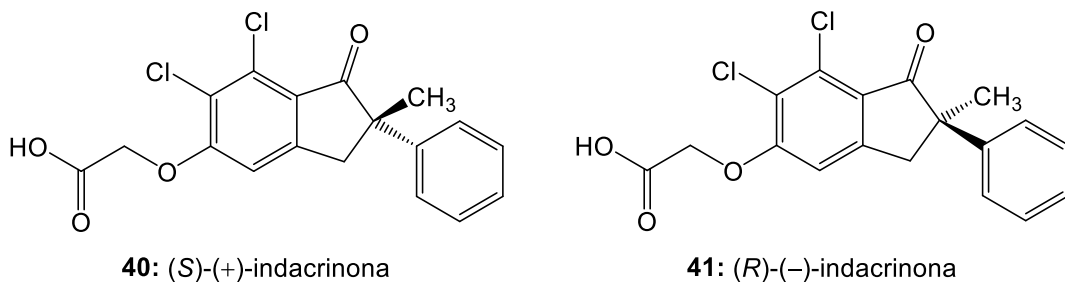
**Figura 14** – Propaganda alemã do medicamento Contergan®

Fonte: Clemens Kirchner, 2017.

Nota: Tradução do texto: **A)** A sorte: Felizmente, um mensageiro perdeu uma caixa cheia de pílulas muito eficazes para dormir: se tratava da talidomida como não era tóxica não precisou alarmar a polícia ou o rádio. **B)** Mais sorte: mas o mais sortudo foi aquele que encontrou, ele vai descansar e dormir bem à noite. Se, no entanto, ele acordar com a consciência pesada perceberá, que está apenas dormindo. **C)** E com Contergan, não há desespero.

É possível observar ainda o exemplo da indacrinona em que a (*S*)-(+)-indacrinona (**40**), que é o eutômero, apresenta efeito diurético, mas que também promove a retenção de ácido úrico, enquanto que o distômero levogiro (**41**), reduz o nível de ácido úrico (Figura 15) (THALL, 1996).

**Figura 15** – Enantiômeros da indacrinona

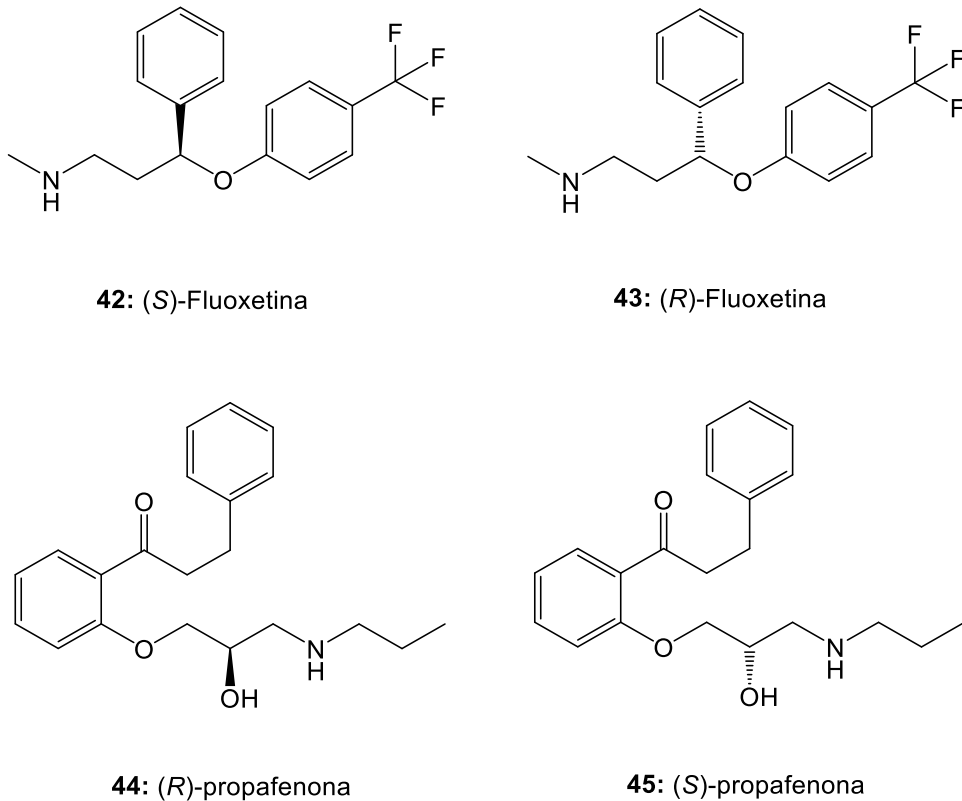


Fonte: o autor.

### 1.2.2 RACEMATOS CUJOS ESTEREOISÔMEROS APRESENTAM A MESMA RESPOSTA BIOLÓGICA

Dois exemplos de medicamentos vendidos na forma de racemato onde os estereoisômeros possuem bioequivalência são o propafenona (**42** e **43**) (antiarrítmico) e fluoxetina (**44** e **45**) (antidepressivo) (Figura 16) (SEKHON, 2013).

**Figura 16** – Estruturas dos enantiômeros da propafenona e fluoxetina

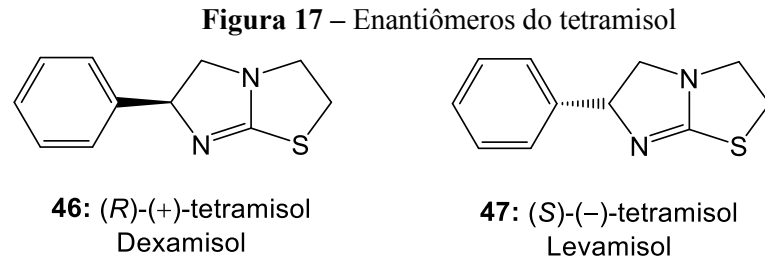


Fonte: o autor.

### 1.2.3 RACEMATOS CUJOS ESTEREOISÔMEROS ATUAM EM ALVOS DIFERENTES

Algumas misturas racêmicas podem apresentar estereoisômeros que atuam em alvos completamente diferentes no organismo, como o tetramisol, em que os enantiômeros são vendidos purificados com os nomes Dexamisol<sup>®</sup> (**46**) e Levamisol<sup>®</sup> (**47**), observe que os prefixos são relativos à rotação específica apresentada pelas espécies (Figura 17) (WOLFORD et al., 2012). Cada um desses fármacos era vendido com um fim específico a espécie levogira de configuração absoluta *S* era vendida para fins anti-helmínticos, enquanto a

espécie dextrogira de configuração absoluta *R* possuía comprovada atividade quando usada como antidepressivo (LIMA, 1997; SEKHON, 2013).



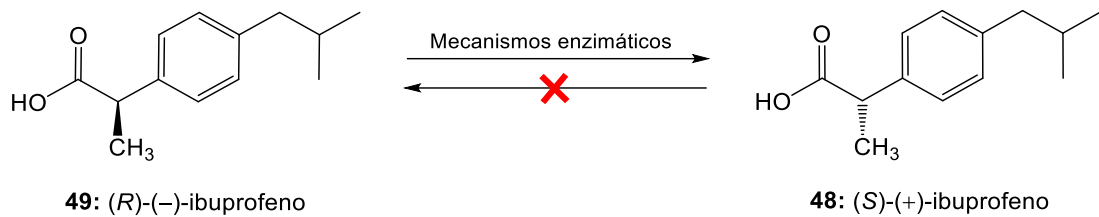
Fonte: o autor.

#### 1.2.4 RACEMATOS EM QUE OS ESTEREOISÔMEROS SE INTERCONVERTEM

O processo de interconversão é uma característica das moléculas quirais que permite a conversão de um estereoisômero no outro (inversão da configuração). Dependendo das condições, pode ocorrer de forma unidirecional onde apenas uma espécie se converte na outra ou bidirecional onde a interconversão é não seletiva e pode ocorrer para ambas espécies estereoisoméricas (LIMA, 1997).

##### 1.2.4.1 Unidirecional

O ibuprofeno é um exemplo de fármaco que apresenta interconversão unidirecional, e que têm potência diferente entre os estereoisômeros, sendo que o (*S*)-ibuprofeno (eutômero) (**48**), é cerca de 100 vezes mais potente que o (*R*)-ibuprofeno (distômero) (**49**) (NGUYEN et al., 2006). No entanto, mesmo com tamanha diferença no organismo humano, é inviável a síntese estereoseletiva ou mesmo a separação dos enantiômeros uma vez que existem enzimas hepáticas no organismo humano capazes de interconverter o distômero (*R*) no eutômero (*S*), no entanto, o inverso não ocorre (Figura 18) (MARZO; HEFTMANN, 2002). Assim, é possível justificar a venda desses medicamentos como uma mistura racêmica (LIMA, 1997).

**Figura 18** – Interconversão unidirecional dos estereoisômeros do ibuprofeno

Fonte: Lima (1997).

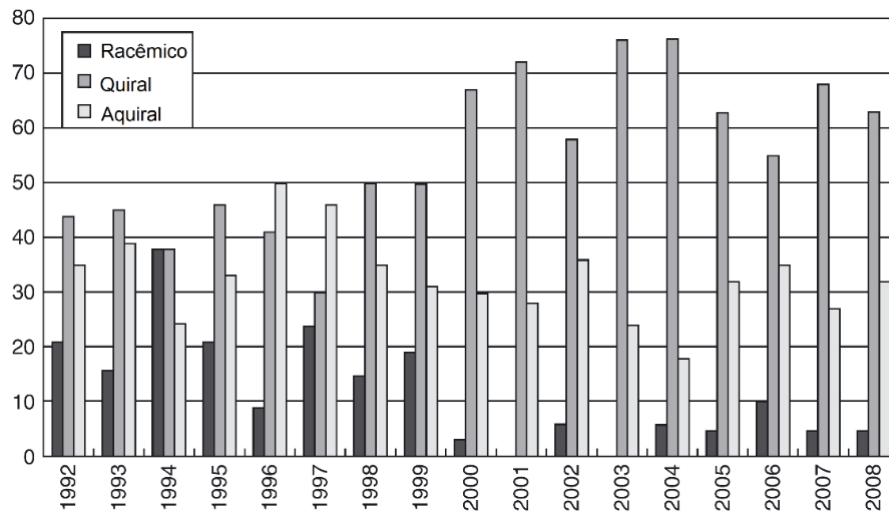
#### 1.2.4.2 Bidirecional

A talidomida além de ser antiemético apresenta um caráter imunomodulador, anti-inflamatório e anti-angiogênico, sendo muito efetiva em ensaios contra doenças autoimunes como o lúpus, ou contra artrites reumatóides e também contra alguns tipos de câncer (HUY et al., 1997). Estes dados despertaram novamente o interesse para a redescoberta da talidomida, assim os estereoisômeros foram separados e submetidos a estudos para verificar a relação entre as respostas adversas e cada um dos estereoisômeros (ROBIN et al., 1995). No entanto, foi observado que mesmo os isômeros isolados mostravam uma interconversão bidirecional ou também denominada racemização, o que torna esse fármaco inadequado para o uso em gestantes (NGUYEN et al., 2006).

#### 1.2.5 REGULAMENTAÇÃO DOS FÁRMACOS QUIRAIS

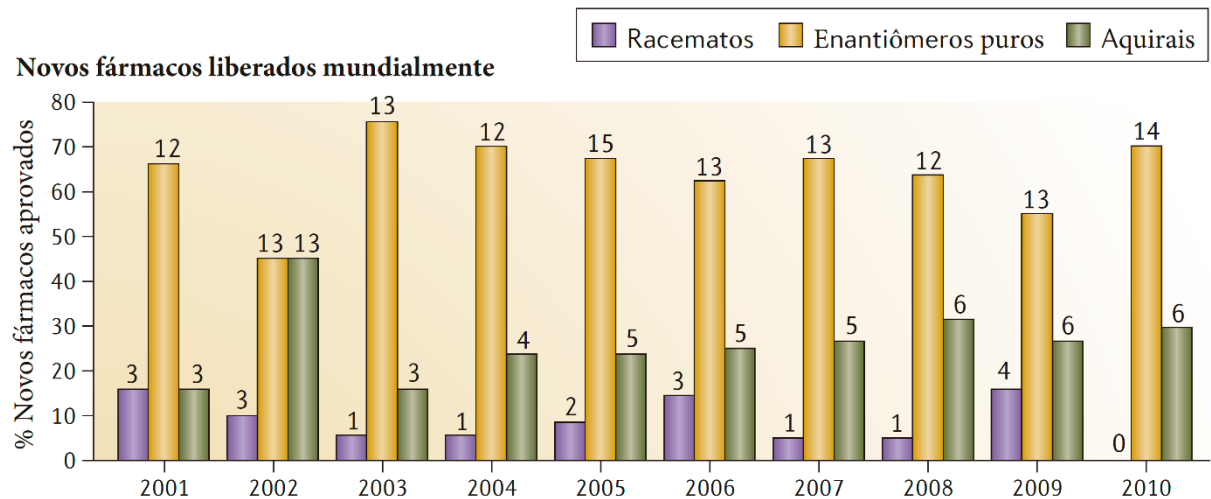
Até meados da década de 90 não existia regulamentação clara sobre os fármacos vendidos como racematos. No entanto foi em 1986 que um oficial do *Food and Drug Administration (FDA)* coloca como critério para a liberação de quaisquer fármacos o conhecimento do comportamento dos estereoisômeros de forma isolada (AGRANAT et al., 2012). Essa limitação causou uma queda considerável na venda daqueles fármacos comercializados como misturas racêmicas (Figura 19). No entanto, mesmo com as regulamentações sobre os fármacos quirais, estes são responsáveis por cerca de 50% do mercado farmacêutico (NGUYEN et al., 2006).



**Figura 19** – Fármacos aprovados pelo *FDA* entre os anos de 1992–2008

Fonte: Lin et al. (2011).

Dados mais recentes que relacionam a liberação de fármacos na forma racêmica, estereoisômero puro e aquirais, mostram uma tendência de queda dos medicamentos na forma de racematos e o crescente espectro mercadológico que os enantiômeros puros têm alcançado (Figura 20) (AGRANAT et al., 2012).

**Figura 20** – Porcentagem de fármacos liberados mundialmente entre os anos de 2001–2010

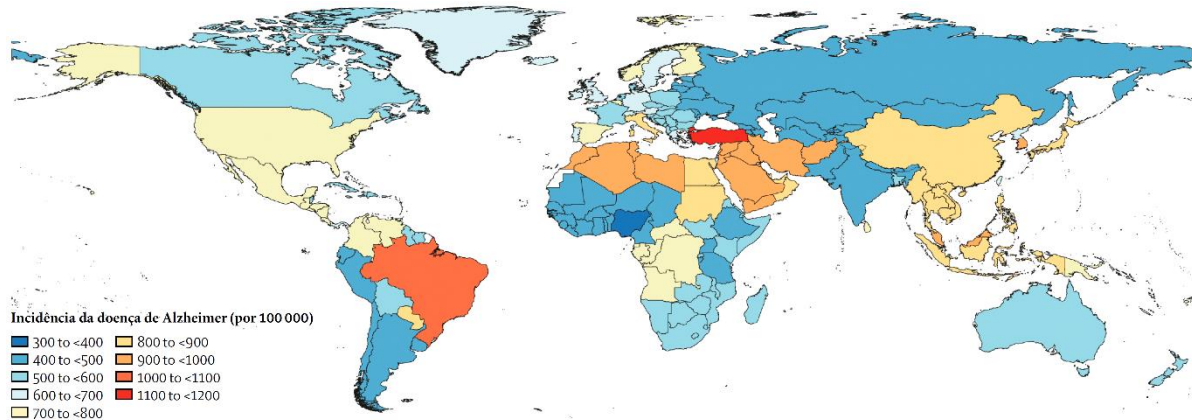
Fonte: Agranat et al. (2012).

### 1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER E OS INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE

Com o aumento da expectativa de vida, doenças que atingem o SNC também têm aumentado e uma delas é a doença de Alzheimer (DA). Segundo dados estatísticos a DA deve

atingir cerca de 114 milhões de pessoas até 2050 (PARK, 2010). De acordo com levantamento feito por Nichols (2018), o Brasil é um dos países mais afetados pela DA (Figura 21). O estudo relata ainda que nos últimos 30 anos a incidência de casos de demência mundial praticamente dobrou.

**Figura 21** – Disposição geográfica da doença de Alzheimer

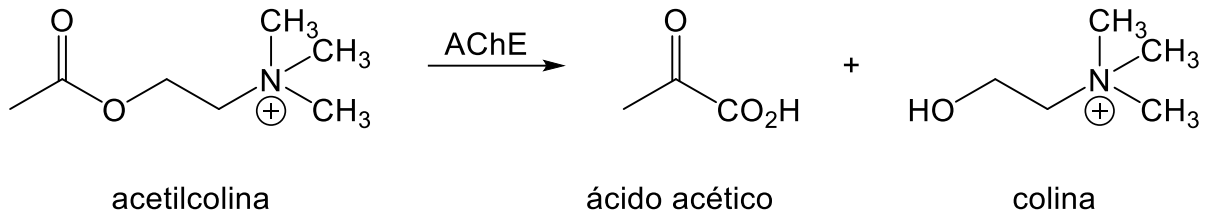


Fonte: Nichols (2018).

A DA é uma doença neurodegenerativa, que tem como sintomas a perda de memória, a dificuldade na coordenação motora além de afetar as funções cognitivas e emocionais (DANUELLO et al., 2012), acometendo principalmente pessoas com idade superior aos 65 anos (ADAMS et al., 2007). Em 2010, foi registrado que a DA havia afetado cerca de 36 milhões de pessoas (DALL'ACQUA, 2013).

A DA é uma doença multifatorial cuja causa ainda permanece em estudo, no entanto a hipótese colinérgica ainda é a melhor alternativa de tratamento paliativo, sendo nessa região que os fármacos atuais atuam. Segundo esse modelo, os pacientes apresentam baixa concentração de acetilcolina (ACh) no córtex (ADSERSEN et al., 2007), um neurotransmissor que atua nas fendas sinápticas como mensageiro químico (ARAÚJO et al., 2016). O déficit desse neurotransmissor está associado ao caráter regulador da acetilcolinesterase (AChE), que atua como catalisador na hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético (Figura 22) (DALL'ACQUA, 2013).

