



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

THAMIRES RODRIGUES FREITAS

**ESTUDO DA ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE
Senna spectabilis (FABACEAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS PIVATTO

COORIENTADORA: PROFA. DRA. AMANDA DANUELLO PIVATTO

UBERLÂNDIA

2022

THAMIRES RODRIGUES FREITAS

**ESTUDO DA ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE
Senna spectabilis (FABACEAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA**

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

Área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda Danuello Pivatto

UBERLÂNDIA

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F866 Freitas, Thamires Rodrigues, 1994-
2022 ESTUDO DA ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS
DE *Senna spectabilis* (FABACEAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA
ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA [recurso eletrônico] /
Thamires Rodrigues Freitas. - 2022.

Orientador: Marcos Pivatto.
Coorientadora: Amanda Danuello Pivatto.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.640>
Inclui bibliografia.

1. Química. I. Pivatto, Marcos ,1979-, (Orient.). II.
Pivatto, Amanda Danuello, - , (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em
Química. IV. Título.

CDU: 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 51 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 133, PPGQUI				
Data:	Um de novembro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00 h	Hora de encerramento:	19:00 h
Matrícula do Discente:	11823QMI004				
Nome do Discente:	Thamires Rodrigues Freitas				
Título do Trabalho:	Estudo da estereoquímica dos alcaloides piperidínicos de <i>Senna spectabilis</i> (Fabaceae) e suas implicações na atividade anticolinesterásica.				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	“Prospecção química de espécies nativas do Cerrado brasileiro visando a descoberta de novos compostos bioativos”.				

Reuniu-se por meio de webconferência, link: <https://conferenciacentral.rnp.br/webconf/marcos-pivatto-2>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Raquel Maria Ferreira de Sousa**, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; **Alberto de Oliveira**, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; **João Henrique Ghilardi Lago**, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo; **Luís Carlos Scalón Cunha**, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia/IFTM e **Marcos Pivatto**, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Marcos Pivatto, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutorado.

Após os ritos da defesa, apresentação do trabalho e arguição, que ocorreu por via on-line através da plataforma Mconf (link: <https://conferenciacentral.rnp.br/webconf/marcos-pivatto-2>), os membros da banca se reuniram em sessão fechada, e deliberaram que a candidata estava **Aprovada**. Foram sugeridas

correções e modificações, que serão avaliadas pela discente e orientador, tendo a partir da data de defesa, 30 dias para a realização e submissão do exemplar final corrigido ao repositório da biblioteca da UFU. Sem mais, foi encerrada a defesa.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/11/2022, às 19:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/11/2022, às 19:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/11/2022, às 19:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luís Carlos Scalon Cunha, Usuário Externo**, em 01/11/2022, às 19:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joao Henrique Ghilardi Lago, Usuário Externo**, em 01/11/2022, às 19:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3993206** e o código CRC **734CCDA1**.

THAMIRES RODRIGUES FREITAS

**ESTUDO DA ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE
Senna spectabilis (FABACEAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA**

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

Área de concentração Química Orgânica.

Uberlândia, 01 de novembro de 2022.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Pivatto
(Orientador – UFU)

Profª. Drª. Raquel Maria Ferreira de Sousa
(Examinador – UFU)

Prof. Dr. Alberto de Oliveira
(Examinador – UFU)

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
(Examinador – UFABC)

Prof. Dr. Luís Carlos Scalón Cunha
(Examinador – IFTM)

UBERLÂNDIA

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho, por me dar forças e vontade para seguir em frente.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto, pela orientação, por todo o conhecimento transmitido, pelos conselhos, pelo incentivo à pesquisa e por confiar em mim.

A professora Dra. Amanda D. Pivatto, pela contribuição e pelas dicas.

Aos amigos do NPCBio, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus pais, Leônidas e Eliane, pelo amor, pelo incentivo e apoio. Agradeço pelos ensinamentos e por serem meus exemplos de fé, dedicação e garra.

A minha irmã Thays, minha melhor amiga e meu exemplo de força e determinação.

Ao meu esposo, Moacir, por ser meu parceiro de vida e por sempre me incentivar.

Aos meus avós, por todo o amor, por serem um exemplo de vida e por suas orações.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPEMIG, CNPq, RQ-MG e INCT-BioNat pelo apoio financeiro ao projeto vinculado a este trabalho.

Ao Instituto de Química da UFU e ao Programa de Pós-Graduação em Química.

RESUMO

Senna spectabilis (Fabaceae) é uma importante fonte de alcaloides quirais e das suas flores foram isolados os alcaloides homólogos majoritários, a (–)-cassina e a (–)-espectralina, assim como dois diastereômeros, a 6-isocassina e a 6-isopectralina. Misturas de pares homólogos foram resolvidas por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo que os quatro compostos isolados tiveram sua configuração relativa determinada por experimentos de ressonância magnética nuclear de NOESY 1D. Adicionalmente, os alcaloides majoritários tiveram sua configuração absoluta determinada pelo método de Mosher. O carbono assimétrico da posição 3 (C-3), tanto da (–)-cassina quanto da (–)-espectralina, foram assinalados como (–)-R. Com isso, aliado aos resultados dos experimentos de NOESY 1D, também foi possível determinar a configuração absoluta do C-2 e do C-6 para a (–)-cassina e a (–)-espectralina, bem como sugerir para os diastereômeros 6-isocassina e a 6-isopectralina, como sendo (–)-2R,3R,6S-cassina, (–)-2R,3R,6S-espectralina, 2R,3R,6R-isocassina e 2R,3R,6R-isopectralina. Com a configuração absoluta assegurada, foi possível a verificação do potencial anticolinesterásico dos alcaloides como inibidores da enzima acetilcolinesterase, sendo que a (–)-cassina (IC_{50} 14,5 μ M) e a (–)-espectralina (IC_{50} 29,9 μ M) foram mais potentes quando comparados a 6-isocassina (IC_{50} 751,5 μ M) e a 6-isopectralina (IC_{50} 2950,5 μ M), respectivamente, indicando que a configuração absoluta do carbono assimétrico da posição 6 (C-6) é fundamental para a atividade.

Palavras-chave: *Senna spectabilis*, alcaloides piperidínicos, ésteres de Mosher, configuração absoluta.

ABSTRACT

Senna spectabilis (Fabaceae) is an important source of chiral alkaloids, from which the major homologous alkaloids, (–)-cassine and (–)-spectaline, as well as two diastereomers, 6-isocassine and 6-isospectraline, were isolated. Mixtures of homologous pairs were resolved by high performance liquid chromatography, with the four isolated compounds having their relative configuration determined by NOESY 1D nuclear magnetic resonance experiments. Additionally, the majority alkaloids had their absolute configuration determined by the Mosher method. The 3-position asymmetric carbon (C-3) of both (–)-cassine and (–)-spectaline, were marked as (–)-R. Thus, together with the results of the NOESY 1D experiments, it was also possible to determine the absolute configuration of C-2 and C-6 for (–)-cassine and (–)-spectaline, as well as to suggest for diastereomers 6-isocassine and 6-isospectraline, being (–)-2R,3R,6S-cassine, (–)-2R,3R,6S-spectraline, 2R,3R,6R-isocassine and 2R,3R,6R-isospectraline. With the absolute configuration assured, it was possible to verify the anticholinesterase potential of the alkaloids as inhibitors of the enzymes acetylcholinesterase, with (–)-cassine (IC_{50} 14.5 μ M) and (–)-spectaline (IC_{50} 29.9 μ M) were more potent when compared to 6-isocassine (IC_{50} 751.5 μ M) and 6-isospectraline (IC_{50} 2950.5 μ M), respectively, indicating that the absolute configuration of the asymmetric carbon at position 6 (C-6) is fundamental for the activity. Therefore, these results allowed to consolidate the knowledge about the structures of piperidine alkaloids of *S. spectabilis*, as well as the application of nuclear magnetic resonance, involving the Mosher method, in the studies of absolute configuration of natural products, in addition to the investigation of their biological implications.

Keywords: *Senna spectabilis*, piperidine alkaloids, Mosher's ester, absolute configuration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	D-glicose e L-isoleucina.	20
Figura 2.	Talidomida.	22
Figura 3.	Novas entidades moleculares aprovadas pelo FDA entre 2010–2020.	22
Figura 4.	Inversão quiral unidirecional do (<i>R</i>)-ibuprofeno.	23
Figura 5.	(<i>S</i>)-Levofloxacina de maior potencial farmacocinético.	23
Figura 6.	Anestésico (<i>S</i>)-bupivacaína (eutômero).	24
Figura 7.	Atenolol.	24
Figura 8.	Omeprazol e dexlansoprazol.	25
Figura 9.	Número de artigos que tratam de reatribuições de configuração absoluta de PNs no período de 2010–2020.	26
Figura 10.	(+)-Frondosina B.	27
Figura 11.	Furanonas quirais (–)-(R)-sotolon e (+)-(R)-maple.	27
Figura 12.	(–)-Galantamina e (+)-epigalantamina: diastereômeros.	28
Figura 13.	<i>Senna spectabilis</i> : detalhes da planta, flores, fruto, sementes, casca e madeira.	29
Figura 14.	(+)-Carpaína isolado das folhas de <i>Carica papaya</i> .	30
Figura 15.	Alcaloides isolados de <i>S. spectabilis</i> .	32
Figura 16.	Unidade de ACh internalizada nas estruturas de 33 e 28 .	34
Figura 17.	Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de <i>S. spectabilis</i> .	42
Figura 18.	CCD do extrato etanólico (A) e das frações obtidas na extração líquido-líquido: hexano (B) e CH ₂ Cl ₂ (C).	44
Figura 19.	CCD das frações coletadas de TIC01.	44
Figura 20.	Procedimentos cromatográficos realizados com a fração CH ₂ Cl ₂ .	45
Figura 21.	Cromatograma (CG-EM) e EM-IE da fração TIC01-F ₁₁₄₋₂₆₅ (18/24) e (21/30).	46
Figura 22.	Proposta de fragmentação para os alcaloides piperidínicos por IE.	47
Figura 23.	CCD das frações coletadas de TIC02.	47
Figura 24.	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração TIC02-F ₂₉₋₃₄ .	48
Figura 25.	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide 18 .	49
Figura 26.	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide 24 .	49

Figura 27.	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração TIC02-F ₄₅₋₄₇ .	50
Figura 28.	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide 21 .	51
Figura 29.	Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide 30 .	51
Figura 30.	EM-IES-(+) em alta resolução dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) .	53
Figura 31.	EM/EM-IES-(+) dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) .	54
Figura 32.	Espectro de RMN de ¹ H dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) (500 MHz, DMSO).	55
Figura 33.	Ampliação do espectro 32 (δ 0,95–2,45) dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) .	56
Figura 34.	Ampliação do espectro 32 (δ 2,45–3,6) dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) .	57
Figura 35.	Espectro de RMN de ¹³ C-DEPTq dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) (150 MHz, DMSO).	59
Figura 36.	Ampliação do espectro 35 (δ 10,0–80,0) dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) .	60
Figura 37.	Ampliação do espectro 35 (δ 10,0–38,0) dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) .	61
Figura 38.	Ampliação do espectro 35 (δ 28,6–30,4) dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) .	62
Figura 39.	Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H–2 dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) (500 MHz, DMSO).	64
Figura 40.	Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H–3 dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) (500 MHz, DMSO).	65
Figura 41.	Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H–6 dos alcaloides 18 (A) e 21 (B) (500 MHz, DMSO).	66
Figura 42.	EM-IES-(+) em alta resolução dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) .	68
Figura 43.	EM/EM-IES-(+) dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) .	69
Figura 44.	Espectro de RMN de ¹ H dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) (500 MHz, DMSO).	70
Figura 45.	Ampliação do espectro 44 (δ 0,95–2,6) dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) .	71
Figura 46.	Ampliação do espectro 44 (δ 2,45–3,7) dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) .	72
Figura 47.	Espectro de RMN de ¹³ C-DEPTq dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) (150 MHz, DMSO).	74
Figura 48.	Ampliação do espectro 47 (δ 10,0–80,0) dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) .	75
Figura 49.	Ampliação do espectro 47 (δ 10,0–38,0) dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) .	76
Figura 50.	Ampliação do espectro 47 (δ 28,6–30,4) dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) .	77

Figura 51.	Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-2 dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) (500 MHz, DMSO).	78
Figura 52.	Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-3 dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) (500 MHz, DMSO).	79
Figura 53.	Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-6 dos alcaloides 24 (A) e 30 (B) (500 MHz, DMSO).	80
Figura 54.	Cristais do ácido tartárico separados por Louis Pasteur em 1848.	83
Figura 55.	Ácidos (S)-MTPA (34) e (R)-MTPA (35).	86
Figura 56.	Dupla derivatização de um álcool com os enantiômeros do reagente auxiliar (R)- e (S)-MTPA.	87
Figura 57.	Efeitos de proteção/desproteção nos três confôrmeros mais representativos dos ésteres de MTPA.	87
Figura 58.	Modelo proposto por Mosher para atribuição da configuração absoluta por RMN de ^1H .	88
Figura 59.	Equilíbrios conformacionais nos ésteres MPA.	89
Figura 60.	Principais confôrmeros gerados pela rotação do $\text{C}_\alpha\text{--Ar}$ nos AAMAs.	90
Figura 61.	(+)-(S)- Naproxeno.	90
Figura 62.	Simples derivatização de um álcool com o enantiômero do reagente auxiliar (+)-(S)- naproxeno em diferentes temperaturas.	91
Figura 63.	Conformações possíveis para os alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina.	94
Figura 64.	Reagentes de derivatização quiral utilizados no preparo dos ésteres de Mosher.	95
Figura 65.	Sistema de Kipp modificado para preparação dos cloridratos.	96
Figura 66.	Fluxograma da extração do (+)-(S)-naproxeno.	97
Figura 67.	Preparação dos ésteres de Mosher.	98
Figura 68.	Mecanismo proposto para síntese dos ésteres de Mosher.	100
Figura 69.	Espectro de RMN de ^1H dos derivados 37 (A) e 38 (B) (500 MHz, DMSO).	102
Figura 70.	Ampliação do espectro 69 (δ 0,9–2,6) dos derivados 37 (A) e 38 (B) .	103
Figura 71.	Ampliação do espectro 69 (δ 2,55–3,8) dos derivados 37 (A) e 38 (B) .	104
Figura 72.	Ampliação do espectro 69 (δ 7,0–8,0) dos derivados 37 (A) e 38 (B) .	105

Figura 73.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq dos derivados 37 (A) e 38 (B) (150 MHz, DMSO).	108
Figura 74.	Ampliação do espectro 73 (δ 10,0–80,0) dos derivados 37 (A) e 38 (B).	109
Figura 75.	Ampliação do espectro 73 (δ 10,0–38,0) dos derivados 37 (A) e 38 (B).	110
Figura 76.	Ampliação do espectro 73 (δ 28,6–30,4) dos derivados 37 (A) e 38 (B).	111
Figura 77.	Ampliação do espectro 73 (δ 120,0–140,0) dos derivados 37 (A) e 38 (B).	112
Figura 78.	Espectro de RMN de ^1H dos derivados 39 (A) e 40 (B) (500 MHz, DMSO).	114
Figura 79.	Ampliação do espectro 78 (δ 0,9–2,6) dos derivados 39 (A) e 40 (B).	115
Figura 80.	Ampliação do espectro 78 (δ 2,55–3,8) dos derivados 39 (A) e 40 (B).	116
Figura 81.	Ampliação do espectro 78 (δ 7,0–8,0) dos derivados 39 (A) e 40 (B).	117
Figura 82.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq dos derivados 39 (A) e 40 (B) (150 MHz, DMSO).	120
Figura 83.	Ampliação do espectro 82 (δ 10,0–80,0) dos derivados 39 (A) e 40 (B).	121
Figura 84.	Ampliação do espectro 82 (δ 10,0–38,0) dos derivados 39 (A) e 40 (B).	122
Figura 85.	Ampliação do espectro 82 (δ 28,6–30,4) dos derivados 39 (A) e 40 (B).	123
Figura 86.	Ampliação do espectro 82 (δ 120,0–140,0) dos derivados 39 (A) e 40 (B).	124
Figura 87.	Análise conformacional dos ésteres de Mosher do (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-MTPA e avaliação do efeito de desproteção.	125
Figura 88.	Cromatograma (CG-EM) e EM-IE do (+)-(S)-naproxeno (36).	127
Figura 89.	Espectro de RMN de ^1H do (+)-(S)-naproxeno (36) (600 MHz, DMSO).	128
Figura 90.	Ampliação do espectro 89 (δ 7,0–8,0) do (+)-(S)-naproxeno (36).	128
Figura 91.	Ampliação do espectro 89 (δ 4,5–1,0) do (+)-(S)-naproxeno (36).	129
Figura 92.	Espectro de RMN de ^{13}C DEPTQ do (+)-(S)-naproxeno (36) (150 MHz, DMSO).	129
Figura 93.	Ampliação do espectro 92 (δ 100,0–185,0) do (+)-(S)-naproxeno (36).	130
Figura 94.	Ampliação do espectro 92 (δ 10,0–60,0) do (+)-(S)-naproxeno (36).	130
Figura 95.	Espectro de RMN de ^1H do derivado 41 (500 MHz, DMSO).	132
Figura 96.	Ampliação do espectro 95 (δ 0,9–2,6) do derivado 41 .	133
Figura 97.	Ampliação do espectro 95 (δ 2,55–5,0) do derivado 41 .	133
Figura 98.	Ampliação do espectro 95 (δ 7,0–8,0) do derivado 41 .	134

Figura 99.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq do derivado 41 (150 MHz, DMSO).	135
Figura 100.	Ampliação do espectro 99 (δ 10,0–80,0) do derivado 41 .	135
Figura 101.	Ampliação do espectro 99 (δ 10,0–38,0) do derivado 41 .	136
Figura 102.	Ampliação do espectro 99 (δ 28,6–30,4) do derivado 41 .	136
Figura 103.	Ampliação do espectro 99 (δ 120,0–140,0) do derivado 41 .	137
Figura 104.	Espectro de RMN de ^1H do derivado 42 (500 MHz, DMSO).	138
Figura 105.	Ampliação do espectro 104 (δ 0,9–2,6) do derivado 42 .	139
Figura 106.	Ampliação do espectro 104 (δ 2,55–5,0) do derivado 42 .	139
Figura 107.	Ampliação do espectro 104 (δ 7,0–8,0) do derivado 42 .	140
Figura 108.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq do derivado 42 (150 MHz, DMSO).	140
Figura 109.	Ampliação do espectro 108 (δ 10,0–80,0) do derivado 42 .	141
Figura 110.	Ampliação do espectro 108 (δ 10,0–38,0) do derivado 42 .	141
Figura 111.	Ampliação do espectro 108 (δ 28,6–30,4) do derivado 42 .	142
Figura 112.	Ampliação do espectro 108 (δ 120,0–140,0) do derivado 42 .	142
Figura 113.	Análise conformacional do éster de (<i>S</i>)-naproxeno.	143
Figura 114.	Fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer e seus estereoisômeros.	147
Figura 115.	Atividades inibitórias de AChE (A) e BChE (B) dos alcaloides 18 , 21 , 24 e 30 .	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Equipamentos disponíveis para realização do projeto de pesquisa.	41
Tabela 2.	Massas obtidas da extração líquido-líquido do EEFl-Ss.	43
Tabela 3.	Dados de RMN do alcaloide 18 e 21 em DMSO.	58
Tabela 4.	Dados de RMN do alcaloide 24 e 30 em DMSO.	73
Tabela 5.	Parâmetros reacionais para a síntese dos ésteres de Mosher 37–42 .	98
Tabela 6.	Dados de RMN dos derivados 37 e 38 em DMSO.	106
Tabela 7.	Dados de RMN dos derivados 39 e 40 em DMSO.	118
Tabela 8.	Valores específicos de deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os diastereômeros de Mosher 37 e 38 , bem como as magnitudes das medidas de $\Delta\delta^{\text{RS}}$.	125
Tabela 9.	Valores específicos de deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os diastereômeros de Mosher 39 e 40 , bem como as magnitudes das medidas de $\Delta\delta^{\text{RS}}$.	126
Tabela 10.	Dados de RMN (+)-(S)-naproxeno (36) em DMSO.	131
Tabela 11.	Atividade anticolinesterásica dos alcaloides 18 , 21 , 24 e 30 .	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAMAs	Ácidos arilmetoxiacéticos
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AINE	Antiinflamatório não esteroidal
CA	Configuração absoluta
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
CGL	Cromatografia gás-líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
COX-1	Ciclooxygenase 1
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de arranjo de diodos
DC	Dicroísmo circular
DMAP	Dimetilaminopiridina
DRO	Dispersão rotatório óptica
DRX	Difração de raios X
EDC	Hidrocloreto de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida (do inglês <i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)
EEFl-Ss	Extrato etanólico das flores de <i>Senna spectabilis</i>
ELSD	Detector evaporativo por espelhamento de luz (do inglês <i>evaporative light scattering detector</i>)
EM	Espectrometria de massas
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionário
FM	Fase móvel
IBP	Inibidor da bomba de prótons
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50%
MPA	Ácido α -metoxi- α -fenilacético

MTPA	Ácido α -metoxi- α -trifluorfenilacético
NCE	<i>New Chemical Entities</i>
NEMs	Novas entidades moleculares
PNs	Produtos naturais
PTFE	Politetrafluoretileno
RDQ	Reagente de derivatização quiral
RE	Rotação específica
RMN	Ressonância magnética nuclear
RSQ	Reagente de solvatação quiral
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Estudo químico dos alcaloides piperidínicos quirais isolados das flores de <i>Senna spectabilis</i>	18
1.1	INTRODUÇÃO	19
1.1.1	Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas	19
1.1.2	Estereoisomeria em produtos naturais	19
1.1.3	<i>Senna spectabilis</i> e os alcaloides piperidínicos	29
1.2	OBJETIVOS	36
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
1.3.1	Solventes	37
1.3.2	Reagentes	37
1.3.3	Revelador	37
1.3.3.1	<i>Iodocloroplatinato</i>	37
1.3.4	Técnicas cromatográficas	37
1.3.4.1	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	37
1.3.4.2	<i>Cromatografia em coluna (CC)</i>	38
1.3.4.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	38
1.3.4.4	<i>Cromatografia a gás</i>	39
1.3.5	Técnicas espectroscópicas	40
1.3.6	Equipamentos utilizados	40
1.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	42
1.4.1	Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico	42
1.4.2	Extração líquido-líquido	42
1.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
1.5.1	Fracionamento do EEFl- <i>Ss</i>	43
1.5.2	Análise qualitativa de alcaloides no extrato etanólico (EEFl- <i>Ss</i>) e nas frações de <i>S. spectabilis</i>	43
1.5.3	Isolamento dos alcaloides piperidínicos de <i>S. spectabilis</i>	44
1.5.4	Elucidação estrutural dos alcaloides	52
1.5.4.1	<i>Elucidação estrutural dos alcaloides 18 e 21</i>	52
1.5.4.2	<i>Elucidação estrutural dos alcaloides 24 e 30</i>	67

CAPÍTULO 2	Determinação da configuração absoluta dos alcaloides piperidínicos isolados das flores de <i>Senna spectabilis</i>	82
2.1	INTRODUÇÃO	83
2.1.1	Quiralidade	83
2.1.2	Configuração absoluta	84
2.1.2.1	<i>Método de Mosher</i>	85
2.2	OBJETIVOS	92
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	93
2.3.1	Solventes	93
2.3.2	Reagentes	93
2.3.3	Técnicas espectroscópicas	93
2.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	94
2.4.1	Derivatização com reagente de derivatização quiral	95
2.4.1.1	<i>Preparo dos cloridratos</i>	95
2.4.1.2	<i>Extração do (+)-(S)-naproxeno a partir do Naproxeno Sódico® comercial</i>	96
2.4.1.3	<i>Síntese dos ésteres de Mosher</i>	97
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
2.5.1	Reação com os RDQs (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-MTPA	99
2.5.1.1	<i>Elucidação estrutural dos derivados 37 e 38</i>	101
2.5.1.2	<i>Elucidação estrutural dos derivados 39 e 40</i>	113
2.5.1.3	<i>Análise dos ésteres de Mosher 37–40 por RMN ¹H</i>	125
2.5.2	Reação com os RDQs (+)-(S)-naproxeno	126
2.5.2.1	<i>Elucidação estrutural do derivado 41</i>	131
2.5.2.2	<i>Elucidação estrutural do derivado 42</i>	137
2.5.2.3	<i>Análise dos ésteres de Mosher 41–42 por RMN ¹H</i>	143
2.5.3	Determinação da configuração absoluta dos alcaloides 18, 21, 24 e 30 .	144

CAPÍTULO 3	Implicações biológicas	145
3.1	INTRODUÇÃO	146
3.1.1	Doença de Alzheimer e os inibidores de acetilcolinesterase	146
3.2	OBJETIVOS	149
3.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	150
3.3.1	Atividade anticolinesterásica	150
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
4	CONCLUSÕES	153
	REFERÊNCIAS	154

CAPÍTULO 1

Estudo químico dos alcaloides piperidínicos quirais isolados das flores de
Senna spectabilis

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas

Historicamente, os produtos naturais (PNs) têm desempenhado um papel significativo nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos ao longo dos anos devido à sua ampla gama de atividades biológicas (ATANASOV et al., 2021). Dentre os 1394 novos protótipos de baixo massa molecular (conhecidos como *New Chemical Entities* - NCE) introduzidos no mercado mundial como produtos farmacêuticos durante o período de 1981 a 2019, 66,7% são derivados de PNs, mimetizam ou foram planejados a partir de estruturas de PNs (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Dado o elevado número de espécies de plantas na Terra e as várias vias biossintéticas capazes de produzir tamanha diversidade química, a biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais oferece um potencial particularmente rico em compostos biologicamente ativos que podem ser usados como modelos para a química medicinal e descoberta de medicamentos (BOLZANI et. al. 2012). As vias biossintéticas de várias classes de metabólitos especiais em espécies vegetais podem fornecer diversos tipos de produtos naturais como flavonoides, terpenos, alcaloides, etc (VALLI; BOLZANI, 2019).

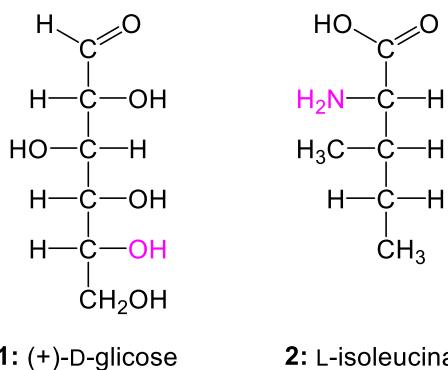
Estudos recentes mostram que o sucesso de PNs no processo de descoberta de fármacos tem sido atribuído à variedade estrutural em termos de composição, massa, tamanho, grupos funcionais, complexidade estrutural e estereoquímica dos compostos encontrados em organismos vivos, que têm uma média de 6,2 centros estereogênicos por molécula, quando comparados a uma média de 0,4 em moléculas sintéticas (BATISTA et al., 2021; FEHER; SCHMIDT, 2003).

1.1.2 Estereoisomeria em produtos naturais

Em sistemas biológicos, as biomoléculas como aminoácidos, açúcares, proteínas e ácidos nucléicos são compostos quirais enantiometricamente puros, estando presentes em uma das duas formas enantioméricas, por exemplo, aminoácidos na forma L e açúcares na forma D (NGUYEN et al., 2021). A maioria das aldosas de ocorrência natural pertencem à família D, sendo a (+)-D-glicose (1) (Figura 1) de longe a mais comum. O mesmo ocorre com os aminoácidos. Embora a hidrólise de proteínas de ocorrência natural

possa produzir até 22 aminoácidos diferentes, eles têm uma característica estrutural em comum: quase todos os aminoácidos têm a configuração L em seu carbono α , como a isoleucina (2) (Figura 1), um exemplo de aminoácido essencial que não pode ser sintetizado pelo organismo e deve ser ingerido como parte da dieta. Como resultado, os processos fisiológicos essenciais são estereosseletivos.

Figura 1. D-glicose e L-isoleucina.



1: (+)-D-glicose

2: L-isoleucina

Fonte: a autora.

Em relação aos fármacos, do ponto de vista estereoquímico, eles podem ser divididos em quirais, racêmicos e enantiômeros puros, sendo que aproximadamente 50% das pequenas moléculas utilizadas atualmente como fármacos são quirais, contendo pelo menos um centro assimétrico em sua estrutura. No entanto, a grande maioria é comercializada como racemato e apenas cerca de 25% na forma de enantiômero puro.

A mudança começou a ocorrer em 1992 quando a *Food and Drug Administration* (FDA), órgão que controla os medicamentos nos Estados Unidos, emitiu uma declaração de política contendo diretrizes para o desenvolvimento de fármacos estereoisoméricos. Neste documento, a FDA recomenda a avaliação da utilidade terapêutica e/ou efeitos toxicológicos de cada estereoisômero para candidatos a fármacos quirais. Em 1994, uma política semelhante foi adotada pela Agência Europeia de Medicamentos (AEM). Ambas as agências reguladoras indicaram regras que especificam explicitamente que o desenvolvimento de um medicamento enantiometricamente puro deve ser priorizado (ABRAM et al., 2019).

Apesar disso, muitos fármacos ainda são comercializados como misturas racêmicas e, embora tenham aparentemente a mesma estrutura química, exibem diferenças marcantes nas propriedades biológicas dos enantiômeros individuais,

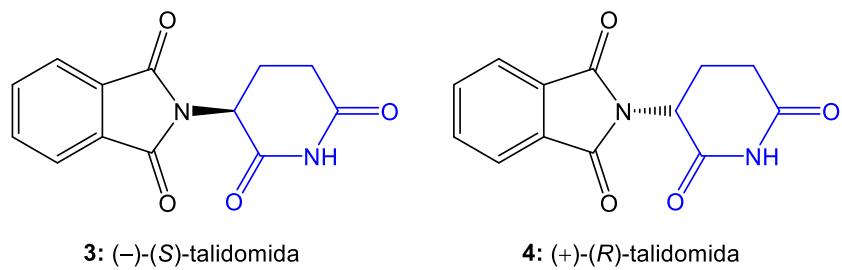
resultando em diferenças significativas na farmacologia, toxicologia, farmacocinética, metabolismo, etc (NGUYEN et al., 2006).

Na maioria dos fármacos, vendidos como misturas racêmicas, o efeito farmacológico está restrito a um dos estereoisômeros, ou pelo menos um deles se destaca por ser mais potente (FINEFIELD et al., 2012; NGUYEN et al., 2021). Os enantiômeros apresentam interações estereosseletivas singulares quando estão em ambiente biológico, o que está relacionado às estruturas tridimensionais quirais, tanto do fármaco quanto da biofase. Essas interações estereosseletivas são resultado de ligações específicas de um dos enantiômeros com a biofase, que resultam nas diferenças observadas nas propriedades terapêuticas.

O caso da talidomida ilustra a importância da quiralidade na indústria farmacêutica quando, em meados dos anos 1950, na Alemanha, foi introduzida no mercado pela farmacêutica Grunenthal, por apresentar propriedades sedativas e antieméticas com o objetivo de tratar os enjoos matinais em mulheres grávidas. No entanto, em 1960, uma das piores páginas da história dos fármacos ocorreu. Foram relatados efeitos colaterais graves da talidomida em crianças, cujas mães fizeram uso do medicamento durante a gravidez, demonstrando que ela era capaz de causar grandes anomalias congênitas como amelia (falta de membro) e focomelia (membros selados), bem como deformidades de órgãos internos, fenda labial e palatina, além de deformidades nos olhos e orelhas. Esses problemas congênitos afetaram mais de 10.000 crianças em 46 países. Assim, em 1961, o medicamento foi retirado do mercado mundial. No entanto, ainda hoje, muitos tipos de pesquisa são direcionados para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na teratogenicidade da talidomida (BARBAROSSA et al., 2021; GAO et al., 2020).

Com relação às propriedades químicas, a talidomida apresenta na sua estrutura uma porção glutarimida (azul) com um único centro estereogênico, e uma parte ftalimida (preto). O medicamento foi/é comercializado como uma mistura racêmica de (–)-*S*-talidomida (**3**) e (+)-*R*-talidomida (**4**) (Figura 2), sob diferentes nomes como Contergan®, Thalomid®, Sedalis®, além de outros. A princípio, os pesquisadores acreditavam que **3** era responsável pelos efeitos teratogênicos (distômero), enquanto **4** era responsável pelas propriedades sedativas (eutômero). De fato, a separação e avaliação do eutômero foi feita, na tentativa de contornar o problema clínico, porém acabou sendo descoberto que em condições fisiológicas ocorre a interconversão entre os estereoisômeros (BARBAROSSA et al., 2021; GAO et al., 2020).

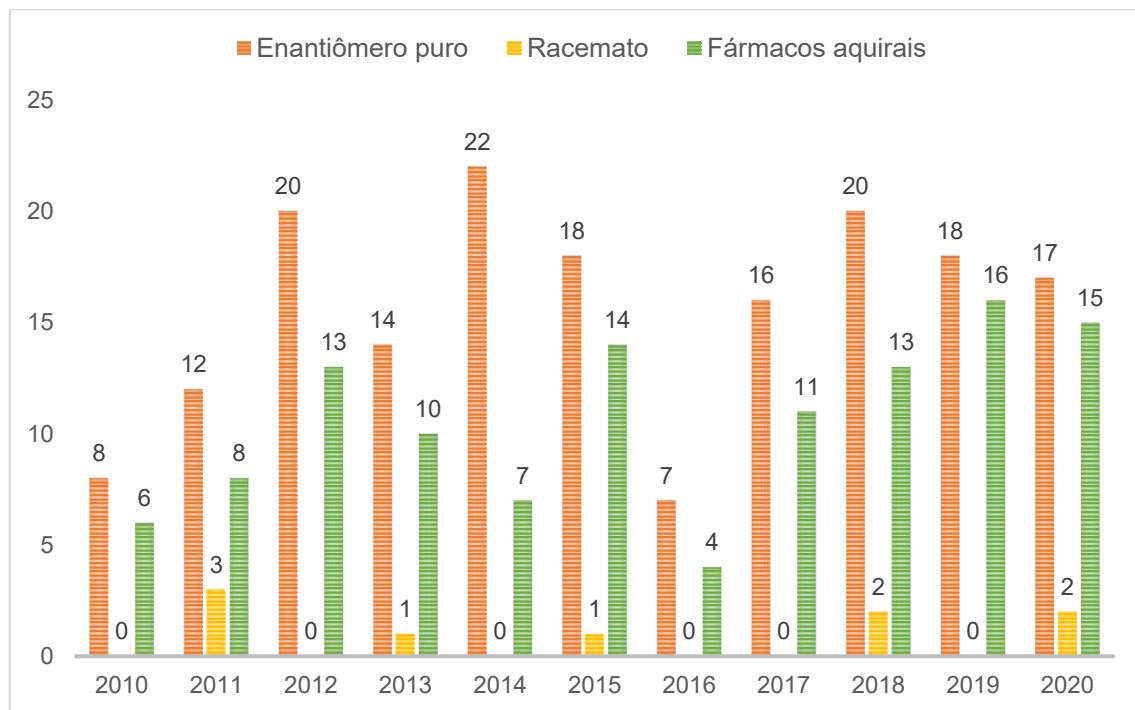
Figura 2. Talidomida.



Fonte: a autora.

Desde então, tem havido um número crescente de novos medicamentos na forma de um único enantiômero ou diastereômero. Além disso, nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem apresentado uma tendência em substituir racematos existentes no mercado, pela introdução de “novos medicamentos” vendidos na forma enantiomericamente pura (ABRAM et al., 2019). Essa abordagem permitiu que muitos medicamentos fossem lançados no mercado utilizando o princípio ativo de configuração estereoquímica específica. Entre as 298 novas entidades moleculares (NEMs) aprovadas pelo FDA no período de 2010 a 2020, 181 (61%) foram quirais e, destas, 172 (95%) são enantiômeros puros (Figura 3) (SANGANYADO et al., 2017).

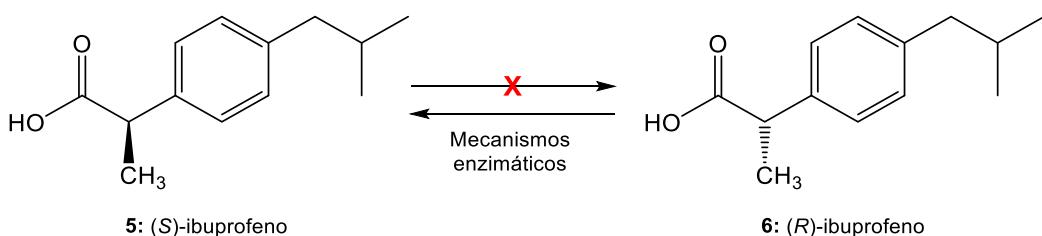
Figura 3. Novas entidades moleculares aprovadas pelo FDA entre 2010–2020.



Fonte: modificado de Hancu e Modroiu (2022).

O fármaco anti-inflamatório não esteroidal (AINE) ibuprofeno foi o primeiro fármaco quiral a ser alterado para a versão de enantiômero único em 1994. A razão para tal troca veio da evidência de que o (S)-ibuprofeno (**5**) era mais de 100 vezes mais potente como um inibidor da enzima ciclooxygenase 1 (COX-1) do que o (R)-ibuprofeno (**6**) (Figura 4). Assim, o uso de **5** teria ação mais rápida em uma dosagem menor e reduziria a variabilidade configuracional no sistema biológico (CALCATERRA et al., 2018). No entanto, o ibuprofeno, quando administrado como racemato, provou sofrer inversão quiral unidirecional do enantiômero (*R*) para o enantiômero (*S*), sendo um exemplo importante de conversão biológica do distômero para o eutômero, evidenciando o comportamento de **6** como um pró-fármaco (Figura 4).

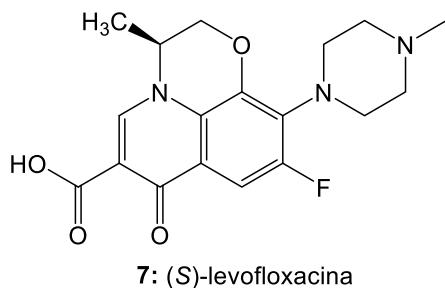
Figura 4. Inversão quiral unidirecional do (R)-ibuprofeno.



Fonte: a autora.

Fármacos enantiomericamente puros têm oferecido benefícios aos pacientes, particularmente quando a atividade farmacológica reside principalmente em um dos enantiômeros: este é o caso da ofloxacina, um agente antibacteriano da classe das fluoroquinolonas em que a (S)-levofloxacina (**7**) provou ser mais solúvel em água do que o racemato e, portanto, exibiu um aumento da atividade antibacteriana de cerca de duas vezes em relação ao racemato, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo a forma *R* farmacologicamente inerte (Figura 5) (CALCATERRA et al., 2018).

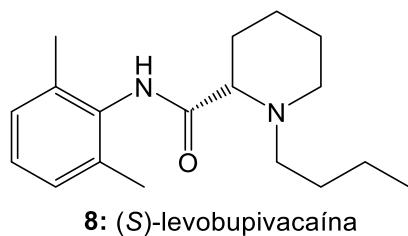
Figura 5. (S)-Levofloxacina de maior potencial farmacocinético.



Fonte: a autora.

Ainda mais esclarecedor é o exemplo do anestésico local bupivacaína, onde o (S)-(-)-bupivacaína (**8**) apresentou menor efeito cardiotóxico que o (R)-enantiômero e o racemato (Figura 6). Assim, a mudança na composição do medicamento para o enantiômero levógiro (levobupivacaína), lançado em 2000 nos Estados Unidos, resultou no desenvolvimento de um anestésico local com um perfil clínico semelhante ao do racemato anteriormente comercializado, mas com vantagem da diminuição na toxicidade cardiovascular (CALCATELLA et al., 2018).

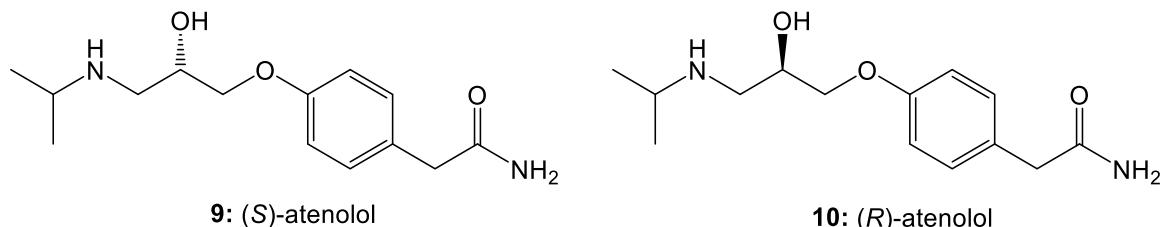
Figura 6. Anestésico (S)-bupivacaína (eutômero).



Fonte: a autora.

Outro exemplo é um antagonista do receptor β usado para o tratamento de doenças cardiovasculares, o (\pm)-atenolol. Estudos farmacológicos mostraram que apenas o (S)-atenolol (**9**) (Figura 7) é responsável pela atividade, uma vez que o enantiômero em sua forma pura ou como mistura racêmica apresentou a mesma eficácia. Sendo assim, como o (R)-atenolol (**10**) não apresenta efeito sinérgico na mistura racêmica, o fármaco poderia ser comercializado como o enantiômero puro (S)-atenolol utilizando metade da dose administrada da mistura (SANGAYADO et al., 2017).

Figura 7. Atenolol.

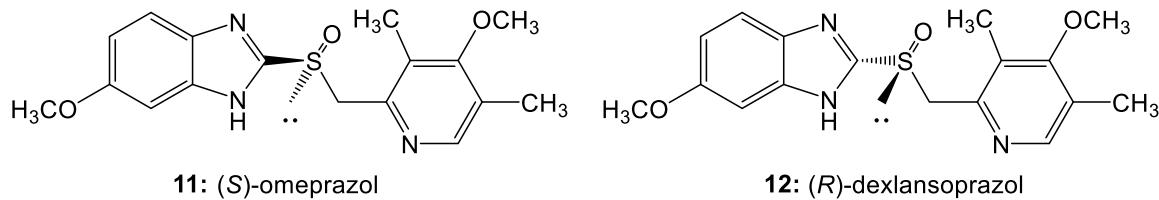


Fonte: a autora.

Houve, no entanto, alguns casos em que fármacos enantiomericamente puros desenvolvidos a partir de racematos de sucesso ofereceram pouca vantagem clínica sobre o racemato, e sua introdução no mercado foi explorada como estratégia comercial da

empresa farmacêutica para se proteger de concorrentes genéricos. O omeprazol (**11**) (Figura 8), um inibidor da bomba de prótons anti-secretor gástrico (IBP), comercializado pela AstraZeneca é reconhecido como um exemplo de estratégia comercial que visa proteger uma parte do mercado contra outros IBPs, como o dexlansoprazol (**12**) da Takeda Pharma LTDA (Figura 8) (CALCATERRA et al., 2018).

Figura 8. Omeprazol e dexlansoprazol.



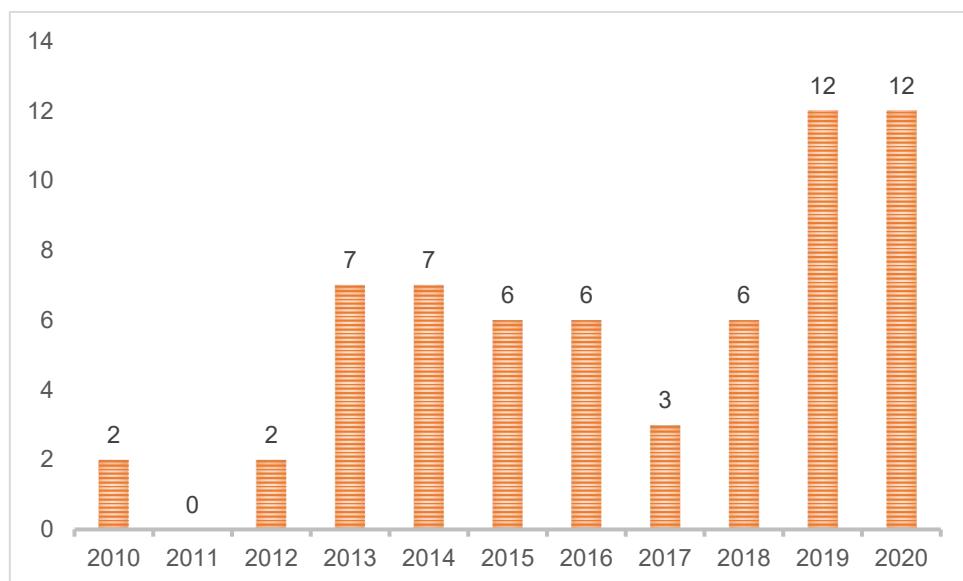
Fonte: a autora.

Já em relação aos produtos naturais, existe uma tendência na biossíntese dos metabólitos secundários quirais, que estes sejam produzidos na forma enantiomericamente pura (MORI, 2011). No entanto, embora a quiralidade seja uma característica fundamental dos metabólitos secundários e crucial para a atividade biológica, a maioria dos químicos de PNs direcionam a maior parte dos esforços para o isolamento, elucidação estrutural e avaliação da atividade biológica, sem dar a devida atenção para a avaliação da composição estereoisomérica (BATISTA et al., 2018). Dos 268 artigos que descrevem moléculas quirais que foram isoladas, apenas 31 (11,6%) verificaram a pureza enantiomérica. Mesmo quando faz parte dos objetivos da pesquisa atribuir a configuração absoluta do(s) composto(s) estudo(s), a avaliação da composição enantiomérica é geralmente pouco investigada. Dos 124 metabólitos secundários isolados relatados, apenas 15% tiveram sua razão enantiomérica determinada, utilizando principalmente a cromatografia quiral (BATISTA et al., 2018). Esses resultados indicam que a composição enantiomérica de muitos PN's ainda é desconhecida; especialmente considerando o número de compostos naturais que possam ser produzidos na forma de mistura racêmica ou excesso enantiomérico (ee) (FINEFIELD et al., 2012; BATISTA et al., 2018).

Nesse sentido, Batista et al. (2021) pesquisaram exemplos de PNs que tiveram suas configurações absolutas reatribuídas no período 2010-2020 com o objetivo de avaliar se há um aumento gradativo do número de artigos que tratam de estudos para reatribuir a estereoquímica de PNs (Figura 9). “Reatribuição de configuração absoluta” ou

“reatribuição estereoquímica” associada a “produtos naturais” foram utilizadas como palavras-chave para realizar a busca nas bases de dados disponíveis (ACS, PubMed, RSC, Science Direct, SciFinder, Scopus, Web of Science e Wiley). Nos casos de compostos com múltiplos centros quirais, a reatribuição da CA geralmente leva a (ou deriva de) revisões da configuração relativa (BATISTA et al., 2021).

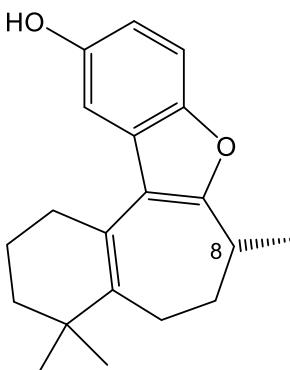
Figura 9. Número de artigos que tratam de reatribuições de configuração absoluta de PNs no período de 2010–2020.



Fonte: modificado de Batista e colaboradores (2021).

Um exemplo aonde problemas associados às atribuições de configuração absoluta baseado apenas nos valores de rotação específica (RE) envolve o caso do sesquiterpeno frondosina B, isolado da esponja *Euryspongia* sp. (13) (Figura 10). A atribuição da configuração absoluta da (+)-frondosina B por síntese total levou a resultados conflitantes. Diferenças nas medidas de RE obtidas para produtos de vias sintéticas diferentes foram atribuídas a uma inesperada inversão do centro estereogênico C-8 (Figura 10). No entanto, um relatório recente de Joyce e colaboradores (2018), demonstrou que a presença de uma impureza, que aparece em uma das etapas chave da síntese, foi responsável pela alteração nos valores de RE, o que resultou em medidas de sinal oposto para os produtos sintéticos com a mesma CA. Como resultado, a atribuição da estereoquímica absoluta do produto natural também foi comprometida (BATISTA et al., 2018).

Figura 10. (+)-Frondosina B.

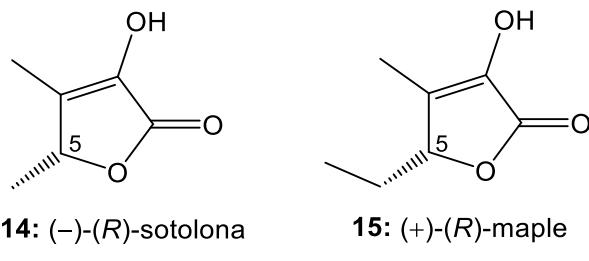


13: (+)-frondosina B

Fonte: a autora.

Já as furanonas quirais (−)-(R)-sotolona (**14**), isolada das sementes do feno grego (*Trigonella foenum-graecum*) e (+)-(R)-maple (**15**), produzida espontaneamente a partir do aminoácido treonina, (Figura 11) (NAKAHASHI et al., 2011) ilustram os riscos decorrentes da atribuição da configuração absoluta baseada apenas nas comparações de valores de rotação específica para compostos com estruturas semelhantes. Essas furanonas substituídas no C-5 diferem uma da outra pela presença de um metileno e, apesar de possuírem a mesma configuração absoluta, apresentam sinais opostos de RE.

Figura 11. Furanonas quirais (−)-(R)-sotolona e (+)-(R)-maple.



14: (−)-(R)-sotolona

15: (+)-(R)-maple

Fonte: a autora.

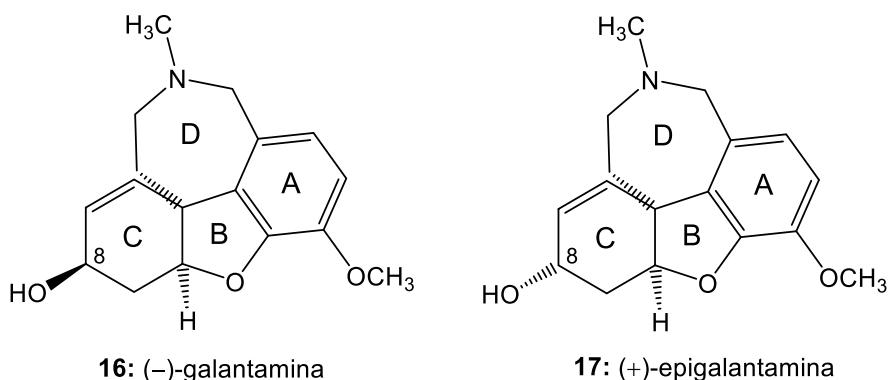
É possível observar até esse ponto que as respostas biológicas apresentadas por enantiômeros é bastante controversa, no entanto, fármacos diastereoméricos podem ser mais facilmente compreendidos, uma vez que estes compostos apresentam diferenças físicas e químicas bastante características, o que pode resultar no comportamento biológico.

Um exemplo deste tipo de estereoisomerismo é observado para a galantamina, cuja forma levorrotatória (**16**) (Figura 12) é encontrada nos bulbos e flores de várias

espécies da família Amaryllidaceae, como a *Galanthus woronowii* e a *Galanthus nivalis*, além de várias espécies de narcisos (*Narcissus* spp.).

A (-)-galantamina (**16**) foi aprovada pela *European Medicine Agency* (EMA) e pela FDA dos EUA como um inibidor competitivo da acetilcolinesterase (AChE) e um modulador alostérico dos receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh), que tem se mostrado eficaz no tratamento da doença de Alzheimer (DA) leve a moderada (DE GUSSEM et al., 2019). Em 1990, um estudo foi publicado com o intuito de investigar quais seriam as diferenças farmacológicas de inibidores da AChE como a epigalantamina (**17**), que é um diastereômero de **16**, obtido por síntese (Figura 12) (MARCO; CARREIRAS, 2006). Os resultados mostraram que **16** (EC_{50} 0,36 μ M) é cerca de 130 vezes mais potente que **17** (EC_{50} 45,70 μ M), o que está de acordo com as propostas de complementaridade estereoespecífica de fármacos quirais e as enzimas, nesse caso entre **16** e a AChE.

Figura 12. (–)-Galantamina e (+)-epigalantamina: diastereômeros.



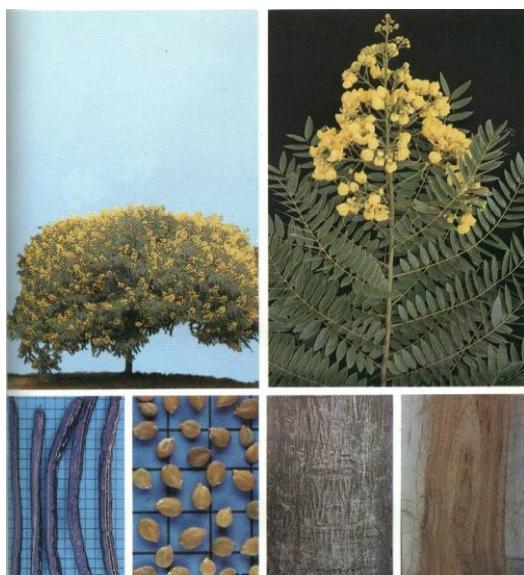
Fonte: a autora.

A partir de uma análise detalhada das estruturas de **16** e **17** é possível observar que estes compostos são epímeros no C-8 do anel C, e uma vez que a potência na inibição da AChE caiu consideravelmente para **17**, em função da alteração deste centro estereogênico, é possível inferir que esta região faz parte do grupo farmacofórico de **16** (THOMSEN et al., 1990). Assim, devido às diferenças significativas nas respostas biológicas de diferentes estereoisômeros, o conhecimento da configuração relativa e absoluta de compostos como a galantamina é de extrema importância (DE GUSSEM et al., 2019).

1.1.3 *Senna spectabilis* e os alcaloides piperidínicos

Senna spectabilis (sin. *Cassia spectabilis* e *Cassia excelsa*) (Figura 13) pertence à família Fabaceae e no Brasil são encontradas cerca de 200 gêneros e aproximadamente 1500 espécies, sendo comum no nordeste semi-árido (Caatinga) e no Cerrado do estado de São Paulo. Apresenta altura de 6 a 9 metros, sendo muito usada para confecção de objetos leves, como caixotaria e também para lenha e carvão. Popularmente é conhecida como são-joão, cássia do nordeste, canafistula-de-besouro e pau-de-ovelha (LORENZI, 2002).

Figura 13. *Senna spectabilis*: detalhes da planta, flores, fruto, sementes, casca e madeira.



Fonte: Lorenzi (2002).

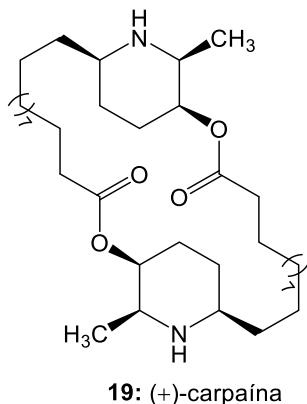
Os alcaloides piperidínicos presentes em *S. spectabilis* têm sido amplamente estudados ao longo dos anos. A estrutura desses compostos consiste na presença de um núcleo piperidínico trissubstituído e um padrão estereoquímico com três centros estereogênicos.

O isolamento do primeiro alcaloide (–)-cassina (**18**) (Figura 15) foi relatado por Highet (1964) a partir das folhas e galhos de *C. excelsa*. Sua estrutura molecular e estereoquímica foram discutidas com base em análises espectrais (RMN 60 MHz e infravermelho) e através de algumas reações químicas, sendo que a configuração relativa foi avaliada com base nos espectros de infravermelho, observando as características dos

sinais relacionados aos estiramentos da hidroxila livre e hidroxila ligada (ligação de hidrogênio intramolecular com o nitrogênio), podendo ser a que está representada em **18** ou sua imagem especular. Além disso, foi feita a comparação com a (+)-carpaína (**19**) (Figura 14), um alcaloide piperidínico isolado das folhas de *Carica papaya* que apresenta estereoquímica totalmente cis. Já os dados polarimétricos apresentaram um valor muito baixo ($[\alpha]_D^{25} -0,6^\circ$ (*c* 8,0 EtOH)), sendo considerada a possibilidade de que a atividade óptica decorra de alguma impureza (HIGHET, 1964).

Posteriormente, Highet e Highet (1966) confirmaram a estrutura da cadeia lateral analisando produtos de degradação por espectrometria de massas. No mesmo ano, Rice e Coke (1966) demonstraram a configuração absoluta de **18** como sendo 2-(*R*)-metil-3-(*R*)-hidroxi-6-(*S*)-(11-oxododecil)-piperidina pela síntese da imagem especular de *N*-metilcassina a partir do alcaloide **19**, que é de configuração absoluta conhecida (HIGHET;HIGHET, 1966; RICE; COKE, 1966).

Figura 14. (+)-Carpaína isolado das folhas de *Carica papaya*.



Fonte: a autora.

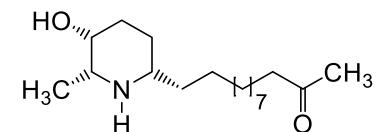
Após mais de uma década, Christofidis, Welter e Jadot (1977), estudando as folhas de *C. spectabilis*, identificaram **20** e isolaram os alcaloides (+)-espectralina (**20**) e (−)-6-*iso*-cassina (**21**) (Figura 15). As fragmentações nos espectros de massa da spectralina foram muito semelhantes às da cassina, exceto por mais dois grupos metilenos, enquanto todo o espectro de massa da 6-*iso*-cassina foi semelhante ao da cassina. Além disso, o espectro de infravermelho da (+)-espectralina mostrou uma banda intensa de hidroxila ligada (3530 cm^{-1}) e uma banda de baixa intensidade de hidroxila livre (3635 cm^{-1}), assim como na (−)-cassina. Isso é característico de todos os sistemas totalmente cis em que a conformação majoritária possui o grupo $-\text{OH}$ na configuração

axial favorável à ligação de hidrogênio intramolecular com o átomo de nitrogênio do núcleo piperidínico. Já o espectro de infravermelho da 6-*iso*-cassina exibe hidroxilas livres (3635 cm^{-1}) e ligadas (3535 cm^{-1}) de número de onda aproximadamente igual. Esta observação significa que a cadeia lateral ou a metila é trans em relação aos outros dois substituintes, no entanto, as constantes de acoplamento no espectro de RMN mostraram que o hidrogênio H-2 é cis em relação ao H-3. A estrutura e a estereoquímica relativa para a 6-*iso*-cassina foi confirmada por estudos de difração de raio-X. Diante disso, foi possível concluir que a espectralina e a 6-*iso*-cassina são, respectivamente, um homólogo e um diastereômero da cassina (CHRISTOFIDIS; WELTER; JADOT, 1977a). Em continuação aos estudos, os mesmos autores isolaram dois novos alcaloides (−)-espectralinina (**22**) e (−)-6-*iso*-carnavalina (**23**) (Figura 15) (CHRISTOFIDIS; WELTER; JADOT, 1977b).

