



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

**BRUNO MUNIZ DA SILVA**

**ISOLAMENTO DOS ALCALOIDES (-)-CASSINA E (-)-ESPECTALINA DAS  
FLORES DE *SENNA SPECTABILIS* E PREPARAÇÃO DE DOIS DERIVADOS  
SEMISSINTÉTICOS AROMÁTICOS**

**UBERLÂNDIA, 2019.**

**BRUNO MUNIZ DA SILVA**

**ISOLAMENTO DOS ALCALOIDES (-)-CASSINA E (-)-ESPECTALINA DAS  
FLORES DE *SENNA SPECTABILIS* E PREPARAÇÃO DE DOIS DERIVADOS  
SEMISSINTÉTICOS AROMÁTICOS**

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).

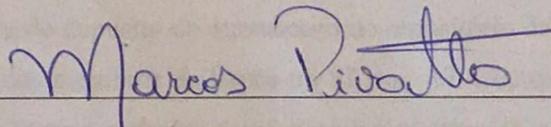
Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

**UBERLÂNDIA, 2019.**

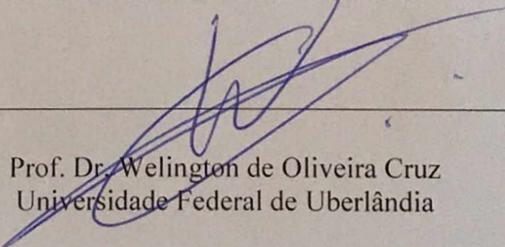
**BRUNO MUNIZ DA SILVA**

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**

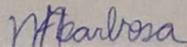


Prof. Dr. Marcos Pivatto (orientador)  
Universidade Federal de Uberlândia



---

Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz  
Universidade Federal de Uberlândia



Mestre Marília Barbosa  
Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, 19 de dezembro de 2019.

*Aos meus pais, Gildásio e  
Márcia, pelo amor fraterno, confiança,  
companheirismo e dedicação.*

*Aos meus irmãos, Bianca e  
Allan, pelo apoio e amizade.*

*Aos meus tios e tias, por sempre  
acreditarem que seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças quando o desânimo e a desesperança surgiam.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto, pela orientação, pelo suporte, conversas e confiança na pesquisa desenvolvida.

À mestre Thamires Rodrigues Freitas, pela paciência, conselhos, muita ajuda, contribuição e dicas.

Aos demais professores do NuPPEN (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) do Instituto de Química da UFU, pelos ensinamentos.

Às amigas criadas no curso de Química Industrial, sentimento fraterno e único.

Aos meus pais, Gildásio e Márcia, pelo amor, confiança, conselhos, incentivos e orações. Sem vocês, nada estaria acontecendo, são meus maiores exemplos.

À minha irmã, Bianca, por sempre acreditar em mim, me apoiar em minhas decisões e auxiliar durante o período de graduação.

À minha namorada, Isabella, por sempre me apoiar, me dar carinho e tornar essa jornada mais leve.

Ao Instituto de Química da UFU, pelo suporte, mesmo em tempos difíceis, tornou possível o desenvolvimento dessa pesquisa.

*Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.*

*(Martin Luther King)*

## RESUMO

O presente trabalho foi planejado a partir de estudos preliminares que verificaram a atividade anticolinesterásica relacionada aos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina, isolados das flores de *Senna spectabilis*. Levando em conta que existem poucos medicamentos para tratamento da doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa que atinge principalmente os idosos, foram planejados diversos derivados. Dentre estes foram selecionados dois análogos benzoilados para serem sintetizados a partir da mistura de (-)-cassina e (-)-espectralina visando a obtenção de compostos mais potentes que possam ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos. Inicialmente, a mistura de (-)-cassina e (-)-espectralina foi transformada nos respectivos cloridratos, utilizando um sistema de Kipp modificado e em seguida submetida à reação com cloreto de benzoíla formando os derivados 3-*O*-benzoilcassina e 3-*O*-benzoilespectalina que foram submetidos à espectrometria de massas em alta resolução para confirmação dos produtos formados. Em seguida, foram submetidos a uma triagem inicial para avaliar a porcentagem de inibição dos compostos frente a enzima anticolinesterase, principal alvo dos fármacos anticolinesterásicos. Os resultados foram pouco significativos para os derivados, apresentando porcentagem de inibição menor que 5% na maior concentração avaliada ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), o que inviabilizou o cálculo do  $\text{IC}_{50}$ .

**Palavras chave:** *Senna spectabilis*, (-)-cassina, (-)-espectralina, alcaloides piperidínicos, derivados semissintéticos, acetilcolinesterase.

## ABSTRACT

The present work was designed from preliminary studies that verified the anticholinesterase activity related to (–)-cassine and (–)-spectaline alkaloids, isolated from *Senna spectabilis* flowers. Considering that there are few drugs to treat Alzheimer's disease, a neurodegenerative disease that mainly affects the elderly, several derivatives have been planned and two benzoylated analogs have been selected to be synthesized from the mixture of (–)-cassine and (–)-spectaline, order to obtain more potent compounds that can be used as models for the development of new anticholinesterase drugs. Initially, the mixture of (–)-cassine and (–)-spectaline was transformed into the respective hydrochlorides using a modified Kipp system and then subjected to reaction with benzoyl chloride to form the 3-*O*-benzoylcassine and 3-*O*-benzoylspectaline derivatives. Which were subjected to high resolution mass spectrometry to confirm the formed products. Then, they were submitted to an initial screening to evaluate the percentage of inhibition against anticholinesterase enzyme (AChE), the main target of anticholinesterase drugs. The results were not significant for the derivatives, presenting inhibition percentage lower than 5% at the highest concentration evaluated (300 µg mL<sup>-1</sup>), making the IC<sub>50</sub> calculation unfeasible.

**Keywords:** *Senna spectabilis*, (–)-cassine, (–)-spectaline, piperidine alkaloids, semi-synthetic derivatives, acetylcholinesterase.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produtos naturais e derivados semissintéticos utilizados no tratamento de câncer.
- Figura 2.** Alguns alcaloides popularmente conhecidos.
- Figura 3.** Alcaloides isolados da quina (**8**), do pau-pereira (**9**) e da estrelas-do-mar (**10**).
- Figura 4.** *Senna spectabilis*: aspectos da planta, altura, flores e folhas.
- Figura 5.** Alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis*.
- Figura 6.** Síntese e catabolismo da ACh.
- Figura 7.** Principais inibidores da AChE aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer.
- Figura 8.** Derivados semissintéticos com potencial anticolinesterásico.
- Figura 9.** Semelhança entre a ACh e os derivados acetilados **15** e **16**.
- Figura 10.** Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*.
- Figura 11.** Aparato de Kipp modificado.
- Figura 12.** Preparação dos derivados benzoilados (**24** e **25**) a partir dos alcaloides **11** e **12**.
- Figura 13.** Sistema de refluxo utilizado na preparação dos ésteres.
- Figura 14.** Cromatoplaça do EEF-*Ss* (**A**) e das frações obtidas da extração líquido-líquido: hexano (**B**) e CHCl<sub>3</sub> (**C**).
- Figura 15.** Cromatoplaça das frações obtidas de BIC01.
- Figura 16.** Procedimentos cromatográficos realizados com a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- Figura 17.** Cromatoplaça das frações obtidas de BIC03.
- Figura 18.** Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração BIC03-F<sub>2</sub>.
- Figura 19.** (+)-EM-IES da fração BIC03-F<sub>2</sub>.
- Figura 20.** Conformações possíveis para os alcaloides **11** e **12**.
- Figura 21.** Mecanismo da reação com cloreto de benzoíla.
- Figura 22.** Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do produto da reação.

**Figura 23.** (+)-EM-IES do derivado semissintético 3-*O*-benzoilcassina (**24**).

**Figura 24.** (+)-EM/EM-IES do derivado semissintético 3-*O*-benzoilcassina (**24**).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Equipamentos disponíveis para realização desse trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

BIC – Bruno Iniciação Científica

CC – Cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia em camada delgada

CG-DIC – Cromatografia a gás com detector de ionização de chama

CLAE – Cromatografia a líquido de alta eficiência

DA – Doença de Alzheimer

DAD – Detector de arranjo de diodos

DMAP – dimetilaminopiridina

DTNB – 5,5-Ditiobis(2-ácido-nitrobenzoico)

d.i. – Diâmetro interno

EEF-*Ss* – Extrato Etanólico das Flores de *Senna spectabilis*

ELSD – Detector evaporativo por espalhamento de luz (do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*).

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para inibir 50% do parasita

ICIPt – Revelador iodocloroplatinato

IQ – Instituto de Química

NuPpEN – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais

PN – Produtos Naturais

PTFE – Politetrafluoretileno.

$R_f$  – Fator de retenção

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UV – Ultra-violeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
1.1 Alcaloides	15
1.2 <i>Senna spectabilis</i>	18
1.3 Doença de Alzheimer	21
<b>2 OBJETIVOS</b>	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	25
3.1 Solventes	25
3.2 Reagentes	25
3.3 Soluções dos reveladores	25
3.3.1 Iodocloroplatinato	25
3.4 Técnicas Cromatográficas	26
3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	26
3.4.2 Cromatografia em coluna	26
3.4.3 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)	26
3.4.4 Cromatografia a gás	27
3.5 Análise de Espectrometria de Massas	27
3.6 Equipamentos utilizados	28
<b>4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	28
4.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico	28
4.2 Extração líquido-líquido	28
4.3 Metodologia Sintética	29
4.3.1 Preparação do cloridrato da mistura de <b>11</b> e <b>12</b>	29
4.3.2 Preparação dos derivados benzoilados	30
4.4 Atividade biológica	31
4.4.1 Atividade anticolinesterásica	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	33
5.1 Fracionamento do EEF-Ss	33
5.2 Preparação dos derivados semissintéticos a partir da mistura de (-)-cassina ( <b>11</b> ) e (-)-espectralina ( <b>12</b> )	37
5.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica	41

<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade faz uso de plantas medicinais há muito tempo, sendo um dos fatores cruciais para a evolução do homem. Antes mesmo de surgir a escrita, historiadores conseguiram identificar que antigas civilizações já utilizavam produtos naturais (PN) seja como alimento ou como remédio. A primeira referência sobre o uso de plantas como medicamento remete a 2800 a.C. na China (PINTO et al., 2017). Com o passar dos anos, o uso das plantas medicinais foi se tornando tradição em muitas comunidades no mundo todo, especialmente em civilizações asiáticas. Apesar do crescimento da medicina alopática ao longo do século XX, uma grande parcela da população mundial ainda não possui acesso aos medicamentos, dificultando o tratamento de inúmeras doenças e favorecendo a disseminação das medicinas alternativas (ROOS et al., 2019).