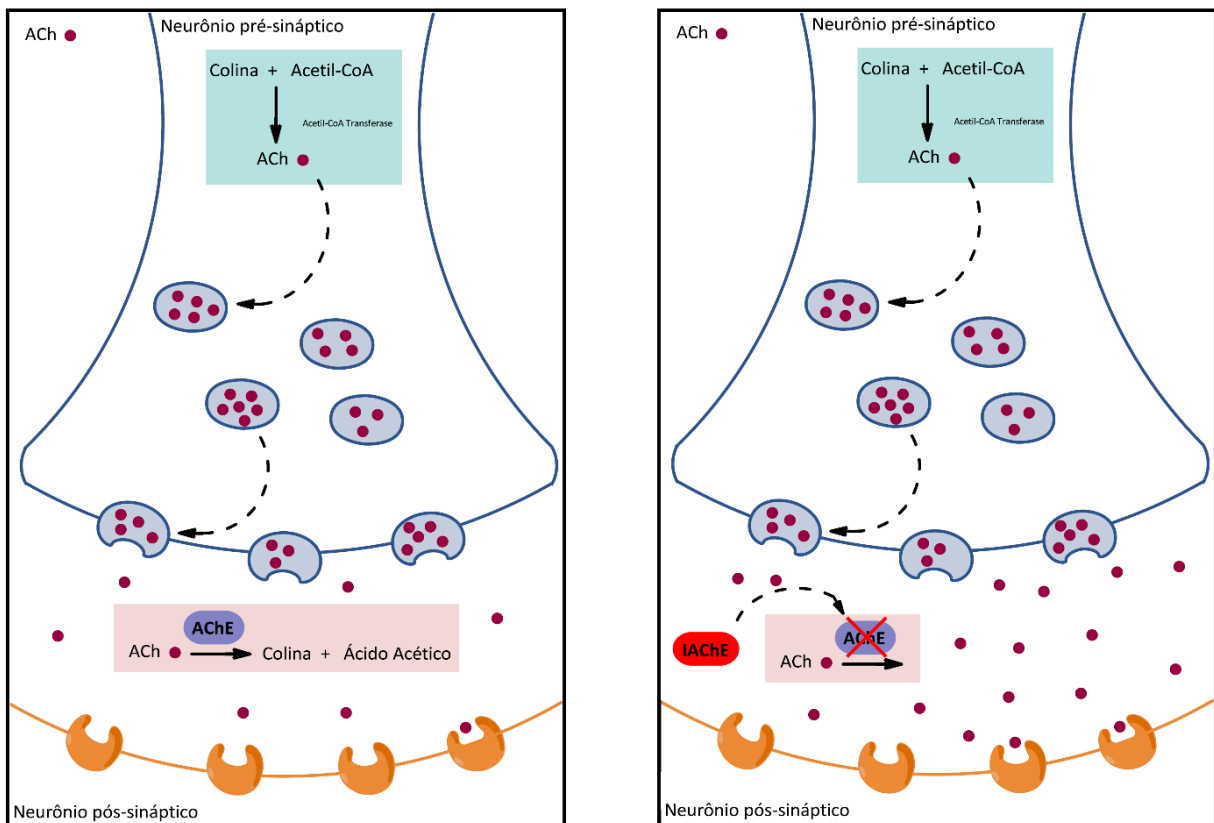
**Figura 22** – Hidrólise da acetilcolina catalisada pela acetilcolinesterase



Fonte: Araújo et al. (2016)

Os inibidores da acetilcolinesterase (IACHe) promovem o aumento do tempo de meia vida da ACh nas fendas sinápticas, o que causa um incremento na transmissão colinérgica (Figura 23). Essa é uma estratégia utilizada para o tratamento sintomático da DA, que permite diminuir a velocidade de avanço da doença (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004; DANUELLO et al., 2012; ADAMS et al., 2007).

**Figura 23** – Representação esquemática do comportamento da ACh com e sem inibição da AChE

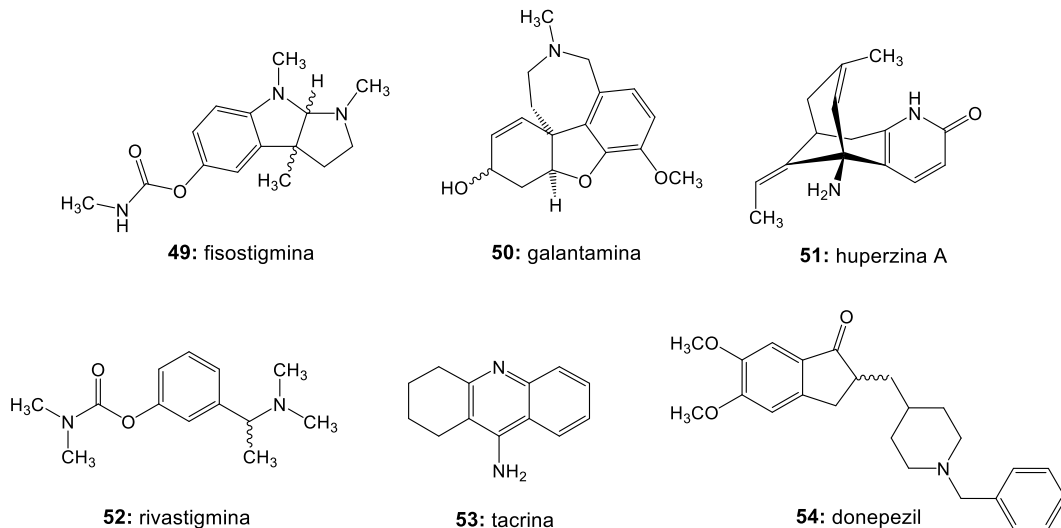


Fonte: Araújo et al. (2016).

### 1.3.1 ALCALOIDES INIBIDORES DA AChE

Sabe-se que um dos pontos de interação da ACh à AChE é o nitrogênio quaternário. Essa informação desperta o interesse para a avaliação dos alcaloides, como a fisostigmina (**49**), a galantamina (**50**) (Razadyne<sup>®</sup>) e a huperzina A (**51**) (Figura 24), que também são espécies nitrogenadas, como possíveis IACHÉ (KONRATH et al., 2013). Além destes, compostos sintéticos ou semissintéticos com a rivastigmina (**52**) (Exelon<sup>®</sup>) a tacrina (**53**) (Cognex<sup>®</sup>), e o donepezil (**54**) (Aricept<sup>®</sup>), também foram extensivamente estudados visando o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da DA (DANUELLO et al., 2012; MEHTA et al., 2011; ADAMS et al., 2007).

**Figura 24** – Agentes terapêuticos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer



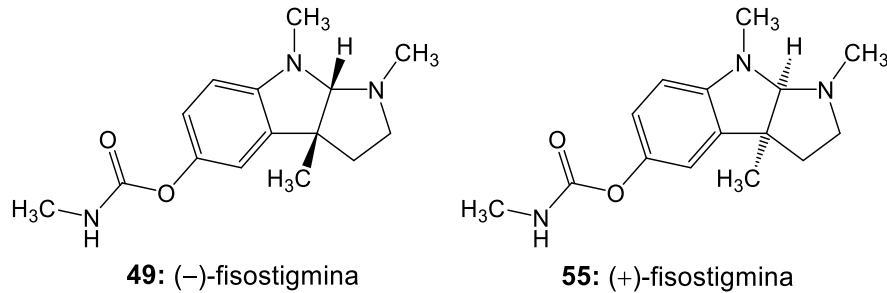
Fonte: o autor.

#### 1.3.1.1 Fisostigmina

A (-)-fisostigmina (**49**), isolada das sementes do *Physostigma venenosum*, teve sua atividade anticolinesterásica descoberta sessenta e três anos após seu isolamento por Loewi e Navratil (1926), sendo o primeiro alcaloide investigado como potencial fármaco para o tratamento dos sintomas da DA (TRIGGLE et al., 1998). Embora apresente importantes características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, seu desenvolvimento como medicamento foi interrompido por apresentar efeitos adversos como náusea, dor de cabeça, diarreia e tontura (DALL'ACQUA, 2013; MEHTA et al., 2011).

Estudos sintéticos chegaram ao enantiômero de **49**, a (+)-fisostigmina (**55**), não havendo relatos deste composto em *P. venenosum*. Ao avaliar a ação dos enantiômeros como inibidores da AChE foi observado que (-)-**49** (IC<sub>50</sub> 4,0 nM) é aproximadamente 1000 vezes mais potente que seu enantiômero (+)-**55** (IC<sub>50</sub> 0,5 μM) (Figura 25) (TRIGGLE et al., 1998).

**Figura 25** – Enantiômeros da fisostigmina

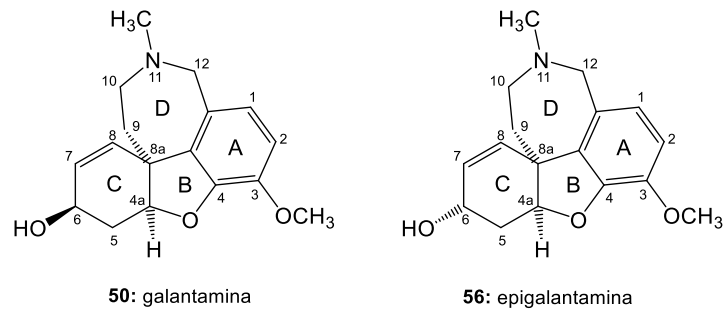


Fonte: o autor.

### 1.3.1.2 Galantamina

A galantamina (**50**) (Razadyne<sup>®</sup>) é um alcaloide de origem natural isolado das flores de *Galanthus nivalis* (Figura 12). Esse metabólito foi isolado por pesquisadores da União Soviética na década de 50, sendo aplicado inicialmente como anestésico e relaxante muscular (TEWARI et al., 2018). Mais tarde (1957) foi relatado como IChE por Mashkovsky e Kruglikova-Lvova (LEI et al., 2018). Aprovada pela FDA em 2001, a galantamina é um dos fármacos utilizados atualmente para o tratamento da DA (MEHTA et al., 2011), sendo inclusive utilizada como controle positivo em muitos ensaios para estudos de avaliação e triagem de novos compostos IChE (FREITAS et al., 2018).

Em 1990, um estudo foi publicado com o intuito de investigar quais seriam as diferenças farmacológicas entre **50** e seu diastereoisômero, a epigalantamina (**56**), um produto obtido por síntese (MARCO; CARREIRAS, 2006), enquanto IChE. Foi observado que **50** (EC<sub>50</sub> 0,36 μM) é cerca de 130 vezes mais potente que **56** (EC<sub>50</sub> 45,70 μM), o que mostra a estereoespecificidade enzimática da AChE. É possível observar que estes alcaloides são epímeros no C-6 (anel C), e uma vez que a potência como IChE caiu consideravelmente em função da alteração deste centro estereogênico, é possível inferir que esta região faz parte do grupo farmacofórico de **50** (THOMSEN et al., 1990) (Figura 13).

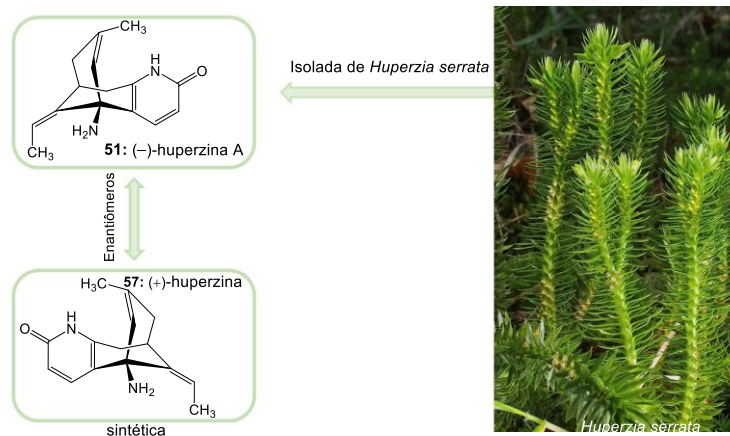
**Figura 26** – Diastereoisômero da galantamina

Fonte: o autor.

### 1.3.1.3 Huperzina A

Huperzina A (HupA) (**51**) é um alcaloide quinolizidínico isolado de *Huperzia serrata*, erva já utilizada na medicina tradição chinesa para o tratamento de perdas de memória (MEHTA et al., 2011). Mesmo apresentando características farmacocinéticas importantes como a capacidade de traspasar a barreira hematoencefálica e alcançar o SNC, prolongado tempo de meia vida, além de apresentar inibição seletiva da AChE de forma reversível a HupA não passou da fase de testes clínicos por causar náuseas e distensão abdominal (HAO et al., 2009; KONRATH et al., 2013; KOZIKOWSKI; TUCKMANTEL, 1999).

Segundo Liu e colaboradores 1986, a HupA apresenta rotação específica de  $-150,4^\circ$  (MeOH). Sua forma dextrogira foi obtida por síntese, e ambos os estereoisômeros foram submetidos ao ensaio para avaliar o potencial de inibição da AChE, sendo verificado que a (-)-**51** ( $IC_{50}$   $65 \pm 4$  nM) é 38 vezes mais potente que o enantiômero (+)-**57** ( $IC_{50}$   $3153 \pm 83$  nM) (Figura 27) (ZHANG et al., 2002).

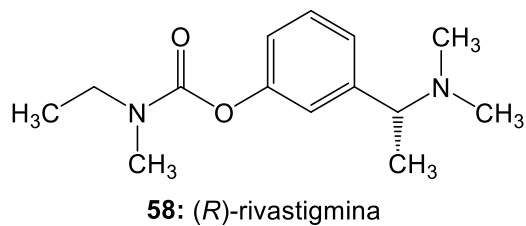
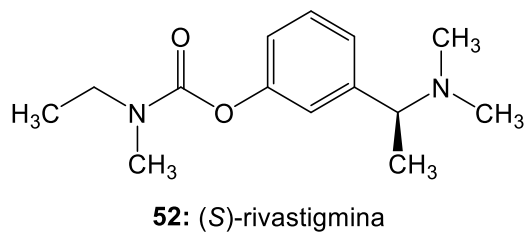
**Figura 27** – Huperzina A isolada de *Huperzia serrata*

Fonte: o autor.

### 1.3.1.4 Rivastigmina

Aprovada nos anos 2000, a rivastigmina (**52**) (Exelon<sup>®</sup>) é um derivado sintético da fisostigmina e se encontra hoje sendo vendida em mais de trinta países para o tratamento dos sintomas da DA leve e moderada (KUMAR, 2006; MEHTA et al., 2011; SUGIMOTO et al., 2000). A rivastigmina apresenta em sua estrutura um centro estereogênico, conferindo quiralidade à molécula (Figura 28). Diferente do donepezil, que é vendido como mistura racêmica, este fármaco é vendido na forma enantiomericamente pura, uma vez que (*S*)-(-)-**52** é mais potente que seu enantiômero (*R*)-(+)-**58** (SRINIVASU et al., 2005). Mesmo sendo um medicamento bastante difundido, em 2007 sofreu uma mudança na forma de aplicação visando a diminuição dos efeitos adversos, passando de oral a dérmica (MEHTA et al., 2011).

**Figura 28** – Enantiômeros da rivastigmina



Fonte: O autor.

### 1.3.1.5 Tacrina

Descoberta durante a segunda guerra mundial, enquanto se pesquisavam antissépticos intravenosos por Adrian Albert, a tacrina (**53**) também possuía a capacidade de traspasar a barreira hematoencefálica e alcançar o SNC com facilidade onde é capaz de inibir a ação da AChE (TUMIATTI et al., 2010). Em 1993, a tacrina (Cognex<sup>®</sup>) foi aprovada pelo FDA para o tratamento de paciente com DA. No entanto, foram relatados efeitos colaterais como náusea, tontura, diarreia, convulsões e síncope, devido ao uso contínuo, indicado devido ao curto

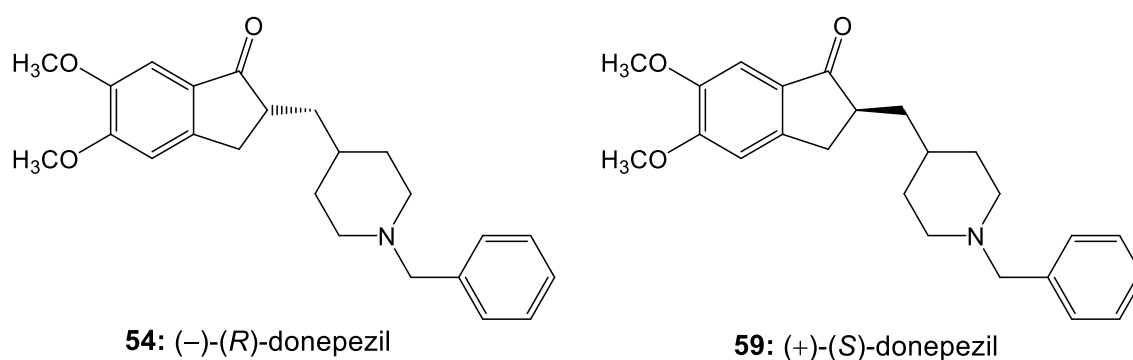
tempo de meia vida no organismo, o que acabou levando a sua retirada do mercado farmacêutico (MEHTA et al., 2011).

### 1.3.1.6 Donepezil

Em 1996, o *FDA* aprovou o uso do donepezil (**54**) (Aricept<sup>®</sup>) como fonte terapêutica no tratamento da DA. Os efeitos colaterais observados em pacientes que fizeram o uso desse medicamento foram bastante reduzidos, além de apresentar um maior tempo de meia vida, o que acarreta em um número de doses diárias menor (MEHTA et al., 2011; RADWAN et al., 2006).

O donepezil é um fármaco vendido na forma de racemato, entretanto, estudos cromatográficos foram realizados com o intuito de separar os enantiômeros e avaliá-los separadamente (MATSUI et al., 1998; RADWAN et al., 2006). Foi observado que o (-)-(*R*)-donepezil (**54**) tem maior tempo de meia vida (27,2 h) que seu enantiômero (+)-(*S*)-donepezil (**59**) (16,8 h) (RADWAN et al., 2006). Também foi observado maior concentração de **59** no plasma sanguíneo em comparação ao seu enantiômero **54** (MATSUI et al., 1998). Estes dados mostram que as propriedades farmacocinéticas de **54** são melhores que as de **59**.

**Figura 29** – Enantiômeros do donepezil



Fonte: O autor.