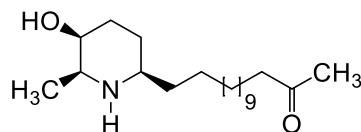
Momose e Toyooka (1993) descreveram a síntese assimétrica da (−)-cassina (**18**) e da (+)-espectralina (**20**) e compararam com os respectivos produtos naturais. A (−)-**18** obtida por síntese ($\text{pf } 55\text{--}57\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} -0,7$ ($c\ 0,59$, EtOH)) estava de acordo com a (−)-**18** natural ($\text{pf } 57\text{--}58,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} -0,6$ ($c\ 8,0$, EtOH)) em suas propriedades físicas e possui propriedades espectrais (RMN ^1H e ^{13}C) idênticas aos sintéticos (\pm)-**18**. O mesmo é observado na comparação da (+)-**20** obtida por síntese ($\text{pf } 59\text{--}61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} +0,9$ ($c\ 1,30$, CHCl_3)) e o produto natural (+)-**20** ($[\alpha]_D^{25} +0,9$ ($c\ 1,30$, CHCl_3)) (MOMOSE; TOYOOKA, 1993).

Estudando o extrato das folhas de *Cassia leptophylla*, Bolzani et al. (1995) isolaram a (−)-espectralina (**24**) e três novos alcaloides piperidínicos leptofilina A (**25**), 3-*O*-acetilleptofilina A (**26**) e leptofilina B (**27**) (Figura 15) (BOLZANI et al., 1995). As configurações relativas dos carbonos assimétricos C-2, C-3 e C-6 no anel piperidínico de **24** foram atribuídas principalmente com base em dados de acoplamento de ^1H obtidos de seus espectros de RMN de ^1H e COSY e comparação desses dados com aqueles relatados para piperidinas relacionadas. Os dados de infravermelho foram semelhantes aos da (−)-cassina e da (+)-espectralina, assim como os dados de RMN. No entanto, $[\alpha]_D^{25}$ para **24** foi em $-8,2\text{ }^{\circ}$ enquanto que a relatada para a (+)-espectralina é de $+8,0\text{ }^{\circ}$, indicando que o alcaloide **24** é o enantiômero de **20**. A comparação dos dados de RMN de ^{13}C para **24** com os de (+)-espectralina (**20**), mostrou uma discrepância nas atribuições da literatura para C-2, C-6 e C-14 e foram revisadas com base em HETCOR e dados HMBC.

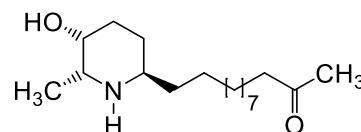
Figura 15. Alcaloides isolados de *S. spectabilis*.



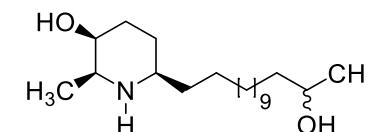
18: (-)-cassina



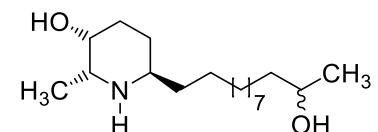
20: (+)-espectralina



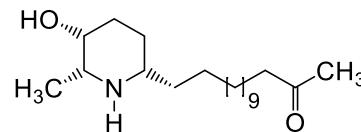
21: (-)-6-iso-cassina



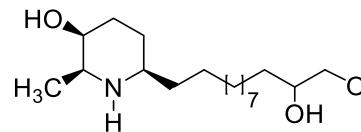
22: (-)-espectralinina



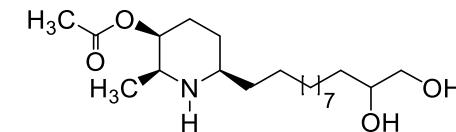
23: (-)-6-iso-carnavalina



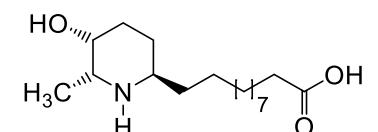
24: (-)-espectralina



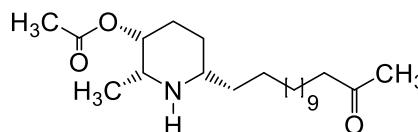
25: leptofilina A



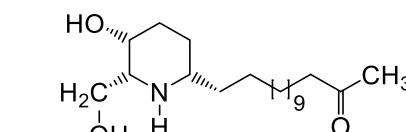
26: 3-O-acetilleptofilina A



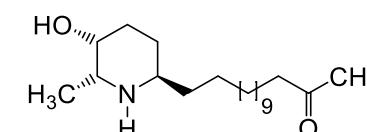
27: leptofilina B



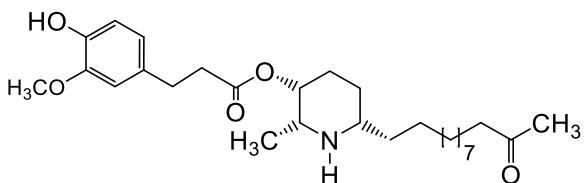
28: (-)-3-O-acetilespectralina



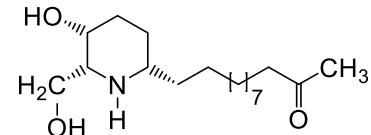
29: (-)-7-hidroxiespectralina



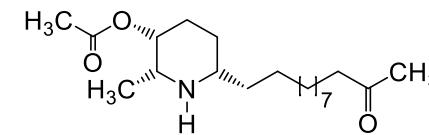
30: 6-iso-espectralina



31: (+)-3-O-feruloilcassina



32: (-)-7-hidroxicassina



33: (-)-3-O-acetyl cassina

Fonte: a autora.

Anos mais tarde, Viegas Junior e colaboradores (2004), isolaram três novos alcaloides piperidínicos $(-)$ -3-*O*-acetilespectralina (**28**), $(-)$ -7-hidroxiespectralina (**29**) e 6-*iso*-espectralina (**30**) das flores e frutos verdes de *C. spectabilis* (VIEGAS JR. et al., 2004). Tanto a 6-*iso*-espectralina (**30**) quanto a $(-)$ -3-*O*-acetilespectralina (**28**) mostraram atividade antinociceptiva promissora, inibição da peroxidação lipídica, inibição moderada contra COX-1 e 2 e citotóxica seletiva contra cepas de *S. cerevisiae*, indicando uma potencial atividade antitumoral (BOLZANI et al., 1995; VIEGAS JR. et al., 2004).

Em 2005, o trabalho de Pivatto et al. representou um marco importante no estudo dos alcaloides piperidínicos de *S. spectabilis* quando foi investigado o padrão de fragmentação de séries homólogas utilizando espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* (EM-EM/IES), demonstrando que os relatos do isolamento de $(-)$ -cassina (**18**) e $(-)$ -espectralina (**24**), bem como $(-)$ -3-*O*-acetilespectralina (**28**) eram, na verdade, a mistura de pares homólogos presentes na planta (PIVATTO et al., 2005).

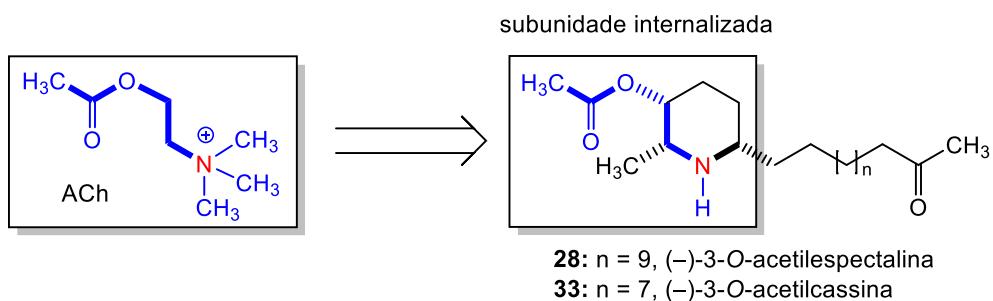
Anos depois, Viegas Junior e colaboradores (2007) isolaram a $(+)$ -3-*O*-ferulolcassina (**31**) dos frutos verdes de *C. spectabilis* e, posteriormente, foi isolado um novo alcaloide piperidínico $(-)$ -7-hidroxicassina (**32**) (VIEGAS JR. et al., 2013).

Em 2014, Pivatto et al., avaliaram os produtos naturais $(-)$ -cassina (**18**) e $(-)$ -espectralina (**24**) e seus derivados semissintéticos $(-)$ -3-*O*-acetilcassina (**33**) e $(-)$ -3-*O*-acetilespectralina (**28**) quanto à sua atividade antimalária por meio do teste de citometria de fluxo, utilizando cepas do *Plasmodium falciparum* 3D7, sendo que foi observada atividade moderada para **18** (IC_{50} 1,82 μ M) e **24** (IC_{50} 2,76 μ M), que por sua vez foram mais eficazes ($IC_{50} < 5,00 \mu$ M) que **33** (IC_{50} 24,47 μ M) e **28** (IC_{50} 25,14 μ M), em comparação com o composto padrão cloroquina (IC_{50} 0,30 μ M) (PIVATTO et al., 2014). No mesmo ano, a mistura dos alcaloides homólogos $(-)$ -cassina(**18**)/ $(-)$ -espectralina (**24**) (\sim 7:3) exibiram atividade significativa contra o parasita *Leishmania major* (IC_{50} 24,9 μ g mL $^{-1}$) em comparação com a pentamidina usada como droga padrão (IC_{50} 0,9 μ g mL $^{-1}$) (MELO et al., 2014) e, anos mais tarde, Castro et al. (2016) relataram a atividade esquistossomicida da fração diclorometano (DE_{50} 83,5 μ g mL $^{-1}$) e da mistura dos alcaloides **18/24** (DE_{50} 37,4 μ g mL $^{-1}$), demonstrando o potencial desses alcaloides no tratamento de doenças tropicais negligenciadas.

Posteriormente, devido aos resultados promissores antileishmania, Lacerda et al. (2018) avaliaram os alcaloides separadamente no ensaio utilizando *L. amazonensis*, assim como os compostos $(-)$ -3-*O*-acetilcassina (**33**) e $(-)$ -3-*O*-acetilespectalina (**28**), sendo o composto **33** isolado pela primeira vez das flores de *S. spectabilis*. O composto **24** (IC_{50} 15,81 μ g mL $^{-1}$) foi mais eficaz que **18** (IC_{50} 25,18 μ g mL $^{-1}$), e o composto **28** (IC_{50} 25,95 μ g mL $^{-1}$) foi mais eficaz que **33** (IC_{50} 30,25 μ g mL $^{-1}$). Nestes ensaios a anfotericina B (IC_{50} 0,29 μ g mL $^{-1}$) foi usada como controle positivo. Dadas as características estruturais desses compostos, como o tamanho da cadeia lateral e os valores de concentração inibitória, os compostos com maior cadeia lateral (**24** e **28**) foram mais eficazes em comparação aos compostos homólogos (**18** e **33**) (LACERDA et al., 2018).

No mesmo ano, Freitas e colaboradores (2018) relataram a separação e avaliação da atividade anticolinesterásica dos alcaloides piperidínicos homólogos **18** e **24** isolados do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*. Foi possível constatar que os homólogos **18** (IC_{50} 0,29 μ g mL $^{-1}$) e **24** (IC_{50} 0,52 μ g mL $^{-1}$) apresentavam potência diferente no ensaio de inibição da AChE, o que mostra a importância dos estudos destes compostos separadamente. Também foi observado em estudos anteriores que os derivados acetilados **33** e **28** apresentam uma unidade de ACh internalizada nas estruturas, o que pode estar relacionado com a inibição da AChE (Figura 16) (CASTRO et al., 2008; DANUELLO et al., 2012; VIEGAS JÚNIOR et al., 2005; FREITAS et al., 2018).

Figura 16. Unidade de ACh internalizada nas estruturas de **33** e **28**.



Fonte: a autora.

Recentemente, em continuação à prospecção química de compostos ativos que possam ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, Freitas et al. (2022) avaliaram os alcaloides **18** (EC_{50} 14,9 μ M) e **24** (EC_{50} 8,3 μ M) contra o vírus Chikungunya (CHIKV) pela primeira

vez em um ensaio de dose-resposta empregando células BHK-21 e CHIKV-*nanoluc*. Os dados apresentados mostram que os compostos **18** e **24** têm potencial como fármacos anti-CHIKV, o que é de extrema importância visto que a febre Chikungunya é uma doença endêmica causada pelo vírus CHIKV e que até hoje não há tratamento antiviral contra esta infecção ou vacina licenciada para prevení-la.

Assim, com base nos dados discutidos até aqui, fica evidente que os alcaloides piperidínicos constituem uma classe rara de produtos naturais que apresentam amplo espectro de atividades biológicas. A avaliação farmacológica dos diferentes compostos, assim como dos pares homólogos e compostos com diferentes estereoquímicas é uma tarefa difícil. Aliado a isso, a ausência de cromóforos torna a detecção e isolamento dos homólogos um grande desafio (FREITAS et al., 2018).

Dentro deste contexto, é importante destacar que ensaios biológicos dos homólogos separados têm apresentado resultados diferentes e que ao longo dos diversos estudos químicos realizados com *S. spectabilis* foi relatado o isolamento da (+)-espectralina (**20**) (CHRISTOFIDIS; WELTER; JADOT, 1977b), cuja estereoquímica é oposta àquela do homólogo de menor cadeia **18** e do enantiômero **24**. Esses dados despertaram nosso interesse para um estudo mais detalhado dos alcaloides presentes em *S. spectabilis*, visando o isolamento e separação dos homólogos e dos estereoisômeros presentes na espécie, assim como um estudo mais direcionado para a determinação da estereoquímica destes compostos.

1.2 OBJETIVOS

Isolar os alcaloides homólogos e quirais presentes no extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis*, determinar as estruturas químicas, inclusive a estereoquímica relativa, utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Solventes

- Metanol (MeOH): Synth P.A. ACS
- Clorofórmio (CHCl₃): Synth P.A. ACS
- Diclorometano (DCM): Êxodo científica
- Hidróxido de amônio (NH₄OH): Synth P.A. ACS
- Solventes de grau analítico (P.A.), purificados por destilação fracionada: hexano, acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH);
- DMSO-*d*₄: (Cambridge Laboratories)

1.3.2 Reagentes

- Ácido acético glacial (HOAc) (Vetec, CAS: 64-19-7)
- Ácido hexacloroplatínico IV: Vetec P.A.
- Iodeto de potássio: Vetec P.A.

1.3.3 Revelador

1.3.3.1 *Iodocloroplatinato* (TOUCHSTONE; DOBBINS, 1978)

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatínico (IV)(H₂(PtCl₆).6H₂O).

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

Solução spray: Mistura da solução A, solução B e H₂O (1:9:10).

1.3.4 Técnicas cromatográficas

1.3.4.1 *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 placas foram

monitoradas por irradiação ultravioleta (254 ou 365 nm) ou reveladas por nebulização do revelador específico para alcaloides (iodocloroplatinato).

1.3.4.2 Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas como fases estacionárias:

- Sílica gel (SiO_2) para cromatografia (63–200 μm , diâmetro de poro 60 \AA) Sigma Aldrich;
- Sílica gel (SiO_2) para cromatografia *flash* (40–63 μm , diâmetro de poro 60 \AA) Sigma Aldrich;
- C_{18} sílica gel, premium grade (40–63 μm , 230–400 mesh, diâmetro de poro 60 \AA) Sorbent Technologies.

1.3.4.3 Cromatografia líquida 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 à líquido de alta eficiência Shimadzu[®], modelo LC–6AD, composto pelos seguintes módulos: bombas LC–6AD, degaseificador DGU–20A₅R, FORNO CTO–20A, coletor de frações FRC–10A, autoinjetor SIL–10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD–M20A e evaporativo por espelhamento 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[®] (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 .
- Coluna semipreparativa Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250,0 × 10,0 mm, 10 μm). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 μm .

As análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLUE-EM), foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), campus Umuarama:

Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Agilent®, modelo Infinity 1260, equipado com coluna Agilent® C₁₈ modelo Poroshell (10,0 mm × 3 mm, 2,7 µm) acoplado ao espectrômetro de massa de alta resolução do tipo QTOF, marca Agilent®, modelo 6520 B, com fonte de ionização por eletronspray. A ionização foi realizada com gás nebulizante a 20 psi, o gás secante aquecido a 220 °C com fluxo de 8,0 L/min e no capilar foi aplicado 4,5 KV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.

As massas acuradas obtidas dos EMs 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:

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

1.3.4.4 Cromatografia a gás (CG)

As análises de cromatografia a gás foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) do Laboratório de Pesquisa em Energias Renováveis (coordenado pelo prof. Ricardo Reis Soares) e um CG-EM do Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU):

- 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*.

- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas Agilent Technologies modelo 7890B GC System/5977B GC/MSD, com as seguintes condições: gás transportador hélio a fluxo constante de 1,0 mL/min; coluna cromatográfica capilar Agilent 19091S-433 HP-5ms (30 m x 250 µm x 0.25 µm); temperatura do injetor ajustada a 210 °C, com uma proporção de divisão de 1:20; temperatura do forno inicialmente mantida a 100 °C e depois aumentada a uma velocidade de 13 °C/min a 280 °C, mantida durante 8 min; tempo de execução 21 min. O intervalo de massa analisado foi de 35–550 μ .

1.3.5 Técnicas espectroscópicas

As análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e NOESY 1D dos alcaloides piperidínicos foram realizadas em espectrômetro Brucker Avance III HD com campo de 14,1 T e criossonda TCI (Triple Channel Inverse) de 5 mm. Todas as amostras foram solubilizadas em dimetilsufóxido deuterado (DMSO- d_6 , Sigma-Aldrich[®]). Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando o solvente residual como padrão interno. Essas análises foram realizadas no instituto de química da universidade estadual paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) no campus de Araraquara.

1.3.6 Equipamentos utilizados

O Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos (NPCBio) – IQ/UFU, também conta com alguns equipamentos mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Equipamentos disponíveis para realização do projeto de pesquisa.

Equipamento	Marca	Modelo
Agitador magnético (3 unidades)	Gehaka	AA-2050
Banho de aquecimento	Fisatom	550
Balança analítica	Shimadzu	AX 200
Balança analítica	Gehaka	BG 200
Bomba de vácuo	Prismatec	131B
Câmara escura para luz ultravioleta (UV 254 e 365 nm)	Solab	SL-204
Chiller (Frigomix B) e controlador (Themomix BM)		
CG-EM	Shimadzu	GC2010
CG-FID	Shimadzu	GC2014
Espectrofotômetro	Genesyis	10S UV-Vis
Linha de secagem de amostra a pressão reduzida (bomba)	Edwards	RV5
Rotaevaporador (componentes: rotavapor R-100, banho de aquecimento B-100, bomba de vácuo V-100 e controlador I-100)	Buchi	R-100
Rotaevaporador (componentes: evaporador rotativo Químis, banho de aquecimento Buchi B-465 e bomba de vácuo Buchi V-100)	Químis	
Sistema de exaustão (capelas) (2 unidades)		

Nota: Todos os equipamentos são unitários, com exceção daqueles especificados.

Fonte: a autora.

1.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

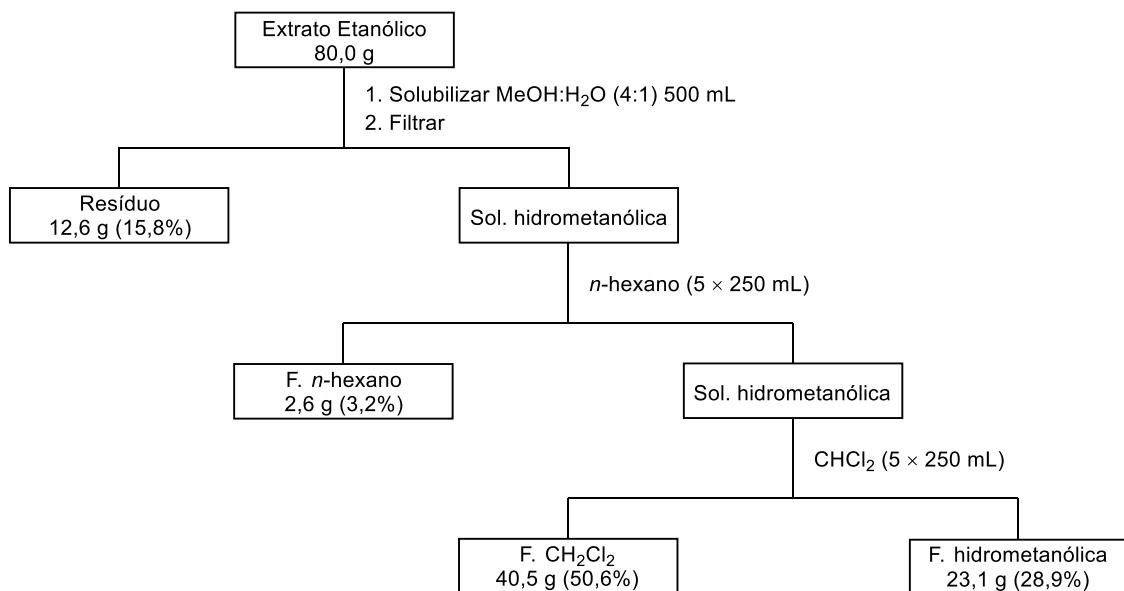
1.4.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico

O extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* (EEFl-Ss) foi preparado previamente pelo Professor Dr. Marcos Pivatto a partir do material vegetal (35,8 kg), que após seco e triturado (7,9 kg) foi submetido à extração por maceração com etanol PA (5×35 L), sendo o solvente removido por destilação em evaporador rotativo a pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. As flores foram coletadas (fevereiro de 2009) no terminal rodoviário de Araraquara, sendo a exsicata (SP 384 109) depositada no Instituto de Botânica de São Paulo.

1.4.2 Extração líquido-líquido

O EEFl-Ss (80,0 g) foi solubilizado em 500 mL de MeOH/H₂O (4:1, v/v), filtrado e submetido à extração líquido-líquido com hexano (5×250 mL) e diclorometano (5×250 mL) (Figura 17). Os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotativo a pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C.

Figura 17. Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*.



Fonte: a autora.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1 Fracionamento do EEF1-Ss

O EEF1-Ss (80,0 g) obtido a partir das flores *S. spectabilis*, foi submetido a extração líquido-líquido utilizando hexano e diclorometano, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Massas obtidas da extração líquido-líquido do EEF1-Ss.

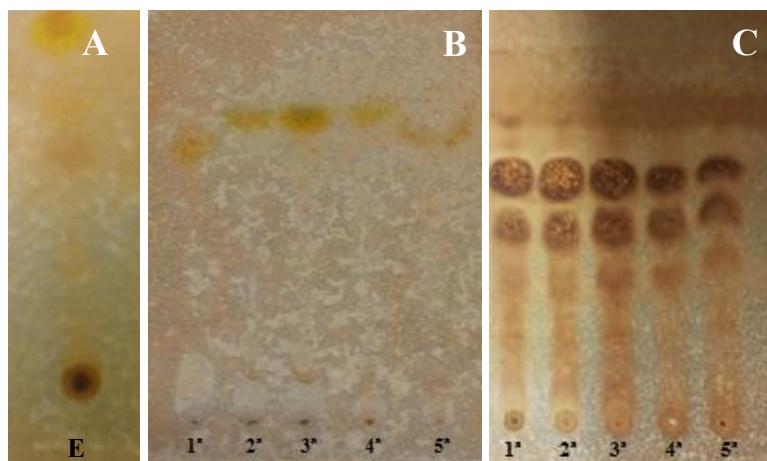
Fração	Massa (g)
Resíduo	12,6
Hexano	2,6
CH ₂ Cl ₂	40,5
Hidrometanólica	23,1
Massa total	78,8

Fonte: a autora.

1.5.2 Análise qualitativa dos alcaloides no extrato (EEF1-Ss) e nas frações de *S. spectabilis*

O extrato etanólico (EEF1-Ss) e as frações obtidas das extrações líquido-líquido foram analisadas por CCD utilizando como FE sílica gel e como FM uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,5). A adição do hidróxido de amônio à fase móvel foi necessária para reduzir a retenção dos alcaloides pelos grupos silanois (caráter ácido), uma vez que o hidróxido de amônio atua como uma amina competitiva (PIVATTO et al., 2014). As cromatoplacas foram reveladas com IClPt, reagente específico para alcaloides (Figura 18). A partir da avaliação das placas, foi possível constatar que os alcaloides estavam presentes em maior concentração nas frações CH₂Cl₂, que foram agrupadas e em seguida submetida à cromatografia em coluna (CC) para purificação destes metabólitos.

Figura 18. CCD do extrato etanólico (A) e das frações obtidas na extração líquido-líquido: hexano (B) e CH₂Cl₂ (C).



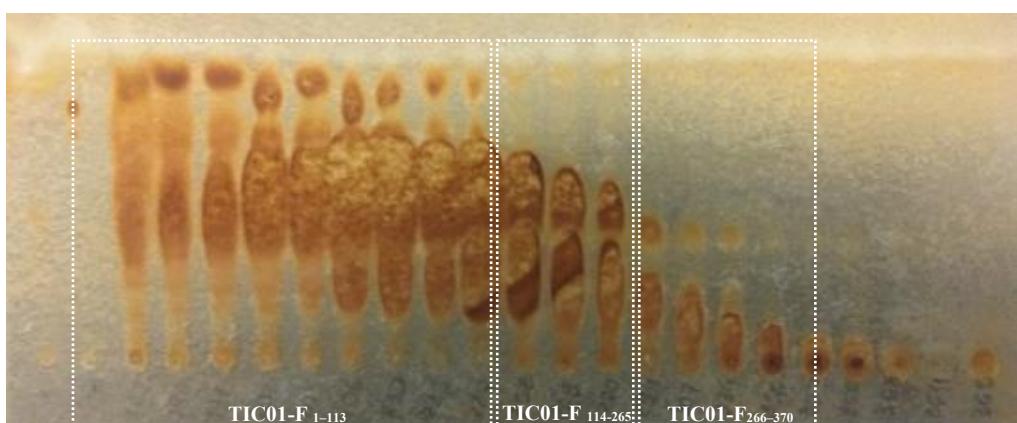
Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,5) e revelador IClPt.

Fonte: a autora.

1.5.3 Isolamento dos alcaloides piperidínicos de *S. spectabilis*

A fração CH₂Cl₂ (8,5 g) foi submetida à CC (445,0 g, 20,0 × 8,0 cm d.i.), utilizando como FE sílica gel (63–200 µm) e FM um gradiente de solventes que iniciou com CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (10:0:0,5) até CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (7:3:0,5), e na sequência 100% de MeOH. As frações coletadas (370) foram avaliadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de *R*_f, resultando nas frações alcaloídicas: TIC01-F₁₋₁₁₃ (598,5 mg), TIC01-F₁₁₄₋₂₆₅ (3,6 g) e TIC01-F₂₆₆₋₃₇₀ (3,7 g) (Figura 19).

Figura 19. CCD das frações coletadas de TIC01.

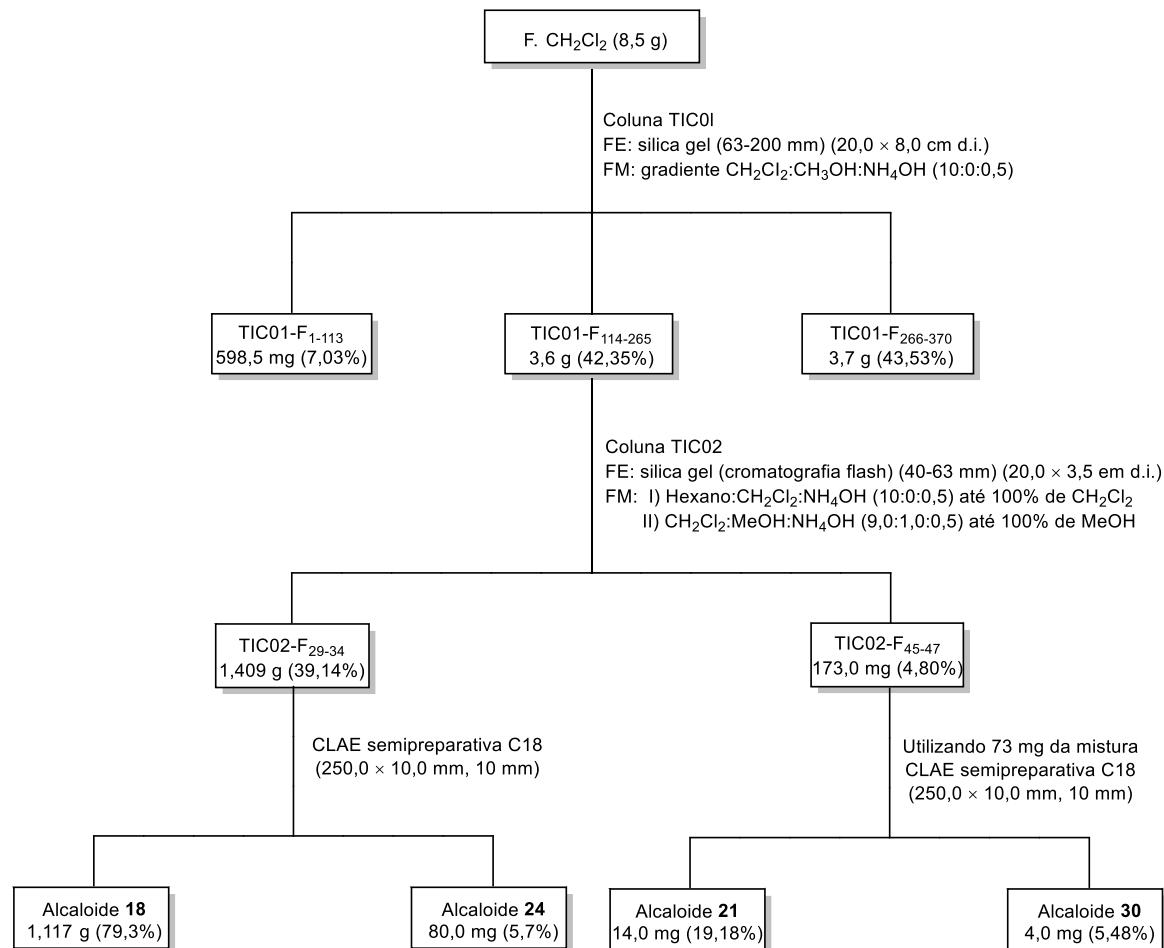


Condições: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,5) e revelador IClPt.

Fonte: a autora.

O fluxograma (Figura 20) apresenta um panorama dos procedimentos realizados para o isolamento dos alcaloides.

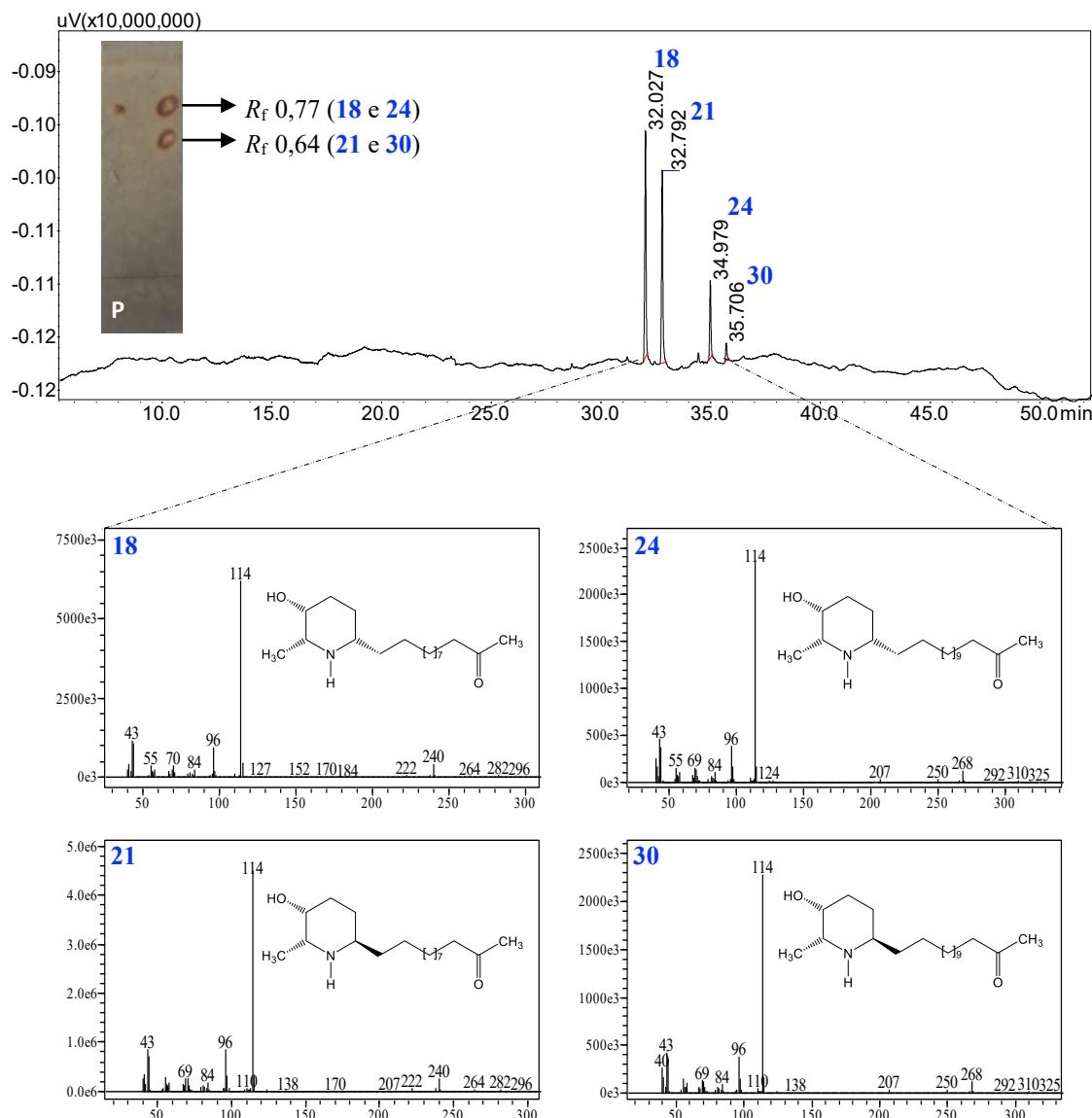
Figura 20. Procedimentos cromatográficos realizados com a fração CH_2Cl_2 .



Fonte: a autora.

A fração TIC01-F₁₁₄₋₂₆₅ foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível observar a presença de quatro sinais com diferentes tempos de retenção (t_R): **18** (t_R 32,0 min.), **24** (t_R 35,0 min.), **21** (t_R 32,8 min.) e **30** (t_R 35,7 min.) (Figura 21). No entanto, a análise dos EM-IE (Figura 21) permitiu observar que os espectros de **18** e **21** (m/z 297) [M^{+}], assim como de **24** e **30** (m/z 325) [M^{+}], eram idênticos.

Figura 21. Cromatograma (CG-EM) e EM-IE da fração TIC01-F₁₁₄₋₂₆₅ (**18/24** e **21/30**).

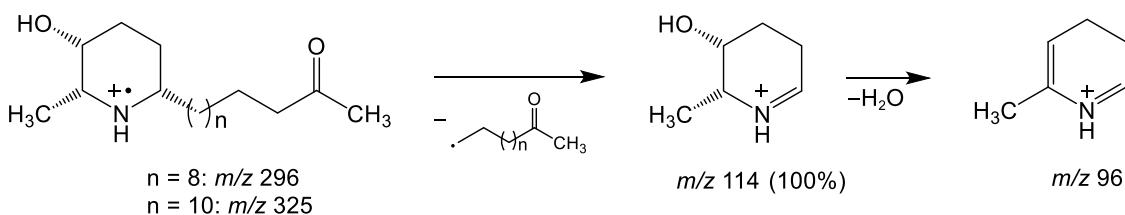


Nota: CCD: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9:1:0,25) e revelador IClPt.

Fonte: a autora.

Também foi observado que o pico base (*m/z* 114) foi o mesmo para os quatro compostos e corresponde à eliminação da cadeia lateral em C-6 ($\bullet\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{11}\text{COCH}_3$), que gera o fragmento de *m/z* 96 após desidratação (Figura 22). Nesse sentido, sabendo que a cadeia lateral é linear, os fragmentos observados ajudaram a distinguir os compostos **18/24** e **21/30** e confirmar a presença desses alcaloides como pares homólogos, como já relatado anteriormente por Pivatto e colaboradores (2005) e por Freitas e colaboradores (2018).

Figura 22. Proposta de fragmentação para os alcaloides piperidínicos por IE.

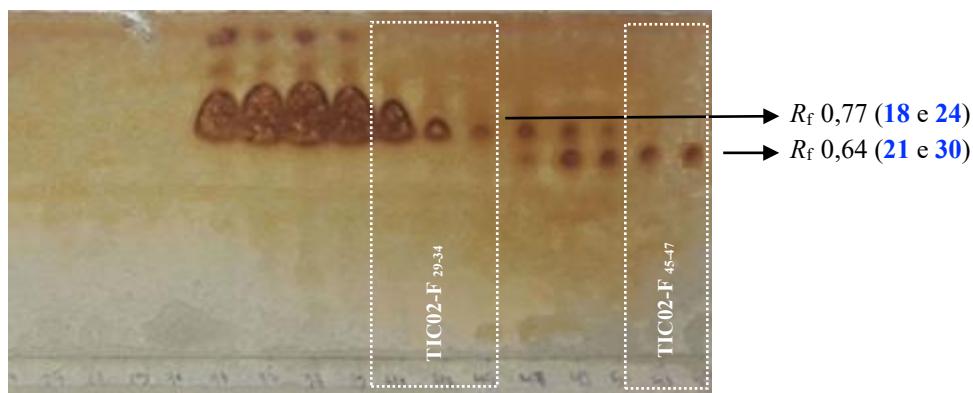


Fonte: adaptado de Freitas e colaboradores (2018).

Além disso, o fato dos alcaloides **18** e **21** apresentarem o mesmo íon molecular, assim como **24** e **30**, sugere que esses compostos apresentam uma relação estereoisomérica entre eles. Relatos na literatura descrevem alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis* com diferentes estereoquímicas, dentre eles os compostos **21** e **30** com a configuração absoluta do C-6 invertida em relação aos alcaloides **18** e **24** (CHRISTOFIDIS et al., 1977; VIEGAS JÚNIOR et al., 2004; SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2011b).

Com o intuito de separar os compostos presentes na fração TIC01-F₁₁₄₋₂₆₅ (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:CH₂Cl₂:NH₄OH (10:0:0,5) até 100% de CH₂Cl₂, seguido de CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (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*: TIC02-F₁₋₂₄ (54,0 mg), TIC02-F₂₅ (23,0 mg), TIC02-F₂₆₋₂₈ (128,5 mg), TIC02-F₂₉₋₃₄ (1,4 g), TIC02-F₃₅₋₃₈ (717,4 mg), TIC02-F₃₉₋₄₄ (474,2 mg) e TIC02-F₄₅₋₄₇ (173,0 mg) (Figura 23).

Figura 23. CCD das frações coletadas de TIC02.

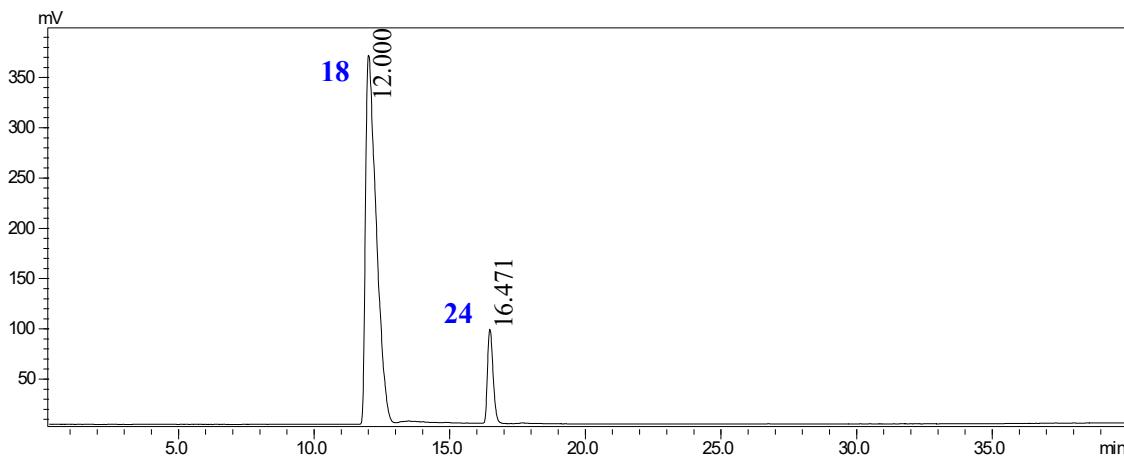


Condições: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:NH₄OH (9:1:0,5) e revelador IClPt.

Fonte: a autora.

A fração TIC02-F₂₉₋₃₄ foi analisada por CLAE-ELSD (Figura 24), que permitiu observar a mistura dos homólogos **18** (*t*_R 12,0 min.) e **24** (*t*_R 16,5 min.). Como **24** é ligeiramente mais lipofílico que **18**, devido as duas unidades de CH₂ adicionais na cadeia lateral em C-6, apresentou tempo de retenção maior quando analisado em coluna de fase reversa (C₁₈).

Figura 24. Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração TIC02-F₂₉₋₃₄.

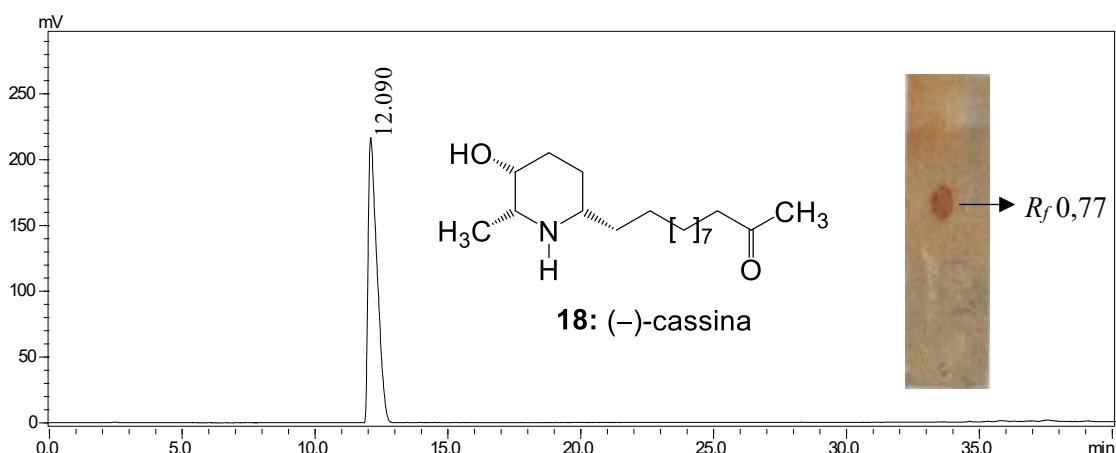


Condições: Coluna Phenomenex® C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: a autora.

Em seguida a fração TIC02-F₂₉₋₃₄ foi submetida a CLAE no modo semipreparativo, de onde foi possível separar os alcaloides **18** (1,12 g, *t*_R 12,1 min) e **24** (80 mg, *t*_R 16,6 min). Depois de isolados os metabólitos foram analisados em CLAE-ELSD no modo analítico para avaliar a eficiência da separação (Figuras 25 e 26).

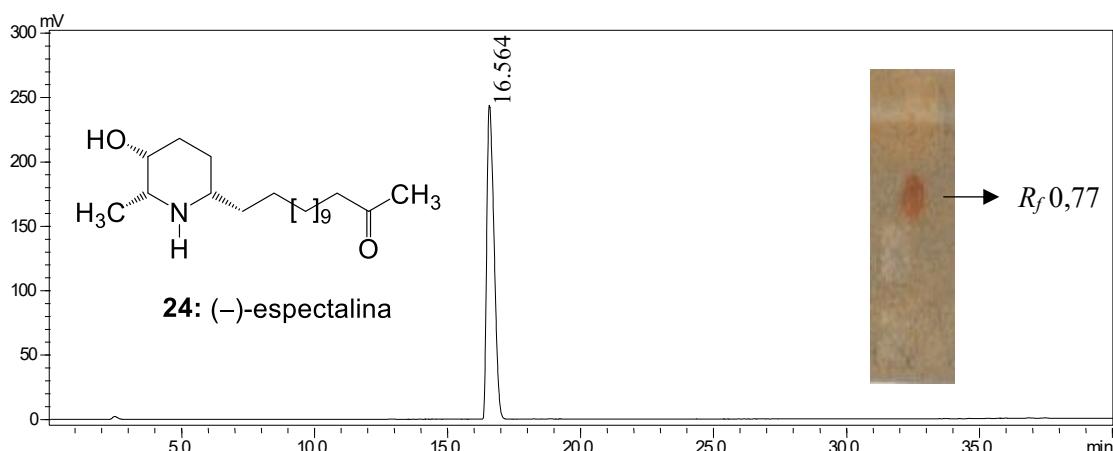
Figura 25. Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide **18**.



Condições: Coluna Phenomenex® 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: CH₂Cl₂:NH₄OH (9:1:0,5) revelador IClPt.

Fonte: a autora.

Figura 26. Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide **24**.



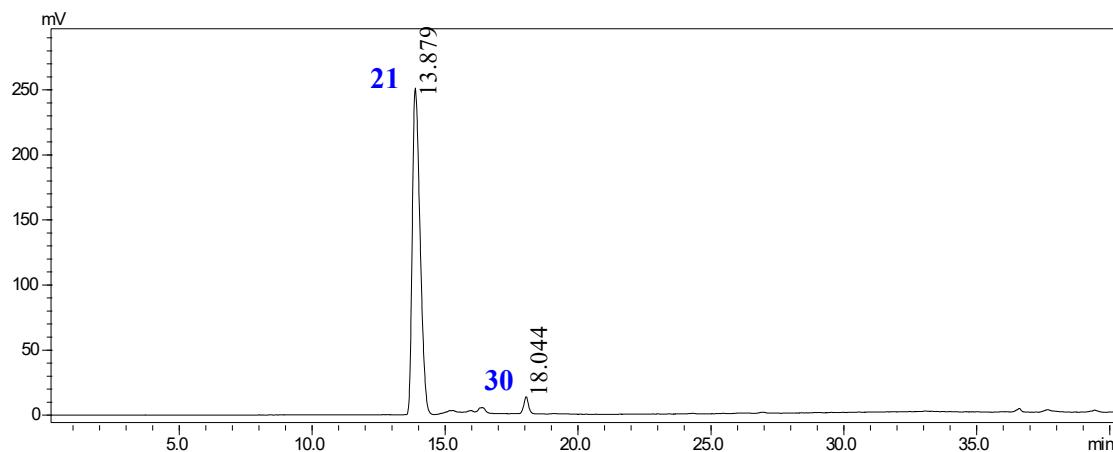
Condições: Coluna Phenomenex® C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD. CCD: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:NH₄OH (9:1:0,5) revelador IClPt.

Fonte: a autora.

Da mesma forma, a fração TIC02-F_{45–47} foi analisada por CLAE-ELSD (Figura 27), que permitiu observar a mistura dos homólogos *iso*-cassina (**21**) (t_R 13,9 min.) e *iso*-espectralina (**30**) (t_R 18,0 min.). Como **30** é ligeiramente mais lipofílico

que **21**, 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 27. Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração TIC02-F₄₅₋₄₇.

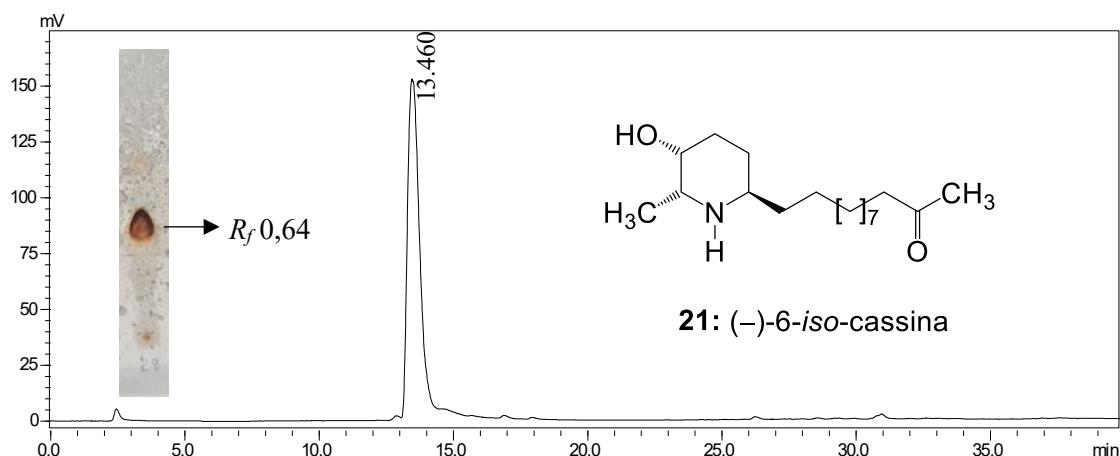


Condições: Coluna Phenomenex® C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), gradiente (30 min), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: a autora.

Em seguida a fração TIC02-F₄₅₋₄₇ foi submetida a CLAE no modo semipreparativo, de onde foi possível isolar os compostos **21** (14,2 mg, *t*_R 13,5 min) e **30** (4,1 mg, *t*_R 17,1 min). Depois de isolados os alcaloides foram analisados em CLAE-ELSD no modo analítico para avaliar a eficiência da separação (Figuras 28 e 29).

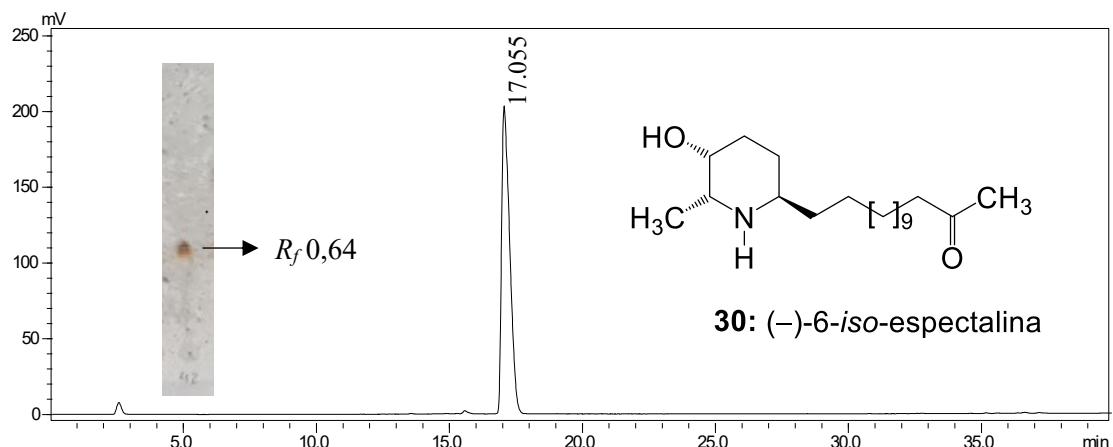
Figura 28. Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide **21**.



Condições: Coluna Phenomenex® 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: CH₂Cl₂:NH₄OH (9:1:0,5) revelador IClPt.

Fonte: a autora.

Figura 29. Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica do alcaloide **30**.



Condições: Coluna Phenomenex® 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: CH₂Cl₂:NH₄OH (9:1:0,5) revelador IClPt.

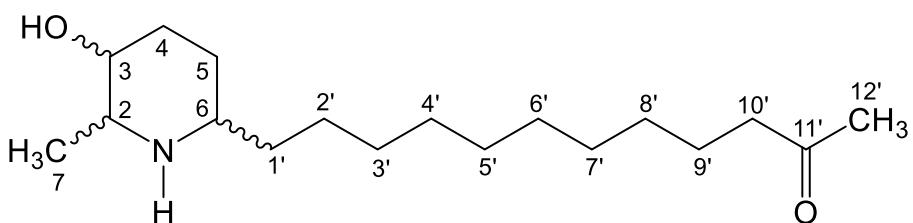
Fonte: a autora.

1.5.4 Elucidação estrutural dos alcaloides

O estudo químico da fração alcaloídica (CH_2Cl_2) obtida do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* resultou no isolamento de quatro alcaloides piperidínicos, cuja identificação foi feita através das técnicas espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C) e espectrométricas (EM), assim como a comparação dos dados com aqueles descritos na literatura.

1.5.4.1 Elucidação estrutural dos alcaloides **18** e **21**

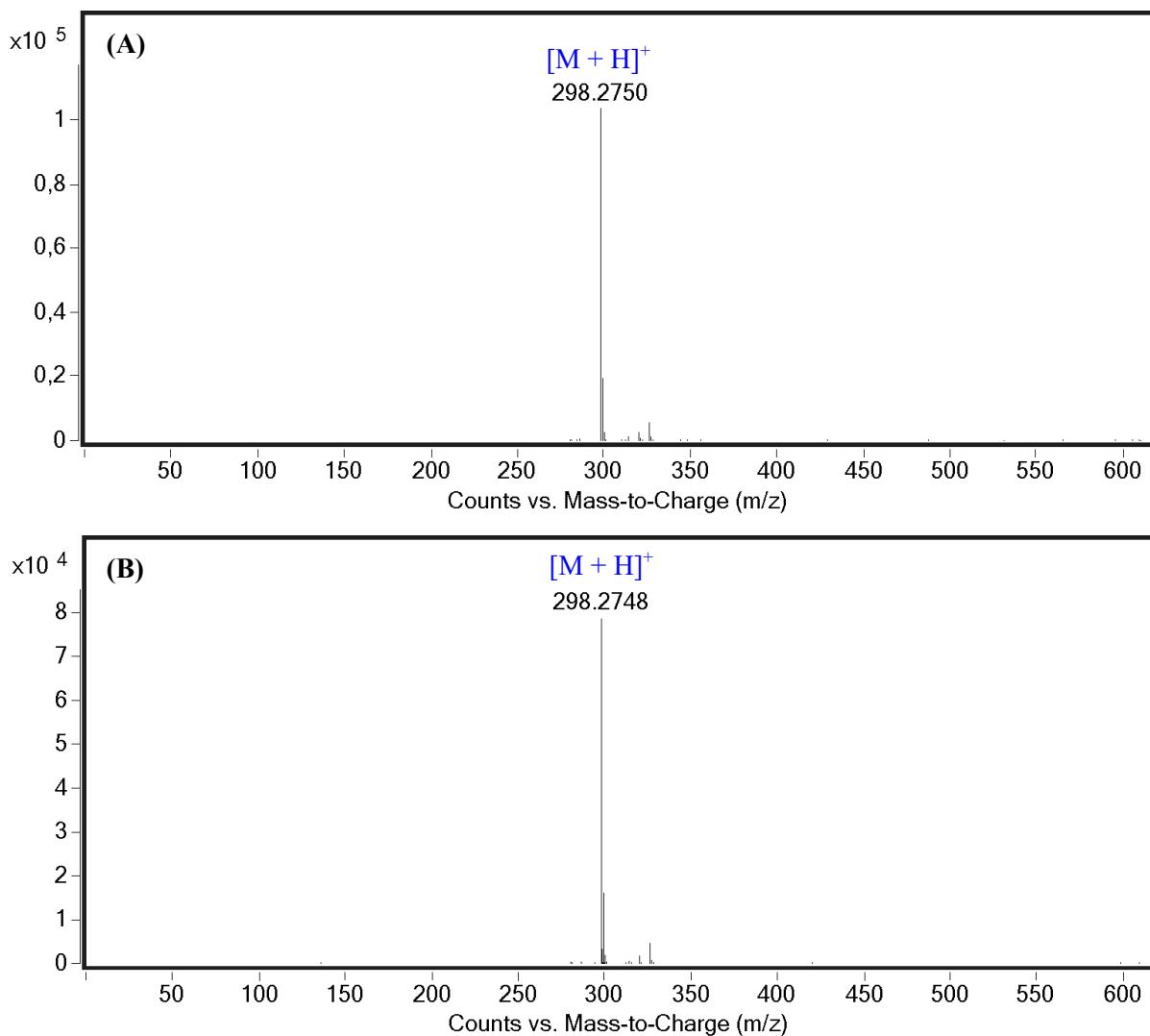
As substâncias **18** e **21** foram isoladas a partir do fracionamento cromatográfico da fração diclorometano das flores de *Senna spectabilis*.



Os compostos **18** (1,12 g, R_f 0,77, t_R 12,1 min) e **21** (14,0 g, R_f 0,64, t_R 13,5 min) apresentaram espectros de RMN de ^1H e ^{13}C DEPTQ muito parecidos, além de espectros de massas de alta resolução idênticos. Como as substâncias em questão possuem propriedades físicas diferentes (R_f e t_R), esses resultados sugerem a presença de estereoisômeros, mais especificamente, diastereômeros.

A análise por EM-IES-(+) em alta resolução permitiu estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ para **18** e **21**, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 298,2750 e m/z 298,2748 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2^+$ 298,2741 (Δ 3,0 ppm e Δ 2,3 ppm), respectivamente (Figura 30).