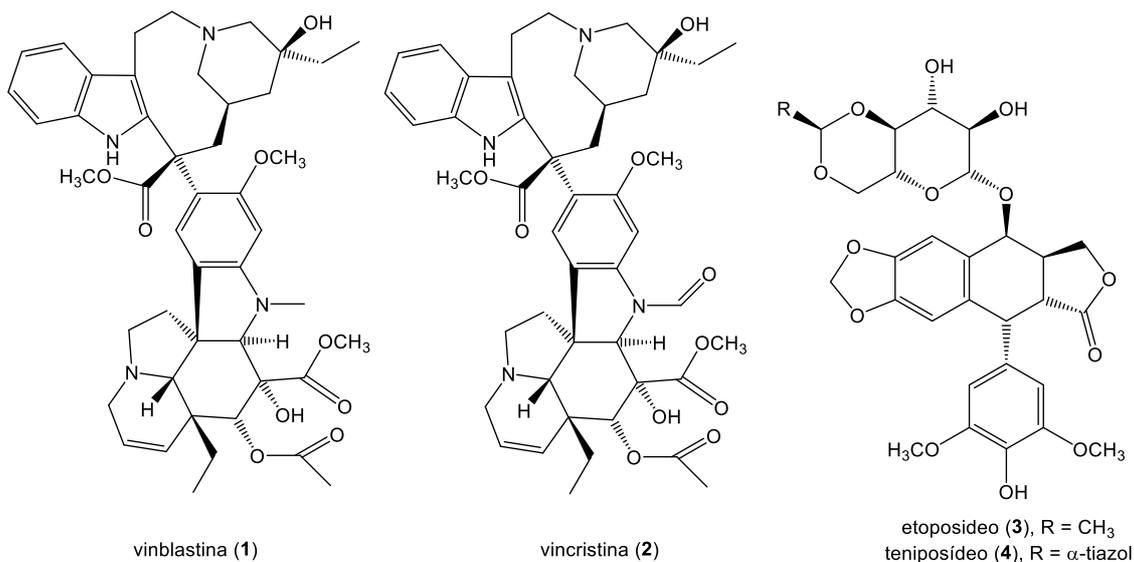
Atualmente, a comercialização de plantas medicinais é feita nas farmácias, em estabelecimentos de manipulação e lojas de produtos naturais. Contudo, uma grande parcela dos produtos comercializados, embora recebam uma rotulação industrial, não possuem certificação de qualidade. Muitas destas plantas são cultivadas em larga escala, não sendo coletadas no seu bioma natural, o que descaracteriza o conceito de medicina tradicional (ROOS et al., 2019).

No Brasil, o uso das plantas no tratamento de enfermidades obteve contribuição significativa dos escravos africanos e esses ensinamentos foram transmitidos através das gerações (PINTO et al., 2017). Sendo assim, a busca por plantas medicinais que possam auxiliar no alívio das dores, mal-estar, entre outros males, é algo enraizado na cultura brasileira, especificamente nas comunidades mais carentes. A falta de auxílio e estruturação na saúde pública e a facilidade em se obter essas plantas faz com que essas alternativas se tornem a única solução para essa parcela da população. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) informam que 80% da população faz uso de métodos caseiros de medicação e dentre estes, 83% utilizam plantas para produção de chás, pomadas, óleos, dentre outras formas de manipulação (STEFANELLO et al., 2018).

Há relatos do uso de produtos naturais para o tratamento de inúmeras doenças, inclusive o câncer. Embora muitos ainda encarem o tratamento tumoral utilizando PNs

com ceticismo, um dos medicamentos anticâncer mais utilizado na terapêutica é derivado da pervinca-de-Madagascar, de onde foram isolados os alcaloides vinblastina (1) e vincristina (2) (Figura 1). Esses dois metabólitos combinados com dois derivados semissintéticos, etoposídeo (3) e teniposídeo (4), estão entre os mais conhecidos atualmente quando se trata de medicamentos anticâncer (CRAGG, NEWMAN, 2013).

**Figura 1.** Produtos naturais e derivados semissintéticos utilizados no tratamento de câncer.

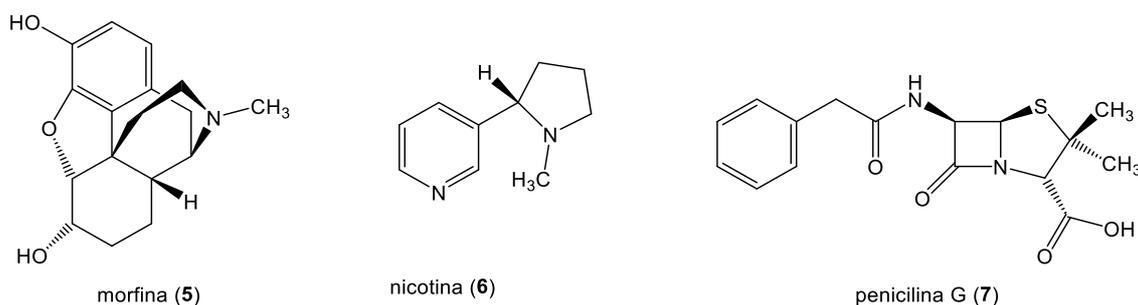


Fonte: o autor.

## 1.1 Alcaloides

Na natureza, especificamente em plantas e micro-organismos há a presença de uma classe de compostos orgânicos cíclicos nitrogenados cujas atividades biológicas são significativas, os alcaloides (PELLETIER, 2001). Diversas atividades biológicas importantes são observadas nesta classe de compostos, principalmente devido à presença de nitrogênio nas estruturas. Assim, alguns alcaloides são utilizados no âmbito médico, exercendo diversas funções. Alguns são bastante conhecidos como a morfina (5), nicotina (6) e penicilina G (7) (Figura 2) (VOLLHARDT, 2013).

**Figura 2.** Alguns dos diversos alcaloides extraídos e obtidos a partir de produtos naturais.



Fonte: o autor.

Uma grande variedade de alcaloides e seus derivados são utilizados na medicina asiática desde muito tempo como ingredientes ativos para medicamentos no tratamento de doenças transmitidas por vírus e bactérias. Nesse contexto, pesquisadores têm investido na busca por novos produtos naturais o que tem impulsionado o desenvolvimento de novos métodos de extração e purificação, expandindo a química de PNs e conseqüentemente o conhecimento de novos alcaloides (QIU et al., 2014).

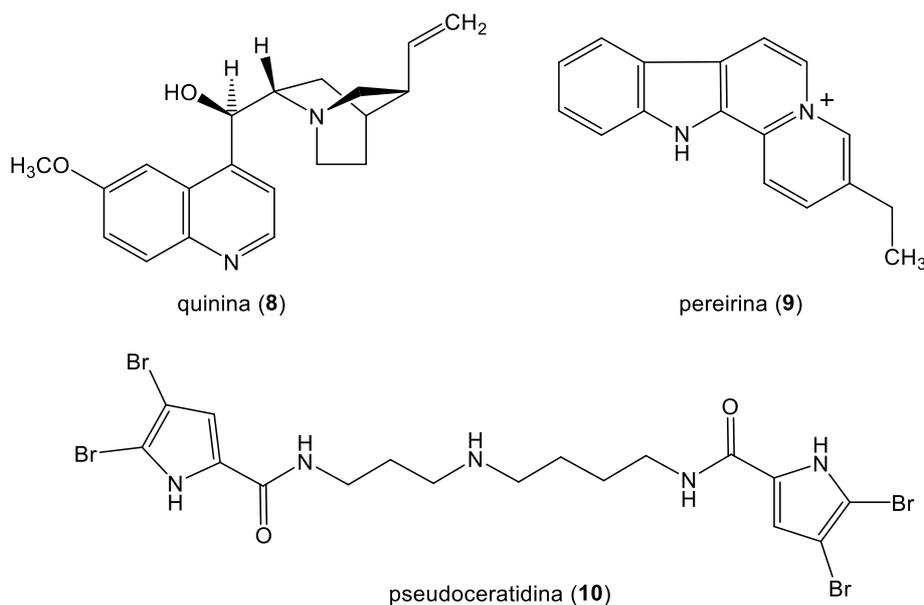
Paralelamente, na América, o tratamento de doenças com PNs está enraizado na cultura dos diferentes povos. Os conhecimentos foram transmitidos por gerações e, na maioria das vezes, adquiridos de forma empírica (DA TRINDADE et al., 2019). Civilizações como os incas, maias e astecas utilizavam diferentes tipos de plantas, como a “coca” e a “quina”, no tratamento de algumas enfermidades. A maioria das descobertas dessas civilizações são retratadas como lendas, mas a manipulação de folhas e cascas das plantas de fato atuavam como importantes remédios nessas comunidades (ALMEIDA et al., 2009).

No século XIX, as primeiras substâncias começaram a ser extraídas das plantas, principalmente os ácidos e bases orgânicas, sendo essas bases posteriormente denominadas de alcaloides. Neste período, compostos como a morfina (5) (Figura 2), foram estudados por Setürner (1783–1841) e posteriormente isolados por Séquin (1767–1835). Em seguida foi isolada a quinina (8) (Figura 2), um alcaloide quinolínico extraído das cascas da quina, que foi isolado em 1820 por Pelletier (1788–1842) e Caventou (1795–1877), utilizada para tratar febres oriundas de diferentes causas (ALMEIDA et al., 2009).

No Brasil, há relatos de que o primeiro alcaloide isolado foi a pereirina (9) (Figura 2), obtida do pau-pereira (*Platycomus regnellii*) e o responsável pelo

isolamento foi o farmacêutico Ezequiel Corrêa dos Santos. Sua pesquisa foi motivada pelo conhecimento dos povos indígenas que relataram a cura de doenças, como a febre amarela através de banhos com água proveniente do cozimento das cascas da planta. Mais tarde, outros farmacêuticos deram a continuidade ao estudo, avaliando a atividade biológica deste alcaloide (ALMEIDA et al., 2009).

**Figura 3.** Alcaloides isolados da quina (8), do pau-pereira (9) e da estrelas-do-mar (10).



Fonte: o autor.

Devido ao desenvolvimento das técnicas de separação nos últimos anos, muitos alcaloides e derivados foram descobertos e avaliados do ponto de vista farmacológico. Com isso, os PNs e seus derivados foram, e continuam sendo, de grande importância para a população de forma geral, ligados de forma direta ou indireta à síntese de novos fármacos (VIEGAS et al., 2004).

Apesar dos avanços tecnológicos, a maneira como os alcaloides são produzidos nas plantas, ou seja, a biossíntese, ainda não é totalmente conhecida, no entanto, é consenso que eles têm papel importante para o desenvolvimento e proteção do organismo. Sabe-se também, que a maioria dos alcaloides são derivados de aminoácidos, como a tirosina, fenilalanina, ácido antranílico, triptofano, triptamina, lisina, histidina, ácido nicotínico, entre outros (ROBERTS et al., 2018).

Durante muitos anos os alcaloides foram associados, em sua grande maioria, a produtos vegetais. No entanto, estudos recentes mostram que estes compostos também estão presentes em microrganismos e animais (ROBERTS et al., 2018). Dentre as descobertas envolvendo animais, vale destacar uma série de derivados alcaloídicos que foram obtidos das estrelas-do-mar, como a pseudoceratidina (**10**) (Figura 2), e que foram avaliados quanto ao potencial antimalárico, anti-Chagas e também para o tratamento da leishmaniose cutânea visceral. Isso evidencia que estudos com alcaloides e seus derivados ocupam um espaço cada vez maior na química de PNs, bem como na farmacologia (PARRA et al., 2018).

