

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

ISABELA LOPES E CYTRÂNGOLO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA
ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE *Senna spectabilis*
UTILIZANDO O NAPROXENO COMO REAGENTE DE DERIVATIZAÇÃO
QUIRAL**

UBERLÂNDIA-MG

2025

ISABELA LOPES E CYTRÂNGOLO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA
ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE *Senna spectabilis*
UTILIZANDO O NAPROXENO COMO REAGENTE DE DERIVATIZAÇÃO
QUIRAL**

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

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Amanda Danuello Pivatto

UBERLÂNDIA-MG

2025

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

C997 2025	Cytrângolo, Isabela Lopes e, 2001- DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE <i>Senna spectabilis</i> UTILIZANDO O NAPROXENO COMO REAGENTE DE DERIVATIZAÇÃO QUIRAL [recurso eletrônico] / Isabela Lopes e Cytrângolo. - 2025. Orientadora: Marcos Pivatto . Coorientadora: Amanda Danuello Pivatto. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.212 Inclui bibliografia. 1. Química. I. , Marcos Pivatto ,1979-, (Orient.). II. Pivatto, Amanda Danuello,1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título. CDU: 54
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 401, PPGQUI				
Data:	Quatorze de fevereiro de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	14h	Hora de encerramento:	17h
Matrícula do Discente:	12312QMI004				
Nome do Discente:	Isabela Lopes e Cytrângolo				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de uma metodologia para determinação da estereoquímica dos alcaloides piperidínicos de <i>Senna spectabilis</i> utilizando o naproxeno como reagente de derivatização quiral				
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				
ODS	"ODS 3 - Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bemestar para todos, em todas as idades. "				

Reuniu-se, _____ por _____ webconferência, _____ pelo link: <https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/marcos-pivatto-2>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta pelos professores doutores: **Alan Cesar Pilon**, da Universidade Estadual de São Paulo; **Aline Coqueiro**, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná; e **Marcos Pivatto**, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. **Marcos Pivatto**, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à 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(às) 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):

Aprovada.

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

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 14/02/2025, às 17:29, 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 **Aline Coqueiro, Usuário Externo**, em 14/02/2025, às 17:30, 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 **Alan Cesar Pilon, Usuário Externo**, em 14/02/2025, às 17:30, 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 **6100194** e o código CRC **6BDB99BD**.

ISABELA LOPES E CYTRÂNGOLO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA
ESTEREOQUÍMICA DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE *Senna spectabilis*
UTILIZANDO O NAPROXENO COMO REAGENTE DE DERIVATIZAÇÃO
QUIRAL**

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

Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, 14 de fevereiro de 2025.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Pivatto – Orientador (UFU)

Prof. Dr. Alan Cesar Pilon – Examinador (Unesp)

Prof^a. Dr^a. Aline Coqueiro – Examinadora (UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores e amigos Marcos Pivatto e Amanda Danuello pelo incentivo, motivação e orientação nesta caminhada acadêmica.

Agradeço à fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para realização, Código de Financiamento 001.

Um agradecimento especial ao professor Eduardo Franca pela orientação quanto aos cálculos computacionais e pela paciência em me ajudar nessa jornada.

Agradeço aos meus pais, Márcia e Alexandre, por tanta coisa que nem sei como começar a escrever, tudo o que eu tenho eu devo a vocês, mas faço questão de pontuar os quilos de arroz doados que alimentaram 6 dragões durante esses anos.

Agradeço aos colegas de laboratório, por me auxiliarem no que precisei.

Agradeço aos laboratórios vizinhos pela companhia e ajuda.

Agradeço muito aos técnicos da universidade que me ajudaram durante todo o processo do mestrado, um sincero abraço a todos.

Agradeço ainda, aos amigos que fiz durante o decorrer da pós-graduação, a presença de vocês na minha vida foi de extrema importância.

Agradeço aos moradores da “casa 7”, Matheus e Grilo e ainda depois Amanda e Phelipe. Mesmo que eu não faça ideia do motivo desse nome, foi muito gratificante ter dividido casa com vocês, foram vários momentos de risadas regados à banquetes.

Agradeço ao meu irmão, Lulu. Sinto sua falta.

Agradeço principalmente ao meu namorado João, que suportou cada surto meu durante esse período, mesmo que alguns tenham sido provocados pelo próprio.

Agradeço a Michelle, pela imensurável ajuda.

Agradeço aos meus familiares que me apoiaram nessa jornada, em especial a Bia e ao Joaquim, a beleza de vocês que me deram forças para continuar.

*“Cansada demais, ferida demais, mudada demais.
**Se ninguém vê exageros em você, não está sendo
você o suficiente”***

- Senna, a Redentora. (LoL, 2019)

RESUMO

O par homólogo (–)-cassina e (–)-espectralina foi isolado de *Senna spectabilis* como metabólitos majoritários, e apresentam comprovada atividade biológica como antimalárica, anti-chikungunya e inibidores da acetilcolinesterase, enzima relacionada a doença de Alzheimer. São classificados como alcaloides piperidínicos e quirais, o que torna relevante e necessário a compreensão da estereoquímica para o avanço dos estudos como candidatos à fármacos. Dessa forma, foi desenvolvida uma metodologia almejando eficiência e baixo custo para a determinação da estereoquímica destes compostos, através do preparo de ésteres de Mosher, utilizando como reagente de derivatização quiral o fármaco (*S*)-naproxeno. Assim, a mistura dos homólogos foi resolvida por técnicas cromatográficas incluindo a cromatografia líquida de alta eficiência e o (*S*)-naproxeno foi extraído de medicamentos, uma vez que este fármaco é comercializado na forma enantiomericamente pura, o que foi confirmado por polarimetria. Como a técnica de Mosher, de dupla derivatização, necessita de ambos, (*S*)-naproxeno e (*R*)-naproxeno, foi necessário racemizar o primeiro em meio ácido, para obtenção do par enantiomérico. Em seguida, os ésteres foram preparados com a mistura racêmica do naproxeno, baseados na reação de esterificação de Steglich, sendo os produtos diastereoisoméricos separados e confirmados por cromatografia em camada delgada preparativa e espectrometria de massas, respectivamente. Para determinar as configurações absolutas dos ésteres de Mosher, também foram realizados cálculos computacionais, baseados na dinâmica molecular de Born-Oppenheimer, para auxiliar na compreensão dos conformeros, avaliar como os substituintes do anel piperidínico (equatorial/axial) estão dispostos e que efeito anisotrópico o grupo naftil (proteção/desproteção) exerce sobre os substituintes que são vizinhos ao carbono assimétrico do grupo hidroxila.

Palavras-chave: *Senna spectabilis*, ésteres de Mosher, conformações, configuração absoluta, quiralidade.

ABSTRACT

The homologous pair (–)-cassine and (–)-spectaline was isolated from *Senna spectabilis* as major metabolites and has demonstrated biological activity as antimalarial, anti-chikungunya, and acetylcholinesterase inhibitors, an enzyme related to Alzheimer's disease. They are classified as piperidinic and chiral alkaloids, making the understanding of their stereochemistry relevant and necessary for advancing studies on their potential as drug candidates. Thus, a methodology was developed aiming for efficiency and low cost to determine the stereochemistry of these compounds through the preparation of Mosher esters, using the chiral derivatization reagent (*S*)-naproxen. The homologous mixture was resolved using chromatographic techniques, including high-performance liquid chromatography, and the (*S*)-naproxen was extracted from commercial pharmaceutical formulations, as this drug is marketed in an enantiomerically pure form, which was confirmed by polarimetry. Since the Mosher technique, which involves double derivatization, requires both (*S*)-naproxen and (*R*)-naproxen, it was necessary to racemize the former in an acidic medium to obtain the enantiomeric pair. Subsequently, the esters were prepared using the racemic mixture of naproxen, based on the Steglich esterification reaction, with the resulting diastereoisomeric products being separated and confirmed by preparative thin-layer chromatography and mass spectrometry, respectively. To determine the absolute configurations of the Mosher esters, computational calculations were also performed based on Born-Oppenheimer molecular dynamics, to assist in understanding the conformers, evaluate how the piperidine ring substituents (equatorial/axial) are arranged, and assess the anisotropic effect of the naphthyl group (protection/deprotection) on the substituents adjacent to the asymmetric carbon of the hydroxyl group.

Keywords: *Senna spectabilis*, Mosher's esters, conformations, absolute configuration, chirality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Metabólitos especiais isolados de plantas com importância histórica	20
Figura 2 -	Alcaloides piperidínicos isolados de <i>Senna spectabilis</i>	21
Figura 3 -	Naproxeno comercializado na forma de <i>S</i> -enantiômero.	22
Figura 4	Método de dupla derivatização utilizando o naproxeno (7), como reagente de derivatização quiral, para atribuição da configuração absoluta de 5 e 6.	23
Figura 5 -	Moléculas obtidas a partir de PN com grande importância, encontradas na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde.	25
Figura 6 -	Medicamentos aprovados entre janeiro/1981 e setembro/2019, n = 1394.	26
Figura 7 -	Fatores que afetam a biossíntese dos metabólitos secundários.	27
Figura 8 -	Pares enantioméricos que exibem atividades biológicas diferentes.	28
Figura 9 -	Representação da interação de enantiômeros com um receptor biológico utilizando o modelo de três pontos.	29
Figura 10 -	Pares enantioméricos que exibem atividades biológicas diferentes.	30
Figura 11 -	Biointerconversão unidirecional do ibuprofeno através de catalise enzimática.	31
Figura 12 -	Taliodomida	31
Figura 13 -	<i>Senna spectabilis</i> . r.: ramo, s.: nectário, t.: pétalas, u.: fruto	33
Figura 14 -	Representação da ligação de hidrogênio intramolecular para a (-)-cassina.	34
Figura 15 -	Alcaloides piperidínicos isolados de <i>Senna spectabilis</i> .	35
Figura 16 -	Substratos quirais que tiveram suas estereoquímicas estabelecidas utilizando RDQ.	37
Figura 17 -	Reagentes de derivatização quiral (RDQ) comumente utilizados para determinação de configuração absoluta.	38
Figura 18 -	(<i>S</i>)-Naproxeno como RDQ, uma alternativa de baixo custo para a determinação da estereoquímica absoluta.	39
Figura 19 -	Dupla derivatização: deslocamento dos sinais nos espectros de RMN ¹ H em função do efeito anisotrópico dos RDQs.	40

Figura 20 -	(A) Corrente de elétrons π do benzeno gera campo magnético induzido; (B) Regiões de proteção e desproteção.	41
Figura 21 -	Efeitos de blindagem do grupo naftil do NPX sobre os ligantes (Lx = L1 e L2) do carbono assimétrico.	42
Figura 22 -	Equilíbrios conformacionais do (R)-MPA-substrato.	43
Figura 23 -	Equilíbrio conformacional do MTPA.	43
Figura 24 -	Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de <i>S. spectabilis</i> .	50
Figura 25 -	Sistema de Kipp modificado para o preparo dos cloridratos.	51
Figura 26 -	Reação para obtenção dos cloridratos da (-)-cassina e (-)-espectralina.	52
Figura 27 -	Fluxograma da extração do (+)-(<i>S</i>)-naproxeno.	53
Figura 28 -	Reação para obtenção dos ésteres de (-)-cassina e (-)-espectralina.	55
Figura 29 -	CCD das frações coletadas de IMC1.	57
Figura 30 -	CCD das frações obtidas da IMC2.	58
Figura 31 -	CG-EM-IE dos padrões 5 (t_R 13,5 min) (A) e 6a (t_R 14,9 min) (B) e das frações IMC2-F ₈₂ (C), IMC2-F ₈₃ (D) e IMC2-F ₈₇ (E).	59
Figura 32 -	EM-IE dos padrões 5 (t_R 13,52 min) e 6a (t_R 15,1 min) (A e B respectivamente) e compostos com mesmos t_R (C e D), observados na fração IMC2-F ₈₂₋₈₈ .	61
Figura 33 -	Mecanismo de fragmentação sugerido para o sinal em m/z 114 (-)-cassina e (-)-espectralina.	62
Figura 34 -	CG-EM-IE da fração IMC2-F ₈₉₋₁₁₄ .	62
Figura 35 -	EM-IE dos alcaloides 15 (t_R 14,01 min) e 16 (t_R 15,56 min) (Figura 35).	63
Figura 36 -	CG-FID dos padrões 5 (A) e 6a (B).	64
Figura 37 -	CG-FID das frações IMC3-F ₂₋₅ (A), IMC3-F ₆₋₈ (B), IMC3-F ₉₋₁₁ (C).	65
Figura 38 -	Comprimidos das respectivas farmacêuticas em suas formas revestidas e trituradas.	67
Figura 39 -	Reação para neutralizar o naproxeno sódico.	67
Figura 40 -	Gráfico das rotações observadas (α) versus concentração do (<i>S</i>)-NPX.	69
Figura 41 -	CCD dos (<i>S</i>)-NPXs (A: Naxotec [®] , B: Flanax [®] e C: Naproxeno sódico [®]).	70

Figura 42 -	CG-EM-IE dos (<i>S</i>)-NPXs (7a) (t_R 11,1 min) (A: Naxotec [®] , B: Flanax [®] e C: Naproxeno sódico [®]).	71
Figura 43 -	EM-IE do (<i>S</i>)-NPX.	72
Figura 44 -	Proposta de fragmentação para o (<i>S</i>)-NPX.	73
Figura 45 -	Espectro de RMN ¹ H para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ (400 MHz).	76
Figura 46 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (δ 1,40–1,75; δ 3,70–4,10) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]).	77
Figura 47 -	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (δ 6,70–8,00) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]).	78
Figura 48 -	Espectro de RMN ¹³ C para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ (100 MHz).	79
Figura 49 -	Espectro de RMN ¹³ C/DEPT para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ (100 MHz).	80
Figura 50 -	Mapa de contorno COSY para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ .	81
Figura 51 -	Mapa de contorno COSY (δ 1,3–4,2) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ .	82
Figura 52 -	Mapa de contorno COSY (δ 7,0–8,0) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ .	83
Figura 53 -	Mapa de contorno HSQC para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ . (400 MHz)	84
Figura 54 -	Mapa de contorno HSQC (δ 1,5–4,1) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ .	85
Figura 55 -	Mapa de contorno HSQC (δ 7,0–8,0) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ .	86
Figura 56 -	Mapa de contorno HSBC para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ . (400 MHz)	87
Figura 57 -	Mapa de contorno HSBC (δ 1,2–4,4) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ .	88
Figura 58 -	Mapa de contorno HSBC (δ 7,0–8,0) para o (<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl ₃ .	89

Figura 59 -	Propostas de mecanismo para reação de racemização do (<i>S</i>)-NPX em meios ácido (A) e básico (B).	90
Figura 60 -	CCD dos produtos obtidos das reações de racemização em meio ácido (A), meio básico (B) e do padrão 7a (P).	91
Figura 61 -	CLAE do (<i>S</i>)-NPX (7a) (A) e dos produtos obtidos da racemização em meio ácido (B) e em meio básico (C).	92
Figura 62 -	Proposta de fragmentação para o (<i>S</i>)-NPX em IES.	93
Figura 63 -	EM-IES-(+) de 7a (A) e dos picos em t_R 59,36 (B) e em t_R 60,63 (C) do produto de racemização em meio ácido.	94
Figura 64 -	UVs dos picos em t_R 59,41 (A) e 60,67 min (B), do produto da reação para racemização em meio ácido (Figura 61B).	95
Figura 65 -	CCDs da reação de esterificação de Steglich; 10 min (A e A'), 1,5 h (B e B'), e 6 h (C e C') de reação.	96
Figura 66 -	CCD do produto da reação de esterificação.	97
Figura 67 -	CCD das frações IMC4-F ₁₋₆₆ , IMC4-F ₆₇₋₆₉ , IMC4-F ₇₀₋₇₇ , IMC4-F ₇₈₋₈₁ , e IMC4-F ₈₂₋₁₀₀ e controles (5 , 7a , e 27).	98
Figura 68 -	CLAE-EM-IES-(+) da fração IMC4-F ₆₇₋₆₉ .	98
Figura 69 -	EM-IES-(+) dos produtos (5 (t_R 6,75 min) e 28 (t_R 8,78 min)) observados na fração IMC4-F ₆₇₋₆₉ (Figura 67).	99
Figura 70 -	CCD das frações IMC5-F ₁₋₃₅ , IMC5-F ₃₆₋₃₉ , IMC5-F ₄₀₋₅₇ , IMC5-F ₅₈₋₆₁ , e IMC5-F ₆₂₋₆₅ e controles (5 , 7a , e 27).	100
Figura 71 -	CLAE-EM-IES-(+) das frações IMC5-F ₃₆ (A), IMC5-F ₃₇ (B), IMC5-F ₃₈ (C) e IMC5-F ₃₉ (D).	101
Figura 72 -	EM-IES-(+) dos produtos com t_R 8,70 e 8,80 min, observados nas frações IMC5-F ₃₆ , F ₃₇ , F ₃₈ e F ₃₉ (Figura 70).	102
Figura 73 -	CCD da fração IMC5-F ₃₆ e controles (7a e 5); desenvolvimento da CCD 1 vez (A), 2 vezes (B), 3 vezes (C), 4 vezes (D e E).	103
Figura 74 -	CCDP da fração IMC5-F ₃₆ (A) e CCD das frações coletadas (B e C).	103
Figura 75 -	Proposta de mecanismo para obtenção dos ésteres de Mosher 28 , 29 , 30 e 31 .	105
Figura 76 -	Ângulos diedros responsáveis pelas conformações axiais-equatoriais do confôrmere "A" (A) e do confôrmere "B" (B).	107

Figura 77 -	Representação tridimensional do ângulo diedro entre o oxigênio da carbonila do éster e o hidrogênio do *C-3 do alcaloide.	109
Figura 78 -	Representação tridimensional e na projeção de Newman, do ângulo diedro entre o hidrogênio do *C do naproxeno (α) e do hidrogênio do *C-3 do alcaloide (α').	110
Figura 79 -	Representação tridimensional do éster, demonstrando a posição teórica do grupo naftil gerando (A) proteção e (B) desproteção dos ligantes do anel piperidínico.	111
Figura 80 -	Representação tridimensional dos ésteres 28 (A) e 30 (B).	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Temperatura de fusão dos cloridratos da (–)-cassina e (–)-espectralina em comparação com dados da literatura.	66
Tabela 2 -	Massas dos comprimidos utilizados e naproxeno obtidos na forma sódica e neutra.	67
Tabela 3 -	Temperatura de fusão dos (S)-NPXs extraídos na forma neutra.	68
Tabela 4 -	Rotação específica dos (S)-NPXs extraídos na forma neutra.	68
Tabela 5 -	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para o (S)-NPX (Naxotec [®]) em CDCl_3 .	75
Tabela 6 -	Valores obtidos nos cálculos computacionais em estudos relativos ao equilíbrio equatorial e axial dos substituintes dos ésteres de Mosher obtidos.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ap	Antiperiplanar
B₀	Campo magnético externo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCl₃D	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia a gás
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d	Dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodo
d.i.	Diâmetro interno
dd	Duplo dubleto
DMBO	Dinâmica molecular de Born-Oppenheimer
DM	Dinâmica molecular
DMAP	Dimetilaminopiridina
DRX	Difração de raio X
EDC	Hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EEFI-Ss	Extrato etanólico das flores de <i>Senna spectabilis</i>
ELSD	<i>Evaporative light scattering detector</i> (detector evaporativo por espalhamento de luz)
EM	Espectrômetro de massas
AcOEt	Acetato de etila
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
IBTEC	Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia
IClPt	Revelador iodocloroplatinato
IE	Ionização por impacto de elétrons
IQ-UFU	Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia

IV	Espectroscopia na região do infravermelho
LCQC	Laboratório de Cristalografia e Química Computacional
L_x	Ligantes
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MPA	Ácido α -metoxi-fenil acético
MTPA	Ácido α -metoxi- α -trifluorometil fenil acético
Na₂CO_{3(aq)}	Solução de carbonato de sódio aquoso
NH₄OH	Hidróxido de amônio
NPCBio	Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos
NPX	Naproxeno
NuPPeN	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
PF	Ponto de fusão
PN	Produtos Naturais
q	Quadruplete
QTOF	<i>Quadrupole-time of flight</i> – Quadrupolo-tempo de voo
RDA	Retro-Diels-Alder
RDQ	Reagente de derivatização quiral
RELAM	Rede de laboratório multiusuário
R_f	<i>Ratio to front</i> – Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singleto
SiO₂	Sílica gel
Sp	Sinperiplanares
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
T_R	Tempo de retenção
UV-vis	Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível
V_{inj}	Volume de injeção
$\Delta\delta^{R,S}$	Diferenças nos deslocamentos químicos
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Produtos naturais	24
2.2 Quiralidade em moléculas bioativas	28
2.3 <i>Senna spectabilis</i>.....	32
2.4 Alcaloides piperidínicos	33
2.5 Método de Mosher	36
3. OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Instrumentação	46
4.2 Solventes e reagentes	46
4.2.1 <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	<i>47</i>
4.2.2 <i>Preparo do revelador de iodocloroplatinato (IClPt)</i>	<i>47</i>
4.2.3 <i>Cromatografia em coluna aberta</i>	<i>47</i>
4.2.4 <i>Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....</i>	<i>47</i>
4.2.5 <i>Cromatógrafo a Gás.....</i>	<i>48</i>
4.2.6 <i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	<i>49</i>
4.2.7 <i>Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)</i>	<i>49</i>
4.3 Metodologia experimental	50
4.3.1 <i>Preparo do extrato etanólico das flores de <i>Senna spectabilis</i> e isolamento dos</i> <i>alcaloides (-)-cassina (5) e (-)-espectralina (6a)</i>	<i>50</i>
4.3.2 <i>Preparação dos cloridratos da (-)-cassina (5) e (-)-espectralina (6a)</i>	<i>51</i>
4.3.3 <i>Extração do (+)-(S)-naproxeno.....</i>	<i>52</i>
4.3.4 <i>Racemização do (+)-(S)-naproxeno</i>	<i>53</i>

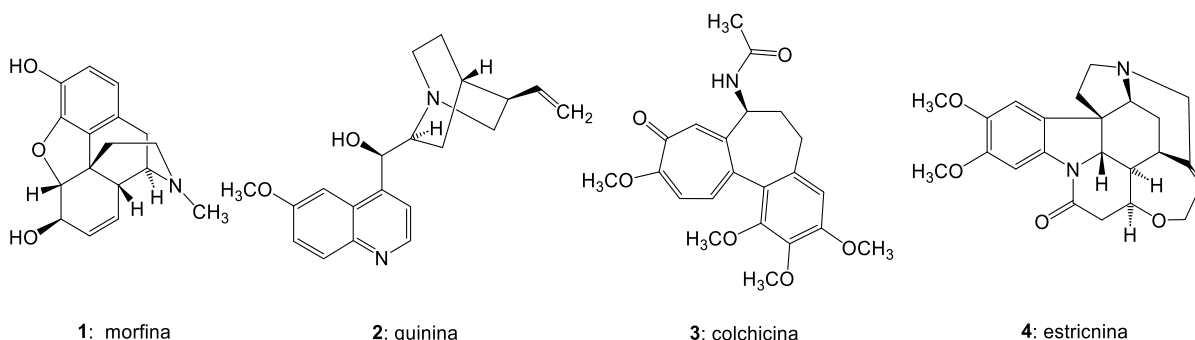
4.3.5 Preparação dos ésteres de Mosher	54
4.3.6 Separação dos ésteres de Mosher	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1 Isolamento dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina	57
5.2 Síntese dos respectivos cloridratos de (–)-cassina e (–)-espectralina	66
5.3 Extração do (+)-(<i>S</i>)-naproxeno ((+)-(<i>S</i>)-NPX)	66
5.4 Racemização do (+)-(<i>S</i>)-NPX	90
5.5 Preparação dos ésteres de Mosher	95
5.6 Estudo computacional dinâmica molecular	105
6. CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	114

1. INTRODUÇÃO

A química de Produtos Naturais (PN) está atrelada a civilização desde o seu primórdio, proporcionando uma melhor qualidade de vida através do uso das plantas. Conhecimentos adquiridos com a experimentação do “natural” eram passados de geração para geração por xamãs, pajés ou curandeiros (Berlinck *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2017; Morozov, 2021). Apesar de não terem o entendimento científico do funcionamento ou dos mecanismos de ação dos PN, estes eram frequentemente empregados em virtude da espiritualidade ou de rituais mágicos. Posteriormente estes conhecimentos fundamentaram os alicerces e contribuíram no processo de descoberta de novos fármacos (Almeida *et al.*, 2017).

Os PN ganharam cada vez mais destaque conforme a indústria farmacêutica progredia através das pesquisas científicas que levaram a descoberta de diversos fármacos (Singh *et al.*, 2024). Alguns compostos revolucionaram a história, sendo possível nomear a morfina (**1**), extraído de *Papaver somniferum*, a quinina (**2**), obtido de *Cinchona ledgeriana* e a colchicina (**3**), obtido de *Colchicum autumnale* (Figura 1), todos alcaloides isolados de plantas (Morozov, 2021). Porém, apesar do que geralmente é comentado, os PN não são isentos de malefícios, sendo um exemplo a estricnina (**4**) (Figura 1), que também é um alcaloide, extraído das sementes de *Strychnos nux-vomica* (Guo *et al.*, 2018). Nos Estados Unidos no período de 1926–1928, essa planta era usada como remédio para aumentar o apetite, como estimulante cardíaco e até contra a possessão demoníaca, porém, a estricnina chegou a matar mais de três pessoas todas as semanas em seu auge. Dentro deste contexto o estudo sistemático da química de PN se mostra cada vez mais importante e necessário na descoberta de novos fármacos (Hoffman *et al.*, 2014).

Figura 1 – Metabólitos especiais isolados de plantas com importância histórica.



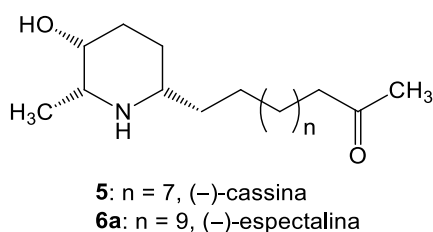
Fonte: Autora.

A flora mundial apresenta um elevado número de espécies de plantas e consequente diversidade química que culminou na aprovação de muitos medicamentos nas últimas décadas pelos órgãos de regulamentação, como o visto no Brasil com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de 2006, visando o uso seguro de fitoterápicos a partir da biodiversidade brasileira (Ministério da Saúde, 2006).

Um exemplo de espécie utilizada, na medicina tradicional, como antimicrobiana, anti-hepatotóxica e anti-inflamatória são os extratos das folhas de *Senna spectabilis*, fonte de alcaloides piperidínicos quirais (Nkantchoua, 2018). Estes compostos foram avaliados em ensaios que direcionam estudos para o desenvolvimento de potenciais candidatos a fármacos para tratar doenças negligenciadas como a Malária (Pivatto *et al.*, 2014) e a Chikungunya (Freitas *et al.*, 2022), que afetam grande parte da população em países emergentes e que não dispõe de medicamentos ou vacinas para o tratamento. Estes compostos também apresentaram atividade sobre a acetilcolinesterase, que é uma enzima associada a doença de Alzheimer (Danuello *et al.*, 2012; Viegas Junior *et al.*, 2006).

O foco desses estudos se dá principalmente sobre os alcaloides (–)-cassina (**5**) e (–)-espectralina (**6a**) (Figura 2), presentes em *S. spectabilis*. Esses compostos apresentam núcleo piperidínico trissubstituído e padrão estereoquímico com três centros estereogênicos. Ao longo dos anos, sua estereoquímica tem sido discutida com base em dados de espectroscopia na região do infravermelho (Highet, 1964), que não é uma técnica adequada para esse tipo de análise e difração de raios X (Christordis *et al.*, 1977), sendo que compostos orgânicos dificilmente apresentam cristais adequados para os estudos de raio X, o que pode resultar em incertezas nos resultados reportados.

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



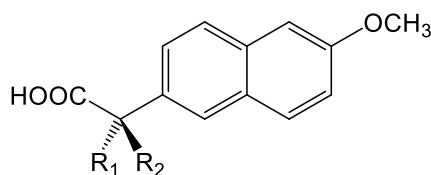
Fonte: Autora.