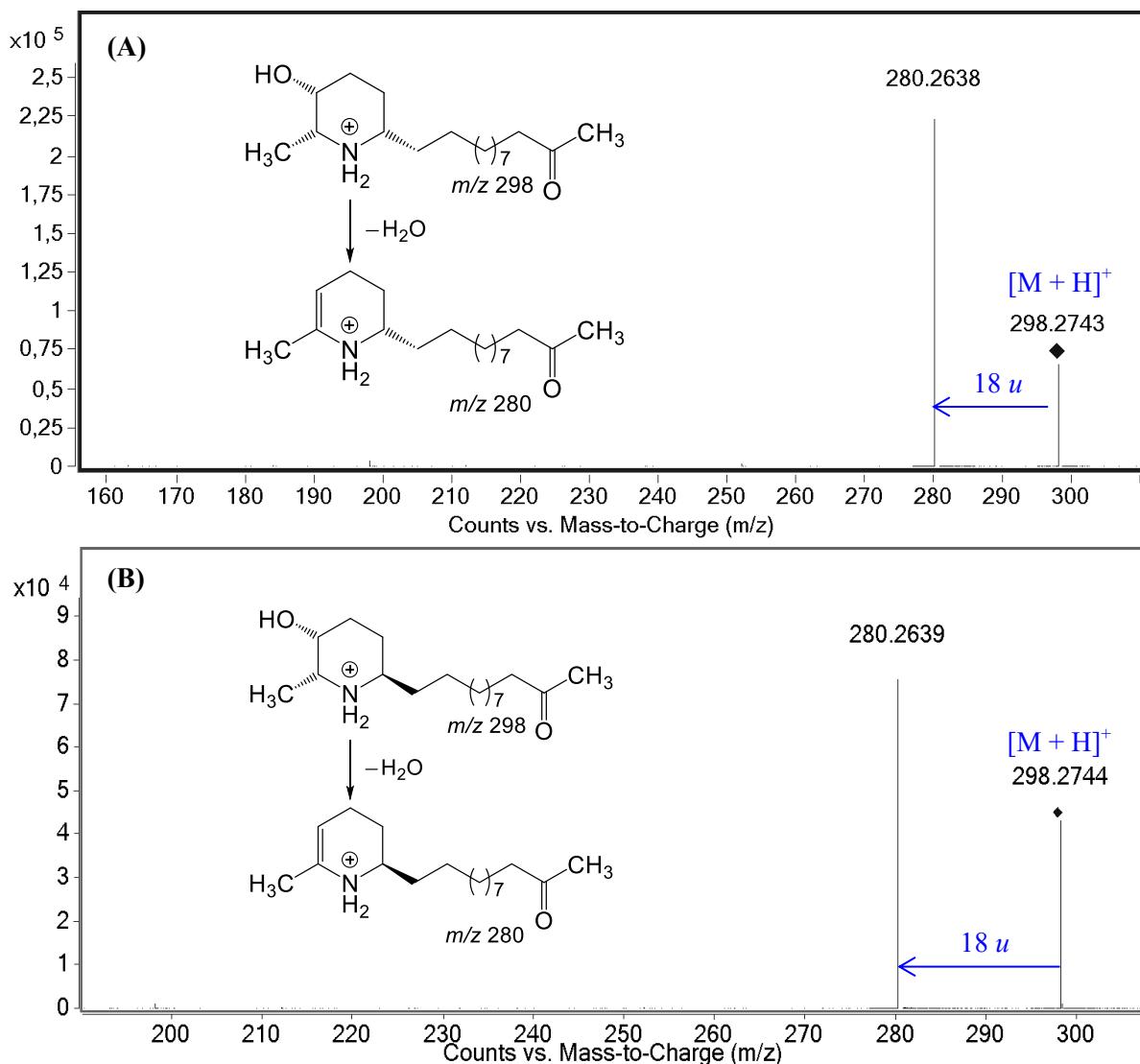
Figura 30. EM-IES-(+) em alta resolução dos alcaloides **18** (A) e **21** (B).



Fonte: a autora.

Quando o sinal referente à molécula protonada foi submetido à análise sequencial (EM/EM), foi observado o íon fragmento de m/z 280, que foi atribuído à eliminação neutra de água (18 u) (Figura 31).

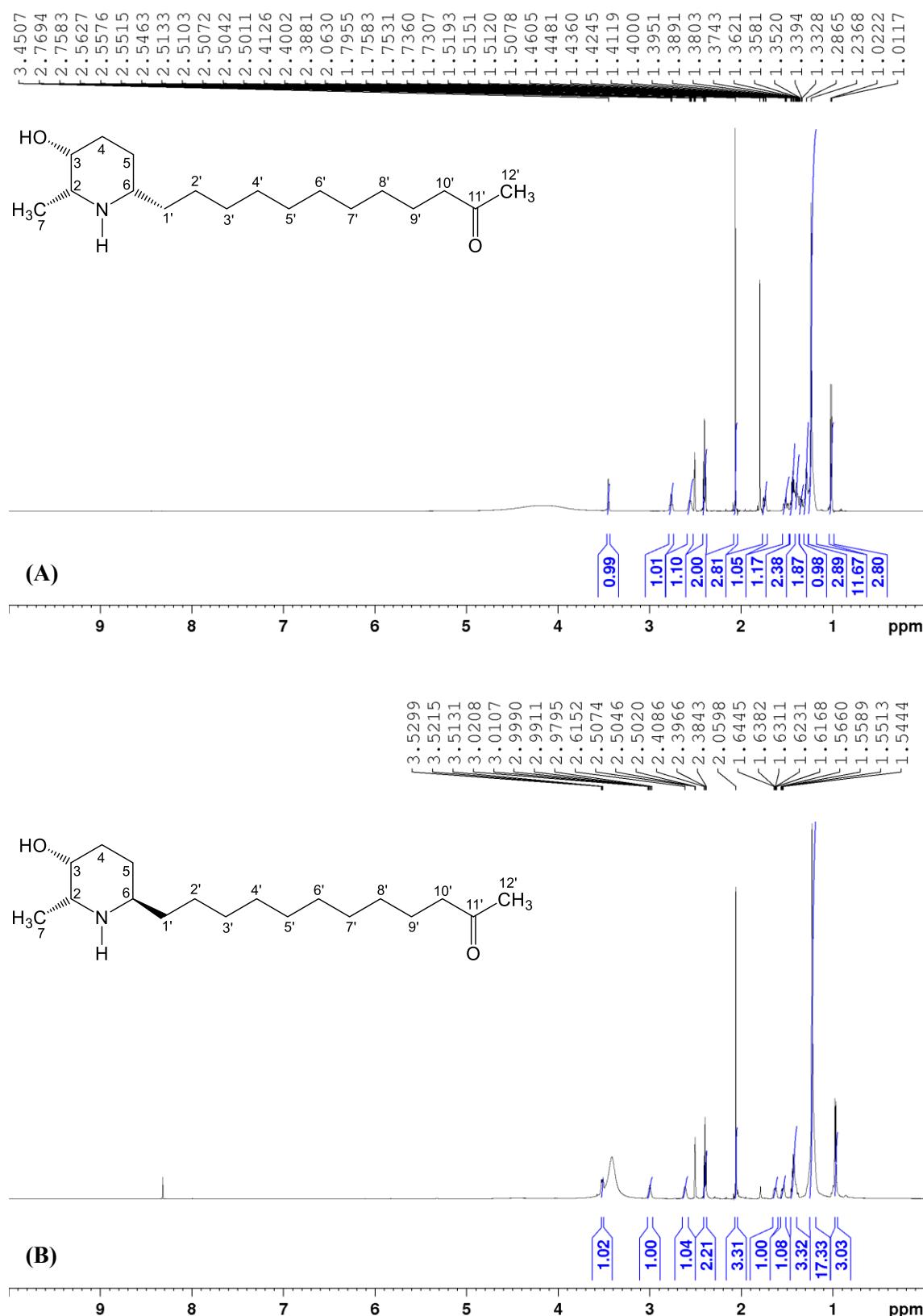
Figura 31. EM/EM-IES-(+) dos alcaloides **18** (A) e **21** (B).



Fonte: a autora.

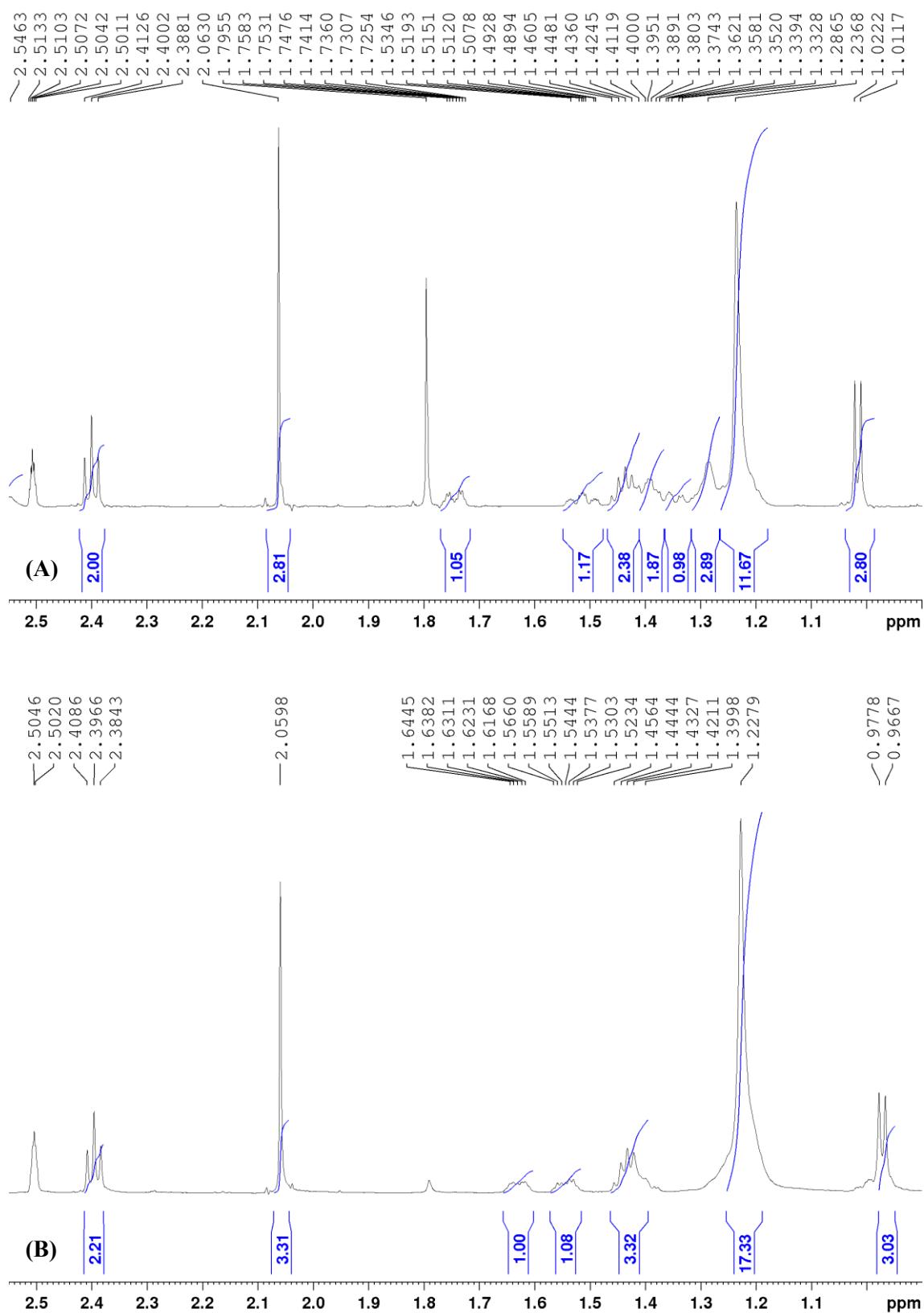
A análise dos espectros de RMN de ^1H dos alcaloides **18** e **21** (Tabela 3) (Figuras 32–34) permitiu observar a extremidade da cadeia lateral, funcionalizada pelo grupo metil-cetona e identificada pela presença dos sinais δ 2,39 (2H, t) e δ 2,06 (3H, s). Além disso, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **18** em δ 2,76 (1H, q, $J = 6,7$ Hz), δ 3,45 (1H, sl), δ 1,74 (1H, m), 1,51 (1H, m), 1,38 (1H, m), 1,33 (1H, m), δ 2,56 (1H, m) e δ 1,01 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), e para **21** em δ 2,99 (1H, m), δ 3,52 (1H, m), δ 1,54 (1H, m), 1,43 (1H, m), 1,23 (2H, m), δ 2,61 (1H, m) e δ 0,97 (3H, d, $J = 6,8$ Hz), relativos aos hidrogênios H–2, H–3, H–4a, H–4b, H–5a, H–5b, H–6 e H–7, respectivamente.

Figura 32. Espectro de RMN de ^1H dos alcaloides **18 (A)** e **21 (B)** (500 MHz, DMSO).



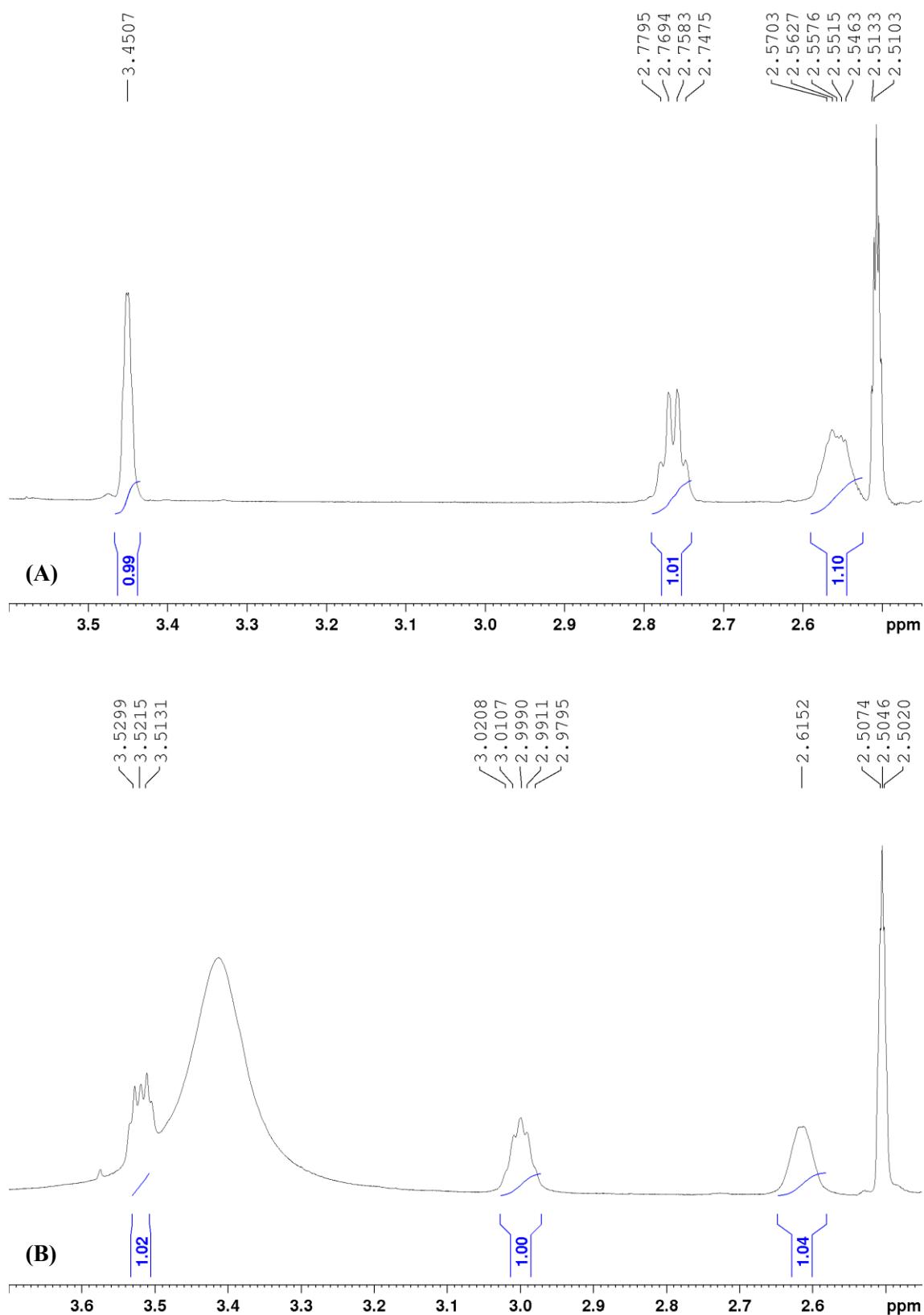
Fonte: a autora.

Figura 33. Ampliação do espectro 32 (δ 0,95–2,45) dos alcaloides **18** (A) e **21** (B).



Fonte: a autora.

Figura 34. Ampliação do espectro 32 (δ 2,45–3,6) dos alcaloides **18** (A) e **21** (B).



Fonte: a autora.

Tabela 3. Dados de RMN do alcaloide **18** e **21** em DMSO.

Posição	18		21	
	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b
2	2,76 q (6,7)	55,19 (CH)	2,99 m	51,52 (CH)
3	3,45 sl	65,93 (CH)	3,52 m	68,65 (CH)
4	1,74 m 1,51 m	31,83 (CH ₂)	1,54 m 1,43 m	27,80 (CH ₂)
5	1,38 m 1,33 m	24,93 (CH ₂)	1,23 m	26,23 (CH ₂)
6	2,56 m	56,32 (CH)	2,61 m	48,37 (CH)
7	1,01 d (6,7)	17,97 (CH ₃)	0,97 d (6,8)	13,21 (CH ₃)
1'	1,38 1,28	35,71 (CH ₂)	1,63 1,23	35,19 (CH ₂)
2'	1,28 m	25,62 (CH ₂)	1,23 m	29,67 (CH ₂)
3'	1,23 m	29,58 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,46 ^c (CH ₂)
4'	1,23 m	29,42 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,41 ^c (CH ₂)
5'	1,23 m	29,40 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,36 ^c (CH ₂)
6'	1,23 m	29,38 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,31 ^c (CH ₂)
7'	1,23 m	29,31 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,31 ^c (CH ₂)
8'	1,23 m	29,01 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,01 ^c (CH ₂)
9'	1,43 qt	23,66 (CH ₂)	1,43 m	23,66 CH ₂)
10'	2,39 t (7,4)	43,16 (CH ₂)	2,39 t (7,1)	43,16 (CH ₂)
11'	—	208,98 (C)	—	208,97 (C)
12'	2,06 s	30,12 (CH ₃)	2,06 s	30,11 (CH ₃)

^aOs experimentos de RMN foram realizados a 600 e 150 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} 0,00$).

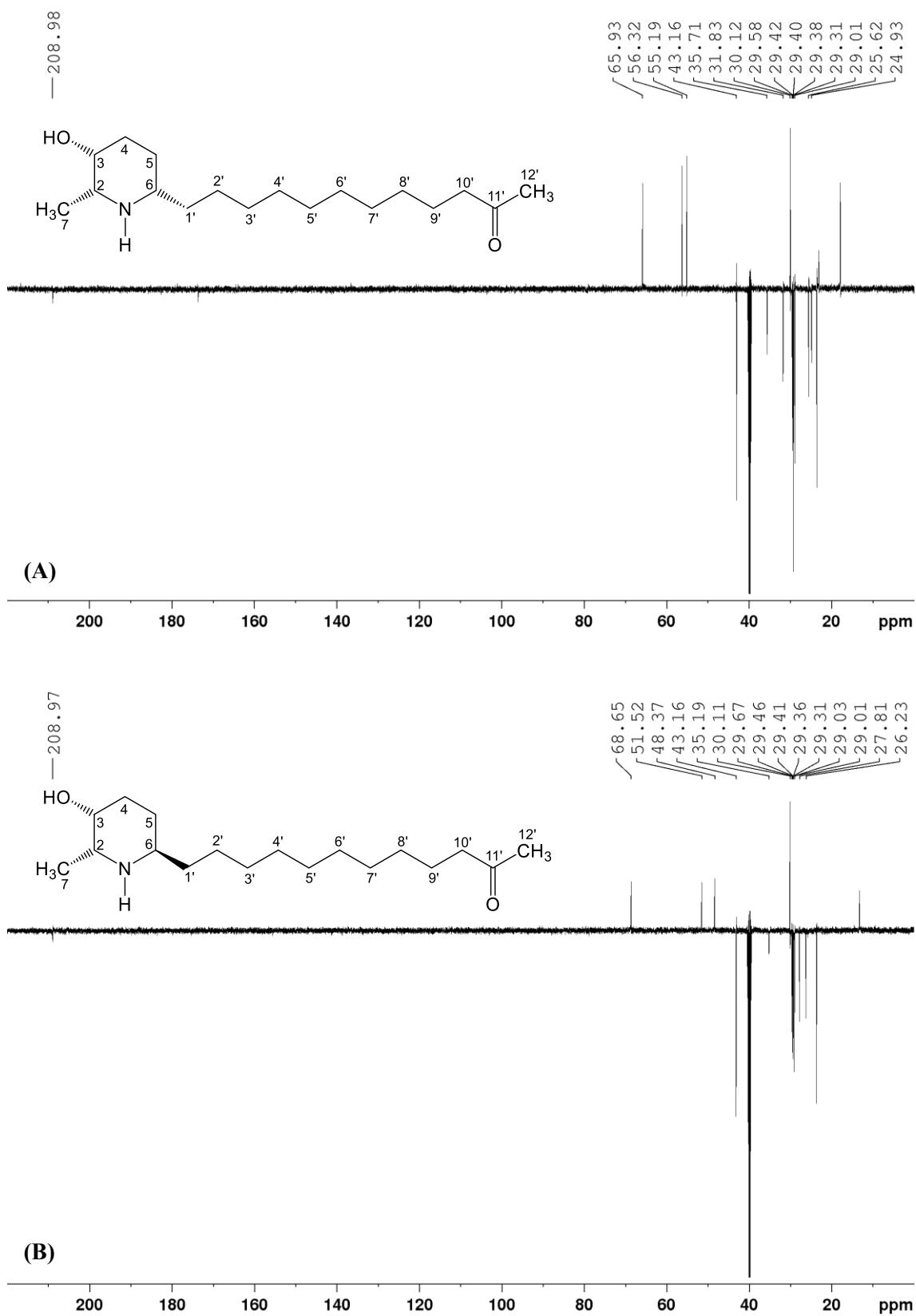
^bMultiplicidade: s (simpleto); d (dupleto); t (tripleto); q (quadruploto); qt (quintuploto); m (multipleto).

^cValor atribuído com base no deslocamento químico calculado (ChemDraw Ultra v. 12) e podem estar interconvertidos dentro da coluna.

Fonte: a autora.

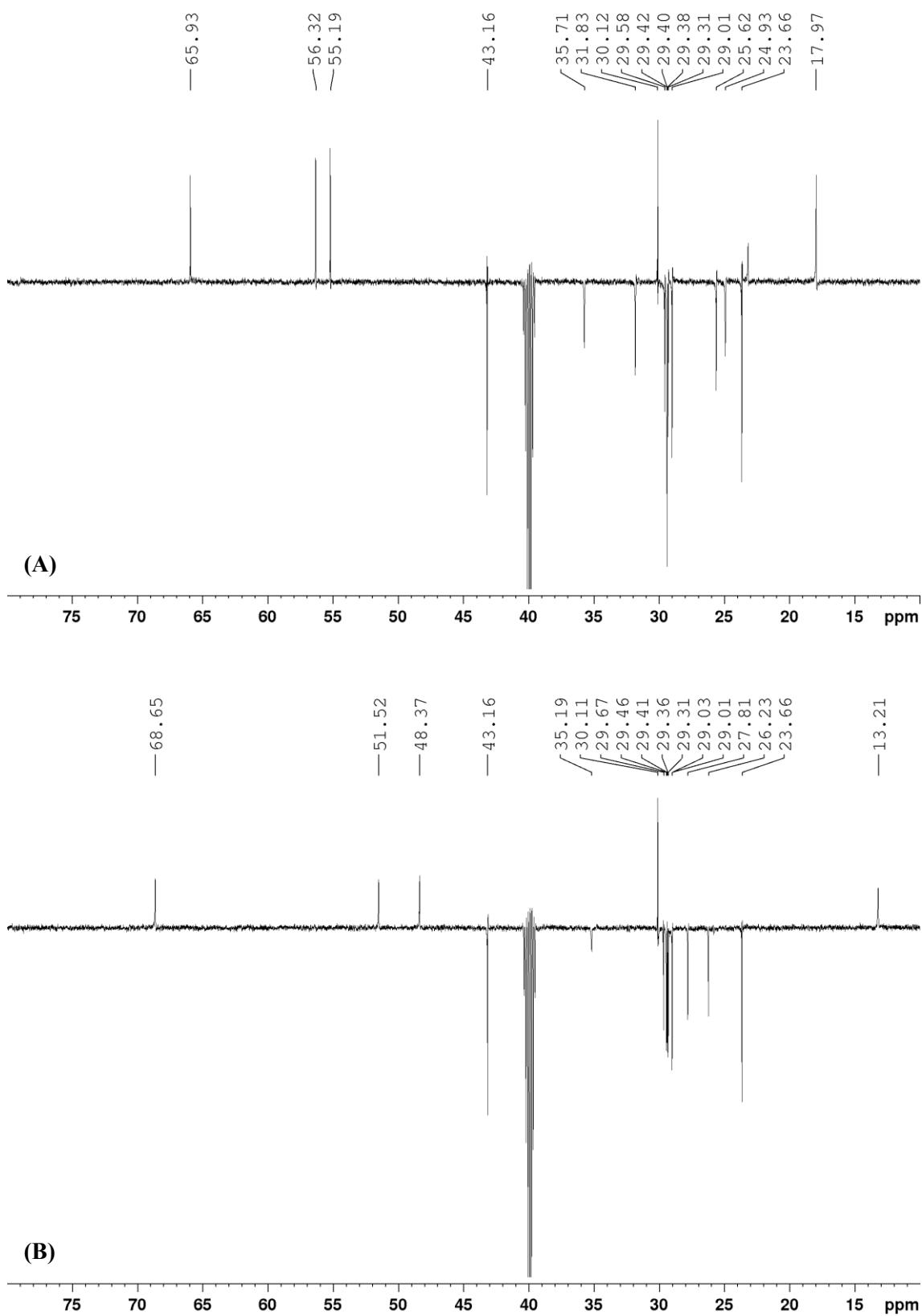
Nos espectros de ^{13}C DEPTQ (Tabela 3) (Figuras 35–38) foram observados os carbonos metilênicos C–3'–C–8' na região entre δ 29,01–29,58 e os carbonos da extremidade da cadeia lateral em δ 23,66 (CH₂), δ 43,16 (CH₂), δ 208,97 (C) e δ 30,12 (CH₃), que condizem com os dados já publicados na literatura (FREITAS et al., 2018). Além disso, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **18** em δ 55,19 (CH), δ 65,93 (CH), δ 31,83 (CH₂), 24,93 (CH₂), 56,32 (CH) e 17,97 (CH₃), e para **21** em δ 51,52 (CH), δ 68,65 (CH), δ 27,80 (CH₂), 26,23 (CH₂), 48,37 (CH) e 13,21 (CH₃), relativos aos carbonos C–2, C–3, C–4, C–5, C–6 e C–7, respectivamente.

Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq dos alcaloides **18** (A) e **21** (B) (150 MHz, DMSO).



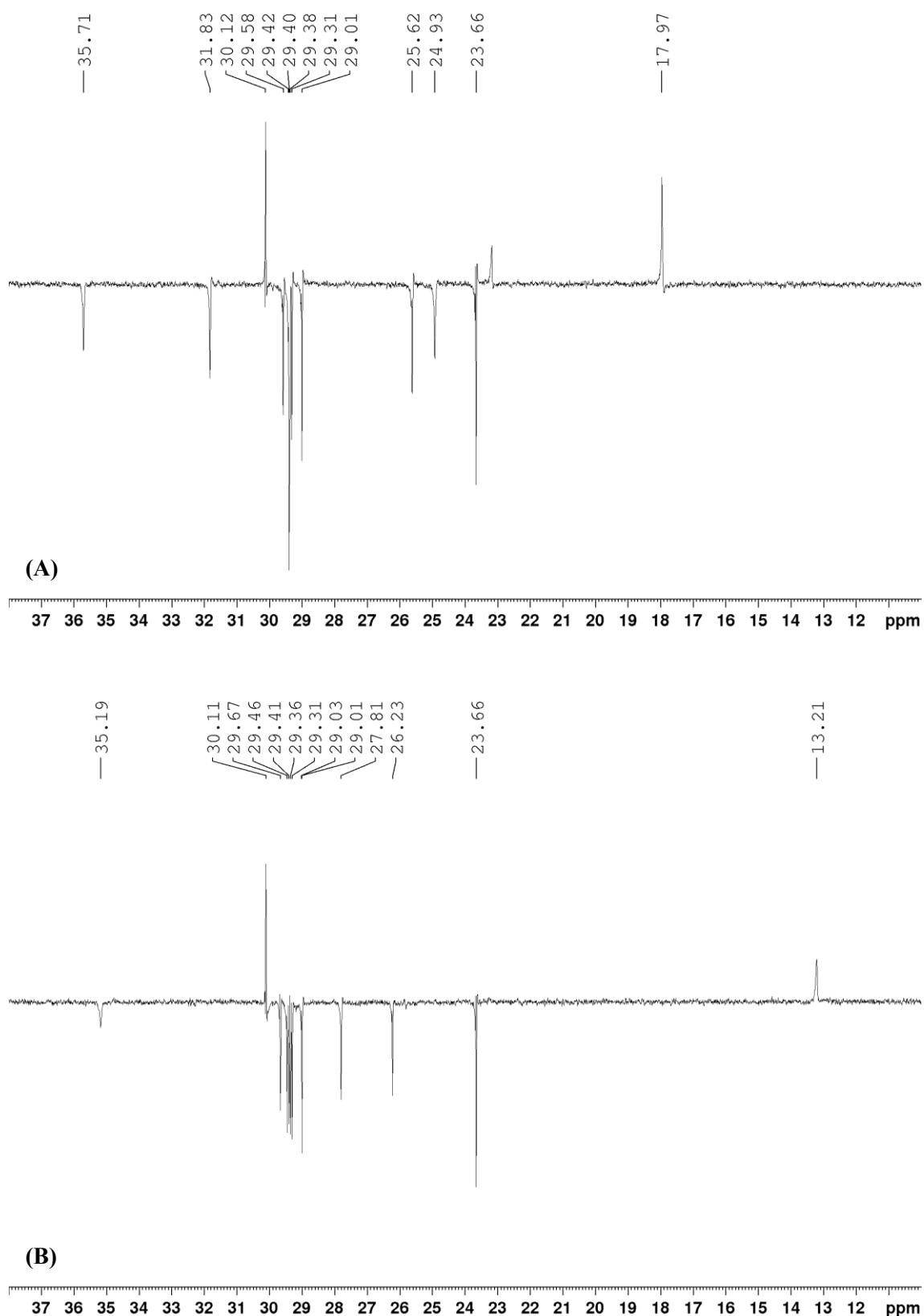
Fonte: a autora.

Figura 36. Ampliação do espectro ^{13}C (δ 10,0–80,0) dos alcaloides **18** (A) e **21** (B).



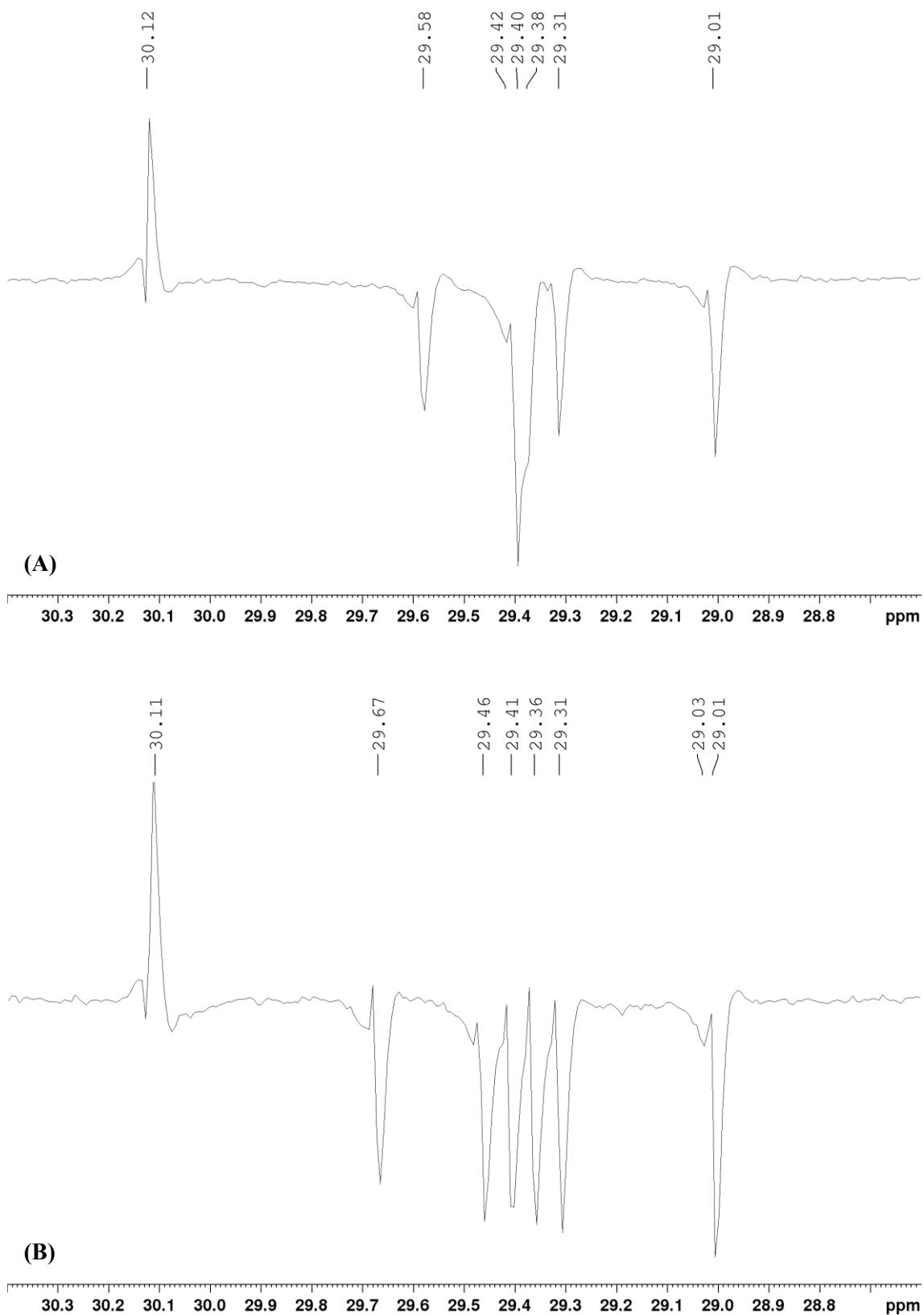
Fonte: a autora.

Figura 37. Ampliação do espectro 35 (δ 10,0–38,0) dos alcaloides **18** (A) e **21** (B).



Fonte: a autora.

Figura 38. Ampliação do espectro 35 (δ 28,6–30,4) dos alcaloides **18** (A) e **21** (B).

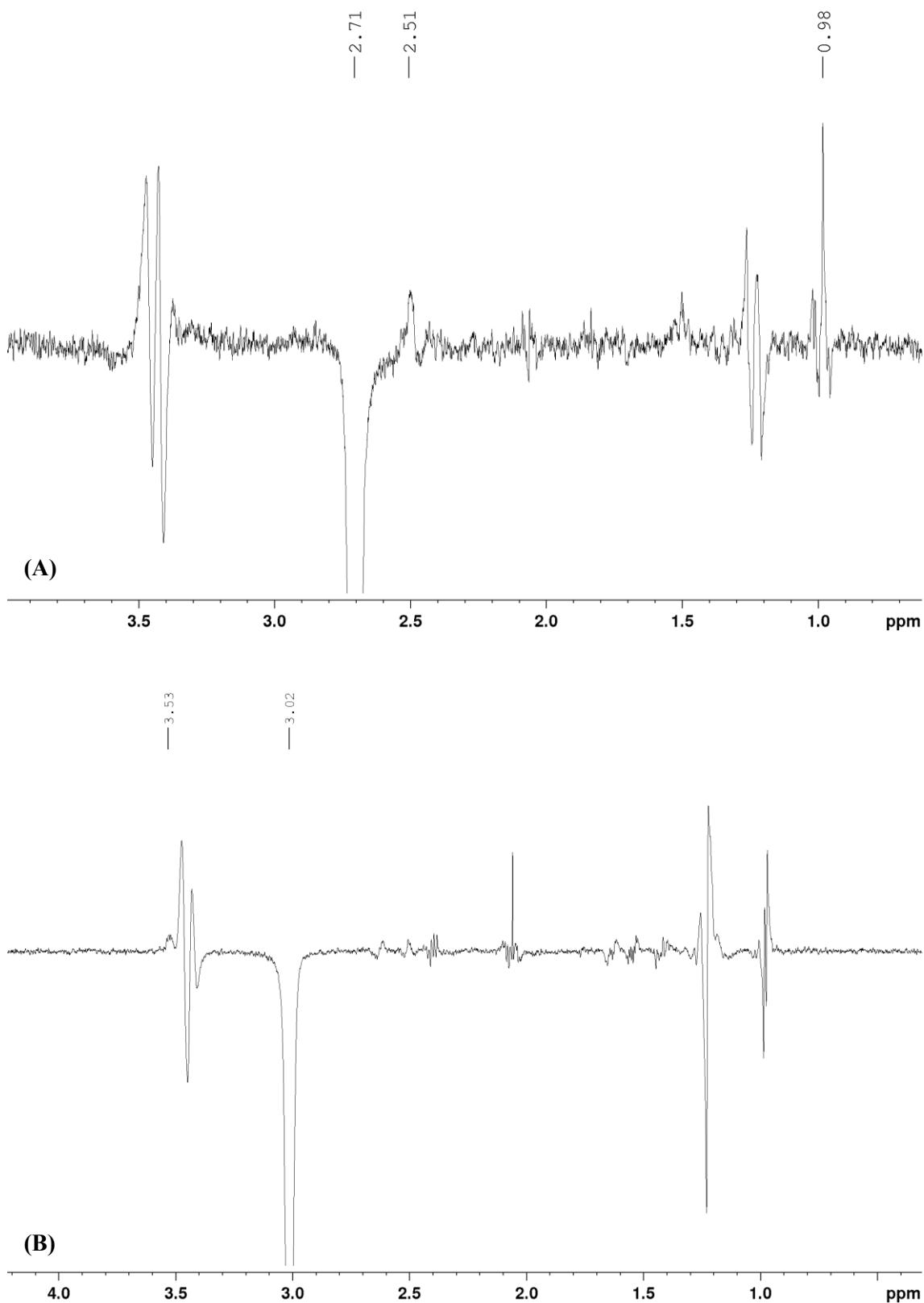


Fonte: a autora.

As configurações relativas dos centros estereogênicos presentes no núcleo piperidínico dos alcaloides **18** e **21**, foram propostas com base nos experimentos de NOESY 1D (Figuras 39–41). Para o alcaloide **18**, quando irradiado o sinal referente ao H–2 (δ 2,76) (Figura 39), foi possível observar as correlações com os sinais referentes aos hidrogênios H–6 (δ 2,56) e H–7 (δ 0,98). Ao irradiar o sinal referente ao H–3 (δ 3,45) (Figura 40), foi possível observar as correlações com os sinais referentes aos hidrogênios H–2 (δ 2,76) e H–4a (δ 1,74) e, ao irradiar o sinal referente ao H–6 (δ 2,56) (Figura 41), foi possível observar a correlação com o sinal referente ao hidrogênio H–2 (δ 2,76). As correlações observadas (Figura 42) indicam que os hidrogênios H–2, H–3 e H–6 mantêm uma relação cis em relação ao plano do anel.

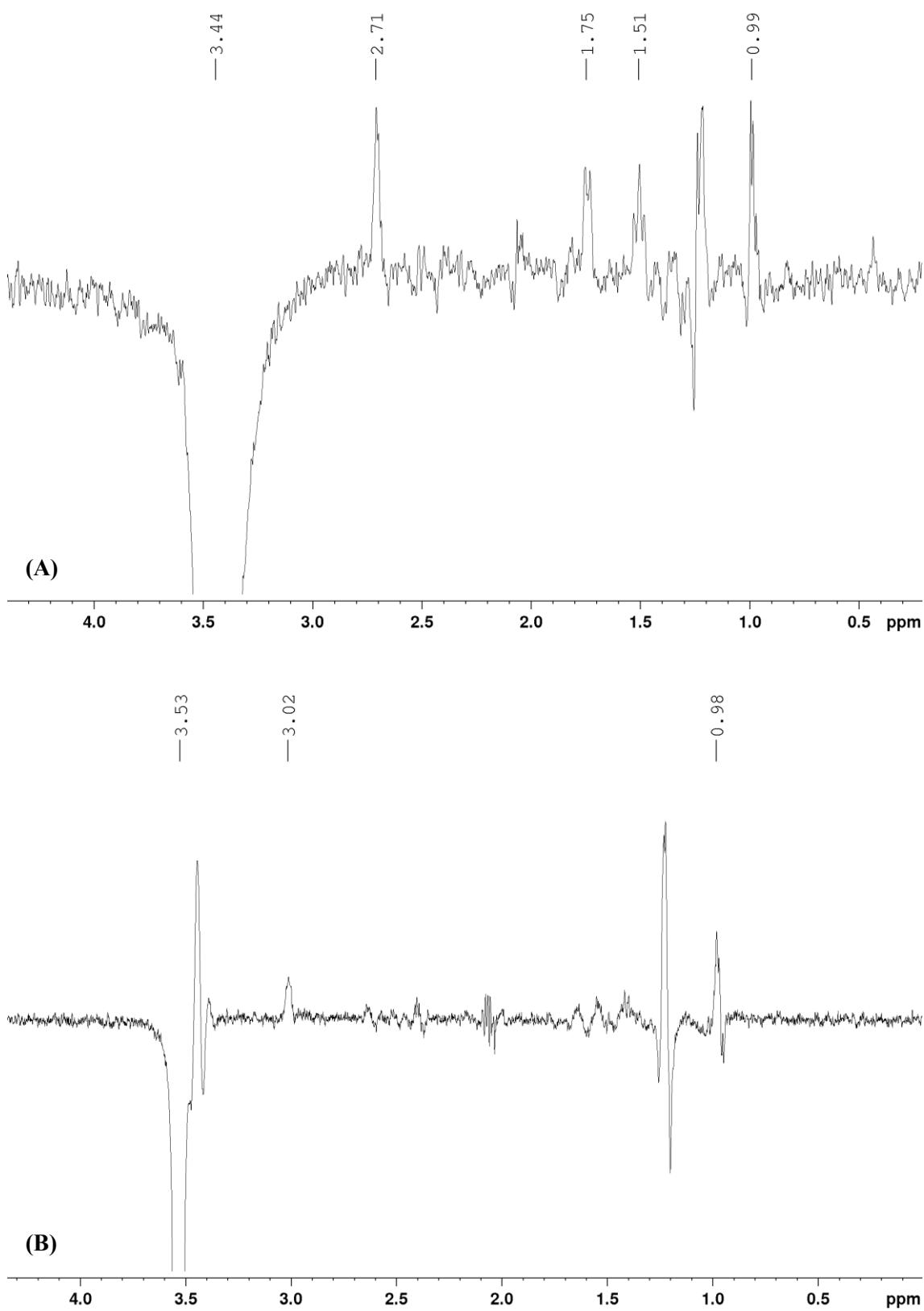
Já para o alcaloide **21**, quando irradiado o sinal referente ao H–2 (δ 2,99) (Figura 39), foi possível observar a correlação com o sinal referente ao hidrogênio H–3 (δ 3,52) e, ao irradiar o sinal referente ao H–3 (δ 3,52) (Figura 40), foi possível observar a correlação com o sinal referente ao hidrogênio H–2 (δ 2,99), indicando que os hidrogênios H–2 e H–3 mantêm uma relação cis em relação ao plano do anel. Ao contrário do que ocorre em **18**, no alcaloide **21**, quando irradiado o sinal referente ao H–6 (δ 2,61) (Figura 41), não foi possível observar a correlação com o sinal referente ao hidrogênio H–2 (δ 2,99), indicando que o hidrogênio H–6 mantém uma relação trans com os hidrogênios H–2 e H–3 em relação ao plano do anel. Nesse sentido, as correlações observadas para os alcaloides **18** e **21** sugerem que os compostos são epímeros no C–6.

Figura 39. Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-2 dos alcaloides **18** (A) e **21** (B) (500 MHz, DMSO).



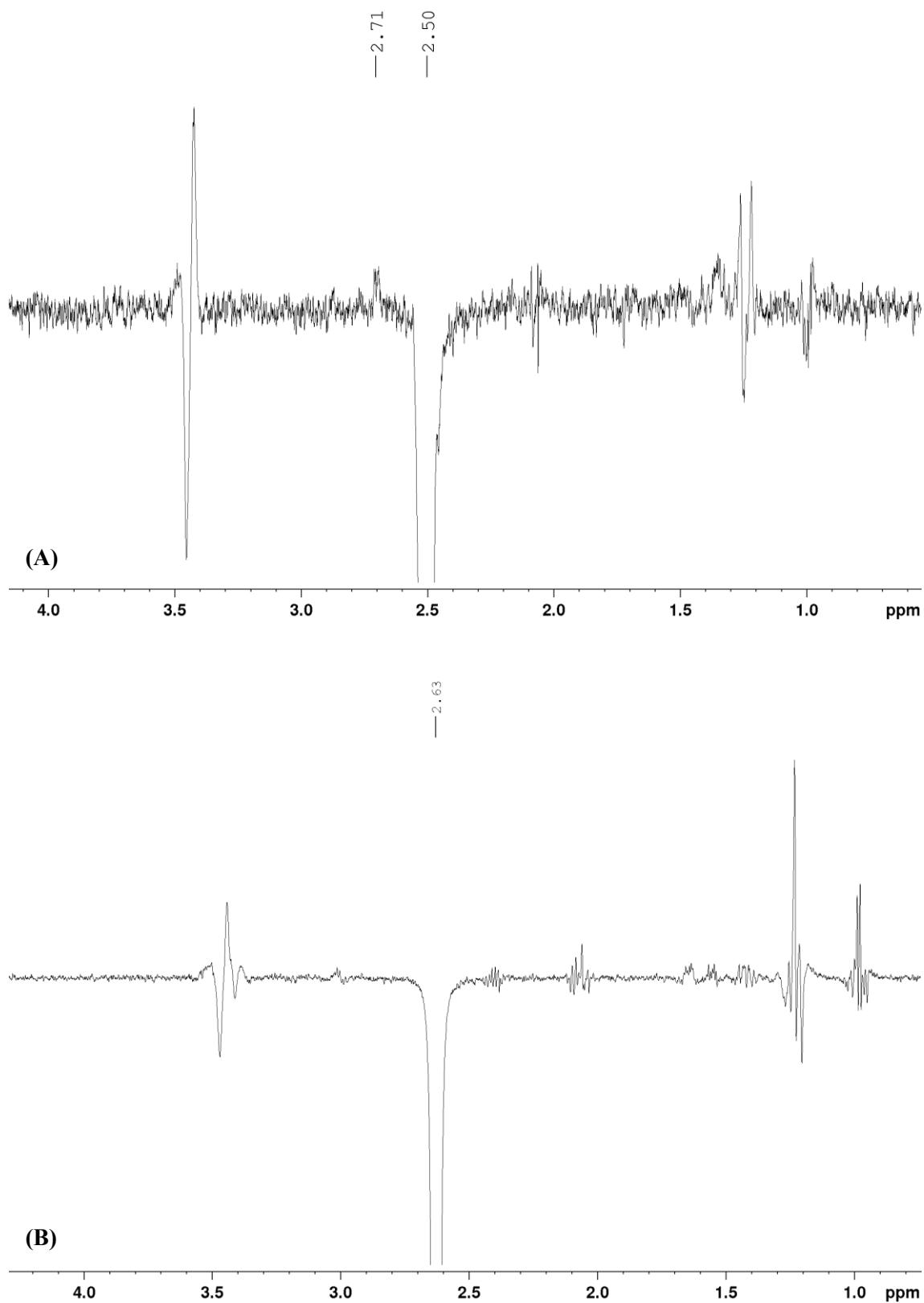
Fonte: a autora.

Figura 40. Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-3 dos alcaloides **18** (A) e **21** (B) (500 MHz, DMSO).



Fonte: a autora.

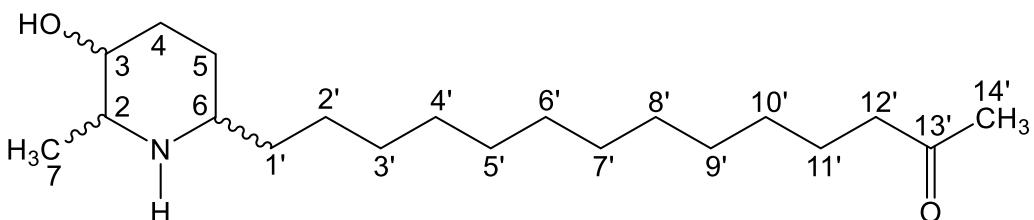
Figura 41. Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-6 dos alcaloides **18** (A) e **21** (B) (500 MHz, DMSO).



Fonte: a autora.

1.5.4.2 Elucidação estrutural dos alcaloides **24** e **30**

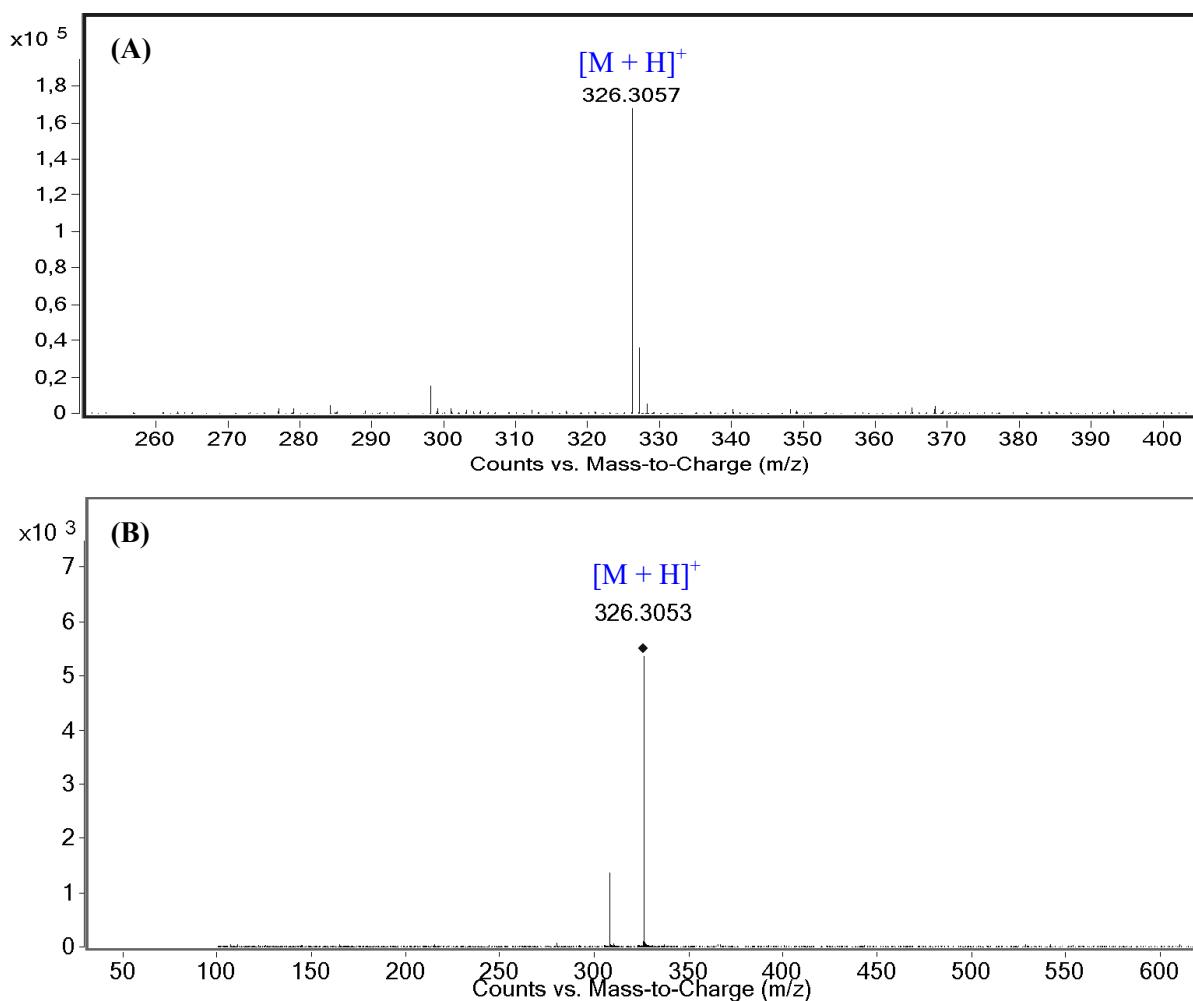
As substâncias **24** e **30** foram isoladas a partir do fracionamento cromatográfico da fração diclorometano das flores de *Senna spectabilis*.



Os compostos **24** (80,0 mg, R_f 0,77, t_R 12,1 min) e **30** (4,0 mg, R_f 0,64, t_R 13,5 min) apresentaram espectros de RMN de ^1H e ^{13}C DEPTQ muito parecidos, além de espectros de massas de alta resolução idênticos. Como as substâncias em questão possuem propriedades físicas diferentes (R_f e t_R), esses resultados sugerem a presença de estereoisômeros, mais especificamente, diastereômeros.

A análise por EM-IES-(+) em alta resolução permitiu estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_2$ para **24** e **30**, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 326,3057 e m/z 326,3053 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{NO}_2^+$ 326,3054 (Δ 0,9 ppm e Δ -0,3 ppm), respectivamente (Figura 42).

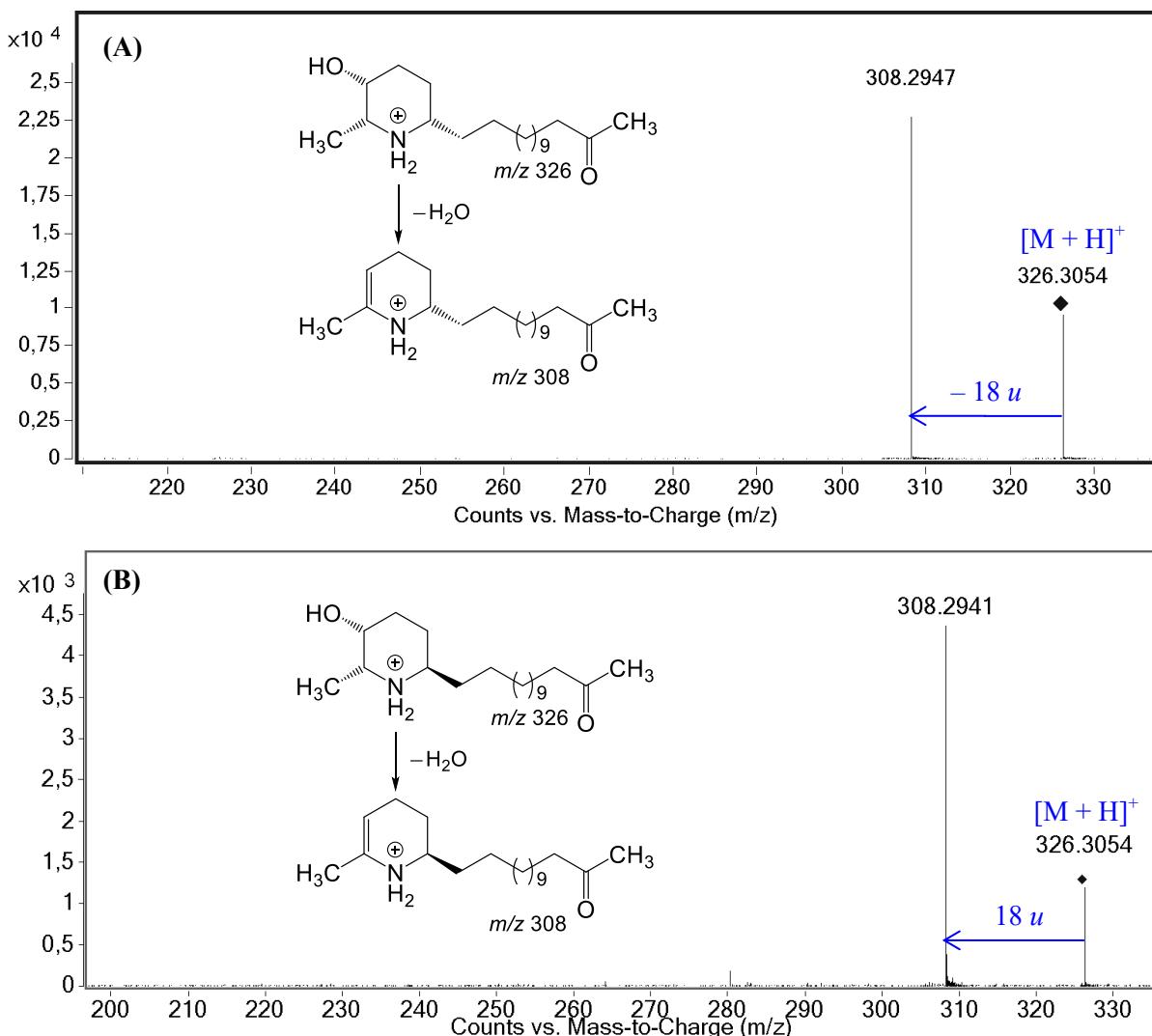
Figura 42. EM-IES-(+) em alta resolução dos alcaloides **24** (A) e **30** (B).



Fonte: a autora.

Quando o sinal referente à molécula protonada foi submetido à análise sequencial (EM/EM), foi observado o íon fragmento de m/z 308, que foi atribuído à eliminação neutra de água (18 u) (Figura 43).