## 1.2 *Senna spectabilis*

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ficando atrás somente da Amazônia em território. Sua biodiversidade é conhecida mundialmente e políticas de preservação tem sido objetivo de vários governos (SANTOS, 2018). Muitas das espécies farmacologicamente ativas utilizadas na medicina popular são originárias do Cerrado. O estudo químico destas espécies pode levar ao descobrimento de novos compostos bioativos que podem resultar no desenvolvimento de novos medicamentos (RIBEIRO et al., 2016). Como exemplo, pode-se citar espécies do gênero *Campomanesia* que são usadas na medicina popular para tratar úlceras, diarreia e inflamações (MATTOS et al., 2015). Outra espécie importante é a *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae), em que extratos da planta apresentaram atividade contra larvas de *Aedes aegypti*, atividade leishmanicida contra *Leishmania brasilienses* e *Leishmania amazonenses*, além de ser ovicida e linfocida (linfa é fase intermediária de desenvolvimento do parasita) contra *Rhodnius negletus*, mosquito causador da doença de Chagas (XAVIER et al., 2016).

Dentre os inúmeros exemplos existentes no Cerrado, *Senna spectabilis* tem despertado a curiosidade de muitos pesquisadores devido ao seu valor terapêutico na medicina popular. Trata-se de uma planta ornamental que pode ser cultivada em áreas tropicais e subtropicais (Figura 4) (NKANTCHOUA et al., 2018). Essa planta é da família Fabaceae, que compreende mais de 200 gêneros e 1500 espécies em diferentes biomas brasileiros. *S. spectabilis* pode atingir alturas que variam de 6 a 9 m e na época

de florescência exibe belas flores amarelas. É comumente conhecida como cássia do nordeste, pau-de-ovelha e são-joão (LORENZI, 2002).

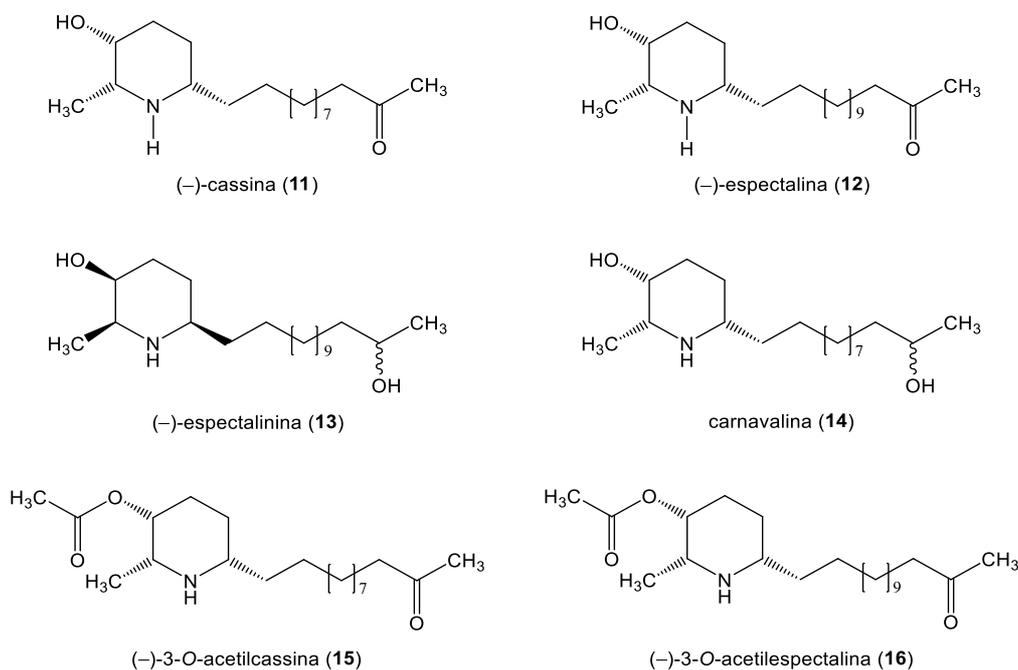
**Figura 4.** *Senna spectabilis*: aspectos da planta, flores e folhas.



Fonte: Lorenzi, 2002.

Devido a facilidade de encontrá-la, muitos estudos foram realizados com extratos etanólicos das folhas, flores e frutos a fim de avaliar o potencial biológico relacionado aos alcaloides presentes. Em 1964, Highet isolou pela primeira vez um alcaloide a partir de *S. spectabilis*, a (-)-cassina (**11**) (Figura 5). Mais tarde, os alcaloides (-)-espectralina (**12**), (-)-espectalinina (**13**), (-)-cassina (**11**) e carnavalina (**14**) (Figura 5), foram isolados a partir de extratos de *Cassia leptophylla*, que na verdade era também *S. spectabilis*, e posteriormente alguns derivados destes foram sintetizados (BOLZANI et.al, 1995). Já no século XXI, a síntese de derivados a partir dos alcaloides encontrados em *S. spectabilis* levou a descoberta de novos derivados com potencial de inibição da acetilcolinesterase, uma enzima chave para o tratamento da doença de Alzheimer (DA) (VIEGAS et al., 2004).

**Figura 5.** Alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis*.



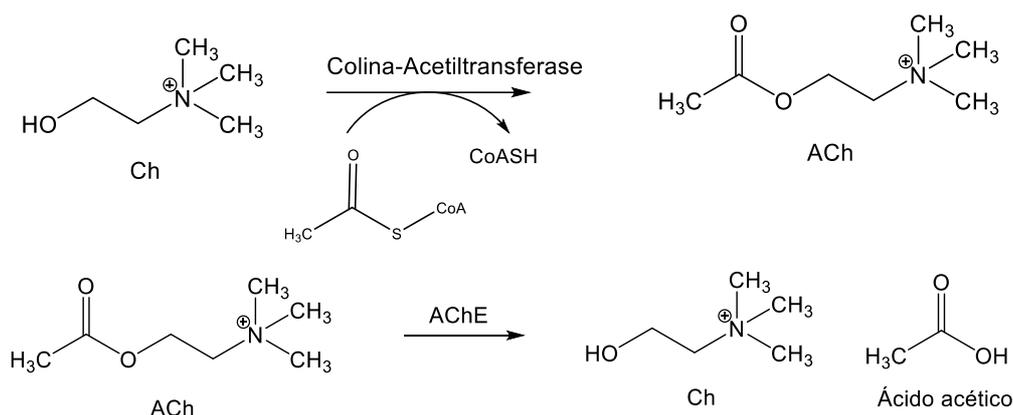
Fonte: o autor.

É possível notar a diferença entre as estruturas de (-)-cassina (11) e (-)-espectralina (12), de apenas duas unidades metilênicas na cadeia lateral em C-6, o que torna a separação desses compostos uma tarefa não trivial. Contudo, a síntese de derivados semissintéticos desses alcaloides, nos últimos anos, são alvo de muitos pesquisadores a fim de auxiliar no tratamento de doenças como a malária (PIVATTO et al., 2014) a leishmaniose (LACERDA et al., 2018) e a DA (SILVA et al., 2010). Os alcaloides de *S. spectabilis* também foram avaliados quanto ao potencial antitumoral, utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (VIEGAS JUNIOR et al., 2004). Além disso, Pivatto et al., 2014 verificaram a atividade antimalárica dos derivados (-)-3-O-acetilcassina (15) e (-)-3-O-acetilespectralina (16), despertando o interesse para estudos visando a síntese de novos derivados semissintéticos. Esses resultados também impulsionaram as pesquisas em busca de novos derivados que possam atuar na inibição da AChE.

### 1.3 Doença de Alzheimer

Estima-se que 46 milhões de pessoas sofram com a DA em todo o mundo (MORAGA et al., 2018). Como essa enfermidade afeta indivíduos de idade avançada e a expectativa de vida do ser humano tem aumentado com o passar dos anos, estudos apontam que em 2050 cerca de 131,5 milhões de pessoas serão acometidos pela doença (MORAGA et al., 2018). Para entender a dinâmica dessa enfermidade, é necessário conhecer um dos neurotransmissores produzidos em nosso corpo, a acetilcolina (ACh), que encontra-se no sistema nervoso central, sistema simpático e parassimpático, e é responsável pela sinalização sináptica. Esse neurotransmissor é liberado na fenda sináptica – espaço entre as membranas das células – e se liga aos seus respectivos receptores, emitindo sinais para os tecidos. Para controlar a concentração de ACh produzido pelo organismo, há a enzima AChE, que cataboliza a ACh em colina e ácido acético (Figura 6). A colina é transportada para o interior das células neurais, reiniciando o ciclo metabólico. O indivíduo acometido pela DA apresenta déficit de ACh, o que acaba comprometendo as atividades cognitivas e consequentemente o indivíduo passa a ter lapsos de memória, se esquecendo desde entes queridos à tarefas triviais, como dirigir, falar, andar ou até mesmo comer (MORAGA et al., 2018).

**Figura 6.** Síntese e catabolismo da ACh.



Fonte: o autor.

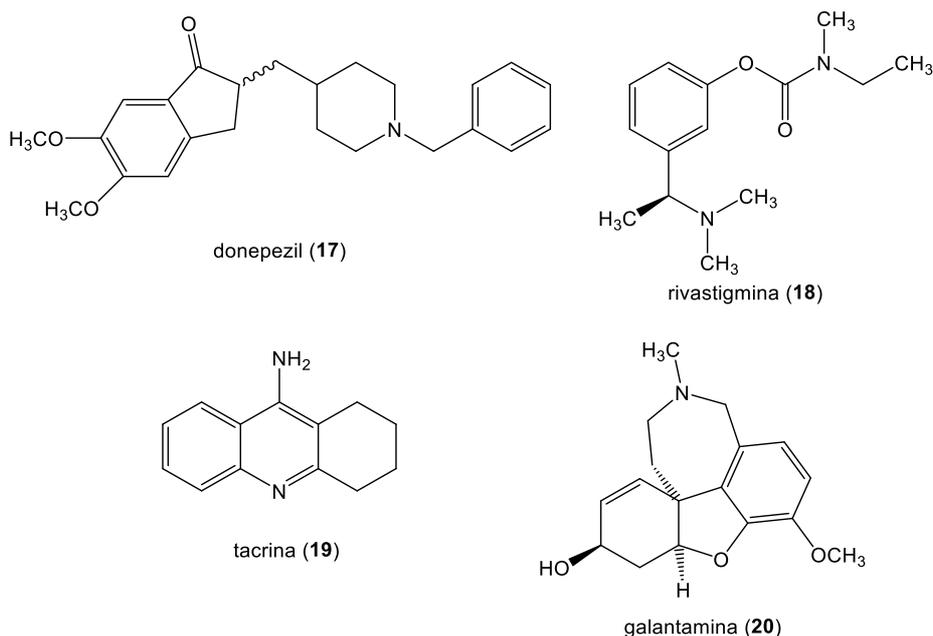
A DA pode apresentar três sintomas principais; primeiramente, acontece a disfunção cognitiva, com perda de memória, dificuldades de linguagem e disfunção executiva (perda de coordenação intelectual e raciocínio comprometido). Num segundo

estágio a DA pode apresentar sintomas como distúrbios comportamentais, como depressão, alucinações, delírios e agitação. No terceiro estágio os indivíduos que manifestam a forma mais grave podem apresentar dificuldades em desempenhar atividades comuns do cotidiano, como dirigir, fazer compras, se vestir ou até mesmo comer. Os diferentes graus da doença podem variar de acordo com os pacientes, sendo que aqueles que já sofrem de alguma doença cardiovascular, podem agravar os sintomas com o passar do tempo (BURNS; ILIFFE, 2009).