O estudo das moléculas quirais enquanto potenciais fármacos é imprescindível, não há como ignorar os efeitos que os diferentes estereoisômeros de um mesmo composto podem causar tanto do ponto de vista farmacocinético quanto farmacodinâmico. Aliado a isso estão os alcaloides piperidínicos presentes em *S. spectabilis*, com as diferentes atividades biológicas já comprovadas, além de sua diversidade estereoquímica já relatada por diferentes autores, mas que ainda não apresenta um consenso na literatura. Estes dados nos estimularam para o



desenvolvimento de um trabalho de separação dos homólogos, assim como o isolamento de novos diastereoisômeros utilizando metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para que pudéssemos avaliar estes compostos separadamente nos ensaios de inibição da AChE, que é um alvo importante para o tratamento de doenças que afetam o SNC, e assim estabelecer uma relação entre as estruturas químicas quirais e a atividade biológica.

## 2. OBJETIVOS

Isolar os alcaloides homólogos e quirais presentes no extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* e avaliar a atividade anticolinesterásica.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis*;
- Estudo químico da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> visando o isolamento dos metabólitos majoritários (-)-cassina, (-)-espectralina e novos alcaloides homólogos quirais;
- Preparação de derivados acetilados utilizando como precursores os alcaloides 6-*iso*-cassina e 6-*iso*-espectralina;
- Avaliação da atividade anticolinesterásica do extrato etanólico, das frações, compostos isolados e preparados por semissíntese.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1 SOLVENTES

- Metanol (MeOH): Synth P.A. ACS
- Metanol (MeOH): Sigma-Aldrich HPLC
- Hexano: Vetec P.A.
- Cloreto de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): Vetec P.A. ACS
- Hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ): Synth P.A. ACS
- Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ): Synth P.A. ACS

#### 3.2 REAGENTES

- Ácido clorídrico 37%
- Ácido sulfúrico 98%
- Carbonato de sódio decahidratado
- Cloreto de acetila 99%
- Ácido hexacloroplatínico IV: Vetec P.A.
- Iodeto de potássio: Vetec P.A.

#### 3.3 CROMATOGRAFIA

##### 3.3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Os experimentos de cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) foram realizados utilizando placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência ( $\text{UV}_{254}$ ) 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel). As placas foram reveladas por inspeção em câmara de UV (254 ou 365 nm) ou nebulizadas com reveladores específicos para alcaloides (iodocloroplatinato ou Dragendorff).

### 3.3.2 PREPARO DO REVELADOR IODOCLOROPLATINATO (ICLPT)

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

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

Solução spray: Mistura da solução A com a solução B e  $\text{H}_2\text{O}$  (1:9:10).

### 3.3.3 PREPARO DO REVELADOR DRAGENDORFF

Solução A: 0,85 g de nitrato de bismuto ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ) em solução de 10,0 mL de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) e 40,0 mL de água, sob aquecimento.

Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio (KI) em 30,0 mL de água de destilada.

Solução estoque: Mistura da solução A e solução B (1:1).

Reagente: Solução estoque, ácido acético e água (1:2:10).

### 3.3.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

Para as separações por cromatografia em coluna (CC) aberta foram utilizadas as seguintes fases estacionárias (FE):

- Sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) para cromatografia (63–200  $\mu\text{m}$ , diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich;
- Sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) para cromatografia *flash* (40–63  $\mu\text{m}$ , diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich;
- C18 sílica gel, premium grade (40–63  $\mu\text{m}$ , 230–400 mesh, diâmetro de poro 60 Å) Sorbent Technologies.

### 3.3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para as análises de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), foi utilizado um cromatógrafo do laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ–UFU), campus Santa Mônica:

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu<sup>®</sup>, modelo LC-6AD, composto pelos seguintes módulos: bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A<sub>5R</sub>, forno CTO-20A, coletor de frações FRC-10A, auto injetor SIL-10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e evaporativo por espelhamento de luz (ELSD – *evaporative light scattering detector*) LT II, controlados pelo software LC Solutions.

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

- Coluna analítica Phenomenex<sup>®</sup> (250,0 × 4,6 mm, 5 µm) protegida pela respectiva pré-coluna. Como fase móvel (FM), foi utilizado um gradiente (30 min.), 5–100% de MeOH–H<sub>2</sub>O acidificada com ácido acético (0,1%), e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min.). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e o volume injetado foi de 50 µL (C = 1,0 mg/mL, utilizando MeOH como solvente). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) 0,45 µm.
- Coluna semipreparativa Phenomenex<sup>®</sup> Luna C18 (250,0 × 10,0 mm, 10 µm). Como fase móvel (FM), foi utilizado um gradiente (30 min.), 5–100% de MeOH–H<sub>2</sub>O acidificada com ácido acético (0,1%), e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min.). O fluxo utilizado foi de 2,0 mL/min e o volume injetado foi de 50 µL (C = 100,0 mg/mL, utilizando MeOH como solvente). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) 0,45 µm.

### 3.3.6 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu QP2010, com potencial de ionização de 70 eV, com as seguintes condições: gás transportador hélio a fluxo constante de 1,0 mL/min; coluna SPB-5 (30,0 m × 0,25 mm d.i.) capilar de sílica fundida com 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano como fase estacionária; temperatura do injetor ajustada a 220 °C, com uma proporção de divisão de 1:20; temperatura do forno inicialmente mantida a 60 °C e depois aumentada a uma velocidade de 6 °C/min a 280 °C, mantida durante 24 min; tempo de execução 60 min. O intervalo de massa analisado foi de 40–650 *u*

### 3.4 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS

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

- Espectrômetro de massas de alta resolução QTOF, marca Agilent<sup>®</sup>, modelo 6520B, com fonte de ionização por *electrospray* no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IGB–UFU). As amostras foram solubilizadas em metanol/água (4:1) e introduzidas utilizando seringa (100,0 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200,0 µL/h. A ionização foi realizada com gás nebulizante a 58 psi, o gás secante aquecido a 200 °C com fluxo de 8,0 mL/min e no capilar foi aplicado 4,5 KV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.

As massas acuradas observadas nos EMs em alta resolução foram comparadas com aquelas obtidas do programa ChemDraw Ultra 12.0 (massas exatas). A partir destes dados foram calculados os erros em ppm, utilizando a equação abaixo:

$$\text{Erro}_{(\text{ppm})} = \left[ \frac{\text{massa acurada} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] \times 10^6$$

### 3.5 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

O Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) – IQ/UFU, também conta com alguns equipamentos básicos (Tabela 2).

**Tabela 2** – Equipamentos disponíveis para realização desse trabalho.

<b>Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Balança analítica	Shimadzu	AUW220D
Rotaevaporador	Ika	RV 10
Liofilizador	Terroni	LS300
Linha de secagem de amostras a pressão reduzida	Bomba Edwards	RV5

Fonte: o autor.

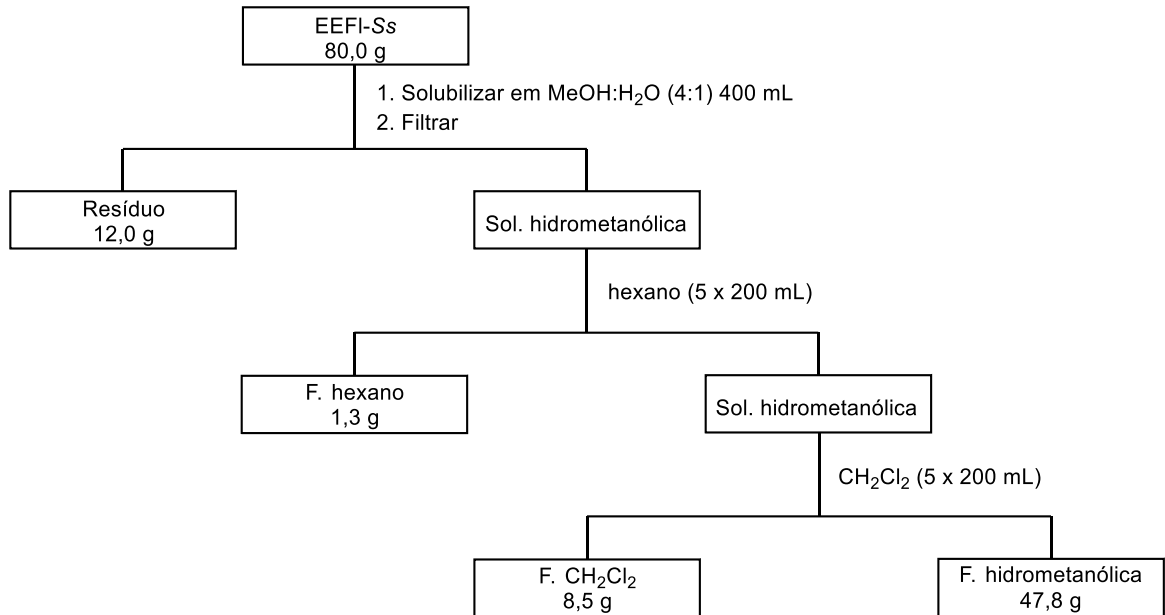
## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* (EEFI–Ss) foi obtido a partir do material vegetal (35,8 kg) coletado no terminal rodoviário de Araraquara em fevereiro de 2009, sendo que a exsicata (SP 384 109) foi depositada no Instituto de Botânica de São Paulo. As flores foram secas (7,9 kg) em estufa com circulação de ar (35 °C) por cinco dias, trituradas em moinho de facas e submetidas à extração por maceração com etanol PA (5 × 35 L), dividido em cinco garrações. Em seguida o solvente foi filtrado e destilado em evaporador rotativo (banho 40 °C) para obtenção do extrato etanólico, que foi monitorado por CCD para verificar a presença dos alcaloides. O processo de extração foi repetido cinco vezes.

### 4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE *S. SPECTABILIS*

O extrato etanólico (80,0 g) foi solubilizado em 400 mL de solução metanol/água (4:1), filtrado e em seguida submetido à extração líquido-líquido com hexano (5 × 250 mL) e diclorometano (5 × 250 mL), sucessivamente (Figura 30). Os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotatório sob pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. A fração hidrometanólica além de submetida a destilação foi liofilizada para remoção da água remanescente. As frações obtidas foram analisadas por CCD para verificar a presença dos alcaloides e avaliar a eficiência do procedimento. As placas foram reveladas com o iodocloroplatinato (ICIPT).

**Figura 30** – Extração líquido-líquido do EEFl-Ss

Fonte: o autor.

#### 4.3 METODOLOGIA SINTÉTICA

##### 4.3.1 PREPARAÇÃO DO CLORIDRATO

A primeira etapa da síntese consiste na preparação do cloridrato, gerado pelo gotejamento de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20 mL) sobre  $\text{HCl}$  (20 mL) em temperatura ambiente, através do aparato modificado de Kipp (Figura 31). Dessa forma foram preparados os cloridratos da mistura dos alcaloides **4** e **5** (100 mg).

**Figura 31** – Aparato de Kipp modificado

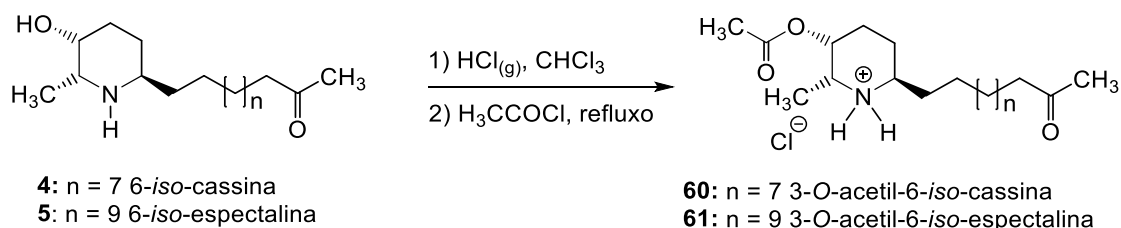
Fonte: o autor.



### 4.3.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS ACETILADOS

A mistura dos cloridratos dos alcaloides **4** e **5** (100 mg) foi submetida a reação de esterificação utilizando cloreto de acetila (0,12 mL) (Figura 32) (VIEGAS JÚNIOR et al., 2005b; PIVATTO, 2010). A reação foi mantida em agitação e refluxo em uma atmosfera inerte (Figura 33) sendo monitoradas por CCD e CG-DIC, até que todo o material de partida fosse convertido nos respectivos produtos.

**Figura 32** – Preparação dos derivados acetilados dos alcaloides de **4** e **5**



Fonte: o autor.

**Figura 33** – Sistema de refluxo utilizado na preparação dos ésteres



Fonte: o autor.

Ao término da reação, foi adicionado uma solução aquosa de carbonato de sódio (5 x 30 mL), 0,07 mol L<sup>-1</sup> (pH 10), à mistura reacional, para neutralizar e retirar o excesso de cloreto de acetila, e em seguida a solução foi submetida à extração líquido-líquido com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 25,0 mL). Quando em contato com a água o cloreto de ácido reage para formar ácido carboxílico (ácido acético). A solução aquosa de carbonato de sódio promove a desprotonação do ácido formando acetato de sódio (sal) que possui maior afinidade pela fase aquosa. Desta forma, há formação de 2 fases — fase orgânica (produtos da reação e material

de partida) e aquosa (acetato de sódio) — tornando factível a separação das fases e assim obtenção da fração orgânica onde se encontram os produtos de interesse. A extração líquido-líquido foi realizada a temperatura ambiente para evitar a hidrólise básica dos ésteres formados (SOLOMONS, 2009) o solvente contendo o produto de interesse foi destilado em evaporador rotatório em uma temperatura de 40°C. Os produtos da reação (**60** e **61**) foram purificados por cromatografia em coluna.

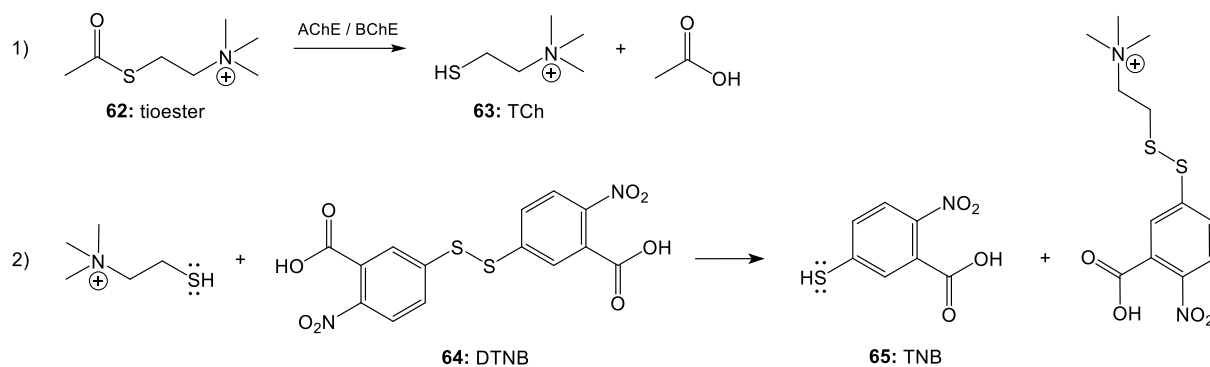
#### 4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

A avaliação do potencial de inibição da acetilcolinesterase foi realizada em colaboração com o professor Dr. Foued S. Espindola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, sendo o procedimento desenvolvido pelo doutorando Allisson B. Justino.

O ensaio foi realizado segundo o método proposto por Ellman e colaboradores (1961). As reações envolvidas no ensaio de avaliação da atividade anticolinesterásica ocorrem inicialmente entre a acetilcolinesterase ou a butirilcolinesterase com o tioéster (**62**), levando ao intermediário denominado tiocolina (TCh) (**63**). Esse intermediário reage com 5,5-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (**64**) para gerar o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) (**65**) que apresenta cor amarela (Figura 34) (DINGOVA et al., 2014). Para os experimentos, 25 µL de solução aquosa de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina (3 mM), 125 µL de DTNB (3 mM) em tampão C, 50 µL de tampão B e 25 µL da amostra diluída em tampão A foram adicionados a microplaca de 96 poços, para dar concentrações de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina variando de 3,0 a 300 µg mL<sup>-1</sup> para o composto puro e 30 a 2000 µg/mL para o extrato etanólico e a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A seguir, foram adicionados 25 µL de solução de enzima (AChE ou BChE) de 0,2 U/mL e a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm a cada 30 s, por 20 min (a temperatura foi mantida a 30 °C). Qualquer aumento na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato (ou aos cromóforos presentes nas amostras) que pode ter ocorrido antes da leitura das absorbâncias, foi corrigido subtraindo-se a taxa de reação medida antes do início do experimento (isto é, antes da leitura a cada 30 s por 20 min) a partir dos valores obtidos após o início do experimento. A porcentagem de inibição foi calculada em comparação com um branco (MeOH a 10% em tampão A) e o controle positivo utilizado foi a galantamina, no mesmo intervalo de concentração para compostos puros. Foram utilizados os seguintes tampões: tampão A: Tris-HCl 50 mM (pH 8); tampão B: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo fração de

albumina de soro bovino a 0,1%; tampão C: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo NaCl 0,10 M e MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 20 mM.

**Figura 34** – Reações propostas para a geração de TNB



Fonte: adaptado de Dingova et al. (2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *S. SPECTABILIS*

O extrato etanólico (80,0 g) obtido a partir das flores *S. spectabilis*, foi submetido a extração líquido-líquido utilizando hexano e diclorometano, respectivamente (Figura 3) (Tabela 3).

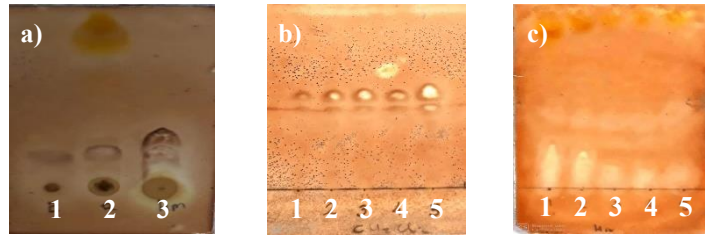
**Tabela 3** – Massas obtidas da extração líquido-líquido do EEFL-*Ss*.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Resíduo	12,0	15,0
Hexano	1,3	1,6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8,5	10,6
Hidrometanólica	47,8	59,8

Fonte: o autor.