Além da dificuldade no estabelecimento da estereoquímica dos alcaloides piperidínicos, alguns estudos ainda reportam a existência de enantiômeros e diastereômeros nos extratos de

S. spectabilis, que não é um resultado comum devido ao maquinário enzimático estereoespecífico presente nos sistemas biológicos das plantas (Momose; Toyooka, 1993). Essas dificuldades evidenciam a necessidade de estudos aprofundados para a determinação inequívoca das configurações relativa e absoluta dos centros assimétricos destes metabólitos, servindo como base para avanços no desenvolvimento de fármacos. Dessa forma, os estudos de estereoquímica abrem perspectivas para o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias viáveis que possam auxiliar na determinação da estereoquímica de metabólitos quirais.

A determinação da estereoquímica é um importante passo no desenvolvimento de fármacos, visto que a mudança de um centro estereogênico pode culminar em atividades biológicas completamente diferentes, inclusive em efeitos adversos. Um exemplo é o fármaco (*S*)-naproxeno (**7a**) (Figura 3), vendido na forma enantiomericamente pura, usado como anti-inflamatório, em contrapartida, seu isômero (*R*)-naproxeno (**7b**) (Figura 3) tem ações hepatotóxicas indesejadas (Romero *et al.*, 2012). Essas dissemelhanças entre os enantiômeros em meio biológico são o alicerce para estudos específicos na determinação da estereoquímica.

Figura 3 – Naproxeno comercializado na forma de *S*-enantiômero.



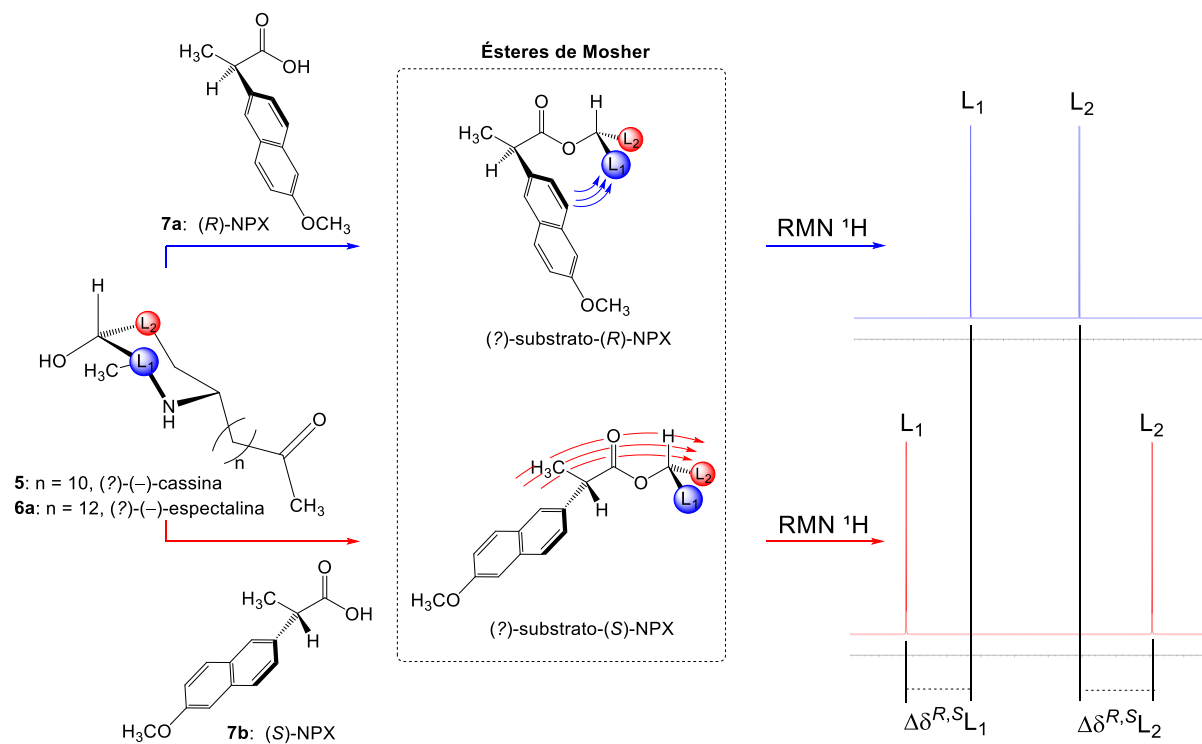
7a: R₁ = CH₃; R₂ = H, (*S*)-naproxeno

7b: R₁ = H; R₂ = CH₃, (*R*)-naproxeno

Fonte: Autora.

Estes resultados despertam o interesse para um estudo direcionado para o desenvolvimento de uma metodologia eficiente e de baixo custo, do ponto de vista químico, para a determinação da estereoquímica dos alcaloides piperidínicos de *Senna spectabilis* utilizando a análise por ressonância magnética nuclear de derivados quirais, intitulados ésteres de Mosher (Figura 4), baseado no método de dupla derivatização o qual consiste na reação de um substrato de estereoquímica não definida (?), com o reagente de estereoquímica definida, sendo possível a comparação das diferenças nos deslocamentos químicos ($\Delta\delta^{R,S}$), causados pelos efeitos anisotrópicos de grupos aromáticos sobre os substituintes (L₁ e L₂) do centro estereogênico (Figura 4).

Figura 4 – Método de dupla derivatização utilizando o naproxeno (7), como reagente de derivatização quiral, para atribuição da configuração absoluta de **5** e **6**.



Fonte: Autora.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produtos naturais

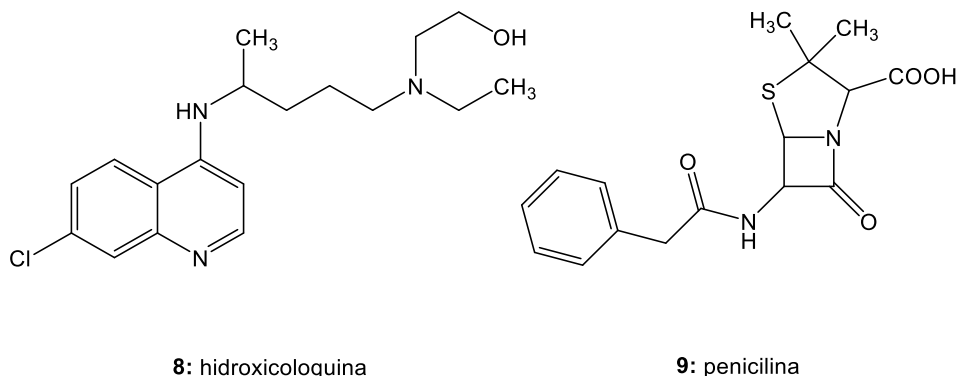
Os produtos naturais (PN) são descritos como compostos derivados de fontes naturais que vêm sendo usados desde o início da história humana. Existem relatos datados de 60.000 a.C. em túmulos de neandertais, localizados no Curdistão (Iraque), que evidenciam o uso de PN para benefício do homem (Ji *et al.*, 2009). Podemos definir estes compostos como pequenas moléculas bioativas (Gallo *et al.*, 2022).

O uso de PN perdurou por eras na civilização, sendo repassados como herança para as gerações subsequentes, posteriormente ganhando um maior destaque científico e se mantendo até os dias atuais. O conhecimento cultural, é um dos alicerces da evolução na ciência, servindo como um indicador para estudos que buscam a descoberta de novos compostos para usos medicinais, elucidando as chamadas medicinas populares e se tornando uma alternativa para o desenvolvimento de fármacos (Maciel *et al.*, 2002). Nesse sentido a estratégia etnodirigida se baseia nos saberes primevos na seleção dos PN, possuindo um significativo papel nos estudos dessa área (Albuquerque; Hanazaki, 2006).

Sendo amplamente derivados dos reinos vegetal, animal ou de microrganismos, os PN apresentam diversas funções como produtos farmacêuticos, alimentos funcionais, corantes, conservantes, aromatizantes além de outros (Rostagno, 2013). Como exemplo, o metabólito quinina (2), presente na planta *Cinchona*, serviu de inspiração à hidroxicloroquina (8) (Figura 5), amplamente utilizada e eficaz no combate da malária (Oliveira *et al.*, 2009; Wink, 2012). Sua descoberta foi de extrema importância para a sociedade, estando presente inclusive, na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023).

Outro exemplo também muito conhecido dentro da gama de PN é a descoberta da penicilina (9) (Figura 5) para o tratamento de infecções causadas por bactérias. Este antibiótico altamente eficaz, foi isolado a partir de fungos do gênero *Penicillium*, a qual sua descoberta e aplicação renderam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1945 (Wanat *et al.*, 2021; Gaynes, 2017). Outro exemplo está relacionado ao captopril, usado no relaxamento dos vasos sanguíneos, para tratamento da hipertensão. Este composto pode ser obtido do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, sendo um registro importante de fármaco derivado de PN advindo de animais (Almeida *et al.*, 2017).

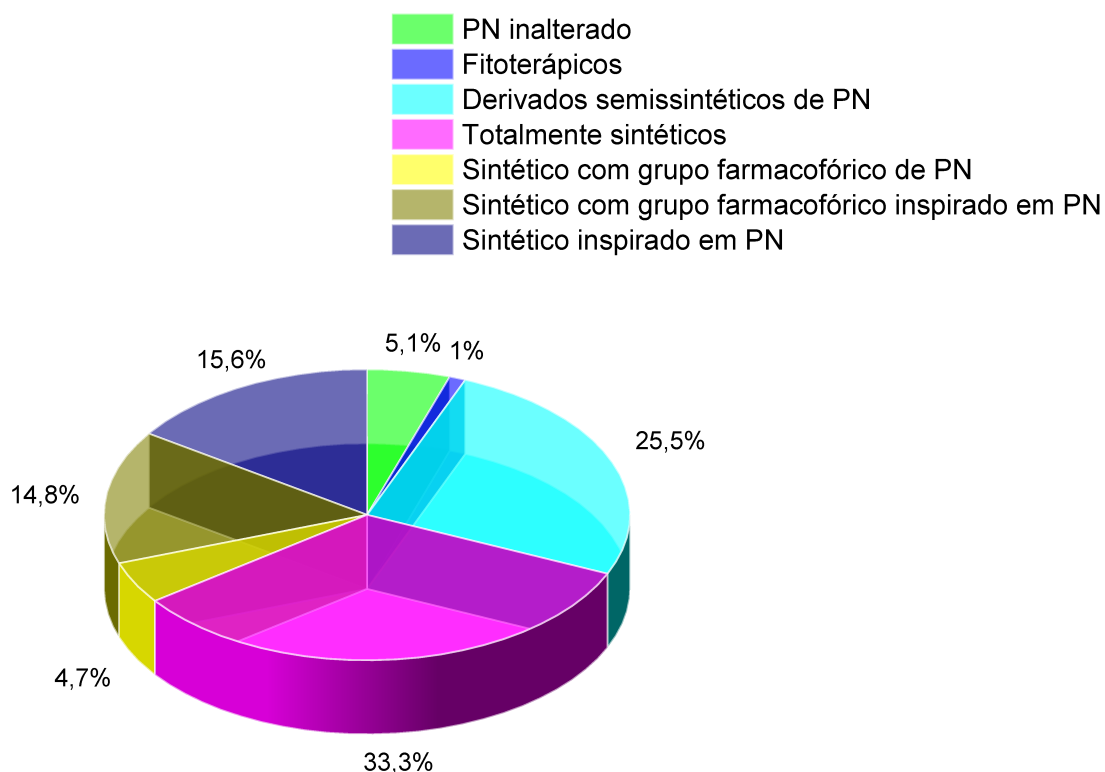
Figura 5 – Moléculas obtidas a partir de PN com grande importância, encontradas na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde.



Fonte: Autora.

De acordo com o estudo publicado por Newman e Cragg em 2020, cerca de 67% dos fármacos disponíveis no mercado nos últimos 40 anos, são inspirados ou tem origem em PN (Figura 6). Isto mostra que através de estudos químicos e ensaios biológicos de animais, fungos e plantas, foi possível identificar moléculas biologicamente ativas as quais foram modificadas, ou não, para a introdução no mercado farmacêutico. Porém, apesar desta grande porcentagem, somente 5% de todas as plantas existentes no planeta que foram estudadas do ponto de vista químico, levando a crer que ainda existe uma vasta gama de metabólitos com potencial farmacológico até então não estudados e testados (Cechinel Filho *et al.*, 1998; Bessa *et al.*, 2013). Estes dados fomentam a relevância de pesquisas focadas no descobrimento de novos PN, servindo como alicerce no desenvolvimento da sociedade, indicando que o estudo e o investimento em PN é vantajoso (Albuquerque; Hanazaki, 2006).

Figura 6 – Medicamentos aprovados entre janeiro/1981 e setembro/2019, n = 1394.

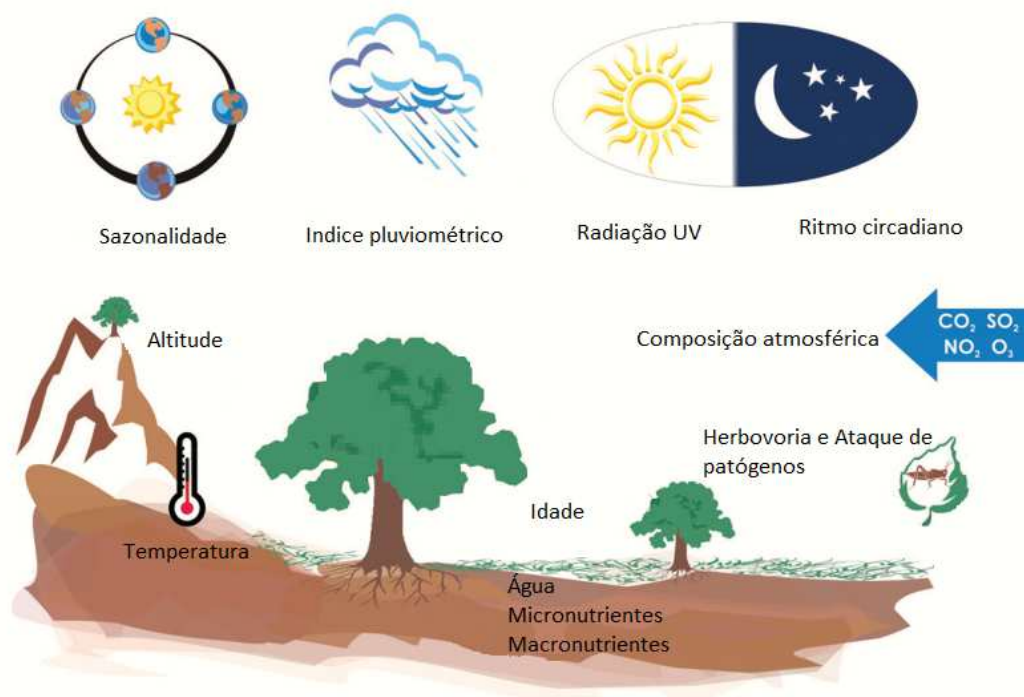


Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).

O Brasil apresenta uma parte relevante de toda a biodiversidade mundial, devido a sua fauna e flora peculiares, o que proporciona grandes possibilidades de isolamento de novos compostos oriundos dos estudos com PN (Barreiro *et al.*, 2009). É oportuno comentar que a vasta gama de compostos bioativos, provindos dos PN, está associado a variedade de metabólitos secundários presentes na natureza. Os metabólitos especiais podem ser definidos por moléculas orgânicas que possuem função adaptativa ou para sobrevivência (Dewick, 2009; Bernardini *et al.*, 2018).

Tais compostos expressam certa particularidade nas espécies, tendo sua biossíntese afetada por diversas condições ambientais, como temperatura, sazonalidade, altitude, ameaças de outras espécies, entre outras influências externas (Gobbo-Neto *et al.*, 2007) (Figura 7). Sendo assim, as circunstâncias favorecem a produção de grande variedade de metabólitos especiais, como terpenos, alcaloides, flavonoides, esteroides, entre outros, sendo produzidos para garantir vantagens adaptativas e evolutivas ao ambiente que se encontra (Gobbo-Neto *et al.*, 2007).

Figura 7 – Fatores que afetam a biossíntese dos metabólitos secundários.



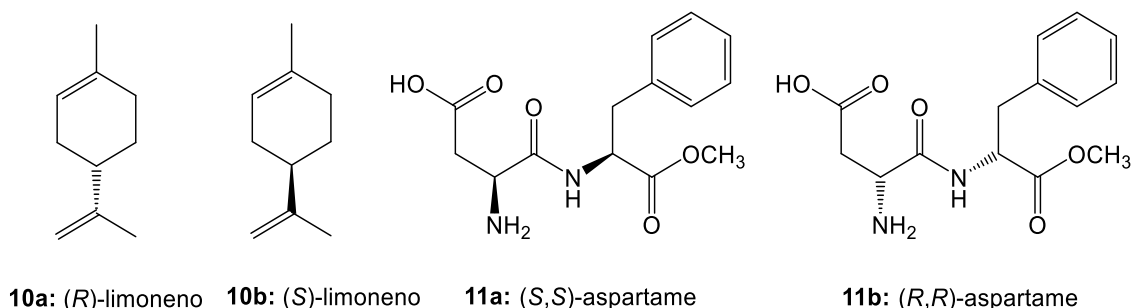
Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto *et al.* (2007).

Essas questões explicam o motivo de tamanha variedade de metabólitos presentes na natureza, sendo possível observar diferentes atividades biológicas de acordo com cada espécie, ou até mesmo ter diversidade química devido a alteração do ambiente no qual o organismo se encontra. Dentro deste contexto o conhecimento das estruturas químicas de forma inequívoca é fundamental para o desenrolar das etapas que levam ao desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros. Para isso, diferentes técnicas são utilizadas para o conhecimento da massa molecular, funções e presença/conexões de grupos específicos. Além destes aspectos ainda podem estar presentes agravantes de complexidade como os relacionados a estereoquímica, que merecem atenção especial devido a estereoespecificidade dos receptores biológicos à fármacos quirais.

2.2 Quiralidade em moléculas bioativas

Dentro dos estudos relacionados a quiralidade das moléculas, existem divisões quanto ao estereoisomerismo, que é o arranjo tridimensional dos substituintes no espaço, podendo ser, por exemplo, em torno de um carbono assimétrico. Um maior destaque é dado aos enantiômeros, cujo termo exato é descrito como um par de moléculas que apresentam a relação de objeto e imagem especular não sobreponíveis (IUPAC, 2019). Tais moléculas são de grande importância para a química de PN, visto que há uma estimativa média de 6,2 centros assimétricos por molécula de PN *versus* 0,4 em moléculas sintéticas (Batista *et al.*, 2021). Estes pares enantioméricos exibem propriedades físicas idênticas, porém se diferenciam em ambientes quirais, como exemplo em sistemas biológicos (Constantino, 2005). Alguns exemplos são o (*R*)-limoneno (**10a**) e (*S*)-limoneno (**10b**), característicos do aroma da laranja e do limão, respectivamente e o (*S,S*)-aspartame (**11a**) e o (*R,R*)-aspartame (**11b**), que possuem sabor doce e amargo, nesta ordem (Figura 8) (Ebbbers, 1997).

Figura 8 – Pares enantioméricos que exibem atividades biológicas diferentes.

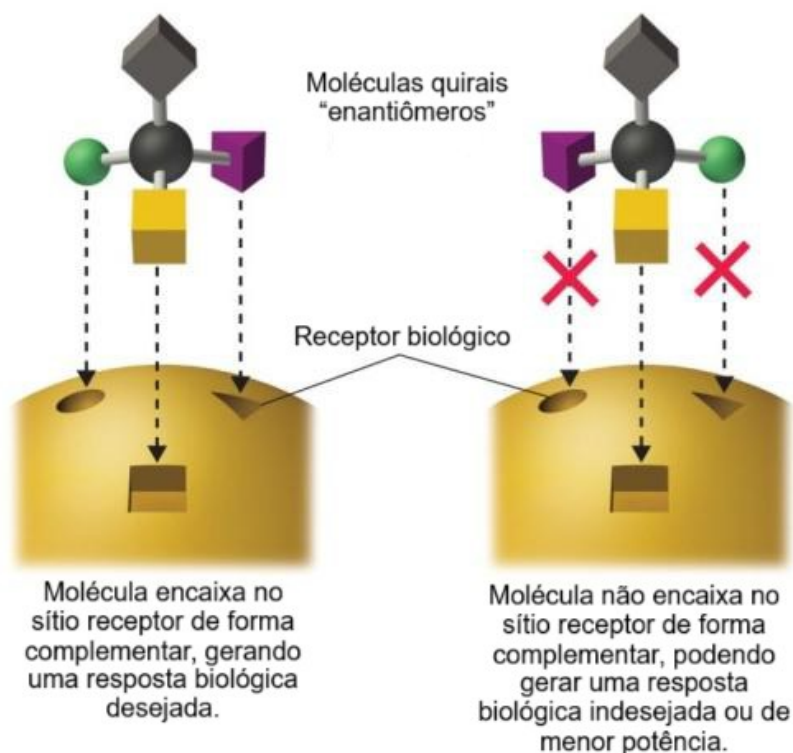


Fonte: a autora.

Easson e Stedman (1993), propuseram um modelo chamado “modelo de três pontos” (do inglês “*three point fit*”) (Figura 9) para auxiliar na explicação de como moléculas quirais interagem com sistemas biológicos. Este modelo demonstra a interação dos enantiômeros com o sítio ativo de um bioreceptor estereoespecífico, mostrando que há diferença na interação de cada um dos enantiômeros, resultando em respostas biológicas diferentes. Em Química Medicinal são utilizados os termos eutômero e distômero, sendo o primeiro utilizado para definir aquela atividade biológica desejada e o segundo para aquela atividade biológica indesejada. Esse fato está relacionado com os tipos de interações realizadas pelos fármacos quirais (Figura 9) (Hamidi *et al.*, 2015). Assim, fármacos quirais podem apresentar diminuição

ou total supressão do efeito biológico de interesse ou, ainda, o aparecimento de um efeito adverso (Coelho, 2001).

Figura 9 – Representação da interação de enantiômeros com um receptor biológico utilizando o modelo de três pontos.



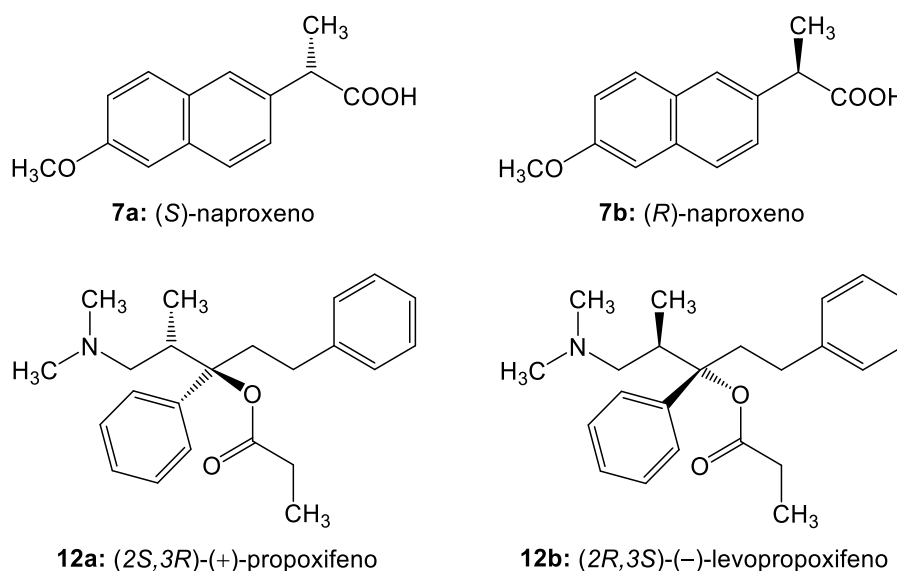
Fonte: Adaptado de Hamidi *et al.* (2015).

Dos fármacos comercialmente disponíveis, aproximadamente 56% são compostos quirais, sendo que somente 12% são administrados como enantiômero puro e o restante comercializado na forma de racematos (Singh *et al.*, 2020). Existem motivos que podem levar as empresas farmacêuticas a empregar esforços na obtenção do enantiômero ativo (eutômero) para a produção de uma única molécula (fármaco) mais potente. Porém, há justificativas para a comercialização de um fármaco na forma de racemato, por exemplo se houver alguma sinergia entre os estereoisômeros para a mesma resposta biológica ou ainda a ocorrência de bioinversões, aonde o estereoisômero menos ativo se interconverte, em meio biológico, no estereoisômero mais potente (Barreiro *et al.*, 1997). Dito isso, a decisão de separar ou não os enantiômeros, deve ser tomada depois de exaustivos estudos que avaliem todos os efeitos dos enantiômeros.

Exemplos de fármacos quirais, comercializados na forma enantiomericamente pura são:

- (*S*)-(+)-naproxeno (**7a**) (Figura 10), utilizado como anti-inflamatório, analgésico e antitérmico, vale destacar que o enantiômero (*R*)-(-)-naproxeno (**7b**) apresenta ação hepatotóxica (Romero *et al.*, 2012).
- (2*S*,3*R*)-(+)-propoxifeno (**12a**) (Figura 10), utilizado como analgésico.
- (2*R*,3*S*)-(-)-levopropoxifeno (**12b**) (Figura 10), utilizado como antitussígeno (Lima, 1997), sendo as diferenças entre **7a** e **7b** indesejadas e entre **12a** e **12b** desejadas.

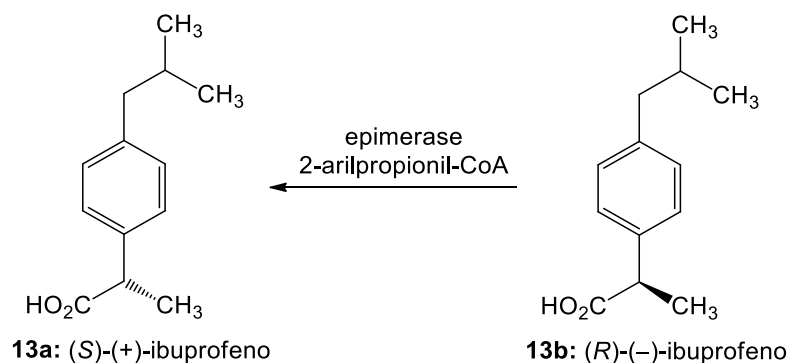
Figura 10 – Pares enantioméricos que exibem atividades biológicas diferentes.



Fonte: a autora.

Um exemplo de fármaco comercializado na forma de mistura racêmica é o ibuprofeno (Figura 11), utilizado como analgésico e antitérmico. Apesar do enantiômero (*S*)-(+)-ibuprofeno (**13a**) apresentar maior eficiência na atividade biológica, a venda deste fármaco na forma de mistura racêmica é justificada devido a biointerconversão unidirecional do (*R*)-(-)-ibuprofeno (**13b**) para **13a**, através de enzimas estereoespecíficas como a epimerase 2-arilpropionil-CoA, encontrada no citosol e mitocôndrias, atuando assim, como um pró-fármaco (Romero *et al.*, 2012; Reichel *et al.*, 1997). Assim, não há necessidade do desenvolvimento de metodologias de separação ou síntese estereoseletiva para produção de **13a**, uma vez que estaria somente agregando maior preço ao medicamento, o que seria uma desvantagem do ponto de vista comercial (Romero *et al.*, 2012).

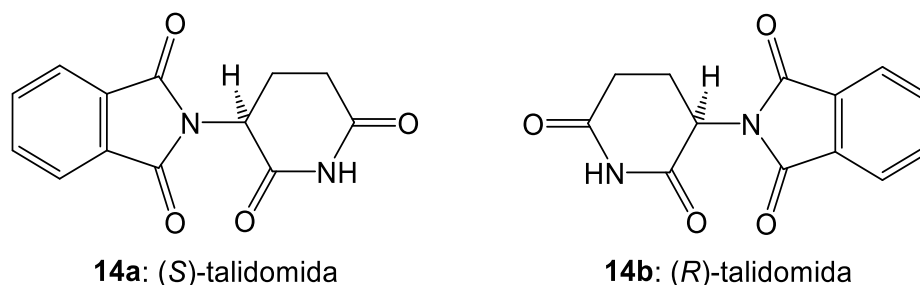
Figura 11 – Biointerconversão unidirecional do ibuprofeno através de catalise enzimática.



Fonte: a autora.