O tratamento da DA consiste em administrar medicamentos inibidores da AChE, sendo os mais comuns o donpenezil (**17**), rivastigmina (**18**), tacrina (**19**) e galantamina (**20**) (Figura 7) (METHA et al., 2012). Este último trata-se de um bromidrato de galantamina, um sal de alcaloide que traz menos efeitos colaterais ao paciente. Em contrapartida, estudos mostram que **17** e **18** podem levar o indivíduo a adquirir problemas hepáticos e gastrointestinais. Isso faz com que a busca por novos fármacos capazes de inibir a AChE e que não apresentem efeitos colaterais, seja ainda maior (METHA et al., 2012). Outro fator relacionado a DA é a deficiência de vitamina D que está correlacionada como um fator de risco. Sendo assim, a suplementação desta vitamina é recomendada para indivíduos com demência diagnosticada (WELLER; BUDSON, 2018).

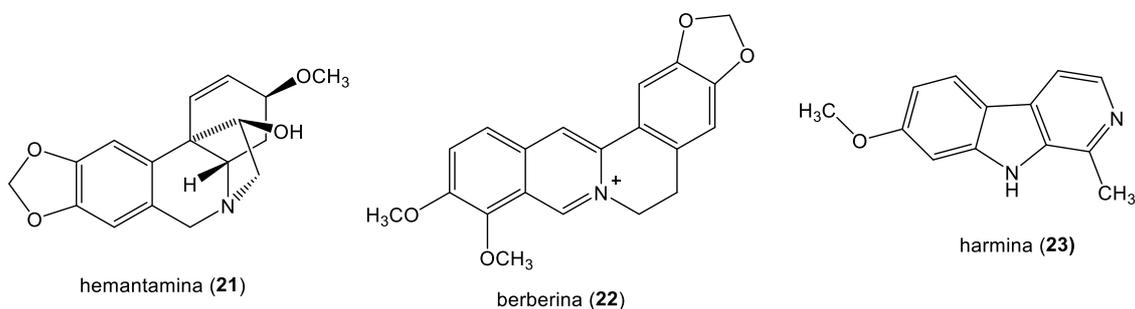
Estudos recentes mostraram que derivados alcaloídicos como a hemantamina (**21**) e berberina (**22**), presentes em *Onychopetalum amazonicum*, apresentam inibição da AChE semelhante à galantamina (**20**) (Figura 8). Estudos de *docking* foram feitos para entender como estes metabólitos interagem com a AChE (LIMA et al., 2019; KOHELOVÁ et. al, 2019).

**Figura 7.** Principais inibidores da AChE aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer.



Fonte: o autor.

**Figura 8.** Derivados semissintéticos com potencial anticolinesterásico.



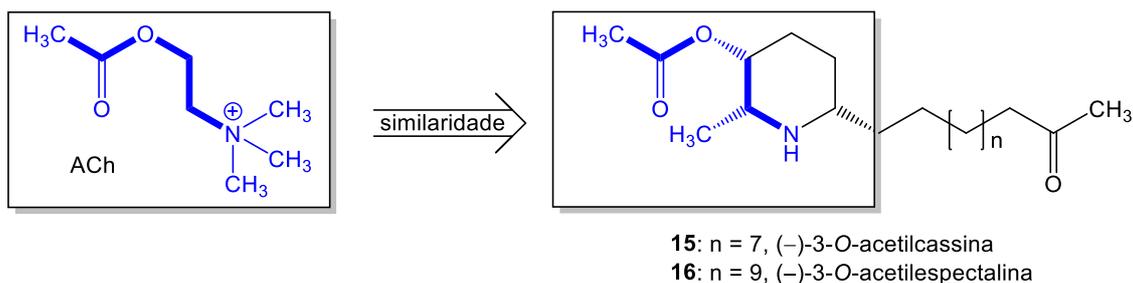
Fonte: o autor.

Outro derivado semissintético recentemente desenvolvido a partir do alcaloide harmina (23) (Figura 8), que inicialmente apresentou atividade nematicida contra *Bursaphelenchus xylophilus*, responsável pela “murchidão” do pinheiro, recentemente, através de ensaios de *docking*, apresentou considerável potencial de inibição da AChE, sendo eleito como um importante modelo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos que atuam no sítio ativo da AChE (XIA et al., 2019).

Estes dados dão suporte para as pesquisas que visam o desenvolvimento de novos derivados semissintéticos de alcaloides, visto que os estudos de *docking* com diferentes compostos tem sido eficientes para o entendimento do modo de interação dos

inibidores de AChE. Dentro deste contexto, o estudo com os alcaloides piperidínicos isolados de *S. spectabilis*, permitiu observar que os derivados acetilados **15** e **16**, preparados a partir da (-)-cassina (**11**) e (-)-espectralina (**12**) (Figura 9), apresentam similaridade estrutural com o neurotransmissor ACh, sugerindo que estes compostos possam ser potenciais inibidores da AChE (FREITAS, 2017).

**Figura 9.** Semelhança entre a ACh e os derivados acetilados **15** e **16**.



Fonte: o autor.

Estes dados despertaram nosso interesse para o um estudo direcionado para a preparação de derivados que possam ser utilizados como inibidores da AChE. Como já mencionado, os alcaloides presentes em *S. spectabilis* são relatados como inibidores dessa enzima. Sendo assim, a busca por novos derivados semissintéticos da (-)-cassina (**11**) e (-)-espectralina (**12**) e a avaliação do potencial biológico desses derivados pode levar a uma série de análogos com potencial anticolinesterásico. Dentro deste contexto, vislumbrou-se a preparação e avaliação anticolinesterásica de dois derivados benzoilados.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Isolamento dos alcaloides majoritários das flores de *Senna spectabilis*;
- Purificação da (-)-cassina (**11**) e (-)-espectralina (**12**);
- Preparo dos derivados 3-O-benzoilcassina e 3-O-benzoilespectralina a partir da (-)-cassina (**11**) e (-)-espectralina (**12**);
- Avaliação do potencial de inibição da acetilcolinesterase (AChE) dos derivados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Solventes

- Metanol (MeOH): Sigma-Aldrich grau HPLC;
- Metanol (MeOH): Synth P.A. ACS;
- Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>): Synth P.A. ACS;
- Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): Vetec P.A;
- Solução aquosa de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 28%: Alphatec P.A. e Neon P.A;
- Solventes de grau analítico, purificados por destilação fracionada: hexano, etanol, metanol e acetona;
- Água deionizada em aparelho da marca Milli-Q plus.

#### 3.2 Reagentes

- Ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H): Synth;
- Hexacloroplatinato de potássio (K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>): Vetec;
- Iodeto de potássio (KI): Chemicals;
- Ácido clorídrico (HCl);
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

#### 3.3 Soluções dos reveladores

##### 3.3.1 Iodocloroplatinato (TOUCHSTONE; DOBBINS, 1978):

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatinico (IV) (H<sub>2</sub>(PtCl<sub>6</sub>).6H<sub>2</sub>O). Também pode ser utilizado o sal K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>.

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

Solução spray: Mistura da solução A, solução B e H<sub>2</sub>O (1:9:10).

### 3.4 Técnicas cromatográficas

#### 3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 (Macherey-Nagel), com 0,20 mm de espessura e indicador de fluorescência (UV 254 nm). As revelações foram feitas por irradiação ultravioleta (254 ou 365 nm) ou por nebulização de revelador específico.

#### 3.4.2 Cromatografia em coluna

Foram utilizadas como fases estacionárias:

- Sílica gel (SiO<sub>2</sub>) para cromatografia (63–200µm, diâmetro de poro 60 Å) Sigma-Aldrich.
- Sílica gel (SiO<sub>2</sub>) para cromatografia flash (40–63µm, diâmetro de poro 60 Å) Sigma-Aldrich.

#### 3.4.3 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

As análises de cromatografia a líquido de alta eficiência, foram realizadas utilizando um cromatógrafo do laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ–UFU), campus de Santa Mônica:

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu®, modelo LC–6AD, composto pelos seguintes módulos: bombas LC–6AD, degaseificador DGU–20A<sub>5R</sub>, forno CTO–20A, coletor de frações FRC–10A, autoinjeter SIL–10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD–M20A e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD, do inglês *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® Lunna C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 µm) protegida pela respectiva pré-coluna. As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 µm.

### 3.4.4 Cromatografia a gás

As análises de cromatografia a gás foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização em chama (CG-DIC) do laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), campus de Santa Mônica.

Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC) Shimadzu, modelo 2010. Foi utilizada uma coluna capilar do tipo OV-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). A análise foi realizada utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 3 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e detector foram de 280 e 300 °C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 μL de solução (1 mg mL<sup>-1</sup>) em diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Foi utilizado o modo *split* de injeção (1:20). A temperatura do forno foi programada para aquecer de 100 a 280 °C com velocidade de 13 °C min<sup>-1</sup>. Tempo total de análise 21,0 min.

### 3.5 Análise de espectrometria de massas

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

As massas acuradas obtidas dos espectros de massa em alta resolução foram comparadas com aquelas obtidas do programa ChemDraw Ultra 12.0 (massas exatas), e calculados os erros em ppm. Para isso foi utilizada a equação abaixo:

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

### 3.6 Equipamentos utilizados

O Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPpEN) – IQ/UFU, também conta com alguns equipamentos básicos (Tabela 1).

**Tabela 1.** 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	LS3000
Linha de secagem de amostras a pressão reduzida	Bomba Edwards	RV5

Fonte: autor.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico

O extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* foi preparado pelo professor Dr. Marcos Pivatto, sendo o material vegetal coletado no Terminal Rodoviário de Araraquara (21°48'26,1"S; 48°10'27,9"O). Sua exsicata (SP 364 109) foi enviada para a Professora Inês Cordeiro que fez a identificação e depósito no Instituto de Botânica de São Paulo. As flores foram secas em estufa com circulação de ar, trituradas em moinho de facas e submetidas à extração com etanol. Processo repetido por cinco vezes, com intervalo de sete dias entre as repetições.