### 5.2 ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO (EEFL-*Ss*) E DAS FRAÇÕES DE *S. SPECTABILIS*

O extrato etanólico e as frações obtidas da extração líquido-líquido foram analisadas por CCD utilizando como FE sílica gel e como FM uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5). Foi necessário adicionar hidróxido de amônio à fase móvel para reduzir a retenção dos alcaloides pelos grupos silanois (caráter ácido), uma vez que o hidróxido de amônio atua como uma amina competidora (PIVATTO et al., 2014). As cromatoplasmas foram reveladas com ICIPt, reagente específico para alcaloides (Figura 35). A partir da avaliação das placas, foi possível constatar, através de uma análise qualitativa, que a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> apresentava a maior concentração de alcaloides, o que foi observado pelas manchas de coloração marrom, que são características para estes metabólitos quando utilizado o revelador ICIPt (Figura 35). Assim, essa fração foi submetida à cromatografia em coluna para purificação destes compostos.

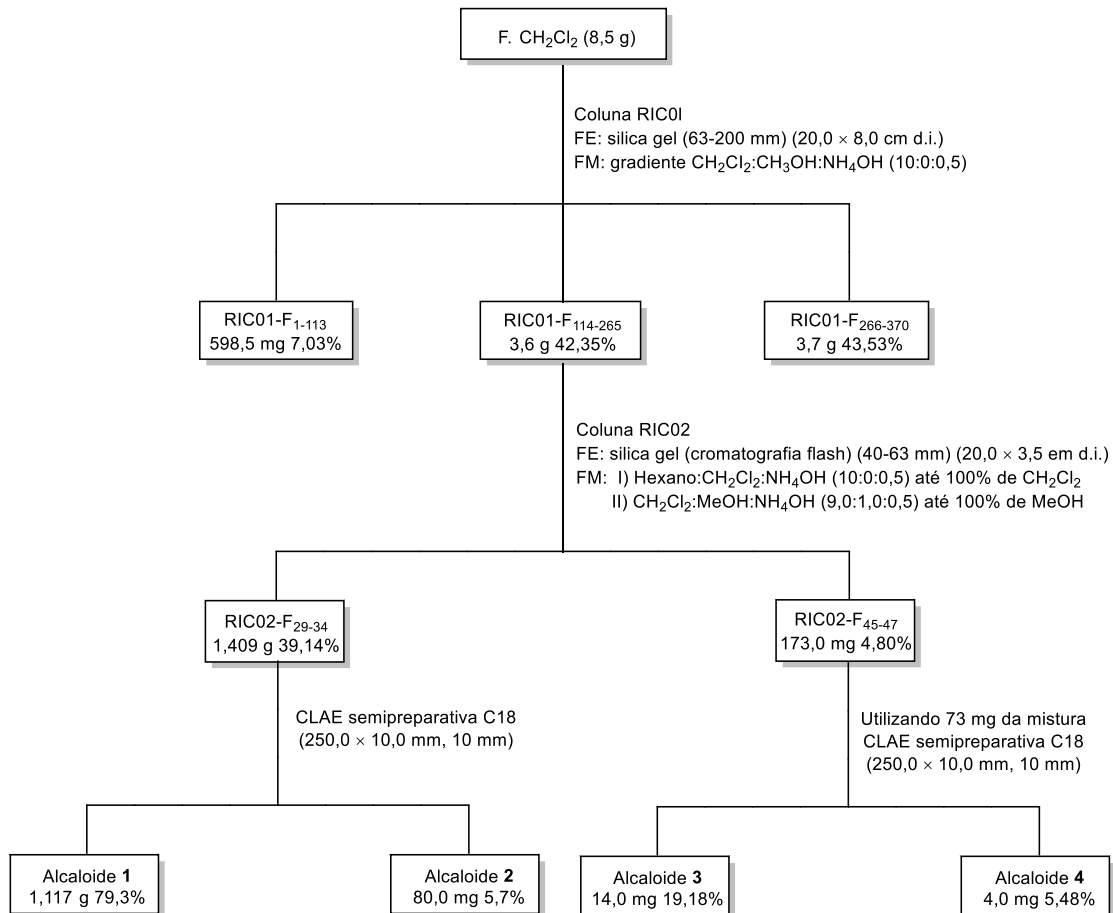
**Figura 35** – Cromatoplaça da prospecção química (revelador ICIPt)

Nota: **a)** EEFl-Ss (1), resíduo (2) e fração hidrometanólica (3), frações: **b)** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e **c)** hexano.  
Condições: FE: sílica, FM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5) e revelador ICIPt.

Fonte: o autor.

### 5.3 ISOLAMENTO DOS ALCALOIDES DA FRAÇÃO CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

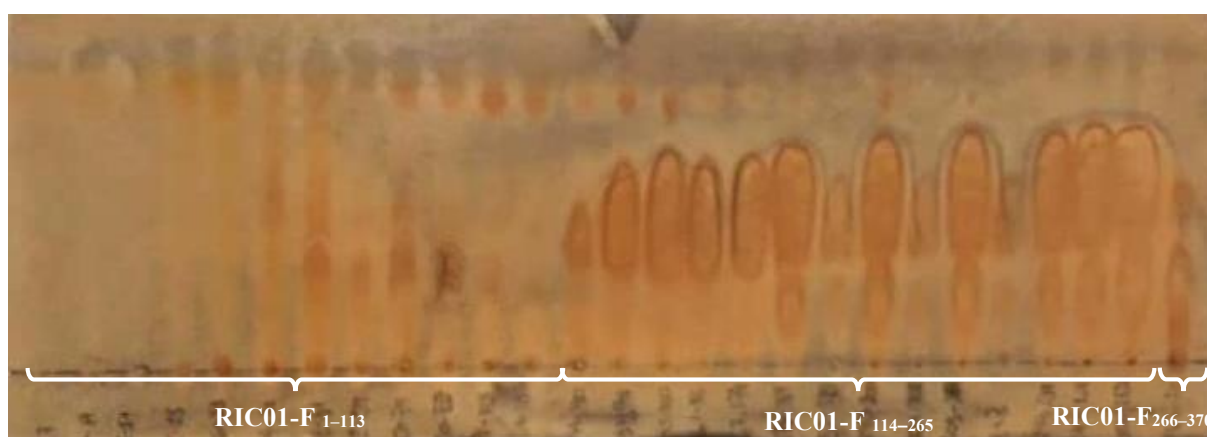
A fração diclorometano foi submetida a diferentes procedimentos cromatográficos visando o isolamento dos alcaloides identificados previamente por CCD (Figura 36).

**Figura 36** – Isolamento dos alcaloides 1–4 a partir da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Fonte: o autor.

A fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) (445,0 g,  $20,0 \times 8,0$  cm d.i.), utilizando como FE sílica gel (63–200  $\mu\text{m}$ ) e eluição em modo gradiente, utilizando como FM um sistema de solventes iniciando com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (10:0:0,5) até 100% de MeOH. As frações coletadas (370) foram avaliadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de  $R_f$  (Figura 33). Depois de reunidas, as frações foram denominadas: RIC01-F<sub>1–113</sub> (598,5 mg), RIC01-F<sub>114–265</sub> (3,6 g) e RIC01-F<sub>266–370</sub> (3,7 g) (Figura 37).

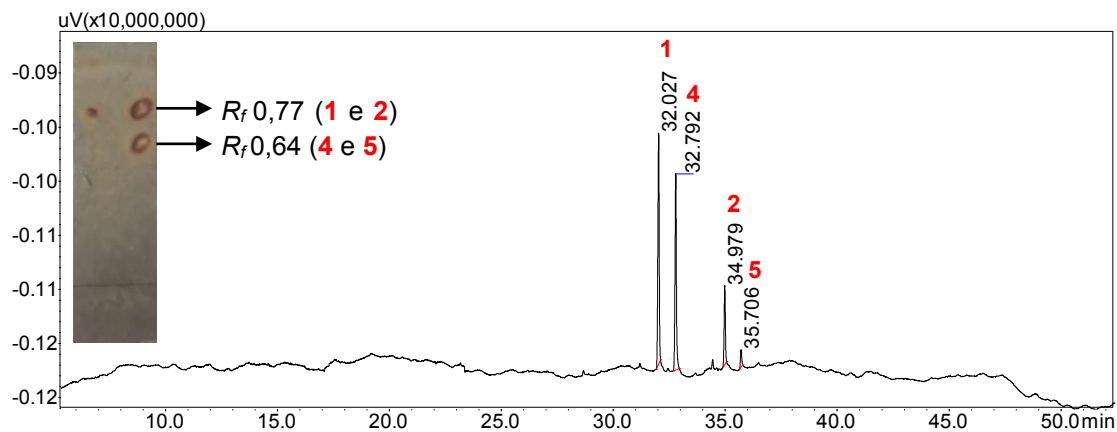
**Figura 37** – Cromatoplaça das frações coletadas de RIC01



Condições: FE: sílica, FM:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1:0,5) e revelador ICIPt.

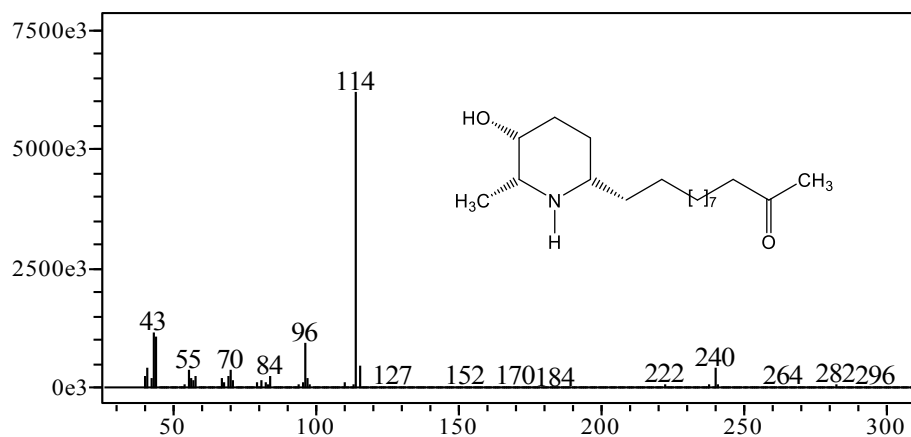
Fonte: o autor.

A fração RIC01-F<sub>114–265</sub> foi submetida à análise por CG-EM o que permitiu identificar quatro compostos com diferentes tempos de retenção ( $t_R$ ): **1** ( $t_R$  32,0 min.), **2** ( $t_R$  35,0 min.), **4** ( $t_R$  32,8 min.) e **5** ( $t_R$  35,7 min.) (Figura 38). A análise dos EM-IE permitiu observar que os EMs de **1** e **4** ( $m/z$  297) [ $\text{M}^{++}$ ], assim como de **2** e **5** ( $m/z$  325) [ $\text{M}^{++}$ ] apresentavam os mesmos íons moleculares. Também foi observado que o pico base ( $m/z$  114) foi o mesmo para os quatro compostos (Figuras 39, 40, 41 42), sugerindo que **1** e **4**, assim como **2** e **5** são estereoisômeros. Além disso, foi possível observar que **1/4** e **2/5** são pares homólogos, como já relatado anteriormente por Pivatto e colaboradores (2005).

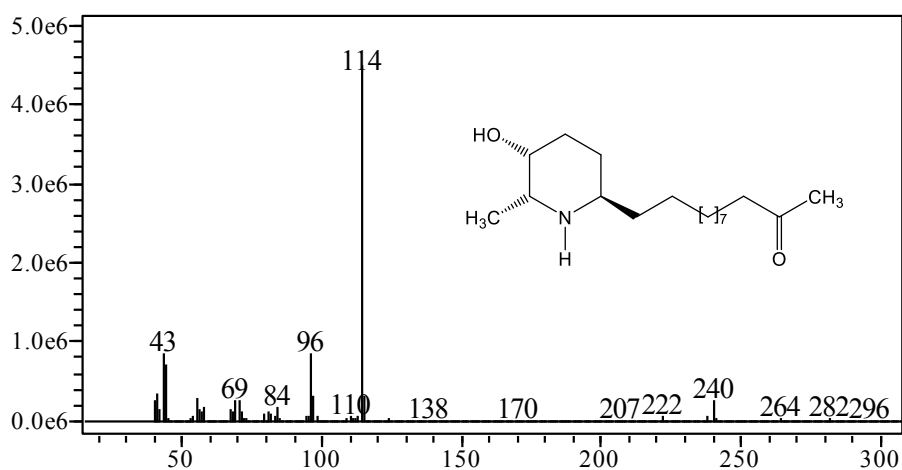
**Figura 38** – Cromatograma (CG-EM) da fração RIC01-F<sub>114-265</sub> (1/2 e 4/5)

Nota: CCD: FE sílica, FM CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,25) e revelador ICIPt.

Fonte: o autor

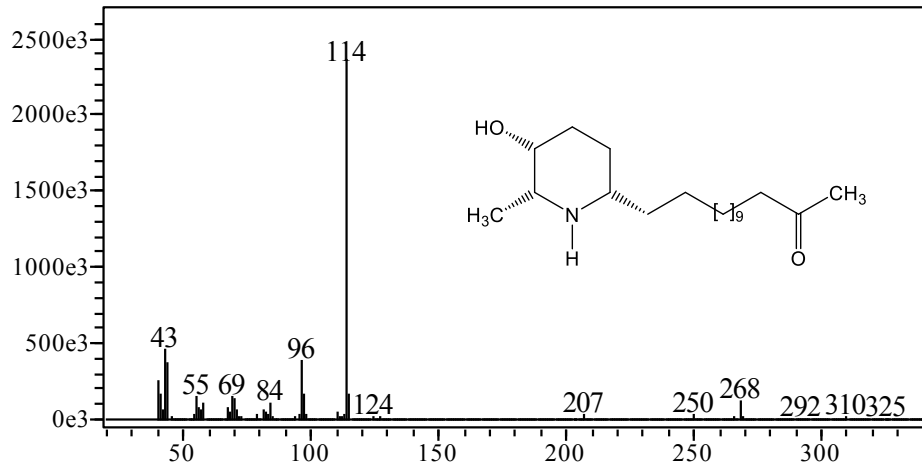
**Figura 39** – EM-IE de 1

Fonte: o autor.

**Figura 40** – EM-IE de 4

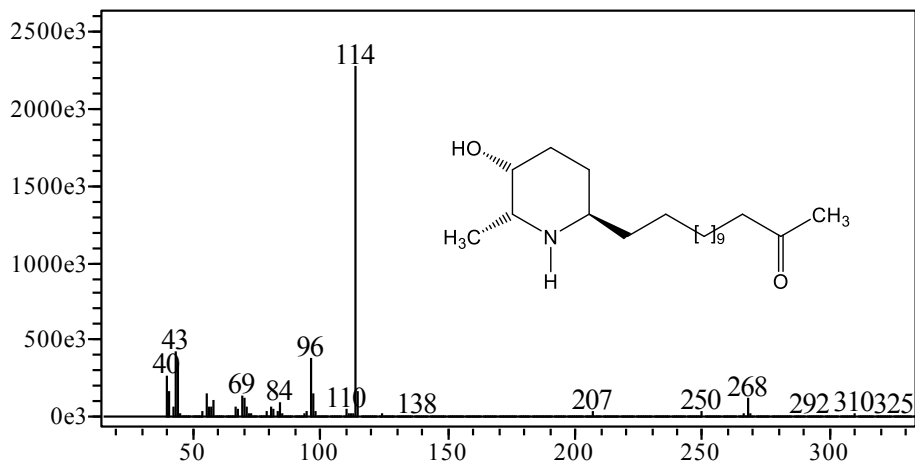
Fonte: o autor.

Figura 41 – EM-IE de 2



Fonte: o autor.

Figura 42 – EM-IE de 5



Fonte: o autor.

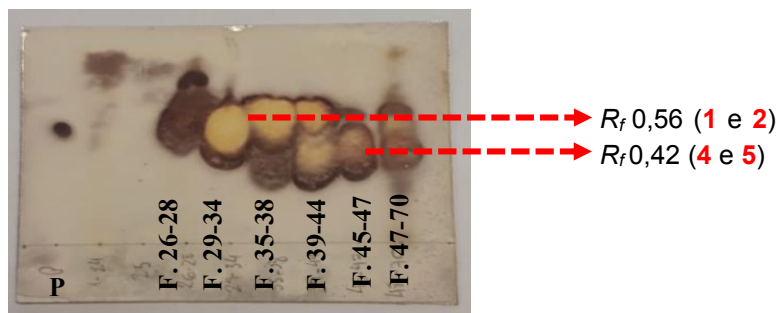
Relatos na literatura descrevem alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis* com diferentes estereoquímicas, dentre eles os compostos **4** e **5** com a configuração absoluta do C-6 invertida em relação aos alcaloides **1** e **2** (CHRISTOFIDIS et al., 1977; VIEGAS JÚNIOR et al., 2004; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011). A partir da análise do cromatograma (Figura 38), dos EMs e sabendo que os picos com  $t_R$  32,0 e 35,0 min. são referentes aos alcaloides **1** e **2**, respectivamente, e que na cromatoplaça coeluem no *spot* com  $R_f$  0,77, é possível sugerir que o que difere os compostos **1** e **2** de **4** e **5**, respectivamente, são aspectos estereoquímicos, o que justifica a similaridade dos EMs.

Com o intuito de isolar os compostos presentes na fração RIC01-F<sub>114-265</sub> (3,6 g), ela foi submetida à CC *flash* (95,0 g, 20,0 × 3,7 cm d.i.) utilizando como FE sílica gel (40–63 μm) e



FM um gradiente iniciando com hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NH<sub>4</sub>OH (10:0:0,5) até 100% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seguido de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5) até 100% de MeOH. As frações coletadas (70) foram avaliadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de  $R_f$ : RIC02-F<sub>1-24</sub> (54,0 mg), RIC02-F<sub>25</sub> (23,0 mg), RIC02-F<sub>26-28</sub> (128,5 mg), RIC02-F<sub>29-34</sub> (1,4 g), RIC02-F<sub>35-38</sub> (717,4 mg), RIC02-F<sub>39-44</sub> (474,2 mg), RIC02-F<sub>45-47</sub> (173,0 mg) e RIC02-F<sub>47-70</sub> (216,6 mg) (Figura 43).