É importante destacar que o exemplo apresentado para o ibuprofeno não se repete com frequência no universo dos fármacos quirais, e não deve ser utilizado como justificativa para a comercialização de outros fármacos na forma racêmica. A falta de estudos e de testes biológicos com os enantiômeros isolados é capaz de desencadear tragédias, como é o caso da talidomida (**14a e 14b**) (Figura 12). Introduzida no comércio, na forma racêmica, no final da década de 1950, inicialmente como sedativo e posteriormente como medicamento antiemético, foi amplamente distribuída em países do leste europeu e em países da América do Sul como o Brasil. Foi banida depois de quase 5 anos, deixando um rastro de efeitos nocivos aos usuários, os chamados “filhos da talidomida” (Vargesson, 2015). Esse desastre está relacionado ao enantiômero (*S*)-talidomida (**14a**) que é teratogênico e causa má formação fetal, enquanto a (*R*)-talidomida (**14b**) apresenta efeito antiemético (Kowalczyk *et al.*, 2020). Dessa forma a história mostra que não devemos negligenciar os efeitos dos fármacos quirais (Singh *et al.*, 2020).

Figura 12 – Talidomida.



Fonte: a autora.

Dentro de um contexto de busca por novos fármacos de origem vegetal, a química de PN tem se apresentado como uma fonte importante e rica em diversidade estrutural, muitas vezes de compostos quirais que merecem atenção especial quanto à determinação da configuração absoluta dos centros estereogênicos (Romero *et al.*, 2012).

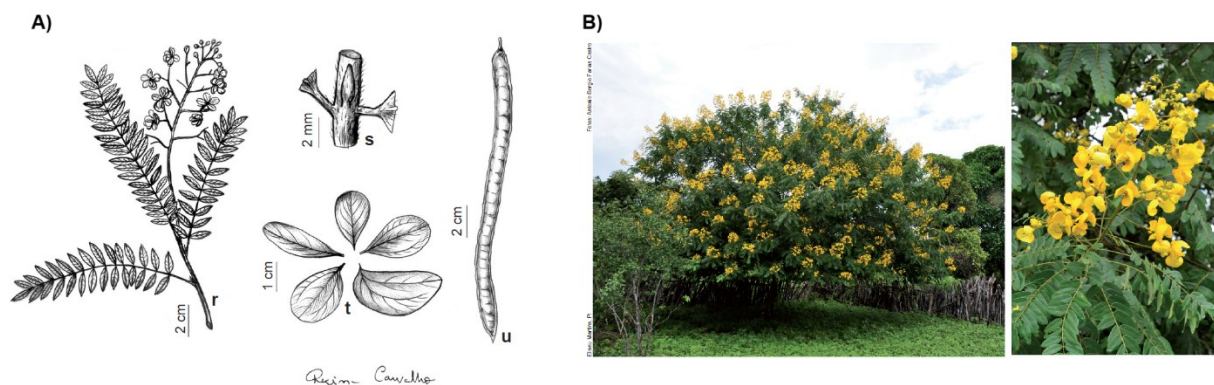
Compostos enantiomericamente puros são facilmente encontrados na natureza, no entanto, a síntese no laboratório, na maioria das vezes, é um grande desafio. Assim, os PNs podem ser usados como inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos (Guo, 2017). Nesse sentido os alcaloides encontrados em *Senna spectabilis* têm despertado grande interesse devido às atividades biológicas, pela presença na forma de pares homólogos e ainda pela estereoquímica associada a esses compostos (Freitas *et al.*, 2018).

2.3 *Senna spectabilis*

Pertencente à família Fabaceae, *Senna spectabilis* (sin. *Cassia spectabilis* ou *Cassia excelsa*) (Figura 13A), popularmente conhecida por diversos nomes, entre eles Cássia, Cássia do Nordeste, Tula-de-Besouro, Canafistula-de-Besouro e Fedegoso, é bastante utilizada na arborização das cidades (Lorenzi, 2002). Recentemente, espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia* passaram por revisões e reclassificações, levando a alterações taxonômicas em alguns casos, o que se justifica devido à grande similaridade das espécies destes gêneros (Viegas Junior *et al.*, 2006).

Senna spectabilis pode ser naturalmente encontrada em biomas brasileiros como no Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga, apresentando diversos usos populares (Santos *et al.*, 2020). Comumente utilizado como árvore ornamental, devido sua beleza e cor vibrante (Figura 13B), essa espécie também pode ser usada como alimento no âmbito agropecuário devido ao alto valor nutricional; pode ser usada na fabricação de móveis pequenos como caixotes ou como lenha (Lorenzi, 1998; Santos, 2013). Essa espécie também é muito recorrente na medicina popular, sendo relatado o uso para o tratamento da epilepsia, obstipação intestinal, insônia, ansiedade e outras (Nkantchoua, 2018).

Figura 13 – *Senna spectabilis*. r.: ramo, s.: nectário, t.: pétalas, u.: fruto.



Fonte: Adaptado de Santos *et al.* (2020) e Carvalho *et al.* (2010).

Senna spectabilis, ainda é bastante estudada, tendo várias propriedades farmacológicas avaliadas e comprovadas, dentre estas se destacam: antibiofilme, antifúngica, antibacteriana (Jothy *et al.*, 2012), antioxidante, anti-inflamatória (Oladeji *et al.*, 2021), anticonvulsivo (Nkantchoua, 2018), antimalárica (Pivatto *et al.*, 2014), anestésica, antimicrobiana, esquistomicida (Castro *et al.*, 2016), analgésica, antidepressivo (Oladeji *et al.*, 2021), antiproliferativa, leishmanicida (Melo *et al.*, 2014) e anticolinesterásica (Franca *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

As atividades biológicas estão relacionadas aos metabólitos presentes na planta, espalhados pelo caule, flores, folhas e raízes. Vale destacar que estes compostos estão presentes em baixa concentração nas plantas e por isso utilizar o isolamento como fonte para o preparo de medicamentos, não é viável.

Assim, os estudos relacionados a química de PN e química medicinal, são necessários e imprescindíveis para identificação e caracterização de novos compostos, importantes como inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser sintetizados em grande escala. Dessa forma, *Senna spectabilis* é fonte de alcaloides piperidínicos raros, que apresentam interesse farmacológico, o que evidencia a importância de estudos aprofundados sobre os metabólitos que a planta produz.

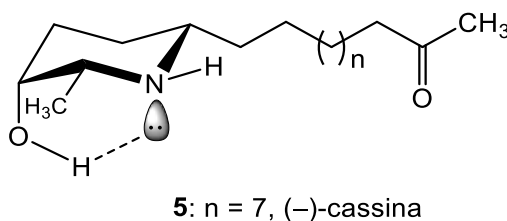
2.4 Alcaloides piperidínicos

Os alcaloides piperidínicos, presentes em *Senna spectabilis*, são os metabólitos especiais de maior abundância nas folhas, flores e frutos verdes, sendo amplamente estudados devido as atividades farmacológicas já comprovadas. O primeiro alcaloide piperidínico foi

isolado por Highet (1964), de *C. excelsa*, e nomeado de (-)-cassina (**5**) (Figura 2), sendo sua estrutura relatada corretamente por Highet e Highet (1966), em retratação. Sua caracterização foi realizada por meio de técnicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 60 MHz, infravermelho (IV), análise elementar e por meio de derivados produzidos a partir da **5**, alterando as funções orgânicas presentes.

A determinação da configuração foi realizada através da análise do espectro na região do infravermelho (IV), sugerindo que os substituintes do anel piperidínico, até então identificados, seriam todos *cis* (Figura 15). Essa informação foi obtida devido a observação de uma única banda de absorção no IV em $\bar{\nu}$ 3530 cm^{-1} , atribuída ao grupo hidroxila quando faz ligação de hidrogênio intramolecular com o nitrogênio, que é diferente do sinal de hidroxila livre que absorve em $\bar{\nu}$ 3630 cm^{-1} (Highet, 1964). No entanto, este resultado sozinho não é conclusivo para estabelecer a configuração absoluta do composto.

Figura 15 – Representação da ligação de hidrogênio intramolecular para a (-)-cassina.



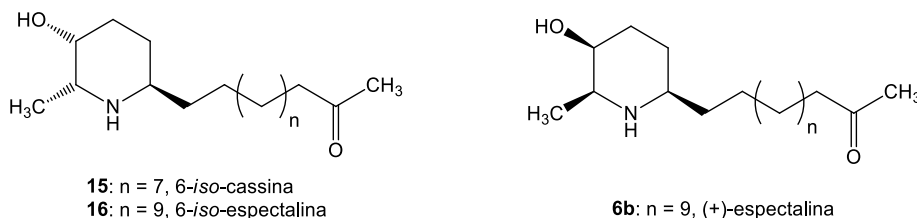
Fonte: a autora.

Diferentes estudos foram realizados nos anos que se seguiram ao isolamento feito por Highet, buscando a determinação da configuração de **5**. Rice Junior e Coke (1966), realizaram a semissíntese da **5**, partindo de um alcaloide conhecido, cuja configuração também já estava estabelecida, com o objetivo de demonstrar similaridade espectral entre o composto sintetizado e **5**. Como resultado, a configuração absoluta e relativa foi estabelecida por comparação polimérica, sendo 2-(*R*)-metil-3-(*R*)-hidroxi-6-(*S*)-(11-oxododecil)-piperidina, corroborando com o relatado anteriormente, onde os substituintes do anel piperidínico são *cis*.

Além de **5**, outros alcaloides também foram identificados em *S. spectabilis*, como a (-)-espectralina (**6a**), que é um homólogo de **5** (Mulchandani; Hassarajani, 1977); a (+)-espectralina (**6b**) (Figura 16), que seria um enantiômero de **6a** (Christofidis *et al.*, 1977); a (-)-6-*iso*-cassina (**15**) (Christofidis *et al.*, 1977) e 6-*iso*-espectralina (**16**) (Viegas Jr. *et al.*, 2004), que são diastereoisômeros de **5** e **6** (Figura 15). Além destes, outros metabólitos já foram relatados em *Senna spectabilis*, porém os de maior ênfase nesta pesquisa são os homólogos (-)-

cassina e a (-)-espectralina. Na sugestão para a determinação da configuração dos centros assimétricos, foram utilizadas técnicas como difração de Raio-X (DRX), infravermelho e análises polarimétricas (Christordis *et al.*, 1977a; Pivatto *et al.*, 2014).

Figura 15 – Alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis*.



Fonte: a autora.

Entretanto, é importante considerar que a técnica de DRX para determinação da estereoquímica requer a formação de cristais bem definidos para realização do experimento e obtenção de resultados confiáveis, e estes alcaloides, não cumprem essa exigência, uma vez que grande parte deles apresenta aspecto de sólidos amorfos. De forma semelhante, a discussão baseada unicamente nos resultados obtidos dos espectros IV, também não são suficientes para a determinação inequívoca da estereoquímica dos alcaloides isolados, o que pode ter gerado resultados equivocados. Em 1996, Bolzani *et al.*, isolou o alcaloide **6a** e estabeleceu a configuração relativa por dados de RMN ^1H e COSY. Vale destacar que neste estudo a espécie foi erroneamente classificada como *Cassia leptophylla*.

É importante salientar que o metabolismo enzimático das plantas, que é estereoespecífico, geralmente também leva a produção de metabólitos estereoespecíficos, o que desperta a preocupação em relação a tamanha diversidade estereoquímica relatada na literatura para os alcaloides piperidínicos isolados de *S. spectabilis* por diferentes pesquisadores. Seriam realmente compostos com diferentes estereoquímicas ou seriam erros de determinação?

Vale ressaltar que a existência dos pares homólogos **5/6a** e **15/16**, que diferem por duas unidades de CH_2 , apresentam grande desafio na separação (Silva *et al.*, 2011; Pivatto, 2010), uma vez que séries homólogas geralmente apresentam características físico-químicas bastante semelhantes. Técnicas como cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia em coluna (CC) de bancada não separam estes compostos de forma eficiente, comumente apresentando na CCD o mesmo R_f . Um importante marco nessa perspectiva foi o trabalho desenvolvido por Pivatto *et al.* (2005), que através de um estudo sistemático utilizando a

espectrometria de massas (EM), comprovou a existência desta mistura de pares homólogos, levantando a possibilidade de que os estudos de isolamento, realizados até então, poderiam estar relatando na verdade a mistura dos pares homólogos. Adicionalmente, estudos que fizeram a avaliação biológica dos homólogos isolados de *S. spectabilis*, também apresentaram diferentes resultados (Pivatto *et al.*, 2014; Lacerda *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2018), o que mostra a importância de um estudo sistemático envolvendo também a estereoquímica destes metabólitos.

Em resumo, devido as incongruências relatadas, há a necessidade de estudos direcionados para a estereoquímica dos alcaloides piperidínicos de *Senna spectabilis*, para determinar de maneira inequívoca a configuração relativa e absoluta destes compostos. Esses resultados são importantes e auxiliam nos estudos da química medicinal, contribuindo para a melhor compreensão da atividade biológica. Dessa forma, o método desenvolvido por Mosher, conhecido também como “análise dos ésteres de Mosher” pode ser uma alternativa para compreensão da estereoquímica dos alcaloides piperidínicos.

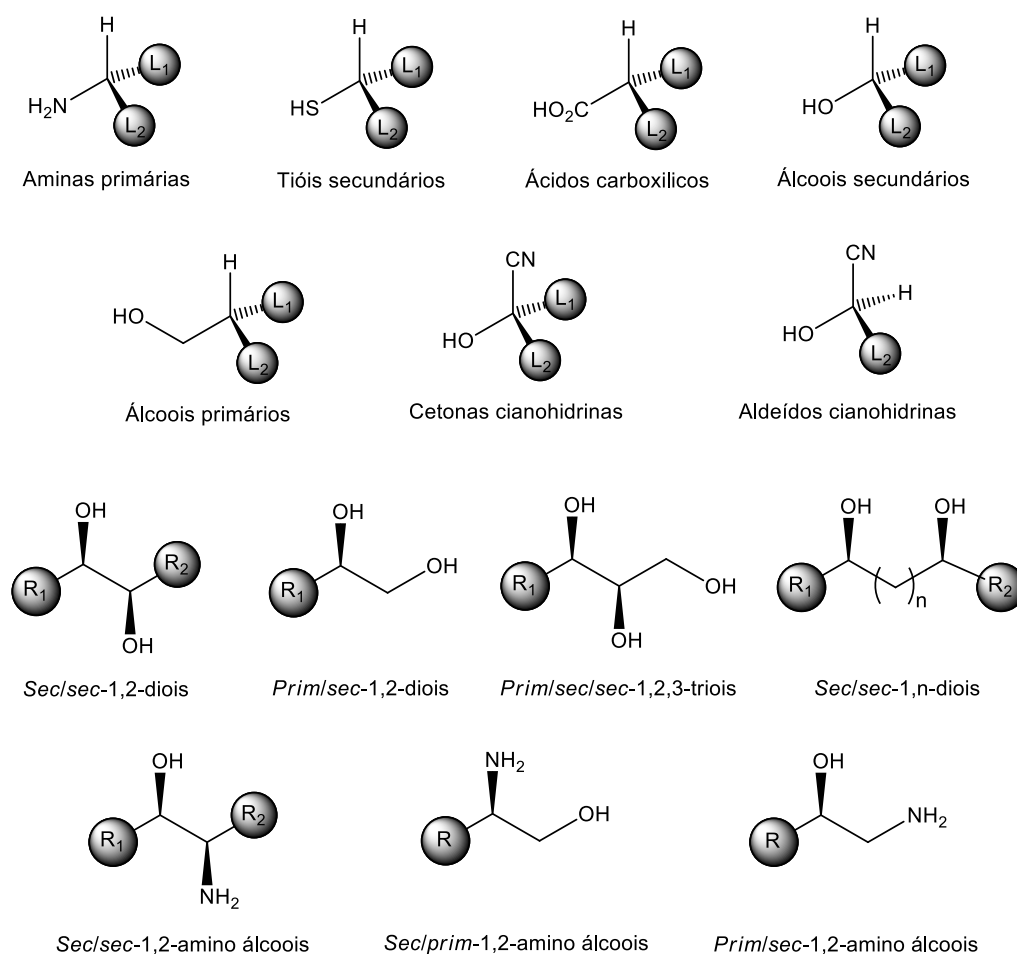
2.5 Método de Mosher

A determinação da configuração absoluta de moléculas é feita principalmente por técnicas como Cristalografia de Raios X ou métodos quirópticos como o Dicroísmo Circular. Cada uma das técnicas possui limitações como a exigência de cristais bem definidos ou a necessidade de absorção de luz em um determinado comprimento de onda, respectivamente, o que as vezes não é possível em alguns casos. Porém, abordagens espectroscópicas como a ressonância magnética nuclear (RMN) através do uso de auxiliares quirais, pode ser uma alternativa e ainda apresentar algumas vantagens como, a necessita de quantidades pequenas da amostra, podendo ser sólida ou líquida em solução (Seco *et al.*, 2004).

Ao analisar os espectros de RMN obtidos do par enantiomérico, geralmente, não é possível identificar diferença entre eles, não sendo possível a determinação inequívoca da estereoquímica. Sendo assim, para que a determinação seja possível, e a identificação da configuração absoluta possa ser estabelecida pela diferença dos espectros, é necessário o uso de um auxiliar quiral durante as análises, sendo que os mais comumente utilizados são os solventes que proporcionam o reconhecimento de ambientes quirais ou o uso de reagentes de derivatização quiral (RDQ). Apesar do grande potencial da técnica, o uso de solventes quirais, como auxiliares, não fornecem desvios apreciáveis nos espectros, sendo usados quase que somente para medições de pureza enantiomérica (Seco *et al.*, 2004). A segunda abordagem, que

faz uso de RDQ, consiste em conectar, por ligação covalente, o substrato à dois auxiliares quirais (enantioméricos) de configuração absoluta definida (*R* e *S*). Os produtos da dupla derivatização apresentam a relação de diastereoisômeros, levando a diferenças maiores nos deslocamentos químicos (RMN ^1H), sendo um método eficiente para atribuição da configuração. Porém, é necessária uma avaliação detalhada do substrato para escolha correta do RDQ a ser utilizado (Seco *et al.*, 2015). Dentro dessa perspectiva, estudos conseguiram caracterizar uma grande variedade de substratos (Figura 16).

Figura 16 – Substratos quirais que tiveram suas estereoquímicas estabelecidas utilizando RDQ.

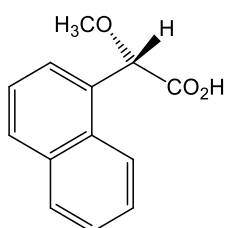


Fonte: a autora.

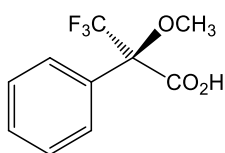
Existem três componentes estruturais fundamentais que caracterizam os RDQ (Figura 18); a presença de um grupo capaz de se ligar covalentemente ao substrato; um grupo com anisotropia magnética para proteção/desproteção seletiva dos substituintes do substrato; e

por fim, um grupo capaz de direcionar a conformação dos diastereoisômeros formados, capaz de potencializar o efeito do grupo anisotrópico.

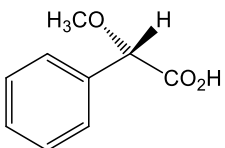
Figura 17 – Reagentes de derivatização quiral (RDQ) comumente utilizados para determinação de configuração absoluta.



17: Ácido 1-naftil- α -metoxi acético (*R*)-1-NMA



18: Ácido α -metoxi- α -trifluorofenilacético (*R*)-MTPA



19: Ácido α -metoxi-fenil acético (*R*)-MPA

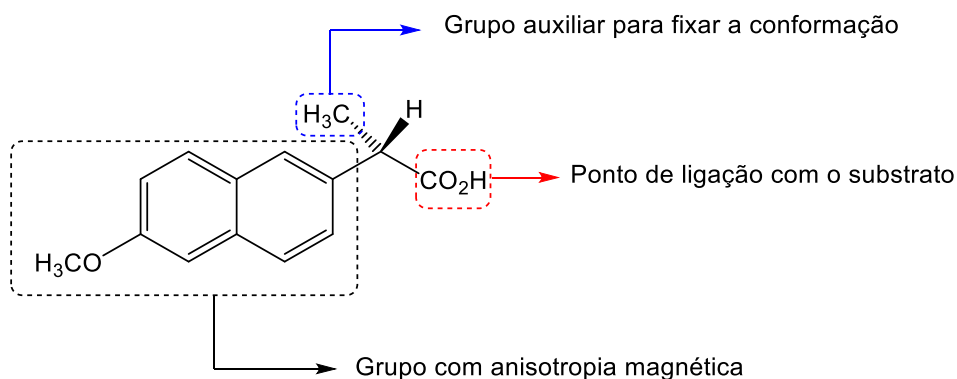
Fonte: a autora.

O ácido α -metoxi- α -trifluorometoxilfenilacético ((*R*)-MTPA) (**18**) (Figura 17) é um dos reagentes de derivatização mais comumente empregado que foi utilizado pela primeira vez por Dale, Dull e Mosher em 1969. Desde então, vários estudos utilizam esse método, que ficou conhecido como análise dos ésteres de Mosher. O nome se deve ao produto derivatizado que é um éster, obtido através de uma ligação covalente entre o substrato e o reagente. No entanto, também são relatados alguns problemas envolvendo o uso desses reagentes, como serem altamente higroscópicos, as vezes caros para aquisição, baixa reatividade (produtos com baixos rendimentos) e com diferenças nos deslocamentos químicos ($\Delta\delta^{RS}$) muito pequenas, por isso a necessidade de uma boa avaliação na escolha do RDQ (Marques *et al.*, 2019).

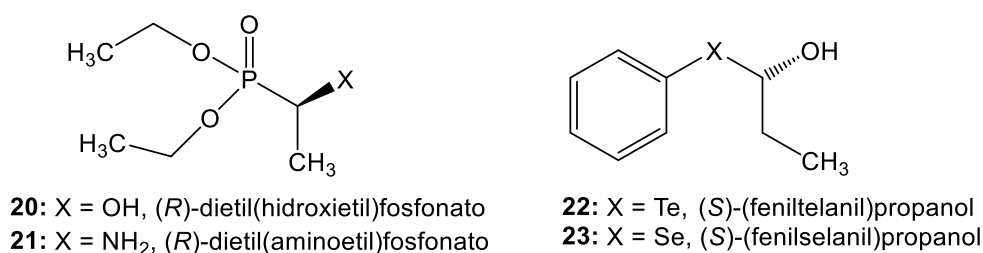
Uma alternativa de baixo custo é o (*S*)-naproxeno ((*S*)-NPX) (**7a**) (Figura 18), vendido nas farmácias como medicamento anti-inflamatório na forma de excesso enantiomérico ($\geq 98\%$) (Ma *et al.*, 2019), que já foi utilizado para a determinação da estereoquímica do

(*R*)-dietil-(hidroxietil)fosfonato (**20**), (*R*)-dietil-(aminoetil)fosfonato (**21**), (Błaśewska *et al.*, 2007), (*S*)-(feniltelanil)propanol (**22**) e (*S*)-(fenilselanil)propanol (**23**) (Marques *et al.*, 2019).

Figura 18 – (*S*)-Naproxeno como RDQ, uma alternativa de baixo custo para a determinação da estereoquímica absoluta.



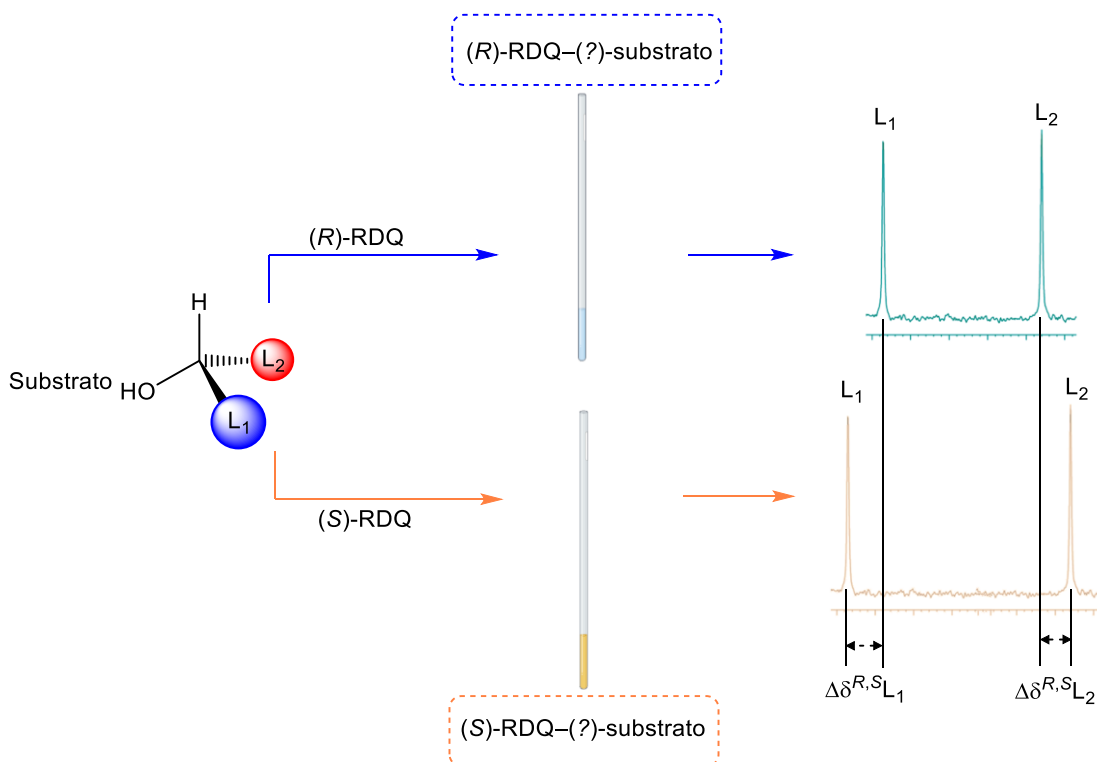
7a: (+)-(-)-*S*-ácido-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanóico



Fonte: a autora.

O método mais difundido, que segundo a literatura são obtidos os melhores resultados dos RDQ é utilizando a dupla derivatização, onde o substrato de estereoquímica não definida reage com cada um dos enantiômeros do RDQ separadamente, ou seja, (*R*)-RDQ e (*S*)-RDQ (Figura 19). Posteriormente, são comparadas as diferenças nos deslocamentos químicos ($\Delta\delta^{R,S}$) dos espectros de RMN dos produtos obtidos na derivatização. Dessa forma os ligantes (L₁ e L₂) do carbono assimétrico são singletos no espectro de RMN ¹H e absorvem em uma escala arbitrária, sendo deslocados em cada espectro, em função do grupo anisotrópico do respectivo RDQ (Figura 19).

Figura 19 – Dupla derivatização: deslocamento dos sinais nos espectros de RMN ^1H em função do efeito anisotrópico dos RDQs.

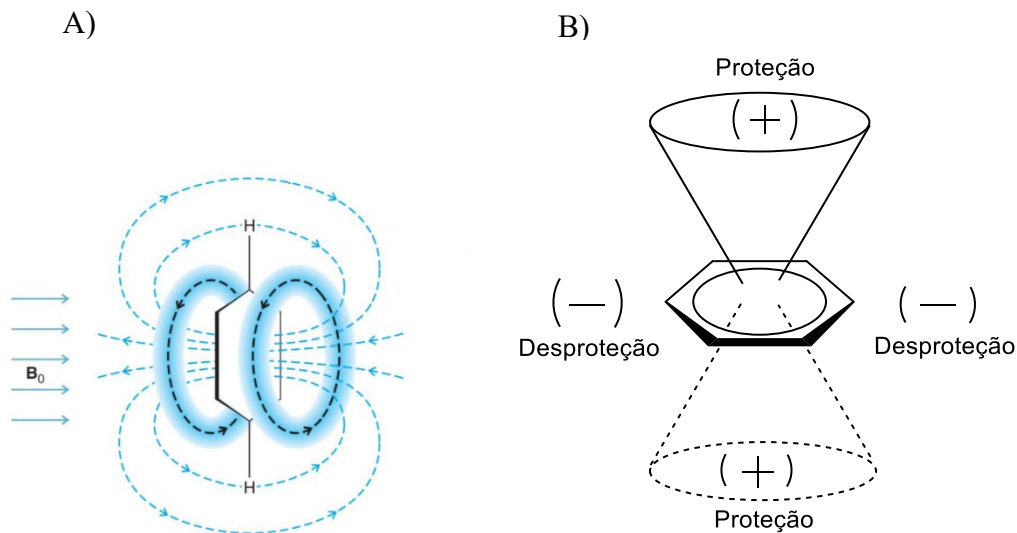


Fonte: a autora

Os deslocamentos vistos nos espectros são provocados pelo efeito anisotrópico gerado pelos sistemas aromáticos dos RDQ. Os ligantes do carbono assimétrico do substrato que se conecta ao RDQ, sofrem influência de proteção ou desproteção. A corrente de elétrons π do sistema aromático gera um campo magnético induzido secundário que interage com o campo magnético externo, chamado de B_0 e produzido pelo equipamento de RMN. Nas regiões em que o campo magnético induzido pelos elétrons se opõe ao B_0 , ocorre uma interferência anulando parte da intensidade do B_0 e blindando os hidrogênios que estiverem nesta região, causando deslocamentos químicos com valores menores no espectro de RMN ^1H (Figura 21) (Silverstein *et al.*, 2005).