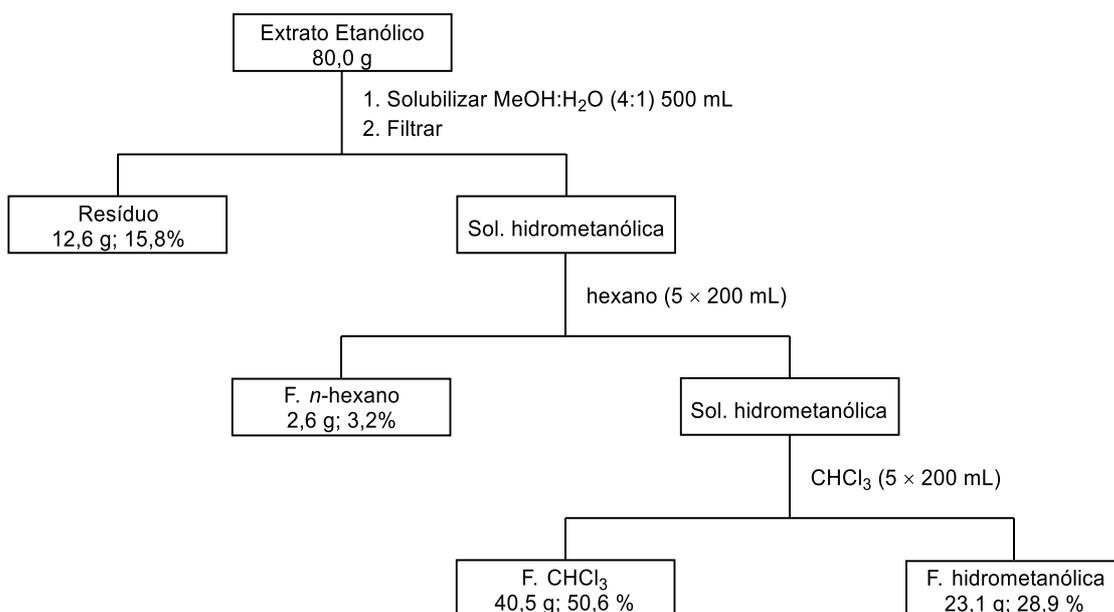
### 4.2 Extração líquido-líquido

O extrato etanólico (80,0 g) foi solubilizado em 400 mL de solução metanol/água (4:1), filtrado e submetido à extração líquido-líquido com hexano (5 × 250 mL) e em seguida com clorofórmio (5 × 250 mL), respectivamente, não sendo necessário a extração com outros solventes, uma vez que estudos anteriores mostraram

que a maior concentração dos alcaloides está na fração clorofórmio (Figura 10) (PIVATTO, 2010). Os solventes das extrações foram destilados em evaporador rotativo.

As frações obtidas, a massa retida no papel de filtro e a fração hidrometanólica foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar a presença dos alcaloides e avaliar a eficiência do procedimento. As placas foram reveladas com o revelador iodocloroplatinato (IClPt).

**Figura 10.** Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*.



Fonte: o autor.

### 4.3 Metodologia sintética

#### 4.3.1 Preparação do cloridrato da mistura de **11** e **12**

Primeiramente foi necessário a preparação dos cloridratos dos alcaloides através da adição de  $\text{HCl}_{(g)}$ , que é gerado com o gotejamento de  $\text{H}_2\text{SO}_{4(l)}$  sobre  $\text{HCl}_{(l)}$ , utilizando um sistema de Kipp modificado (Figura 11). Conforme as gotas do ácido sulfúrico entram em contato com o ácido clorídrico, os vapores do gás ( $\text{HCl}$ ) vão se formando e através de um sistema de cânula são borbulhadas na solução de  $\text{CHCl}_3$  (3 mL) contendo a mistura dos alcaloides (-)-cassina (**11**) e (-)-espectralina (**12**).

**Figura 11.** Aparato de Kipp modificado.

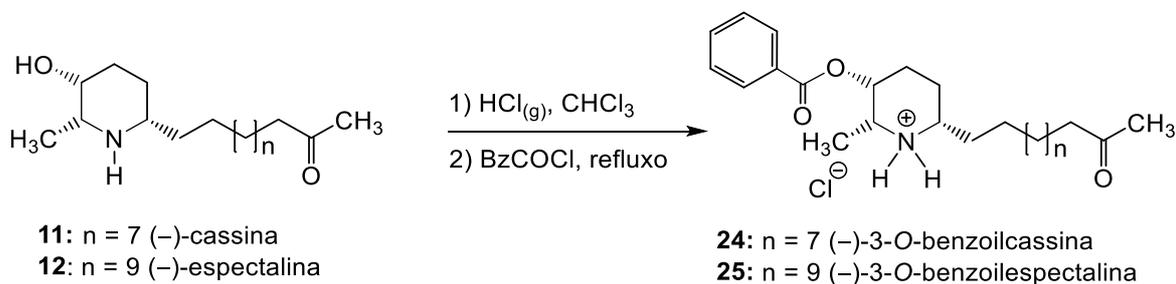


Fonte: o autor.

#### 4.3.2 Preparação dos derivados benzoilados

Inicialmente a mistura de **11** e **12** foi transformada nos respectivos cloridratos utilizando um sistema de Kipp modificado (Figura 11) (PIVATTO, 2010). Em seguida, 245,3 mg da mistura dos alcaloides **11** e **12** foram solubilizados em 20 mL de  $\text{CHCl}_3$ , previamente tratado e destilado. Na sequência, 0,5 mL de cloreto de benzoíla ( $\text{BzCOCl}$ ) e 85,5 mg dimetilaminopiridina (4-DMAP), como catalisador, foram adicionados a reação, que foi mantida em agitação e refluxo por 27 h (Figura 13). A reação foi monitorada por CCD e CG-DIC, sendo observado que após 25 h todo o material de partida havia sido convertido nos respectivos produtos (Figura 12).

**Figura 12.** Preparação dos derivados benzoilados (**24** e **25**) a partir dos alcaloides **11** e **12**.



Fonte: o autor.

**Figura 13.** Sistema de refluxo utilizado na preparação dos ésteres.



Fonte: o autor.

A reação foi finalizada após 27 h com a adição de 25,0 mL de solução aquosa saturada de carbonato de sódio (pH 10) e submetida à extração líquido-líquido com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $5 \times 25,0$  mL), para retirar o excesso do cloreto de ácido do meio reacional. Quando em contato com a água os cloretos de ácido reagem formando o ácido carboxílico, nesse caso o ácido benzoico. A adição da solução aquosa de carbonato de sódio levou a formação do benzoato de sódio que possui maior afinidade pela fase aquosa. Desta forma, com a adição do solvente orgânico ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), há a formação de 2 fases - fase orgânica (produtos da reação e material de partida) e fase aquosa (sal do cloreto de ácido), que são separados utilizando um funil de separação. A extração líquido-líquido foi realizada em temperatura ambiente para evitar a hidrólise básica do éster formado (SOLOMONS, 2009). O produto da reação (3-*O*-benzoilcassina (**24**) e 3-*O*-benzolilespectalina (**25**)), foi analisado por CCD, CLAE e por espectrometria de massas.

#### 4.4 Atividade biológica

Os ensaios para determinar a atividade anticolinesterásica foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola. A

metodologia utilizada foi adaptada a partir dos ensaios realizados por Marston et al. (2002) e Rhee et al. (2001).

#### 4.4.1 Atividade anticolinesterásica

A atividade inibitória da AChE do extrato etanólico, da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dos alcaloides **11** e **12** e dos derivados semissintéticos benzoilcassina (**24**) e benzoilespectralina (**25**) foram avaliadas usando o método de microplaca de 96 poços (MARSTON et al., 2002; RHEE et al., 2001). Neste método, as enzimas hidrolisam os substratos acetilticolina, para produzir tiocolina que reage com 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocinoína e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados a 405 nm.

Para os experimentos, 25 µL de solução aquosa de iodeto de acetilticolina ou iodeto de butirilticolina (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 acetilticolina variando de 3,0 a 300 µg/mL para os compostos isolados e 30 a 2000 µg/mL para o extrato etanólico e fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A seguir, foram adicionados 25 µL de solução de enzima (AChE) 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. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fracionamento do EEF-*Ss*

O EEF-*Ss* e as frações obtidas da extração líquido-líquido foram analisadas por CCD utilizando como fase móvel (FM) uma mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1:0,5) (Figura 14). As cromatoplasmas foram reveladas com ICIPt, sendo possível constatar que a maior concentração de alcaloides estava na fração  $\text{CHCl}_3$ .

**Figura 14.** Cromatoplasma do EEF-*Ss* (A) e das frações obtidas da extração líquido-líquido: hexano (B) e  $\text{CHCl}_3$  (C).

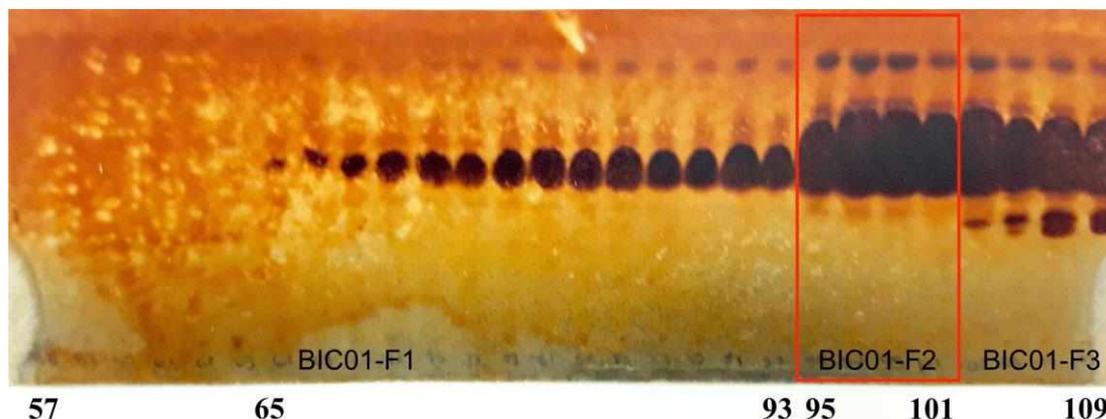


Nota: FE: sílica, FM:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1:0,25) e revelador ICIPt.

Fonte: o autor.

A fração alcaloídica ( $\text{CHCl}_3$ , 10,0 g) foi submetida a cromatografia em coluna (CC) (BIC01) (400,0 g, 15,0 × 8,0 cm d.i.), utilizando como fase estacionária (FE) sílica gel (63–200  $\mu\text{m}$ ) e FM um gradiente de solventes que iniciou com hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NH}_4\text{OH}$  (10:0:0,5) até hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NH}_4\text{OH}$  (0:10:0,5), seguido por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (10:0:0,5) até  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (7:3:0,5), e na sequência 100% de MeOH. Posteriormente, as frações coletadas (202) foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de  $R_f$ , resultando nas frações alcaloídicas BIC01-F<sub>1</sub> (738,0 mg), BIC01-F<sub>2</sub> (527,3 mg) e BIC01-F<sub>3</sub> (813,0 mg) (Figura 15).