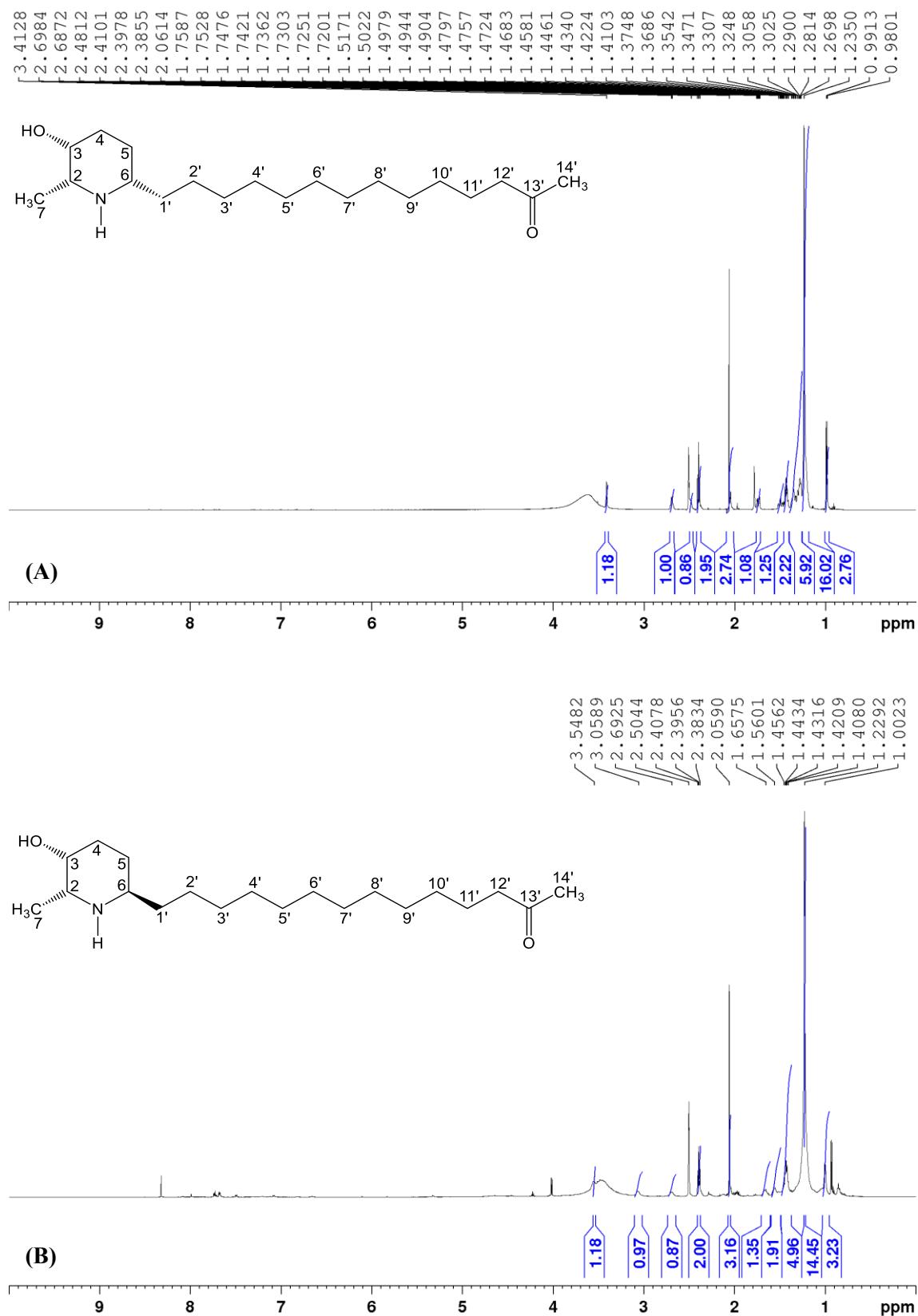
Figura 43. EM/EM-IES-(+) dos alcaloides **24** (A) e **30** (B).



Fonte: a autora.

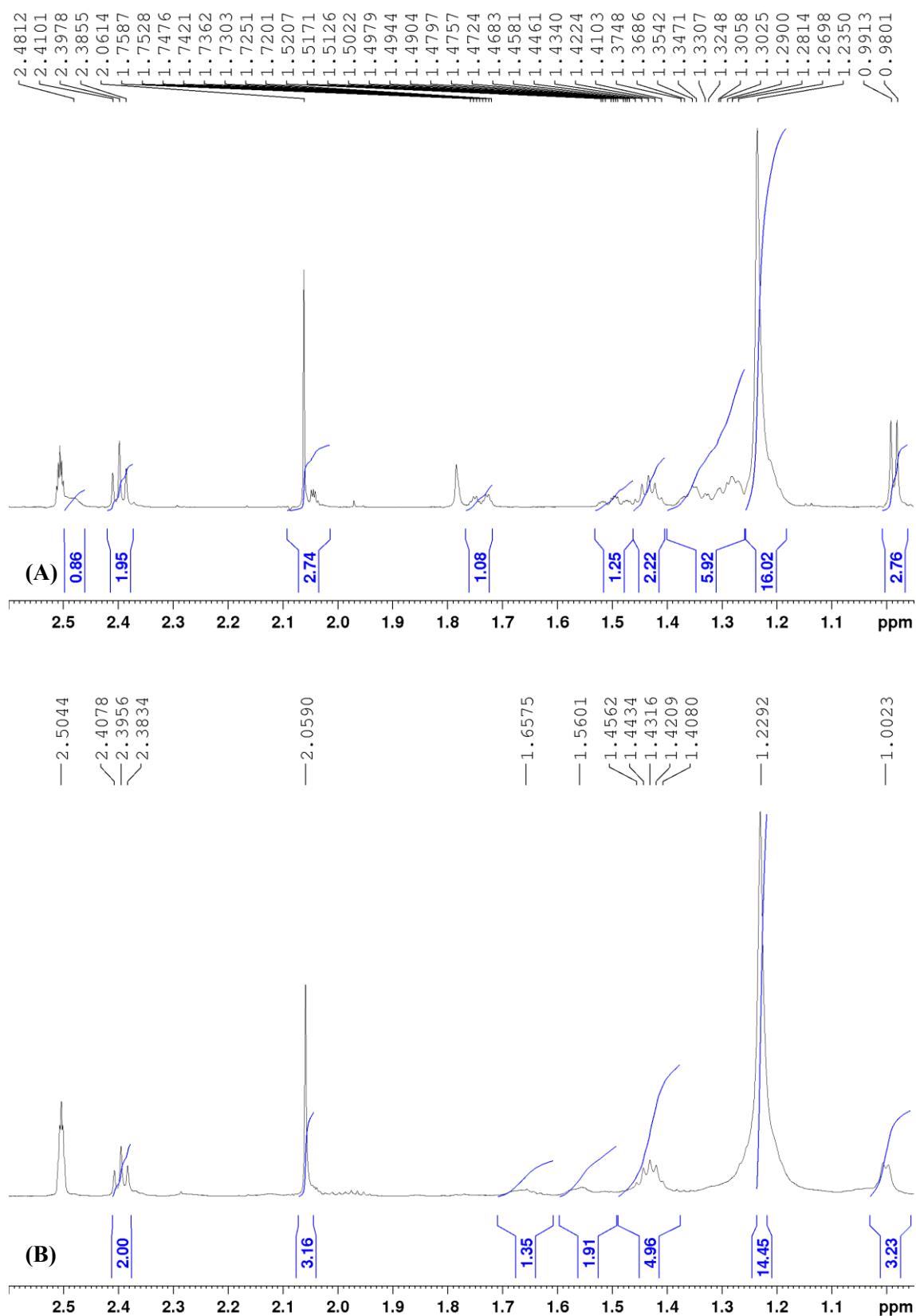
A análise dos espectros de RMN de ^1H dos alcaloides **24** e **30** (Tabela 4) (Figuras 44–46) permitiu observar a extremidade da cadeia lateral, funcionalizada pelo grupo metil-cetona e identificada pela presença dos sinais δ 2,39 (2H, t) e δ 2,06 (3H, s). Além disso, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **24** em δ 2,69 (1H, q, $J = 6,7$ Hz), δ 3,41 (1H, sl), δ 1,74 (1H, m), 1,48 (1H, m), 1,36 (2H, m), δ 2,48 (1H, m) e δ 0,99 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), e para **30** em δ 3,06 (1H, m), δ 3,55 (1H, m), δ 1,55 (1H, m), 1,43 (1H, m), 1,23 (2H, m), δ 2,69 (1H, m) e δ 1,00 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), relativos aos hidrogênios H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6 e H-7, respectivamente.

Figura 44. Espectro de RMN de ^1H dos alcaloides **24 (A)** e **30 (B)** (500 MHz, DMSO).



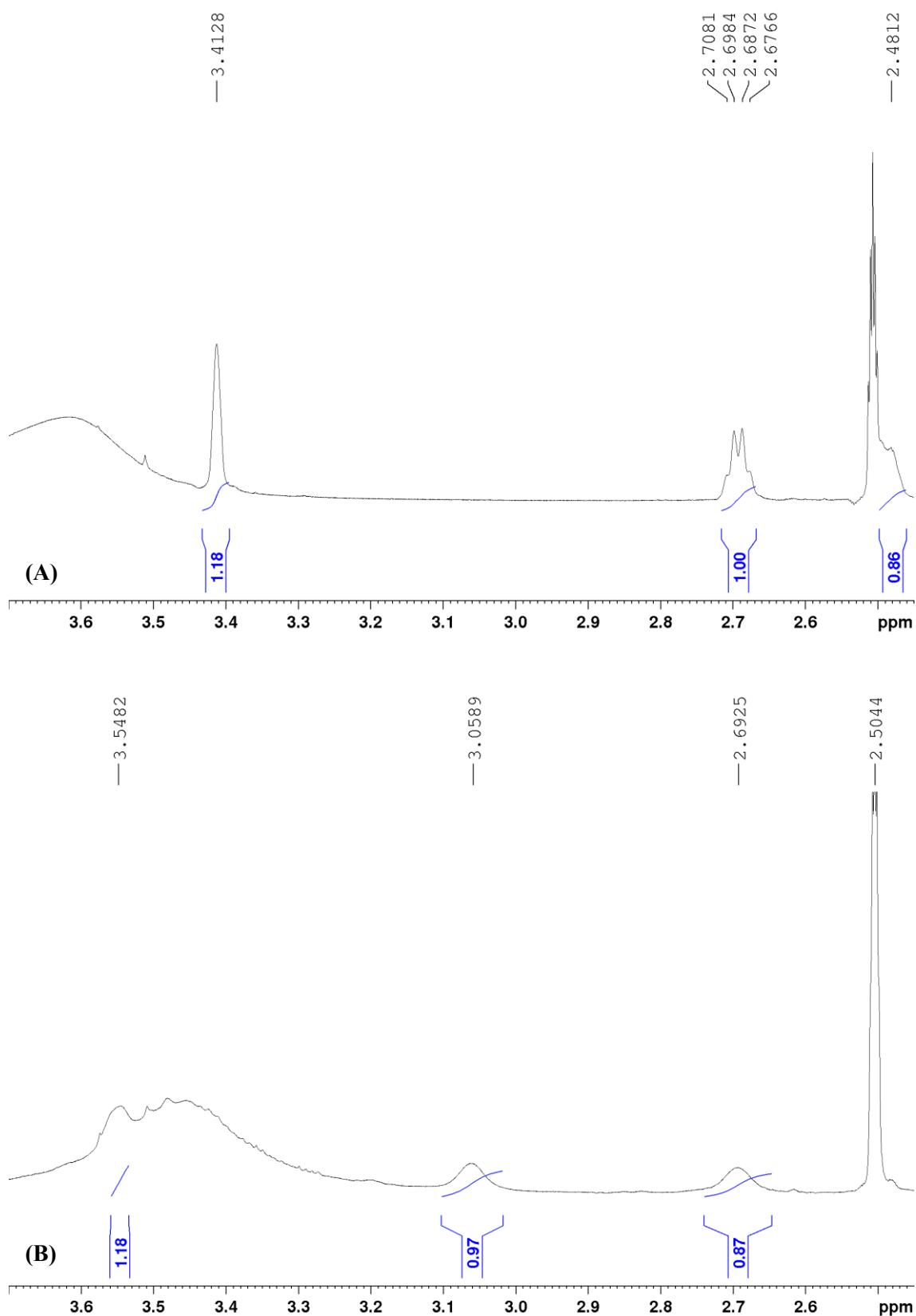
Fonte: a autora.

Figura 45. Ampliação do espectro 44 (δ 0,95–2,6) dos alcaloides **24** (A) e **30** (B).



Fonte: a autora.

Figura 46. Ampliação do espectro 44 (δ 2,45–3,7) dos alcaloides **24** (A) e **30** (B).



Fonte: a autora.

Tabela 4. Dados de RMN do alcaloide **24** e **30** em DMSO.

Posição	24		30	
	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b
2	2,69 q (6,7)	55,21 (CH)	3,06 m	51,44 (CH)
3	3,41 m	66,12 (CH)	3,55 m	68,21 (CH)
4	1,74 m 1,48 m	32,09 (CH ₂)	1,55 m 1,43 m	27,47 (CH ₂)
5	1,36 m	25,41 (CH ₂)	1,23 m	26,15 (CH ₂)
6	2,48 m	56,39 (CH)	2,69 m	48,76 (CH)
7	0,99 d (6,7) 1,36 m 1,28 m	18,39 (CH ₃) 36,22 (CH ₂)	1,00 d (6,7) 1,23 m	19,33 (CH ₃) (CH ₂)
2'	1,28 m	25,73 (CH ₂)	1,23 m	(CH ₂)
3'	1,23 m	29,66 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,61 ^c (CH ₂)
4'	1,23 m	29,52 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,48 ^c (CH ₂)
5'	1,23 m	29,49 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,45 ^c (CH ₂)
6'	1,23 m	29,45 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,38 ^c (CH ₂)
7'	1,23 m	29,40 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,32 ^c (CH ₂)
8'	1,23 m	29,38 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,18 ^c (CH ₂)
9'	1,23 m	29,32 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,16 ^c (CH ₂)
10'	1,23 m	29,01 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,02 ^c (CH ₂)
11'	1,43 qt	23,66 (CH ₂)	1,43	23,67
12'	2,40 t (7,4)	43,18 (CH ₂)	2,39 t (7,2)	43,25 (CH ₂)
13'	—	208,95 (C)	—	208,74 (C)
14'	2,06 s	30,12 (CH ₃)	2,06 s	30,20 (CH ₃)

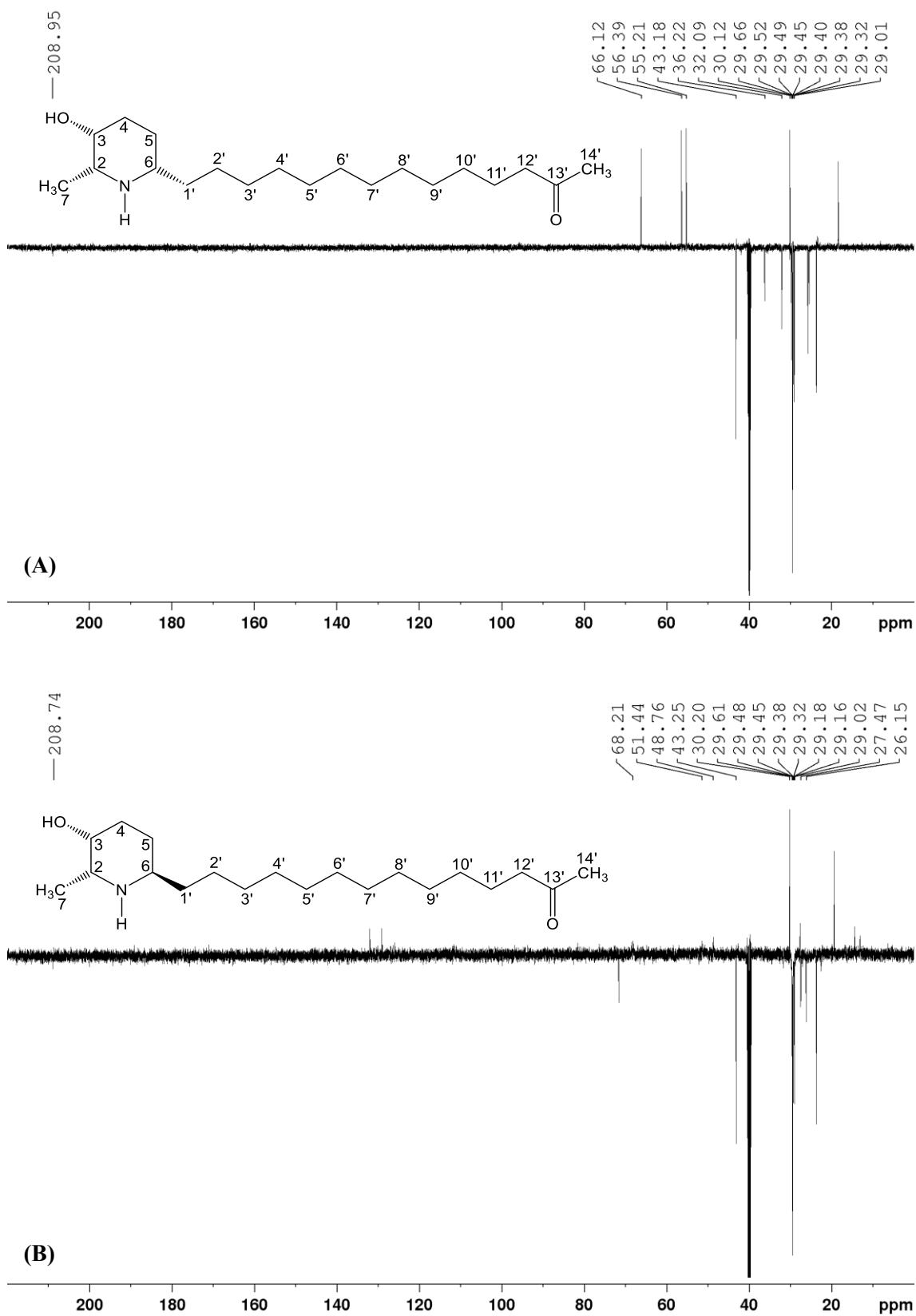
^aOs experimentos de RMN foram realizados a 600 e 150 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} 0,00$).

^bMultiplicidade: s (simpleto); d (dupliceto); t (triplete); q (quadruplete); qt (quintuplete); m (multiplete). ^cValor atribuído com base no deslocamento químico calculado (ChemDraw Ultra v. 12) e podem estar interconvertidos dentro da coluna.

Fonte: a autora.

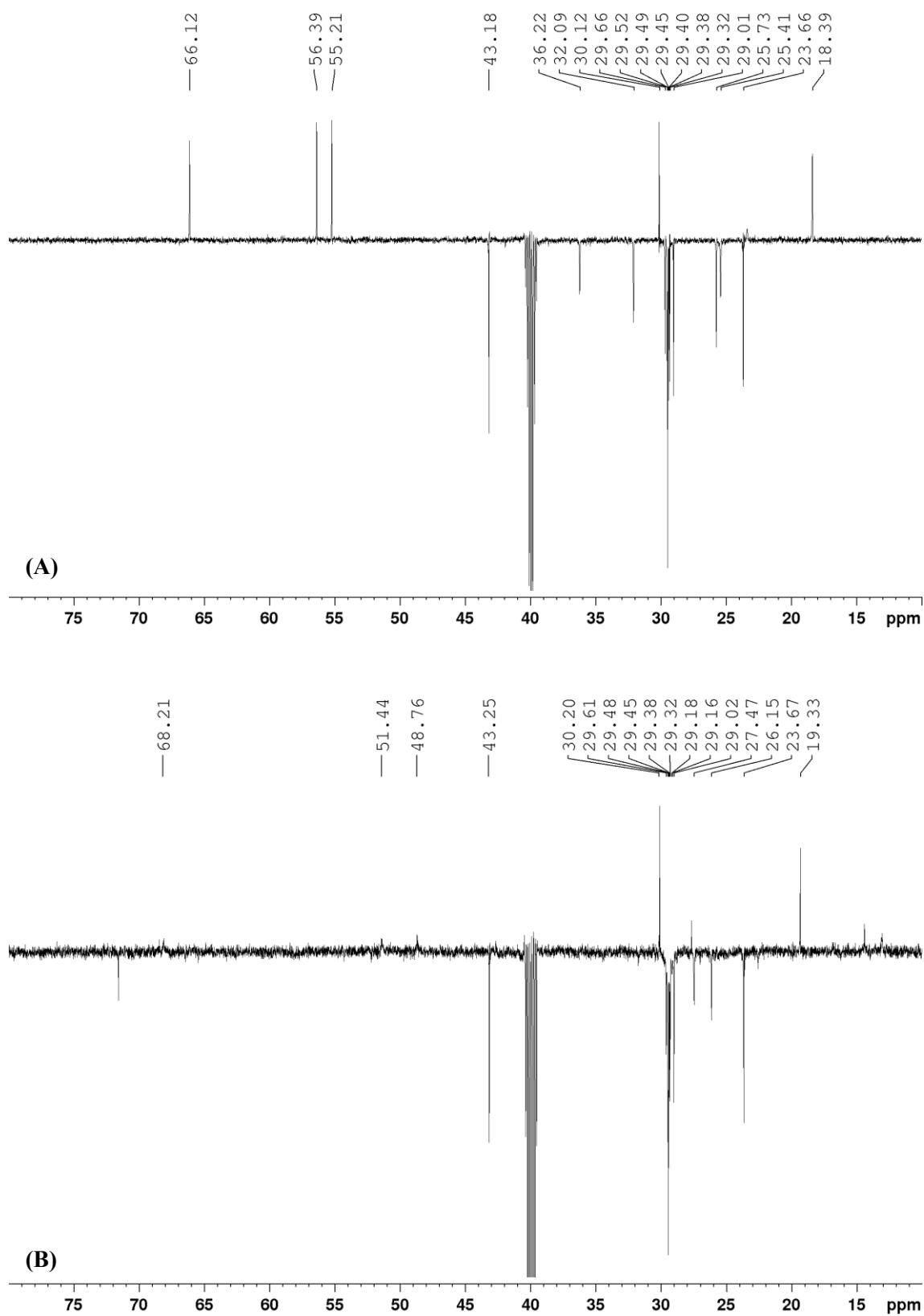
Já a análise do espectro de RMN de ^{13}C DEPTQ (Tabela 4) (Figuras 47–50) permitiu diferenciar os alcaloides **18/21** e **24/30** na região entre δ 29,01–29,66, sendo que em **24/30** são observados dois sinais adicionais referente aos carbonos metilênicos da cadeia lateral.

Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq dos alcaloides **24** (A) e **30** (B) (150 MHz, DMSO).



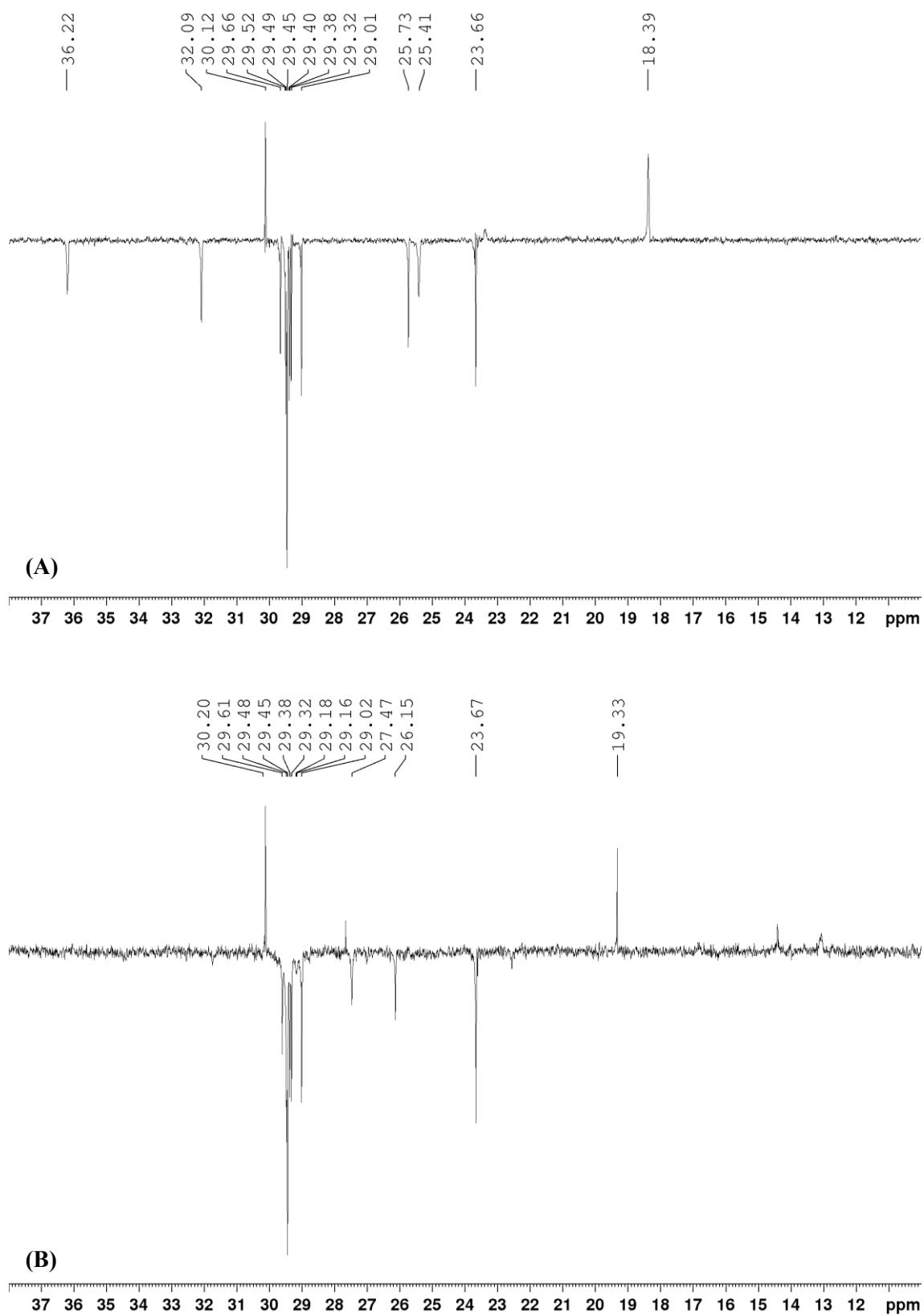
Fonte: a autora.

Figura 48. Ampliação do espectro 47 (δ 10,0–80,0) dos alcaloides **24** (A) e **30** (B).



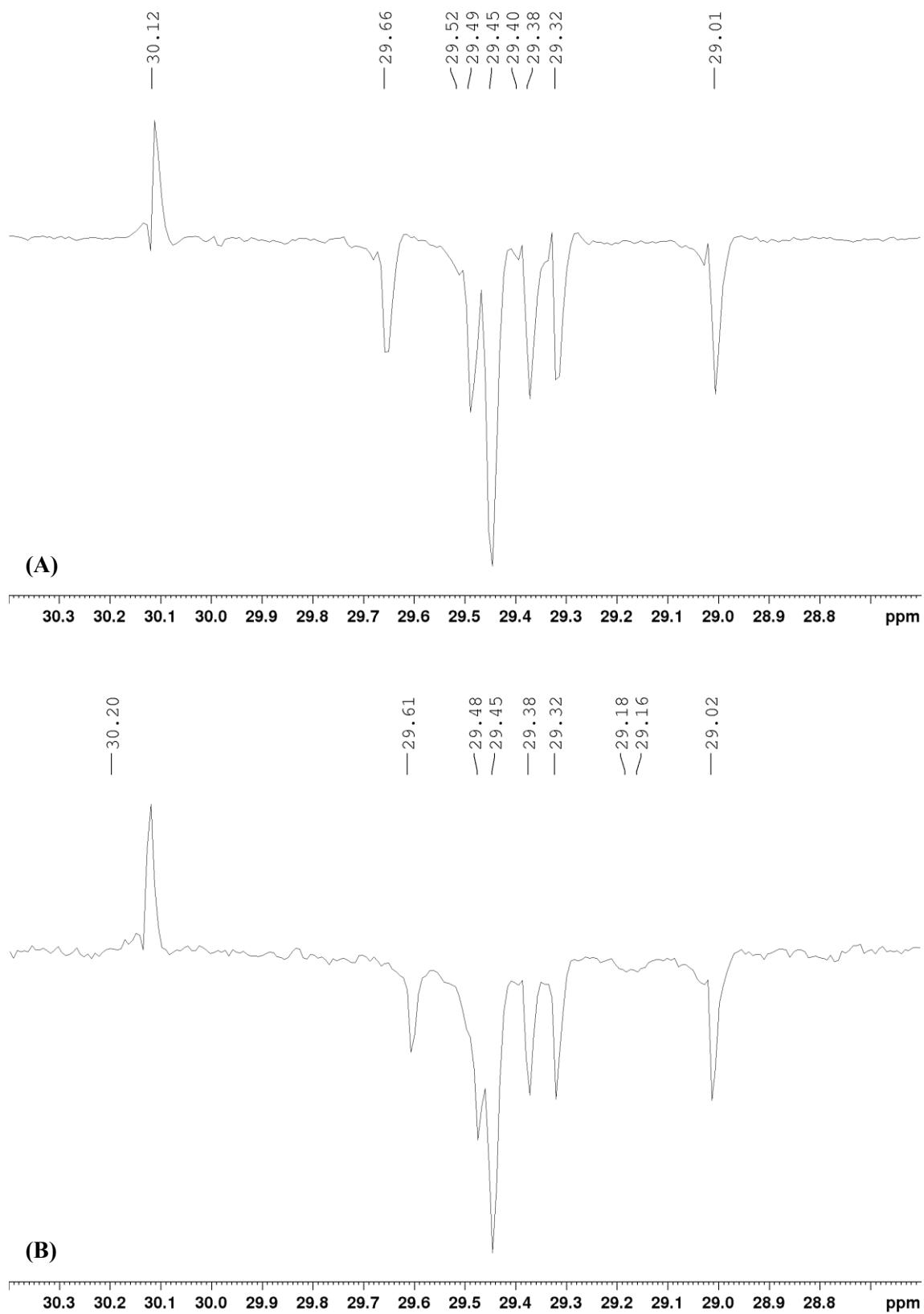
Fonte: a autora.

Figura 49. Ampliação do espectro 47 (δ 10,0–38,0) dos alcaloides **24** (A) e **30** (B).



Fonte: a autora.

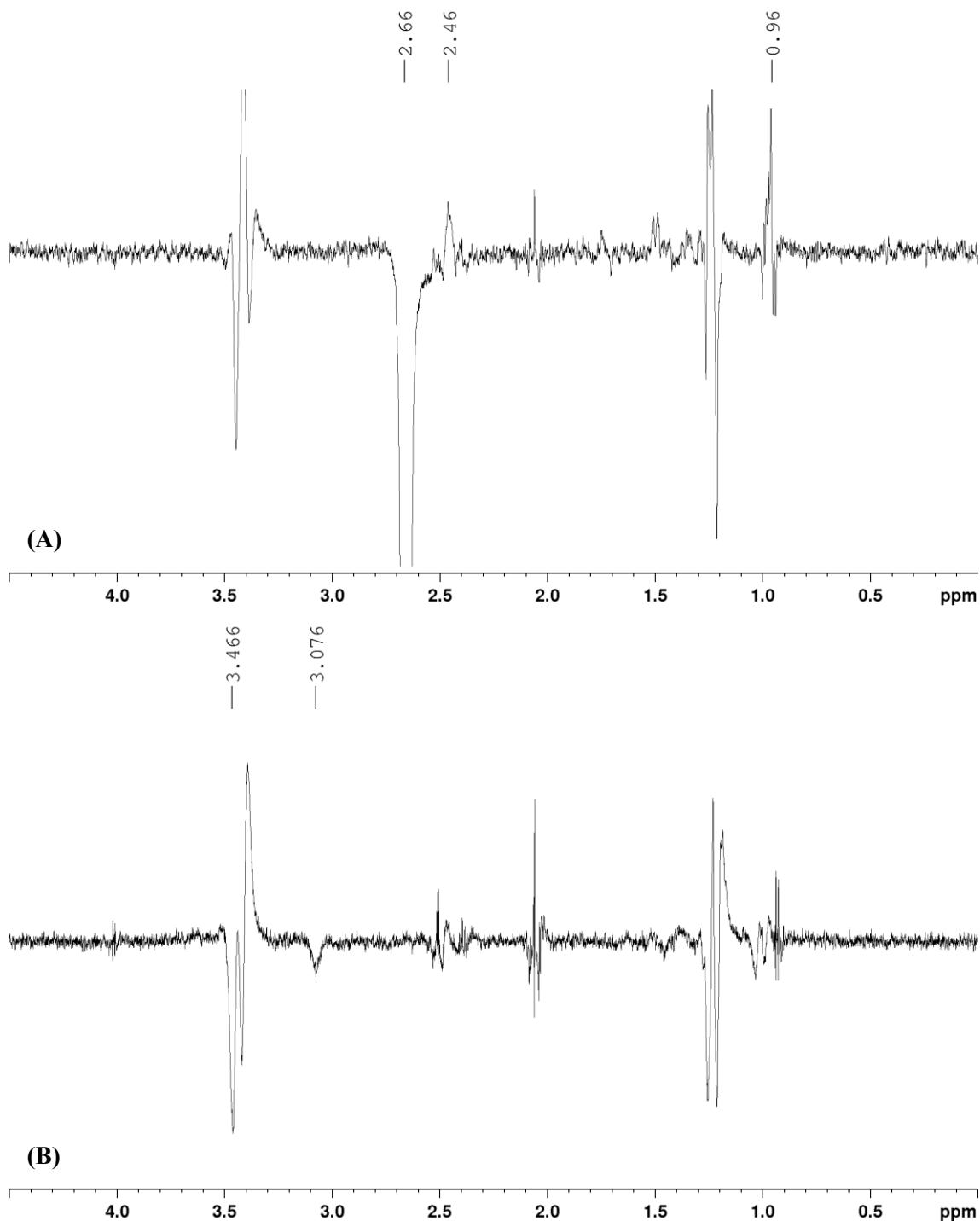
Figura 50. Ampliação do espectro 47 (δ 28,6–30,4) dos alcaloides **24** (A) e **30** (B).



Fonte: a autora.

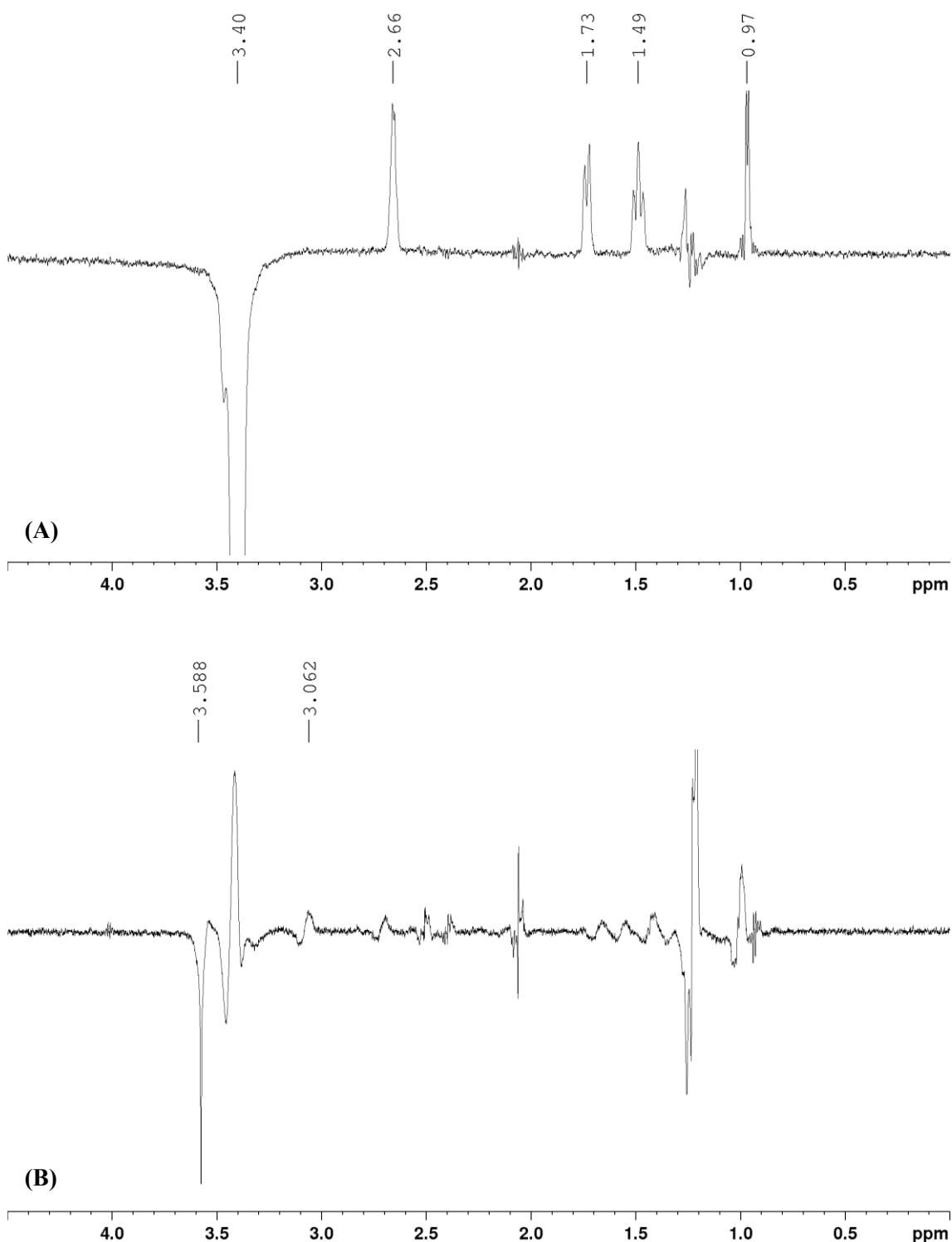
As configurações relativas dos centros estereogênicos presentes no núcleo piperidínico dos alcaloides **24** e **30** (Figuras 51–53), foram propostas com base nos experimentos de NOESY 1D, de onde foi possível observar a mesma estereoquímica relativa para os pares **18/24** e **21/30**.

Figura 51. Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H–2 dos alcaloides **24** (A) e **30** (B) (500 MHz, DMSO).



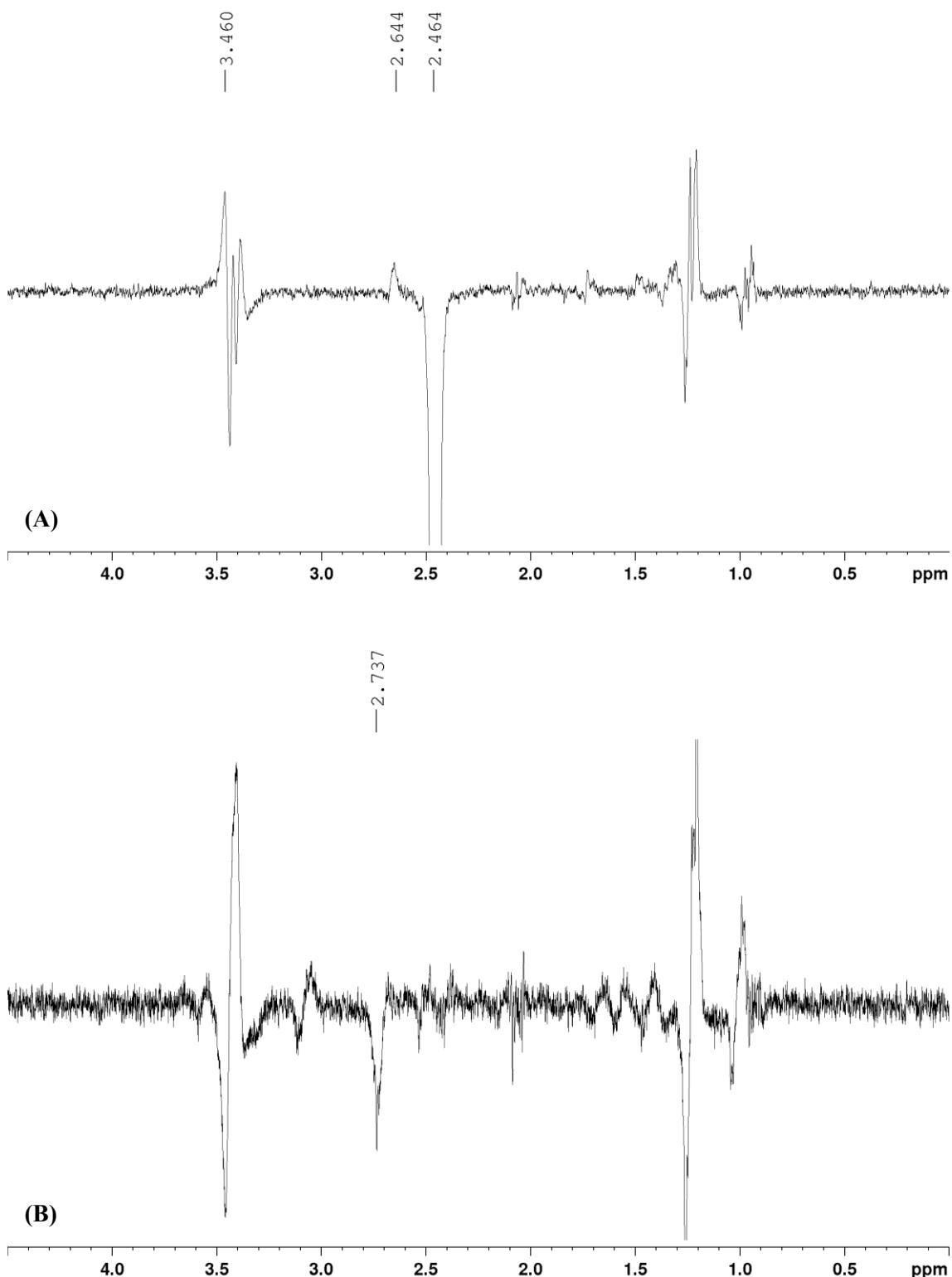
Fonte: a autora.

Figura 52. Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-3 dos alcaloides **24** (A) e **30** (B) (500 MHz, DMSO).



Fonte: a autora.

Figura 53. Espectro de RMN de NOESY 1D irradiando o H-6 dos alcaloides **24** (A) e **30** (B) (500 MHz, DMSO).



Fonte: a autora.

Dessa forma, foram possíveis o isolamento e a identificação estrutural dos quatro alcaloides piperidínicos quirais, incluindo os diastereômeros por meio da utilização das técnicas de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* em alta resolução e de RMN de ^1H e ^{13}C , principalmente, os experimentos de NOESY 1D, bem como da cromatografia líquida de alta eficiência. Embora tenha sido possível a determinação da configuração relativa dos centros estereogênicos do núcleo piperidínico, a configuração absoluta permaneceu indeterminada. Assim, no próximo capítulo será abordada a utilização do método de Mosher para a determinação da configuração absoluta desses compostos.

CAPÍTULO 2

Determinação da configuração absoluta dos alcaloides piperidínicos isolados das flores
de *Senna spectabilis*

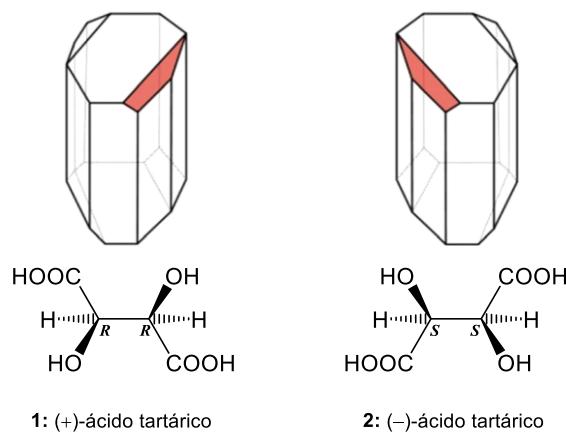
2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Quiralidade

A *International Union for Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (MOSS, 1996) considera quiralidade como a propriedade geométrica de um objeto rígido (ou arranjo espacial de pontos ou átomos) não ser superponível com sua imagem especular. Esse objeto ainda não pode apresentar elementos de simetria como plano de simetria, centro de inversão ou eixos de rotação-reflexão.

Historicamente, a descoberta da quiralidade foi atribuída a Louis Pasteur, químico e biólogo francês, quando observava cristais do ácido tartárico sob um microscópio. Ele percebeu que cada cristal tinha uma pequena faceta em uma de suas bordas, orientada às vezes para a direita e às vezes para a esquerda. Com o auxílio de uma lupa e pinça, ele conseguiu separar à mão pela primeira vez, em 1848, os dois enantiômeros do ácido tartárico (Figura 54). Essa foi a primeira resolução quiral artificial na história da ciência, no entanto, foi necessário cerca de um século para se consolidar a teoria de que a quiralidade desempenha um papel fundamental não apenas na vida das plantas e animais, mas também dos seres humanos, sendo de fundamental importância nas indústrias farmacêutica e agroquímica (NGUYEN et al., 2006; VANTOMME; CRASSOUS, 2021).

Figura 54. Cristais do ácido tartárico separados por Louis Pasteur em 1848.



Fonte: modificado de Vantomme e Crassous (2021).

O interesse em determinar a estereoquímica absoluta de um composto orgânico quiral deriva do fato de que a disposição dos substituintes em torno de um centro estereogênico freqüentemente determina propriedades importantes nos aspectos químicos, físicos, biológicos e farmacêuticos. A necessidade de obtenção de compostos enantiomericamente puros gera o crescimento e desenvolvimento de áreas como a síntese assimétrica, cromatografia quiral (técnicas de resolução) e técnicas de determinação da configuração absoluta dos centros estereogênicos em que os métodos sejam simples e confiáveis e se possível de baixo custo (SECO et al., 2004).

2.1.2 Configuração absoluta

Existem vários métodos instrumentais para a determinação da configuração absoluta. Os mais amplamente conhecidos são a cristalografia de raios-X, seguida dos métodos quiroópticos (por exemplo, dicroísmo circular (DC), dispersão rotatória óptica (DRO) ou rotação óptica específica); entretanto, seu uso não está isento de alguns inconvenientes e limitações relacionadas aos equipamentos, que são muito específicos para cada método, além de requerer treinamento especial para operação e preparo da amostra, como no caso da difração de raios X (DRX), que requer monocristais de boa qualidade (BATISTA et al., 2021). Outros métodos incluem rotação específica, infravermelho (IR), dicroísmo circular vibracional e atividade óptica vibracional Raman.

Recentemente, tem se difundido o uso da espectroscopia de RMN como uma alternativa eficiente para resolver o problema da determinação da configuração absoluta, existindo duas abordagens gerais na análise da configuração absoluta por RMN. A primeira envolve aqueles procedimentos onde a derivatização do substrato cuja configuração absoluta é desconhecida não é necessária. A amostra (o enantiômero puro) é analisada por RMN em um ambiente quiral que é fornecido por um solvente quiral ou pela adição de um reagente de solvatação quiral (RSQ) a um solvente padrão não quiral. Nesta abordagem, não há ligação covalente entre a amostra e o “reagente” quiral, e essa vantagem é a origem de sua principal limitação: o ambiente quiral produz diferenças muito pequenas nos deslocamentos químicos para os dois enantiômeros, gerando espectros de RMN muito semelhantes; muitas vezes, os dois enantiômeros devem estar disponíveis para comparação e nenhuma correlação clara entre a configuração absoluta e os espectros de RMN pode ser estabelecida. Por essas razões, a utilidade deste método é

praticamente restrita à determinação da pureza enantiomérica (SECO et al., 2004; BARREIROS et al., 2005; SECO et al., 2015).

A segunda abordagem envolve a derivatização do substrato (o enantiômero puro) com os dois enantiômeros de um reagente de derivatização quiral (RDQ), produzindo dois derivados diastereoméricos. Nesse caso, o ambiente quiral é fornecido pelo reagente auxiliar que foi conectado ao substrato através de ligação covalente, o que leva a diferenças mais significativas nos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C , do que aquelas obtidas quando RSQs são usados. Embora, em certos casos, uma combinação das duas abordagens possa ser usada, a derivatização com RDQs é, de longe, o método preferido para a atribuição da configuração absoluta por RMN (SECO et al., 2004; BARREIROS et al., 2005; SECO et al., 2015).

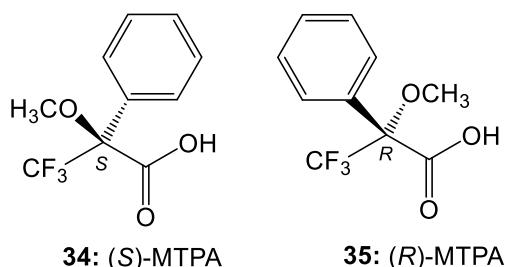
Muitos esforços para desenvolver RDQs que são úteis para atribuir a configuração absoluta de diferentes substratos têm sido descritos na literatura científica, no entanto, desde sua implementação em 1973, o mais conhecido é o "método de Mosher", que usa o ácido metoxitrifluorifenilacético (MTPA) como o reagente. Seu uso tem sido um dos mais bem sucedidos, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos reagentes até mais eficientes e específicos para diferentes substratos, porém, baseados no mesmo princípio (SECO et al., 2004; BARREIROS et al., 2005; SECO et al., 2015).

2.1.2.1 Método de Mosher

O ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético (MTPA) (Figura 55) tem sido o reagente de derivatização mais comumente usado para a determinação da configuração absoluta de álcoois secundários por RMN desde o primeiro relato por Mosher e colaboradores em 1973. Esse método ficou conhecido como “análise dos ésteres de Mosher”, já que a conjugação dos carbinóis com MTPA produz os ésteres correspondentes. Embora Mosher tenha usado originalmente a espectroscopia de RMN de ^{19}F , em particular os deslocamentos químicos dos grupos CF_3 , para a atribuição da configuração absoluta, em estudos posteriores foram utilizados RMN de ^1H e ^{13}C , e os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e de carbono do álcool quiral, respectivamente. O método de Mosher baseia-se no fato de que os hidrogênios nos ésteres de MTPA diastereoméricos exibem diferentes deslocamentos químicos (δ) em seus espectros de RMN de ^1H . Um protocolo típico de análise de éster de Mosher consiste no seguinte: (i) preparação de cada um dos ésteres diastereoméricos (*S*)-MTPA (**34**) e

(*R*)-MTPA (**35**) e (ii) análise comparativa ($\Delta\delta^{S,R}$) dos dados do espectro RMN de ^1H desses dois ésteres (CALCATELLA et al., 2018).

Figura 55. Ácidos (*S*)-MTPA (**34**) e (*R*)-MTPA (**35**).

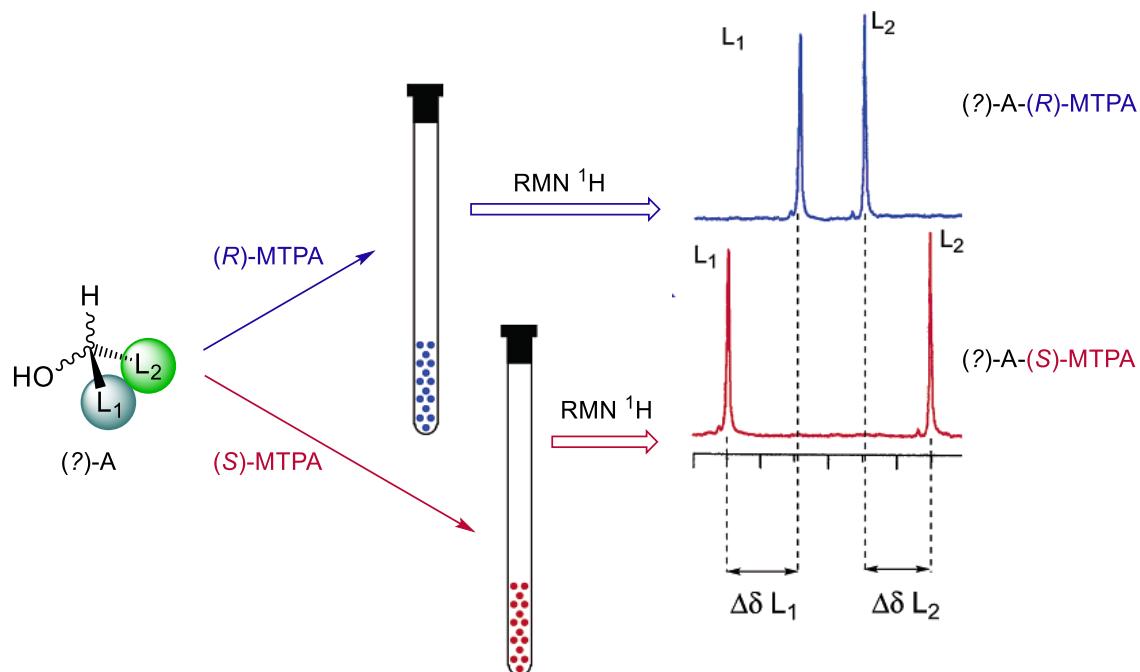


Fonte: a autora.

A determinação da configuração absoluta *R/S* no centro estereogênico do álcool é feita através da correlação entre esse centro e o carbono assimétrico do RDQ de configuração absoluta conhecida, de acordo com o efeito anisotrópico de proteção e/ou desproteção que o grupo aromático do reagente auxiliar produzirá nos substituintes L_1 e L_2 do álcool. Para isso, são consideradas as mudanças nos deslocamentos químicos dos substituintes do carbono assimétrico do álcool (L_1 e L_2) nos dois diastereômeros. Essas diferenças nos deslocamentos químicos são representadas por $\Delta\delta$, e é o sinal desse parâmetro (+ ou -) que fornece informações sobre a configuração (Figura 56) (SECO et al., 2004; BARREIROS et al., 2005; SECO et al., 2015).

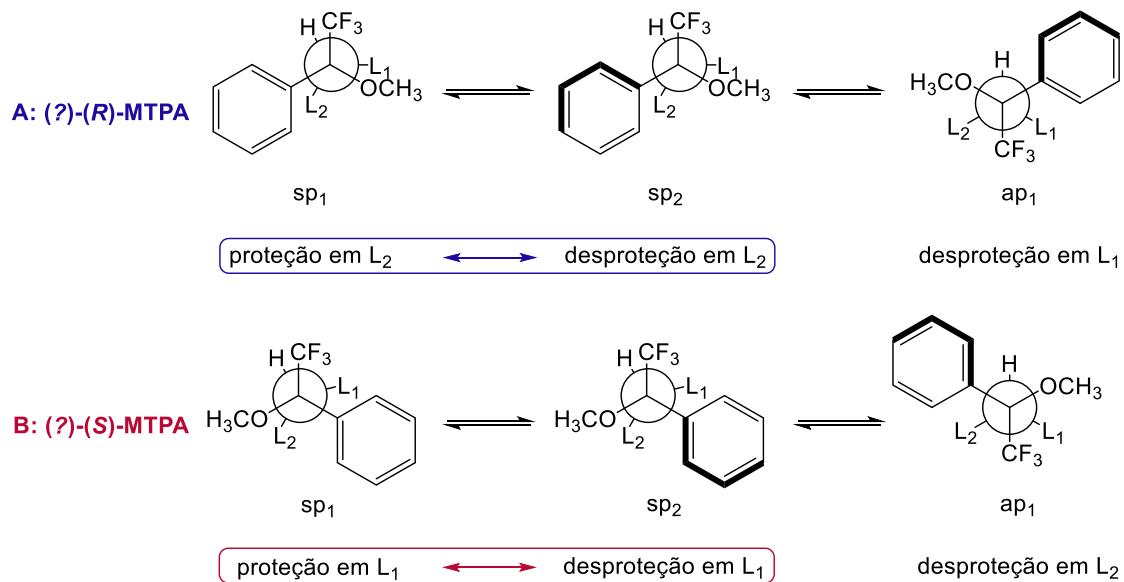
Naturalmente, a chave para o sucesso desse método está na atribuição de que um determinado confôrmero é mais representativo em ambos os enantiômeros (*R*- e *S*-MTPA) e que permanece assim quando diferentes substratos são derivatizados. Em solução, os diastereômeros existem em equilíbrio conformacional (Figura 57). Este equilíbrio é muitas vezes complexo, no entanto, o balanço final tem uma influência substancial na capacidade do grupo anisotrópico (anel aromático) de proteger/desproteger os substituintes L_1/L_2 seletivamente. As quantidades relativas de cada confôrmero e a força do efeito anisotrópico do anel aromático será refletida (em média) no deslocamento químico do RMN resultante. Portanto, para correlacionar as informações obtidas dos espectros de RMN (os valores $\Delta\delta$) com a configuração absoluta, a compreensão detalhada dos principais confôrmeros, assim como a força e a direção do efeito anisotrópico do anel em L_1 e L_2 em cada conformação é necessário (SECO et al., 2004; BARREIROS et al., 2005; SECO et al., 2015).

Figura 56. Dupla derivatização de um álcool com os enantiômeros do reagente auxiliar (*R*)- e (*S*)-MTPA.



Fonte: modificado de Seco, Quiñoa e Riguera (2004).

Figura 57. Efeitos de proteção/desproteção nos três confôrmeros mais representativos dos ésteres de MTPA.



Fonte: adaptada de Barreiros e David (2005).