De modo contrário, quando há uma interferência somando a intensidade do campo magnético induzido com B_0 , haverá um efeito de desblindagem dos hidrogênios, movimentando os sinais para regiões de deslocamentos químicos maiores no espectro de RMN ^1H (Figura 20). O efeito de blindagem não é restrito aos sistemas aromáticos, no entanto, são mais pronunciados nesses sistemas, aumentando proporcionalmente de acordo com o tamanho do sistema aromático, o que pode ser observado a partir do benzeno, naftaleno e antraceno.

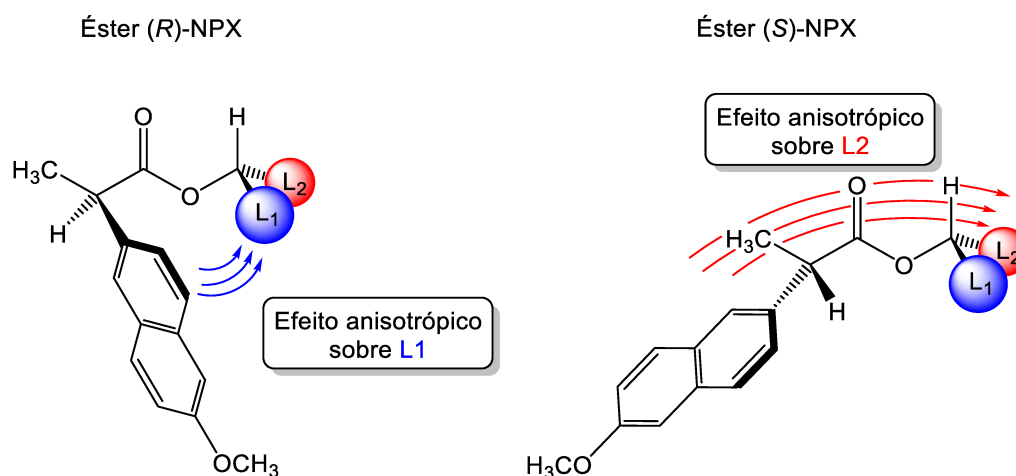
Figura 20 – (A) Corrente de elétrons π do benzeno gera campo magnético induzido; (B) Regiões de proteção e desproteção.



Fonte: Adaptado de Solomons (2013) e Pavia (2010).

As diferenças nos deslocamentos químicos dos ligantes nos dois derivados geralmente é suficiente para determinar a estereoquímica do carbono assimétrico. A diferença é calculada utilizando a fórmula: $\Delta\delta^{R,S} L_x = (\delta^R L_x - \delta^S L_x)$, e indica em qual lado cada substituinte se encontra quando comparado com o grupo anisotrópico (Figura 21). Dependendo do enantiômero do RDQ usado na derivatização, terá um ligante que estará mais fortemente protegido tendo o δ deslocado para valor menor, o que é utilizado para o estabelecimento da estereoquímica. No entanto, mudanças nos equilíbrios conformacionais podem resultar numa menor intensidade do efeito de blindagem o que influencia na magnitude do $\Delta\delta^{R,S}$ e dificulta o estabelecimento da estereoquímica.

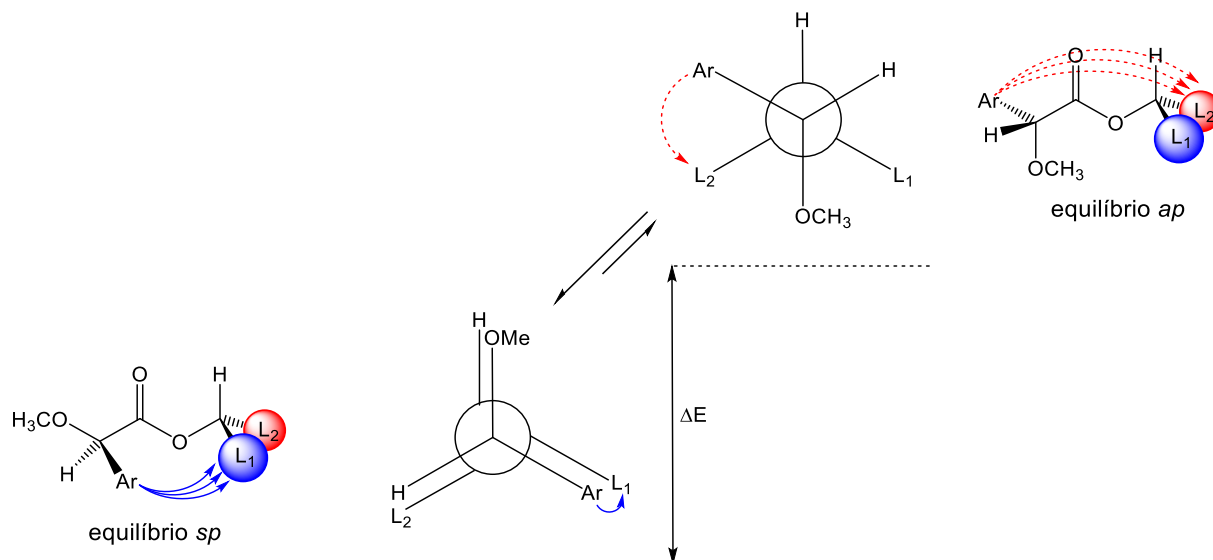
Figura 21 – Efeitos de blindagem do grupo naftil do NPX sobre os ligantes ($L_x = L_1$ e L_2) do carbono assimétrico.



Fonte: a autora.

A metodologia de ésteres de Mosher também pode ser utilizada a partir da análise dos espectros de um único produto em diferentes temperaturas. O aumento da temperatura durante a análise desloca o equilíbrio no sentido endotérmico, aproximando a proporção (%) entre os conformêros, e a diminuição da temperatura desloca o equilíbrio no sentido exotérmico, mantendo o equilíbrio deslocado para o conformêro mais estável, ou seja, a mesma molécula em diferentes temperaturas pode apresentar diferenças nos δ dos sinais no RMN 1H , informação importante na determinação da stereoquímica. Essa informação evidencia a importância de estudos envolvendo a análise dos conformêros, principalmente dos ésteres (RDQ-substrato). Estudos teóricos e experimentais com o MPA (**19**) mostraram que existe uma preferência pelos conformêros sinperiplanar (*sp*) e antiperiplanar (*ap*) e entre eles o equilíbrio é deslocado para o conformêro *sp* (Figura 22). O efeito anisotrópico do RDQ sobre os ligantes em cada um dos conformêros é diferente, e por consequência, os deslocamentos químicos são afetados (Figura 22). Assim, o efeito de blindagem do sistema aromático (Ar) sobre L_1 é mais intenso no equilíbrio *sp*. Já no equilíbrio *ap* é possível observar o efeito de blindagem sobre L_2 de forma mais intensa. No caso do (R)-MPA (Figura 22), o conformêro de menor energia é representado pelo *sp*, o qual o H do substrato está eclipsado com o grupo OCH_3 do RDQ, fixando a posição do grupo anisotrópico (Ar) sobre o ligante L_1 . De maneira semelhante o H do substrato também está eclipsado com a carbonila do éster formado, tendo a conformação fixada pela ligação de hidrogênio intramolecular, vista nos dois conformêros representados.

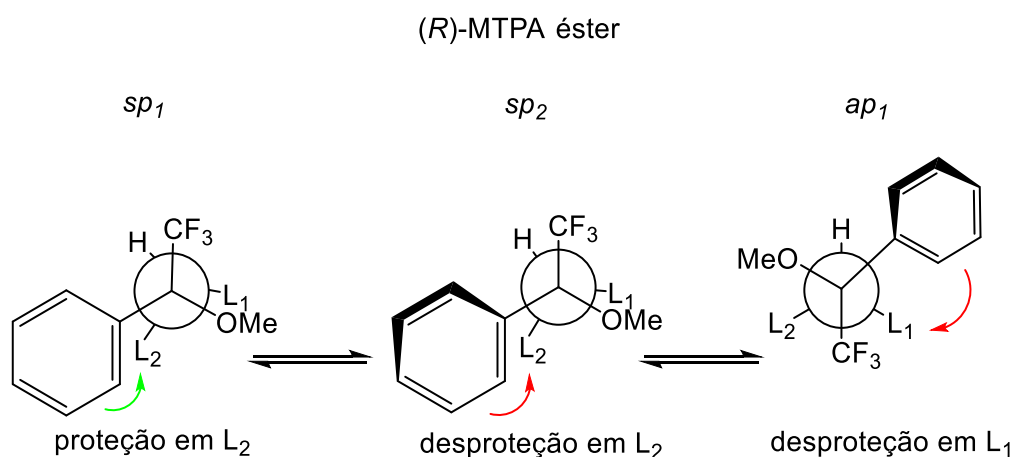
Figura 22 – Equilíbrios conformacionais do (*R*)-MPA–substrato.



Fonte: a autora.

O MTPA (**18**) também é um RDQ muito utilizado que possui três confôrmeros principais (Figura 23), sendo que os efeitos anisotrópicos em cada um dos confôrmeros podem ser diferentes e até se anularem entre confôrmeros, o que pode gerar valores de $\Delta\delta^{S,R}$ pequenos e difíceis de serem interpretados. Essas diferenças entre os RDQ utilizados, evidenciam que apesar do método ser eficiente na determinação da configuração, é necessária uma análise conformacional detalhada do produto derivatizado.

Figura 23 – Equilíbrio conformacional do MTPA.



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

Os estudos teóricos através da química computacional, mais especificamente os cálculos de dinâmica molecular (DM), são ferramentas importantes nas análises conformacionais. A DM pode ser utilizada para simular o comportamento de moléculas em diferentes solventes, analisando e prevendo as principais conformações moleculares (Schlick, 1996). Dessa forma, é possível estipular as porcentagens dos confôrmers, estados de energia, temperatura necessária para interconversão em diferentes meios (solventes), entre outras variáveis, sendo os cálculos de DM usados como estratégia para refinar os dados de raios-X ou RMN (Mackrell; Banavali; Foloppe, 2001).

Diante da importância biológica que os alcaloides piperidínicos de *S. spectabilis* têm apresentado como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos e da necessidade do conhecimento de forma inequívoca da quiralidade associada a esses metabólitos, selecionamos o método de Mosher como estratégia para atribuição da estereoquímica absoluta. Assim, elegemos os alcaloides (–)-cassina e a (–)-espectralina como modelos para os estudos, uma vez que são compostos relativamente abundantes na espécie, no entanto, não apresentam grupos cromóforos e não formam cristais, o que inviabiliza o uso de outras técnicas e evidencia a importância da estratégia desenvolvida por Mosher.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para a determinação da estereoquímica absoluta dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina, isolado das flores de *S. spectabilis*, utilizando como reagente de derivatização quiral o (+)-(*S*)-naproxeno ((*S*)-NPX), um anti-inflamatório comercializado na forma de enantiômero puro.

3.2 Objetivos específicos

- Obter os alcaloides piperidínicos (–)-cassina e (–)-espectralina do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*;
- Obter o (*S*)-NPX, a partir de fármacos comerciais, avaliar a pureza e identificar sua estrutura através das técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Desenvolver uma metodologia para racemização do (*S*)-NPX para obtenção do (*R*)-NPX;
- Sintetizar os ésteres de Mosher;
- Desenvolver uma metodologia de purificação/separação dos ésteres;
- Avaliar as conformações de menor energia dos ésteres utilizando cálculos computacionais;
- Avaliar os dados de RMN ¹H dos ésteres sintetizados;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

- Banho de ultrassom FISATOM modelo 550.
- Balança analítica SHIMADZU modelo AX 200.
- Câmara escura para luz ultravioleta (UV 254 e 365 nm) SOLAB modelo SL-204.
- Linha de secagem de amostra a pressão reduzida (bomba) EDWARDS modelo RV5.
- Rotaevaporador BUCHI modelo R-100 (componentes: banho de aquecimento Buchi B-465 e bomba de vácuo Buchi V-100).
- Agitador magnético GEHAKA modelo AA-2050.
- Polarímetro analógico Nova Optical Systems, modelo NO WXG-4 (luz monocromática de lâmpada de sódio a 589,3 nm).
- Polarímetro analógico KRUSS, modelo P1000-LED (luz monocromática de lâmpada de sódio a 589,3 nm).
- Aparelho de temperatura de fusão GEHAKA, modelo PF1500.

4.2 Solventes e reagentes

- Etanol (EtOH): Synth P.A. ACS
- Metanol (MeOH): J. T. Baker CLAE
- Triclorometano ou clorofórmio (CHCl₃): Êxodo Científica P.A.
- Hidróxido de amônio (NH₄OH): Synth P.A. ACS
- Solventes de grau analítico (P.A.) da empresa Química Araguaya, purificados por destilação fracionada: etanol, hexano, clorofórmio e acetato de etila.
- Ácido acético glacial (CH₃CO₂H): Synth P.A. ACS
- Ácido hexacloroplatínico IV: Vetec P.A.
- Iodeto de potássio: Vetec P.A.
- Clorofórmio-*d* 99,8% ACROS Organics.
- Clorofórmio deuterado (CDCl₃) Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
- Ácido fórmico grau CLAE da Panreac

4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para as análises de cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 de 0,20 mm de espessura com indicador de fluorescência (UV254/366), suportadas em folhas de alumínio (Macherey-Nagel).

Para as placas de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram utilizadas placas comerciais de sílica gel GF de 0,5 mm de espessura com indicador de fluorescência (UV254) (Uniplate).

4.2.2 Preparo do revelador de iodocloroplatinato (IClPt)

Solução A: Solução aquosa de 5% (m/m), de ácido hexacloroplatinico (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). (Touchstone; Dobbins, 1978)

4.2.3 Cromatografia em coluna aberta

Para as separações por cromatografia em coluna (CC) aberta foi utilizada a fase estacionária (FE) de sílica gel (SiO₂) para cromatografia *flash* (40–63 µm, diâmetro de poro 60 Å) (Sigma Aldrich).

4.2.4 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) foram feitas na Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM) localizado no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), campus Santa Mônica, utilizando o equipamento:

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência da Shimadzu Corporation, modelo LC_6AD, com os seguintes módulos: controlador do sistema modelo CBM-20A; detector evaporativo por espalhamento de luz (do inglês *evaporative light scattering detector* – ELSD) modelo ELSD-LT II; detector de arranjo de diodo (DAD) modelo SPD-M40A; forno de coluna modelo CTO-20A; auto amostrador modelo SIL-10AF; coletor de frações FRC-10A; desgaseificador modelo DGU-20A_{SR}. O equipamento é vinculado a uma estação de dados com software LCSolutions.

As análises de cromatografia a líquido de alta eficiência hifenado a espectrômetro de massas (CLAE-EM), foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), coordenado pela professora Luciana Machado Bastos, utilizando um equipamento de CLAE (Agilent modelo Infinity 1260), hifenado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF (Agilent® modelo 6520 B) com fonte de ionização por *electrospray* (IES).

As massas acuradas obtidas dos espectros de massas em alta resolução foram comparadas com as massas exatas obtidas no software ChemDraw Ultra 12.0, sendo calculado os erros em ppm utilizando a equação abaixo:

$$Erro_{(ppm)} = \frac{(Massa\ acurada - massa\ exata)}{massa\ exata} \times 10^6$$

As amostras foram solubilizadas em Metanol (MeOH) grau CLAE, sendo filtradas em membrana de politetrafluoretileno 0,45 µm. Para as análises foram utilizadas as colunas:

- Coluna analítica Phenomenex® Luna (250,0 × 4,6 mm, 5 µm) protegida pela respectiva pré-coluna.
- Coluna semipreparativa Phenomenex® Luna C₁₈ (250,0 × 10,0 mm, 10 µm).
- Coluna quirál analítica da Phenomenex® Lux celulose-4, com diâmetro interno (d.i.) de 4,6 mm e comprimento de 25 cm (250,0 × 4,6 mm, 5 µm), protegida pela respectiva pré-coluna.
- Coluna Agilent Poroshell (100,0 × 3,0 mm, 2,7 µm).

4.2.5 Cromatógrafo a Gás

As análises de cromatografia a gás com detecção por ionização em chama (do inglês, *flame ionization detection*) (CG-FID), foram feitas no RELAM localizado no IQ-UFU, campus Santa Mônica, utilizando o equipamento:

Cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2014/C114847-09428 e auto injetor Shimadzu, modelo AOC-20i Plus, com as seguintes condições: gás transportador nitrogênio a fluxo constante de 2,32 mL.min⁻¹; coluna cromatográfica capilar phenomenex® ZB-5ms (30 m × 250 µm × 0.25 µm); temperatura do injetor ajustada a 250 °C, com uma proporção de

divisão de 1:30; condições de análise: temperatura inicial do forno 100 °C, com aumento gradual de 13 °C.min⁻¹ até 280 °C, onde foi mantida por 8 min; tempo total de análise 21,8 min.

As análises de cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons (CG-EM-IE) foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), campus Umuarama, utilizando o equipamento:

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⁻¹; coluna cromatográfica capilar Agilent 19091S-433 HP-5ms (30 m × 250 µm × 0.25 µm); temperatura do injetor ajustada a 210 °C, com uma proporção de divisão de 1:20; condições de análise: temperatura inicial do forno 100 °C, com aumento gradual de 13 °C.min⁻¹ até 280 °C, onde foi mantida por 8 min; tempo total de análise 21,8 min. As amostras foram solubilizadas em CH₂Cl₂ e os valores das massas detectadas entre 35–550 u foram registrados no espectro.

4.2.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises foram realizadas no espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla) da RELAM localizado IQ/UFU, operando em frequências de 400 e 100 MHz para os núcleos de hidrogênio e carbono, respectivamente. Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando TMS como padrão interno ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$) ou o residual do solvente.

4.2.7 Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)

As análises de UV-Vis foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPpEN) do IQ-UFU, campus Santa Mônica, coordenado pelo prof. Alberto de Oliveira, utilizando um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific modelo GENESYS 10S UV-Vis, fazendo a leitura de absorbância entre 190–1100 nm. As amostras foram solubilizadas em MeOH grau CLAE e as análises foram realizadas utilizando cubetas de 1 cm. O cálculo do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) foi realizado com base na fórmula:

$$A = -\log(T) = \epsilon \times b \times C$$

Nota: A = Absorção; T = Transmitância; b = caminho óptico (cm); C = concentração (mol.L⁻¹); ε = coeficiente de absorvidade molar (L.cm⁻¹.mol⁻¹)

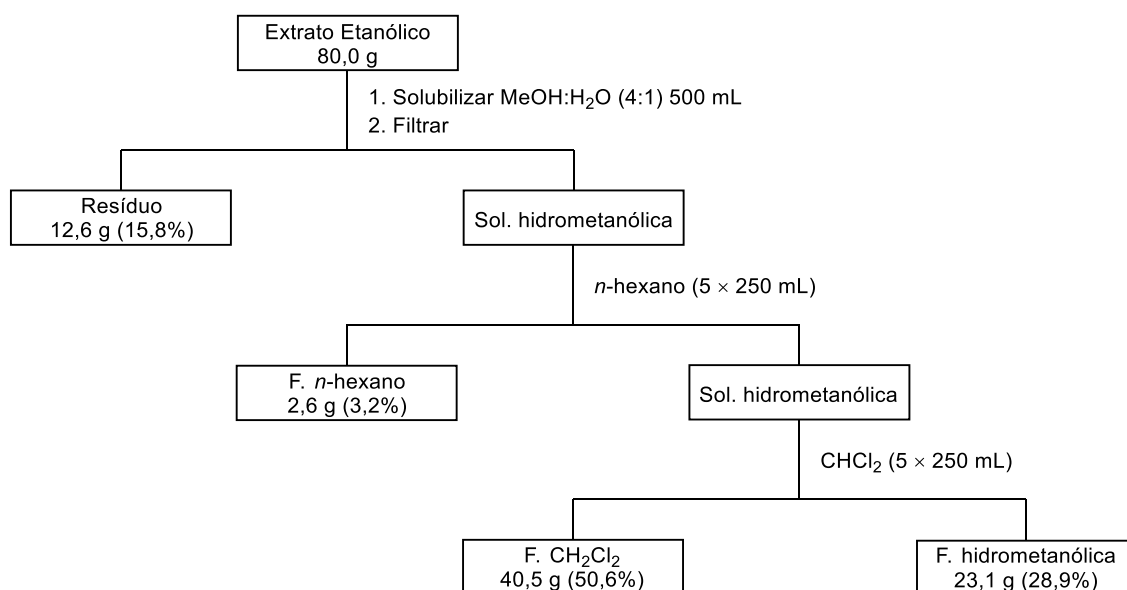
4.3 Metodologia experimental

4.3.1 Preparo do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* e isolamento dos alcaloides (-)-cassina (**5**) e (-)-espectralina (**6a**)

O extrato etanólico (1,9 kg) das flores de *Senna spectabilis* (EEF1-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 (Pivatto, 2010).

Parte do EEF1-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 24). Os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotativo a pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. Parte da fração CH₂Cl₂ (8,5 g) foi submetida à CC, nomeada IMC1 (Freitas, 2022).

Figura 24 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*.



Fonte: a autora.

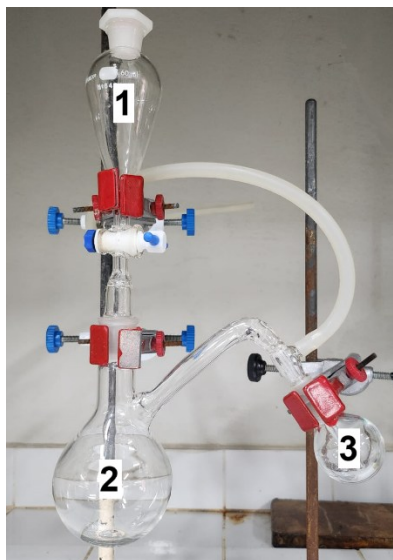
Parte da fração IMC1-F₁₁₄₋₂₆₅ (1,38 g), fração rica em alcaloides, foi submetida à CC, nomeada como IMC2. As frações foram analisadas por CCD e reveladas com o revelador iodocloroplatinato (IClPt). As frações que tiveram resultado positivo para presença de alcaloides foram analisadas por CG-EM-IE.

Parte da fração IMC2-F₈₁₋₈₈ (449 mg), fração rica nos alcaloides **5** e **6a**, foi submetida à CLAE no modo semi-preparativo, nomeada de IMC3. As frações foram analisadas por CG-FID.

4.3.2 Preparação dos cloridratos da (-)-cassina (**5**) e (-)-espectralina (**6a**)

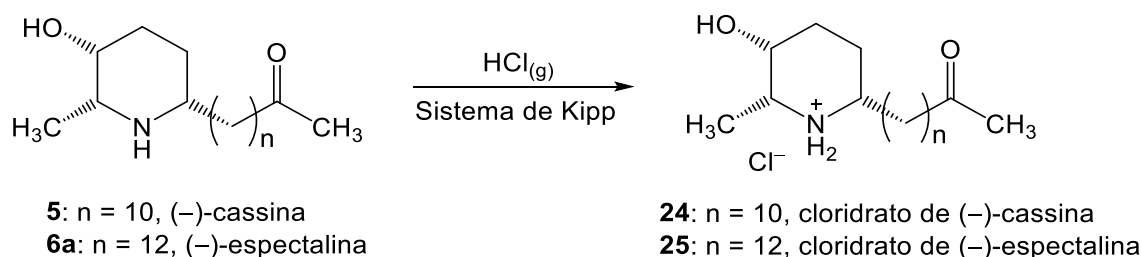
Os cloridratos **24** e **25** foram preparados por adição de HCl_(g), gerado pelo gotejamento de H₂SO_{4(l)} (20 mL), do funil de separação (n° 1), sobre HCl_(l) (20 mL) no balão (n° 2) a temperatura ambiente, utilizando um sistema de Kipp modificado (Figura 25), que canaliza os vapores do gás formado até o balão de fundo redondo (n° 3), borbulhando o gás sobre os alcaloides **5** e **6a** (100 mg) dissolvidos em 5 mL de CHCl₃ (Figuras 25 e 26).

Figura 25 – Sistema de Kipp modificado para o preparo dos cloridratos.



Fonte: A autora.

Figura 26 – Reação para obtenção dos cloridratos da (-)-cassina e (-)-espectralina.



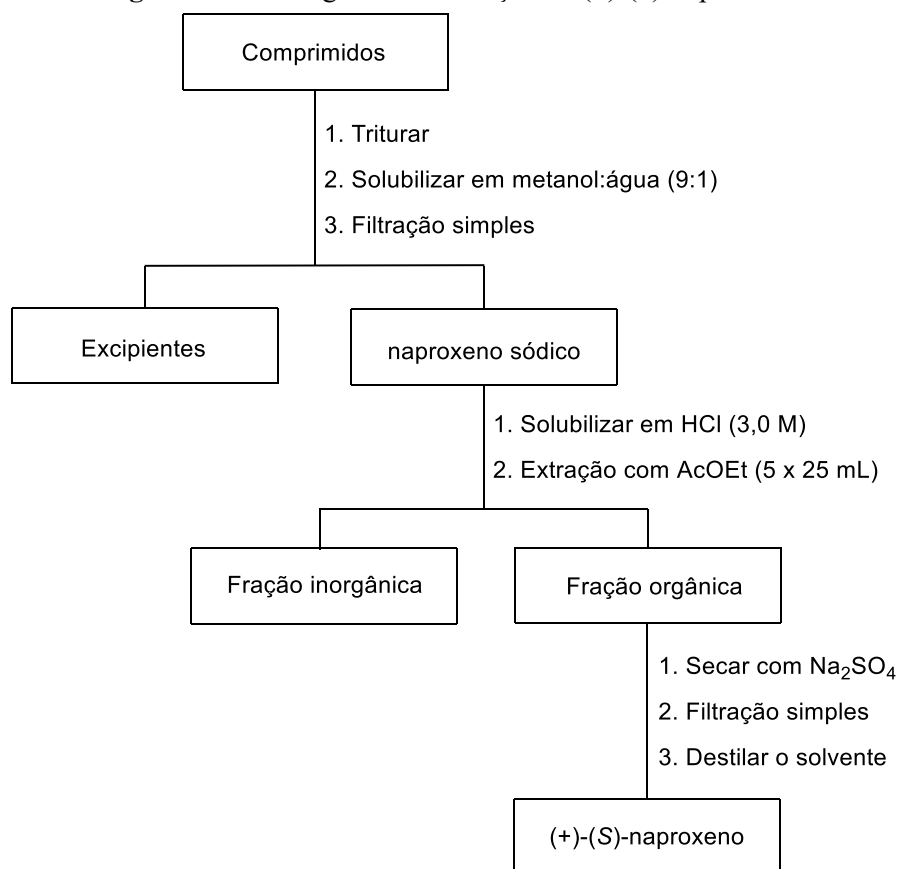
Fonte: A autora.