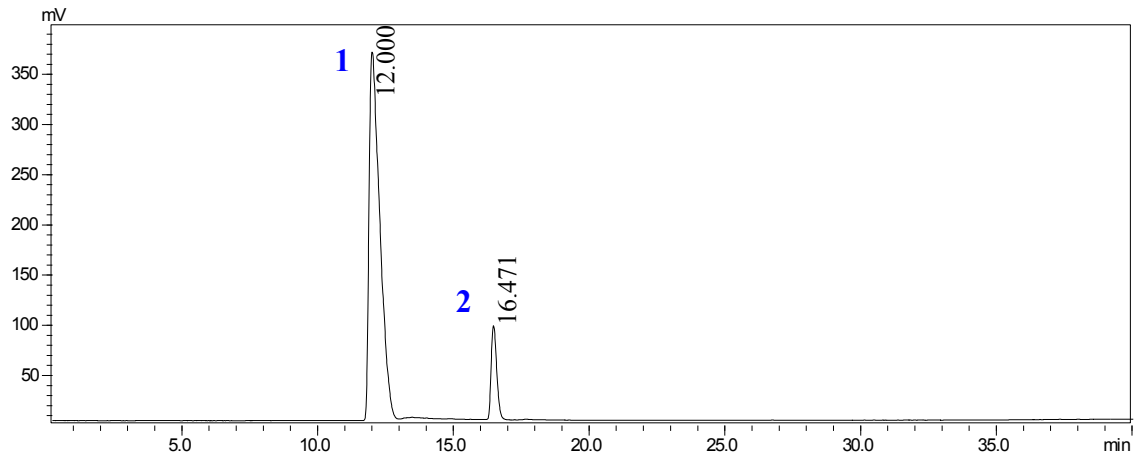
**Figura 43** – Cromatoplaça das frações coletadas de RIC02



Condições: FE: sílica, FM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5) e revelador ICIpt. P = padrão cassina (1).

Fonte: o autor.

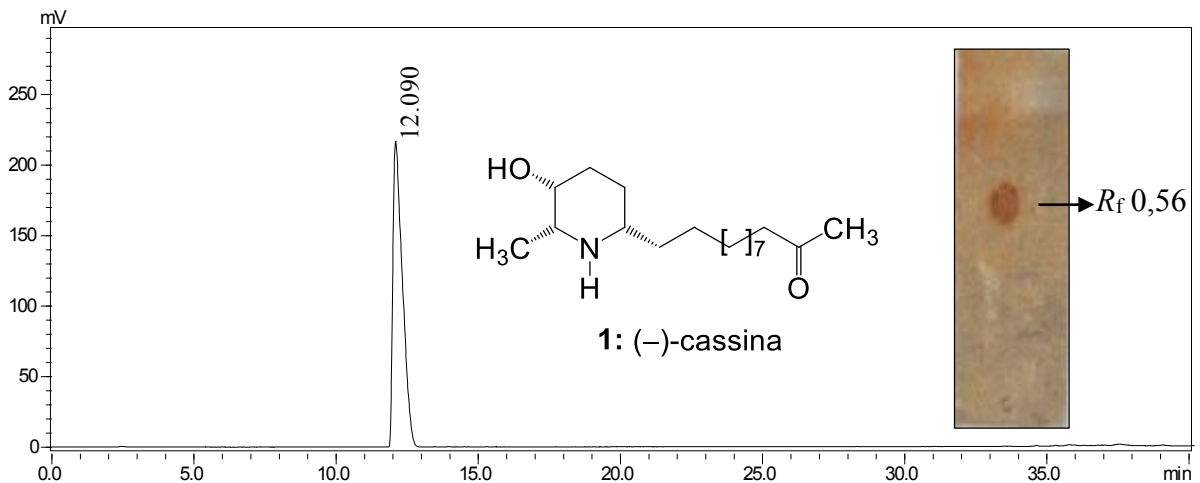
A fração RIC02-F<sub>29-34</sub> foi analisada por CLAE-ELSD (Figura 44), que permitiu observar a mistura dos homólogos **1** ( $t_R$  12,0 min.) e **2** ( $t_R$  16,5 min.). Como **2** é ligeiramente mais lipofílico que **1**, devido as duas unidades de CH<sub>2</sub> adicionais na cadeia lateral em C-6, apresentou tempo de retenção maior quando analisado em coluna de fase reversa (C18).

**Figura 44** – Cromatograma (CLAE-ELSD) da fração RIC02-F<sub>29-34</sub> em coluna analítica

Condições: Coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V<sub>inj.</sub> = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: o autor.

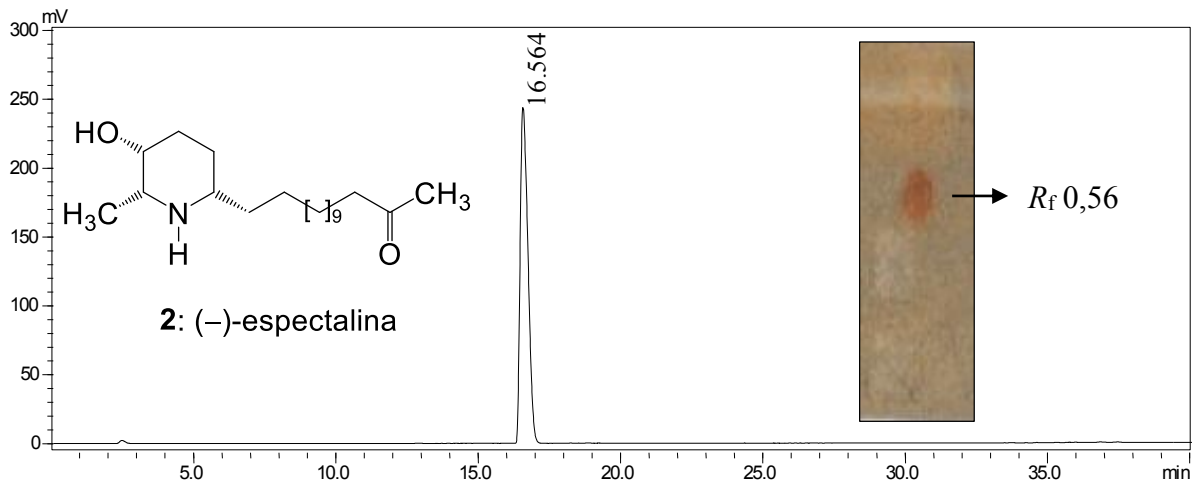
Em seguida a fração RIC02-F<sub>29-34</sub> foi submetida a CLAE no modo semipreparativo, de onde foi possível separar os alcaloides **1** (1,117g, t<sub>R</sub> 12,1 min) e **2** (80 mg, t<sub>R</sub> 16,6 min). Depois de isolados os metabólitos foram analisados em CLAE-ELSD no modo analítico para avaliar a separação (Figuras 45 e 46).

**Figura 45** – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide **1**

Condições: Coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V<sub>inj.</sub> = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD. CCD: FE: sílica, FM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5) revelador ICIPt.

Fonte: o autor.

**Figura 46** – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide **2**

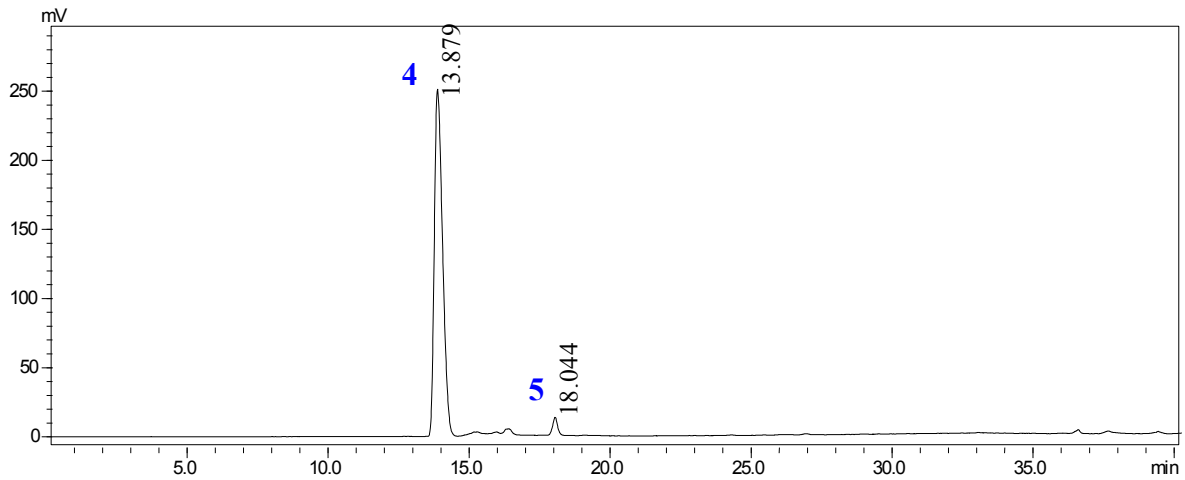


Condições: Coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 mm × 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL,  $V_{\text{inj.}}$  = 50,0  $\mu\text{L}$ , fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD. CCD: FE: sílica, FM:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1:0,5) revelador ICIPT.

Fonte: O autor.

Da mesma forma, a fração RIC02-F<sub>45–47</sub> foi analisada por CLAE-ELSD (Figura 47), que permitiu observar a mistura dos homólogos *iso*-cassina (**4**) ( $t_R$  13,9 min.) e *iso*-espectalina (**5**) ( $t_R$  18,0 min.). Como **5** é ligeiramente mais lipofílico que **4**, devido as duas unidades metilênicas na cadeia lateral em C-6, apresentou tempo de retenção maior quando analisado em coluna de fase reversa (C18).

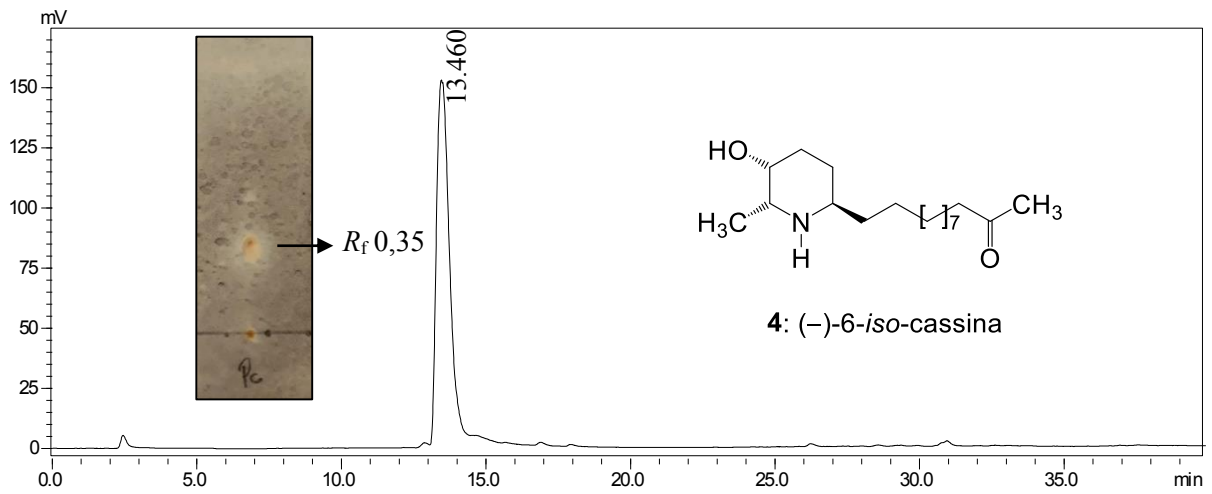
**Figura 47** – Cromatograma (CLAE-ELSD) da fração RIC02-F<sub>45-47</sub> em coluna analítica



Condições: Coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V<sub>inj.</sub> = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

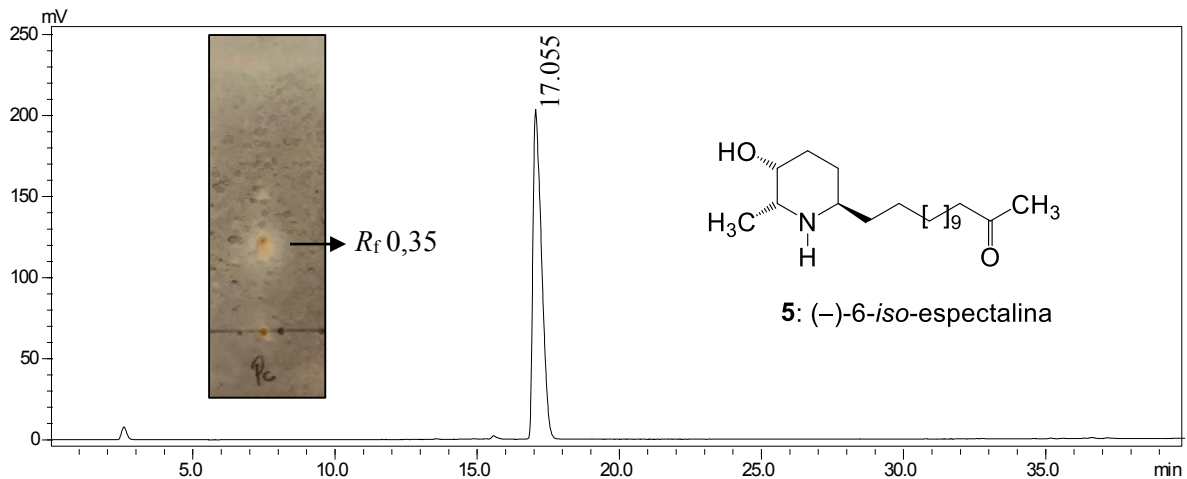
Fonte: o autor.

Em seguida a fração RIC02-F<sub>45-47</sub> foi submetida a CLAE no modo semipreparativo, de onde foi possível isolar os compostos **4** (14 mg, *t<sub>R</sub>* 13,5 min) e **5** (4 mg, *t<sub>R</sub>* 17,1 min). Depois de isolados os alcaloides foram analisados em CLAE-ELSD no modo analítico para avaliar a separação (Figuras 48 e 49).

**Figura 48** – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide **4**

Condições: Coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL,  $V_{inj.}$  = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD. CCD: FE: sílica, FM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5) revelador ICIpt.

Fonte: o autor.

**Figura 49** – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica e cromatoplaça do alcaloide **5**

Condições: Coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL,  $V_{inj.}$  = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD. CCD: FE: sílica, FM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5) revelador ICIpt.

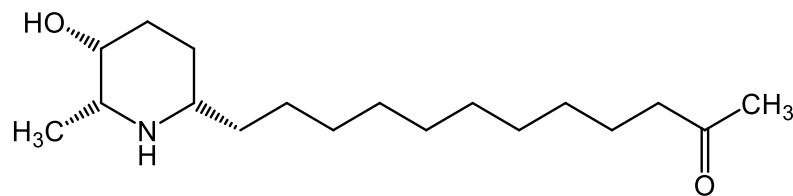
Fonte: o autor.

## 5.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALOIDES

O estudo químico da fração alcaloídica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) das flores de *Senna spectabilis* resultou no isolamento de quatro alcaloides piperidínicos, que foram identificados por EM-IES em alta resolução, assim como a comparação dos dados com aqueles descritos na literatura.

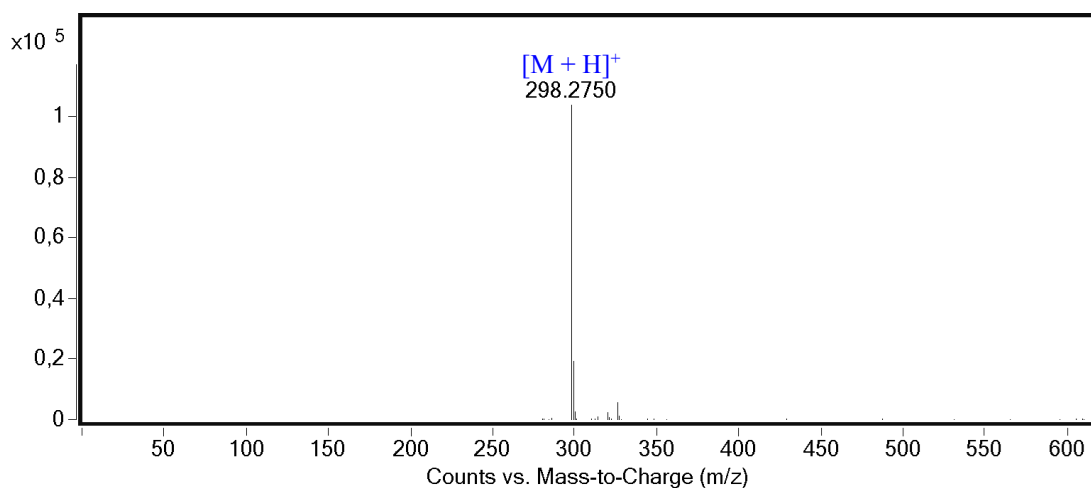
### 5.4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY

#### 5.4.1.1 Elucidação estrutural do alcaloide 1 por EM-IES



O alcaloide **1** (1,12 g) foi isolado como um sólido branco, que apresentou teste positivo quando revelado com o reagente ICIPt ( $R_f$  0,56) (Figura 12). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  298,2750  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2^+$  298,2741 ( $\Delta$  3,0 ppm) (Figura 50).

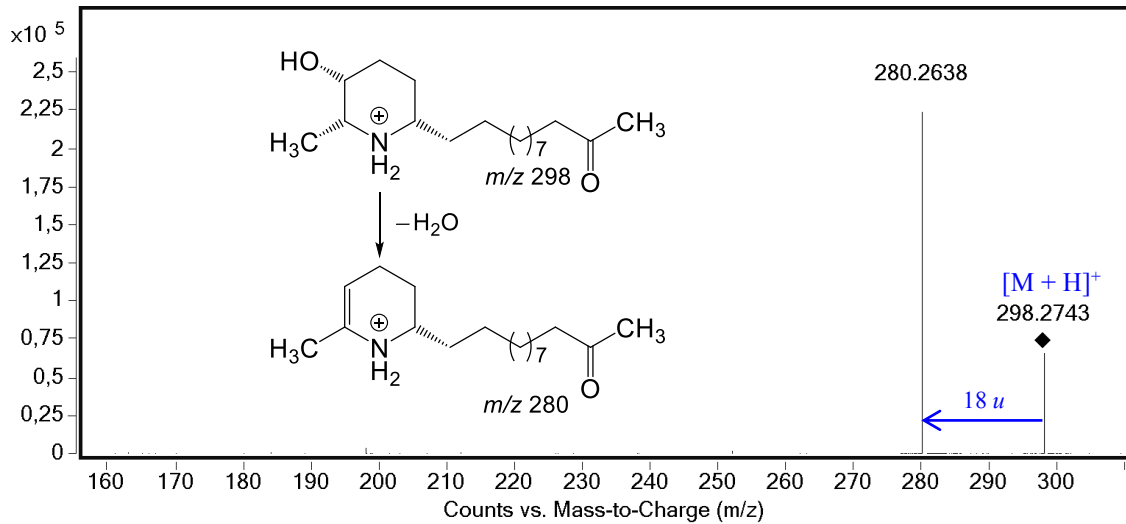
**Figura 50** – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **1**



Fonte: o autor.