Os ésteres de MTPA, de acordo com cálculos semiempíricos, são constituídos de três confôrmeros principais (sp₁, sp₂ e ap₁) de baixa energia em equilíbrio e com quantidades similares, independentes da estrutura do álcool, que são gerados pelas

rotações em torno das ligações $C_\alpha-C=O$ e $C_\alpha-Ph$. Em alguns confôrmeros o anel aromático produz proteção e em outros, desproteção (Figura 61). Assim, nos ésteres de (*R*)-MTPA o grupo L_1 está localizado na região de desproteção do anel aromático no confôrmero ap_1 , e não é afetado nos confôrmeros sp_1 e sp_2 . No entanto, o grupo L_2 está localizado na região de proteção do anel aromático no confôrmero sp_1 e na região de desproteção do confôrmero sp_2 , não sendo afetado no confôrmero ap_1 (Figura 57A). Nos ésteres de (*S*)-MTPA o substituinte L_1 está localizado na área de proteção do anel aromático no confôrmero sp_1 e na região de desproteção no confôrmero sp_2 , não sendo afetado no confôrmero ap_1 . Enquanto que, neste derivado, o substituinte L_2 está na região de desproteção do anel aromático no confôrmero ap_1 , não sendo afetado nos confôrmeros sp_1 e sp_2 , respectivamente (Figura 57B). Neste caso, os efeitos anisotrópicos de proteção e desproteção do anel aromático nos confôrmeros sp_1 e sp_2 são cancelados mutuamente. Portanto, o efeito mais acentuado no espectro de RMN de 1H será aquele do confôrmero ap_1 , que é de desproteção. Os valores de $\Delta\delta^{R,S}$ são calculados de acordo com as fórmulas: $\Delta\delta^{R,S} L_1 = (\delta^R L_1 - \delta^S L_1)$ e $\Delta\delta^{R,S} L_2 = (\delta^R L_2 - \delta^S L_2)$. Tendo em vista que nos ésteres de MTPA o confôrmero ap_1 é protagonista, o substituinte L_1 é mais desprotegido nos ésteres do derivado (*R*)-MTPA, significando que $\Delta\delta^{R,S} L_1 > 0$, enquanto que o substituinte L_2 é mais desprotegido nos ésteres do derivado (*S*)-MTPA, de modo que $\Delta\delta^{R,S} L_2 < 0$ (Figura 58A). Se a configuração do álcool fosse oposta, então os sinais de $\Delta\delta^{R,S} L_1$ e $\Delta\delta^{R,S} L_2$ também seriam opostas (Figura 58B) (SECO et al., 2004).

Figura 58. Modelo proposto por Mosher para atribuição da configuração absoluta por RMN de 1H .



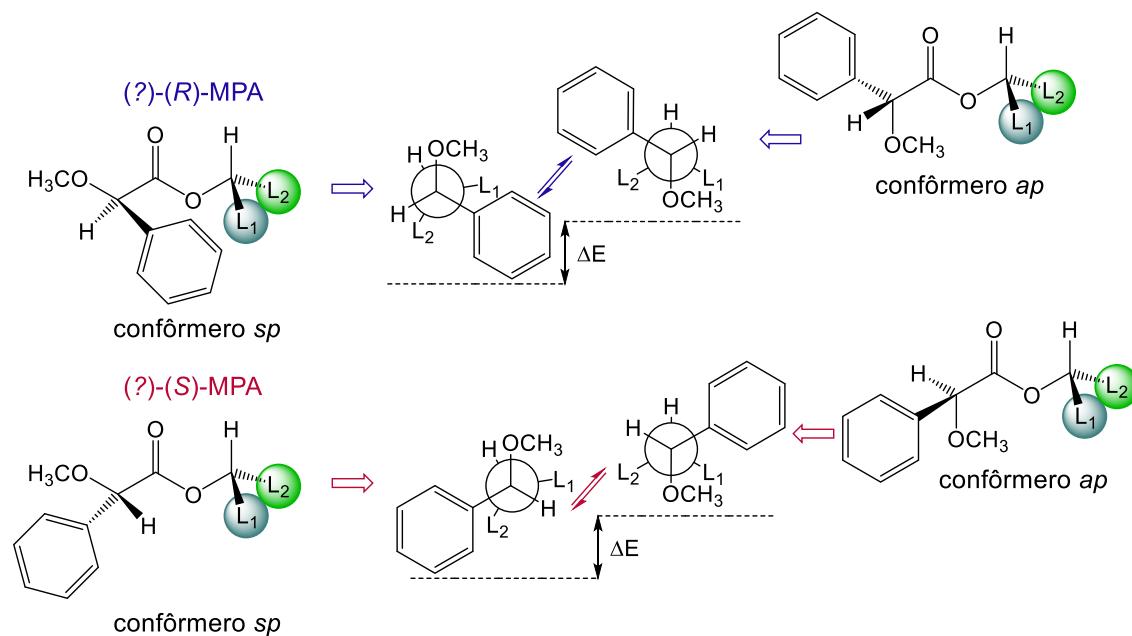
Fonte: modificado de Seco, Quiñoa e Riguera (2004).

A liberdade conformacional dos derivados de MTPA (três confôrmeros: sp_1 , sp_2 e ap_1), que simultaneamente causam efeitos de proteção/desproteção no mesmo substituinte, podem representar uma limitação para a utilização do método, sendo que com frequência são observados pequenos valores de $\Delta\delta^{R,S}$ que são de pouca utilidade para a atribuição de configuração absoluta (SECO et al., 2004; BARREIROS et al., 2005).

Ao mesmo tempo, a flexibilidade conformacional dos ésteres de MTPA e o efeito anisotrópico podem provocar pequenas mudanças estruturais ou experimentais (por exemplo, solvente ou temperatura) para alterar o equilíbrio entre os confôrmeros, fazendo com que os deslocamentos químicos de $\Delta\delta^{R,S}$ sigam padrões diferentes daqueles previstos pelo modelo original de Mosher (SECO et al., 2004).

Uma das alternativas para as limitações relacionadas ao reagente MTPA é o uso de outros RDQs, como o ácido α -metoxi- α -fenilacético (MPA), em que os ésteres apresentam um número de confôrmeros mais restrito com apenas dois confôrmeros (*sp/ap*) e uma preferência mais clara por um desses (*sp*), que, por sua vez, exerce um efeito anisotrópico de proteção nos substituintes (L_1 e L_2) resultando em valores de $\Delta\delta^{R,S}$ mais significativos e mais confiáveis (Figura 59) (SECO et al., 2004).

Figura 59. Equilíbrios conformacionais nos ésteres MPA.

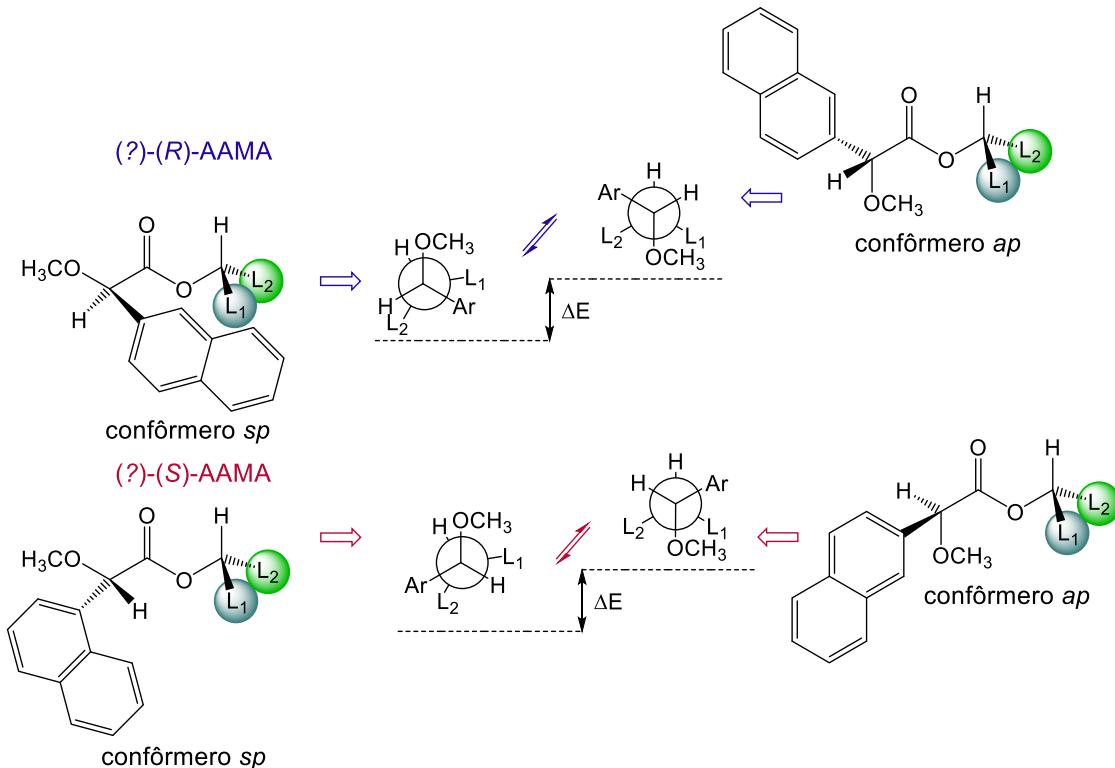


Fonte: modificado de Seco, Quiñoa e Riguera (2004).

Estudos foram realizados para verificar se a substituição da fenila por outros sistemas arílicos maiores seriam capazes de produzir um efeito de proteção mais intenso sobre os substituintes (L_1 e L_2). Os resultados descritos por Seco e colaboradores (2004), mostram que os ácidos arilmETOxiacéticos (AAMAs), que contêm substituintes naftila (Figura 60) ou antracila, causam efeito de proteção mais efetivo que o MPA e por consequência permite observar um deslocamento químico mais nítido e um $\Delta\delta^{R,S}$ mais pronunciado. Essa movimentação do deslocamento químico de forma mais pronunciada,

resulta da combinação do intenso efeito do campo magnético do sistema aromático do naftaleno ou antraceno e da maior rigidez conformacional, deixando o anel numa orientação que afeta os substituintes L_1 e L_2 de forma mais efetiva (SECO et al., 2004).

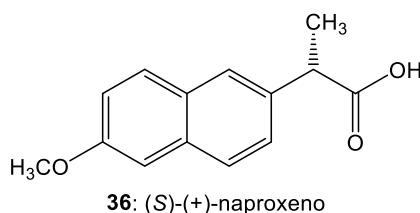
Figura 60. Principais confôrmeros gerados pela rotação do C_α -Ar nos AAMAs.



Fonte: Seco, Quiñoa e Riguera (2004).

Uma alternativa economicamente viável para os laboratórios que não tenham nos seus almoxarifados os RDQs é a utilização do (S) - $(+)$ -naproxeno (**36**) (Figura 61), um antiinflamatório não esteroidal (AINE) comercializado na sua forma enantiomericamente pura. Esse fármaco vem sendo aplicado como RDQ por ser relativamente barato em comparação com outros comercialmente disponíveis e de estrutura semelhante à do 1-NMA (BŁAŻEWSKA e GAJDA, 2002).

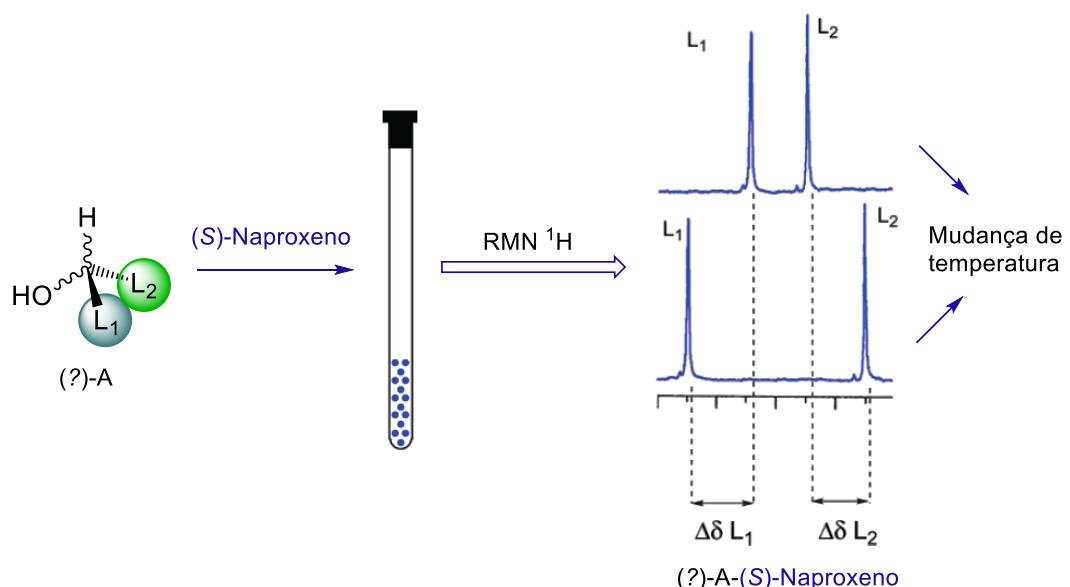
Figura 61. (S) - $(+)$ -Naproxeno.



Fonte: a autora.

Nessa situação, de simples derivatização, o álcool de configuração absoluta desconhecida ((?)-A) pode ser submetido a reação com apenas um dos enantiômeros do RDQ (*R* ou *S*). O espectro de RMN de ^1H do diastereômero formado é obtido à temperatura ambiente (T_1) e, em seguida a temperatura (T_2) mais baixa, onde a população do confôrmero mais estável é preferencial (Figura 62). O parâmetro para cálculo da diferença de $\Delta\delta^{T_1, T_2}$ é definido como o valor de deslocamento químico para o hidrogênio do substituinte L_1 no derivado à temperatura ambiente T_1 subtraindo-se o valor do deslocamento químico do mesmo hidrogênio deste derivado a baixas temperaturas T_2 , conforme a equação: $\Delta\delta^{T_1, T_2} L_1 = \delta^{T_1} L_1 - \delta^{T_2} L_1$ e $\Delta\delta^{T_1, T_2} L_2 = \delta^{T_1} L_2 - \delta^{T_2} L_2$. O estabelecimento da configuração *R/S* é idêntica ao de álcoois na dupla derivatização (SECO et al., 2004; BARREIROS et al., 2005).

Figura 62. Simples derivatização de um álcool com o enantiômero do reagente auxiliar (*S*)-(+)-naproxeno em diferentes temperaturas.



Fonte: modificado de Seco, Quiñoa e Riguera (2004).

Nesse sentido, as metodologias utilizadas para atribuir a configuração absoluta de moléculas quirais evoluíram consideravelmente e tornaram-se uma das etapas indispensáveis para a caracterização estrutural completa de produtos naturais, incluindo o arranjo espacial dos átomos, visto que a determinação inequívoca da configuração absoluta (CA) fornece informações cruciais para ensaios biológicos e investigações de vias biossintéticas (BATISTA et al., 2001).

2.2 OBJETIVOS

Determinar a configuração absoluta dos alcaloides piperidínicos isolados das flores de *Senna spectabilis* utilizando o método de Mosher.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Solventes

- Clorofórmio (CHCl₃): Synth P.A. ACS
- DMSO-*d*₄: (Cambridge Laboratories)

2.3.2 Reagentes

- Ácido clorídrico (HCl) 37% (Vetec, CAS: 7647-01-0)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 98% (Vetec, CAS: 7664-93-9)
- Ácido (R)-(+)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético 99% ((R)-MTPA) (Sigma Aldrich, CAS: 20445-31-2)
- Ácido (S)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético 99% ((S)-MTPA) (Sigma Aldrich, CAS: 17257-71-5)
- Carbonato de sódio (Synth, CAS: 497-19-8)
- Dimetilaminopiridina (DMAP) 98% (Sigma Aldrich, CAS: 1122-58-3)
- Naproxeno Sódico® 550 mg (Neo Química)
- Hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (do inglês *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC) 99% (Sigma Aldrich, CAS: 1892-57-5)

2.3.3 Técnicas espectroscópicas

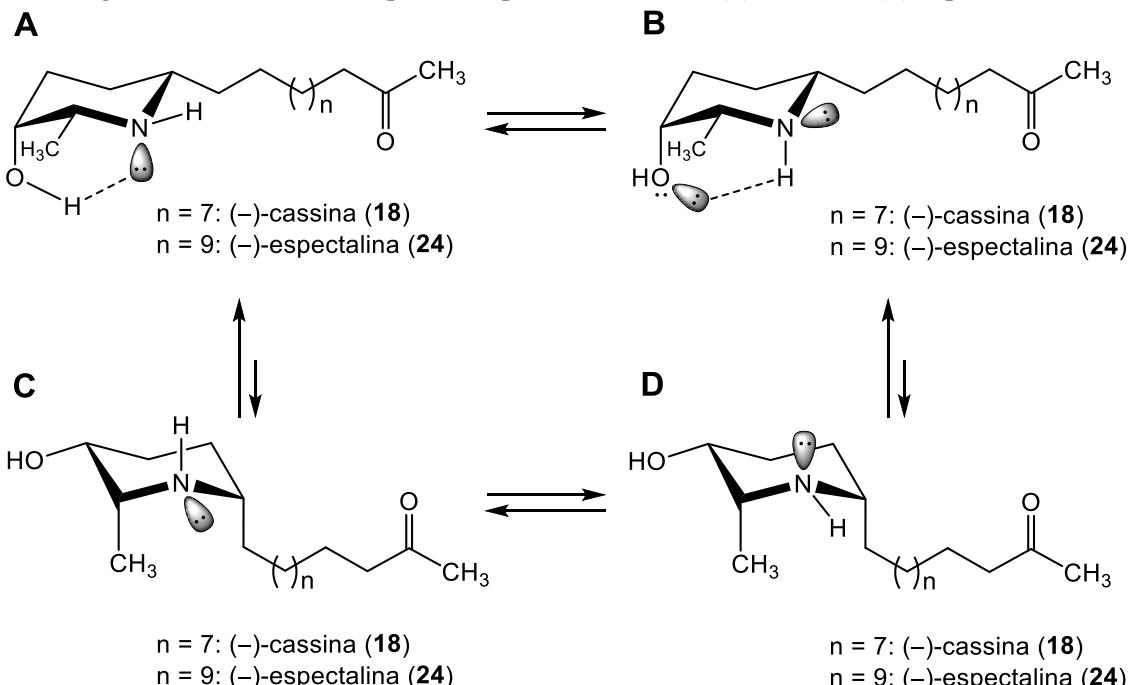
As análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC e NOESY 1D dos alcaloides piperidínicos foram realizadas em espectrômetro Brucker Avance III HD com campo de 14,1 T e criossonda TCI (Triple Channel Inverse) de 5 mm. Todas as amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆, Sigma-Aldrich®). Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando o solvente residual como padrão interno. Essas análises foram realizadas no instituto de química da universidade estadual paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) no campus de Araraquara.

2.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A metodologia utilizada para síntese dos ésteres de Mosher foi adaptada a partir das reações realizadas por Kusumi e Ohtani (1999) e Freitas e colaboradores (2018).

Inicialmente, foi proposta a transformação dos alcaloides piperidínicos em cloridratos para evitar que a reação ocorresse no nitrogênio do anel piperidínico e sim na hidroxila do C-3. A análise detalhada dos confôrmeros dos alcaloides *(–)-cassina* (**18**) e *(–)-espectralina* (**24**) (Figura 63) permite observar que o confôrmero **B** pode fazer uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o par de elétrons da hidroxila do anel piperidínico com o hidrogênio ligado ao nitrogênio, o que pode contribuir para a baixa reatividade da hidroxila. 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 estiver livre (base livre) ou não estiver comprometido nas ligações intramoleculares, representado pelos confôrmeros **B**, **C** e **D** (Figura 63). Para contornar esse problema a esterificação foi realizada a partir dos cloridratos dos alcaloides **18** e **24**, o que deixa a hidroxila como principal nucleófilo.

Figura 63. Conformações possíveis para os alcaloides *(–)-cassina* e *(–)-espectralina*.



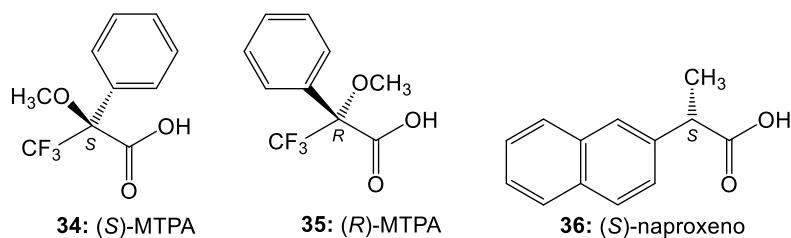
Fonte: a autora.

Em seguida, para determinar a configuração absoluta dos alcaloides piperidínicos, foi utilizado o método desenvolvido por Mosher em 1973 pela possibilidade de trabalhar com pequenas quantidades de amostra e por ser eficiente para álcoois primários e secundários, aminas primárias e secundárias e para ácidos carboxílicos. A técnica utiliza reagentes quirais opticamente puros que possuem em suas estruturas químicas substituintes aromáticos capazes de afetar, do ponto de vista de efeitos anisotrópicos, os grupos (hidrogênio e carbono) do substrato vizinhos ao centro estereogênico, que se pretende determinar a configuração absoluta. Essas interações podem ocorrer na forma de proteção/desproteção, que pode ser observada nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , obtidos experimentalmente sob mesmas condições de análise, dos ésteres de Mosher preparados.

2.4.1 Derivatização com reagente de derivatização quiral

Os ésteres de Mosher foram preparados a partir do cloridrato de (–)-cassina (**18a**) e do cloridrato de (–)-espectralina (**24a**) com os seguintes reagentes de derivatização quiral: ácidos (–)-(S)-MTPA (**34**) e (+)-(R)-MTPA (**35**) e também com o (+)-(S)-naproxeno (**36**) (Figura 64), que foi obtido a partir do fármaco Naproxeno Sódico®, comercializado na forma enantiomericamente pura.

Figura 64. Reagentes de derivatização quiral utilizados no preparo dos ésteres de Mosher.



Fonte: a autora.

2.4.1.1 Preparo dos cloridratos

Os cloridratos **18a** e **24a** foram preparados por adição de $\text{HCl}_{(\text{g})}$, gerado pelo gotejamento de $\text{H}_2\text{SO}_4_{(\text{l})}$ (20 mL) sobre $\text{HCl}_{(\text{l})}$ (20 mL) a temperatura ambiente, utilizando um sistema de Kipp modificado (Figura 65), onde os vapores do gás formado foram borbulhados em 5 mL de CHCl_3 contendo a amostra do alcaloide.

Figura 65. Sistema de Kipp modificado para preparação dos cloridratos.

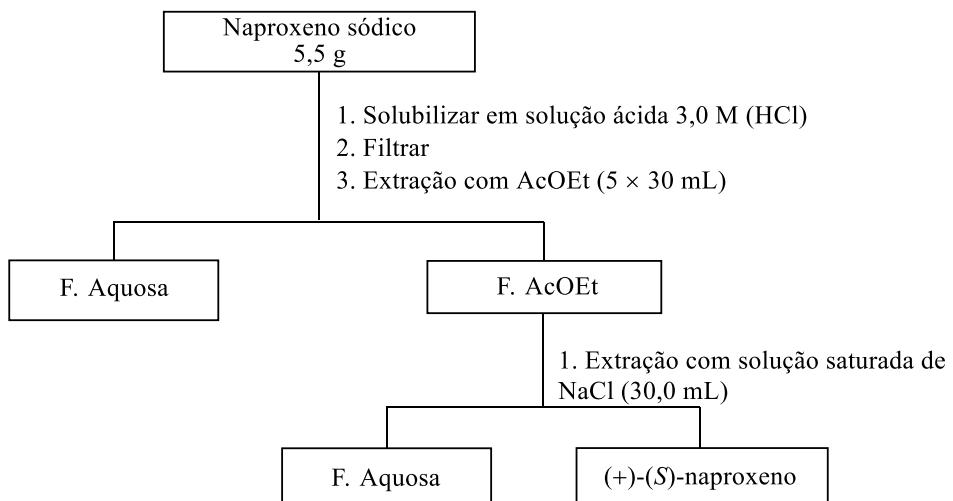


Fonte: a autora.

2.4.1.2 Extração do (+)-(S)-naproxeno a partir do Naproxeno Sódico® comercial

Os comprimidos (10 unidades) do Naproxeno Sódico® (5,5 g, 21,8 mmol) foram triturados e o material pulverizado foi transferido para um béquer. Em seguida, foi solubilizado em 20 mL de HCl (3,0 mol L⁻¹), filtrado e submetido à extração com AcOEt (5 × 30,0 mL). A fase orgânica foi submetida a extração líquido-líquido com solução saturada de cloreto de sódio (30 mL) (Figura 66). Os resquícios de água foram retirados utilizando sulfato de sódio anidro e o AcOEt removido em evaporador rotativo (40 °C). O produto foi analisado por RMN para confirmação da estrutura.

Figura 66. Fluxograma da extração do (+)-(S)-naproxeno.



Fonte: a autora.

2.4.1.3 Síntese dos ésteres de Mosher

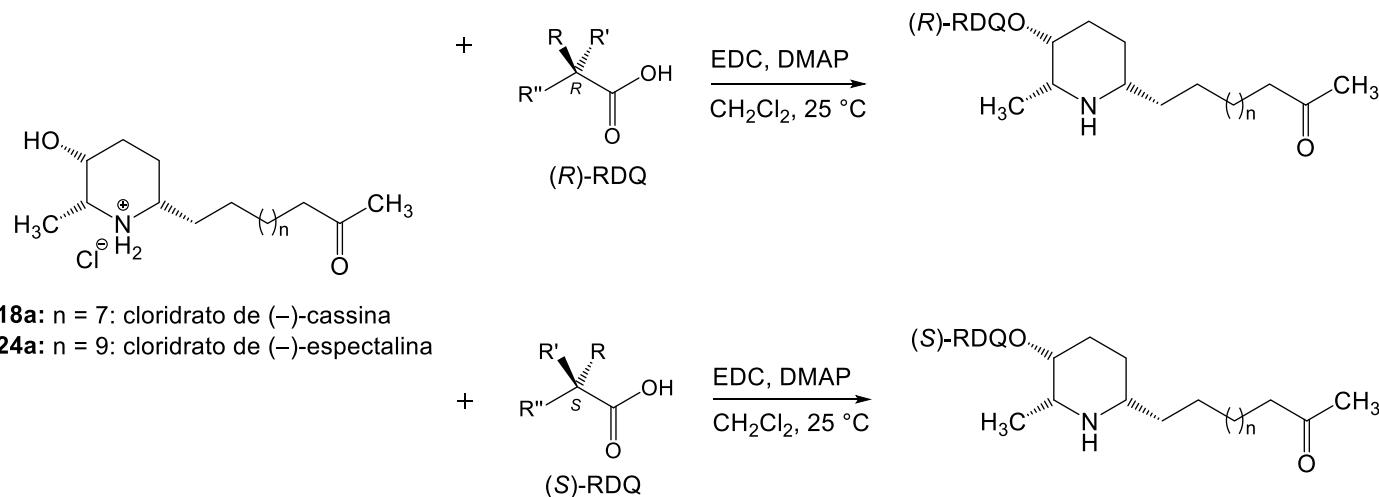
O cloridrato **18a** foi solubilizado em clorofórmio e, em seguida, foi adicionado o RDQ, o hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (do inglês *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC) e a dimetilaminopiridina (DMAP) (Figura 67) (Tabela 5). A mistura foi agitada à temperatura ambiente e monitorada por CCD, até que todo o material de partida fosse convertido no produto (R_f produto $>$ R_f reagente). Ao término da reação (acompanhada por CCD), foi adicionado 30 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (0,07 mol L⁻¹, pH 10) à mistura reacional para neutralizar e retirar o excesso do RDQ. Esse procedimento foi repetido 5 vezes. Em seguida, as fases aquosas foram reagrupadas e submetidas à extração líquido-líquido com CH₂Cl₂ (5 x 25,0 mL). As fases orgânicas (CHCl₃ e CH₂Cl₂) foram reunidas e os resquícios de água removidos utilizando sulfato de sódio anidro. O solvente foi destilado em evaporador rotativo (40 °C) e o produto (**37**) (éster de Mosher) analisado por RMN. As demais reações para obtenção dos ésteres **38–42** seguiram o mesmo protocolo (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros reacionais para a síntese dos ésteres de Mosher 37–42.

Cloridrato	mg (mmol)	RDQ	mg (mmol)	EDC mg (mmol)	DMAP mg (mmol)	Tempo (h)	Produto
18a	50,0 (0,15)	(+)-(R)-MTPA	24,9 (0,15)	29,0 (0,19)	7,3 (0,06)	31	37
18a	50,0 (0,15)	(-)-(S)-MTPA	24,9 (0,15)	29,0 (0,19)	7,3 (0,06)	31	38
24a	54,2 (0,15)	(+)-(R)-MTPA	24,9 (0,15)	29,0 (0,19)	7,3 (0,06)	31	39
24a	54,2 (0,15)	(-)-(S)-MTPA	24,9 (0,15)	29,0 (0,19)	7,3 (0,06)	31	40
18a	50,0 (0,15)	(+)-(S)-naproxeno	48,4 (0,21)	32,6 (0,21)	20,8 (0,17)	35	41
24a	54,2 (0,15)	(+)-(S)-naproxeno	48,4 (0,21)	32,6 (0,21)	20,8 (0,17)	35	42

Fonte: a autora.

Figura 67. Preparação dos ésteres de Mosher.



Fonte: a autora.

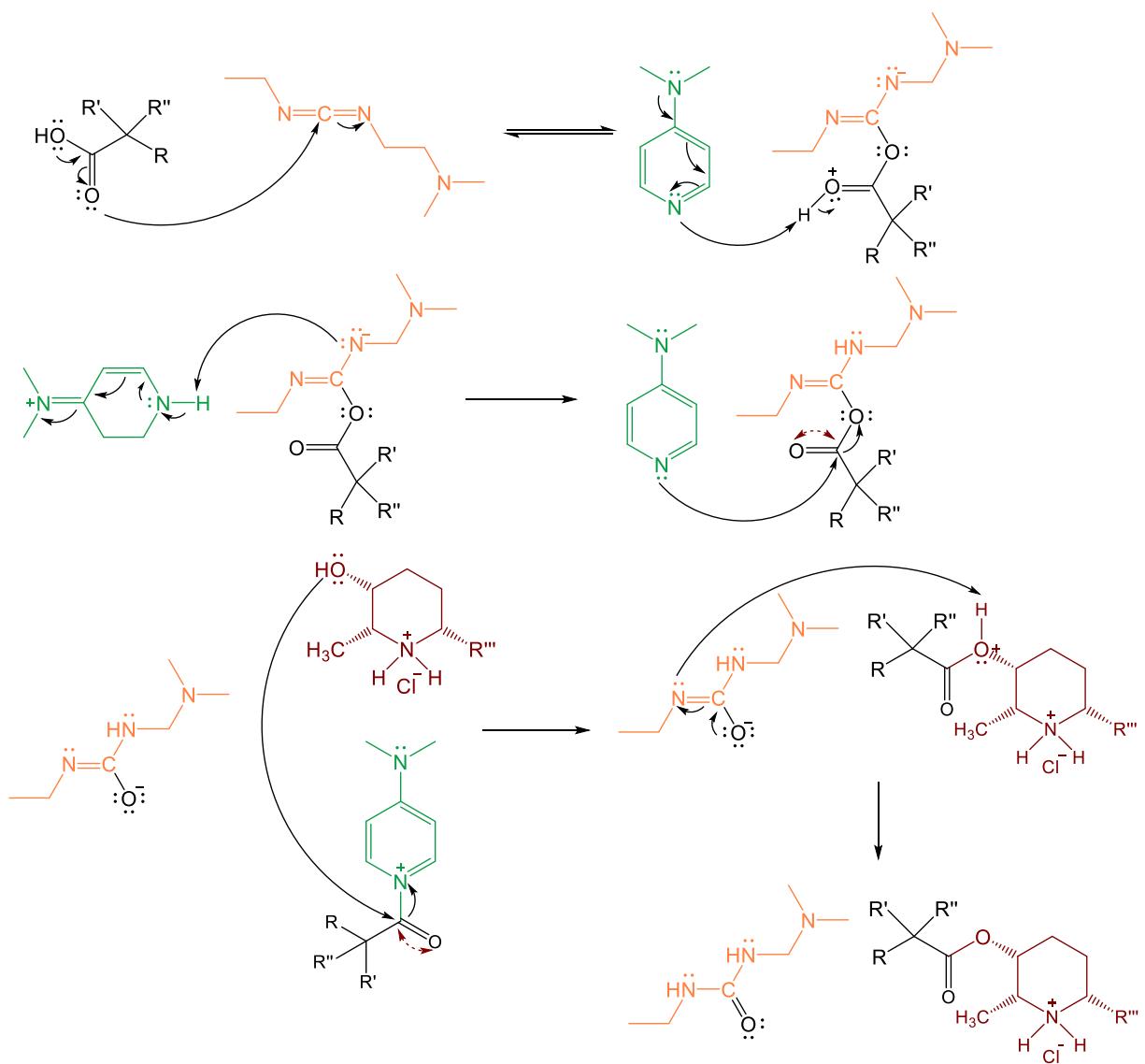
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Reação com os RDQs (*R*)- e (*S*)-MTPA

A configuração absoluta do carbono assimétrico C-3 dos alcaloides **18** e **24** estão sendo avaliadas através do método desenvolvido por Mosher em 1973 para álcoois secundários. A metodologia envolve a dupla derivatização dos alcaloides piperidínicos com o ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético ((*R*)-MTPA) e (*S*)-MTPA).

Inicialmente, o preparo dos ésteres foi feito a partir de uma adaptação da reação de esterificação de Steglich, que utiliza DMAP como catalisador e EDC como agente de acoplamento (TAIN et al., 2020). A proposta de mecanismo (Figura 68) tem início com uma reação ácido-base entre o DMAP e o ácido carboxílico (MTPA), resultando no ácido conjugado do DMAP e no carboxilato do MTPA (nucleófilo), que na sequência ataca o EDC (eletrófilo). Em seguida, o conjugado MTPA-EDC⁻ captura o próton do DMAP-H⁺ e na sequência o DMAP ataca a carbonila do conjugado MTPA-EDC levando a formação do conjugado MTPA-DMAP⁺ e EDC-O⁻, que captura o hidrogênio do álcool do alcaloide e gera *N*-etilureia como subproduto. Na sequência, o alcaloide aniónico ataca a carbonila do MTPA-DMAP⁺ levando ao éster de Mosher (**37–40**).

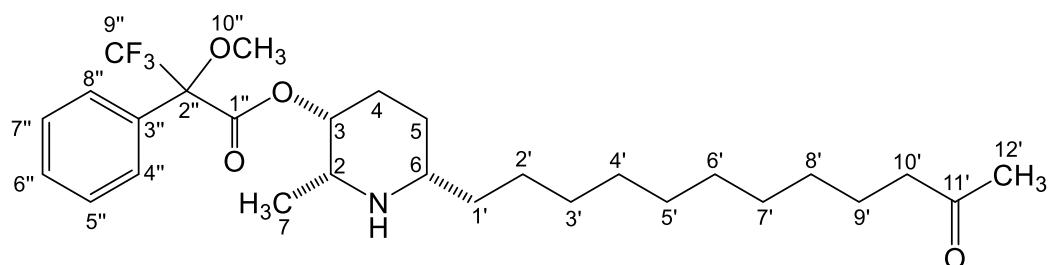
Figura 68. Mecanismo proposto para síntese dos ésteres de Mosher.



Fonte: a autora.

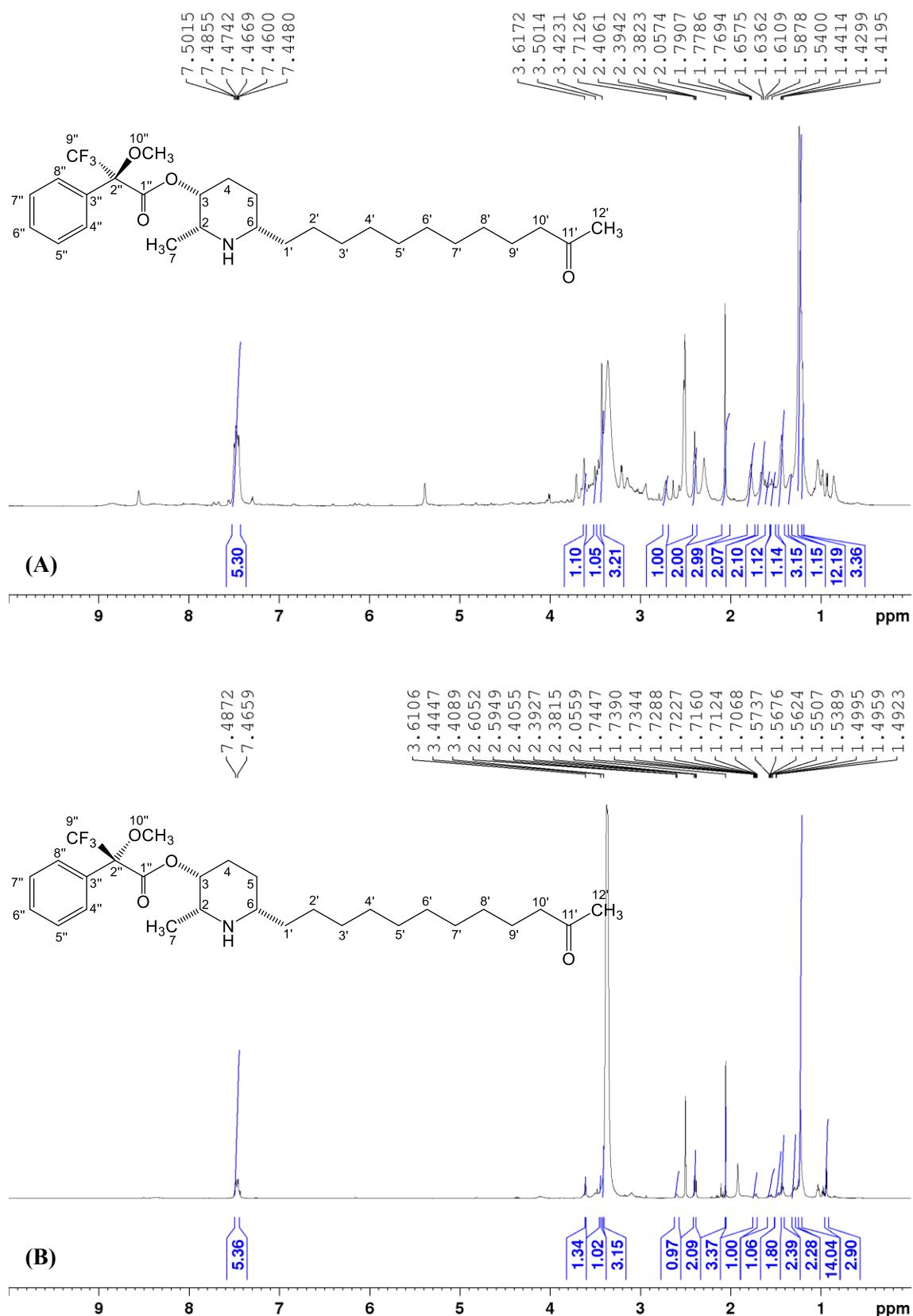
Os derivados **37**, **38**, **39** e **40** foram sintetizados de acordo com o protocolo discutido no item 2.4.1.3. A reação foi monitorada por CCD por 31h, onde foi possível observar uma mancha na cromatoplaca com R_f maior do que o material partida, indicando a formação dos ésteres, que apresentam caráter mais apolar que os alcaloides. Através da análise por RMN foi possível verificar a formação dos produtos de interesse.

2.5.1.1 Elucidação estrutural dos derivados **37** e **38**



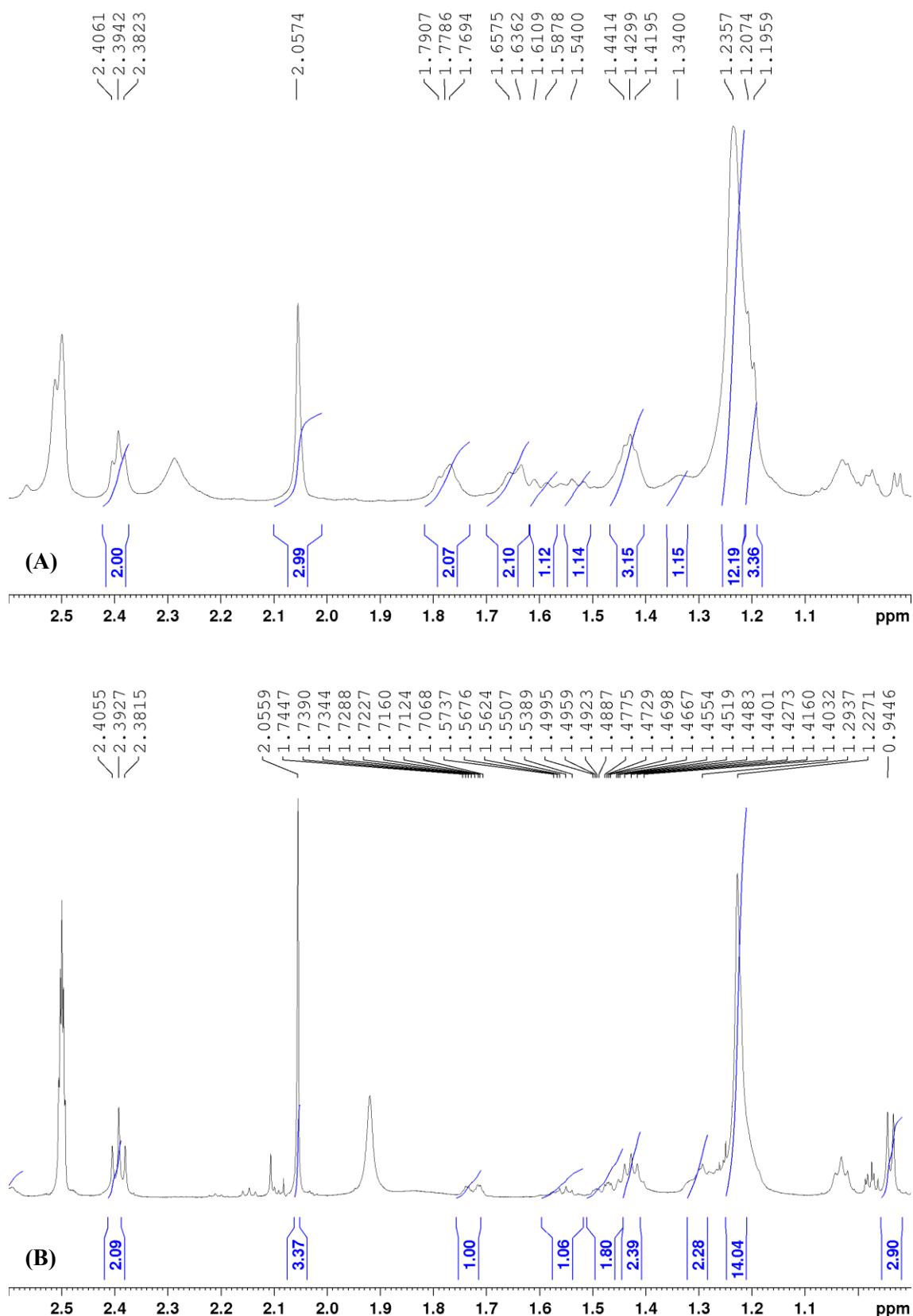
A análise dos espectros de RMN de ^1H dos derivados **37** e **38** (Tabela 6) (Figuras 69–72) permitiu observar os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-cassina (**18**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos hidrogênios do MTPA. Nesse sentido, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **37** em δ 3,50 (1H, m), δ 3,61 (1H, m), δ 1,66 (1H, m), δ 1,54 (1H, m), δ 1,78 (1H, m), δ 1,35 (1H, m), δ 2,71 (1H, m) e δ 1,20 (3H, d), e para **38** em δ 3,44 (1H, m), δ 3,61 (1H, m), δ 1,73 (1H, m), δ 1,56 (1H, m), δ 1,48 (2H, m), δ 2,60 (1H, m) e δ 0,95 (3H, d), relativos aos hidrogênios H–2, H–3, H–4a, H–4b, H–5a, H–5b, H–6 e H–7, respectivamente. Além disso, os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (H–4"– H–8") e da metoxila (H–10") foram identificados em δ 7,48 (5H, m) e δ 3,42 (3H, s) para **37** e δ 7,47 (5H, m) e δ 3,41 (3H, s) para **38**.

Figura 69. Espectro de RMN de ^1H dos derivados **37** (A) e **38** (B) (500 MHz, DMSO).



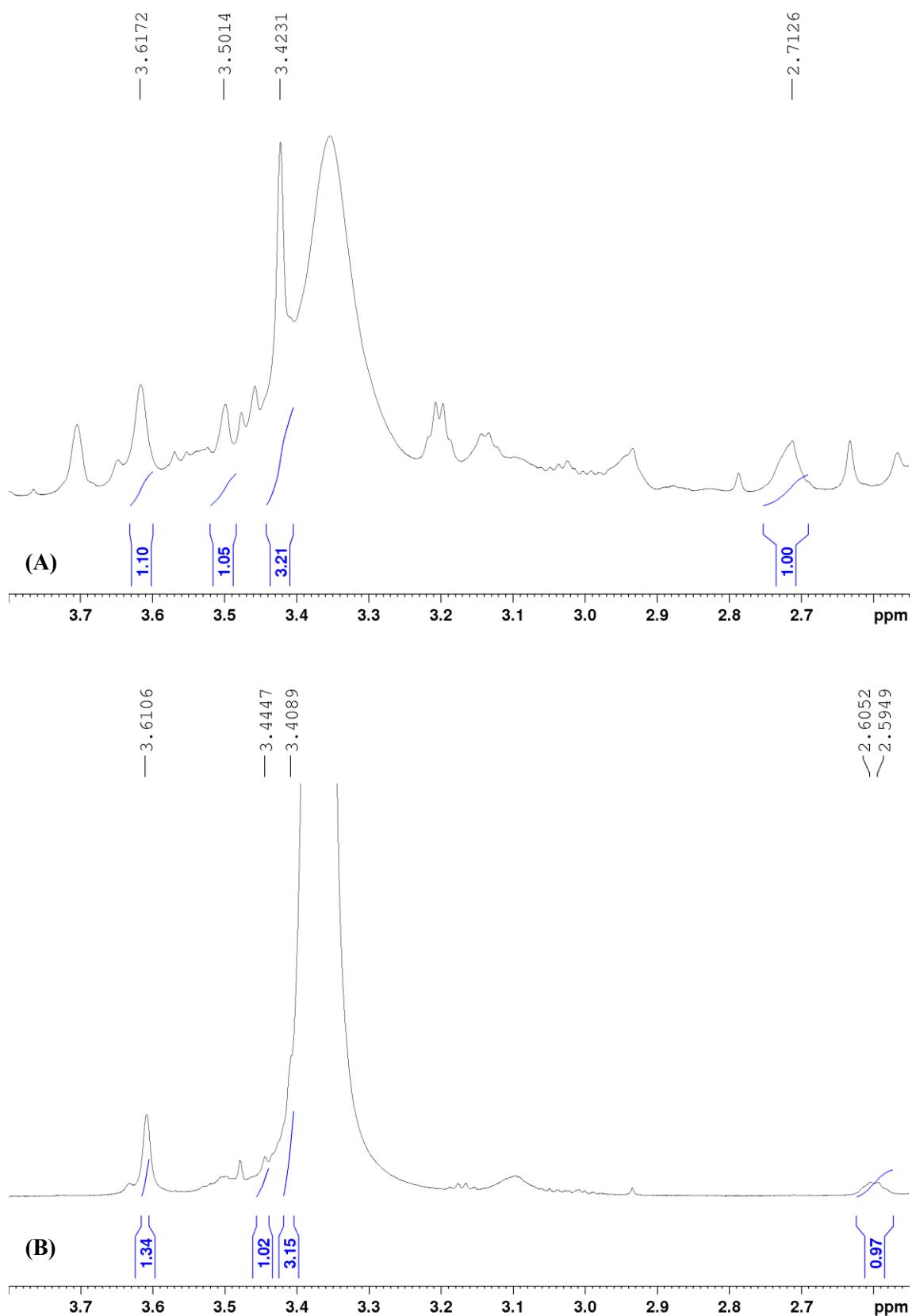
Fonte: a autora.

Figura 70. Ampliação do espectro 69 (δ 0,9–2,6) dos derivados **37** (A) e **38** (B).



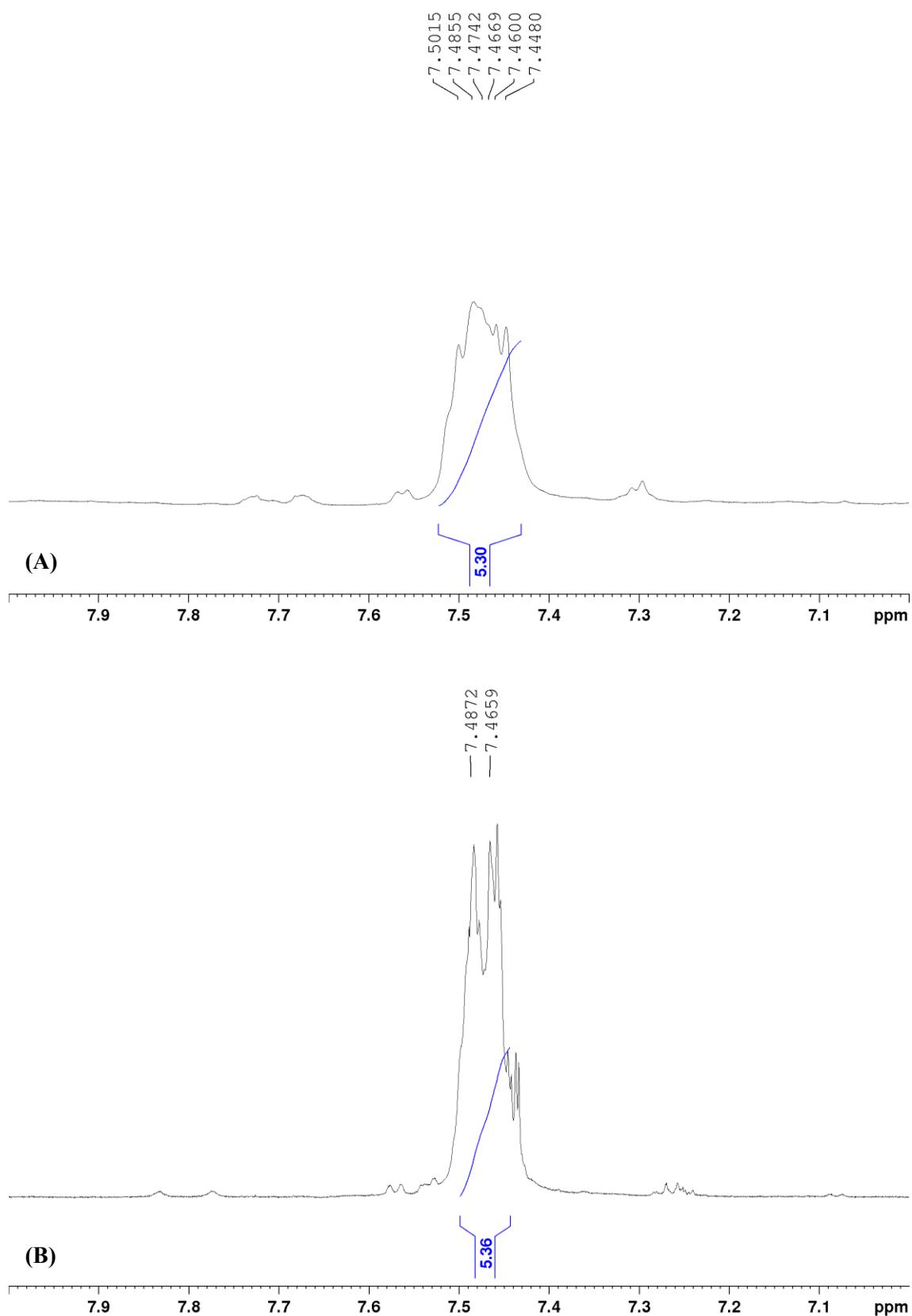
Fonte: a autora.

Figura 71. Ampliação do espectro 69 (δ 2,55–3,8) dos derivados **37** (A) e **38** (B).



Fonte: a autora.

Figura 72. Ampliação do espectro 69 (δ 7,0–8,0) dos derivados **37** (A) e **38** (B).



Fonte: a autora.

Tabela 6. Dados de RMN dos derivados **37** e **38** em DMSO.

Posição	37		38	
	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b
2	3,50	56,60 (CH)	3,44	56,49 (CH)
3	3,61	64,59 (CH)	3,61	66,38 (CH)
4	1,66 1,54	22,46 (CH ₂)	1,73 m 1,56 m	25,48 (CH ₂)
5	1,78 1,35	25,08 (CH ₂)	1,48 m	25,87 (CH ₂)
6	2,71	56,51 (CH)	2,60 m	55,25 (CH)
7	1,20 d	15,86 (CH ₃)	0,95 d	18,94 (CH ₃)
1'	1,66 1,43	33,13 (CH ₂)	1,30	35,60 (CH ₂)
2'	1,78 m 1,60	30,09 (CH ₂)	1,23 m	32,41 (CH ₂)
3'	1,23 m	29,49 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,75 ^c (CH ₂)
4'	1,23 m	29,37 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,46 ^c (CH ₂)
5'	1,23 m	29,34 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,42 ^c (CH ₂)
6'	1,23 m	29,27 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,38 ^c (CH ₂)
7'	1,23 m	29,21 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,31 ^c (CH ₂)
8'	1,23 m	29,02 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,01 ^c (CH ₂)
9'	1,43 qt	23,67 (CH ₂)	1,43 qt	23,69 CH ₂)
10'	2,40 t (7,4)	43,18 (CH ₂)	2,39 t (7,1)	43,21 (CH ₂)
11'	—	209,03 (C)	—	210,85 (C)
12'	2,07 s	30,15 (CH ₃)	2,06 s	30,14 (CH ₃)
1"	—	166,15 (C)	—	166,85 (C)
2"	—	70,28 (C)	—	73,50 (C)
3"	—	133,83 (C)	—	133,81 (C)
4"	7,48	127,59 (CH)	7,47	126,95 (CH)
5"	7,48	128,90 (CH)	7,47	128,93 (CH)
6"	7,48	126,94 (CH)	7,47	127,51 (CH)
7"	7,48	128,90 (CH)	7,47	128,93 (CH)
8"	7,48	127,59 (CH)	7,47	126,95 (CH)
9"	—	153,52 (C)	—	153,75 (C)
10"	3,42	55,53 (CH ₃)	3,41	45,30 (CH ₃)

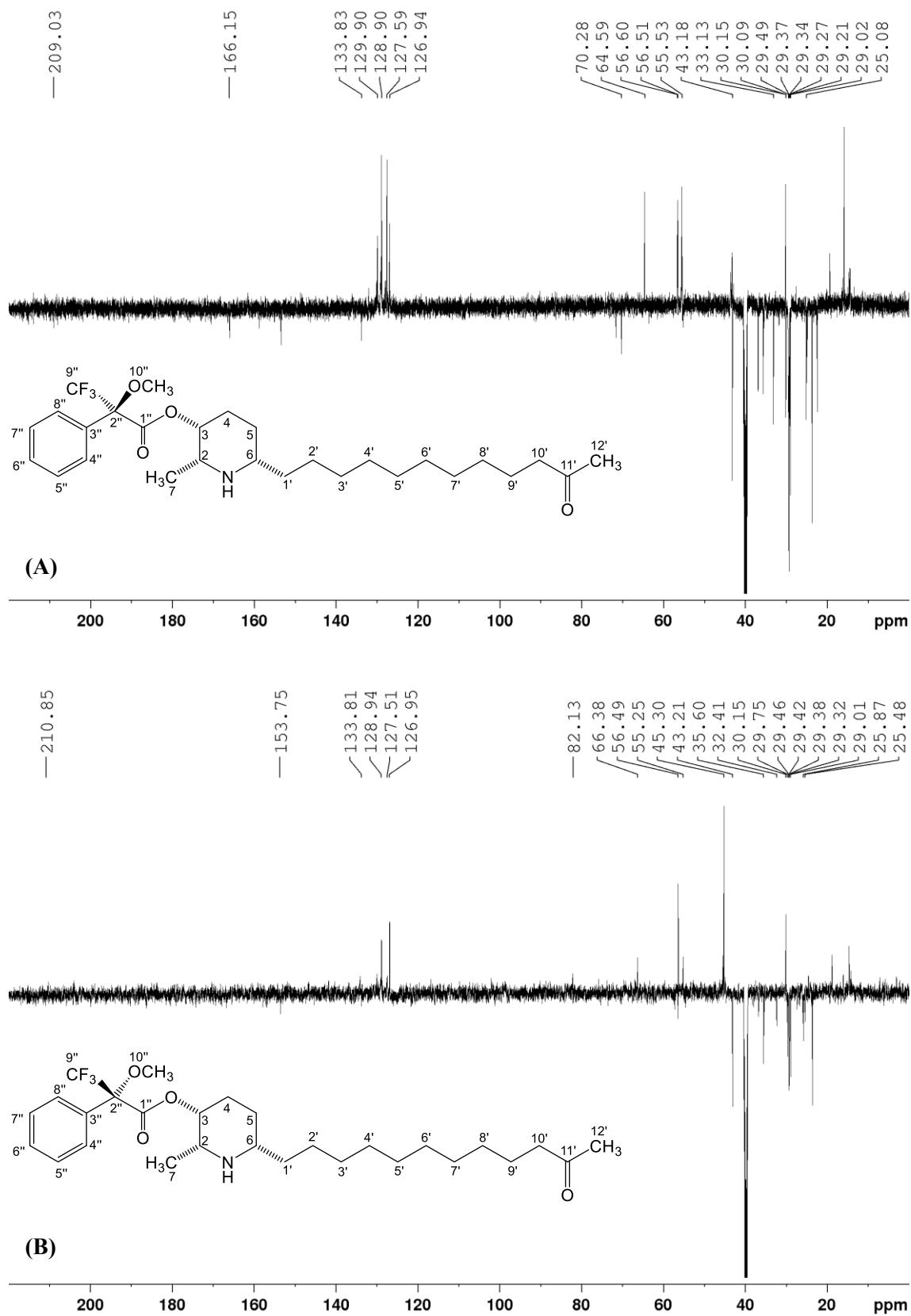
^aOs experimentos de RMN foram realizados a 600 e 150 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} 0,00$).