4.3.3 Extração do (+)-(*S*)-naproxeno

A extração do (+)-(*S*)-naproxeno ((*S*)-NPX) (**7a**) foi realizada a partir de medicamentos comerciais encontrados nas farmácias, contendo naproxeno sódico, de três empresas farmacêuticas distintas. Inicialmente os comprimidos (10 unidades de 550 mg cada), contendo 5,5 g do princípio ativo, foram triturados, utilizando graal e pistilo. O material pulverizado foi transferido para um béquer, solubilizado em 25 mL de uma solução MeOH:H₂O (9:1) e mantido sob agitação em ultrassom por 30 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada, utilizando papel de filtro, e o material pulverizado foi novamente solubilizado em 25 mL de uma nova solução hidrometanólica e submetido a extração por 3 vezes consecutivas. Os três volumes das soluções hidrometanólicas foram reagrupados (75 mL) e os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotativo a pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C.

O sal sódico do naproxeno obtido foi então solubilizado em 50 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico (3,0 mol.L⁻¹) e submetido a extração líquido-líquido com AcOEt (5 × 25,0 mL). Os resquícios de água da fração orgânica foram removidos utilizando sulfato de sódio anidro, mantendo o agente secante em contato com a solução por 15 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada, para retirar o agente secante, e o solvente foi removido por destilação em evaporador rotativo (banho a 40 °C) (Figura 27) (Walsh; Koontz, 1997). O produto obtido foi analisado por CCD, CG-EM-IE, RMN, polarimetria e avaliada sua temperatura de fusão para confirmação da estrutura.

Figura 27 – Fluxograma da extração do (+)-(*S*)-naproxeno.



Fonte: A autora.

4.3.4 Racemização do (+)-(*S*)-naproxeno

Foram avaliadas duas metodologias para racemização do (+)-(*S*)-naproxeno (**7a**), uma em meio básico e outra em meio ácido.

Meio básico: Foi pesado 200,0 mg (46,05 mol) de **7a**, solubilizado em 25 mL de solução aquosa de KOH (0,32 mol.L⁻¹), transferido para um balão de fundo redondo de 50 mL e mantida sob agitação e refluxo a 100 °C por 24 h (Xu, *et al.*, 2015). Em seguida, a solução foi resfriada e neutralizada com uma solução de HCl (1,0 mol.L⁻¹, 50 mL) sob agitação por 20 minutos. Na sequência, a solução foi transferida para um funil de separação e submetida a extração líquido-líquido com AcOEt (5 × 25,0 mL). Os resquícios de água da fase orgânica foram removidos utilizando sulfato de sódio anidro, que foi mantido em contato com a solução por 15 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada, para retirar o agente secante, e o solvente foi removido por destilação em evaporador rotativo (banho a 40 °C). O produto foi analisado por CCD, CLAE-DAD-EM-IES-(+) e RMN.

Meio ácido: Foi pesado 200,0 mg (46,05 mol) de **7a**, solubilizado em 25,0 mL de anidrido acético, transferido para um balão de fundo redondo de 50 mL e mantido sob agitação e refluxo a 140 °C por 24 h (Linze *et al.*, 1985). Em seguida, para finalizar a reação, a solução foi resfriada e na sequência adicionado 25,0 mL de água. Posteriormente a solução foi transferida para um funil de separação e submetida a extração líquido-líquido com AcOEt (5 × 25,0 mL). Os resquícios de água da fase orgânica foram removidos utilizando sulfato de sódio anidro, que foi mantido em contato com a solução por 15 minutos. Na sequência, a solução foi filtrada, para retirar o agente secante, e o solvente foi removido por destilação em evaporador rotativo (banho a 40 °C). O produto foi analisado por CCD, CLAE-DAD-EM-IES-(+), e RMN (Ma *et al.*, 2019).

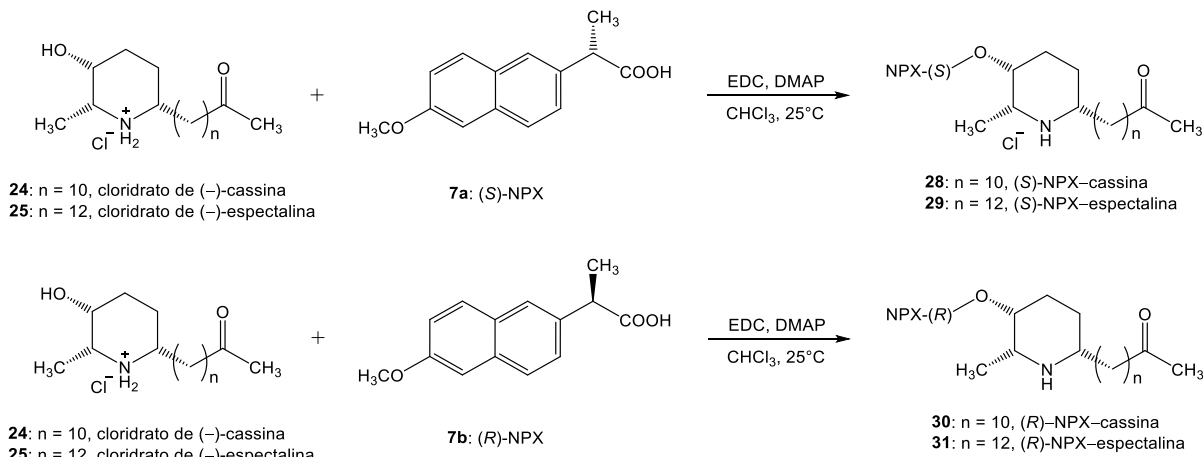
4.3.5 Preparação dos ésteres de Mosher

O éster de Mosher (*S*)-naproxeno–cassina foi preparado a partir de 50,0 mg (0,15 mmol) do cloridrato **24**, que foi solubilizado em 5 mL de CHCl₃ e transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL e mantido sob agitação. A esta solução foram adicionados 50,0 mg (0,22 mmol) de **7a**, 32,7 mg (0,22 mmol) de hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (**26**), utilizado como agente de acoplamento, e 20,8 mg (0,17 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) (**27**), utilizado como catalisador. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 35 horas (Figura 28) e monitorada por CCD. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 30 mL de uma solução de carbonato de sódio (0,07 mol.L⁻¹, pH 10) para neutralizar o meio reacional, que foi transferido para um funil de separação. Esse procedimento foi repedido 5 vezes e as fases aquosas foram agrupadas (150 mL) e submetidas à extração líquido-líquido com CH₂Cl₂ (5 × 25 mL). Os resquícios de água das frações orgânicas (CHCl₃ e CH₂Cl₂) foram removidos utilizando sulfato de sódio anidro, que foi mantido em contato com a solução por 15 minutos (Freitas, 2022). Na sequência, a solução foi filtrada, para retirar o agente secante e o solvente foi removido por destilação em evaporador rotativo (banho a 40 °C). A reação foi monitorada por CCD, utilizando como revelador ICIPt e câmara de UV254 nm.

Os ésteres de Mosher (*S*)-naproxeno–cassina e (*R*)-naproxeno–cassina foram preparados a partir de 88,0 mg (0,26 mmol) do cloridrato **24**, que foi solubilizado em 5 mL de CHCl₃ e transferido para um balão de fundo redondo de 50 mL e mantido sob agitação. A esta

solução foram adicionados 87,8 mg (0,38 mmol) da mistura racêmica de **7a/7b**, 53,7 mg (0,41 mmol) de EDC (**26**), e 36,0 mg (0,32 mmol) de DMAP (**27**) (Figura 28). As demais etapas da reação são idênticas às da síntese do (*S*)-naproxeno–cassina descritas anteriormente.

Figura 28 – Reação para obtenção dos ésteres de (–)-cassina e (–)-espectralina.



Fonte: A autora.

4.3.6 Separação dos ésteres de Mosher

Foi realizado uma CCDP com 4,2 mg da IMC5-F₃₆, com duas eluições, acompanhada por UV254. Na sequência foi feita a raspagem da sílica, que foi coletada em béquer e solubilizada em metanol (2 × 10 mL) e diclometano (1 x 15 mL). Em seguida o material foi filtrado e o solvente rotaevaporado. A separação comprovada por CCD, utilizando como revelador ICIpt e câmara de UV em λ de 254 nm, e CLAE-EM-ESI-(+).

4.3.8 Cálculos de dinâmica molecular (DM)

Os cálculos computacionais foram realizados em computadores localizados no Laboratório de Modelagem Molecular e Simulação Computacional de Nano-Bio Sistemas – CENAPAD-SP, e nos computadores localizados no Laboratório de Cristalografia e Química Computacional (LCQC) da UFU, campus Santa Mônica, em colaboração com o prof. Eduardo Franca.

O sistema foi simulado utilizando a metodologia de Dinâmica Molecular (DM), que utiliza equações de movimento clássica de Newton e Hamilton, para determinar a trajetória, ou seja, a evolução temporal de um sistema, usadas para determinar parâmetros estruturais, assim

como conformações preferenciais (Freitas; Oliveira, 2018). Os cálculos para as análises conformacionais do núcleo piperidínico (cadeira-bote) dos alcaloides foram baseados nas equações e parâmetros de Cremer e Pople modificados (Iglesias-Fernández *et al.*, 2015). Já as análises para determinar a conformação dos ésteres e orientação do grupo naftil em relação ao núcleo piperidínico, foram feitos utilizando cálculos baseados na dinâmica molecular de Born-Oppenheimer (DMBO), sendo esta, semelhante a DM clássica com adição de cálculos quânticos da estrutura eletrônica como cálculos de função de onda, envolvendo integração da trajetória, o que permite determinar sua energia potencial, gradiente e hessiana (Sousa Neto, 2022).

Espectros teóricos de RMN ^1H foram obtidos utilizando a Teoria Funcional de Densidade (DFT), com funcional B3LYP e função de base PVSSEG-2, através do modelo de solvatação implícita CPCM para os solventes metanol e clorofórmio.

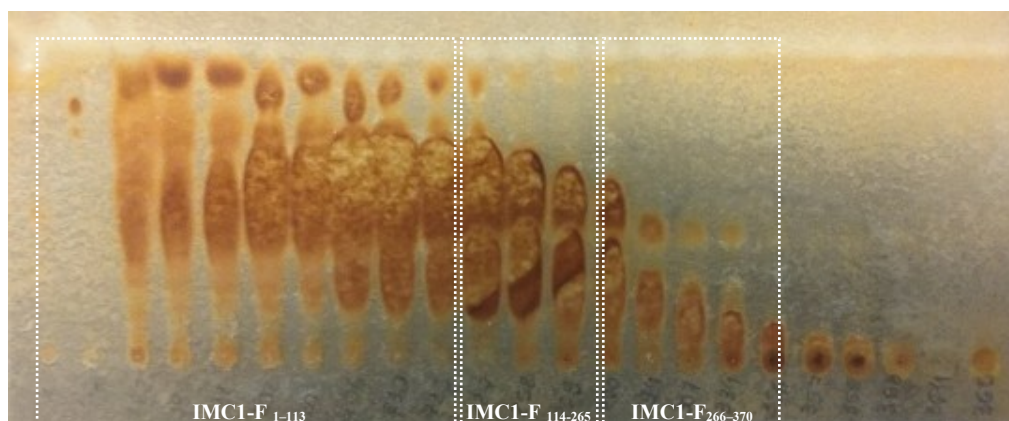
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina

O extrato etanólico (EEF1-Ss) e as frações obtidas das extrações líquido-líquido (item 4.3.1), foram analisadas por CCD utilizando como FE sílica gel e como FM uma mistura de CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,5). As cromatoplasmas foram reveladas com ICIPt, reagente específico para alcaloides. A partir da avaliação das placas, foi possível constatar que os alcaloides estavam presentes em maior concentração na fração CH_2Cl_2 (40,0 g), que em seguida foi submetida à cromatografia em coluna (CC).

Parte da fração CH_2Cl_2 (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 CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (10:0:0,5) até CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (7:3:0,5), e na sequência 100% de MeOH. As frações coletadas (370) foram avaliadas por CCD, reveladas com ICIPt e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f , resultando nas frações alcaloídicas: IMC1-F_{1–113} (598,5 mg), IMC1-F_{114–265} (3,6 g) e IMC1-F_{266–370} (3,7 g) (Figura 29).

Figura 29 – CCD das frações coletadas de IMC1.



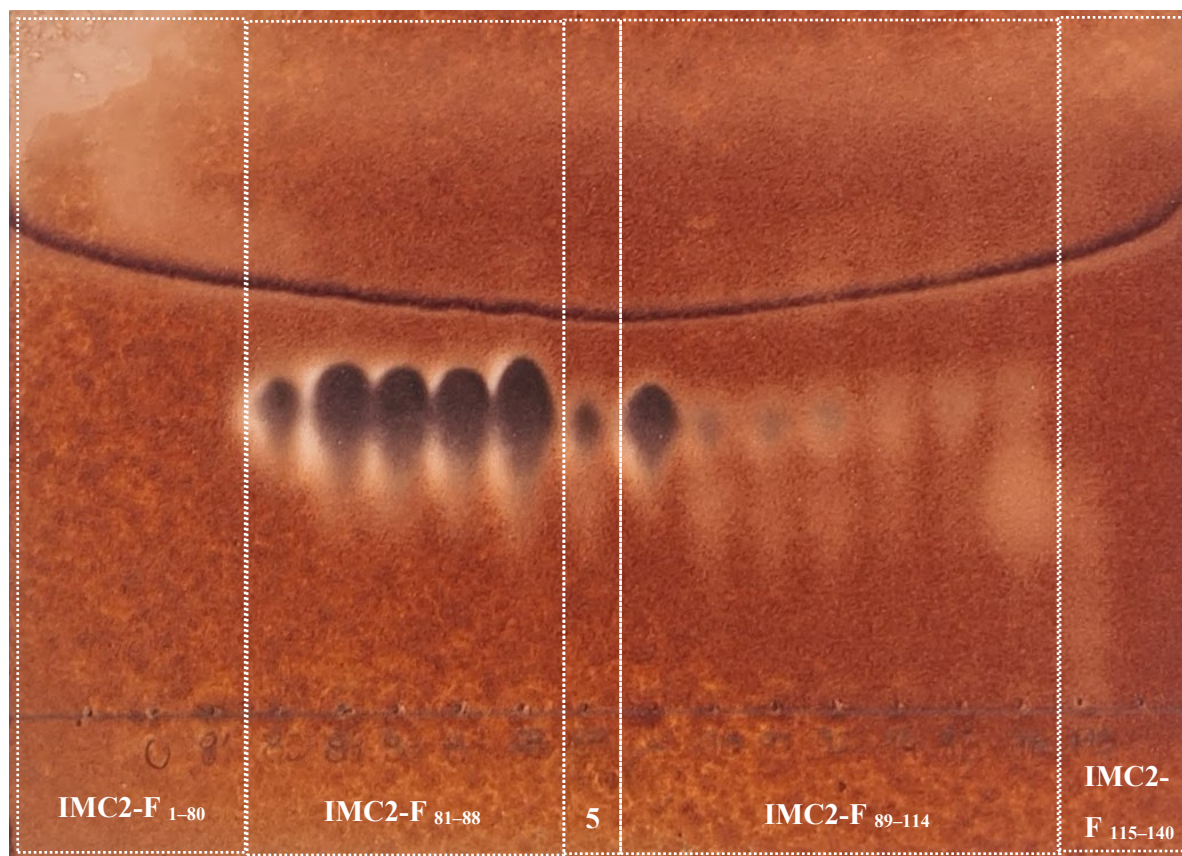
Condições: FE: sílica, FM: CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,5) e revelador ICIPt.

Fonte: a autora.

Parte da fração IMC1-F_{114–265} (1,38 g), similar ao padrão de **5**, foi submetida à CC utilizando como FE sílica *flash* (78,0 g, 24,5 × 3 cm d.i), e como FM um gradiente de solventes que iniciou com hexano: CH_2Cl_2 : NH_4OH (10:0:0,5), passando por CH_2Cl_2 :AcOEt: NH_4OH e finalizando com AcOEt:MeOH: NH_4OH (0:10:0,5). As frações coletadas (140) foram analisadas por CCD, reveladas com ICIPt e reagrupadas de acordo com

similaridades dos valores de R_f (Figura 30), resultando nas frações IMC2-F₁₋₈₀ (155,6 mg), IMC2-F₈₁₋₈₈ (554,5 mg), IMC2-F₈₉₋₁₁₄ (194,4 mg) e IMC2-F₁₁₅₋₁₄₀ (392,6 mg)

Figura 30 – CCD das frações obtidas da IMC2.

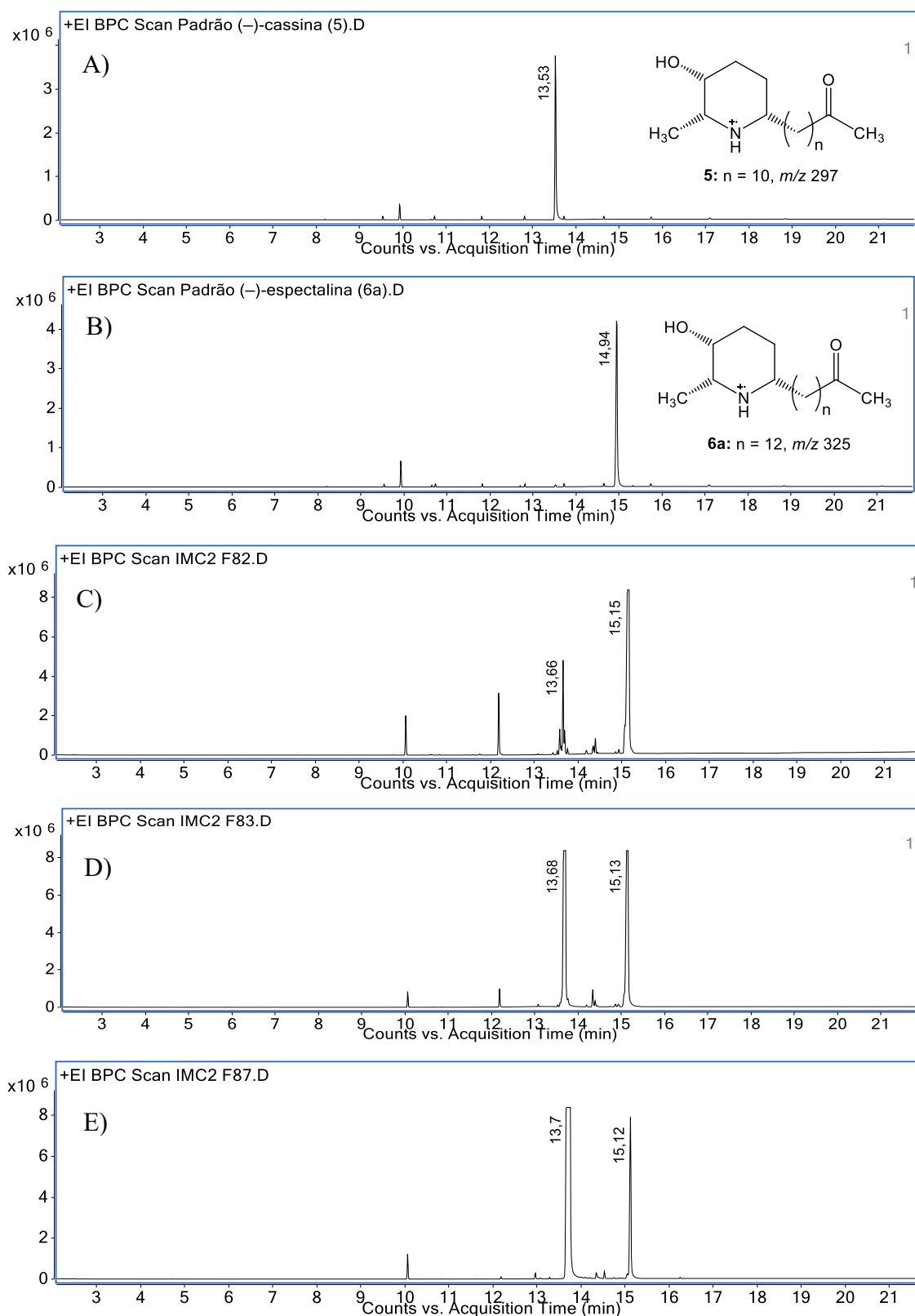


Condições: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (8,5:1,5:0,25) e revelador IClPt.

Fonte: a autora.

As frações IMC2-F₈₁ a IMC2-F₈₈ apresentaram uma única mancha na CCD com o mesmo R_f 0,55 do padrão **5**, indicando a presença deste composto. No entanto, já é conhecido que o homólogo **6a** também apresenta mesmo R_f . Assim, estas frações foram analisadas por CG-EM-IE, onde foi possível confirmar a presença do par homólogo (Figura 31).

Figura 31 – CG-EM-IE dos padrões **5** (t_R 13,5 min) (A) e **6a** (t_R 14,9 min) (B) e das frações IMC2-F₈₂ (C), IMC2-F₈₃ (D) e IMC2-F₈₇ (E).

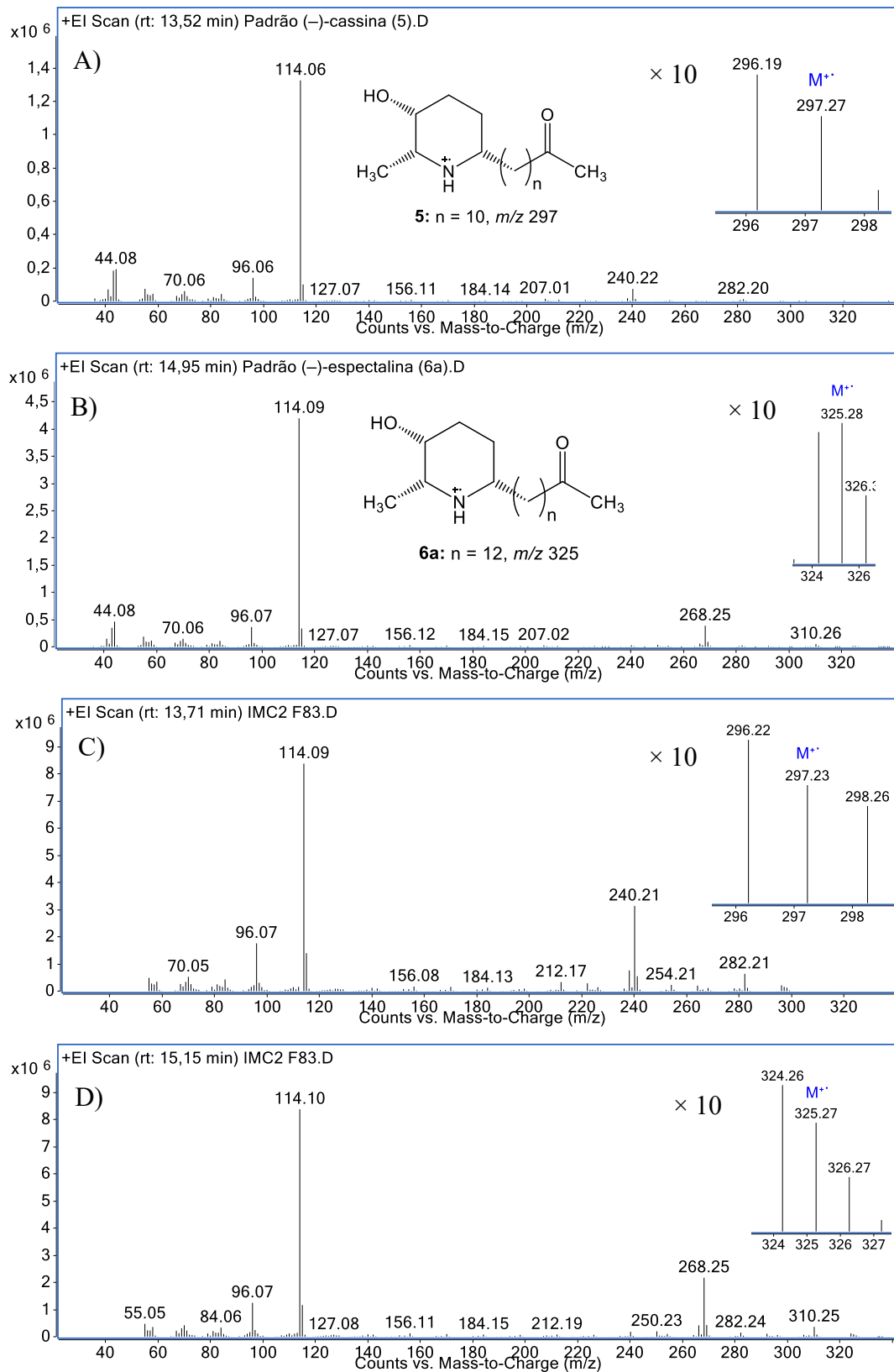


Condições: Gradiente de 100–280 °C (21,8 min), depois mantido a 280 °C (8 min); $C_{amostra} = 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, Fluxo do gás (He) = $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

Fonte: a autora.

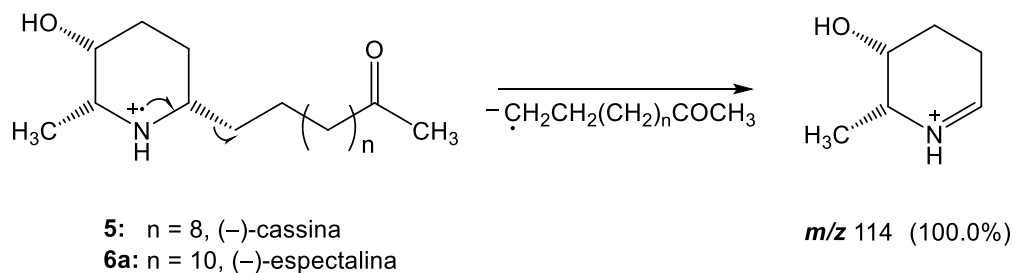
A partir da análise dos cromatogramas (Figura 31) foi possível observar que as frações IMC2-F₈₁ até IMC2-F₈₈ apresentavam sinais com tempos de retenção (t_R) similares aos dos padrões homólogos **5** (t_R 13,6 min) e **6a** (t_R 15,1 min), e em cada fração essa mistura variava em proporção da seguinte maneira: IMC2-F₈₂ **5/6a** (1:4), IMC2-F₈₃ **5/6a** (1:1) e IMC2-F₈₇ **5/6a** (4:1), o que está de acordo com o reportado por Pivatto e colaboradores (2005). Além disso, os EMs obtidos (Figuras 32C e 32D) são similares aos EMs dos padrões **5** e **6a** (Figura 32A e B), corroborando os resultados relatados na literatura (Freitas *et al.*, 2018). Na análise dos EM-IE (Figura 32), foi possível observar os íons moleculares (M^{+}) m/z 297 (**5**) e 325 (**6a**), sendo que o mesmo íon fragmento de m/z 114 (pico base), foi observado para os dois compostos e foi atribuído a eliminação da cadeia lateral ligada ao C-6 através de uma cisão homolítica (Figura 33).

Figura 32 – EM-IE dos padrões **5** (t_R 13,52 min) e **6a** (t_R 15,1 min) (A e B respectivamente) e compostos com mesmos t_R (C e D), observados na fração IMC2-F₈₂₋₈₈.



Fonte: a autora.

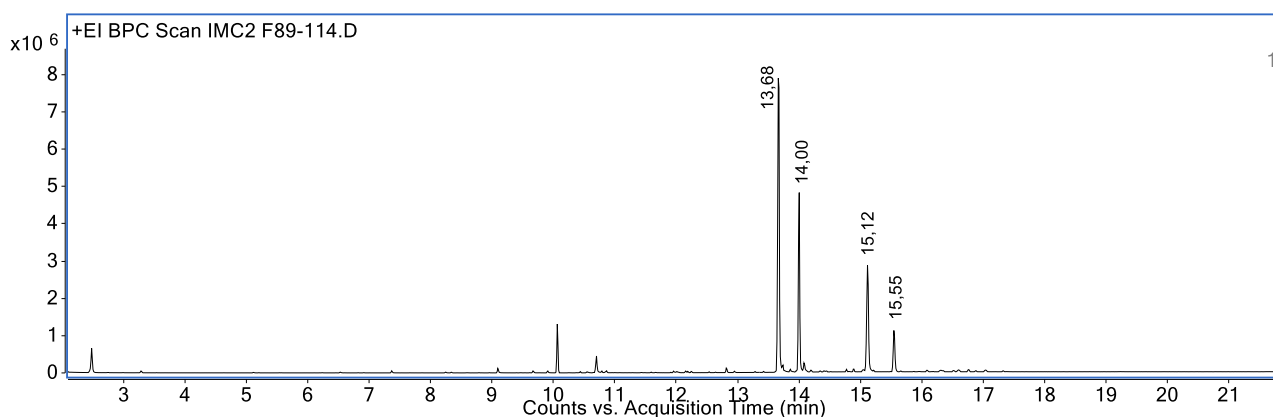
Figura 33 – Proposta de mecanismo de fragmentação sugerido (–)-cassina e (–)-espectralina para justificar o sinal em m/z 114 (pico base).