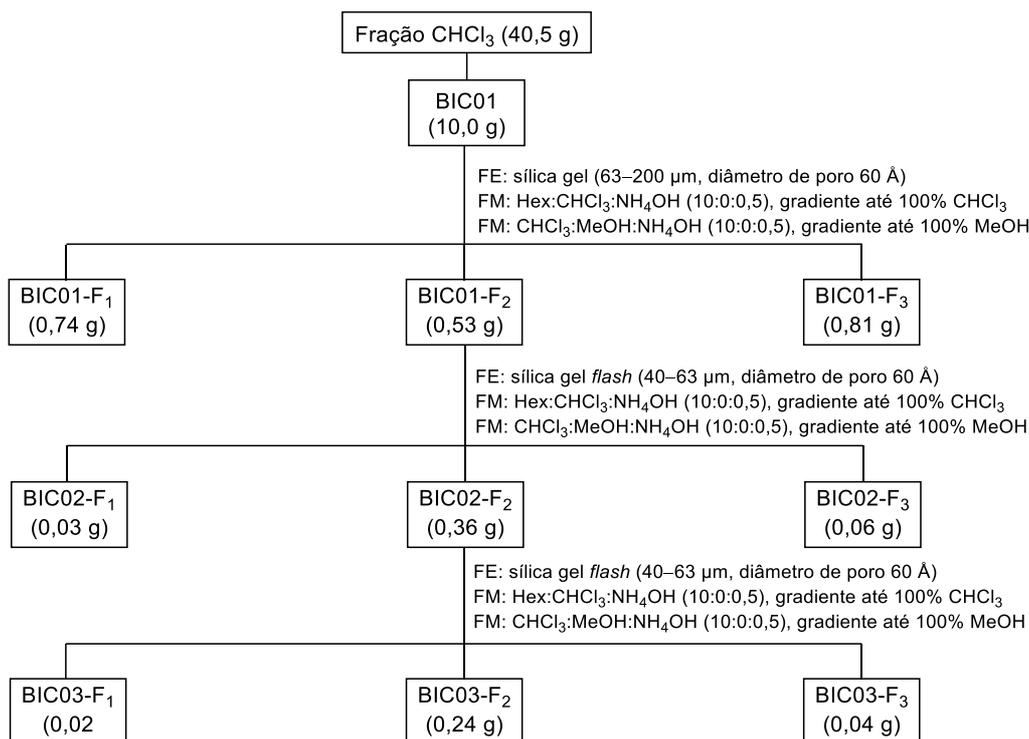
**Figura 15.** Cromatoplaça das frações obtidas de BIC01.



Nota: FE: sílica, FM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9,5:0,5:0,25). Revelador ICIPt.

Fonte: o autor.

**Figura 16.** Procedimentos cromatográficos realizados com a fração CHCl<sub>3</sub>.

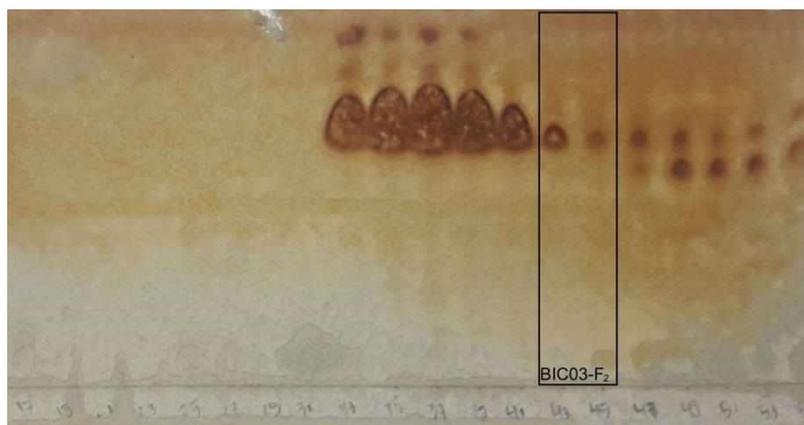


Fonte: o autor.

A fração BIC01-F<sub>2</sub> (527,3 mg) foi submetida novamente a CC (57,8 g, 35,0 × 2,0 cm d.i.) utilizando como FE sílica gel para cromatografia *flash* (40–63 μm) e eluição em modo gradiente utilizando como FM um gradiente de solventes que iniciou com hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NH<sub>4</sub>OH (10:0:0,5) até hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NH<sub>4</sub>OH (0:10:0,5), seguido por

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (10:0:0,5) até CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (7:3:0,5), e na sequência 100% de MeOH. As frações (120) coletadas foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R<sub>f</sub>, de onde foram obtidas três subfrações (BIC02-F<sub>1</sub> (26,8 mg), BIC02-F<sub>2</sub> (362 mg) e BIC02-F<sub>3</sub> (64 mg)). A subfração BIC02-F<sub>2</sub> (362 mg) foi submetida a outro procedimento cromatográfico (BIC03) (30,3 g, 20,0 × 2,5 cm d.i.) utilizando como FE sílica gel para cromatografia *flash* (40–63 μm) e eluição em modo gradiente utilizando como FM um gradiente de solventes que iniciou com hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NH<sub>4</sub>OH (10:0:0,5) até hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NH<sub>4</sub>OH (0:10:0,5), seguido por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (10:0:0,5) até CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (7:3:0,5), e na sequência 100% de MeOH. As frações (71) coletadas foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R<sub>f</sub>, de onde foi obtida a mistura dos alcaloides homólogos (-)-cassina (**11**) e (-)-espectralina (**12**) (BIC03-F<sub>2</sub>, 245,3 mg) (Figura 17).

**Figura 17.** Cromatoplaça das frações obtidas de BIC03.

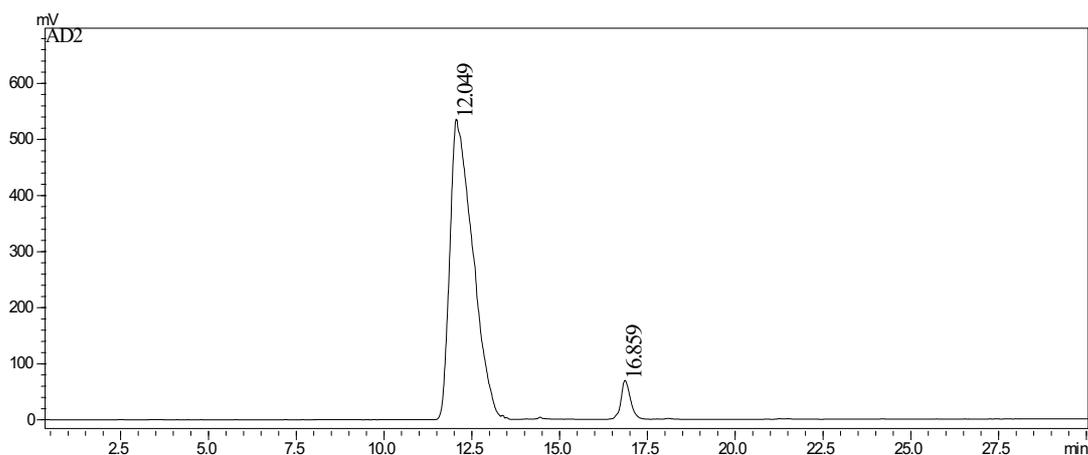


Nota: FE: sílica, FM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9,5:0,5:0,25) e revelador ICIPt.

Fonte: o autor.

A fração BIC03-F<sub>2</sub> foi analisada por CLAE-ELSD (Figura 18), sendo possível observar dois picos principais com  $t_R$  12,0 min. e  $t_R$  16,8 min. O detector evaporativo por espalhamento de luz (ELSD) é universal e pode ser empregado para análise de diferentes classes de produtos naturais, garantindo a detecção mesmo daqueles compostos que não apresentam cromóforo (GONZALEZ et al., 2011; URANO; RODRIGUES; BERLINCK, 2012).

**Figura 18.** Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração BIC03-F<sub>2</sub>.

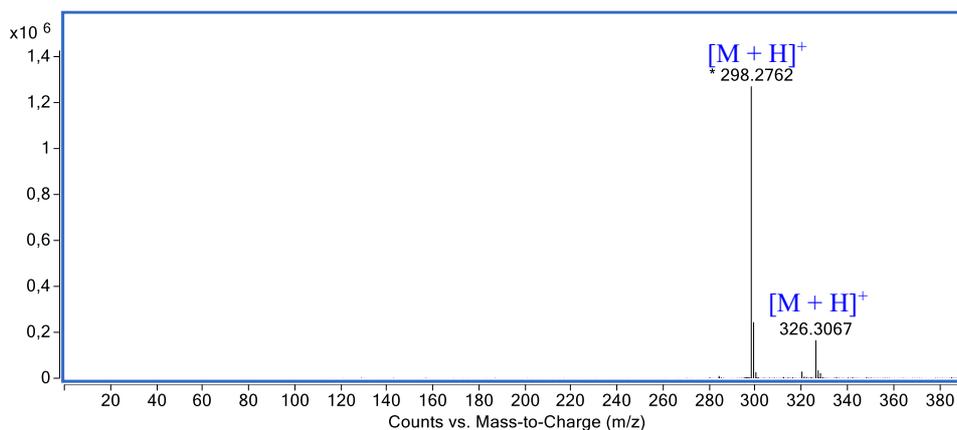


Condições: Coluna Phenomenex® C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (35 min), 35–100% de MeOH–H<sub>2</sub>O, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V<sub>inj.</sub> = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: o autor.

A análise do cromatograma (Figura 18) indicou a presença da mistura de dois alcaloides majoritários, o que na análise por CCD, revelada com ICIPt, mostra apenas uma mancha (Figura 17). A análise da fração BIC03-F<sub>2</sub> por EM-IES em alta resolução permitiu observar os sinais *m/z* 298,2762 e 326,3067 [M + H]<sup>+</sup>, calculados para C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>, 298,2741 (Δ 7,0 ppm) e C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>, 326,3054 (Δ 4,0 ppm), respectivamente (Figura 19). Os sinais de massa par [M + H]<sup>+</sup> caracterizam a presença de compostos com número ímpar de nitrogênio e foram correlacionados aos alcaloides piperidínicos (–)-cassina (**11**) e (–)-espectralina (**12**), já relatados na espécie (FREITAS et al., 2018).

**Figura 19.** (+)-EM-IES da fração BIC03-F<sub>2</sub>.

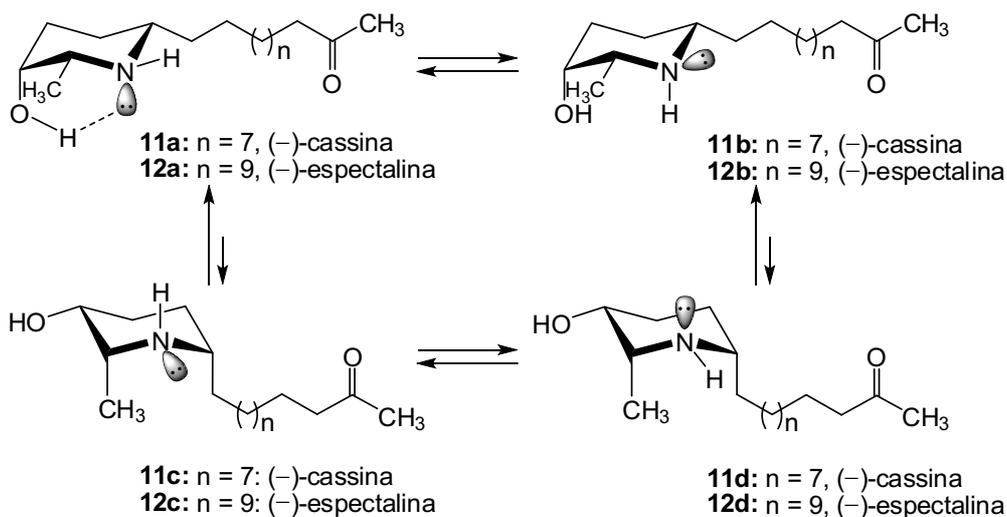


Fonte: o autor.