^bMultiplicidade: s (simpleto); d (duploto); t (triploto); q (quadruploto); qt (quintuploto); m (multipleto). ^c Valor atribuído com base no deslocamento químico calculado (ChemDraw Ultra v. 12) e podem estar interconvertidos dentro da coluna.

Fonte: a autora.

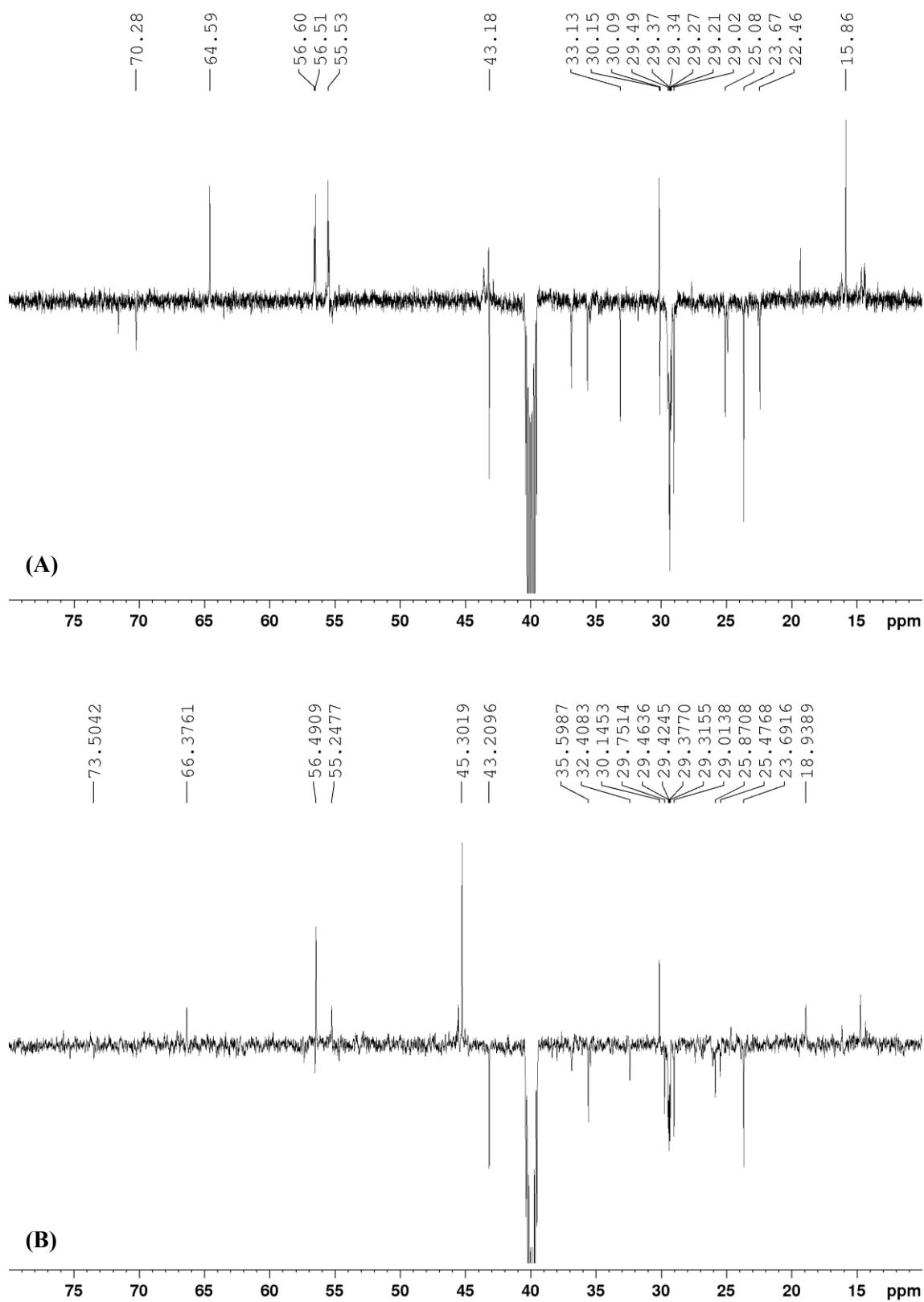
Nos espectros de ^{13}C DEPTQ (Tabela 6) (Figuras 73–77) foram observados os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-cassina (**18**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos carbonos do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos carbonos do MTPA. Assim, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **37** em δ 56,60 (CH), δ 64,59 (CH), δ 22,46 (CH₂), δ 25,08 (CH₂), δ 56,51 (CH) e δ 15,86 (CH₃), e para **38** em δ 56,49 (CH), δ 66,38 (CH), δ 25,48 (CH₂), δ 25,87 (CH₂), δ 55,25 (CH) e δ 18,94 (CH₃), relativos aos carbonos C–2, C–3, C–4, C–5, C–6 e C–7, respectivamente. Ainda, foram identificados os sinais δ 166,15 (C), δ 70,28 (C), δ 133,83 (C), δ 127,59 (CH), δ 128,90 (CH), δ 126,94 (CH), δ 153,52 (CH) e δ 55,53 (CH₃) para **37** e δ 166,85 (C), δ 73,50 (C), δ 133,81 (C), δ 126,95 (CH), δ 128,93 (CH), δ 127,51 (CH), δ 153,75 (CH) e δ 45,30 (CH₃) para **38**, relativos aos carbonos C–1", C–2", C–3", C–4", C–8", C–5", C–7", C–9" e C–10", respectivamente.

Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq dos derivados **37** (A) e **38** (B) (150 MHz, DMSO).



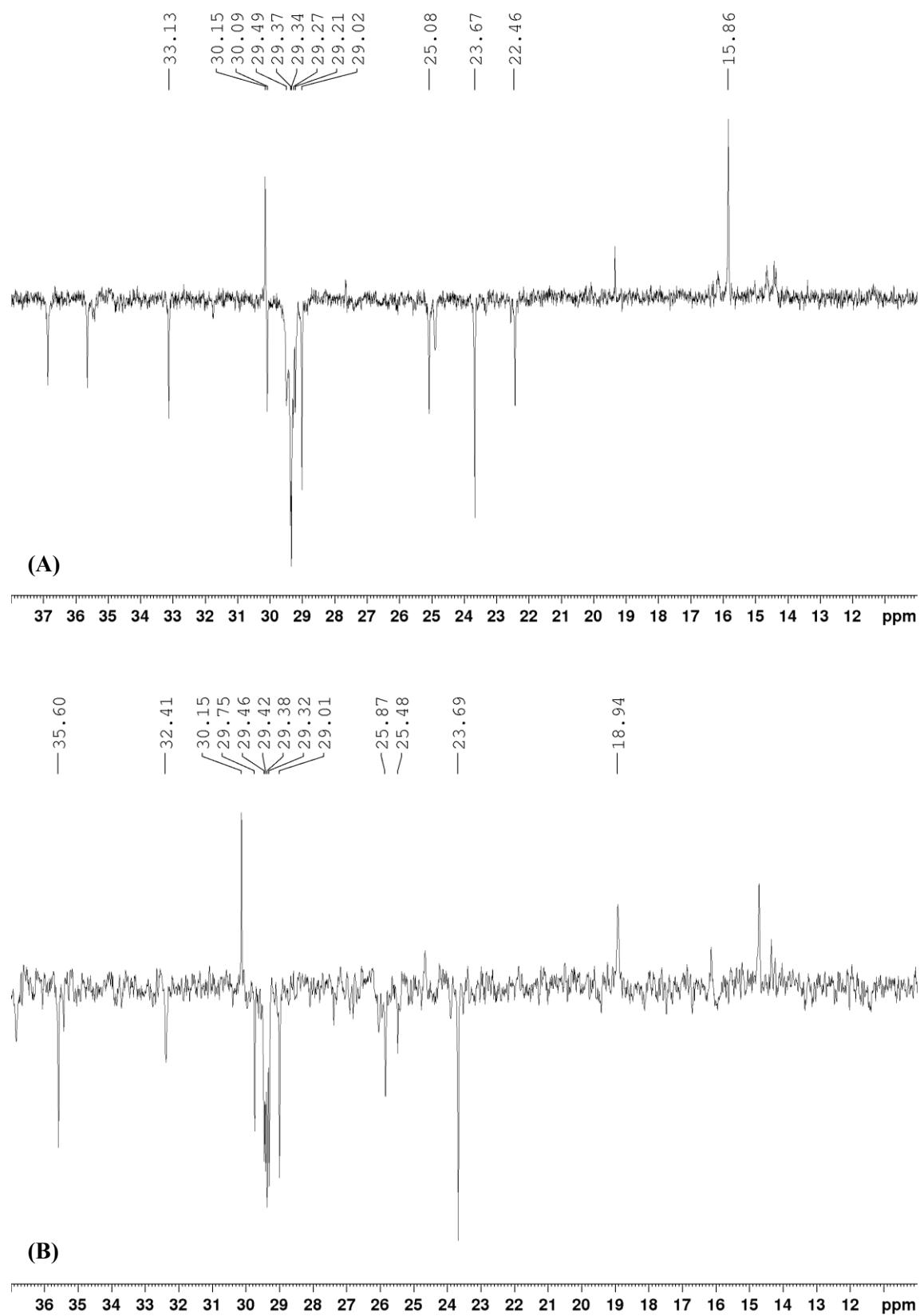
Fonte: a autora.

Figura 74. Ampliação do espectro 73 (δ 10,0–80,0) dos derivados **37** (A) e **38** (B).



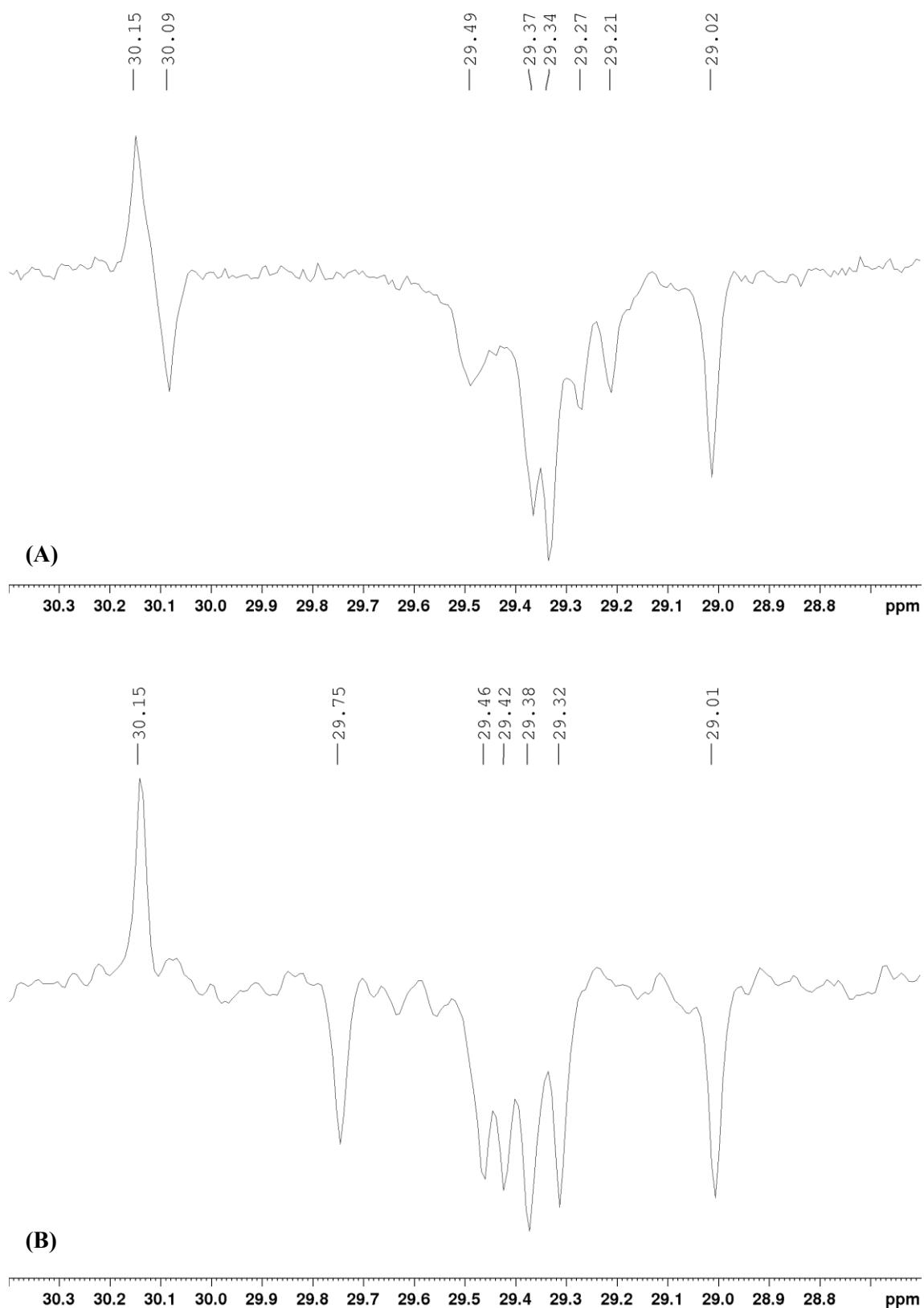
Fonte: a autora.

Figura 75. Ampliação do espectro 73 (δ 10,0–38,0) dos derivados **37 (A)** e **38 (B)**.



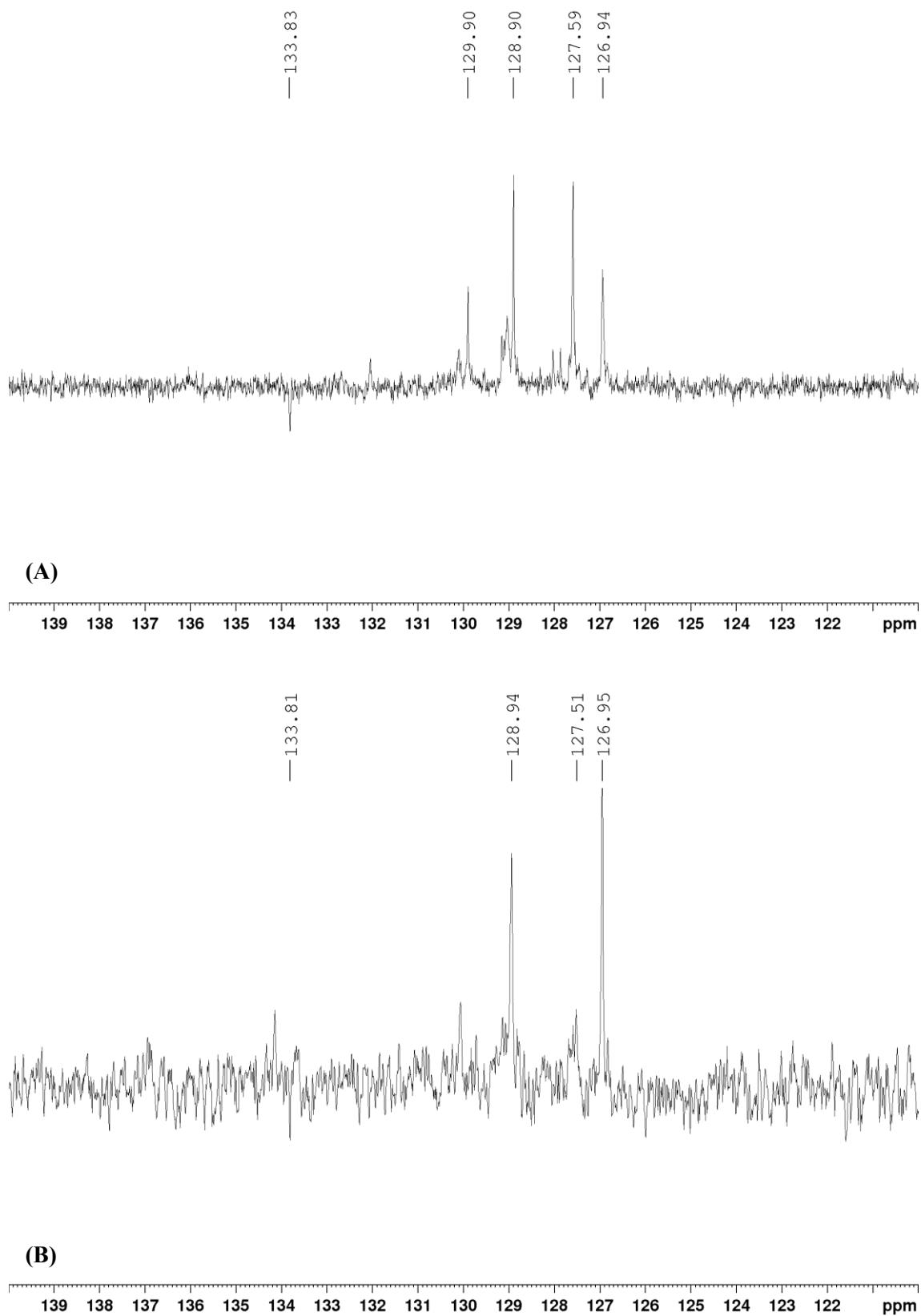
Fonte: a autora.

Figura 76. Ampliação do espectro 73 (δ 28,6–30,4) dos derivados **37 (A)** e **38 (B)**.



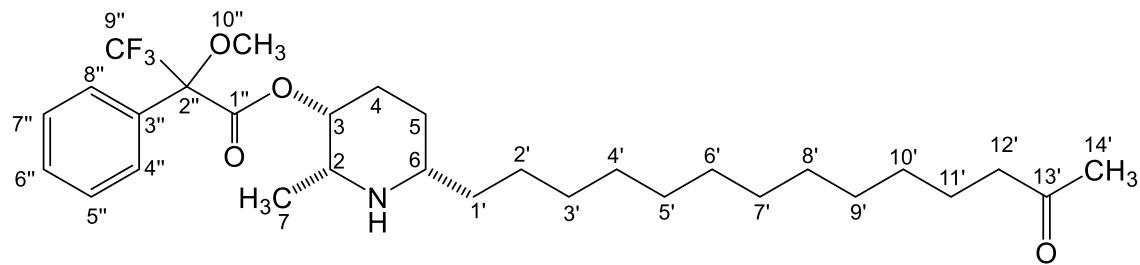
Fonte: a autora.

Figura 77. Ampliação do espectro 73 (δ 120,0–140,0) dos derivados **37 (A)** e **38 (B)**.



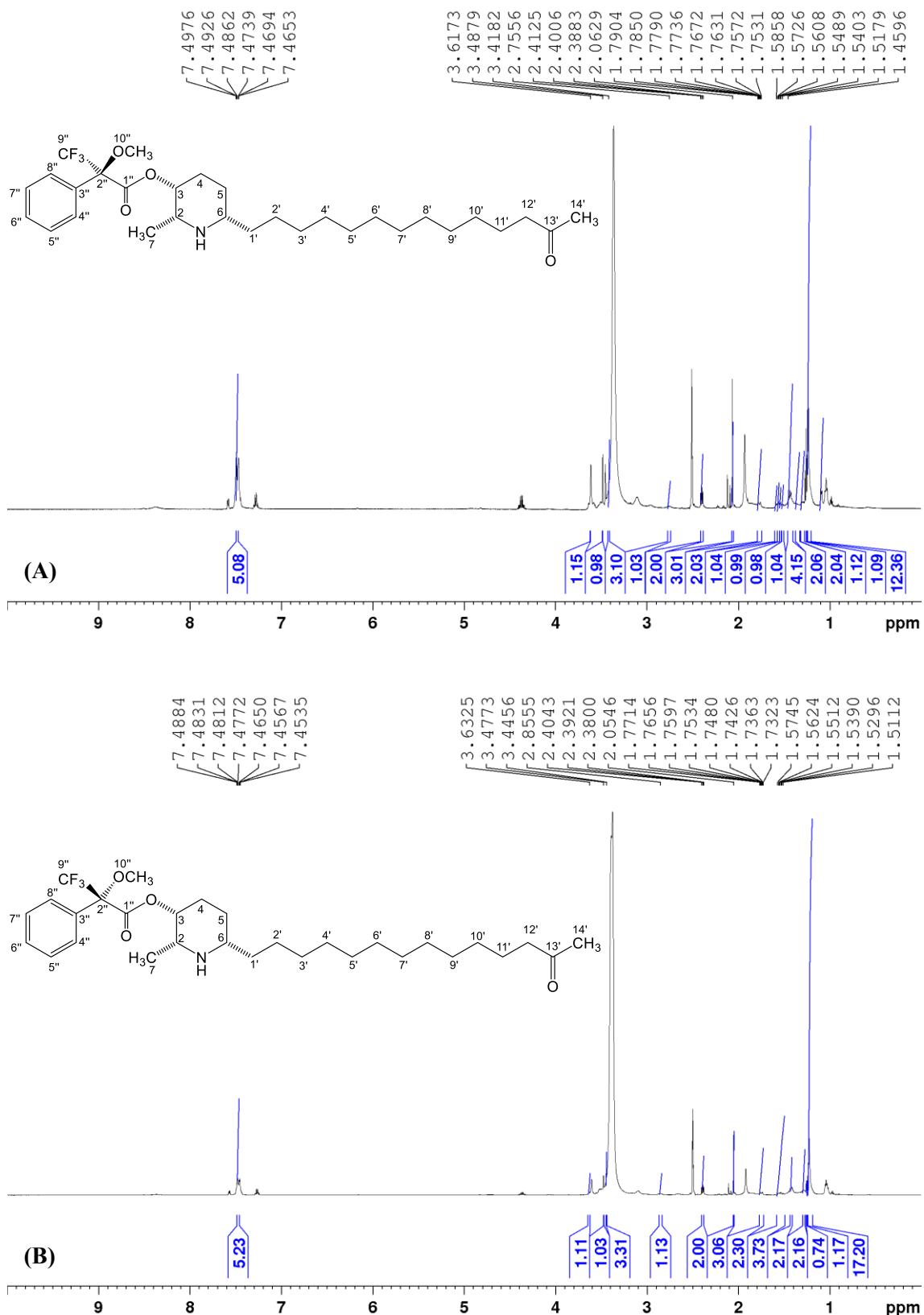
Fonte: a autora.

2.5.1.2 Elucidação estrutural dos derivados **39** e **40**



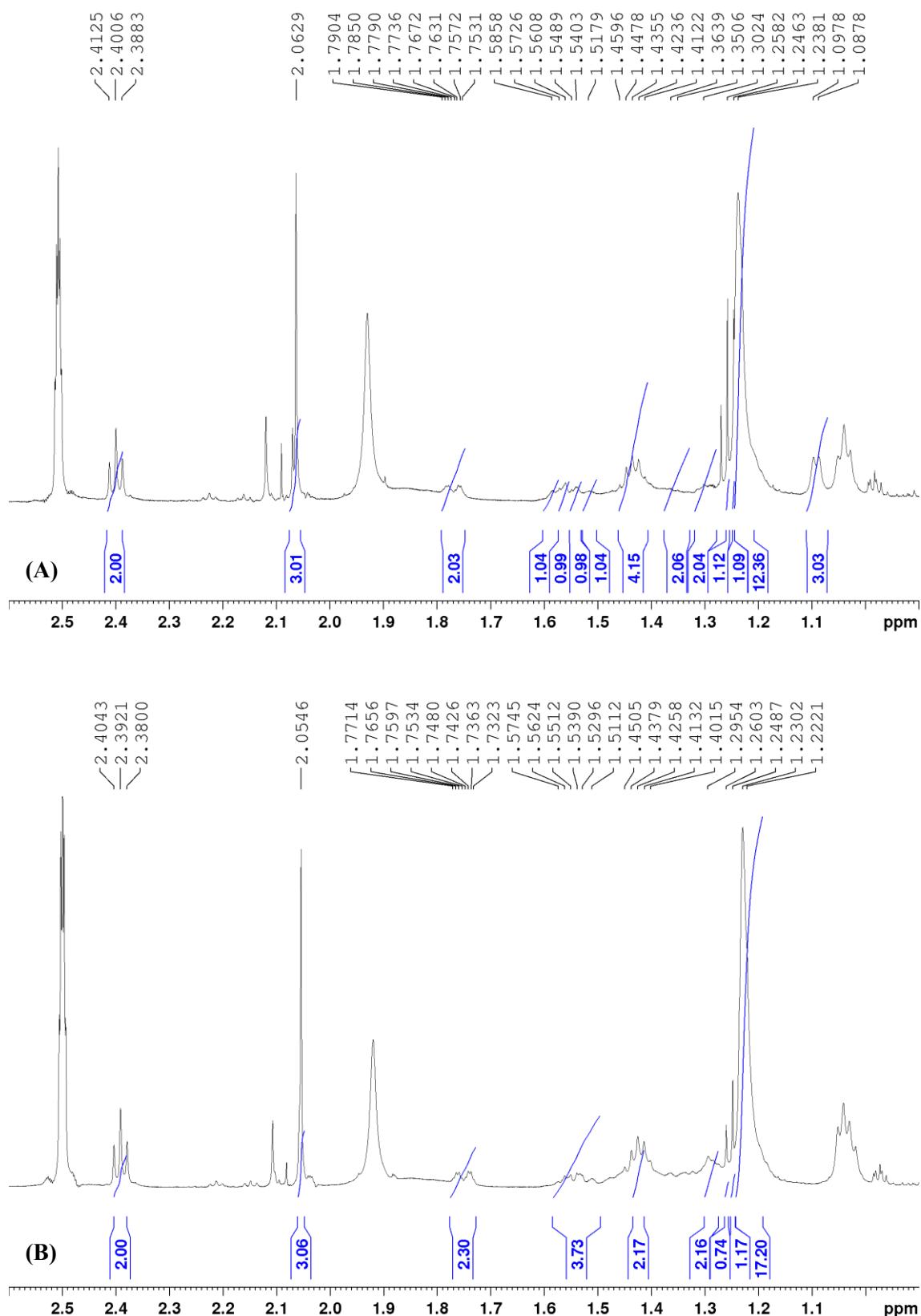
A análise dos espectros de RMN de ^1H dos derivados **39** e **40** (Tabela 7) (Figuras 78–81) permitiu observar os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-espectralina (**24**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos hidrogênios do MTPA. Nesse sentido, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **39** em δ 3,49 (1H, m), δ 3,62 (1H, m), δ 1,58 (1H, m), δ 1,52 (1H, m), δ 1,77 (1H, m), δ 1,35 (1H, m), δ 2,75 (1H, m) e δ 1,09 (3H, d), e para **40** em δ 3,47 (1H, m), δ 3,63 (1H, m), δ 1,74 (1H, m), δ 1,57 (1H, m), δ 1,77 (1H, m), δ 1,55 (1H, m), δ 2,85 (1H, m) e δ 1,22 (3H, d), relativos aos hidrogênios H–2, H–3, H–4a, H–4b, H–5a, H–5b, H–6 e H–7, respectivamente. Além disso, os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (H–4''– H–8'') e da metoxila (H–10'') foram identificados em δ 7,47 (5H, m) e δ 3,42 (3H, s) para **39** e δ 7,47 (5H, m) e δ 3,44 (3H, s) para **40**.

Figura 78. Espectro de RMN de ^1H dos derivados **39** (A) e **40** (B) (500 MHz, DMSO).



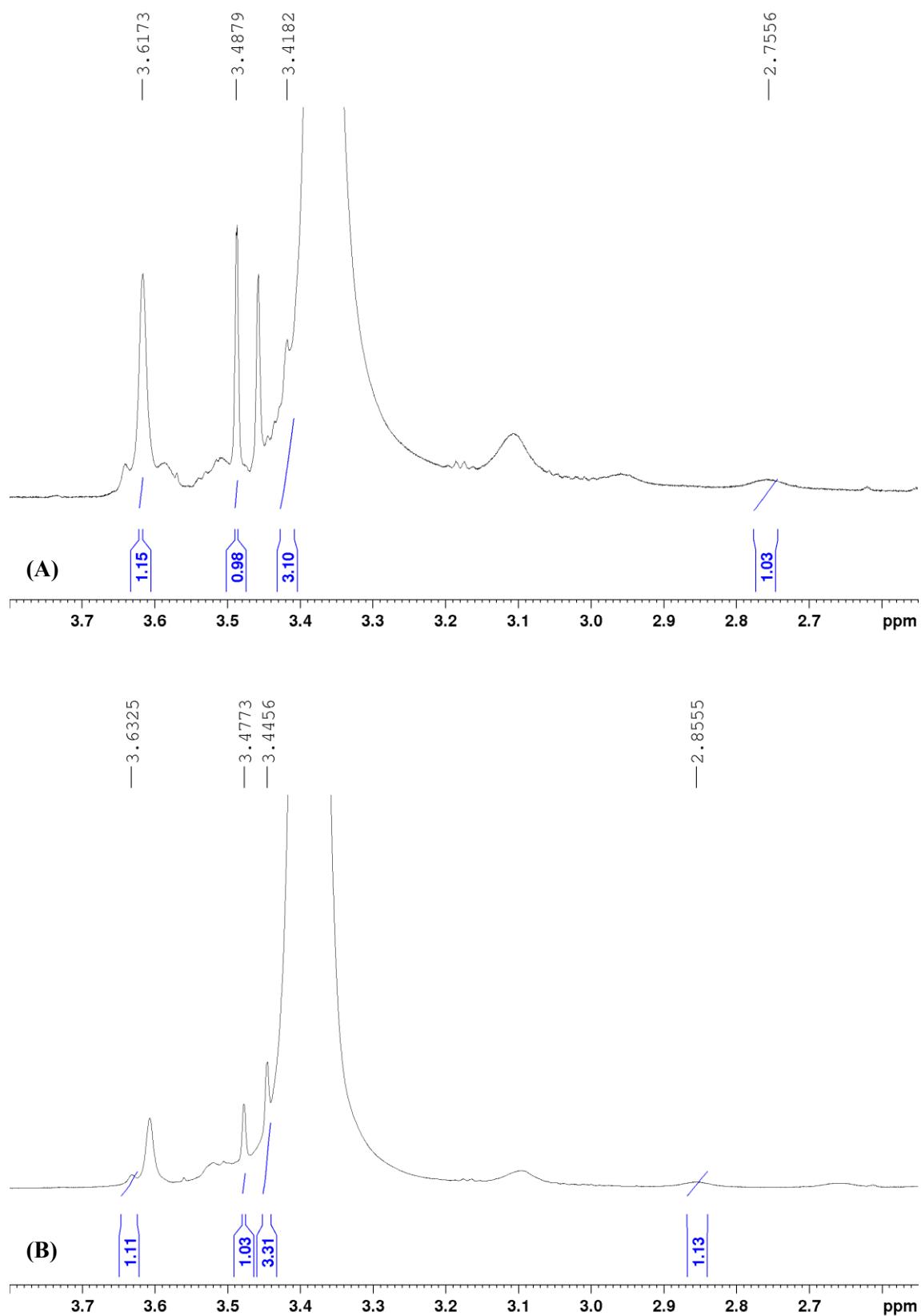
Fonte: a autora.

Figura 79. Ampliação do espectro 78 (δ 0,9–2,6) dos derivados **39** (A) e **40** (B).



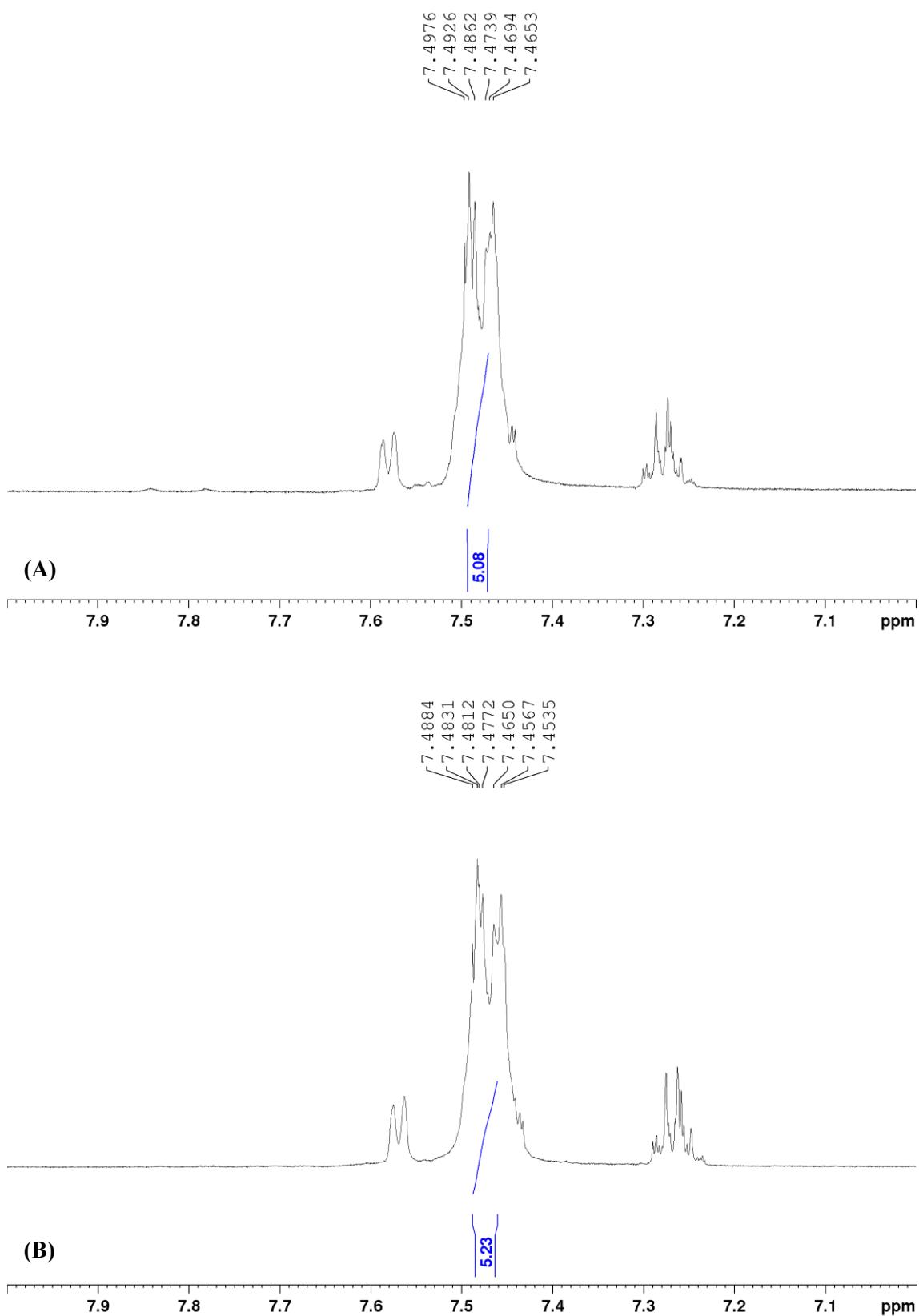
Fonte: a autora.

Figura 80. Ampliação do espectro 78 (δ 2,55–3,8) dos derivados **39** (A) e **40** (B).



Fonte: a autora.

Figura 81. Ampliação do espectro 78 (δ 7,0–8,0) dos derivados **39** (A) e **40** (B).



Fonte: a autora.

Tabela 7. Dados de RMN dos derivados **39** e **40** em DMSO.

Posição	39		40	
	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b
2	3,49	55,67 (CH)	3,47	55,68 (CH)
3	3,62	56,47 (CH)	3,63	56,47 (CH)
4	1,58 1,52	25,38 (CH ₂)	1,74 1,57	25,46 (CH ₂)
5	1,77 1,35	25,47 (CH ₂)	1,77 1,55	25,49 (CH ₂)
6	2,75	55,38 (CH)	2,85	55,36 (CH)
7	1,09 d	14,73 (CH ₃)	1,22 d	14,71 (CH ₃)
1'	1,57 1,35	35,58 (CH ₂)	1,52	35,59 (CH ₂)
2'	1,77 1,55	29,49 (CH ₂)	1,30 m	28,48 (CH ₂)
3'	1,30 m	29,46 ^c (CH ₂)	1,25 m	29,46 ^c (CH ₂)
4'	1,26 m	29,42 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,45 ^c (CH ₂)
5'	1,24 m	29,41 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,42 ^c (CH ₂)
6'	1,24 m	29,37 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,41 ^c (CH ₂)
7'	1,24 m	29,35 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,38 ^c (CH ₂)
8'	1,24 m	29,33 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,37 ^c (CH ₂)
9'	1,24 m	29,32 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,32 ^c (CH ₂)
10'	1,24 m	29,02 ^c (CH ₂)	1,23 m	29,01 ^c (CH ₂)
11'	1,43 qt	23,67 (CH ₂)	1,43 qt	23,67 CH ₂)
12'	2,40 t (7,4)	43,17 (CH ₂)	2,39 t (7,1)	43,17 (CH ₂)
13'	—	209,08 (C)	—	211,15 (C)
14'	2,06 s	30,14 (CH ₃)	2,05 s	30,15 (CH ₃)
1"	—	166,41 (C)	—	174,50 (C)
2"	—	63,06 (C)	—	63,09 (C)
3"	—	132,18 (C)	—	134,10 (C)
4"	7,47	127,61 (CH)	7,47	126,95 (CH)
5"	7,47	129,12 (CH)	7,47	128,96 (CH)
6"	7,47	128,13 (CH)	7,47	127,60 (CH)
7"	7,47	129,12 (CH)	7,47	128,96 (CH)
8"	7,47	127,61 (CH)	7,47	126,95 (CH)
9"	—	153,64 (C)	—	153,78 (C)
10"	3,42	54,55 (CH ₃)	3,44	54,55 (CH ₃)

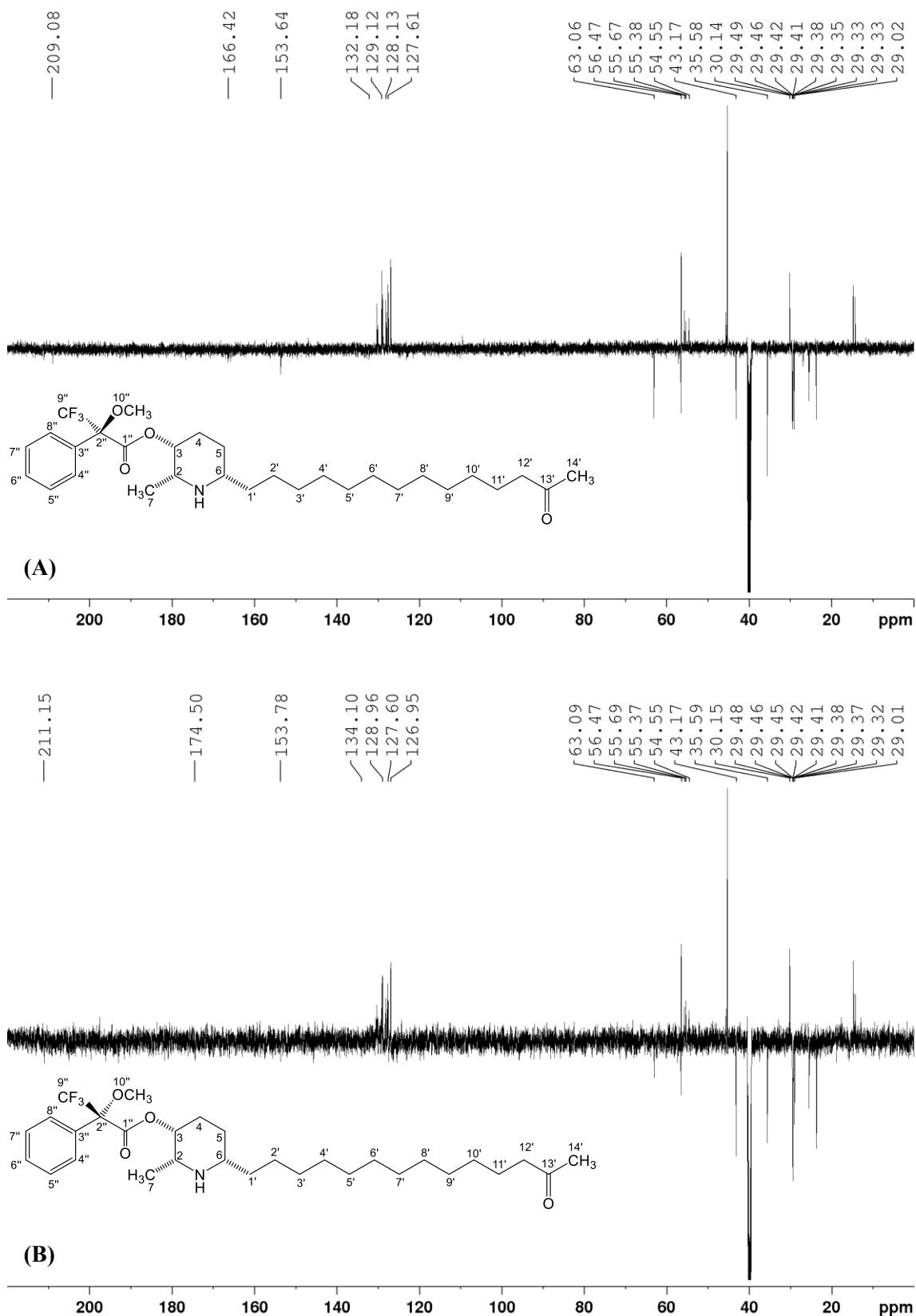
^aOs experimentos de RMN foram realizados a 600 e 150 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} 0,00$).

^bMultiplicidade: s (simpleto); d (dobleto); t (triplete); q (quadruplete); qt (quintuplete); m (multipleto). ^cValor atribuído com base no deslocamento químico calculado (ChemDraw Ultra v. 12) e podem estar interconvertidos dentro da coluna.

Fonte: a autora.

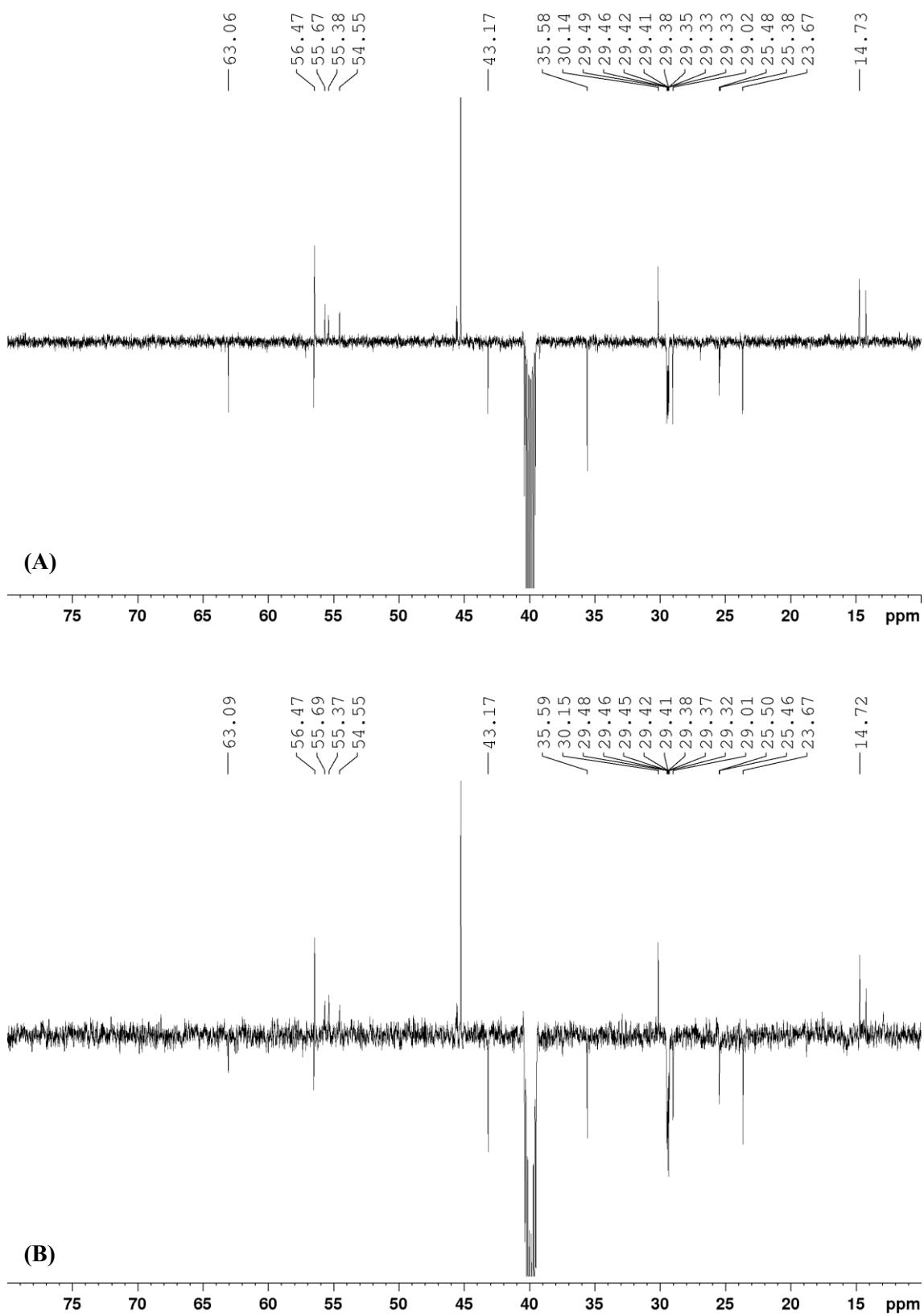
Nos espectros de ^{13}C DEPTQ (Tabela 7) (Figuras 82–86) foram observados os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-espectralina (**24**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos carbonos do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos carbonos do MTPA. Assim, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **39** em δ 55,67 (CH), δ 56,47 (CH), δ 25,38 (CH₂), δ 25,47 (CH₂), δ 55,38 (CH) e δ 14,73 (CH₃), e para **40** em δ 55,68 (CH), δ 56,47 (CH), δ 25,46 (CH₂), δ 25,49 (CH₂), δ 55,36 (CH) e δ 14,71 (CH₃), relativos aos carbonos C–2, C–3, C–4, C–5, C–6 e C–7, respectivamente. Ainda, foram identificados os sinais δ 166,41 (C), δ 63,06 (C), δ 132,18 (C), δ 127,61 (CH), δ 129,12 (CH), δ 128,13 (CH), δ 153,64 (CH) e δ 54,55 (CH₃) para **39** e δ 174,50 (C), δ 63,09 (C), δ 134,10 (C), δ 126,95 (CH), δ 128,96 (CH), δ 127,60 (CH), δ 153,78 (CH) e δ 54,55 (CH₃) para **40**, relativos aos carbonos C–1", C–2", C–3", C–4", C–8", C–5", C–7", C–9" e C–10", respectivamente.

Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq dos derivados **39** (A) e **40** (B) (150 MHz, DMSO).



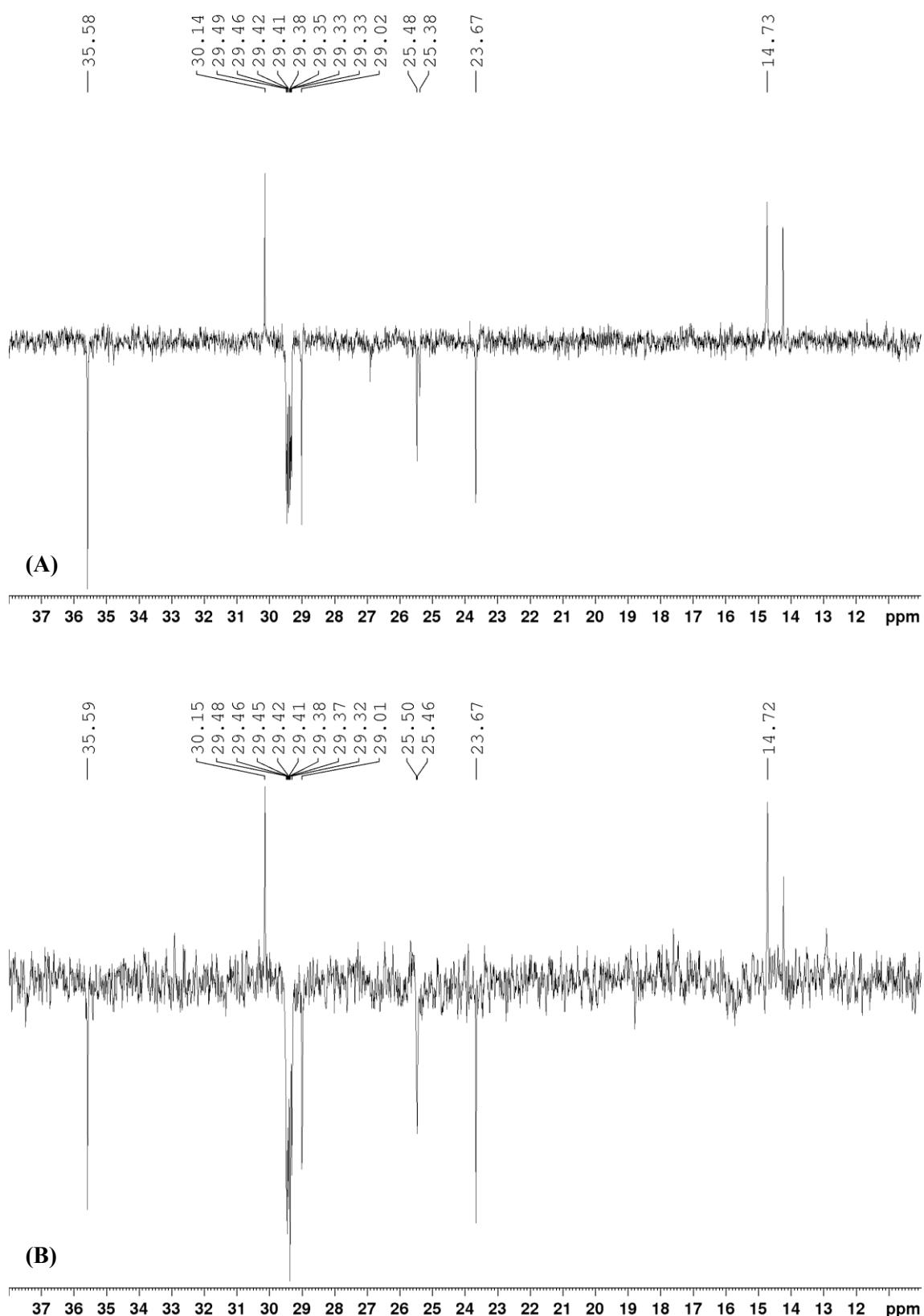
Fonte: a autora.

Figura 83. Ampliação do espectro 82 (δ 10,0–80,0) dos derivados **39** (A) e **40** (B).



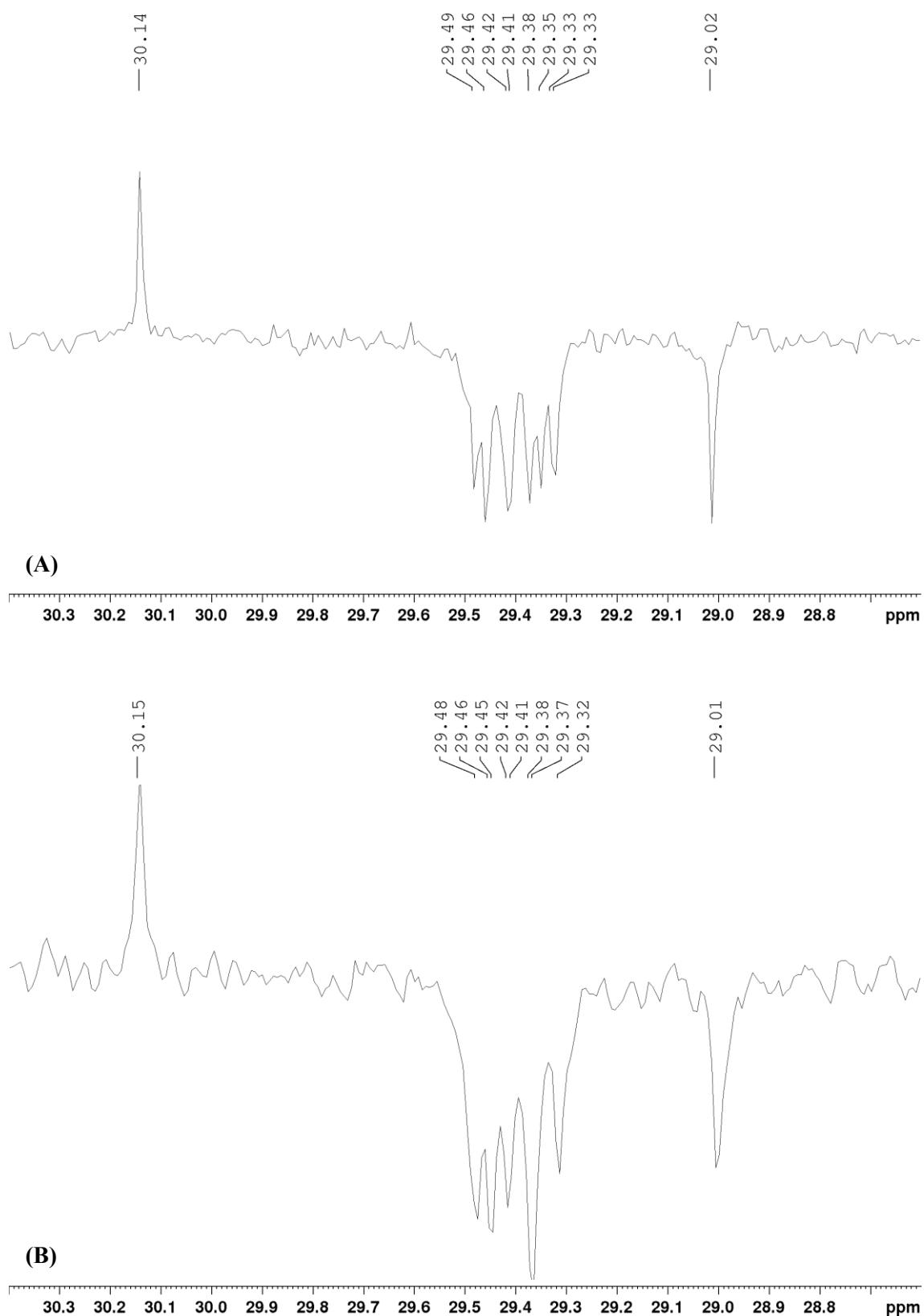
Fonte: a autora.

Figura 84. Ampliação do espectro 82 (δ 10,0–38,0) dos derivados **39 (A)** e **40 (B)**.



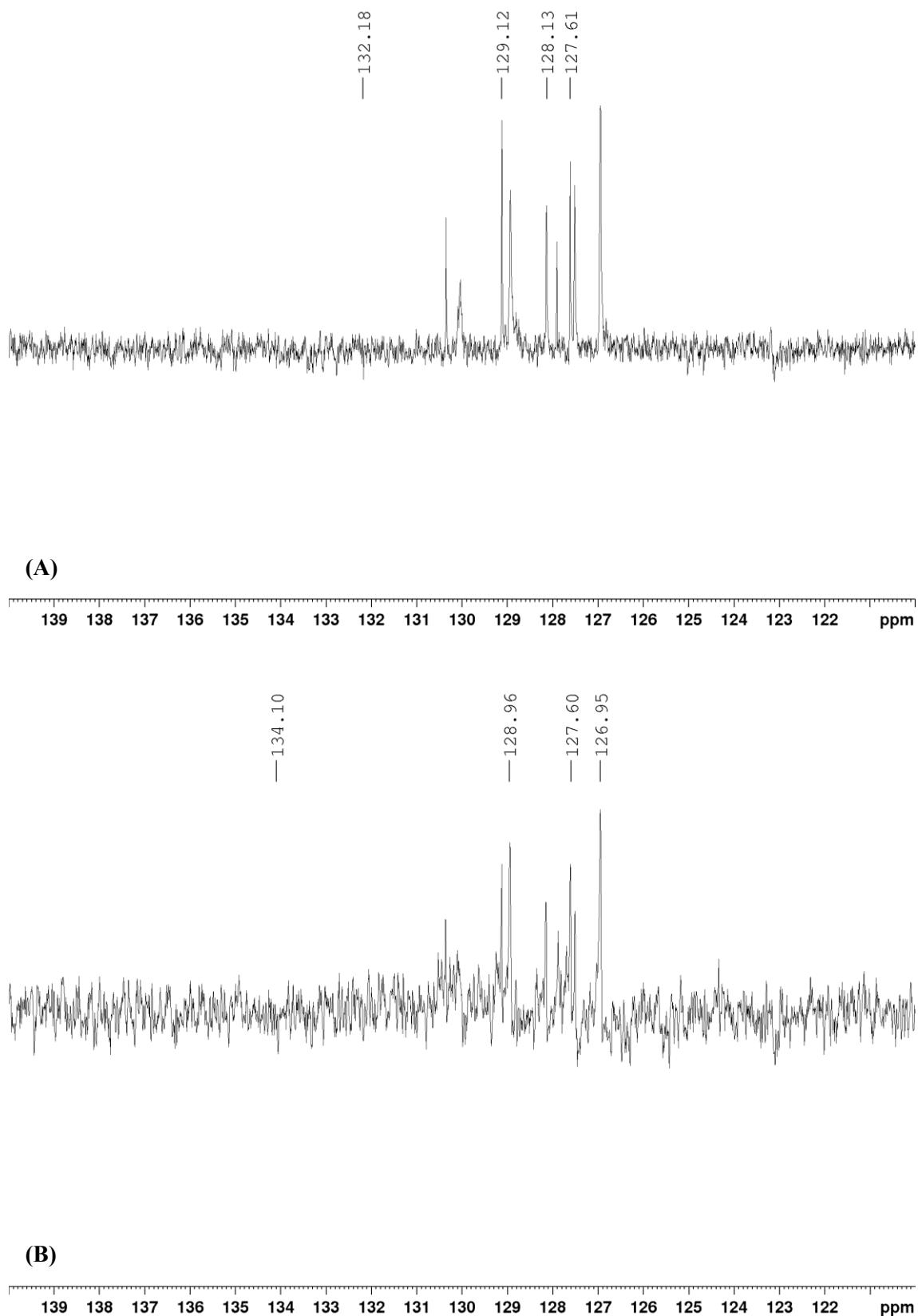
Fonte: a autora.

Figura 85. Ampliação do espectro 82 (δ 28,6–30,4) dos derivados **39 (A)** e **40 (B)**.