Fonte: Freitas *et al.* (2018).

Na fração IMC2-F_{89–114} foram observadas manchas marrons nas análises de CCD com o mesmo R_f do padrão **5**, acompanhadas de manchas com menor R_f 0,28, indicando a presença de compostos mais polares. Essas frações foram analisadas por CG-EM-IE (Figura 34), sendo possível observar, além dos sinais de **5** (t_R 13,7 min) e **6a** (t_R 15,1 min), sinais com t_R 14,01 e 15,56 min, que apresentam EM-IE (Figura 35) similares aos de **5** e **6a**, respectivamente, sugerindo que estes compostos são diastereoisômeros dos alcaloides **5** e **6**, já relatados anteriormente como (–)-6-*iso*-cassina (**15**) e (–)-6-*iso*-espectralina (**16**), respectivamente.

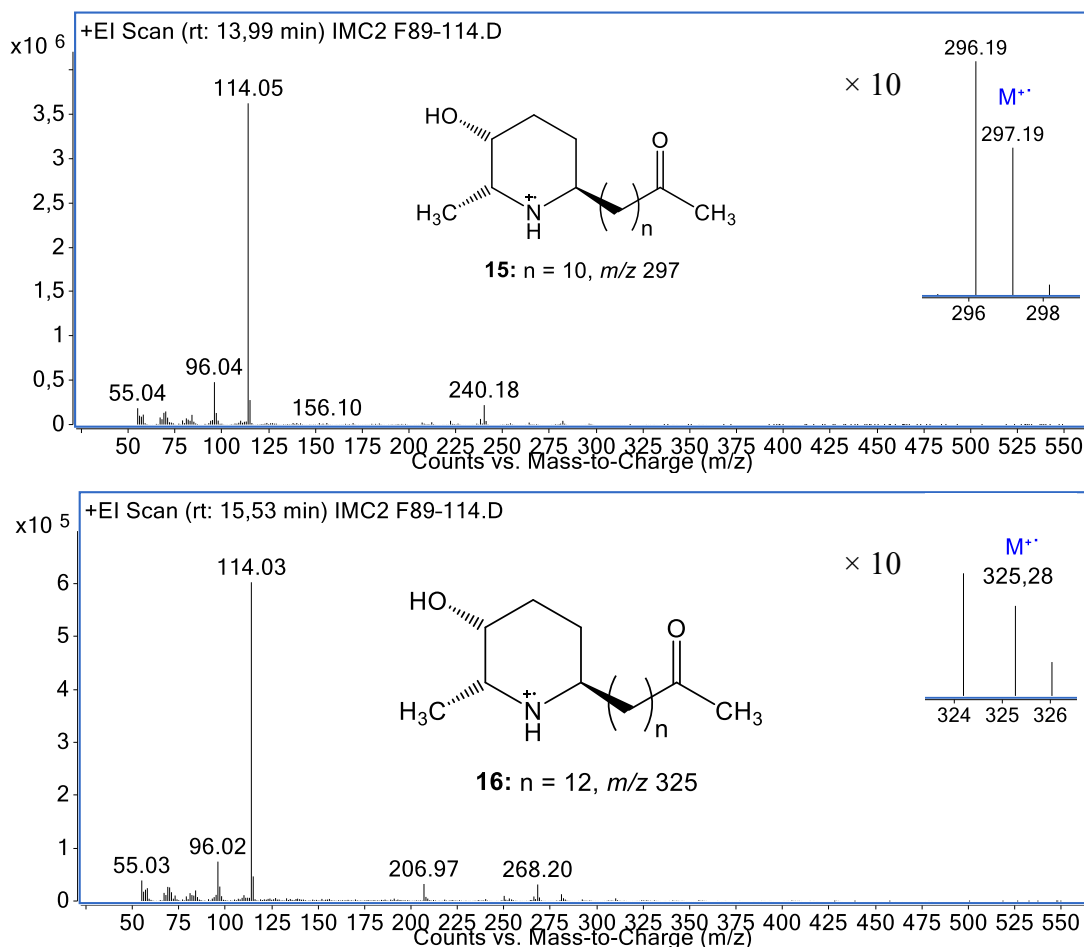
Figura 34 – CG-EM-IE da fração IMC2-F_{89–114}.



Condições: Gradiente de 100–280 °C (21,8 min), depois mantido a 280 °C (8 min); $C_{amostra} = 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, Fluxo do gás (He) = $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

Fonte: a autora.

Figura 35 – EM-IE dos alcaloides **15** (t_R 14,01 min) e **16** (t_R 15,56 min) (Figura 35).

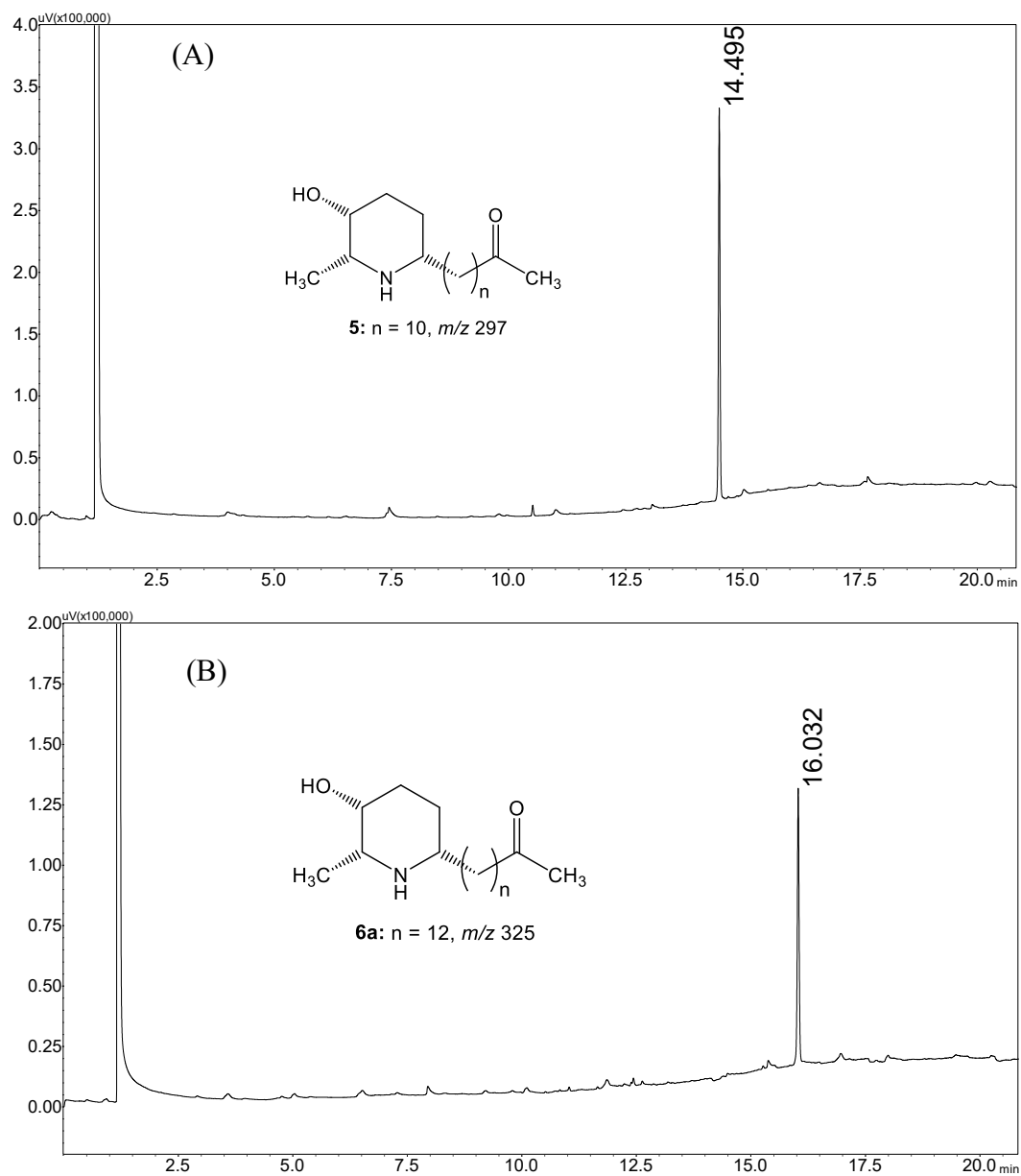


Fonte: a autora.

Parte da fração IMC2-F₈₁₋₈₈ (449,0 mg) foi submetida à CLAE no modo semipreparativo, para isolamento dos alcaloides **5** e **6a**. As frações coletadas (20) foram analisadas por CG-FID e reagrupadas de acordo com a similaridades dos valores dos t_R (Figura 37), resultando nas frações IMC3-F₁ (0,6 mg), IMC3-F₂₋₅ (159,8 mg), IMC3-F₆₋₈ (28,8 mg), IMC3-F₉₋₁₁ (40,5 mg) e IMC3-F₁₂₋₂₀ (38,0 mg).

A partir da análise dos cromatogramas (Figura 37) foi possível observar que a fração IMC3-F₂₋₅ apresentou apenas um sinal com tempo de retenção (t_R 14,5 min) similar ao do padrão **5** (t_R 15,5 min) (Figura 36), de mesmo modo, a fração e IMC3-F₉₋₁₁ apresentou apenas um sinal com tempo de retenção (t_R 16,0 min) similar ao do padrão **6a** (t_R 16,0 min), tendo a fração IMC3-F₆₋₈ apresentado dois sinais com tempos de retenção (t_R 14,9 min; t_R 16,0 min) similares aos padrões de **5** e **6a**. As frações IMC3-F₁ e IMC3-F₁₂₋₂₀ não apresentaram sinais referentes aos alcaloides.

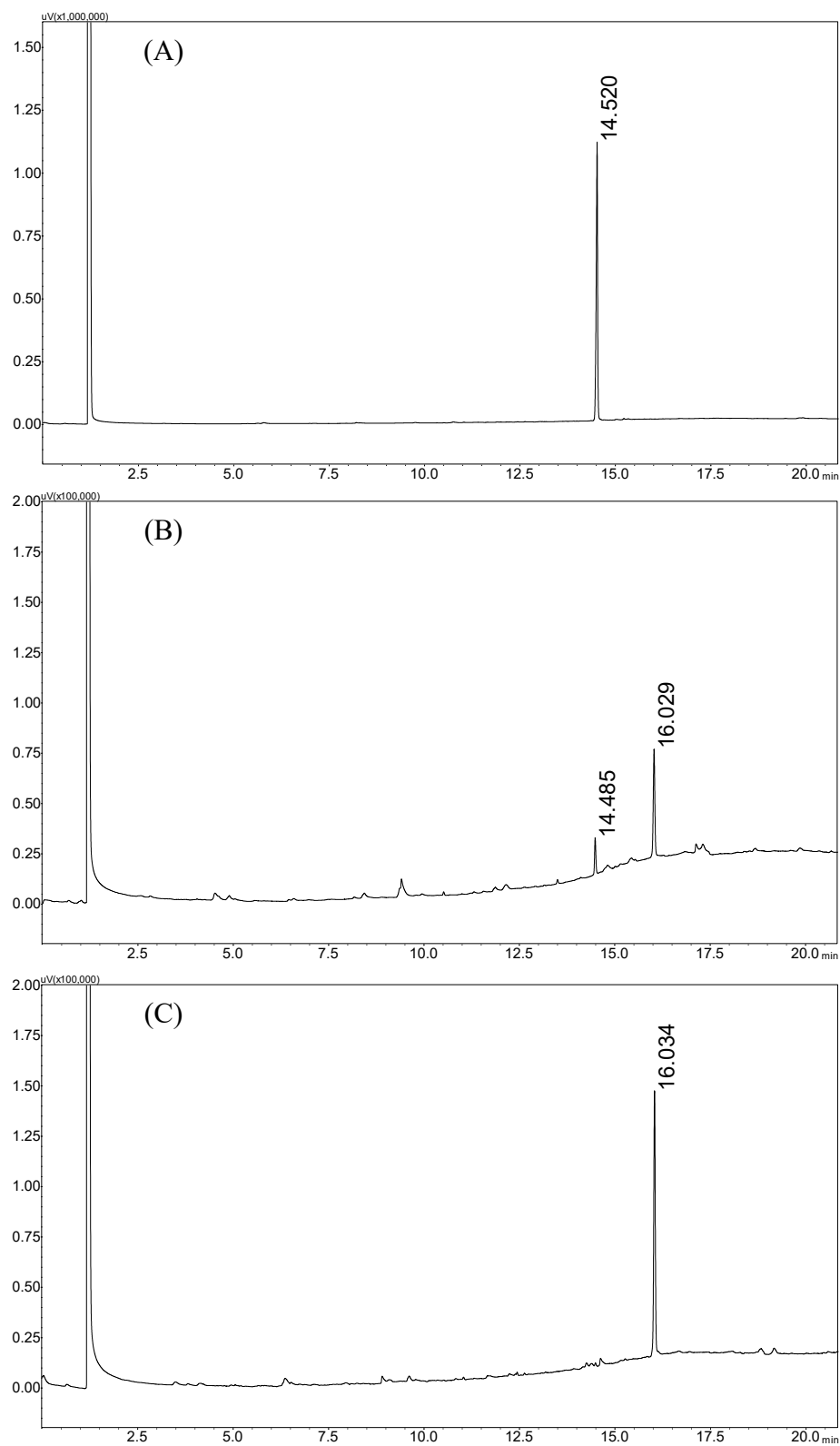
Figura 36 – CG-FID dos padrões **5 (A) e **6a** (B).**



Condições: Gradiente de 100–280 °C (21,8 min), depois mantido a 280 °C (8 min); $C_{amostra} = 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, Fluxo do gás (N_2) = 2,32 mL.min⁻¹.

Fonte: a autora.

Figura 37 – CG-FID das frações IMC3-F₂₋₅ (A), IMC3-F₆₋₈ (B), IMC3-F₉₋₁₁ (C).



Condições: Gradiente de 100–280 °C (21,8 min), depois mantido a 280 °C (8 min); $C_{amostra} = 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, Fluxo do gás (N_2) = 2,32 mL.min⁻¹.

Fonte: a autora.

5.2 Síntese dos respectivos cloridratos de (–)-cassina e (–)-espectralina

Para a síntese do cloridrato da (–)-cassina (**24**) foi utilizada a fração IMC3-F₂₋₅ que consiste do alcaloide **5**. Ao final da reação o produto foi seco e pesado, sendo observado um sólido levemente amarelado, em concordância com a literatura, e rendimento de 92% (Viegas Junior *et al.*, 2005). De maneira análoga, também foi realizada a reação para a síntese do cloridrato da (–)-espectralina (**25**) utilizando a fração IMC3-F₉₋₁₁. Para avaliar a formação dos cloridratos a temperatura de fusão (TF) foi avaliada e comparada com valores descritos na literatura (Tabela 1). Os valores de TF obtidos estão de acordo com dados reportados e corroboram a formação dos cloridratos.

Tabela 1 – Temperatura de fusão dos cloridratos da (–)-cassina e (–)-espectralina em comparação com dados da literatura.

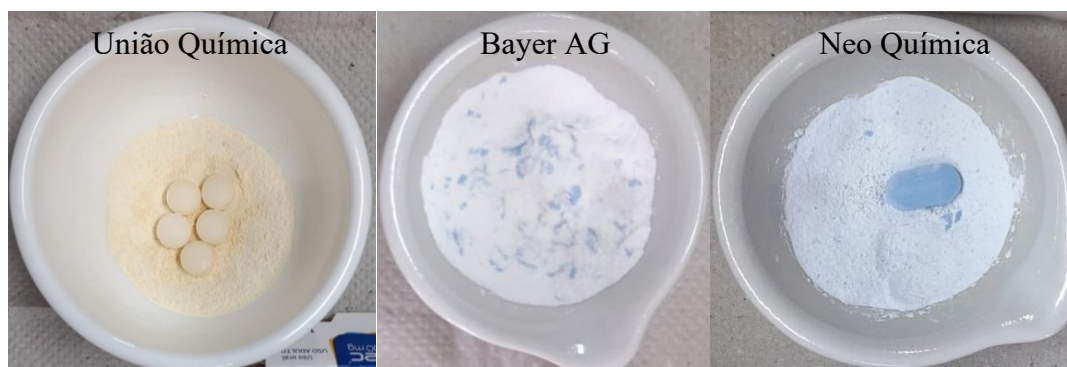
Compostos	Temperatura de fusão (°C)	
	(a autora)	(Pivatto, 2010)
24	158,2–159,6	161,44
25	158,7–160,0	161,90
5	-	54,29
6a	-	67,67

Fonte: a autora.

5.3 Extração do (+)-(*S*)-naproxeno ((+)-(*S*)-NPX)

O ácido (+)-(*S*)-naproxeno ((*S*)-NPX) (**7a**), foi obtido a partir de três medicamentos diferentes comercializados nas farmácias, o “Naxotec” da farmacêutica União Química; “Naproxeno sódico” da farmacêutica Neo Química; e o “Flanax” da farmacêutica Bayer AG, como descrito no item 4.3.3. Em cada caso, foram observadas características próprias dos excipientes dos medicamentos, como por exemplo, os corantes utilizados (descritos nas bulas): óxido de ferro que é amarelo, utilizado pela farmacêutica União Química e o corante laca azul de alumínio utilizado pelas farmacêuticas Neo Química e Bayer AG (Figura 38).

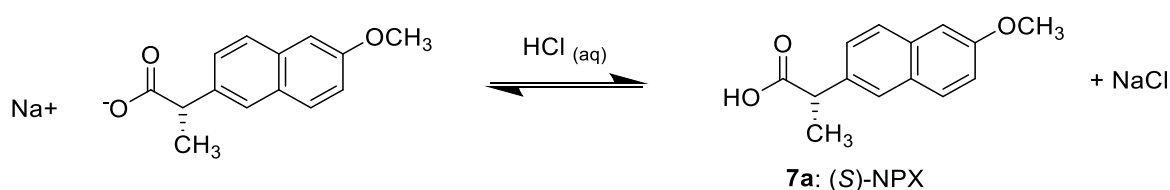
Figura 38 – Comprimidos das respectivas farmacêuticas em suas formas revestidas e trituradas.



Fonte: a autora.

Além da diferença aparente dos comprimidos devido aos corantes utilizados, os excipientes em cada caso resultaram em diferenças no processo de filtragem, que por consequência também causou diferença nas massas obtidas dos fármacos na forma sódica. A massa esperada para 10 comprimidos de 500,0 mg cada, de acordo com o descrito nos rótulos dos medicamentos das três farmacêuticas, era de 5,0 g de naproxeno sódico. No entanto, a massa extraída e respectiva porcentagem para cada um deles foi: 2,57 g (47%) União Química, 4,24 g (76%) Bayer e 6,14 g (110%) Neo Química (Tabela 2). O sal sódico do naproxeno foi então transformado na sua forma de ácido neutro (**7a**), utilizando uma solução de HCl 3M (Figura 39), como descrito no item 4.3.3 (Tabela 2).

Figura 39 – Reação para neutralizar o naproxeno sódico.



Fonte: A autora.

Tabela 2 – Massas do naproxeno obtido na forma sódica e neutra.

Medicamento ^a	Massa NPX extraído (%) ^b	Massa NPX neutro (%) ^c
Naxotec [®]	2,57 (47%)	2,00 (40%)
Naproxeno sódico [®]	6,14 (110%)	4,64 (93%)
Flanax [®]	4,24 (76%)	3,39 (68%)

^aForam pesados 10 comprimidos de 500,0 mg cada. ^bNaproxeno (NPX) na forma sódica. ^cNPX na forma neutra.

Fonte: A autora.

Os (*S*)-NPXs, na forma neutra, de cada medicamento foram obtidos como sólidos brancos, que para atestar a pureza, foram medidas as temperaturas de fusão (4 ×), sendo considerada a média das variações (Tabela 3). De acordo com Mahlin (2011), Römer e Kraska (2010) e Lee, Choi e Park (2008) o ponto de fusão do naproxeno pode variar entre 152–154,6 °C. Assim, é possível notar a similaridade entre o valor relatado e os valores medidos experimentalmente, sendo que os dados não foram corrigidos (Tabela 3).

Tabela 3 – Temperatura de fusão dos (*S*)-NPXs extraídos na forma neutra.

Medicamento	Temperatura de fusão (°C)
Naxotec [®]	150,6–151,0
Flanax [®]	153,5–154,7
Naproxeno sódico [®]	152,4–153,3

Fonte: a autora.

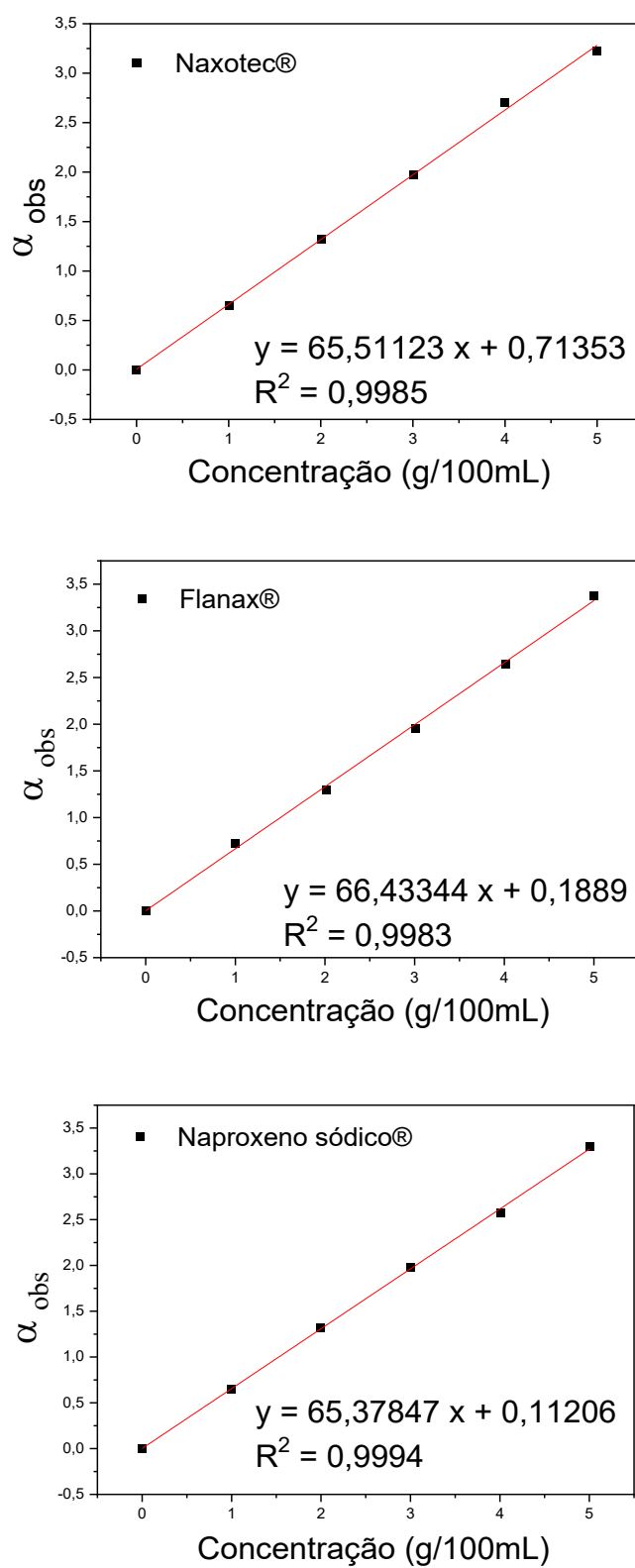
Para avaliar a pureza enantiomérica os (*S*)-NPXs foram submetidos à análise polarimétrica. Vale destacar que o princípio ativo desse medicamento deve estar presente na forma enantiomericamente pura, assim a rotação específica esperada de acordo com Smith e Rajanbabu (2009) deve ser $[\alpha] = +66,5$ e de acordo com Rana e Singh (2011) deve ser $[\alpha] = +65,5$. Assim, foram preparadas soluções dos (*S*)-NPXs em clorofórmio em cinco concentrações (1, 2, 3, 4 e 5 g.mL⁻¹) e com os valores das rotações específicas calculados, foi plotado uma curva padrão para obtenção da rotação específica média a partir da linearização da reta (Figura 40), sendo obtidos valores muito próximos daqueles reportados na literatura (Tabela 4).

Tabela 4 – Rotação específica dos (*S*)-NPXs extraídos na forma neutra.

Medicamento	$[\alpha]_{589,6}^{27}$
Naxotec [®]	+65,51
Flanax [®]	+66,43
Naproxeno sódico [®]	+65,38

Fonte: a autora.

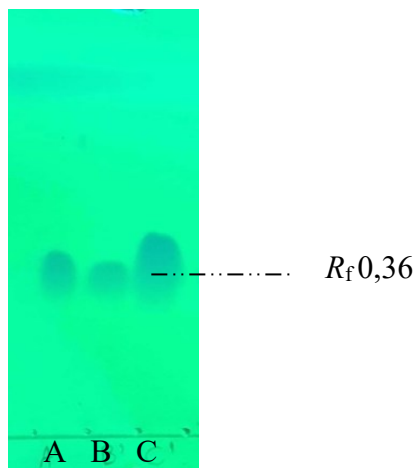
Figura 40 – Gráfico das rotações observadas (α) *versus* concentração do (S)-NPX.



Fonte: a autora.

Os (*S*)-NPXs foram analisados por CCD (Figura 41), sendo observado que os três fármacos apresentam o mesmo valor de R_f 0,36, outro indicativo de que os compostos são o (*S*)-NPX.

Figura 41 – CCD dos (*S*)-NPXs (A: Naxotec[®], B: Flanax[®] e C: Naproxeno sódico[®]).

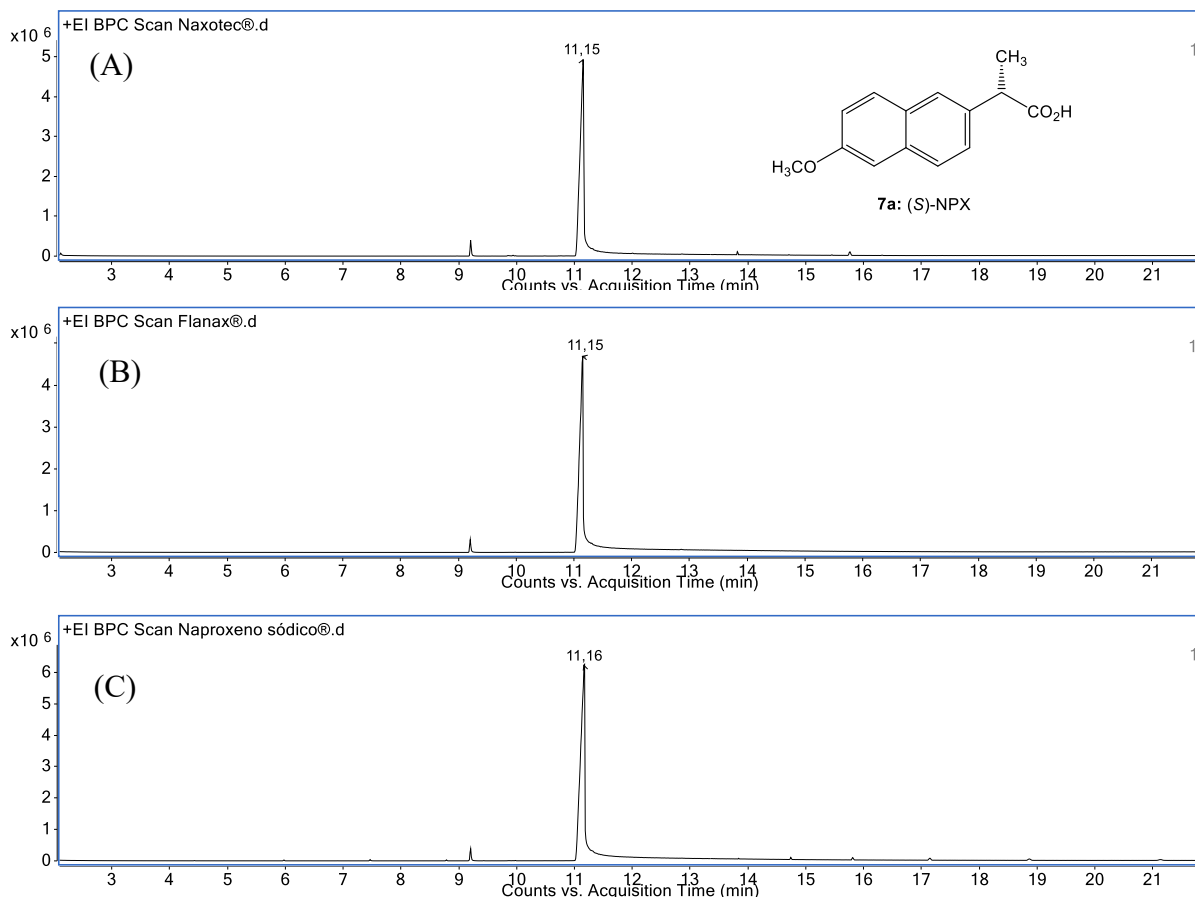


Condições: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH (9,5:0,5) e revelado em câmara UV em 254 nm.