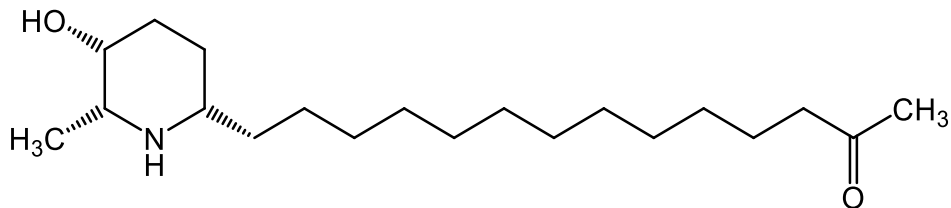
O sinal de  $m/z$  298 foi submetido à análise sequencial (EM/EM), que gerou o íon fragmento de  $m/z$  280, atribuído à eliminação neutra de água ( $18 u$ ) (Figura 51).

**Figura 51** – EM/EM-IES-(+) do íon molecular  $m/z$  298  $[M + H]^+$  (25 eV), observado para o alcaloide **1**

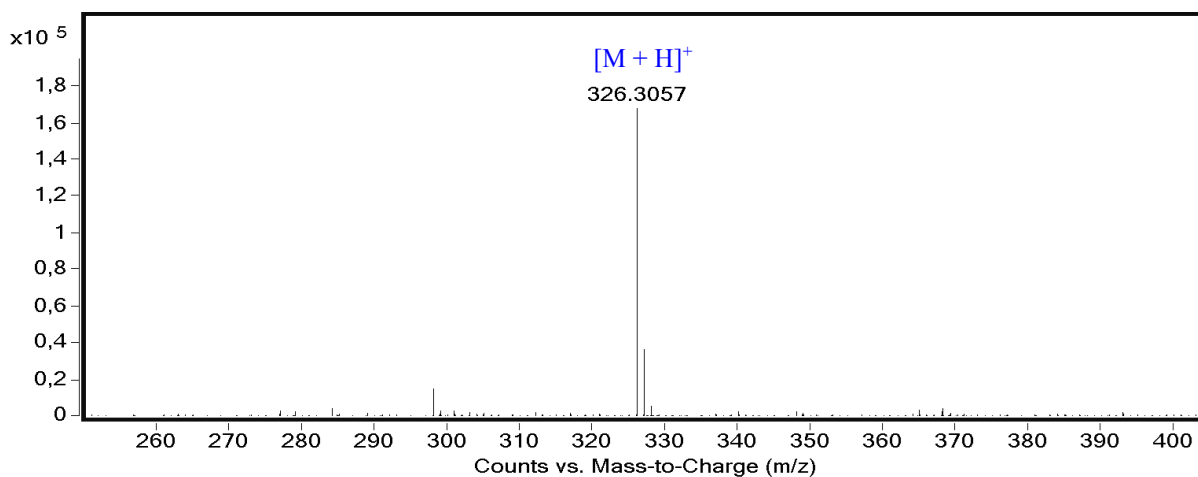


Fonte: o autor.

#### 5.4.1.2 Elucidação estrutural do alcaloide **2** por EM-IES

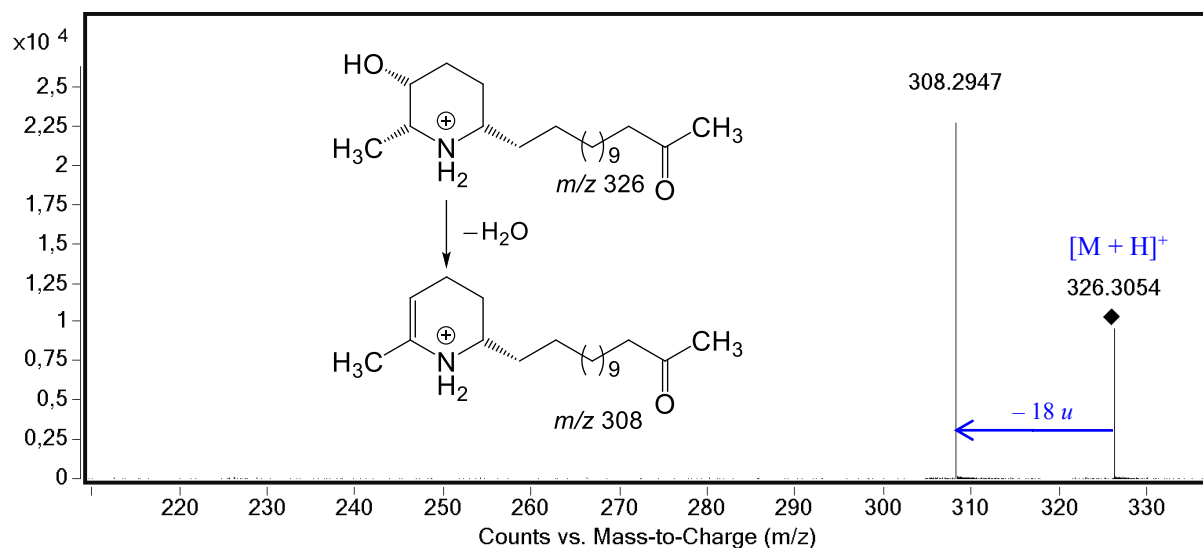


O alcaloide **2** (80,0 mg) foi isolado como um sólido branco que apresentou teste positivo com o revelador ICIPt ( $R_f$  0,56) (Figura 13). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular  $C_{20}H_{40}NO_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  326,3057  $[M + H]^+$ , calculado para  $C_{20}H_{41}NO_2^+$  326,3054 ( $\Delta$  0,9 ppm) (Figura 52).

**Figura 52** – EM-IES (+) em alta resolução do alcaloide 2

Fonte: o autor.

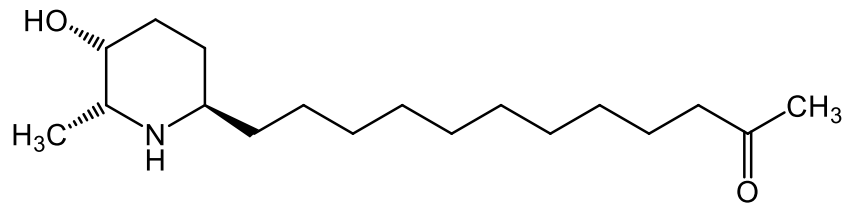
O sinal de  $m/z$  326, ao ser submetido à análise por EM/EM, gerou o íon fragmento de  $m/z$  308, atribuído à eliminação neutra de água ( $18 u$ ) (Figura 53).

**Figura 53** – EM/EM-IES-(+) do íon molecular  $m/z$  326  $[M + H]^+$  (25 eV), observado para o alcaloide 2

Fonte: o autor.

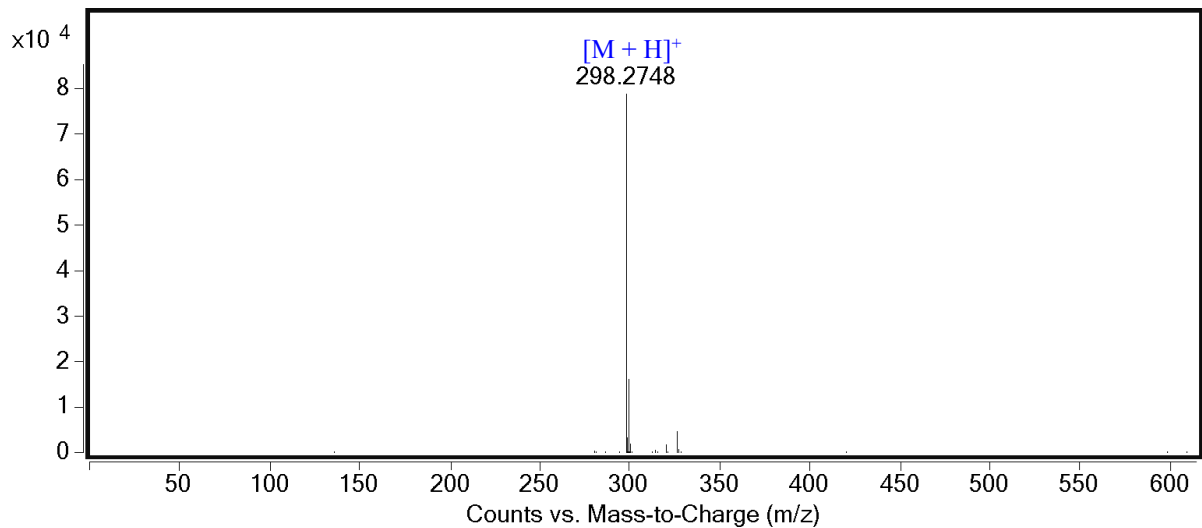


### 5.4.1.3 Elucidação estrutural do alcaloide 4 por EM-IES



O alcaloide **4** (14,0 mg) foi isolado como um óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelado com o reagente ICIPt ( $R_f$  0,35) (Figura 15). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular  $C_{18}H_{35}NO_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  298,2748  $[M + H]^+$ , calculado para  $C_{18}H_{36}NO_2^+$  298,2741 ( $\Delta$  2,3 ppm) (Figura 54).

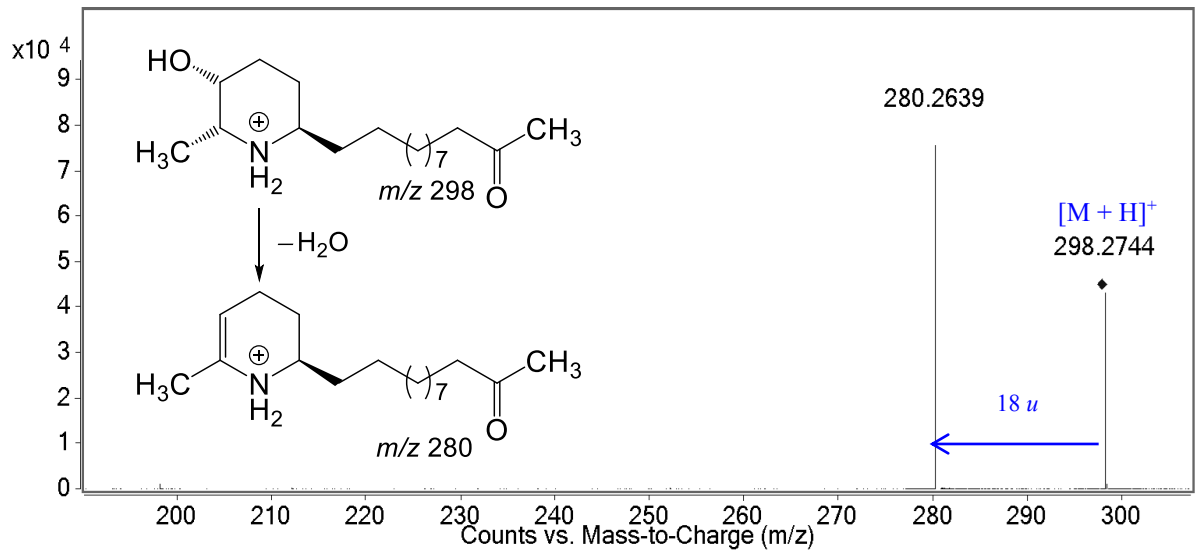
**Figura 54** – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **4**



Fonte: o autor.

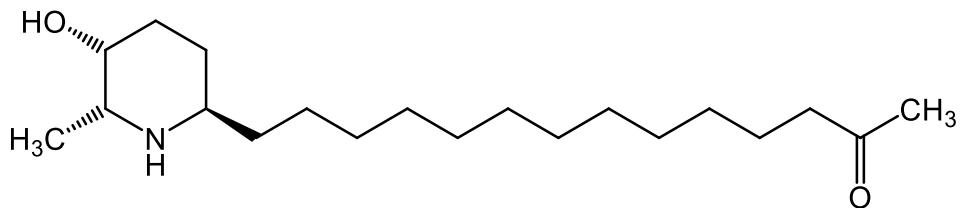
O sinal de  $m/z$  298, ao ser submetido à análise por EM/EM, gerou o íon fragmento de  $m/z$  280, atribuído à eliminação neutra de água (18 u) (Figura 55).

**Figura 55** – EM/EM-IES-(+) do íon molecular  $m/z$  298  $[M + H]^+$  (25 eV), observado para o alcaloide 4

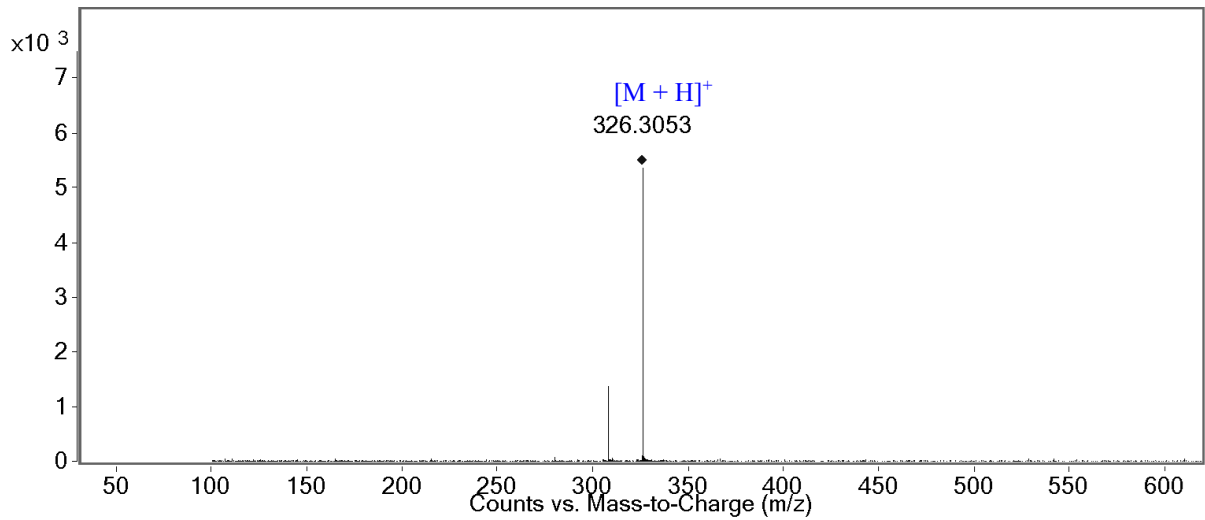


Fonte: o autor.

#### 5.4.1.4 Elucidação estrutural do alcaloide 5 por EM-IES

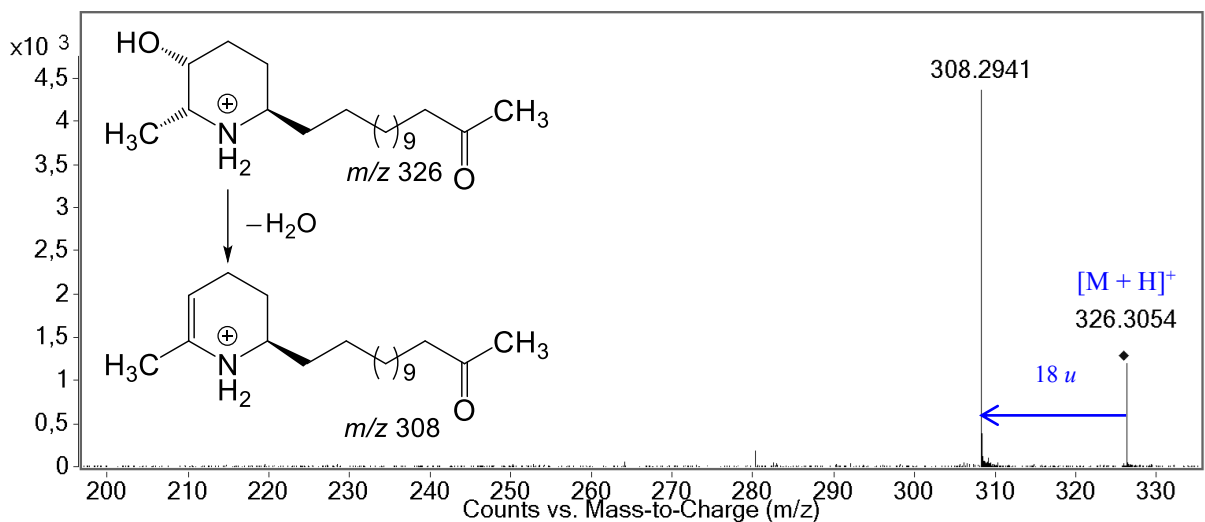


O alcaloide 5 (4,0 mg) foi isolado como um óleo amarelo que apresentou teste positivo com o revelador ICIPt ( $R_f$  0,35) (Figura 16). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular  $C_{20}H_{40}NO_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  326,3053  $[M + H]^+$ , calculado para  $C_{20}H_{41}NO_2^+$  326,3054 ( $\Delta$  -0,3 ppm) (Figura 56).

**Figura 56** – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **5**

Fonte: o autor.

O sinal de  $m/z$  326, ao ser submetido à análise por EM/EM, gerou o íon fragmento de  $m/z$  308, atribuído à eliminação neutra de água (18 u) (Figura 57).

**Figura 57** – EM/EM-IES-(+) do íon molecular  $m/z$  326  $[M + H]^+$  (25 eV), observado para o alcaloide **5**

Fonte: o autor.