Fonte: a autora.

Figura 86. Ampliação do espectro 82 (δ 120,0–140,0) dos derivados **39 (A)** e **40 (B)**.

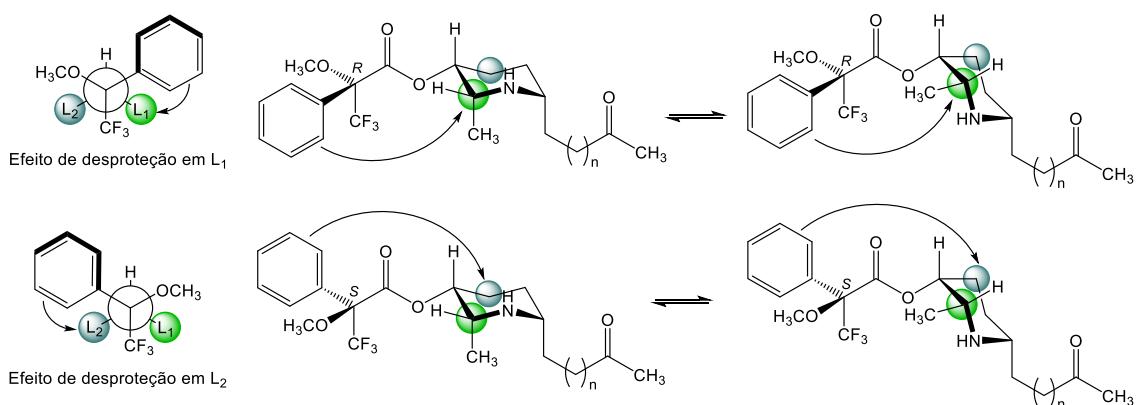


Fonte: a autora.

2.5.1.3 Análise dos ésteres de Mosher 37–40 por RMN 1H

Através das análises dos espectros de RMN de 1H e observando o efeito anisotrópico dos grupos arila dos RDQs sobre os substituintes do centro estereogênico carbinólico (C-3), é possível obter informações a respeito da configuração absoluta dos alcaloides **18** e **24**. Para os ésteres de MTPA, devemos levar em consideração o efeito de desproteção exercido pelo anel aromático sobre os substituintes ligados no C-3 do núcleo piperidínico, ou seja, H-2 e H-4. Estudos teóricos indicam que a conformação mais favorecida para o auxiliar quiral (MTPA) seria aquela com as ligações C_a –CF₃ e C=O na forma anti-periplanar (*ap*), independente da estrutura do álcool. Fazendo uma análise criteriosa dos derivados sintetizados, de acordo com nosso modelo, o efeito anisotrópico de desproteção foi observado sobre o H-2 nos derivados com (*R*)-MTPA (**37** e **39**), enquanto nos derivados com (*S*)-MTPA (**38** e **40**) o efeito foi sobre H-4 (Figura 87) (Tabelas 8 e 9).

Figura 87. Análise conformacional dos ésteres de Mosher do (*R*)- e (*S*)-MTPA e avaliação do efeito de desproteção.



Fonte: a autora.

Tabela 8. Valores específicos de deslocamentos químicos de RMN de 1H para os diastereômeros de Mosher **37** e **38**, bem como as magnitudes das medidas de $\Delta\delta^{RS}$.

	H-2	H-4a	H-4b
(<i>R</i>)-MTPACASSINA (37)	3,50	1,66	1,54
(<i>S</i>)-MTPACASSINA (38)	3,44	1,73	1,56
$\Delta\delta^{RS}$	+ 0,06	– 0,07	– 0,02

Fonte: a autora.

Tabela 9. Valores específicos de deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os diastereômeros de Mosher **39** e **40**, bem como as magnitudes das medidas de $\Delta\delta^{\text{RS}}$.

	H-2	H-4a	H-4b
(<i>R</i>)-MTPAESPECTALINA (39)	3,49	1,58	1,52
(<i>S</i>)-MTPAESPECTALINA (40)	3,47	1,77	1,55
$\Delta\delta^{\text{RS}}$	+ 0,02	- 0,19	- 0,03

Fonte: a autora.

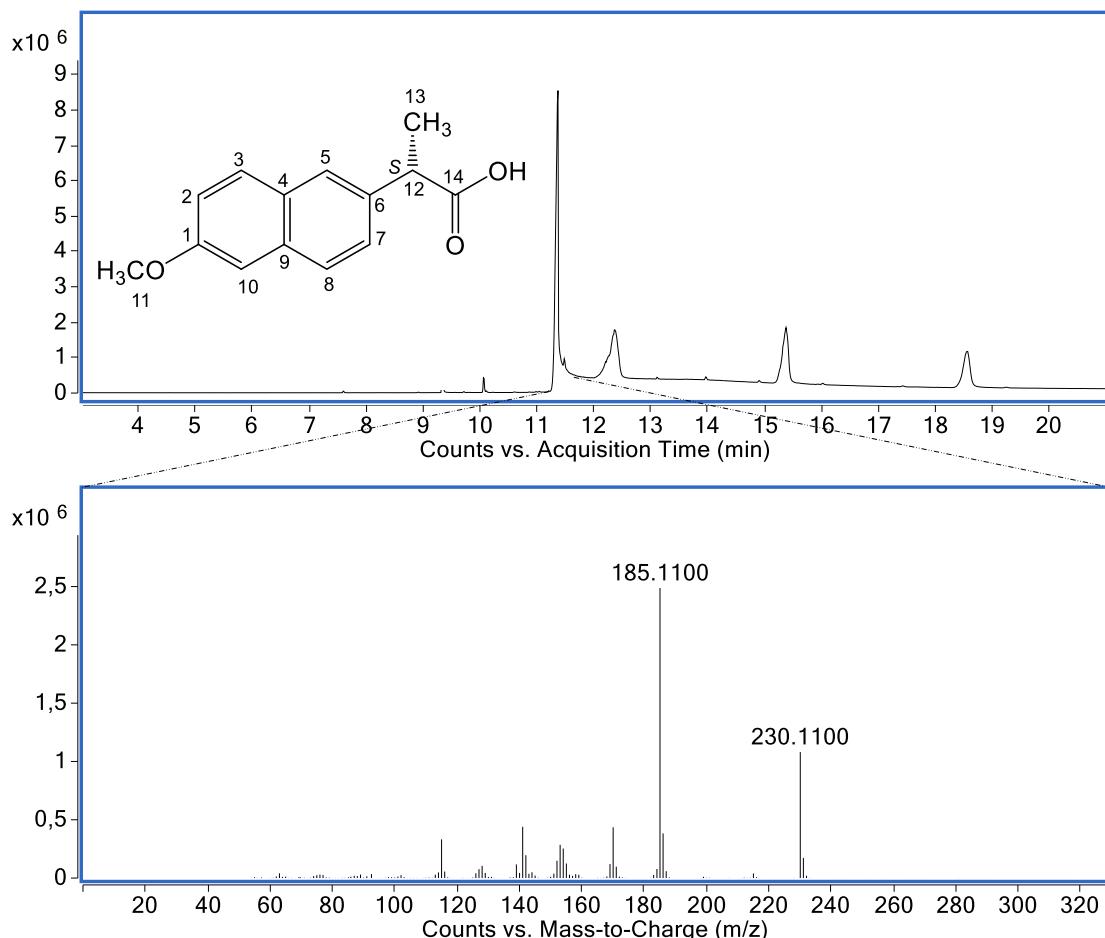
Nesse sentido, as tabelas 8 e 9 trazem os deslocamentos químicos dos hidrogênios que sofreram o efeito anisotrópico dos reagentes auxiliares de Mosher e os valores de $\Delta\delta^{\text{RS}} > 0$ para H-2 e $\Delta\delta^{\text{RS}} < 0$ para H-4 sugerem que a configuração absoluta do C-3 dos alcaloides piperidínicos (–)-cassina e (–)-espectralina é *R*.

2.5.2 Reação com os RDQs (+)-(S)-naproxeno

Como uma alternativa economicamente viável de determinação das estereoquímicas dos alcaloides de *S. spectabilis*, o princípio ativo do fármaco comercial Naproxeno Sódico®, vendido na forma enantiometricamente pura (+)-(S)-naproxeno (**36**), também foi utilizado como RDQ. Assim, o princípio ativo, em sua forma ácida, foi extraído (item 2.4.1.2) e analisado por CG-EM (Figura 88) e RMN para confirmação da pureza do material (Figuras 89–94) (Tabela 10).

A análise por CG-EM permitiu observar a presença de um sinal majoritário com t_{R} 11,4 min. O pico referente ao íon foi observado em m/z 230, corroborando com a fórmula molecular do (+)-(S)-naproxeno, $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$. Além disso, o pico base com m/z 185 sugere uma descarboxilação do composto durante o processo de ionização.

Figura 88. Cromatograma (CG-EM) e EM-IE do (+)-(S)-naproxeno (**36**).

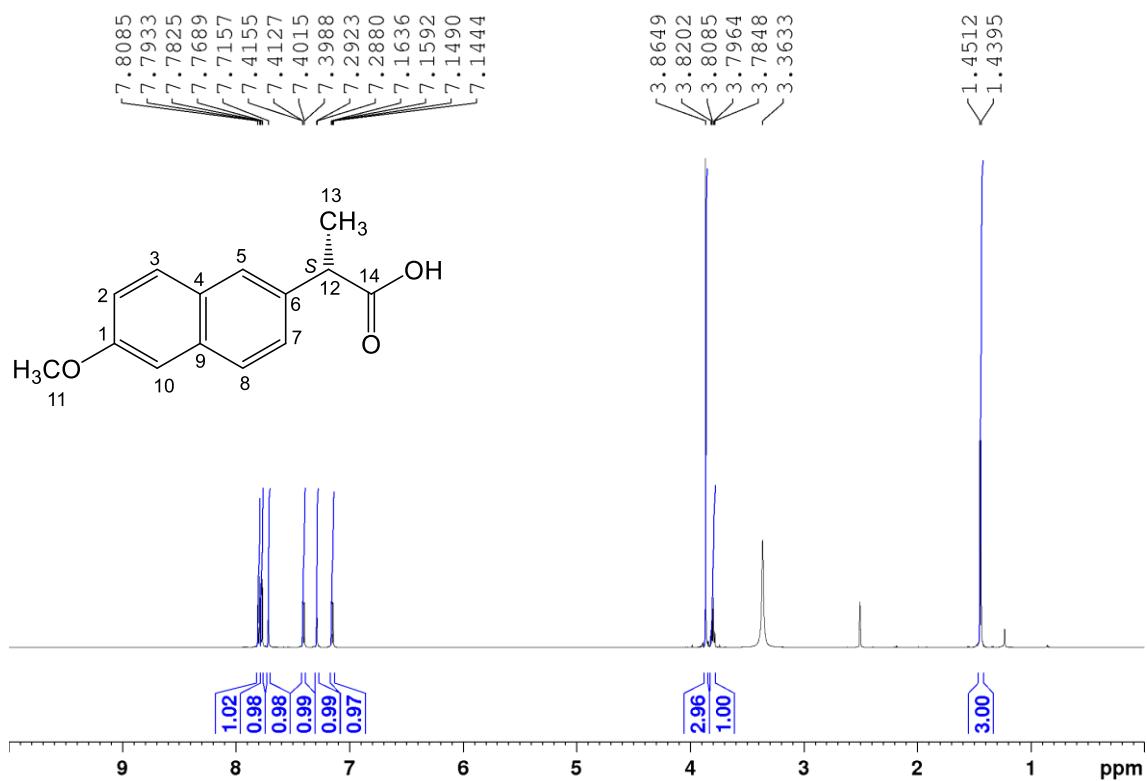


Fonte: a autora.

A análise dos espectros de RMN de ¹H do composto **36** (Tabela 10) (Figuras 89–91) permitiu observar os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (H-2, H-3, H-5, H-7, H-8 e H-10), à metoxila (H-11), ao hidrogênio alfa (H-12) e à metila (H-13) em δ 7,15 (1H, dd, J = 8,9; 2,5 Hz), δ 7,79 (1H, d, J = 8,9 Hz), δ 7,71 (1H, s), δ 7,76 (1H, d, J = 8,6 Hz), δ 7,41 (1H, dd, J = 8,6 ; 1,8 Hz), δ 7,28 (1H, d, J = 2,5 Hz), δ 3,86 (3H, s), δ 3,80 (1H, q, J = 7,0 Hz) e δ 1,44 (3H, d, J = 7,0 Hz).

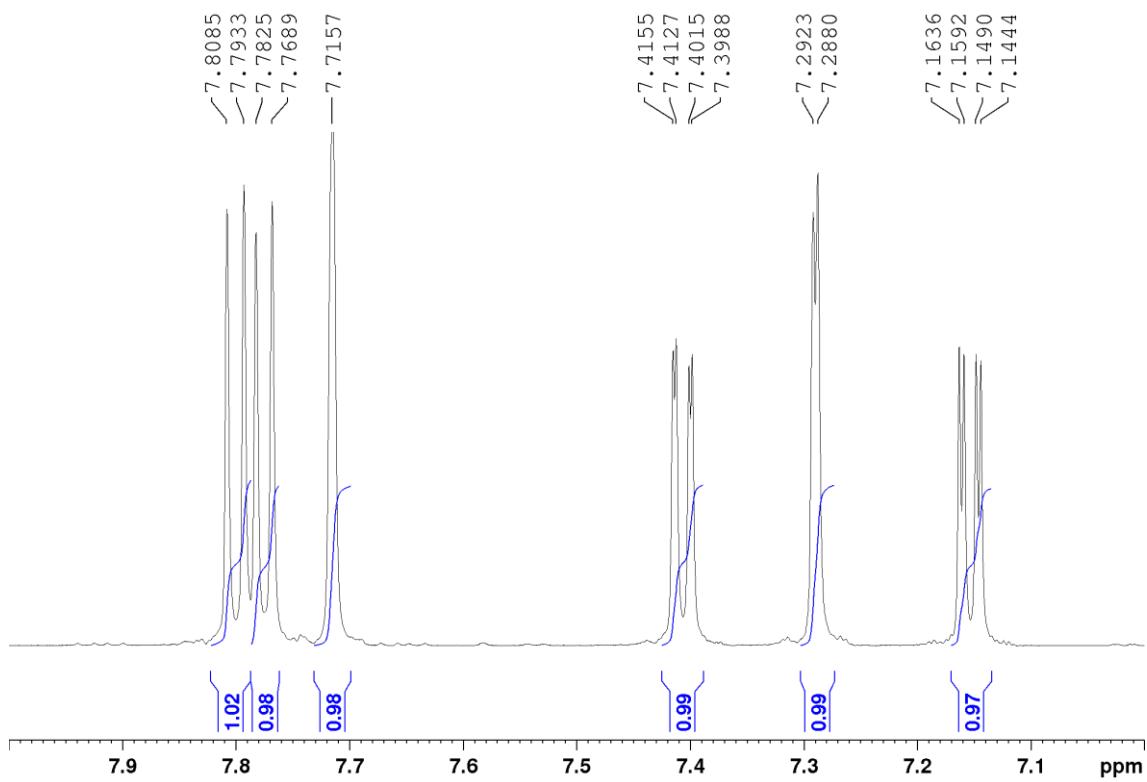
Nos espectros de ¹³C DEPTQ (Tabela 10) (Figuras 92–94) foram identificados os sinais δ 157,56 (C), δ 119,15 (CH), δ 129,57 (CH), δ 128,85 (C), δ 126,88 (CH), δ 136,37 (C), δ 127,29 (CH), δ 126,02 (CH), δ 133,69 (C), δ 106,14 (CH), δ 55,61 (CH₃), δ 45,04 (CH), δ 18,91 (CH₃) e δ 175,94 (C) relativos aos carbonos C-1"–C-14", respectivamente.

Figura 89. Espectro de RMN de ^1H do (+)-(S)-naproxeno (**36**) (600 MHz, DMSO).



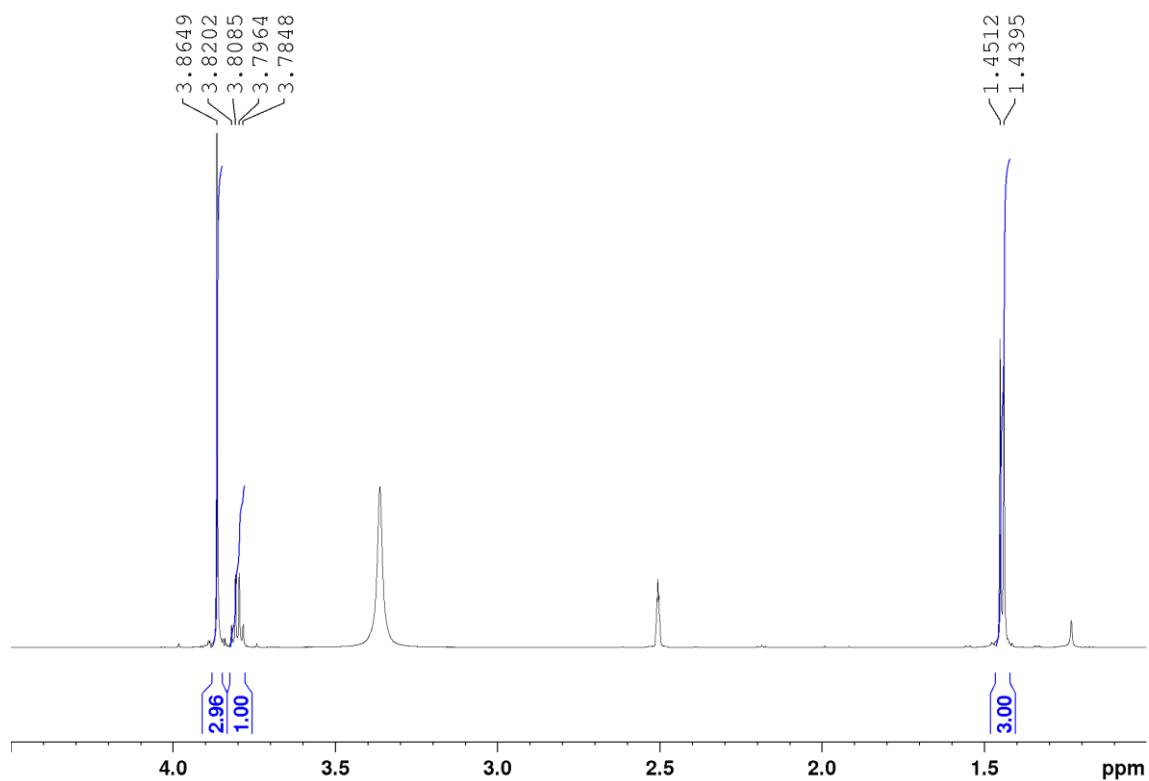
Fonte: a autora.

Figura 90. Ampliação do espectro 70 (δ 7,0–8,0) do (+)-(S)-naproxeno (**36**).



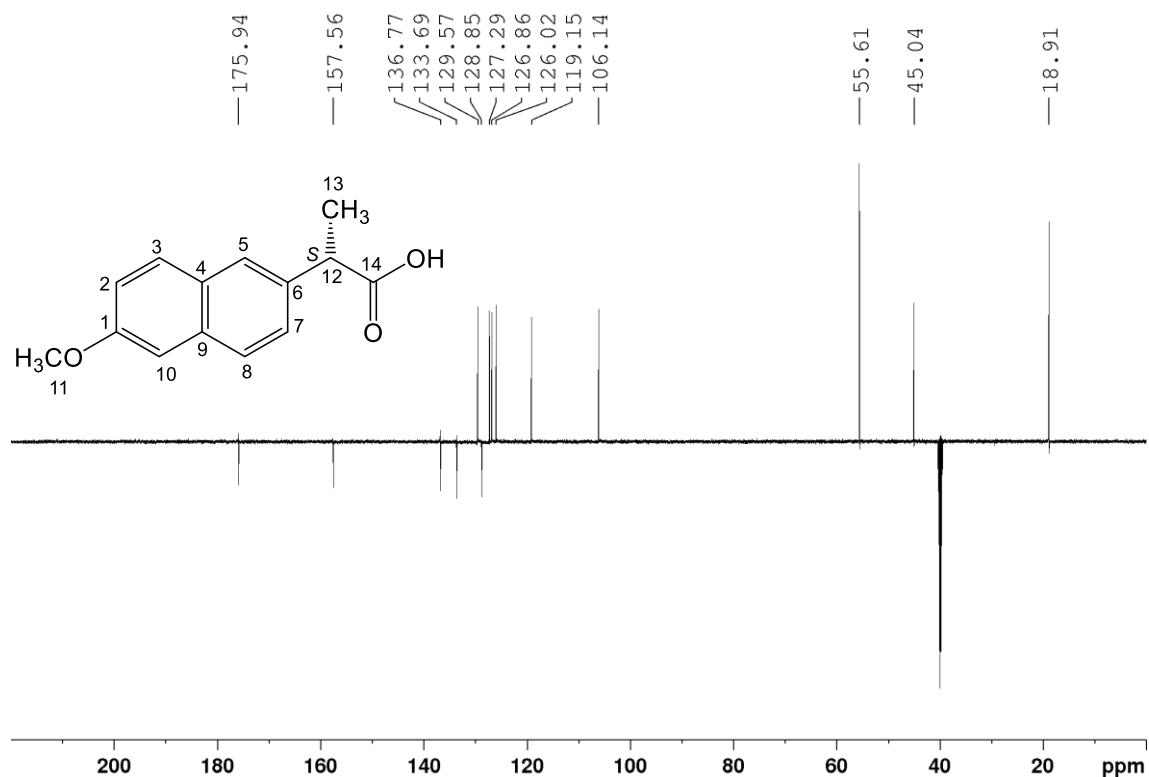
Fonte: a autora.

Figura 91. Ampliação do espectro 70 (δ 4,5–1,0) do (+)-(S)-naproxeno (**36**).



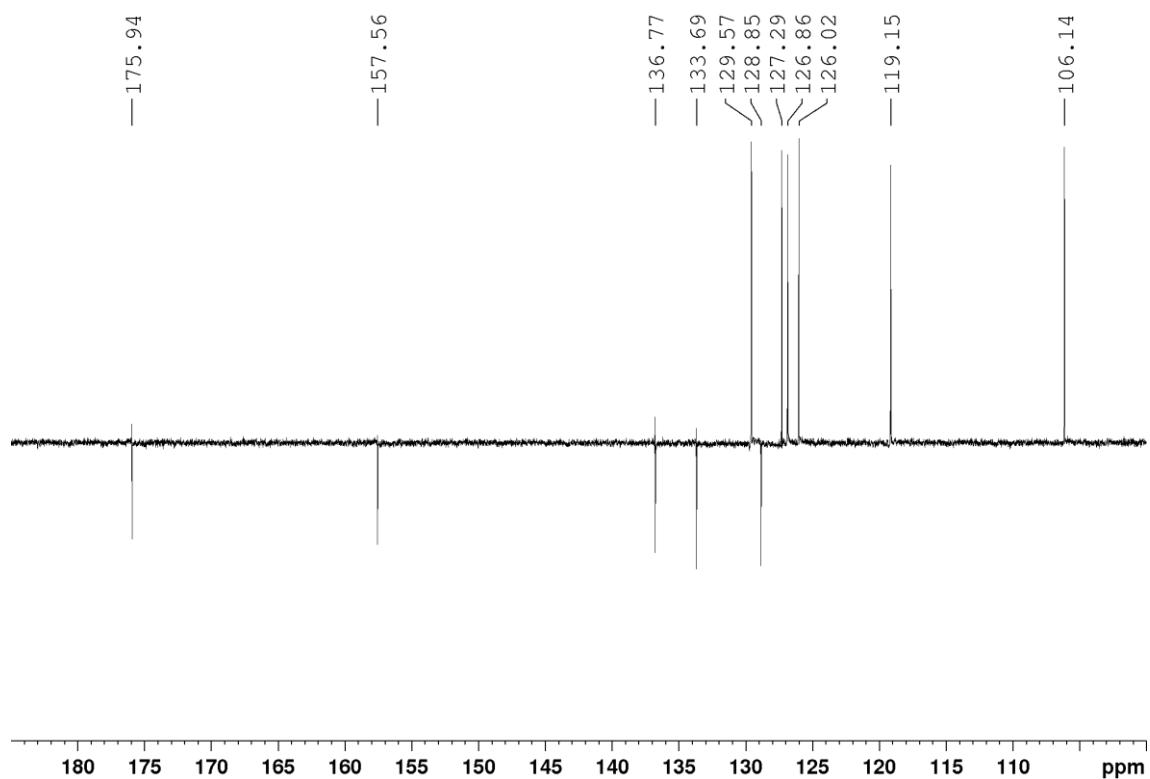
Fonte: a autora.

Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C DEPTQ do (+)-(S)-naproxeno (**36**) (150 MHz, DMSO).



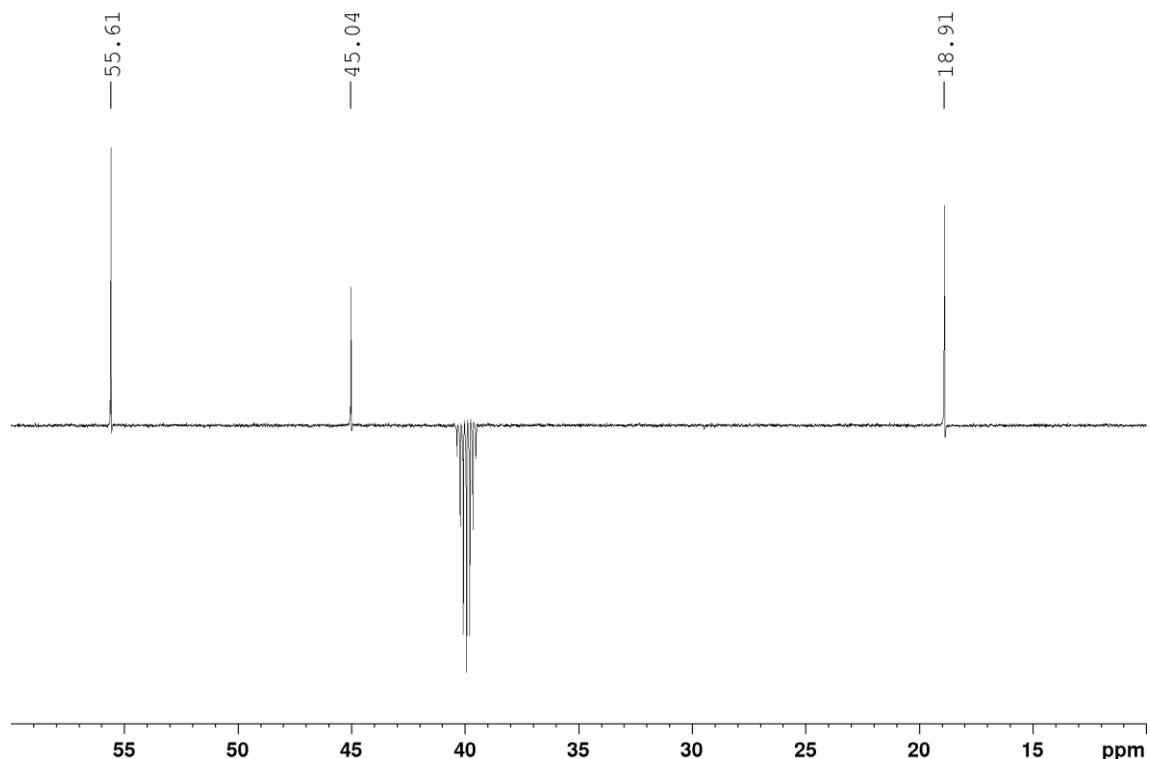
Fonte: a autora.

Figura 93. Ampliação do espectro 73 (δ 100,0–185,0) do (+)-(S)-naproxeno (**36**).



Fonte: a autora.

Figura 94. Ampliação do espectro 73 (δ 10,0–60,0) do (+)-(S)-naproxeno (**36**).



Fonte: a autora.

Tabela 10. Dados de RMN (+)-(S)-naproxeno (**36**) em DMSO.

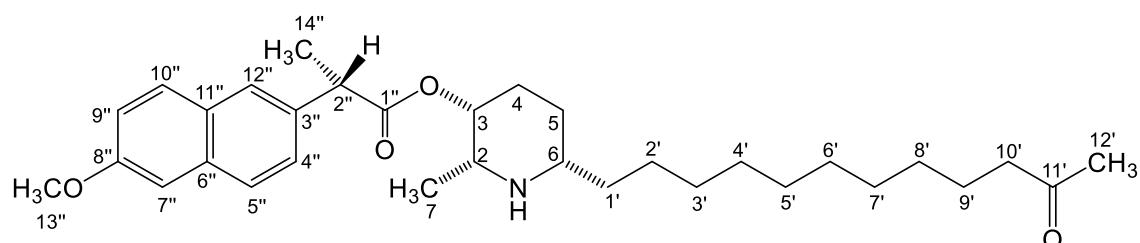
Posição	(+)-(S)-naproxeno (36)	
	^1H δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	^{13}C DEPTQ δ_{C}^a (mult.) ^b
1	—	157,56 (C)
2	7,15 dd (8,9; 2,5)	119,15 (CH)
3	7,79 d (8,9)	129,57 (CH)
4	—	128,85 (C)
5	7,71 s	126,88 (CH)
6	—	136,37 (C)
7	7,76 d (8,6)	127,29 (CH)
8	7,41 dd (8,6; 1,8)	126,02 (CH)
9	—	133,69 (C)
10	7,28 d (2,5)	106,14 (CH)
11	3,86 s	55,61 (CH_3)
12	3,80 q (7,02)	45,04 (CH)
13	1,44 d (7,02)	18,91 (CH_3)
14	—	175,94 (C)

^aOs experimentos de RMN foram realizados a 600 e 150 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} 0,00$). ^bMultiplicidade: s (simpleto); d (dupliceto); t (triplete); q (quadruplete); qt (quintuplete); m (multiplete).

Fonte: a autora

As reações de esterificação usando (+)-(S)-naproxeno (**36**) e os cloridratos **18a** e **24a** foram realizadas segundo o protocolo do item 2.4.1.3 e os produtos (S)-naproxeno–cassina (**41**) e (S)-naproxeno–espectralina (**42**) analisados por RMN.

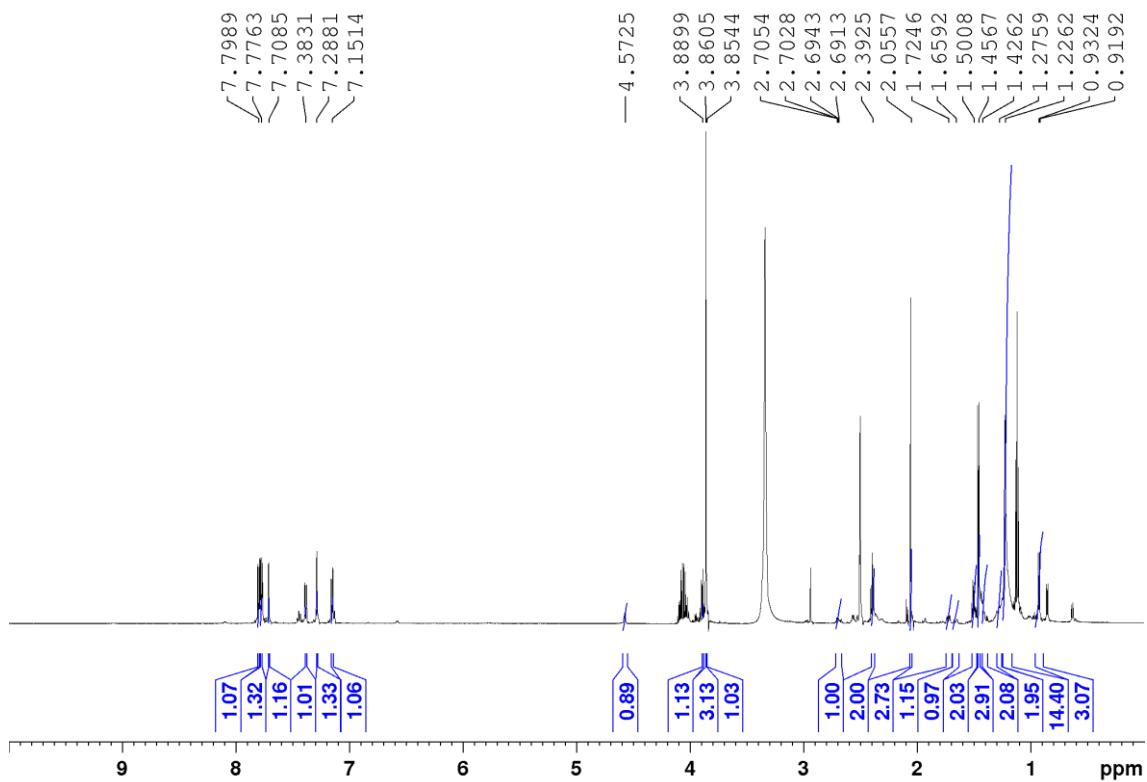
2.5.2.1 Elucidação estrutural do derivado **41**



A análise dos espectros de RMN de ^1H do derivado **41** (Figuras 95–98) permitiu observar os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-cassina (**18**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos hidrogênios do (+)-(S)-naproxeno. Nesse sentido, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para

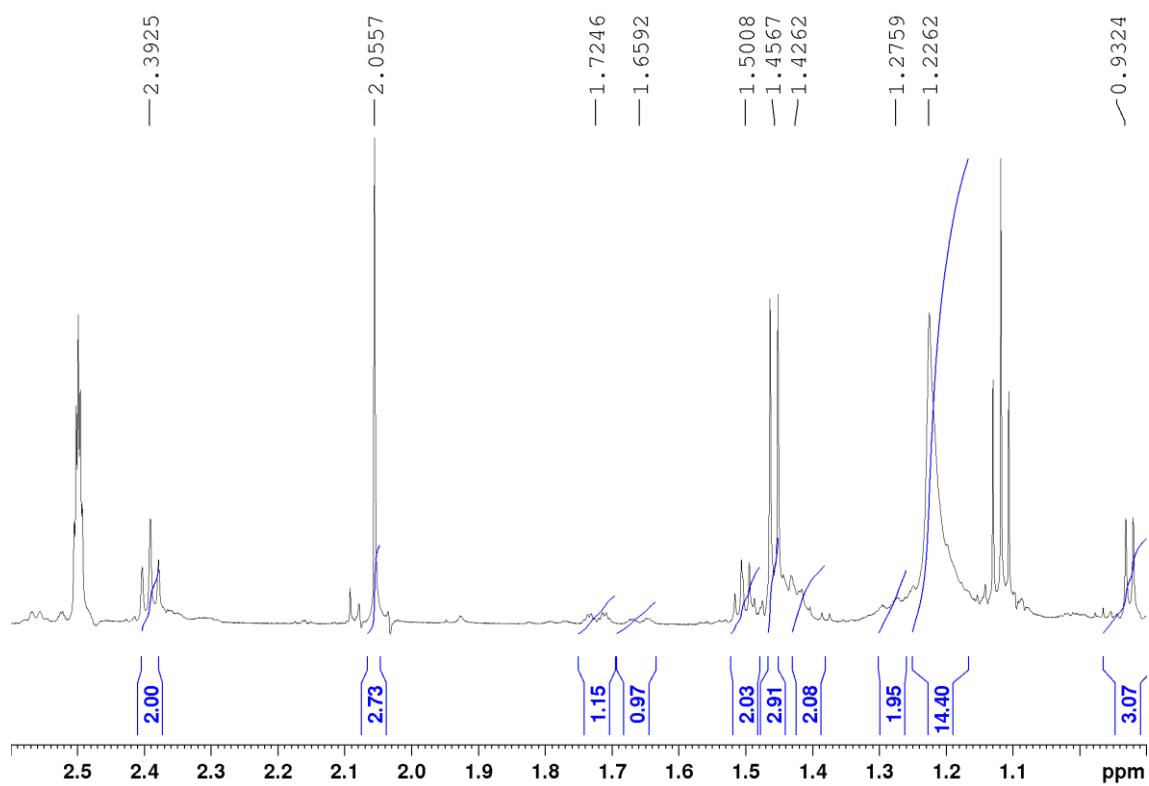
41 em δ 3,85 (1H, m), δ 4,57 (1H, m), δ 1,72 (1H, m), δ 1,66 (1H, m), δ 1,50 (2H, m), δ 2,69 (1H, m) e δ 0,92 (3H, d), relativos aos hidrogênios H-2, H-3, H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, H-6 e H-7, respectivamente. Além disso, os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (H-4'', H-5'', H-7'', H-9'', H-10'' e H-12''), ao hidrogênio alfa (H-2''), à metila (H-14'') e à metoxila (H-13'') foram identificados em δ 7,38 (1H), δ 7,80 (1H), δ 7,29 (1H), δ 7,15 (1H), δ 7,78 (1H), δ 7,71 (1H), δ 3,89 (1H), δ 1,46 (3H) e δ 3,86 (3H) para **41**.

Figura 95. Espectro de RMN de ^1H do derivado **41** (500 MHz, DMSO).



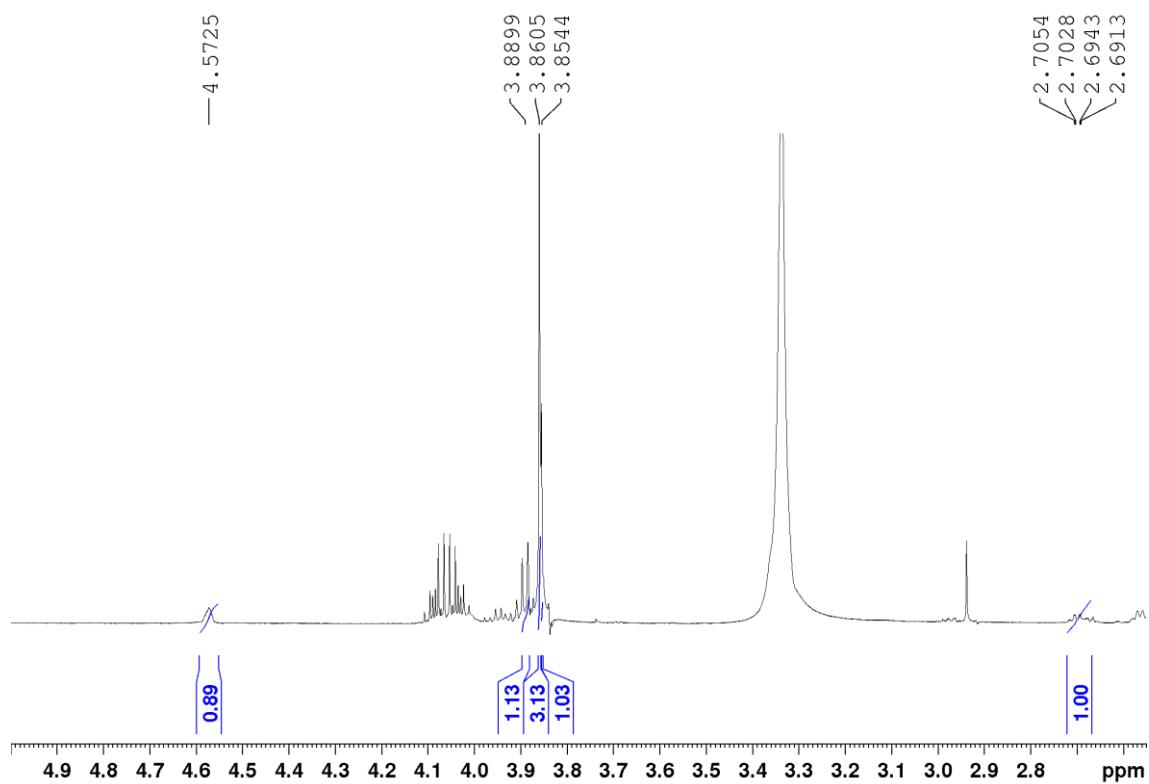
Fonte: a autora.

Figura 96. Ampliação do espectro 95 (δ 0,9–2,6) do derivado **41**.



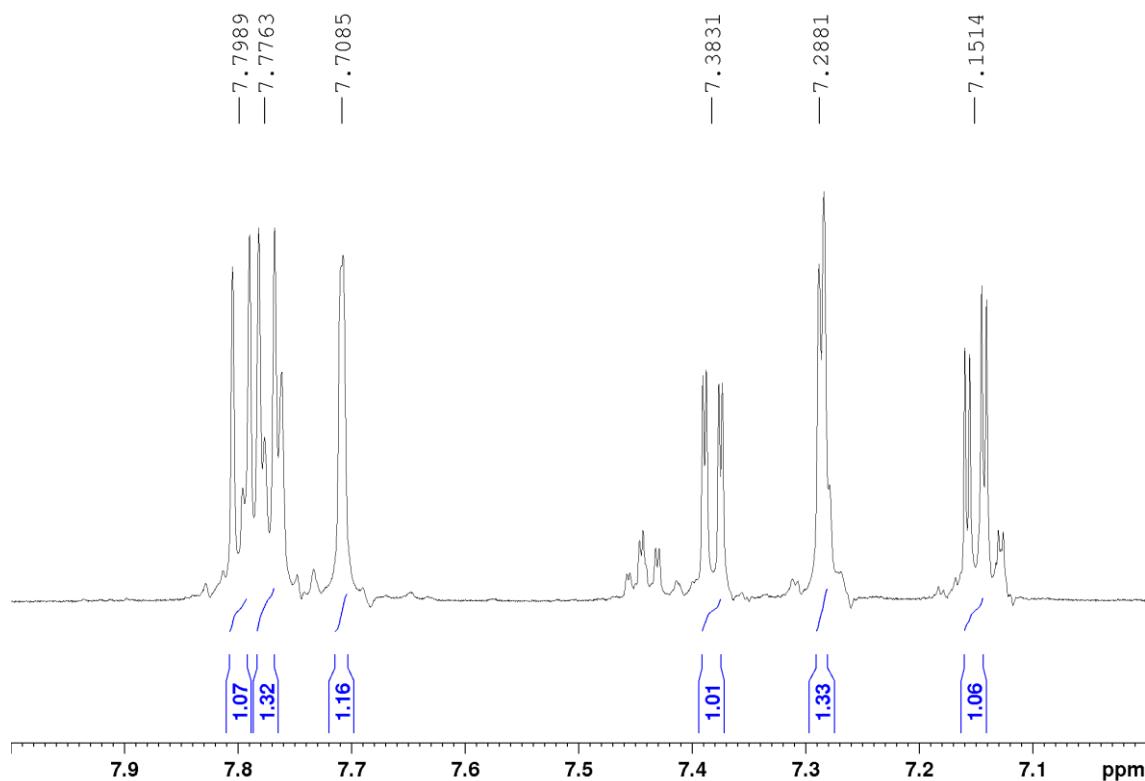
Fonte: a autora.

Figura 97. Ampliação do espectro 95 (δ 2,55–5,0) do derivado **41**.



Fonte: a autora.

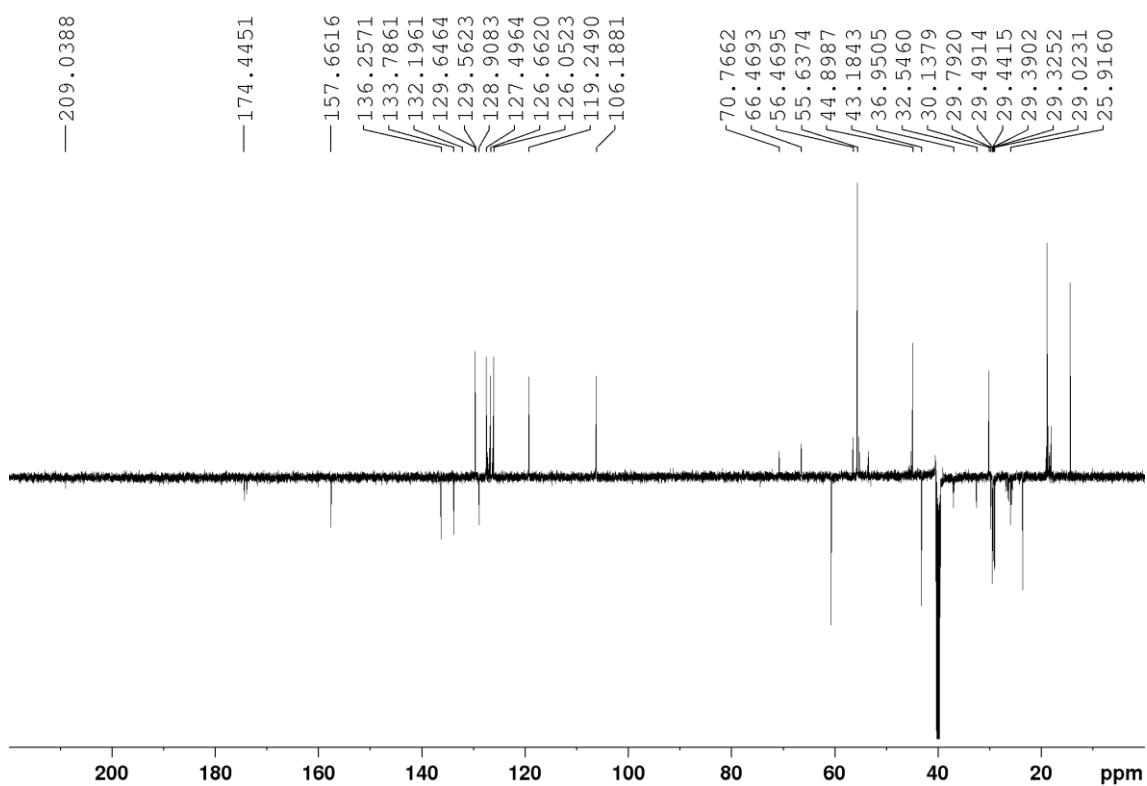
Figura 98. Ampliação do espectro 95 (δ 7,0–8,0) do derivado **41**.



Fonte: a autora.

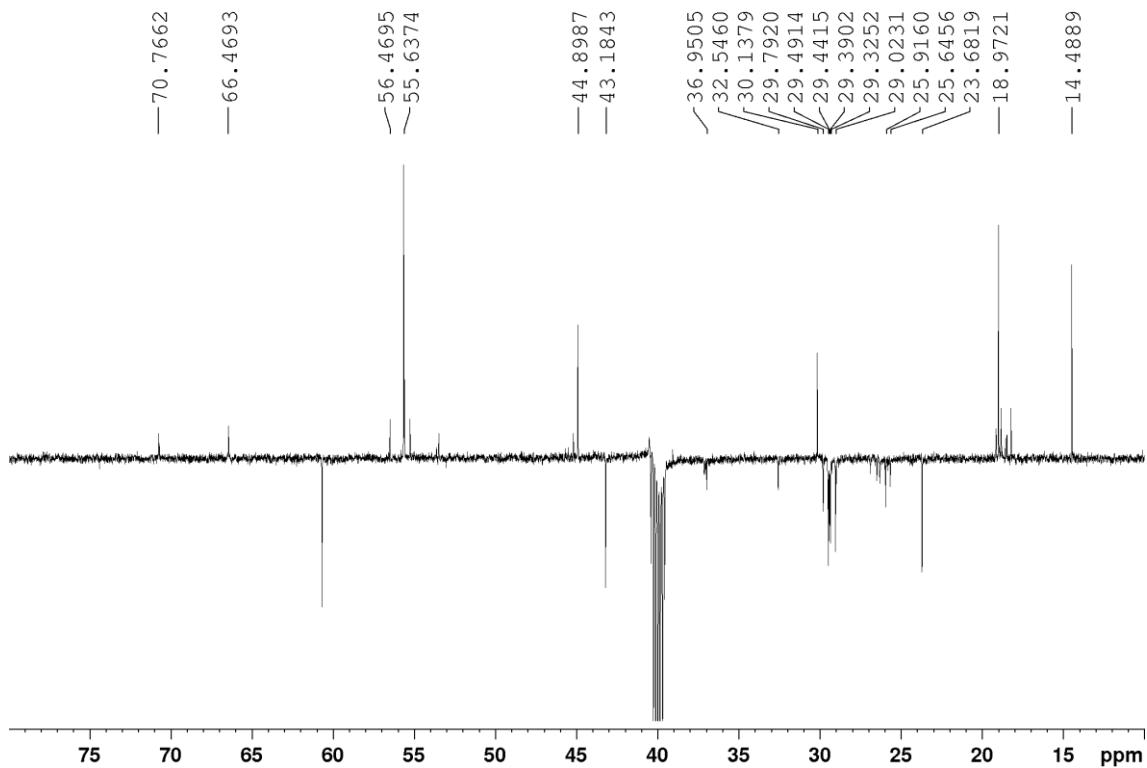
Nos espectros de ^{13}C DEPTQ (Figuras 99–103) foram observados os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-cassina (**18**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos carbonos do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos carbonos do (+)-(S)-naproxeno. Assim, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **41** em δ 66,47 (CH), δ 70,77 (CH), δ 25,64 (CH₂), δ 25,92 (CH₂), δ 56,47 (CH) e δ 18,97 (CH₃), relativos aos carbonos C–2, C–3, C–4, C–5, C–6 e C–7, respectivamente. Ainda, foram identificados os sinais δ 174,44 (C), δ 44,90 (C), δ 133,79 (C), δ 129,56 (CH), δ 126,70 (CH), δ 132,20 (C), δ 106,19 (CH), δ 157,66 (C), δ 119,25 (CH), δ 129,65 (CH), δ 128,91 (C), δ 127,50 (CH), δ 55,64 (CH₃) e δ 14,49 (CH₃) para **41**, relativos aos carbonos C–1"–C–14", respectivamente.

Figura 99. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq do derivado **41** (150 MHz, DMSO).



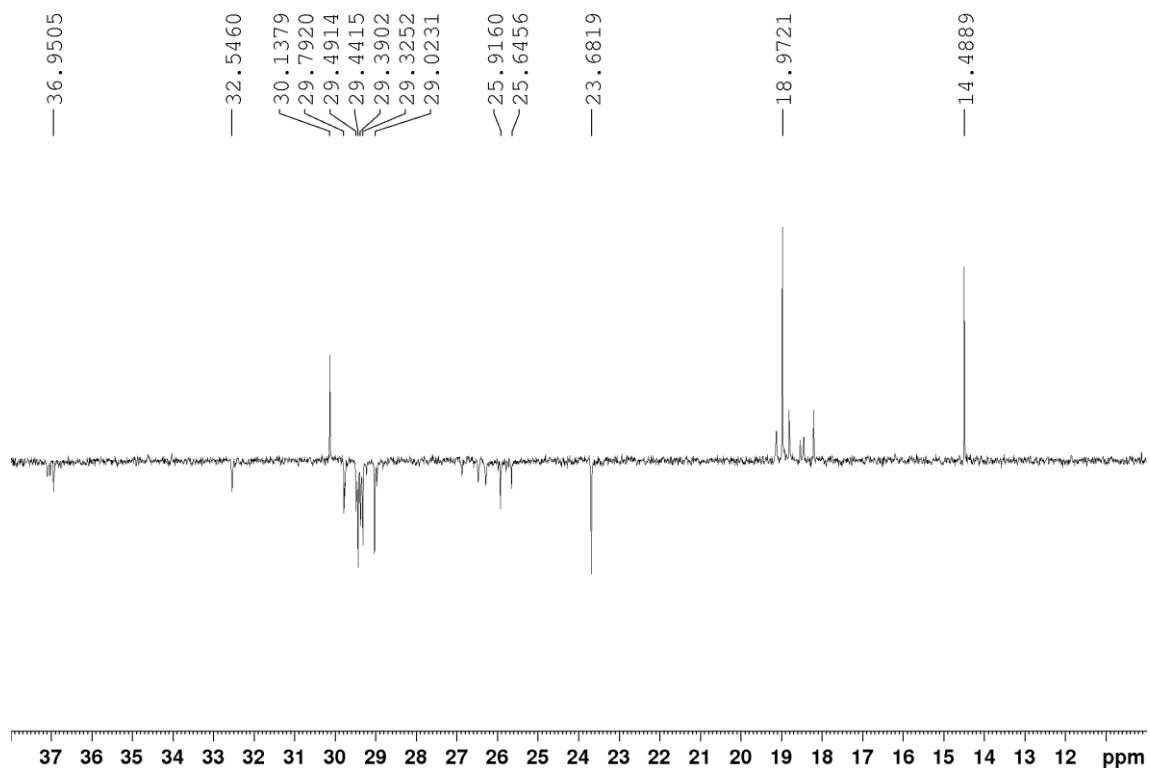
Fonte: a autora.

Figura 100. Ampliação do espectro 99 (δ 10,0–80,0) do derivado **41**.



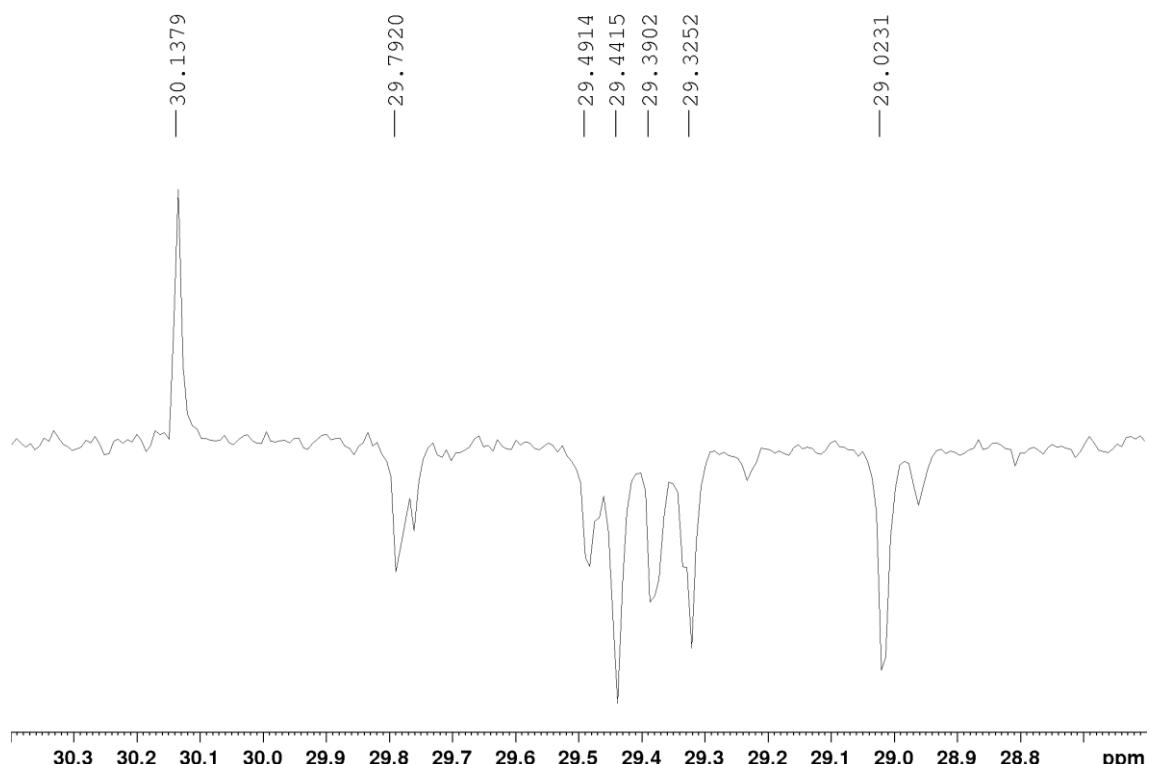
Fonte: a autora.

Figura 101. Ampliação do espectro 99 (δ 10,0–38,0) do derivado **41**.



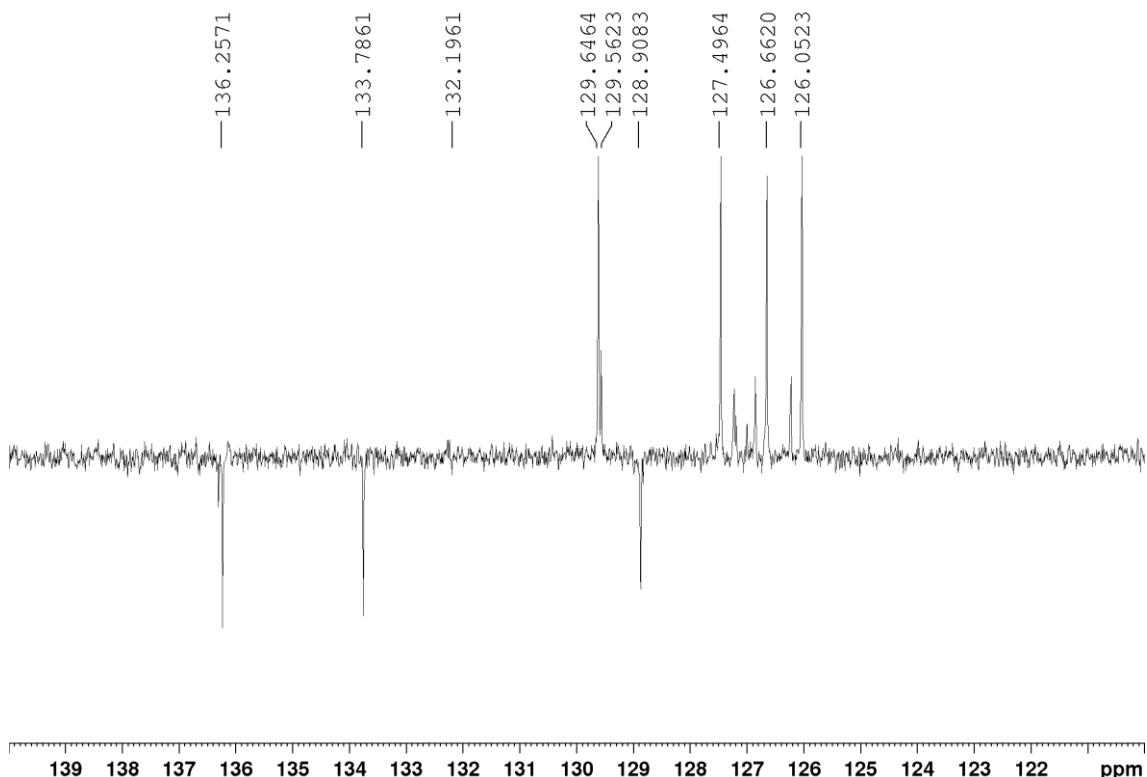
Fonte: a autora.