Fonte: a autora.

Os (*S*)-NPXs também foram analisados por CG-EM-IE, sendo observado um sinal majoritário com t_R 11,2 min para os três medicamentos (Figura 42).

Figura 42 – CG-EM-IE dos (S)-NPXs (7a) (t_R 11,1 min) (A: Naxotec[®], B: Flanax[®] e C: Naproxeno sódico[®]).

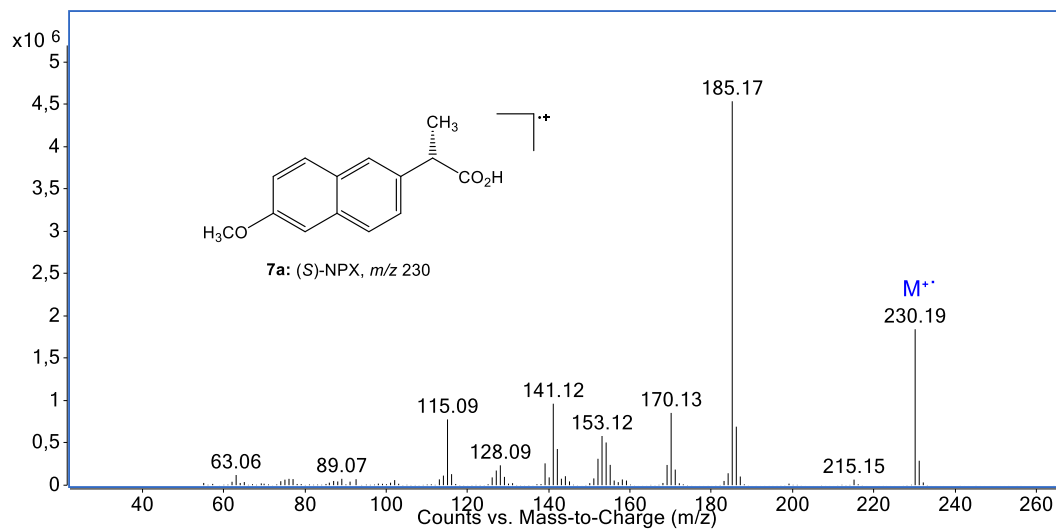


Condições: Gradiente de 100–280 °C (21 min), depois mantido a 280 °C (8 min); $C_{amostra} = 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, Fluxo do gás (He) = $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

Fonte: a autora.

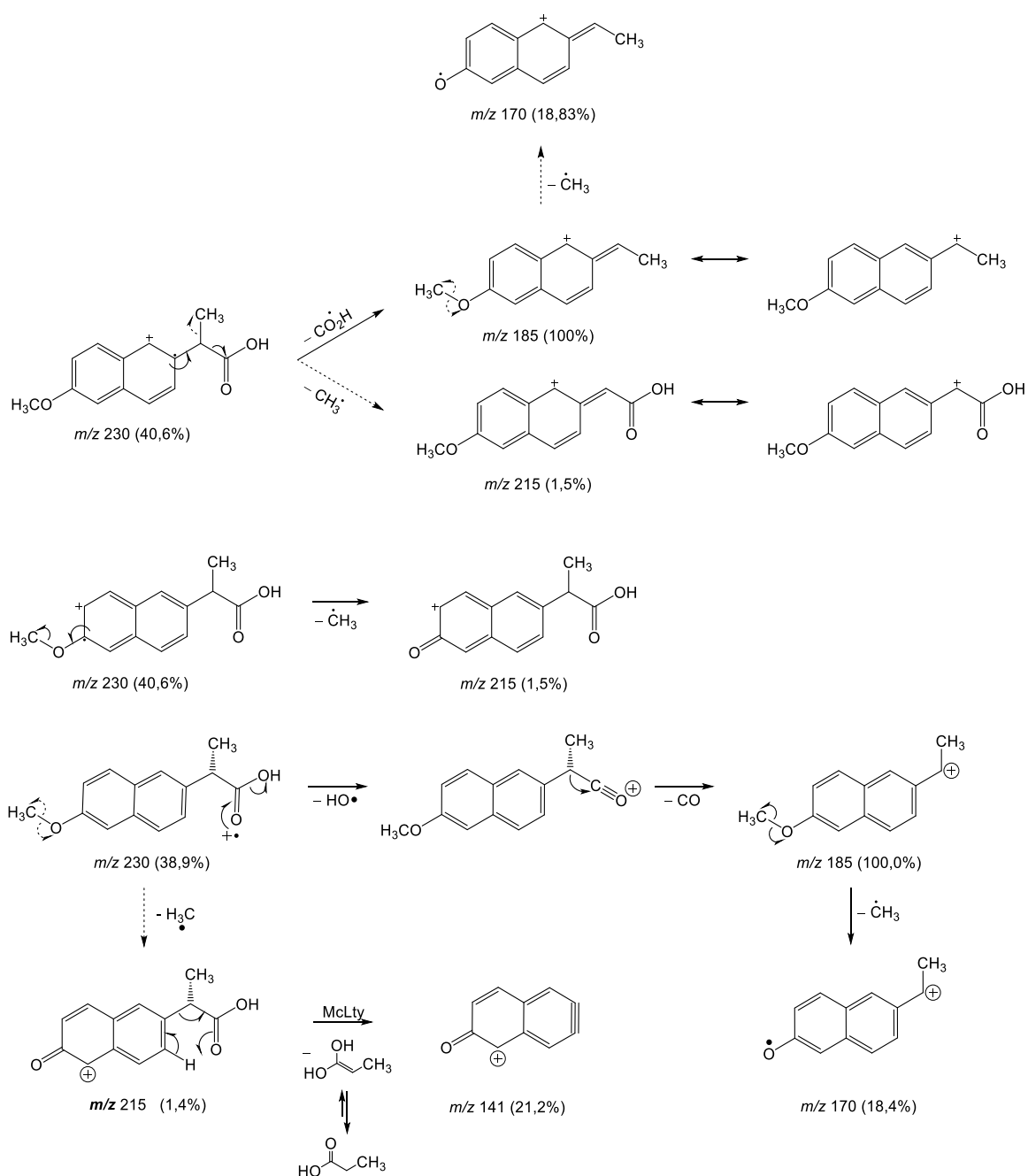
Os sinais com t_R 11,2 min (Figura 42) apresentaram o mesmo EM-IE (Figura 43). A análise detalhada do EM permitiu observar o sinal referente ao íon molecular de m/z 230 (M^+). O pico base foi observado para m/z 185 e foi atribuído a eliminação do grupo $\bullet\text{CO}_2\text{H}$ (45 u), através da cisão homolítica entre C1–C2 (Figura 44), sendo que o intermediário pode ter a aromaticidade restabelecida por estruturas de ressonância, o que corrobora a proposta da intensidade do sinal. Na sequência, também foi observado um sinal de m/z 170, que está de acordo com a eliminação de $\bullet\text{CH}_3$ (15 u), ligada ao oxigênio aromático, através de uma cisão homolítica. De forma similar o sinal de m/z 215 pode ser justificado a partir da eliminação da metila, a partir do íon molecular. O sinal de m/z 141 pode ser justificado a partir do íon molecular que perde a metila, seguido da eliminação neutra de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (74 u), através de um rearranjo do tipo McLafferty (McLty) (Figura 44). Esses dados corroboram a proposta do (S)-NPX.

Figura 43 – EM-IE do (S)-NPX.



Fonte: a autora.

Figura 44 – Proposta de fragmentação para o (*S*)-NPX.



Fonte: a autora.

Adicionalmente, foram realizadas análises de RMN de ^1H e de ^{13}C das amostras dos (*S*)-NPXs (**7a**) dos três medicamentos (Figura 45–58) (Tabela 5) e comparados com dados da literatura (Smith; Rajanbabu, 2009). Como os espectros dos três compostos ((*S*)-NPX) foram idênticos, será descrito na sequência apenas os dados de RMN ^1H e ^{13}C de um dos (*S*)-NPXs (Naxotec[®]).

Na análise dos espectros de RMN ^1H de **7a** (Tabela 5) (Figura 40), foi observado um singlete em δ 3,91 (3H), atribuído ao H-1'' da metoxila, assim como um quadrupletto e um dubletto em δ 3,88 (1H, $J = 7,16$ Hz) e δ 1,60 (3H, $J = 7,16$ Hz), atribuídos aos H-2 e H-3, respectivamente. Na região de hidrogênios aromáticos foi observado um duplo dupletto em δ 7,14 (1H, $J_{\text{orto}} = 8,65$ e $J_{\text{meta}} = 2,30$ Hz) atribuído ao H-7', cujas constantes de acoplamento ($J_{\text{meta}} = 2,30$ e $J_{\text{orto}} = 8,65$ Hz), indicam correlação com os sinais em δ 7,11 (1H, d, $J = 2,30$ Hz, H-5') e δ 7,70 (1H, d, $J = 8,65$ Hz, H-8'), respectivamente. Como o sinal em δ 7,70 integrou para 2H, ele também foi atribuído ao dubletto referente ao H-4', e através da análise da constante de acoplamento foi possível observar a correlação com o sinal em δ 7,42 (1H, dd, $J_{\text{orto}} = 8,50$ e $J_{\text{meta}} = 1,72$ Hz), referente ao H-3'. O singlete largo em δ 6,69 (1H, sl), atribuído ao H-1', corrobora a proposta da sobreposição dos sinais de H-8' e H-4'. Na análise dos espectros de RMN ^{13}C de **7a** (Tabela 5) (Figura 41) foram observados quatorze sinais, que foram correlacionados com os hidrogênios através do mapa de contorno HSQC (Figura 53–55). O sinal em δ 54,77 foi atribuído a metoxila (C-1''), o sinal em δ 180,52 foi atribuído a carbonila do ácido carboxílico (C-1), e os sinais em δ 45,25 e 18,13 foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-3, respectivamente. Na região de carbonos aromáticos foi visualizado dez sinais referentes aos carbonos de C-1' a C-8a', que foram atribuídos com o auxílio das correlações obtidas no espectro de HSQC, além de dados da literatura (Smith; Rajanbabu, 2009). A análise do mapa de contorno HSBC (Figura 56–58), permitiu observar as correlações entre hidrogênios a 2J e 3J com os carbonos aromáticos incluindo aqueles não hidrogenados, sendo possível correlacionar os carbonos C-4a' e C-8a' aos sinais em δ 133,83 e 128,91, respectivamente. Também foi possível observar a correlação entre o sinal δ 3,92 (H-1'') com o sinal em δ 157,73 (C-6'), o que permitiu estabelecer de maneira inequívoca a posição da metoxila. A análise conjunta dos espectros, juntamente com a comparação dos dados da literatura suportam a elucidação estrutural do (S)-NPX (Smith; Rajanbabu, 2009).

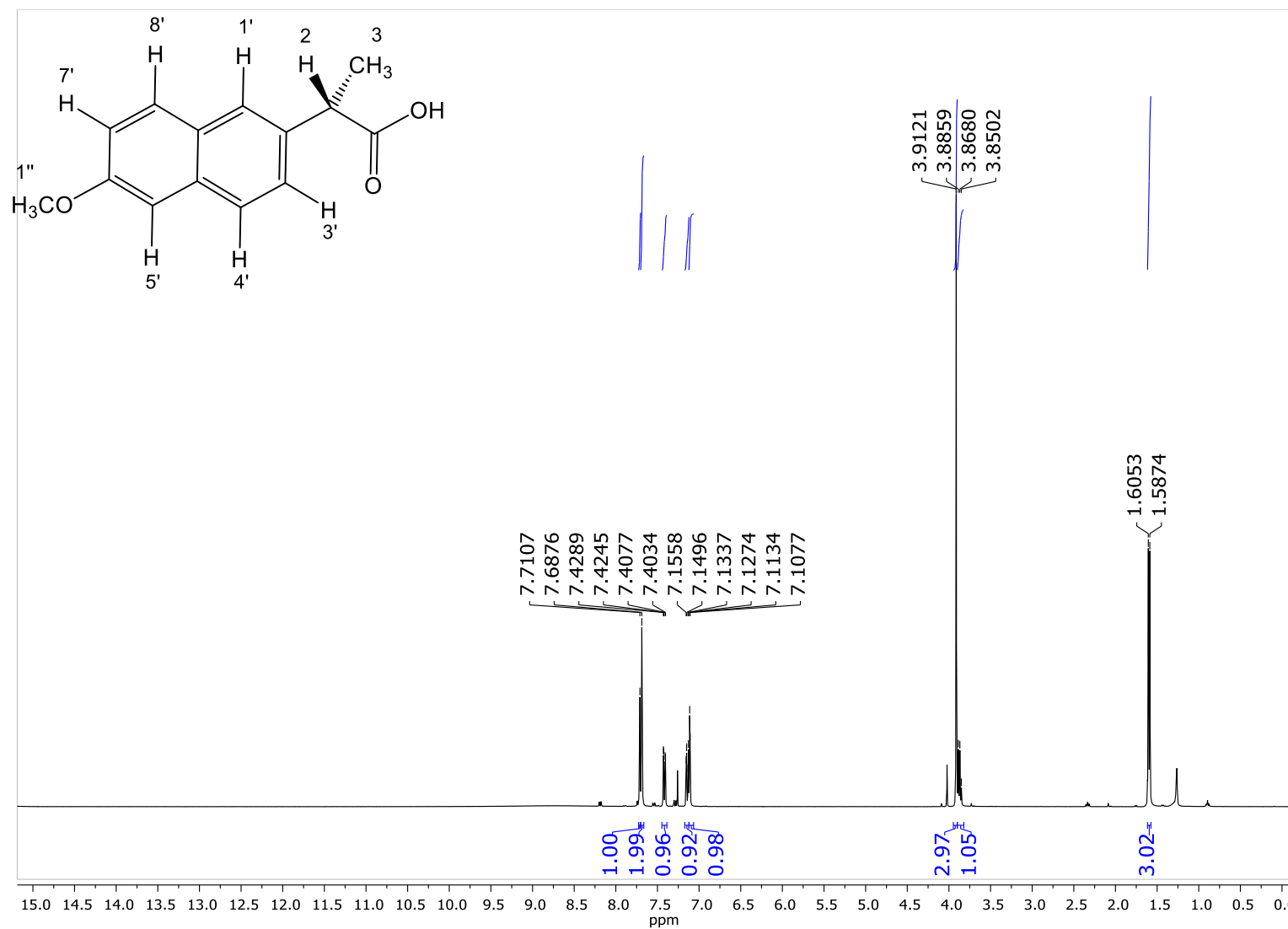
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl_3 .

(<i>S</i>)-NPX (Naxotec [®])							
Posição	(a autora)		(Smith; Rajanbabu, 2009)		(a autora)		
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	^{13}C (100 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	COSY	HSQC	HMBC
1	-	180,52 (C)	7,72 s	180,80 (C)	-	-	H-2; H-3
2	3,88 q (7,16)	45,25 (CH)	3,88 q (7,20)	45,30 (CH)	H-3	H-2	H-3; H-1'; H-3'
3	1,60 d (7,16)	18,13 (CH ₃)	1,60 d (7,20)	18,10 (CH ₃)	H-2	H-3	H-2
1'	6,69 s	126,18 (CH)	7,72 s	126,20 (CH)	H-8'	H-1'	H-2; H-8'
2'	-	134,87 (C)	-	134,80 (C)	-	-	H-2; H-1'; H-3'; H-4'
3'	7,42 dd (1,72; 8,50)	126,14 (CH)	7,42 dd (1,60; 8,40)	126,10 (CH)	H-4'	H-3'	H-2; H-1'; H-4'
4'	7,70 d (8,50)	127,23 (CH)	7,69 s-	127, 20 (CH)	H-2'; H-5'	H-4'	H-3'; H-5'
4a'	-	133,83 (C)	-	133,80 (C)	-	-	H-1'; H-3'; H-4'; H-5'; H-8'
5'	7,11 d (2,30)	105,65 (CH)	7,11 d (2,00)	105,60 (CH)	H-3'; H-7'	H-5'	H-4'; H-7'
6'	-	157,73 (C)	-	157,70 (C)	-	-	H-1''; H-5'; H-7'; H-8'
7'	7,14 dd (2,30; 8,65)	119,03 (CH)	7,15 dd (1,60; 8,80)	119,00 (CH)	H-5'; H-8'	H-7'	H-5'
8'	7,70 d (8,65)	129,30 (CH)	7,69 s	128,90 (CH)	H-1'; H-7'	H-8'	H-7'
8a'	-	128,91 (C)	-	129,30 (C)	-	-	H-1'; H-4'; H-5'; H-7'; H-8'
1''	3,91 s	54,77 (CH ₃)	3,92 s	55,30 (CH ₃)	-	H-1''	-

^aExperimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente e deslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bMultiplicidade: s (singlete); d (duplete); dd (duplo dublete); t (triplete); q (quadruplete).

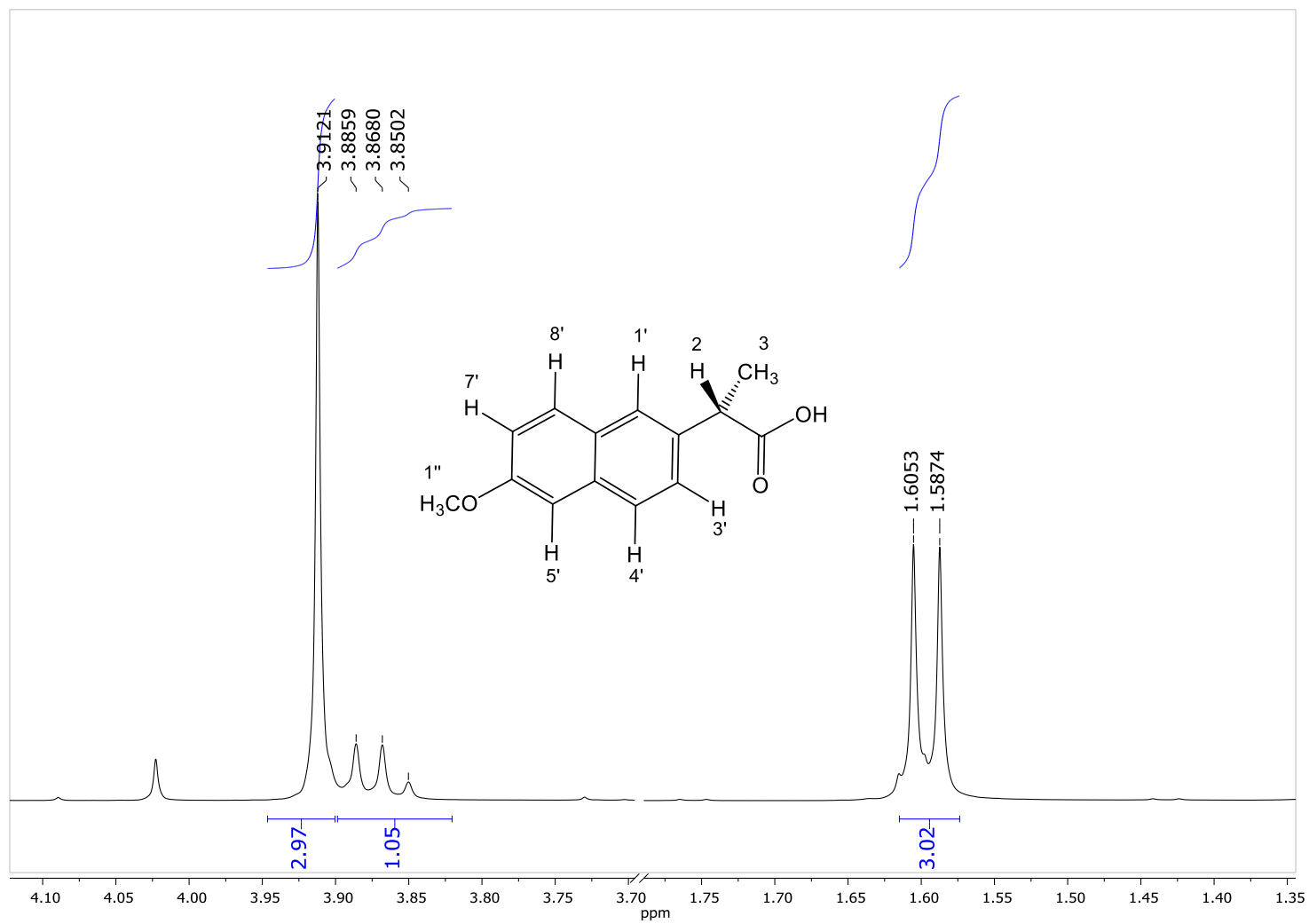
Fonte: a autora

Figura 45 – Espectro de RMN ^1H para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl_3 (400 MHz).



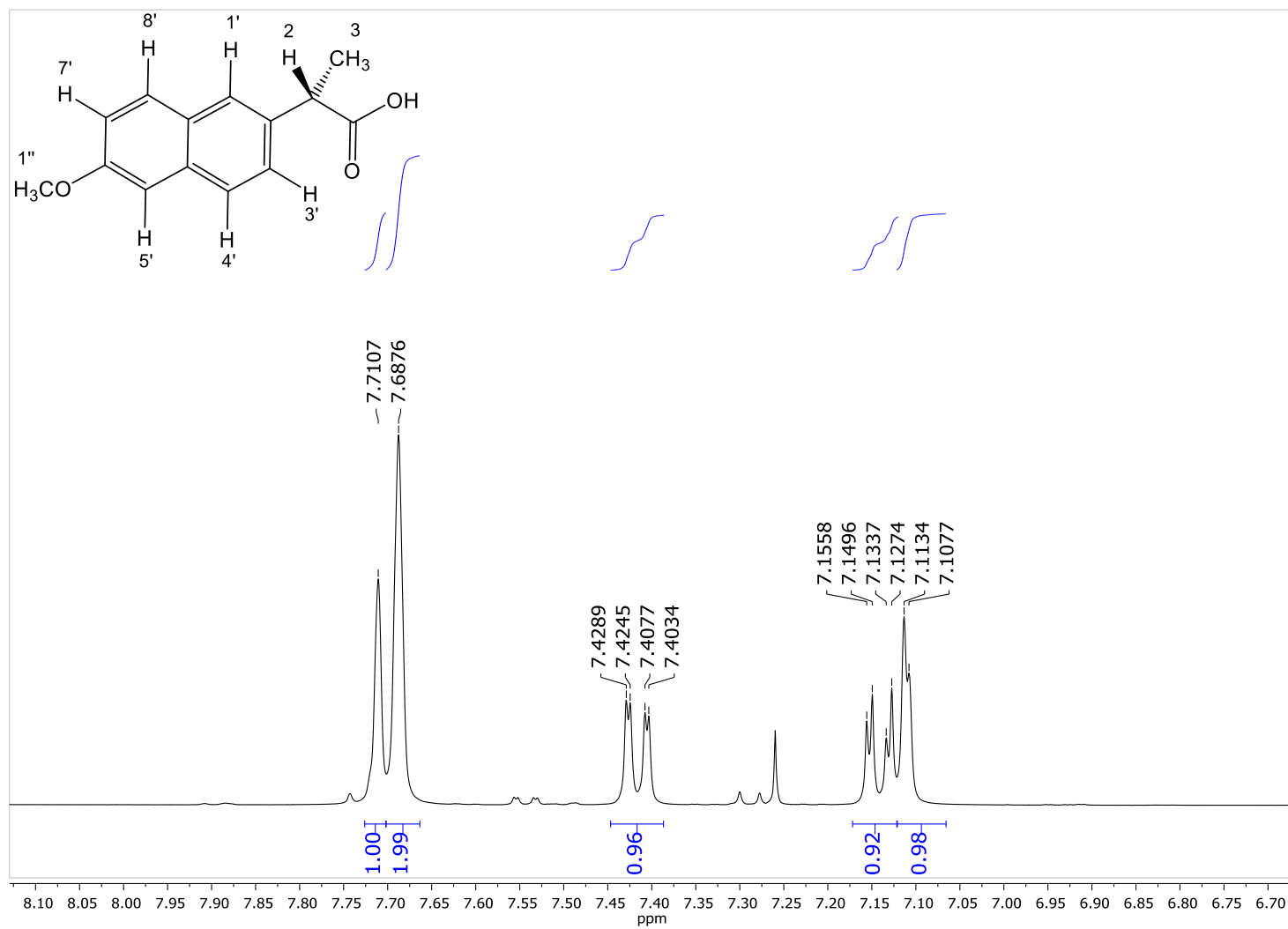
Fonte: a autora.

Figura 46 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ 1,40–1,75; δ 3,70–4,10) para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]).



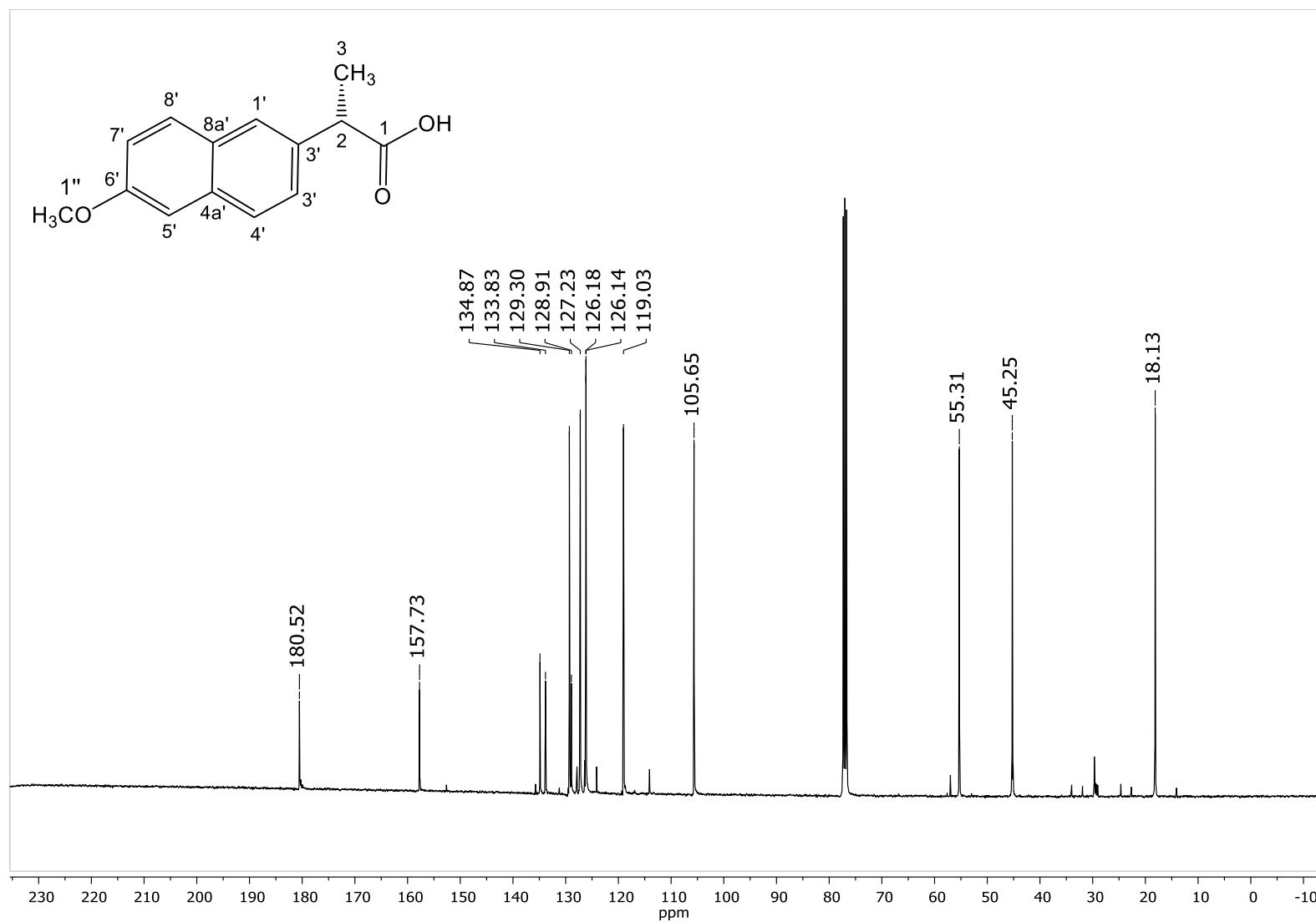
Fonte: a autora.