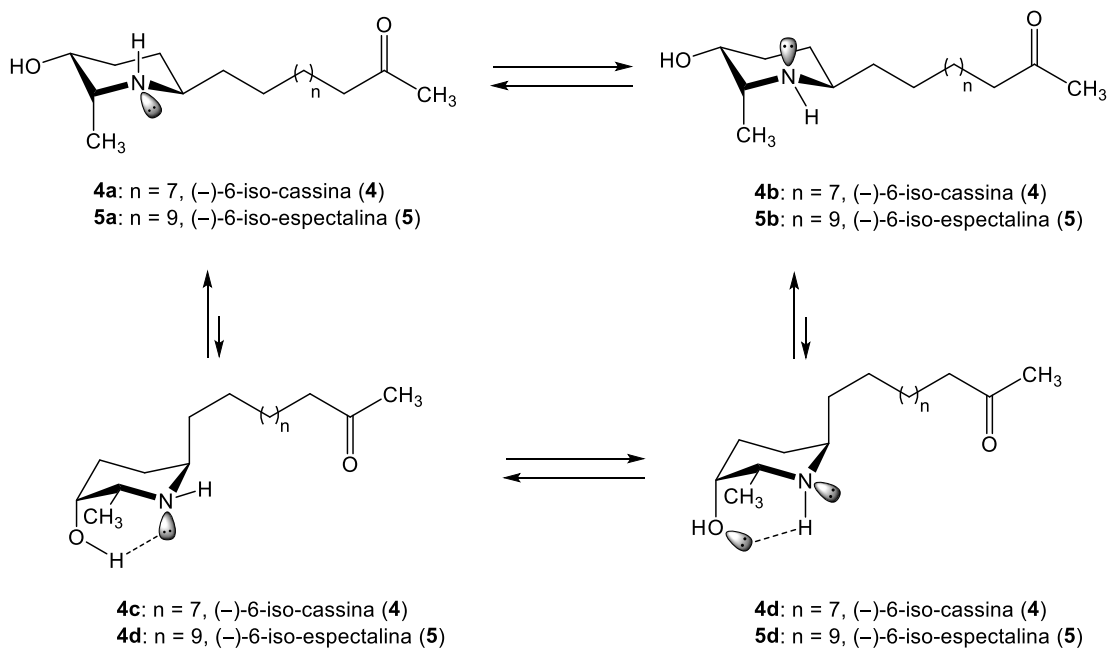
Através da análise dos EM-IES em alta resolução, foi possível constatar que os alcaloides **1/4** ( $m/z$  298,  $[M + H]^+$ ) e **2/5** ( $m/z$  326,  $[M + H]^+$ ), têm as mesmas massas moleculares e conseqüentemente as mesmas fórmulas moleculares, indicando que **1** e **4**, assim como **2** e **5** são estereoisômeros. A partir das análises dos EM-IE e EM/EM e da similaridade apresentada nestes espectros pelos pares **1/4** e **2/5**, apesar dos diferentes aspectos físicos para

**1/2** (sólidos) e **4/5** (óleo), aliado aos diferentes tempos de retenção observados na CG e CLAE (colunas não quirais), fica evidente que a relação estereoquímica entre os pares homólogos (**1/2** e **4/5**) deve ser diastereomérica, o que justifica a separação utilizando sistemas cromatográficos sem a necessidade de auxiliares quirais.

### 5.5 SÍNTESE DOS DERIVADOS ACETILADOS

Visando a preparação de análogos anticolinesterásicos com maior atividade, foram propostas modificações estruturais na hidroxila da posição três (C-3) do núcleo piperidínico dos alcaloides **4** e **5**. Para esse fim foi proposto uma reação de acetilação, comporem quando se trata de piperidínios, 2,6-dissubstituídos essa reação não é trivial, uma vez que diferenças nas conformações e interconversões eletrônicas do nitrogênio, presente no núcleo piperidínio, tornam a hidroxila pouco reativa. A análise detalhada dos confôrmeros (Figura 52) permite observar que **4** e **5** apresentam ligação de hidrogênio intramolecular entre a hidroxila e o nitrogênio, no entanto, o equilíbrio conformacional está deslocado para os confôrmeros (**4a**, **5a**, **4b** e **5b**) onde a hidroxila não está comprometida, deixando-a disponível para a reação. Sabendo que a nucleofilicidade do nitrogênio é maior que a do oxigênio foram preparados os cloridratos de **4** e **5**, para favorecer a nucleofilicidade da hidroxila.

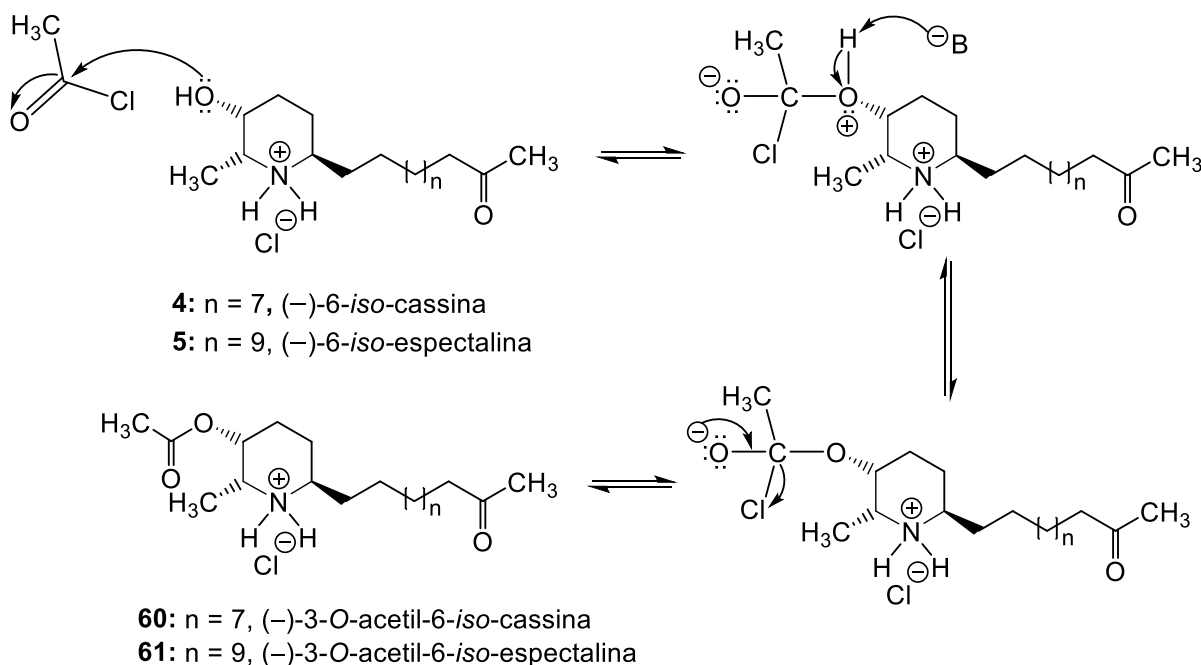
**Figura 58** – Análise conformacional dos alcaloides homólogos **4** e **5**



Fonte: o autor.

Os mecanismos das reações de esterificação para obtenção dos derivados semissintéticos, a partir de **4** e **5**, são do tipo substituição nucleofílica acílica. Inicialmente o par de elétrons do oxigênio ligado ao C-3 do núcleo piperidínico ataca o carbono da carbonila do cloreto de ácido, fazendo com que o par de elétrons da ligação  $\pi$  migre para o oxigênio, formando o íon alcóxido. Em seguida, alguma espécie que possa atuar como base, presente no meio reacional, captura o hidrogênio ligado ao íon hidroxônio restaurando a carga formal do oxigênio (C-3). Na sequência, um o par de elétrons do oxigênio (alcóxido) reestabelece a dupla ligação com o carbono e conseqüentemente há a eliminação do halogênio, levando a formação do éster (Figura 59).

**Figura 59** – Mecanismo de acilação dos alcaloides homólogos **4** e **5**

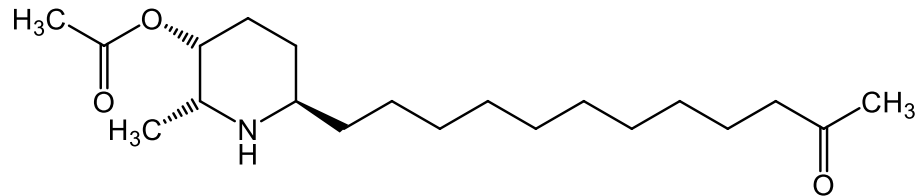


Fonte: o autor.

Essa reação foi realizada com a fração RIC02-F<sub>45-47</sub> (100 mg), que é uma mistura dos alcaloides **4** e **5**, no intuito de diminuir o número de etapas de purificação. O produto da reação foi analisado por CCD e por CG-DIC para avaliar a conversão dos reagentes em produtos. Ao final da reação os produtos foram purificados por CC *flash* (95,0 g, 20,0 × 3,7 cm d.i.) utilizando como FE sílica gel (40–63  $\mu$ m) e FM um gradiente iniciando com hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NH<sub>4</sub>OH (10:0:0,5) até 100% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seguido de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9:1:0,5) até 100% de MeOH. No entanto, só foi possível obter massa do produto (**60**) (5 mg),

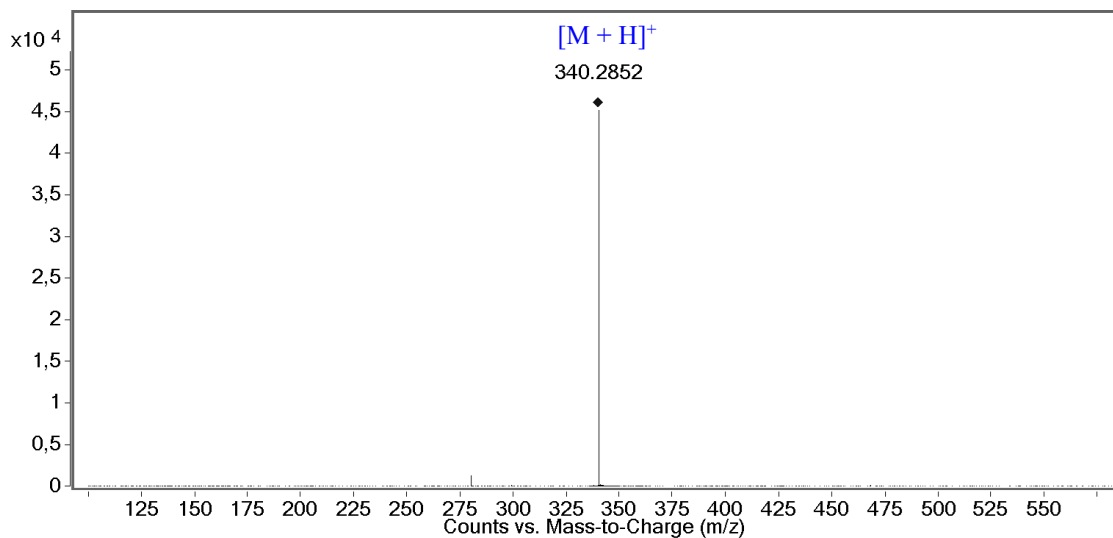
cujo precursor estava em maior quantidade na mistura inicial (4). Este produto foi submetido à análise por espectrometria de massas em alta resolução.

### 5.5.1 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO DERIVADO 60



O derivado 3-*O*-acetil-6-*iso*-cassina (60) foi analisado por espectrometria de massas em alta resolução, modo positivo, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular  $C_{20}H_{37}NO_3$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a três. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  340,2852  $[M + H]^+$ , calculado para  $C_{20}H_{38}NO_3^+$ , 340,2846 ( $\Delta$  1,7 ppm) (Figura 60).

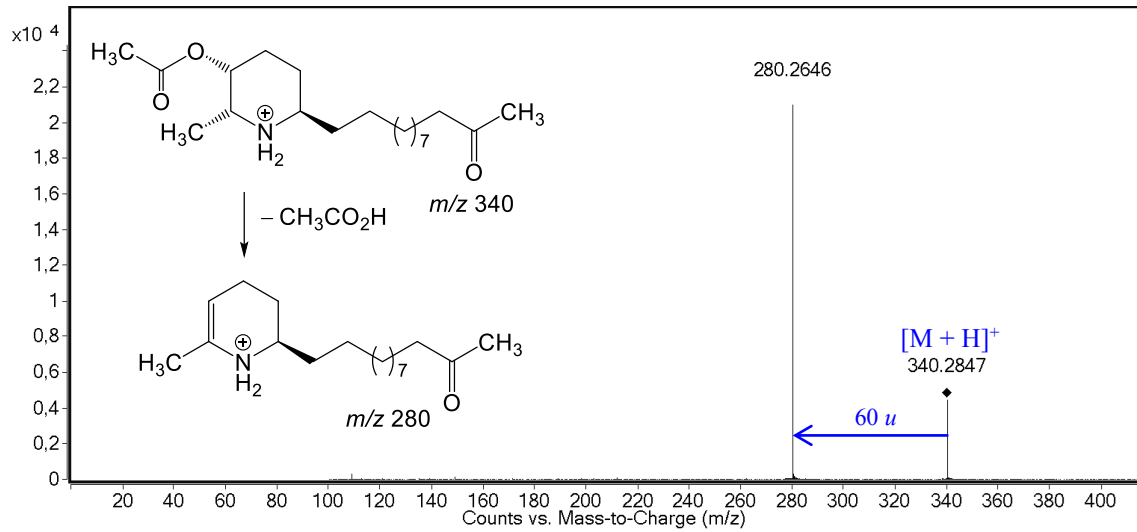
**Figura 60** – EM-IES-(+) em alta resolução do derivado 3-*O*-acetil-6-*iso*-cassina (60)



Fonte: o autor.

Quando o sinal referente a molécula protonada ( $m/z$  340) foi submetido à análise por EM sequencial, foi observado um fragmento de  $m/z$  280, atribuído à eliminação neutra de ácido acético (60 u) (Figura 61).

**Figura 61** – EM/EM-IES-(+) do íon molecular  $m/z$  340  $[M + H]^+$  (25 eV), observado para o derivado 3-*O*-acetil-6-*iso*-cassina (**60**)



Fonte: o autor.

## 5.6 ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

O extrato etanólico, a fração alcaloídica, as misturas contendo os dois alcaloides **1/2**, **4/5**, os alcaloides isolados **1**, **2**, **4** e **5**, e o derivado semissintético **60** foram avaliados quanto ao potencial de inibição da AChE no ensaio em microplaca (Figuras 62 e 63) (Tabela 4).

**Tabela 4** – Avaliação da atividade anticolinesterásica.

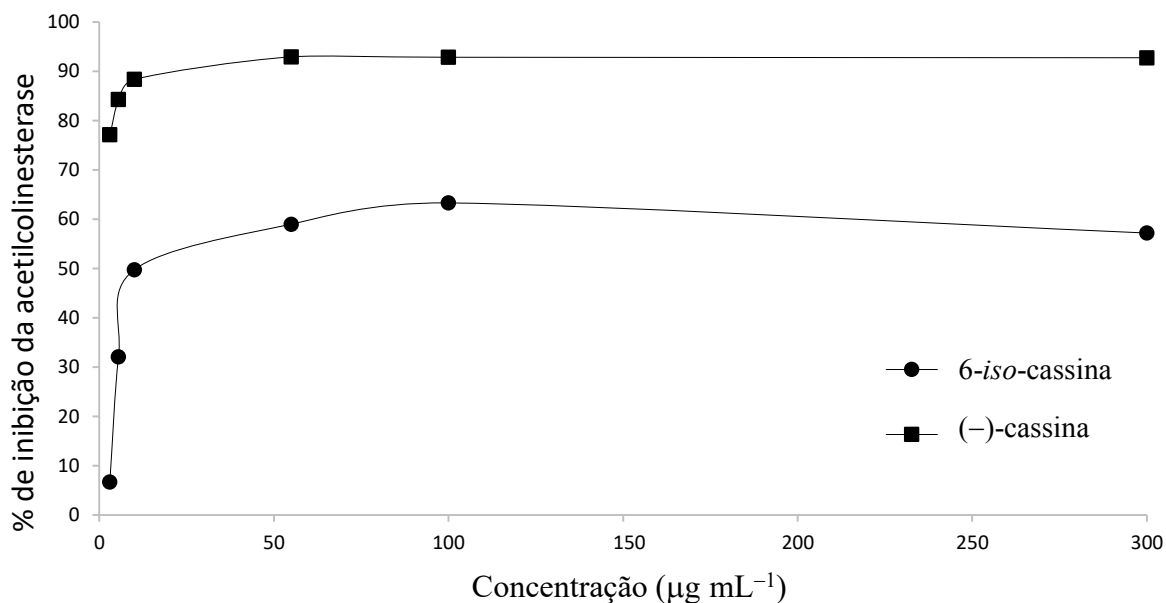
Amostras	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{g mL}^{-1}$ AChE
Extrato etanólico	8,54 $\pm$ 2,3
Fração alcaloídica	5,88 $\pm$ 0,72
Alcaloide <b>1</b>	0,623 $\pm$ 0,0076
Alcaloide <b>2</b>	0,872 $\pm$ 0,12
Mistura alcaloides <b>1</b> e <b>2</b>	0,90 $\pm$ 0,055
Alcaloide <b>4</b>	6,49 $\pm$ 0,23
Alcaloide <b>5</b>	17,6 $\pm$ 1,9
Mistura alcaloides <b>4</b> e <b>5</b>	6,27 $\pm$ 0,91
Derivado <b>60</b>	> 300
Galantamina*	1.5 $\pm$ 0.1

\*Controle positivo

Fonte: o autor.

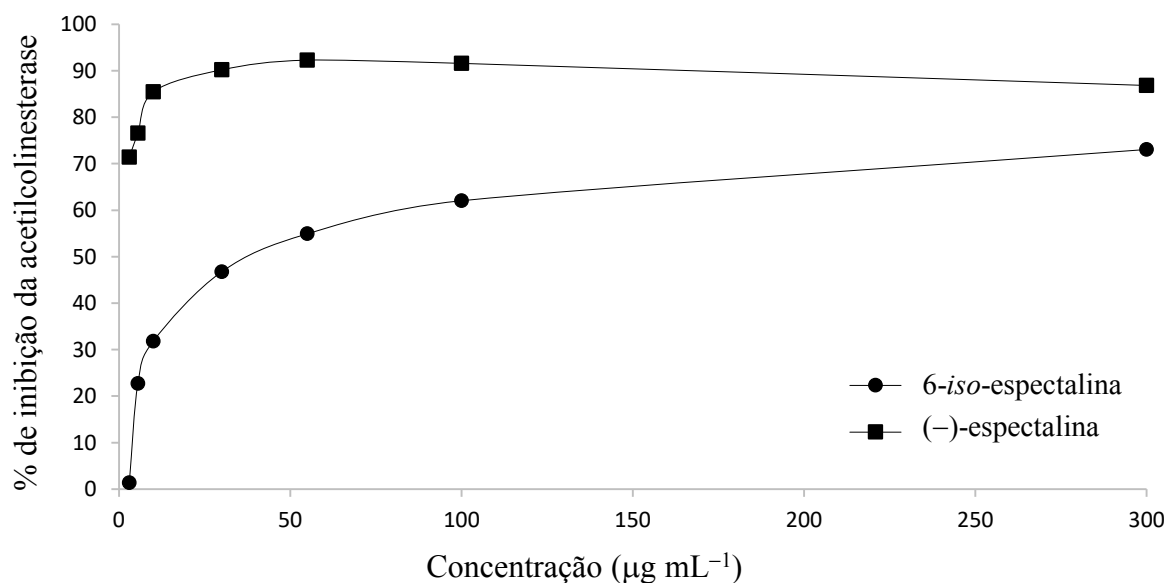
A partir da análise dos resultados de inibição foi possível observar que os alcaloides **1** e **2** são mais potentes que os respectivos estereoisômeros **4** e **5**, na avaliação frente ao mesmo alvo biológico, o que mostra a estereoespecificidade enzimática da AChE. Também foi possível observar uma ligeira seletividade pelos homólogos de menor cadeia (**1** e **4**).