Figura 102. Ampliação do espectro 99 (δ 28,6–30,4) do derivado **41**.



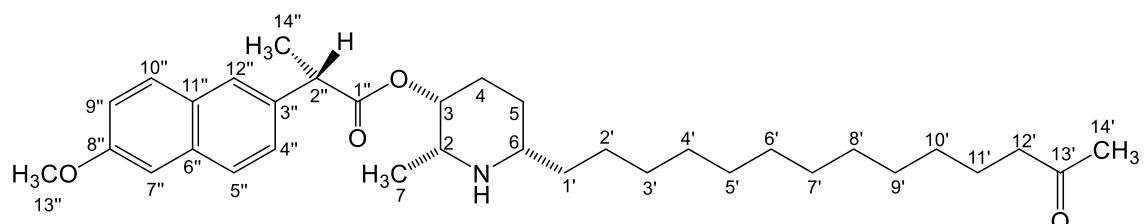
Fonte: a autora.

Figura 103. Ampliação do espectro 99 (δ 120,0–140,0) do derivado **41**.



Fonte: a autora.

2.5.2.2 Elucidação estrutural do derivado **42**

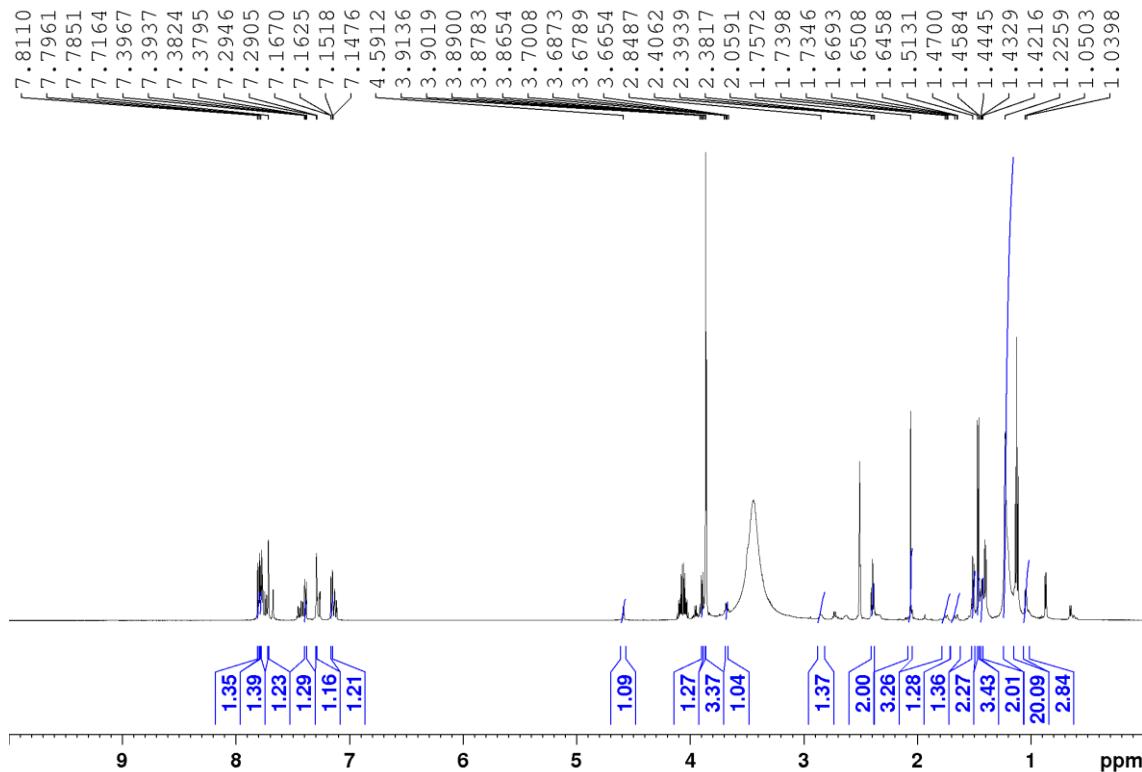


A análise dos espectros de RMN de ^1H do derivado **42** (Figuras 104–107) permitiu observar os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-espectralina (**24**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos hidrogênios do (+)-(S)-naproxeno. Nesse sentido, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **42** em δ 3,68 (1H, m), δ 4,60 (1H, m), δ 1,74 (1H, m), δ 1,65 (1H, m), δ 1,51 (2H, m), δ 2,85 (1H, m) e δ 1,04 (3H, d), relativos aos hidrogênios H–2, H–3, H–4a, H–4b, H–5a, H–5b, H–6 e H–7, respectivamente. Além disso, os sinais referentes aos hidrogênios

aromáticos (H-4", H-5", H-7", H-9", H-10" e H-12"), ao hidrogênio alfa (H-2"), à metila (H-14") e à metoxila (H-13") foram identificados em δ 7,38 (1H), δ 7,81 (1H), δ 7,29 (1H), δ 7,15 (1H), δ 7,80 (1H), δ 7,79 (1H), δ 3,89 (1H), δ 1,46 (3H) e δ 3,86 (3H) para **42**.

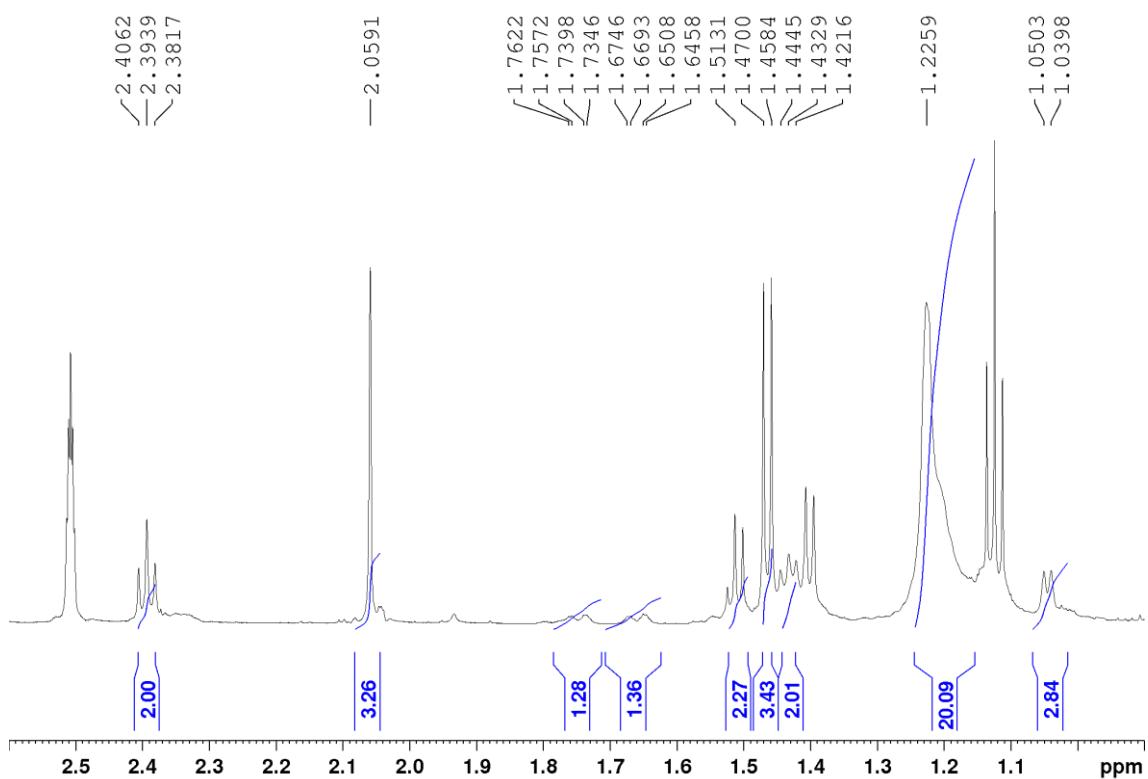
Nos espectros de ^{13}C DEPTQ (Figuras 108–112) foram observados os mesmos sinais referente ao alcaloide (–)-espectralina (**24**), com destaque para as alterações nos deslocamentos químicos dos carbonos do núcleo piperidínico devido à presença do grupo adicionado, além dos sinais referentes aos carbonos do (+)-(S)-naproxeno. Assim, foi possível identificar a presença de sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído para **42** em δ 66,47 (CH), δ 70,77 (CH), δ 25,64 (CH₂), δ 25,92 (CH₂), δ 56,47 (CH) e δ 18,97 (CH₃), relativos aos carbonos C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 e C-7, respectivamente. Ainda, foram identificados os sinais δ 174,44 (C), δ 44,90 (C), δ 133,79 (C), δ 129,56 (CH), δ 126,70 (CH), δ 132,20 (C), δ 106,19 (CH), δ 157,66 (C), δ 119,25 (CH), δ 129,65 (CH), δ 128,91 (C), δ 127,50 (CH), δ 55,64 (CH₃) e δ 14,49 (CH₃) para **42**, relativos aos carbonos C-1"–C-14", respectivamente.

Figura 104. Espectro de RMN de ^1H do derivado **42** (500 MHz, DMSO).



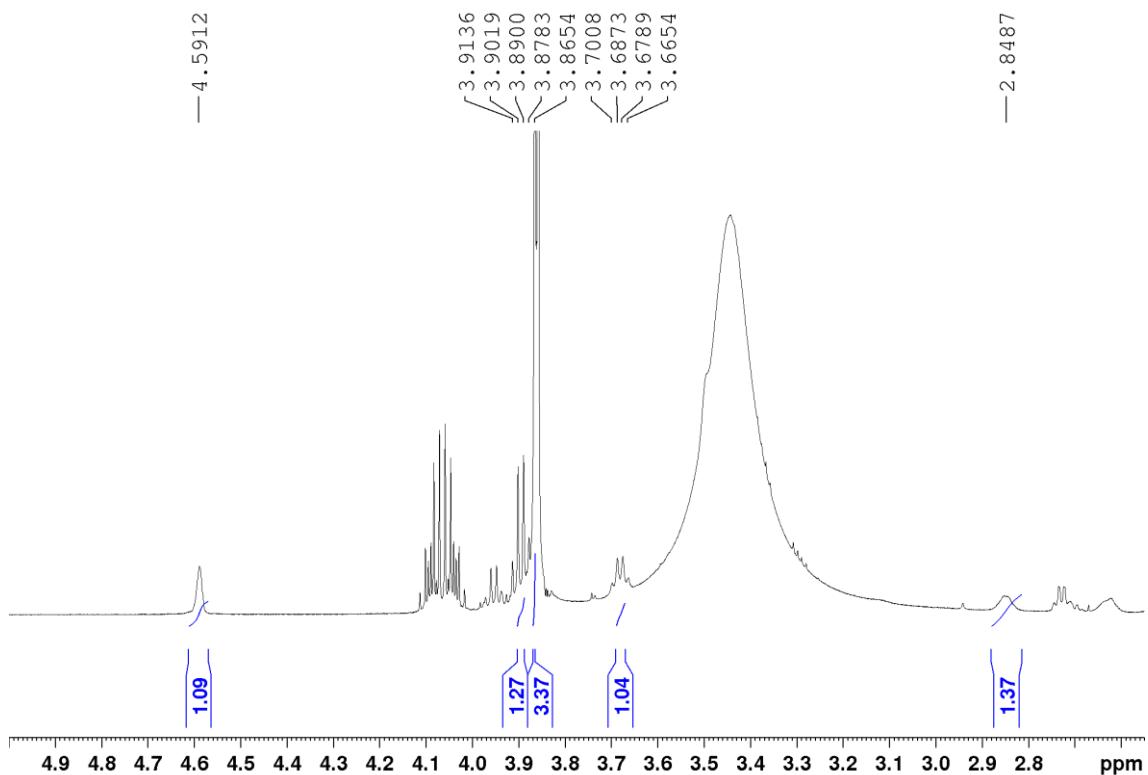
Fonte: a autora.

Figura 105. Ampliação do espectro 104 (δ 0,9–2,6) do derivado 42.



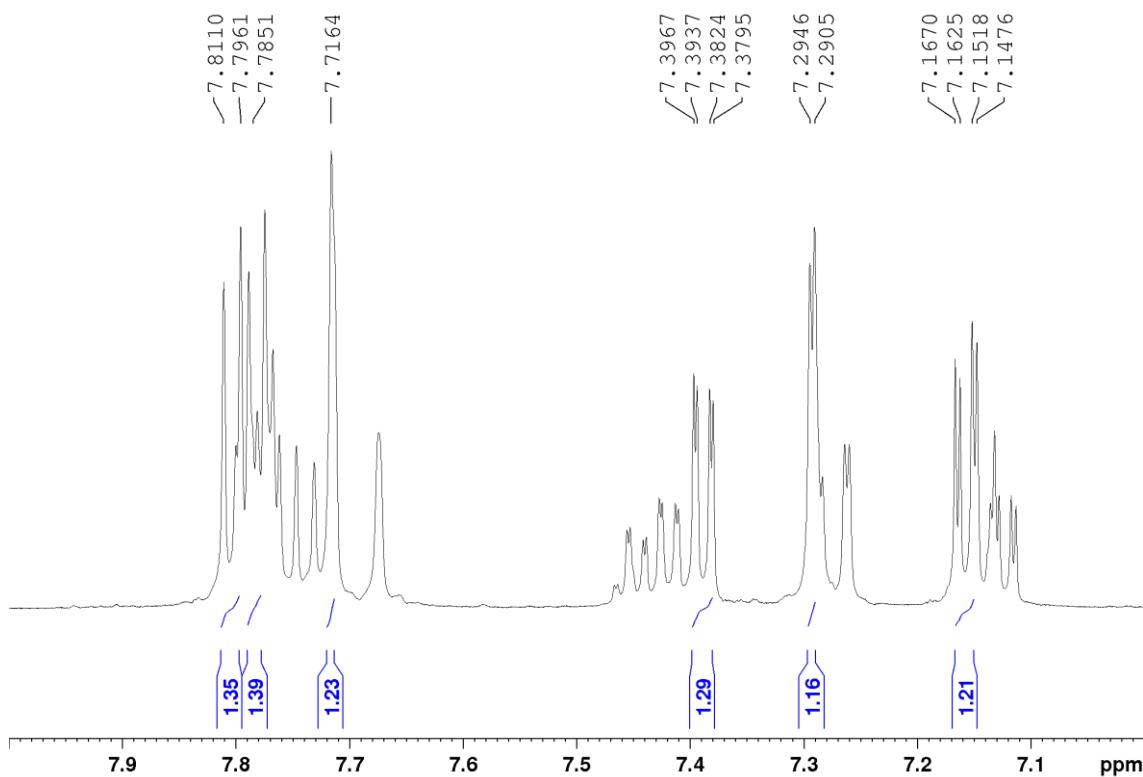
Fonte: a autora.

Figura 106. Ampliação do espectro 104 (δ 2,55–5,0) do derivado 42.



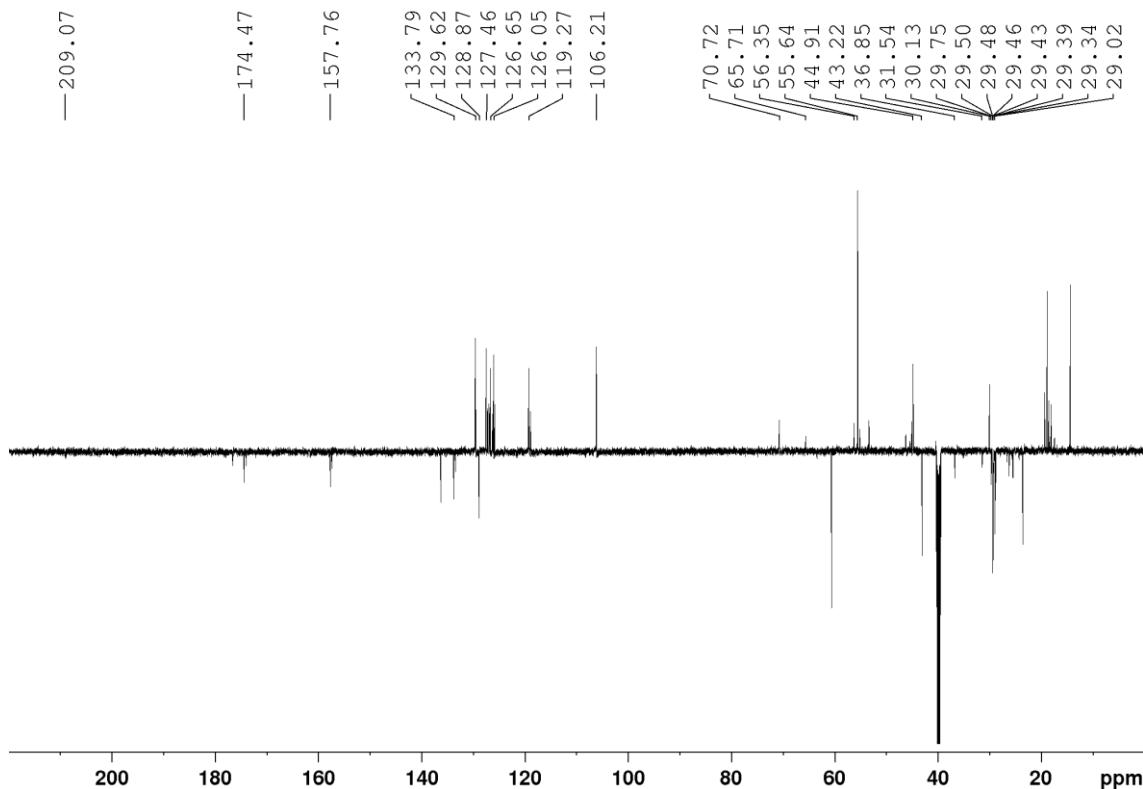
Fonte: a autora.

Figura 107. Ampliação do espectro 104 (δ 7,0–8,0) do derivado **42**.



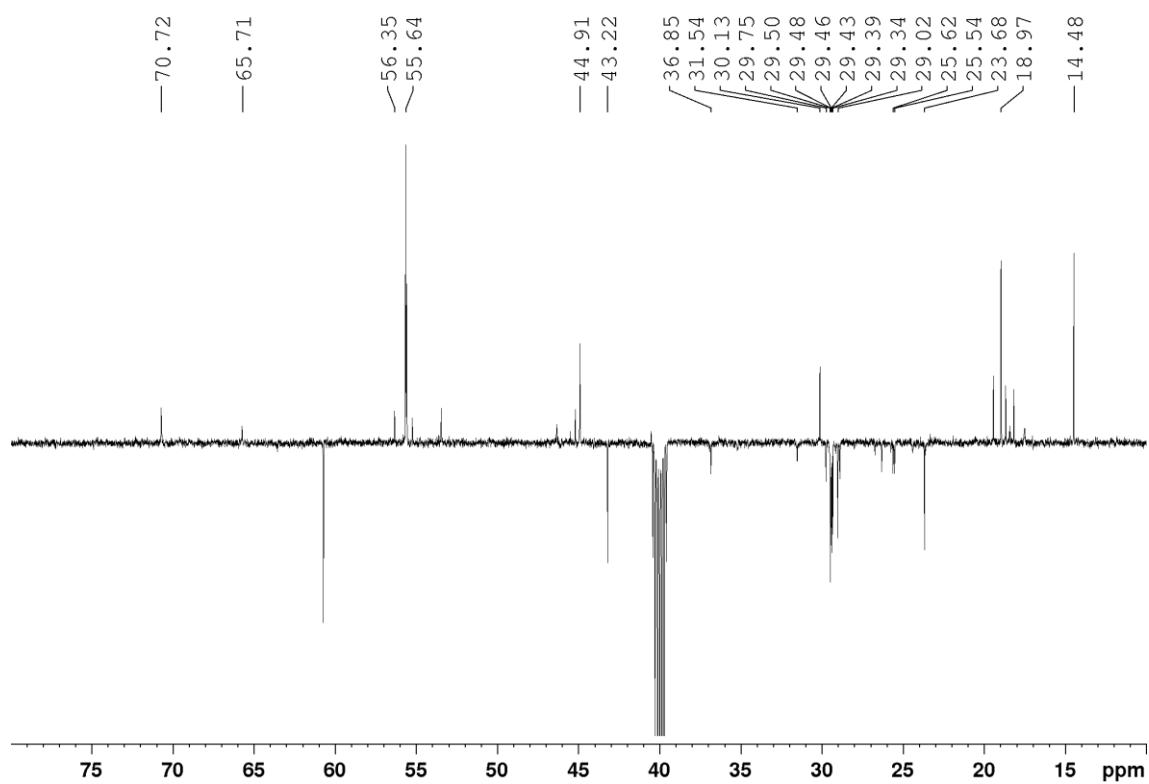
Fonte: a autora.

Figura 108. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTq do derivado **42** (150 MHz, DMSO).



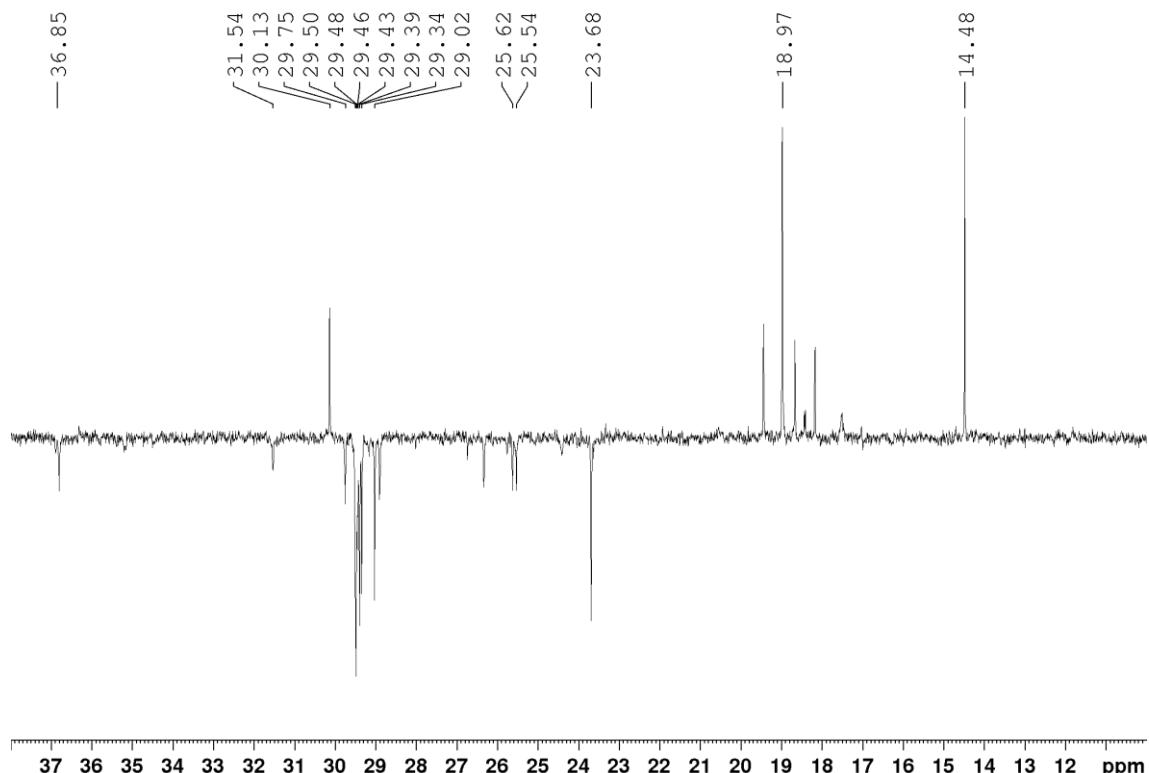
Fonte: a autora.

Figura 109. Ampliação do espectro 108 (δ 10,0–80,0) do derivado **42**.



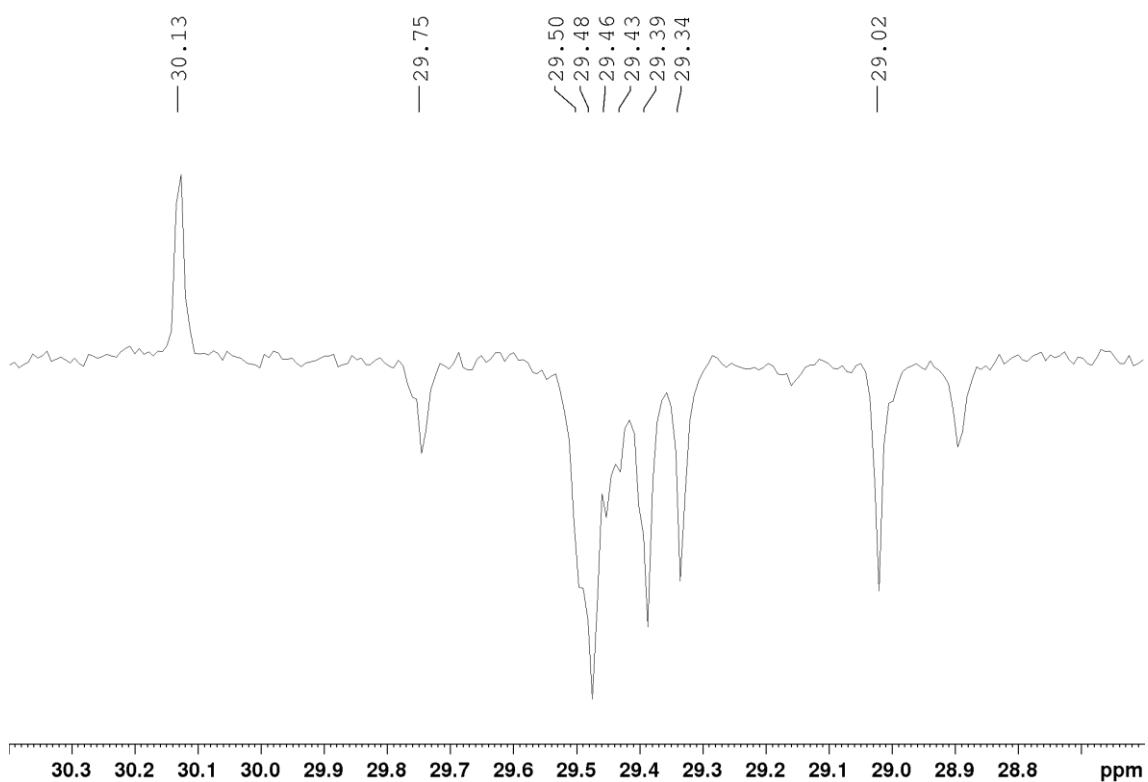
Fonte: a autora.

Figura 110. Ampliação do espectro 108 (δ 10,0–38,0) do derivado **42**.



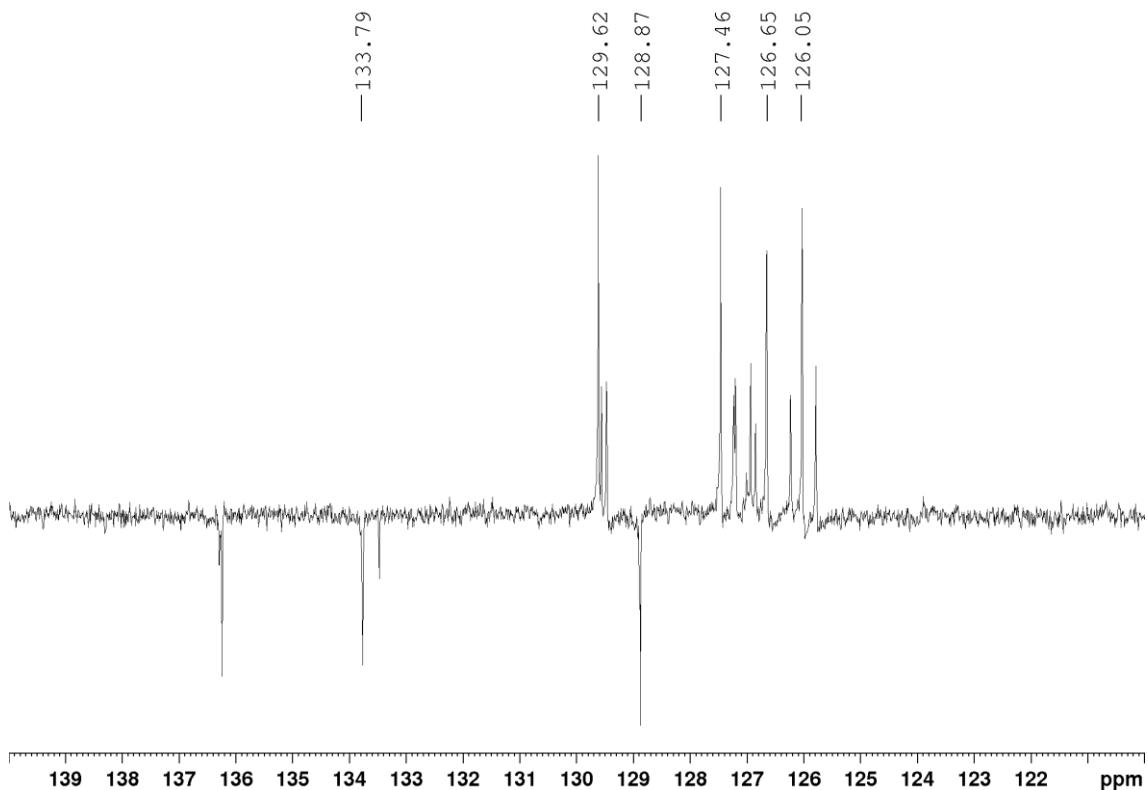
Fonte: a autora.

Figura 111. Ampliação do espectro 108 (δ 28,6–30,4) do derivado 42.



Fonte: a autora.

Figura 112. Ampliação do espectro 108 (δ 120,0–140,0) do derivado 42.



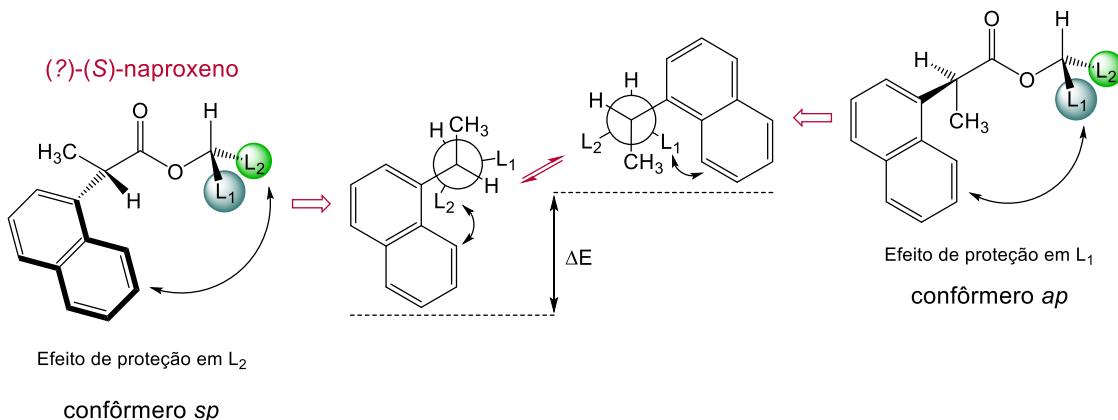
Fonte: a autora.

2.5.2.3 Análise dos ésteres de Mosher 41–42 por RMN 1H

Estudos conformacionais de RDQs com estruturas semelhantes às dos ésteres do (*S*)-naproxeno sugerem que a conformação onde o grupo carbonila e a metila estão *syn*-periplanar, representam o confôrmero mais estável (*sp*). Enquanto que no confôrmero onde a carbonila e a metila estão *anti*-periplanar, representam o confôrmero de menor estabilidade (*ap*). Em relação à rotação em torno da ligação $C\alpha$ –Ar, o confôrmero mais estável é aquele em que a ligação $C\alpha$ –H é coplanar com os anéis aromáticos. Assim, no confôrmero mais estável (*sp*), a ligação $C\alpha$ –Ar é perpendicular à ligação $C=O$ e o plano do anel aromático é paralelo à ligação $C=O$ (Figura 113).

Esse arranjo faz com que a orientação do anel arila exerça com eficiência o efeito anisotrópico de proteção dos substituintes L_1 e L_2 . Do ponto de vista conformacional, o equilíbrio entre *sp* e *ap* é deslocado para o confôrmero *sp*, que é o mais estável e deve ser o mais representativo na análise de RMN.

Figura 113. Análise conformacional do éster de (*S*)-naproxeno.



Fonte: a autora.

Diante disso, duas abordagens poderiam ser aplicadas utilizando o (*S*)-naproxeno. A primeira seria utilizando a dupla derivatização através do preparo do derivado com (*R*)-naproxeno e comparação entre os diastereômeros. Nesse caso, o esperado é o aumento da extensão do efeito anisotrópico sobre os substituintes do carbono assimétrico, e consequentemente maiores valores de $\Delta\delta^{R,S}$. Outra abordagem seria a utilização da simples derivatização para avaliar o efeito anisotrópico em diferentes temperaturas e solventes na sonda do RMN, o que intensificaria o efeito de proteção devido a redução na velocidade de interconversão entre os confôrmeros (*sp/ap*) dos ésteres, permanecendo

mais tempo naquele mais estável. Assim, a diminuição da temperatura da sonda do RMN deve produzir o aumento do número de moléculas na conformação *sp* e consequentemente a diminuição na conformação *ap*. Por esta razão, em temperaturas mais baixas, espera-se que o sinal, no RMN de ^1H , do H-4 se desloque para região de maior proteção, ocasionado pelo grupo arila e, consequentemente, os valores de $\Delta\delta^{\text{T}1,\text{T}2}$ sejam maiores.

Nesse sentido, as duas abordagens seriam interessantes para corroborar as configurações estabelecidas utilizando os reagentes (*R*)-MTPA e (*S*)-MTPA.

2.5.3 Determinação da configuração absoluta dos alcaloides **18, 21, 24 e 30**

A fim de determinar a configuração absoluta dos três centros estereogênicos dos alcaloides piperidínicos em estudo, os resultados apresentados no capítulo 1 acerca da configuração relativa determinada pelo experimento de NOESY 1D através da RMN foram correlacionados com a configuração absoluta do C-3 determinada pelo método de Mosher neste capítulo.

Tendo em vista que o carbono assimétrico C-3 tanto da (–)-cassina (**18**) quanto da (–)-espectralina (**24**) foram assinalados como *R*, através do método de Mosher, e que os experimentos de NOESY 1D mostraram uma configuração *cis* entre os hidrogênios H-2, H-3 e H-6, também foi possível a determinação da configuração absoluta do C-2 e do C-6 para **18** e **24**, sendo assinalados como (–)-2*R*,3*R*,6*S*-cassina, (–)-2*R*,3*R*,6*S*-espectralina. Alinhado a isso, o conhecimento da relação diastereomérica dos alcaloides 6-isocassina (**21**) e a 6-isoespectralina (**30**) quando comparados à **18** e **24**, respectivamente, e a confirmação da mudança do centro estereogênico em C-6 pelos experimentos de NOESY 1D, também foi possível sugerir a configuração absoluta de **21** e **30**, como sendo 2*R*,3*R*,6*R*-isocassina e 2*R*,3*R*,6*R*-isoespectralina.

Com a configuração absoluta assegurada, a influência da estereoquímica na atividade biológica foi avaliada no capítulo seguinte, verificando o potencial anticolinesterásico dos quatro alcaloides frente as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

CAPÍTULO 3

Implicações biológicas

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Doença de Alzheimer e os alcaloides inibidores da AChE

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a forma mais comum de demência, afetando cerca de 55 milhões de indivíduos, sendo que a cada ano surgem cerca de 10 milhões de novos casos. É uma patologia neurodegenerativa progressiva que afeta sobretudo os idosos (60% a 70% dos casos), caracterizada pela perda de memória e comprometimento das funções cognitivas e emocionais (ADAMS; GMUNDER; HAMBURGER, 2007; DANUELLO et al., 2012). Devido ao aumento da expectativa de vida, é esperado que até 2030 esta demência acometa cerca de 82 milhões de pessoas, (WHO, 2022).

As características fisiopatológicas comuns da DA são a deposição de placas amiloides, formação de emaranhados neurofibrilares, processos inflamatórios e deficiência de neurotransmissores, no sistema nervoso central (DALL'ACQUA, 2013), que se revelam sobretudo na desorientação, demência e variação na personalidade e nas interações sociais dos indivíduos. Ainda não há cura para a DA, somente alternativas terapêuticas baseadas no conhecimento de sua fisiopatologia que levam a melhora sintomática e podem evitar a sua progressão (ADAMS; GMUNDER; HAMBURGER, 2007).

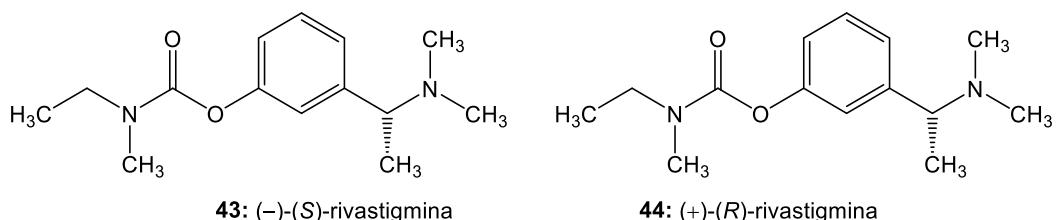
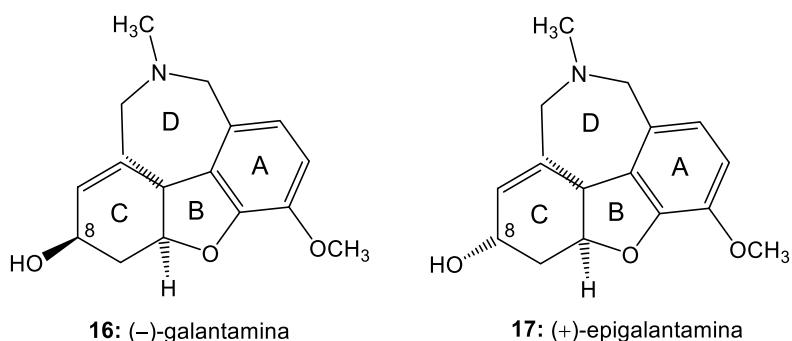
A DA é multifatorial e de origem complexa, sendo que existem diferentes possibilidades de intervenção terapêutica. De acordo com a hipótese colinérgica, a diminuição dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no córtex cerebral, é responsável pela deficiência de memória (ADSERSEN et al., 2007; PAGLIOSA et al., 2010). A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrolise da acetilcolina, regulando seus níveis, ao passo que a butirilcolinesterase (BChE), hidrolisa tanto a ACh como a butirilcolina (BuCh) (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; SILVA et al., 2010). Assim, a inibição destas enzimas tem sido a alternativa terapêutica mais utilizada no tratamento da DA (ADSERSEN et al., 2007; IRANSHAHY; QUINN; IRANSHAH, 2014).

Fármacos que inibem a AChE são designados como anticolinesterásicos, e tem como função retardar a degradação da ACh, aumentando seus níveis nas fendas sinápticas e assim prolongar sua ação.

Dentre os fármacos aprovados pelo FDA, para o alívio dos sintomas da DA, alguns são de origem natural. A galantamina (**16**) (Razadyne®) (Figura 114) é um alcaloide de origem natural isolado das flores de *Galanthus nivalis*, aprovada pela FDA em 2001 e 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 IAChE (FREITAS et al., 2018). Em 1990, um estudo foi publicado com o intuito de investigar quais seriam as diferenças farmacológicas entre **16** e seu diastereoisômero, a epigalantamina (**17**), um produto obtido por síntese enquanto IAChE (MARCO; CARREIRAS, 2006). Foi observado que **16** (EC_{50} 0,36 μ M) é cerca de 130 vezes mais potente que **17** (EC_{50} 45,70 μ M), o que mostra a estereoespecificidade enzimática da AChE

Outro exemplo é a rivastigmina (**43**) (Exelon®) (Figura 114) é um derivado sintético da fisostigmina, aprovada nos anos 2000, 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. Este fármaco é vendido na forma enantiomericamente pura, uma vez que $(-)(S)$ -**43** é mais potente que seu enantiômero $(+)(R)$ -**44** (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 114. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer e seus estereoisômeros.



Fonte: a autora.

Dentro deste contexto e em continuação aos estudos de Freitas et al. (2018) apresentados no primeiro capítulo, esse trabalho visa avaliar os quatro alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis*, que tiveram suas configurações absolutas avaliadas, nos ensaios de inibição das enzimas AChE e BChE, que são alvos importantes para o tratamento de doenças que afetam o SNC, e assim estabelecer uma relação entre as estruturas químicas quirais e a atividade biológica.

3.2 OBJETIVOS

Avaliar a atividade anticolinesterásica dos alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis* e investigar a influência da configuração absoluta nos resultados.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

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), Ellman et al. (1961) e Rhee et al. (2001).

3.3.1 Atividade anticolinesterásica

As atividades inibitórias de AChE e BChE dos alcaloides (–)-cassina (**18**), (–)-6-isocassina (**21**), (–)-espectralina (**24**) e (–)-6-isoespectralina (**30**), foram avaliadas usando o método de microplaca de 96 poços (MARSTON et al., 2002; ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001). Neste método, as enzimas hidrolisam os substratos acetiltiocolina ou butiriltiocolina, para produzir tiocolina que reage com 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), para produzir 2-nitrobenzoatomercaptotiocinoína e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados a 405 nm. 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 butirritoínilina variando de 3,0 a 300 µg/mL para os compostos isolados. 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 percentagem 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 MgCl₂.6H₂O 20 mM. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os alcaloides piperidínicos **18**, **21**, **24** e **30** foram avaliados quanto ao potencial de inibição da AChE e BChE por meio do ensaio em microplaca (Tabela 11) (MARSTON et al., 2002; ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001).

Tabela 11. Atividade anticolinesterásica dos alcaloides **18**, **21**, **24** e **30**.

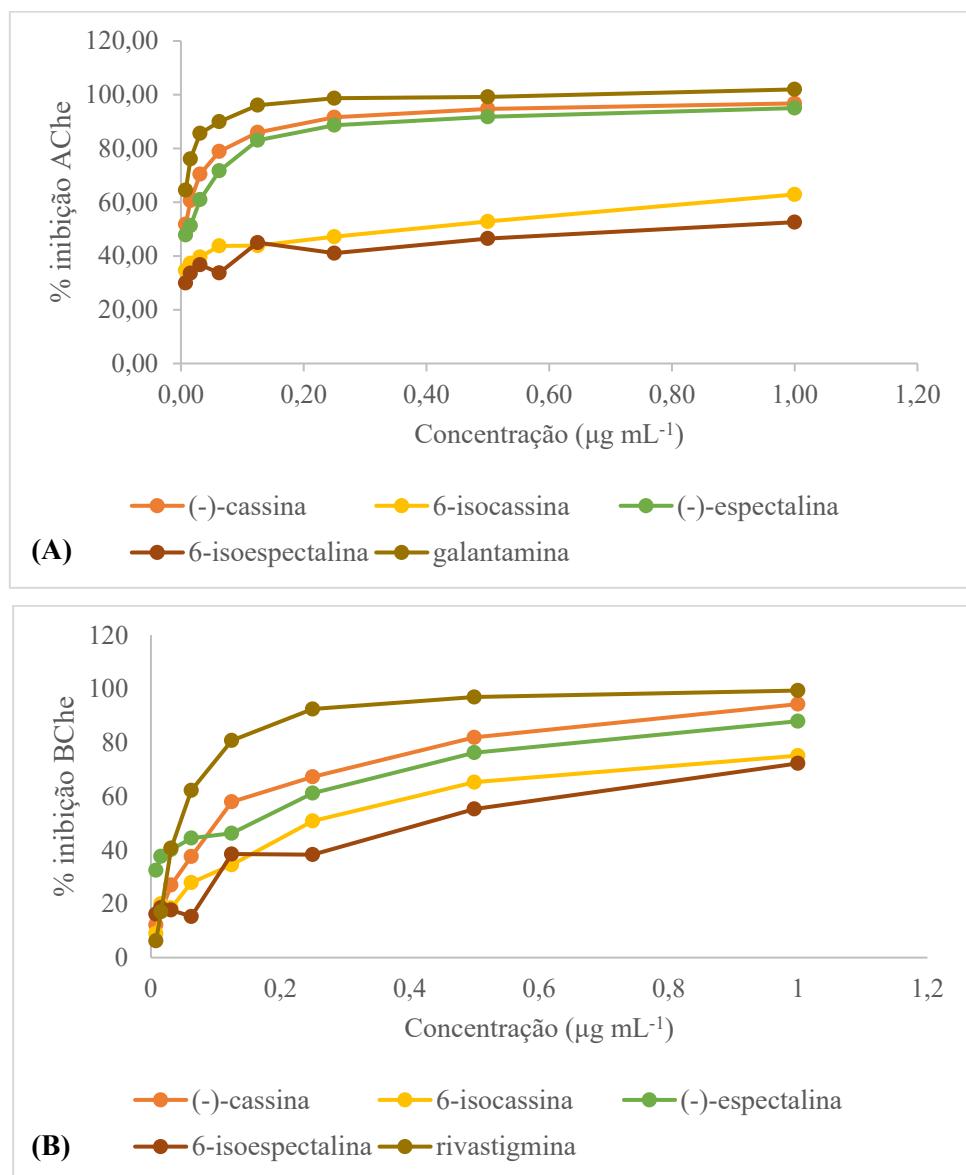
Amostras	IC ₅₀			
	AChE		BChE	
	μg mL ⁻¹	μmol L ⁻¹	μg mL ⁻¹	μmol L ⁻¹
(-)-cassina (18)	4,3 ± 4,5	14,5	65,6 ± 1,7	220,9
6-isocassina (21)	223,2 ± 1,7	751,5	218,9 ± 3,4	737,0
(-)-espectralina (24)	9,73 ± 4,2	29,9	91,3 ± 1,1	280,9
6-isoespectralina (30)	958,9 ± 5,0	2950,5	360,9 ± 6,0	1110,5
Galantamina ^a	0,4 ± 0,6	1,4	—	—
Rivastigmina ^b	—	—	50,0 ± 3,3	200,0

^aControle positivo para AChE; ^bControle positivo para BChE.

Fonte: a autora.

A partir da análise dos resultados de IC₅₀ (Figura 115) foi possível observar que os alcaloides **18** e **24** são mais potentes que os respectivos estereoisômeros **21** e **30**, na avaliação frente ao mesmo alvo biológico, o que mostra a estereoespecificidade das enzimas AChE e BChE. Esses resultados sugerem que a estereoquímica de C-6, nesse núcleo piperidínico, é essencial para a potente atividade anticolinesterásica dos compostos **18** e **24**. Também foi possível observar uma leve seletividade pelos homólogos de menor cadeia (**18** e **21**), quando comparado aos respectivos homólogos de maior cadeia (**24** e **30**).

Figura 115. Atividades inibitórias de AChE (A) e BChE (B) dos alcaloides **18, 21, 24 e 30**.



Nota: Galantamina^a e Rivastigmina^b foram usadas como controle positivo.

Fonte: a autora.

4 CONCLUSÕES

Senna spectabilis é reconhecida pela presença de alcaloides piperidínicos quirais com comprovada atividade biológica. A análise das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis* permitiu identificar que a fração que mais acumula alcaloides (fração alcaloídica) é a fração CH₂Cl₂, de onde foi possível isolar os compostos que chamamos (–)-cassina (**18**), (–)-espectralina (**24**), 6-isocassina (**21**) e 6-isoespectralina (**30**) e que são objeto deste estudo de estereoquímica.

A CLAE-ELSD provou ser uma ferramenta importante na separação dos pares homólogos **18/24** e **21/30**, uma vez que a pequena diferença estrutural de duas unidades metilênicas inviabiliza o uso das técnicas convencionais de CC e a ausência de cromóforos inviabiliza o uso de equipamentos que tenham outros detectores como o de UV-vis.

A EM-IES e a EM-IE também foram ferramentas fundamentais para a identificação dos estereoisômeros e, aliadas aos dados de ressonância magnética nuclear, mais especificamente os experimentos de NOESY 1D, permitiu estabelecer as configurações relativas dos alcaloides em estudo.

O método de Mosher utilizando os reagentes (*R*)-MTPA e (*S*)-MTPA foi eficiente para determinar a configuração absoluta do C-3 dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina. Além disso, a comparação com os dados de configuração relativa obtidos por NOESY 1D permitiu estabelecer a configuração absoluta dos C-2 e C-6, bem como inferir a estrutura dos diastereômeros 6-isocassina e 6-isoespectralina.

A extração do RDQ (+)-(–)-naproxeno a partir do fármaco comercial Naproxeno Sódico[®] parece ser uma alternativa economicamente viável para a preparação dos ésteres de Mosher. Esse RDQ apresenta algumas vantagens em comparação com o MTPA, como o número de confôrmeros menor, além do substituinte naftila, que é maior em comparação com o grupo fenila do MTPA, aumentando assim a intensidade do efeito anisotrópico sobre os substituintes do carbono assimétrico, podendo ser também uma estratégia para determinação da configuração absoluta pelo método de Mosher tanto pelo método da simples quanto da dupla derivatização.

Por fim, a avaliação da atividade anticolinesterásica mostrou que a estereoquímica de C-6 é fundamental para a potência dos compostos (–)-cassina e (–)-espectralina, evidenciando a estereoespecificidade das enzimas acetil e butirilcolinesterase.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, M. JAKUBIEC, M.; KAMINSK, K. Chirality as an important factor for the development of new antiepileptic drugs. **ChemMedChem**, v. 14, p. 1744–1761, 2019. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900367>
- ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; TAKSFORCE, I. N. P. S.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature**, v. 20, p. 200–216, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- BARBAROSSA, A.; IACOPETTA, D.; SINICROPI, M. S.; FRANCHINI, C.; CAROCCI, A. Recent advances in the development of thalidomide-related compounds as anticancer drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 19–40, 2022. <https://dx.doi.org/10.2174/0929867328666210623143526>
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M. Utilização de RMN de ^1H na determinação da configuração absoluta de álcoois. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1061–1065, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600022>
- BATISTA, A. N. L.; SANTOS JR, F. M.; BATISTA JR, J. M.; CASS, Q. B. Enantiomeric mixtures in natural product chemistry: separation and absolute configuration assignment. **Molecules**, v. 23, p. 492–510, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23020492>
- BATISTA, A. N. L.; ANGRISANI, B. R. P.; LIMA, M. L. D.; SILVA, S. M. P.; SCHETTINI, V. H.; CHAGAS, H. A.; SANTIS JR, F. M.; BATISTA JR, J. M.; VALVERDE, A. L. **Absolute configuration reassignment of natural products: an overview of the last decade**, v. 32, n. 8, p. 1499–1518, 2021. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210079>
- BLAZEWSKA, K.; GAJDA, T. (*S*)-Naproxen[®] and (*S*)-Ibuprofen[®] chlorides – conveniente chemical derivatizing agents for the determination of the enantiomeric excess of hydroxy and aminophosphonates by ^{31}P NMR. **Tetrahedron**, v. 13, p. 671–674, 2002. [https://dx.doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00186-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00186-6)
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00254-6](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(95)00254-6)
- BOLZANI, V. S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAR JR, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 2012. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-CON-12-01-11>

CALCATERRA, A.; D'ACQUARICA. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 323–340, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.008>

CASTRO, N. G.; COSTA, R. S.; PIMENTEL, L. S. B.; DANUELLLO, 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>

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, 1977a.
[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(77\)80211-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)80211-1)

CHRISTOFIDIS, I.; WELTER, A.; JADOT, J. Spectalinine and iso-6-carnavaline, two unprecedented piperidine alkaloids from the seeds of *Cassia spectabilis*. **Tetrahedron**, v. 33, p. 3005–3006, 1977b.
[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(77\)88038-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)88038-1)

DANUELLLO, 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>

DE GUSSEM, E.; TEHRANI, K. A.; HERREBOUT, W. A.; BULTINCK, P; JOHANNENSEN, C. Comparative study of the vibrational optical activity techniques in structure elucidation: the case of Galantamine. **ACS Omega**, v. 4, n. 9, p. 14133–14139, 2019.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02108>

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

FINEFIELD, J. M.; SHERMAN, D. H.; KREITMAN, M.; WILLIAMS, R. M. Enantiomeric natural products: occurrence and biogenesis. **Angewandte Reviews**, v. 54, n. 20, p. 4802–4836, 2012.
<https://doi.org/10.1002/anie.201107204>

FREEDMAN, T.B.; CAO, X.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B.; NAFIE, L.A. Determination of the absolute configuration and solution conformation of gossypol by vibrational circular dichroism. **Chirality**, v. 15, p. 196–200, 2003.
<https://doi.org/10.1002/chir.10171>

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>

GAO, S.; WANG, S.; FAN, R.; HU, J. Recent advances in the molecular mechanism of thalidomide teratogenicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110–114, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110114>

GRYBINIK, S.; BOSAKOVA, Z. An overview of chiral separations of pharmaceutically active substances by HPLC (2018–2020). **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 152, p. 1033–1043, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s00706-021-02832-5>

HIGHET, R. J. Alkaloids of Cassia species. I. cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 471–474, 1964.
<https://doi.org/10.1021/jo01025a056>

HIGHET, R. J.; HIGHET, P. F. Alkaloids of Cassia species. II. The side chain of cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 31, p. 1275–1276, 1966.
<https://doi.org/10.1021/jo01342a504>

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Medicinais**, 2003, 152 p.

JOYCE, L.A.; NAWRAT, C.C.; SHERER, E.C.; BIBA, M.; BRUNSKILL, A.; MARTIN, G.E.; COHEN, R.D.; DAVIES, I.W. Beyond optical rotation: What's left is not always right in total synthesis. **Chemical Science**, v. 9, p. 415–424, 2018.
<https://doi.org/10.1039/C7SC04249C>

KENAR, J.A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 269–302, 2006.
<https://doi.org/10.1007/s11746-006-1203-1>

KESHMIRI-NEGHAB, H.; GOLIAEI, B. Therapeutic potential of gossypol: An overview. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, p. 124–128, 2014.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2013.832776>

KUSUMI, T., OHTANI, I. I. **Determination of the absolute configuration of biologically active compounds by the modified Mosher's method**. In: Cooper R, Snyder JK (eds) *The biology chemistry interface*. Marcel Dekker, New York, p. 103–137.

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>

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>

MARÍN-SÁEZ, J.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A.G. Enantiomeric determination and evaluation of the racemization process of atropine in Solanaceae seeds and contaminated samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1474, p. 79–84, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.047>

MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos naturais: um voo da Europa Medieval ao Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2501–2509, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900047>

MELO, G. M. A.; SILVA, M. C. R.; GUIMARÃES, T. P.; PINHEIRO, K. M.; MATTIA, C. B. B.; QUEIROZ, A. C.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JR., 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>

MORI, K. Bioactive natural products and chirality. **Chirality**, v. 23, p. 449–462, 2011.
<https://doi.org/10.1002/chir.20930>

NAKAHASHI, A.; YAGUCHI, Y.; MIURA, N.; EMURA, M.; MONDE, K. A vibrational circular dichroism approach to the determination of the absolute configurations of flavorous 5-substituted-2(5H)-furanones. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 707–711, 2011.
<https://doi.org/10.1021/np1007763>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral drugs: an overview. **International Journal of Biomedical Science**, v. 2, n. 2, p. 85–100, 2006.

NGUYEN, N. V. T.; NGUYEN, K. N. H.; NGUYEN, K. T.; KIM, K. H.; ABOUL-ENEIN, H. Y. The impact of chirality on the analysis of alkaloids in plant. **Pharmacia**, v. 68, n. 4, p. 643–656, 2021.
<https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e71101>

NOORDUIN, W. L.; KAPTEIN, B.; MEEKES, H.; VAN ENCKEVORT, W. J. P.; KELLOGG, R. M.; VLIEG, E. Fast Attrition-enhanced deracemization of naproxen by a gradual in situ feed. **Angewandte Chemie**, v. 48, p. 4581–4583, 2009.
<https://doi.org/10.1002/anie.200901386>

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431–1438, 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800023>

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

RICE, W. Y.; COKE, J. L. Structure and configuration of alkaloids. II. Cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 31, p. 1010–1012, 1966.
<https://doi.org/10.1021/jo01342a005>

SANGANYADO, E.; LU, Z.; FU, Q.; SCHLENK, D; GAN, J. Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes. **Water research**, v. 124, p. 527–542, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.003>

SECO, J. M.; QUIÑOA, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 17–107, 2004.
<https://doi.org/10.1021/cr000665j>

SECO, J. M.; QUIÑOA, E.; RIGUERA, R. **The assignment of the absolute by NMR using chiral derivatizing agents**. New York: Oxford University Press, 2016. 195 p.

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>

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

TAIN, Y. L.; JHENG, L. C.; CHANG, S. K. C.; CHEN, Y. W.; HUANG, L. T.; LIAO, J. X.; HOU, C. Y. Synthesis and characterization of novel resveratrol butyrate esters that have the ability to prevent fat accumulation in a liver cell culture model. **Molecules**, v. 25, p. 4199–4211, 2020.
<https://doi.org/10.3390/molecules25184199>

TESTA, B.; VISTOLI, G.; PEDRETTI, A. Mechanisms and pharmaceutical consequences of processes of stereoisomerisation—A didactic excursion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 101–123, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.007>

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>

TOUCHSTONE, J. C.; DOBBINS, M. F. Visualization procedures. In: **Practice of thin layer chromatography**. New York: John Wiley, 1978. Cap. 7, p. 161–223.

VALLI, M.; BOLZANI, V. S. Natural Products: perspectives and challenges for use of Brazilian plant species in the bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 91:e20190208, 2019.
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920190208>

VANTOMME, C. CRASSOUS, J. Pasteur and chirality: A story of how serendipity favors the prepared minds. **Chirality**, v. 33, n. 10, p. 597–601, 2021.
<https://doi.org/10.1002/chir.23349>

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>

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 JUNIOR, C.; SILVA, D. H. S.; PIVATTO, M.; REZENDE, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; NAIR, M. G. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 2026–2028, 2007.
<https://doi.org/10.1021/np070312g>