## 5.2 Preparação dos derivados semissintéticos a partir da mistura de (–)-cassina (**11**) e (–)-espectralina (**12**)

Com o objetivo de sintetizar análogos com maior atividade e menor toxicidade que os alcaloides **11** e **12**, foram propostas modificações estruturais na hidroxila da posição três (C-3) do núcleo piperidínico. Foram propostas reações de esterificação, tarefa não trivial quando se trabalha com piperidínois, 2,6-dissubstituídos, uma vez que diferenças nas conformações e interconversões eletrônicas do nitrogênio, presente no núcleo piperidínio, tornam a hidroxila (C-3) pouco reativa. A análise detalhada dos confôrmeros (Figura 20) permite observar que **11a/12a** apresentam ligação de hidrogênio intramolecular entre a hidroxila do anel piperidínico e o nitrogênio, tornando-a pouco reativa. Também é preciso levar em consideração que a nucleofilicidade do nitrogênio é maior que a da hidroxila, função a ser esterificada, o que pode levar a produtos indesejados de acilação (amidas). Esses produtos podem ser obtidos quando o par de elétrons do nitrogênio não estiver comprometido nas ligações intramoleculares, representado pelos confôrmeros **11b/12b**, **11c/12c** e **11d/12d** (Figura 20). Para contornar esse problema a esterificação foi realizada a partir do cloridrato da mistura de **11** e **12**, uma vez que na forma de amônio quaternário o nitrogênio não faz ligação intramolecular, tornando a hidroxila um melhor nucleófilo que o nitrogênio.

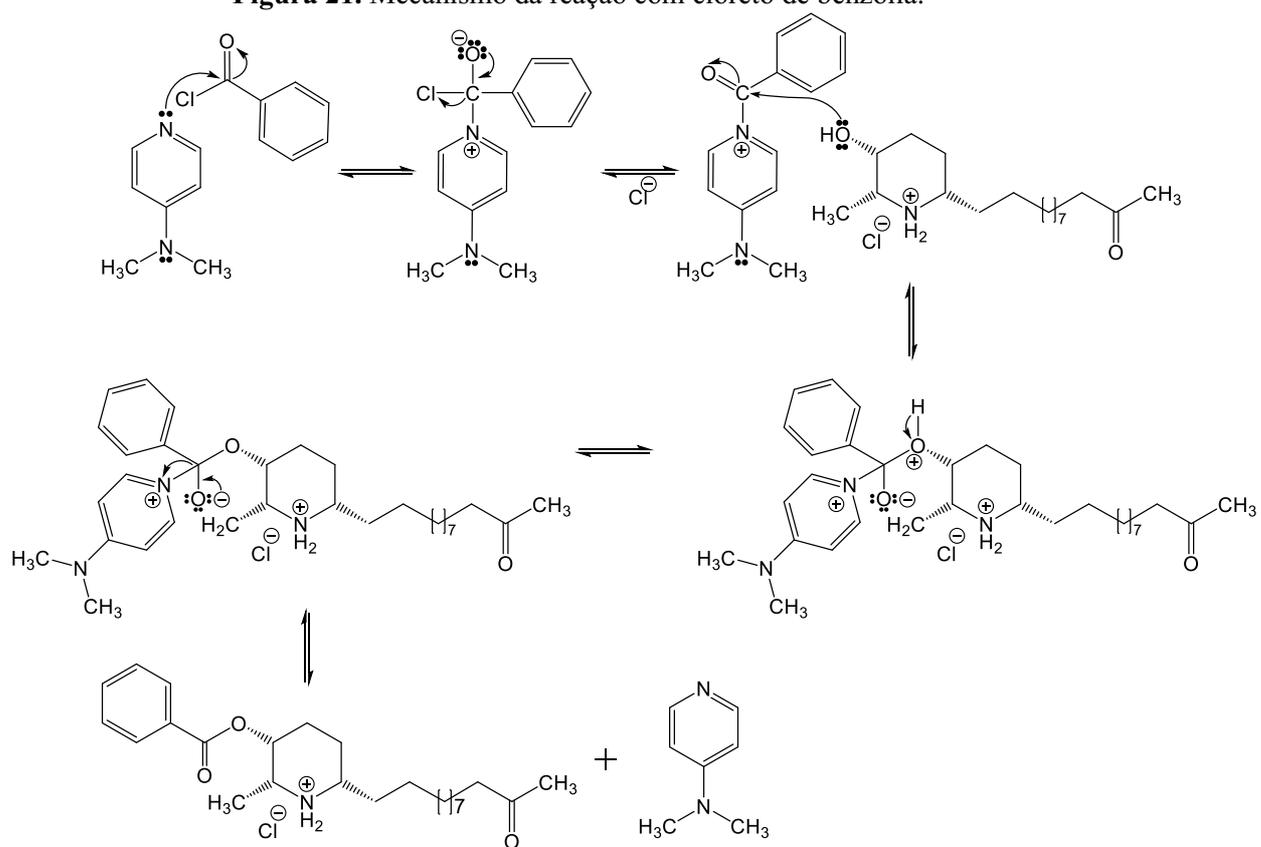
**Figura 20.** Conformações possíveis para os alcaloides **11** e **12**.



Fonte: o autor.

Os mecanismos envolvidos nas reações de esterificação para obtenção dos derivados semissintéticos são do tipo substituição nucleofílica acílica. Inicialmente o par de elétrons da amina secundária do catalisador 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) ataca a carbonila do cloreto de ácido, substituindo o halogênio. Esta espécie carregada apresenta melhor grupo abandonador na etapa equivalente da eliminação do halogênio, aumentando assim a velocidade da reação. Em seguida, o par de elétrons do oxigênio ligado ao C-3 do núcleo piperidínico ataca a carbonila da amida, fazendo com que o par de elétrons permaneça sobre o oxigênio (alcóxido). Na sequência, alguma espécie que possa atuar como base, presente no meio reacional, captura o hidrogênio ligado ao íon hidroxônio. Na próxima etapa o par de elétrons do oxigênio (alcóxido) reestabelece a dupla ligação e conseqüentemente há a eliminação do 4-DMAP levando a formação do éster (Figura 21).

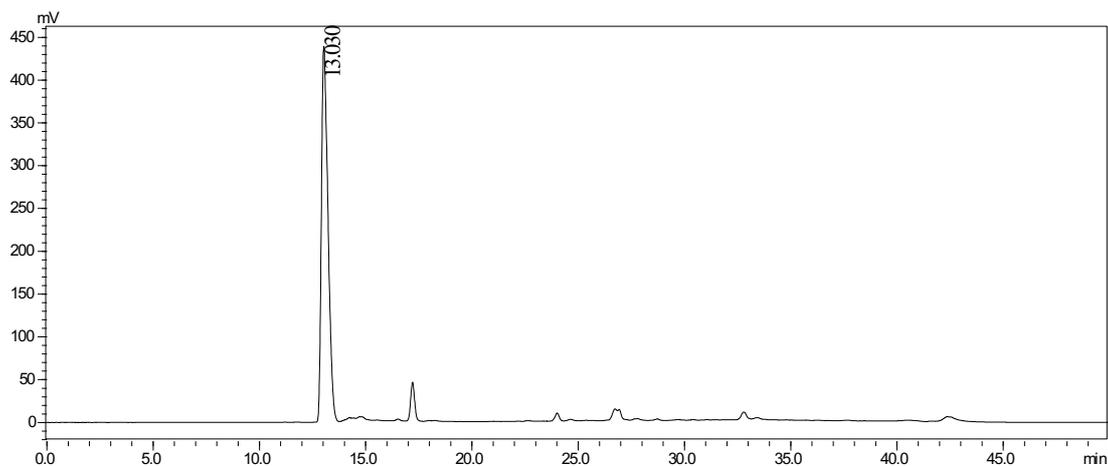
Figura 21. Mecanismo da reação com cloreto de benzoíla.



Fonte: o autor.

O produto da reação foi analisado por CLAE-ELSD (Figura 22), sendo possível observar um pico principal com  $t_R$  13,0 min.

**Figura 22.** Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do produto da reação.

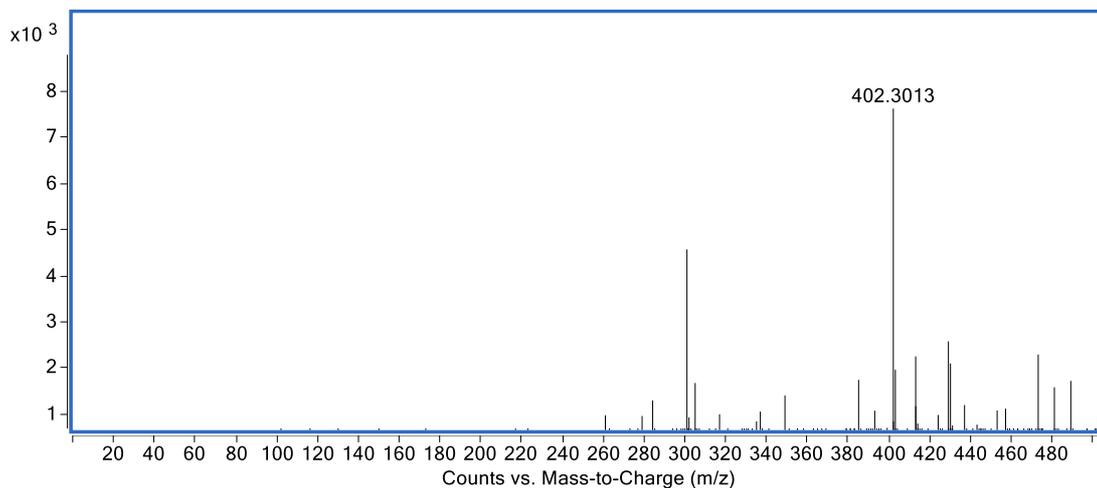


Condições: Coluna Phenomenex® C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (35 min), 35–100% de MeOH–H<sub>2</sub>O, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V<sub>inj.</sub> = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: o autor.

A análise do produto da reação por EM-IES em alta resolução no modo positivo (Figura 23) permitiu observar o sinal de  $m/z$  402,3013  $[M + H]^+$ , que foi calculado para C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>, 402,3003 ( $\Delta$  2,5 ppm), e atribuído ao derivado 3-*O*-benzoilcassina (**24**).

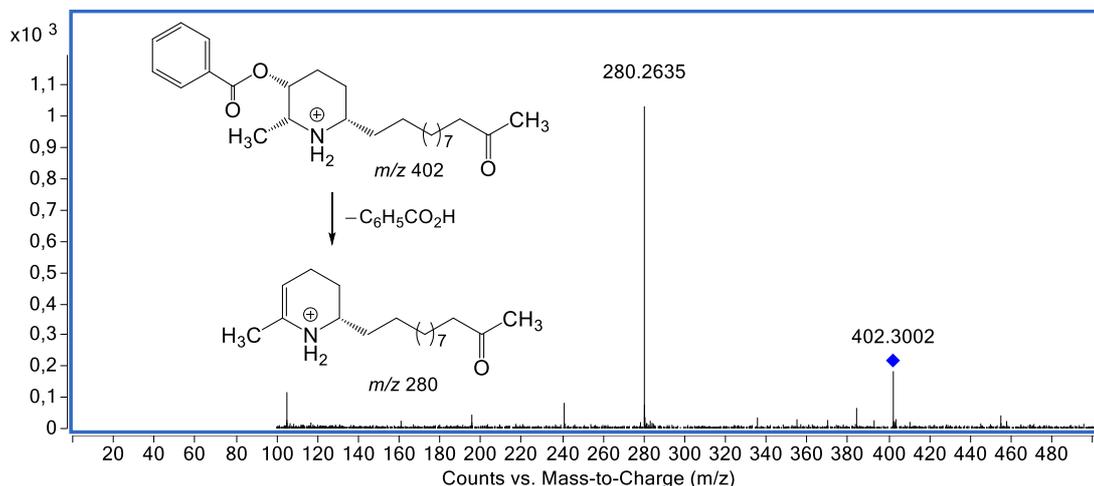
**Figura 23.** (+)-EM-IES do derivado semissintético 3-*O*-benzoilcassina (**24**).