**Figura 62** – Perfil de inibição da AChE para os alcaloides **1** e **4**



Fonte: o autor.

**Figura 63** – Perfil de inibição da AChE para os alcaloides **2** e **5**

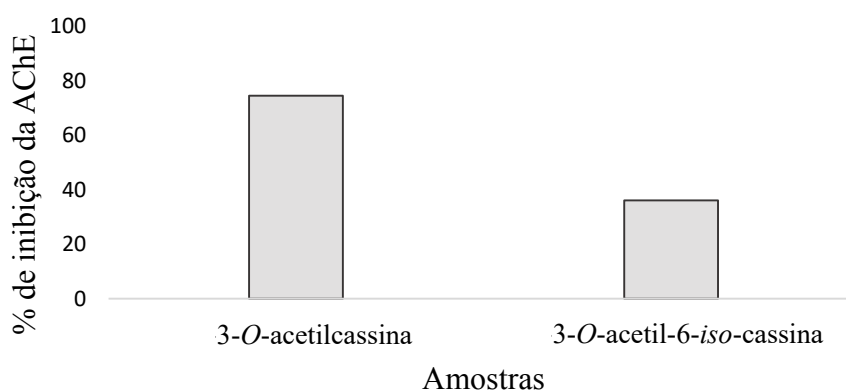


Fonte: o autor.



O derivado acetilado (**60**) também foi submetido ao ensaio de avaliação da atividade inibidora da AChE, no entanto não apresentou inibição quando avaliado na maior concentração ( $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), assim não foi avaliado nas concentrações intermediárias. Para comparação com os dados obtidos neste trabalho, foi plotado um gráfico de porcentagem de inibição da 3-*O*-acetil-6-*iso*-cassina (**60**) e do seu diastereoisômero 3-*O*-acetilcassina (**6**), derivado descrito e sintetizado por FREITAS e colaboradores (2018), na concentração de  $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , onde foi possível observar um potencial de inibição de 36% para **60**, enquanto que **6** apresentou inibição de 74% (Figura 64).

**Figura 64** – Inibição da AChE pelos compostos **6** e **60**



Fonte: o autor.

Mesmo que o derivado semissintético tenha apresentado baixa potência no ensaio de inibição da AChE, fica evidente a existência de uma estreita relação entre a estereoquímica destes derivados e a interação com o sítio receptor da AChE.

## 6 CONCLUSÕES

*Senna spectabilis* provou ser uma importante fonte de alcaloides piperidínicos, de onde foi possível isolar os compostos (-)-cassina (**1**), (-)-espectralina (**2**), 6-*iso*-cassina (**4**) e 6-*iso*-espectralina (**5**). Também foi constatado, por CCD, a presença de outros alcaloides que ainda não foram isolados.

Para separar os pares homólogos **1/2** e **4/5** foi necessário utilizar a cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector *light scattering*, uma vez que as técnicas convencionais de CC não foram eficientes na separação dos homólogos devido principalmente a falta de cromóforos nas suas estruturas, o que inviabiliza o uso de detectores como o UV-vis.

Depois de purificados os alcaloides foram submetidos às análises de EM de alta resolução, o que permitiu a confirmação das fórmulas moleculares. A análise dos EM sequencial, aliada aos dados descritos na literatura, permitiu confirmar as estruturas dos alcaloides **1** e **2** e inferir as estruturas dos estereoisômeros **4** e **5**. Com isso também foi possível constatar a importância da EM.

A partir da mistura dos alcaloides **4/5** foi realizada uma reação de acetilação visando a obtenção do par homólogo, que posteriormente seria separado para avaliação individual dos derivados semissintéticos frente à inibição da AChE. No entanto, do processo de purificação só foi obtido o produto **60**, que foi confirmado por EM em alta resolução e EM/EM.

O extrato etanólico, a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (alcaloídica), as misturas contendo **1/2** e **4/5**, assim como os alcaloides isolados e o derivado semissintético (**60**) foram avaliados quanto ao potencial de inibição da AChE. A partir dos resultados foi possível constatar que a estereoquímica destes compostos está diretamente relacionada a capacidade de inibição enzimática, que também foi confirmada para os pares homólogos. Assim, fica evidente que compostos com diferentes estereoquímicas que apresentem potencial farmacológico precisam ser amplamente investigados.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; GMUNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 363–381, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.016>
- ADSERSEN, A.; KJOLBYE, A.; DALL, O.; JAGER, A. K. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg & Kort. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 179–182, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.006>
- AGRANAT, I.; WAINSCHEIN, S. R.; ZUSMAN, E. Z. The predicated demise of racemic new molecular entities is an ezaggeration. **Nature Reviews**, v. 11, p. 972–973, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrd3657-c1>
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase – AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, 2016. [10.21577/1984-6835.20160122](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122)
- BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, p. 647–656, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000600014>
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. ISBN 978-85-8271-118-7
- BECKETT, A. H. Stereochemical factors in biological activity. **Progress in Drug Research**, s/v, p. 455–524, 1959. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7035-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7035-1_6)
- BELZARENA, S. D. Estudo comparativo entre efedrina e etilefedrina como vasopressor para correção da hipotensão arterial materna em cesarianas eletivas com raquianestesia. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 56, n. 3, p. 229–229, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942006000300002>
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929–5934, 1995. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00254-6](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00254-6)
- BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 181–186, 1999. <http://hdl.handle.net/11449/66030>
- BORTOLOTO, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, p. 215–220, 2009.
- BOUAYAD-GERVAIS, S.; LUBELL, W. D. Examination of the potential for adaptive chirality of the nitrogen chiral center in aza-aspartame. **Molecules**, v. 18, p. 14739–14746, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules181214739>

BROOKS, W. H.; GUIDA W. C.; DANIEL K. G. The significance of chirality in drug design and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 760–770, 2011. <https://doi.org/10.2174/156802611795165098>

BROSSI, A.; SCHONENBERGER, B.; CLARK, O. E.; RAY, R. Inhibition of acetylcholinesterase from electric eel by (–) and (+)-physostigmine and related compounds. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 201, p. 190–192, 1986. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80606-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80606-8)

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 JÚNIOR, C.; MARQUES, M. J. In vitro 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 Letters**, v. 26, p. 4197–4204, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.058>

CASTRO, N. G.; COSTA, R. S.; PIMENTEL, L. S. B.; DANUELLO, A.; ROMEIRO, N. C.; VIEGAS JÚNIOR, C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S.; ROCHA, M. S. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (–)-spectaline. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, p. 339–349, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.035>

CHHABRA, N.; ASERI, M. L., PADMANABHAN, D. A review of drug isomerism and its significance. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 3, 2013. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.112233>

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. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(77\)80211-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)80211-1)

DALL'ACQUA, S. Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. **Botanics: Targets and Therapy**, v. 3, p. 19–28, 2013. <https://doi.org/10.2147/BTAT.S17297>

DANUELLO, A.; ROMEIRO, N. C.; GIESEL, G. M.; PIVATTO, M. VIEGAS JÚNIOR, C.; VERLI, H.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C. A. M.; CASTRO, N. G.; BOLZANI, V. S. Molecular docking and molecular dynamic studies of semi-synthetic piperidine alkaloids as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 163–170, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000100023>

DAVID, B; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemical Reviews**, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>

DINGOVA, D.; LEROY, J.; CHECK, A.; GARAJ, V.; KREJCI, E.; HRABOVSKA, A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. **Analytical Biochemistry**, v. 462, p. 67–75, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.031>

ELMANN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR. V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

FEHER, M.; SCHIMIDT, J. M. Property distribution: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, p. 218–227, 2003. <https://doi.org/10.1021/ci0200467>

FREITAS, T. R.; DANUELLO, A.; VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M. Mass spectrometry for characterization of homologous piperidine alkaloids and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 32, p. 1303–1310, 2018. <https://doi.org/10.1002/rcm.8172>

HAO, Z.; LIU, M.; LIU, Z.; LU, D. Huperzine A for vascular dementia (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2009. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007365.pub2>

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews**, v. 14, p. 111–129, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>

ISLAM, M. R.; MAHDI, J. G.; BOWEN, I. D. Pharmacological importance of stereochemical resolution of enantiomeric drugs. **Drug Safety**, v.17, p. 149–165, 1997. <https://doi.org/10.2165/00002018-199717030-00002>

KIRCHNER, C. Detalhe do cartaz de contergan®. 2017. Disponível em: [https://sdtb.de/fileadmin/user\\_upload/\\_tem/02\\_Ausstellungen/05\\_Objekt\\_des\\_Monats/2017/1200\\_780\\_maerz\\_saeulenplakate-contergan\\_dr-0037-10\\_kirchner.jpg](https://sdtb.de/fileadmin/user_upload/_tem/02_Ausstellungen/05_Objekt_des_Monats/2017/1200_780_maerz_saeulenplakate-contergan_dr-0037-10_kirchner.jpg).

KONRATH, E. L.; PASSOS, C. S.; KLEIN-JÚNIOR L. C.; HENRIQUES A. T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2013. <https://doi.org/10.1111/jphp.12090>

KOZIKOWSKI, A. P.; TUCKMANTEL, W. Chemistry, pharmacology, and clinical efficacy of the Chinese nootropic huperzine A. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, p. 641–650, 1999. <https://doi.org/10.1021/ar9800892>

KUMAR, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 1023–1035, 2006. <https://doi.org/10.1002/ptr.1970>

LACERDA, R. B. M.; FREITAS, T. R.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, T. L.; SILVA, C. V.; CANDIDO, P. A.; OLIVEIRA, R. J.; VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M. Isolation, leishmanicidal evaluation and molecular docking simulations of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 2018, p. 5816–5823, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.032>

LEI, T.; WANG, J.; DU, G. **Natural small molecule drugs from plants**. DU, G. (Org.), Galantamine. Singapura: Springer, 2018. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7\\_42](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7_42)

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 657–663, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000600015>

LIN, G.; ZHANG, J.; CHENG, J. **Chiral Drugs: chemistry and biological action**. Lin, G. (Org.), Overview of chirality and chiral drugs. John Wiley & Sons, Inc., 2011.  
<https://doi.org/10.1002/9781118075647>

LIU, J.; YUAN-LONG, Z.; CHAO-MEI, Y.; YOU-ZUO, Z.; YAN-YI, H.; FENG-WU, W.; BAO-FENG, Q. The structures of huperzine A and B two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 64, p. 837–839, 1986.  
<https://doi.org/10.1139/v86-137>

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, p. 184, 2002.

MARCO, L.; CARREIRAS, M. C. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer' disease. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 1, p. 105–111, 2006.  
<https://doi.org/10.2174/157488906775245246>

MARZO, A.; HEFTMANN, E. Enantioselective analytical methods in pharmacokinetics with specific reference to genetic polymorphic metabolism. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 54, p. 57–70, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00128-8)

MATSUI, K.; ODA, Y.; NAKATA, H. YOSHIMURA, T. Simultaneous determination of donepezil (Aricept<sup>®</sup>) enantiomers in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 729, p. 147–155, 1999.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00145-0)

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, 2012.  
<https://doi.org/10.1155/2012/728983>

MELO, G. M. A.; SILVA, M. C. R.; GUIMARÃES, T. P.; PINHEIRO, K. M.; MATTA, C. B. B.; QUEIROZ, A. C.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JÚNIOR, C. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 277–281, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.024>

MMA (2017). O Bioma Cerrado. Brasília: Ministério do Meio-Ambiente. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>

MORO, A.; INVERNIZZI, N. A tragédia da talidomida: a luta pelos direitos das vítimas e por melhor regulação de medicamentos. **História, Ciências, Saúde**, v. 24, p.603–622, 2017.  
<https://doi.org/10.1590/s0104-59702017000300004>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NGO, L.T.; OKOGUN, J. I., FOLK W. R. 21<sup>st</sup> Century natural products research and drug development and traditional medicines. **Natural Products Reports**, 2013.  
<https://doi.org/10.1039/c3np20120a>

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral drugs: an review. **International Journal of Biomedical Science**, 2006.

NICHOLS, E. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 18, p. 88–106, 2018. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30403-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30403-4)

PARK, S. Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, p. 1589–1609, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1010-y>

PATOCKA, J.; DVORAK, A. Biomedical aspects of chiral molecules. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 2, p. 95–100, 2004. <https://doi.org/10.32725/jab.2004.011>

PHAM-HUY, C.; GALONS, H.; VOISIN, J.; ZHU, J.; RIGHENZI, S.; WARNET, J. M.; CLAUDE, J. R.; DUC, H. T. In vitro and in vivo immunosuppressive potential of thalidomide and its derivative, *n*-hydroxythalidomide, alone and in combination with cyclosporin A. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, p. 289–296, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0192-0561\(97\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0192-0561(97)00067-2)

PIVATTO M.; BACCINI, L. R.; SHARMA, A.; NAKABASHI, M.; DANUELLO, A.; VIEGAS JÚNIOR, C.; GARCIA, C. R. S.; BOLZANI, V. S. Antimalarial activity of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* and semisynthetic derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1900–1906, 2014. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140195>

RADWAN, M. A.; ABDINE, H. H.; AL-QUADEB, B. T.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; NAKASHIMA, K. Stereoselective HPLC assay of donepezil enantiomers with UV detection and its application to pharmacokinetics in rats. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 114–119, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.031>

RAPPOSELLI, S. Effect of stereochemistry in medicinal chemistry and drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 758–759, 2011. <https://doi.org/10.2174/156802611795165179>

ROBIN, S.; ZHU, J.; GALONS, H.; PHAM-HUY, C.; CLAUDE, J. R.; TOMAS, A.; VIOSSAT, B. A convenient asymmetric synthesis of thalidomide. **Tetrahedron**, v. 6, n. 6, p. 1249–1252, 1995. [https://doi.org/10.1016/0957-4166\(95\)00155-1](https://doi.org/10.1016/0957-4166(95)00155-1)

SARKER, S. D.; NAHAR, L. **Natural Products Isolation: An Introduction to Natural Products Isolation**. 3. ed. Reino Unido: Humana Press, p. 1–7, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>

SEKHON, B. S. Exploiting the power of stereochemistry in drugs: an overview of racemic and enantiopure drugs. **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 10–36, 2013. <https://doi.org/10.12970/2308-8044.2013.01.01.2>

- SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; CERQUEIRA, G. S.; SABINO, E. B.; ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, P.; FREITAS, R. M. *Iso-6-spectaline* effects on convulsions induced in epilepsy models. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 232–236, 2011a. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.83772>
- SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; FENG, D.; 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, p. 255–259, 2011b. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.10.007>
- SOLOMONS, T. W. G.; CRAIG, B. F. **Química orgânica**, 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, Cap. 5, p. 214–215, 2012.
- SRINIVASU, M. K.; RAO, B. M.; REDDY, S. S.; KUMAR, P. R.; CHANDRASEKHAR, K. B.; MOHAKHUD, P. K. A validated chiral liquid chromatographic method for the enantiomeric separation of rivastigmine hydrogen tartarate, a cholinesterase inhibitor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 320–325, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.12.023>
- SUGIMOTO, H.; YAMANISHI, Y.; LIMURA, Y.; KAWAKAMI, Y. Donepezil hydrochloride (e2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 303–339, 2000. <https://doi.org/10.2174/0929867003375191>
- TEWARI, D.; STANKIEWICZ, A. M.; MOCAN, A.; SAH A. N.; TZVETKOV, N.T.; HUMINIECKI, L.; HORBANCZUK, J. O.; ATANASOV, A. G. Ethnopharmacological approaches for dementia therapy and significance of natural products and herbal drugs. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, p. 1–24, 2018. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00003>
- THALL, E. When drug molecules look in the mirror. **Journal of Chemical Education**, v. 73, p. 481–484, 1996. <https://doi.org/10.1021/ed073p481>
- THOMSEN, T.; BICKEL, U.; FISCHER, P. KEWITZ, H. Stereoselective of cholinesterase inhibition by galanthamine and tolerance in humans. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 603–605, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF00316106>
- TRIGGLE, D. J.; MITCHELL, J. M.; FILLER, R. The pharmacology of physostigmine. **Drug Reviews**, v. 4, p. 87–136, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.1998.tb00059.x>
- TOBE, Y. The reexamination of pasteur's experiment in Japan. **Mendeleev Communications**, v. 13, p. 93–94, 2003. <https://doi.org/10.1070/MC2003v013n03ABEH001803>
- TUMIATTI, V.; MINARINI, A.; BOLOGNESI, M. L.; MILELLI, A.; ROSINI, M.; MELCHIORE, C. Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1825–1838, 2010. <https://doi.org/10.2174/092986710791111206>
- VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J. ARAÚJO, A. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, p. 2278–2287, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100036>



VIANNA, F. S. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHULER-FACCINI, L. Análogos da Talidomida no Brasil: preocupação com a teratogênese. **Visa em Debate**, v. 2, p. 2–8, 2014. <https://doi.org/10.3395/vd.v2i2.230>

VIEGAS JÚNIOR, 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, 2005. <https://doi.org/10.2174/138955705774329546>

VIEGAS JÚNIOR, 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. 5, p. 908–910, 2004. <https://doi.org/10.1021/np0303963>

WOLFORD, A.; MCDONALD, T. S.; ENG, H.; HANSEI, S.; CHEN, Y.; BAUMAN, J.; SHARMA, R.; KALGUTKAR, A. S. Immune-mediated agranulocytosis caused by the cocaine adulterant levamisole: a case for reactive metabolite(s) involvement. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 40, n. 6, p. 1067–1075, 2012. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.045021>

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 157–169, 2011. <https://doi.org/10.1002/ptr.3258>

ZHANG, H. Y.; LIANG, Y. Q.; TANG, X. C.; HE, X. C.; BAI, D. L. Stereoselectivities of enantiomers of huperzine A in protection against b-amyloid<sub>25–35</sub>-induced injury in PC12 and NG108-15 cells and cholinesterase inhibition in mice. **Neuroscience Letters** v. 317, p. 143–146, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02437-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02437-5)