Fonte: o autor.

O sinal de  $m/z$  402 foi submetido à análise sequencial (EM/EM), que gerou o íon fragmento de  $m/z$  280, atribuído à eliminação neutra de ácido benzoico (122  $u$ ) (Figura 24).

**Figura 24.** (+)-EM/EM-IES do derivado semissintético 3-*O*-benzoilcassina (**24**).



Fonte: o autor.

### 5.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica apresentada pelos alcaloides piperidínicos (–)-cassina (**11**), (–)-espectalina (**12**), (–)-3-*O*-acetilcassina (**15**) e (–)-3-*O*-acetilespectalina (**16**), assim como do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* (FREITAS, 2017), nos motivou para avaliação da fração alcaloídica ( $CHCl_3$ ), assim como do derivado semissintético 3-*O*-benzoilcassina (**24**), através do ensaio em microplaca (MARSTON et al., 2002; RHEE et al., 2001).

Inicialmente foi feita uma triagem na concentração de 300  $\mu g mL^{-1}$ , o que permite selecionar os compostos mais promissores (porcentagem de inibição maior que 50%), para continuar os ensaios em diluições seriadas. Como o derivado semissintético **24** não apresentou porcentagem de inibição maior que 50% não foi dada sequência nos estudos e assim não foi possível calcular o valor de  $IC_{50}$ . O baixo potencial de inibição deste derivado, quando comparado com os demais compostos (**11**, **12**, **15** e **16**), pode estar associado ao tamanho do grupo benzoil (ligado ao C-3), que não permite interação com o sítio ativo da AChE devido à algum tipo de impedimento estérico.

## 6 CONCLUSÕES

A busca por novos fármacos impulsiona diferentes setores da ciência, como biologia, química e farmácia a realizarem estudos com produtos naturais com o objetivo de desenvolver novas alternativas para o tratamento de diferentes doenças. Devido a abundante biodiversidade dos países tropicais, como o Brasil, o estudo dos compostos nitrogenados, denominados alcaloides, presentes em inúmeras plantas, vem crescendo nas últimas décadas.

Nesse contexto, *Senna spectabilis* é uma fonte importante de alcaloides como a (-)-cassina (**11**) e a (-)-espectralina (**12**), que são homólogos diferindo em duas unidades metilênicas. Contudo, foi possível observar que essa espécie contém outros metabólitos dessa classe que são mais polares e que ainda são desconhecidos, mas que foram observados por CCD, CLAE e EM.

Para o isolamento dos alcaloides objetos deste estudo, foram utilizados processos cromatográficos, como a cromatografia em coluna, de onde foi possível obter a mistura de (-)-cassina (**11**) e (-)-espectralina (**12**) (245,3 mg), que foi utilizada para a preparação do derivado semissintético. O sistema de solventes capaz de realizar a separação cromatográfica foi o CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9,5:0,5:0,5), utilizando como fase estacionária sílica gel. O uso do hidróxido de amônio foi importante pois apresenta caráter alcalino atuando como amina competidora, diminuindo a interação dos alcaloides com a sílica e otimizando o processo de separação.

A CLAE também foi uma ferramenta importante para purificar o derivado semissintético. Para confirmar a efetividade do procedimento de purificação o derivado foi analisado por CG-DIC, que foi outra ferramenta fundamental para o desenvolvimento do trabalho, por permitir a análise de compostos de baixa polaridade como são os alcaloides piperidínicos.

A caracterização por espectrometria de massas permitiu evidenciar a formação do derivado benzoilado **24** a partir do sinal referente a massa molecular desse composto em alta resolução.

O baixo potencial de inibição da AChE (menor que 5%) observado no ensaio biológico, quando avaliado na maior concentração, sugere que o substituinte benzoíla de **24** atrapalhe de alguma forma a interação do derivado com o sítio ativo da enzima.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. Pereirinha: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, 942–952, 2009.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929–5934, 1995.
- BURNS, A.; ILIFFE, S. Alzheimer's disease. **British Medical Journal**, v. 338, n. 7692, p. 467–471, 2009.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- TRINDADE, R.; SILVA, J. K.; SETZER, W. N. Copaifera of the neotropics: a review of the phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1511, 2018.
- LIMA, B.; LIMA, J. M.; MACIEL, J. B.; VALENTIM, C. Q.; NUNOMURA, R. C. S.; LIMA, E. S.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; CASS, Q. B.; SILVA, F. M. A. Synthesis and inhibition evaluation of new benzyltetrahydroprotoberberine alkaloids designed as acetylcholinesterase inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 629, 2019.
- FALCO, A.; CUKLERMANN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 63–80, 2016.
- FREITAS, T. R.; DANUELLO, A.; VIEGAS JUNIOR., C.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M. Mass spectrometry for characterization of homologous piperidine alkaloids and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 32, n. 15, p. 1303–1310, 2018.
- GONZALEZ, M. H.; BIANCHI, S. R.; PEREIRA, C. D.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Detector evaporativo com espalhamento de luz: princípios de operação e aplicações em cromatografia líquida de alta eficiência. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 4, p. 315–325, 2011.
- HIGHET, R. J. Alkaloids of *Cassia* species. I. cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 471–474, 1964.
- HIRASAWA, Y.; MITSUI, C.; UCHIYAMA, N.; HAKAMATSUKA, T.; MORITA, H. Hupercumines A and B, Lycopodium alkaloids from *Huperzia cunninghamioides*, inhibiting acetylcholinesterase. **Organic Letters**, v. 20, n. 5, p. 1384–1387, 2018.

KOHELOVÁ, E., PERINOVÁ, R., MAAFI, N.; KORABECNY, J.; HULCOVÁ, D.; MARIKOVÁ, J.; KUCERA, T.; GONZÁLEZ, L. M.; HRABINOVA, M.; VORCAKOVÁ, K.; NOVÁKOVÁ, L.; DE SIMONE, A.; HAVELEK, R.; CAHLIKOVÁ, L. Derivatives of the  $\beta$ -crinine Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1307, 2019.

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. 22, 5816–5823, 2018.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. v. 1, p. 184, 2002.

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

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

MATOS, I. L.; MACHADO, S. M. F.; SOUZA, A. R.; COSTA, E. V.; NEPEL, A.; BARISON, A.; ALVES, P. B. Constituents of essential oil and hydrolate of leaves of *Campomanesia viatoris* Landrum. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1289–1292, 2015.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, 2012.

MENDES, E.; HERDEIRO, M. T.; PIMENTEL, F. O uso de terapêuticas à base de plantas por doentes oncológicos. **Acta Médica Portuguesa**, v. 23, n. 5, p. 901–908, 2010.

MORAGA-NICOLÁS, F.; JARA, C.; GODOY, R.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; VENTHUR, H.; QUIROZ, A.; BECERRA, J.; MUTIS, A.; HORMAZÁBAL, E. *Rhodolirium andicola*: a new renewable source of alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity, a study from nature to molecular docking. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 34–43, 2018.

NKANTCHOUA, G. C.; STEPHANIE, N.; FIFEN, J.; SOTOING, T. G.; LUCIE, O.; KANDEDA, A.; NGO BUM, E. Anticonvulsant effects of *Senna spectabilis* on seizures induced by chemicals and maximal electroshock. **Journal of ethnopharmacology**, v. 212, p. 18–28, 2018.

PARRA, L. L. L.; BERTONHA, A. F.; SEVERO, I. R. M.; AGUIAR, A. C. C.; SOUZA, G. E., OLIVA, G.; GUIDO, R. V. C.; GRAZZIA, N.; COSTA, T. R.; MIGUEL, D. C.; GADELHA, F. R.; FERREIRA, A. G.; HADJU, E.; ROMO, D.; BERLINCK, R. G. S. Isolation, derivative synthesis, and structure–activity relationships of antiparasitic bromopyrrole alkaloids from the marine sponge *Tedania brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 1, p. 188–202, 2018.

PELLETIER S. W. **Alkaloids: chemical and biological perspectives**, v. 15, p. 1–635, 2001.

PINTO, N. C. C.; SILVA, J. B.; MENEGATI, L. M.; GUEDES, M. C. M. R.; MARQUES, L. B.; SILVA, T. P.; DE MELLO, R. C. N.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SALVADOR, M. J.; SCIO, E.; FABRI, R. L. Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2053–2073, 2017 .

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

PIVATTO, M.; BACCINI, L. R.; SHARMA, A.; NAKABASHI, M.; DANUELLO, A.; VIEGAS JUNIOR.; 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.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. J. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217–223, 2001.

RIBEIRO, P. H. S.; SANTOS, M. L.; CAMARA, C. A. G.; BORN, F. S.; FAGG, C. W. Seasonal chemical compositions of the essential oils of *Twoeugenia* species and their acaricidal properties. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 38–43, 2016.

ROBERTS, M. F.; STRACK, D.; WINK, M. Biosynthesis of alkaloids and betalains. **Annual Plant Reviews**, p. 20–91, 2018.

ROOS, V. C.; CARVALHO, C. F.; COUTINHO, C.; SILVA, L. L.; GINDRI, A. L. Ethnopharmacological study of medicinal plants and their possible drug interactions in two cities of the south of Brazil/estudo etnofarmacológico de plantas medicinais e suas possíveis interações medicamentosas em duas cidades do sul do Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4145–4173, 2019.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. v. 2. Rio de Janeiro: LTC, 2009, p. 496.

STEFANELLO, S.; KOZERA, C.; RUPPELT, B. M.; FUMAGALLI, D.; CAMARGO, M. P.; SPONCIADO, D. Levantamento do uso de plantas medicinais na Universidade Federal do Paraná, Palotina–PR, Brasil. **Extensão em Foco**, v. 1, n. 15, 2018.

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

URANO, R. P. M.; RODRIGUES, F. T.; BERLINCK, R. G. S. Utilização de detecção por espalhamento de luz evaporativo para análise de produtos naturais. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1198–1208, 2012.

VIEGAS JUNIOR, C., BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, p. 655–660, 2004.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. E. **Química orgânica: estrutura e função**. Bookman Editora, 2013.

WELLER, J.; BUDSON, A. Current understanding of a Alzheimer's disease diagnosis and treatment. **F1000Research**, v. 7, p. 1161, 2018.

XAVIER, M. N.; ALVES, J. M.; CARNEIRO, N. S.; SOUCHIE, E. L.; SILVA, E. A. J.; MARTINS, C. H. G.; AMBROSIO, M. A. L. V.; EGEEA, M. B.; ALVES, C. C. G.; MIRANDA, M. L. D. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016.

XIA, Y.; QI, Y.; YU, X.; WANG, B.; CAO, R.; JIANG, D. Nematicidal effect against *Bursaphelenchus xylophilus* of harmine quaternary ammonium derivatives, inhibitory activity and molecular docking studies on acetylcholinesterase. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 1, p. 239–250, 2019.