Figura 47 – Ampliação do espectro de RMN ^1H (δ 6,70–8,00) para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]).



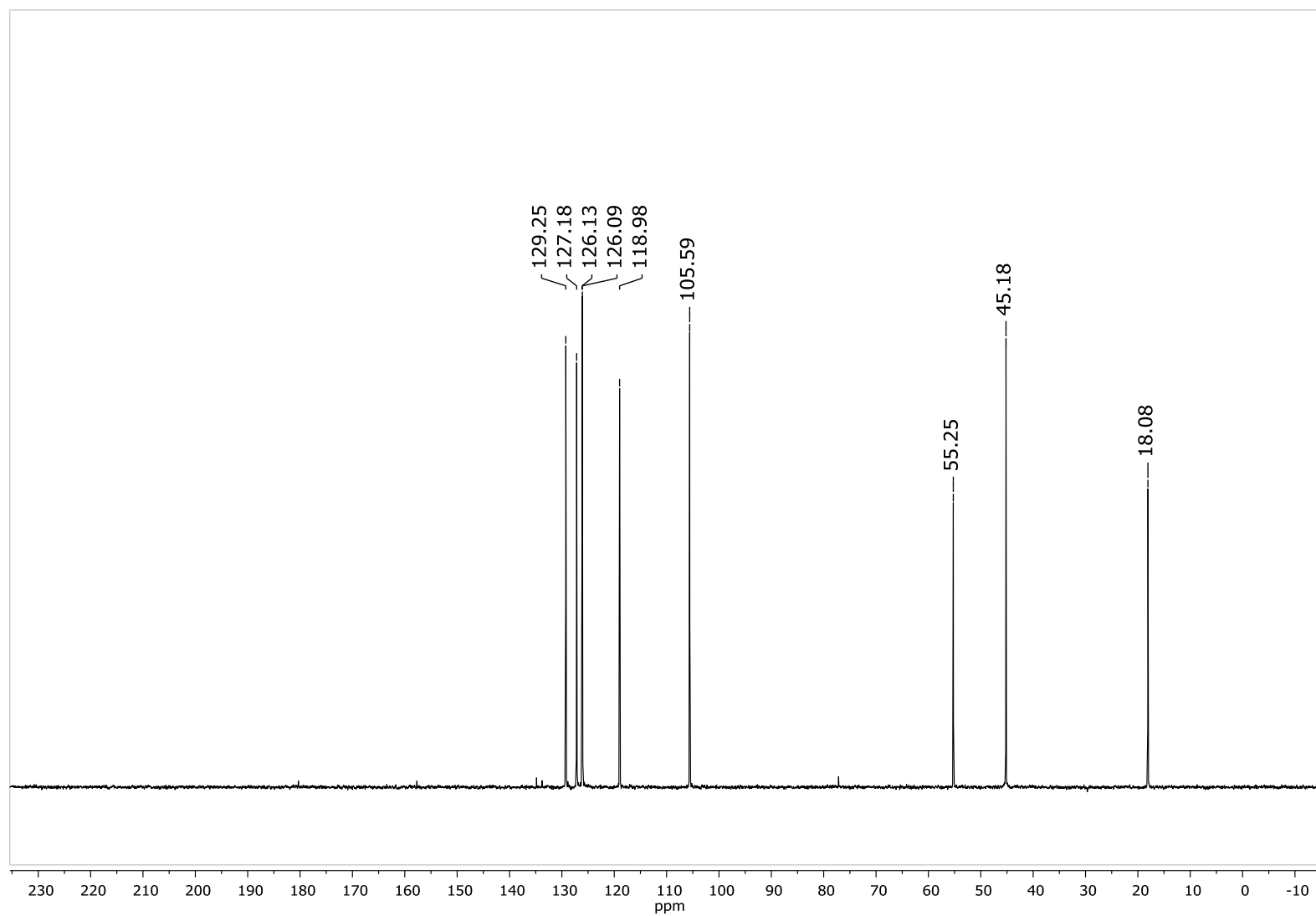
Fonte: a autora.

Figura 48 – Espectro de RMN ^{13}C para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl_3 (100 MHz).



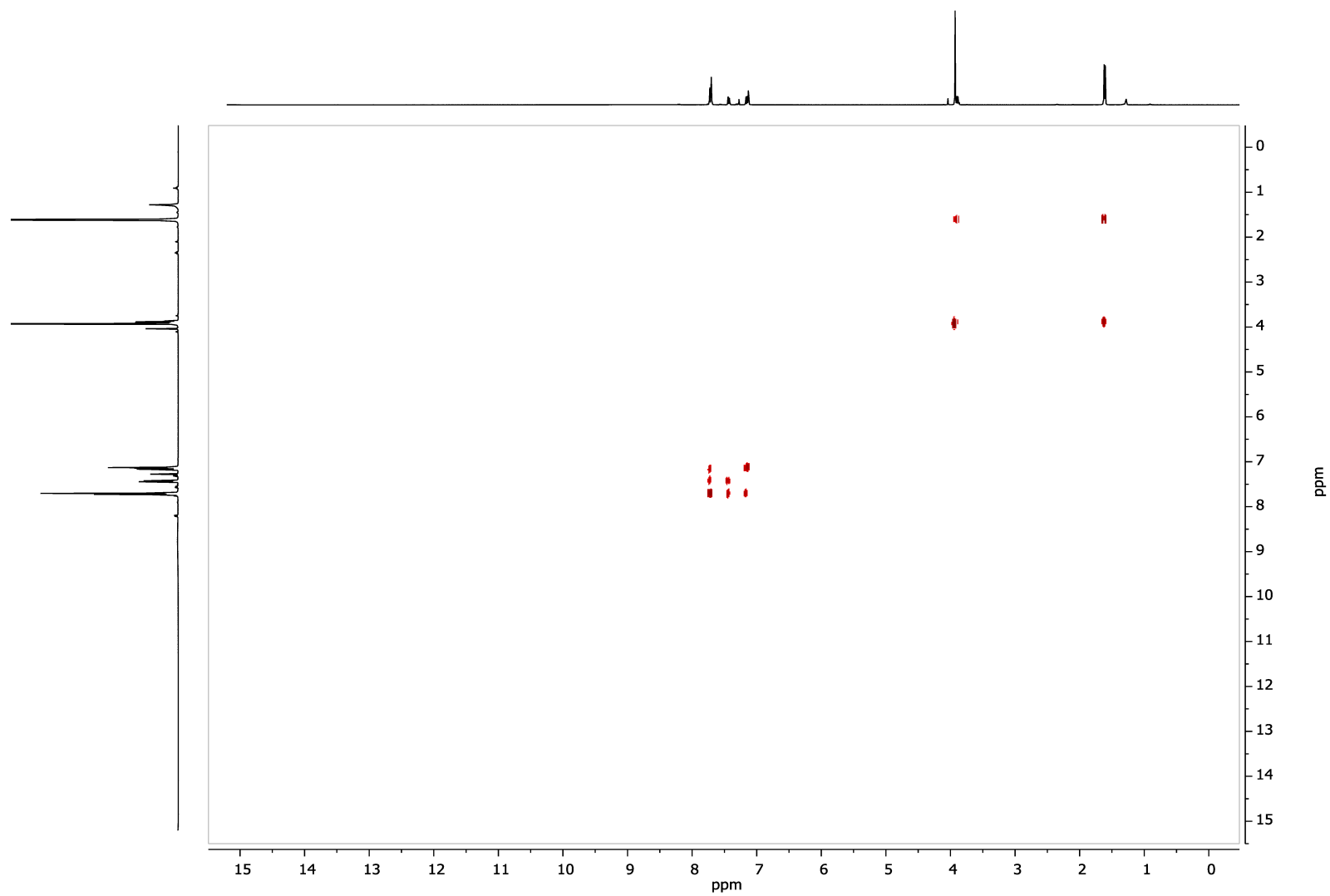
Fonte: a autora.

Figura 49 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl_3 (100 MHz).



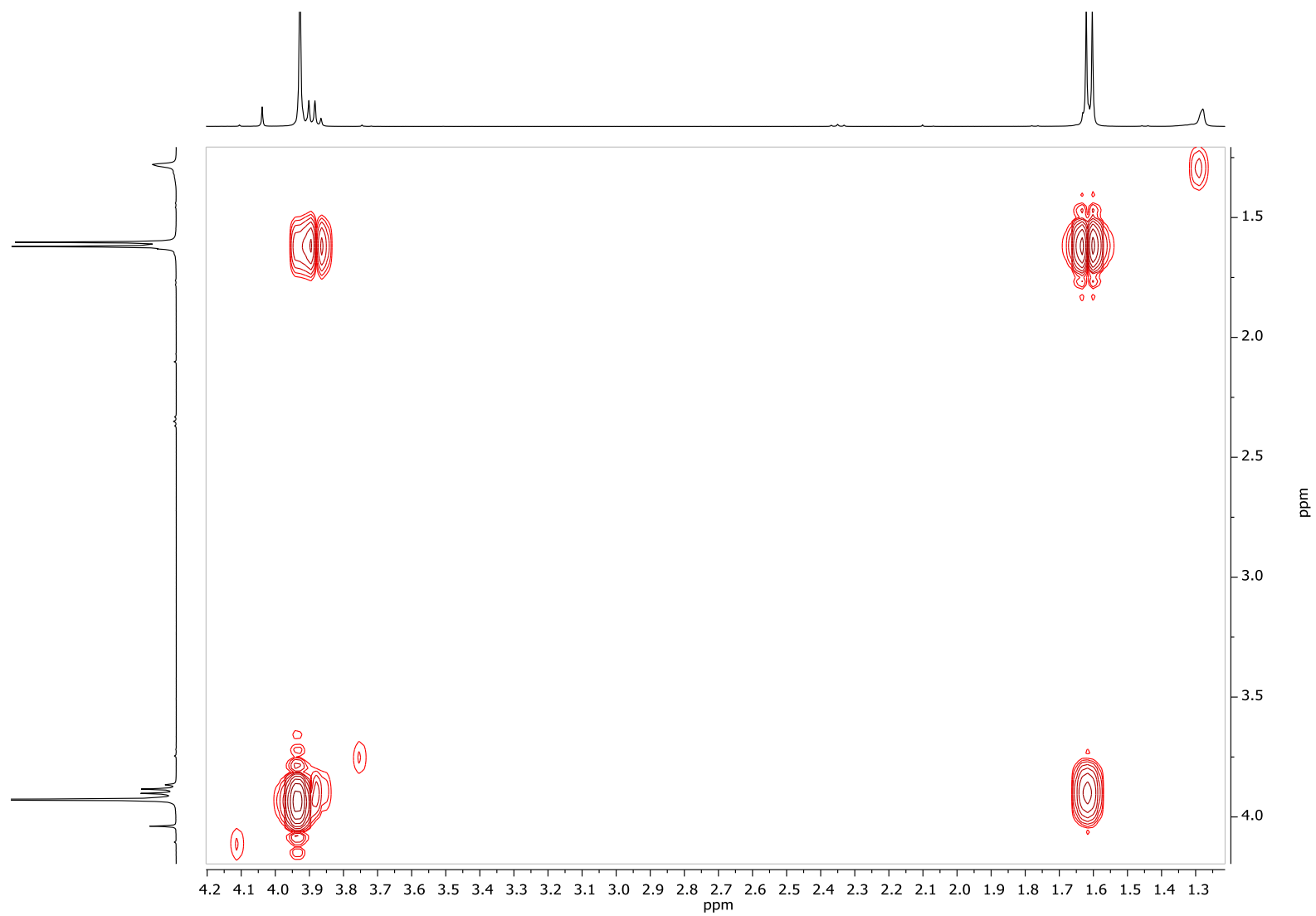
Fonte: a autora.

Figura 50 – Mapa de contorno COSY para o (*S*)-NPX (Naxotec®) em CDCl₃.



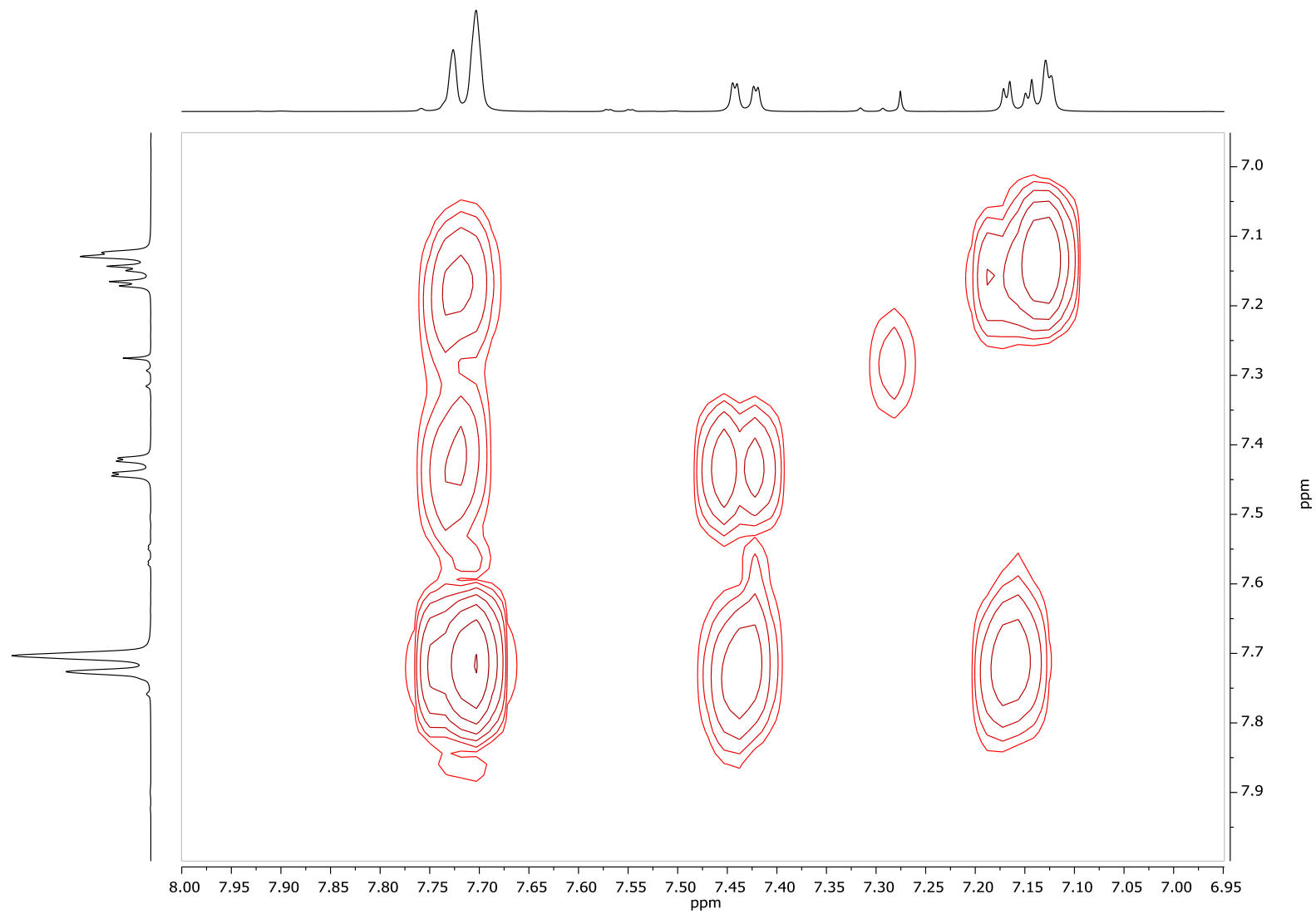
Fonte: a autora.

Figura 51 – Mapa de contorno COSY (δ 1,3–4,2) para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl₃.



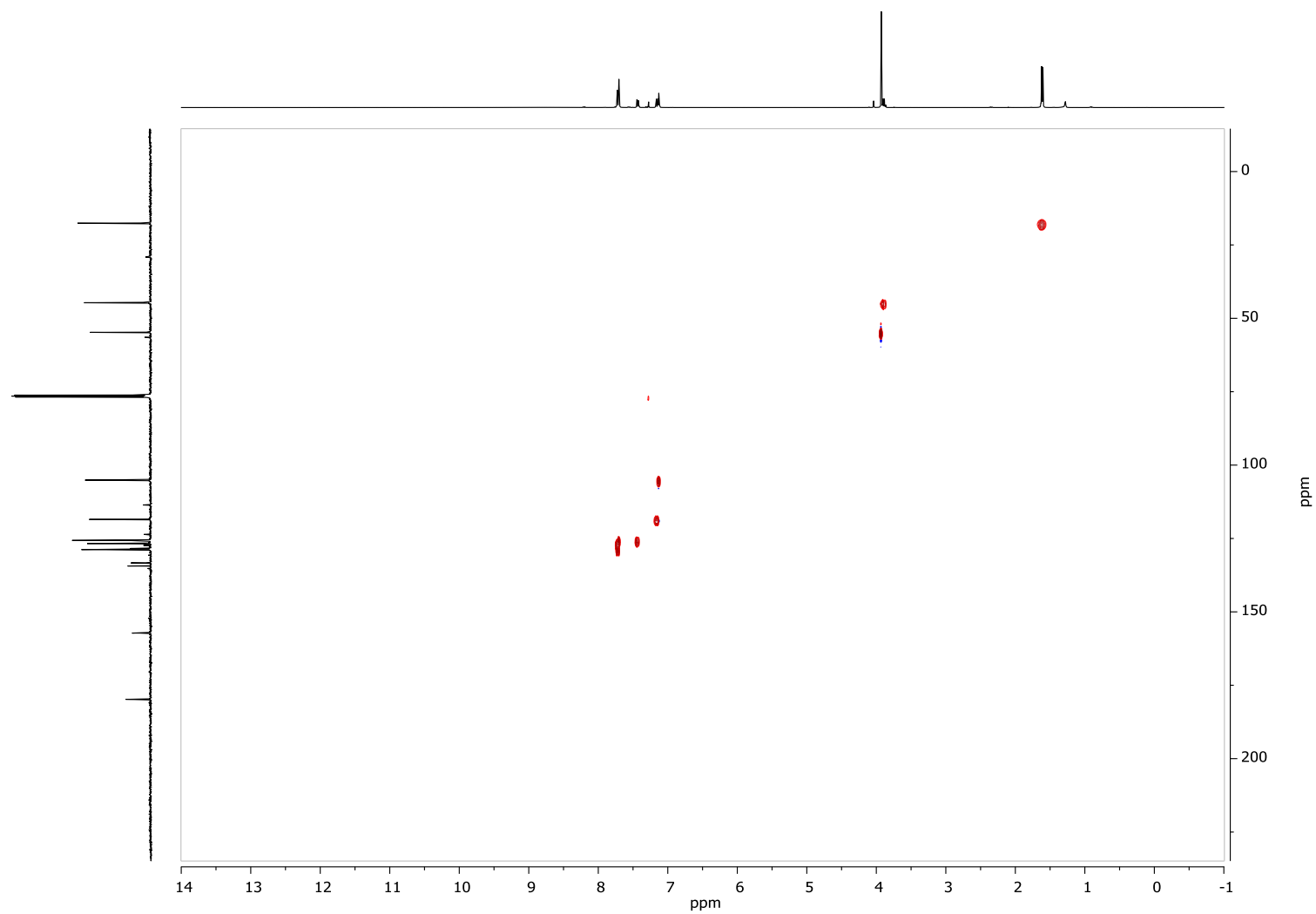
Fonte: a autora.

Figura 52 – Mapa de contorno COSY (δ 7,0–8,0) para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl₃.



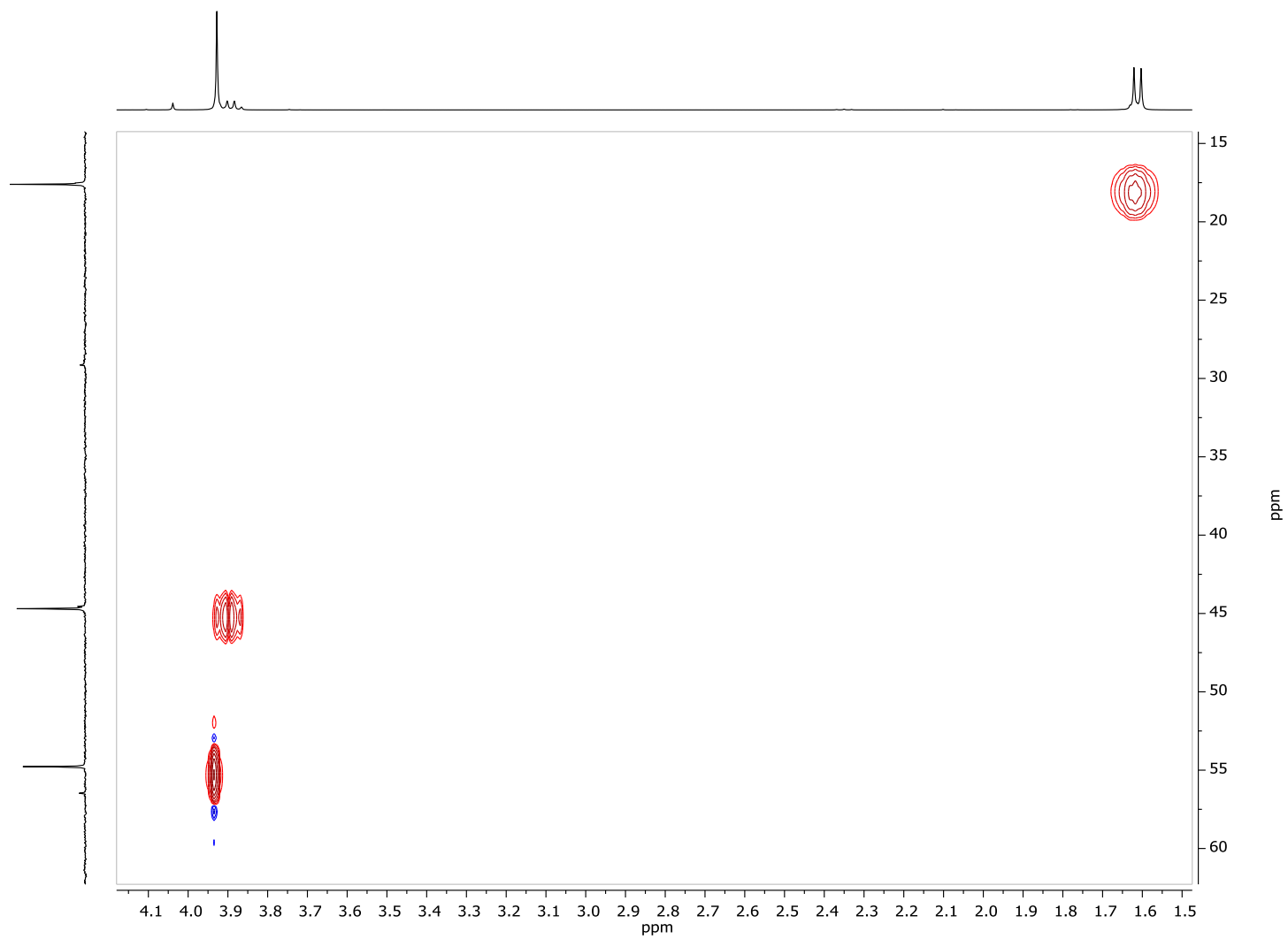
Fonte: a autora.

Figura 53 – Mapa de contorno HSQC para o (*S*)-NPX (Naxotec®) em CDCl₃ (400 MHz).



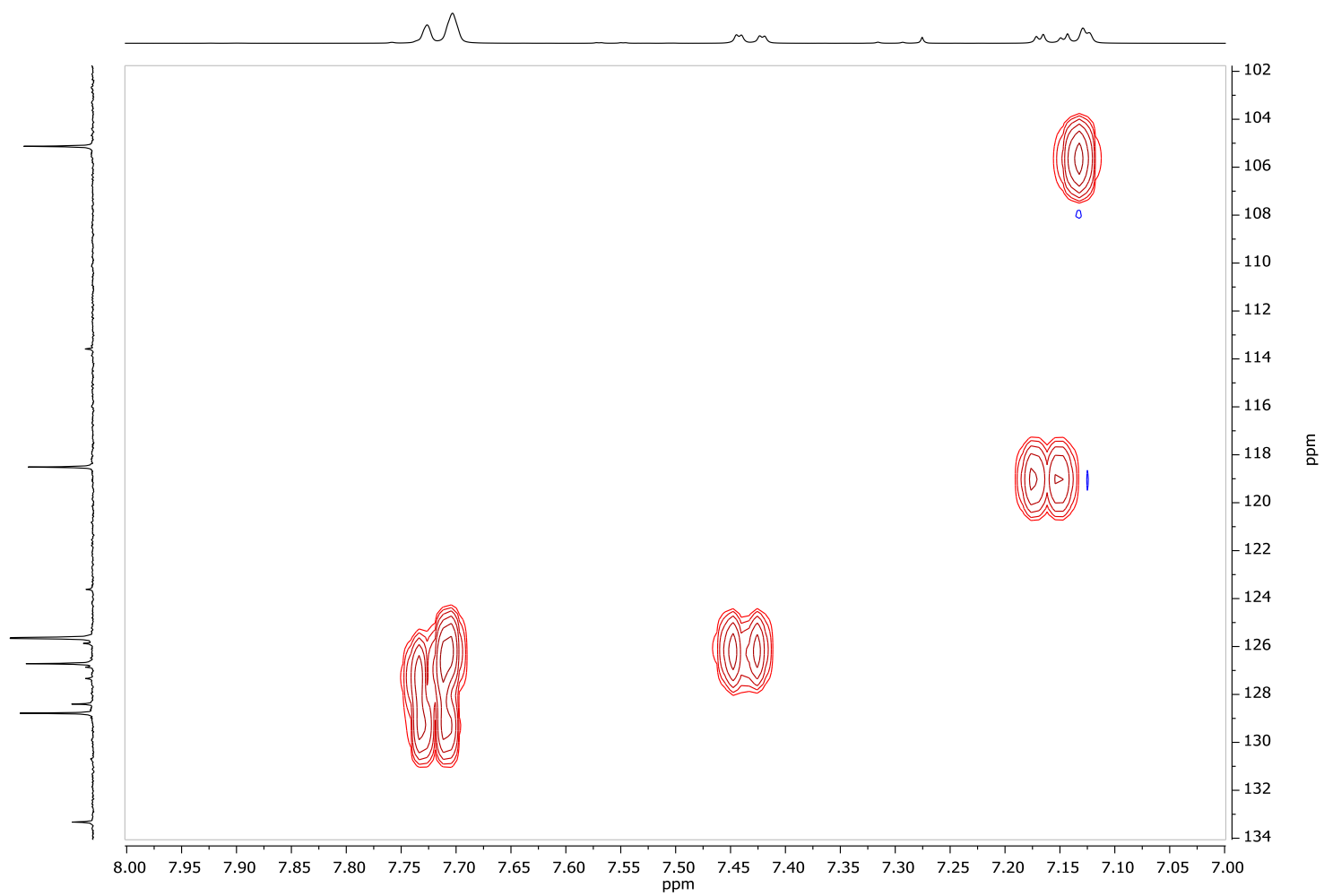
Fonte: a autora.

Figura 54 – Mapa de contorno HSQC (δ 1,5–4,1) para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl₃.



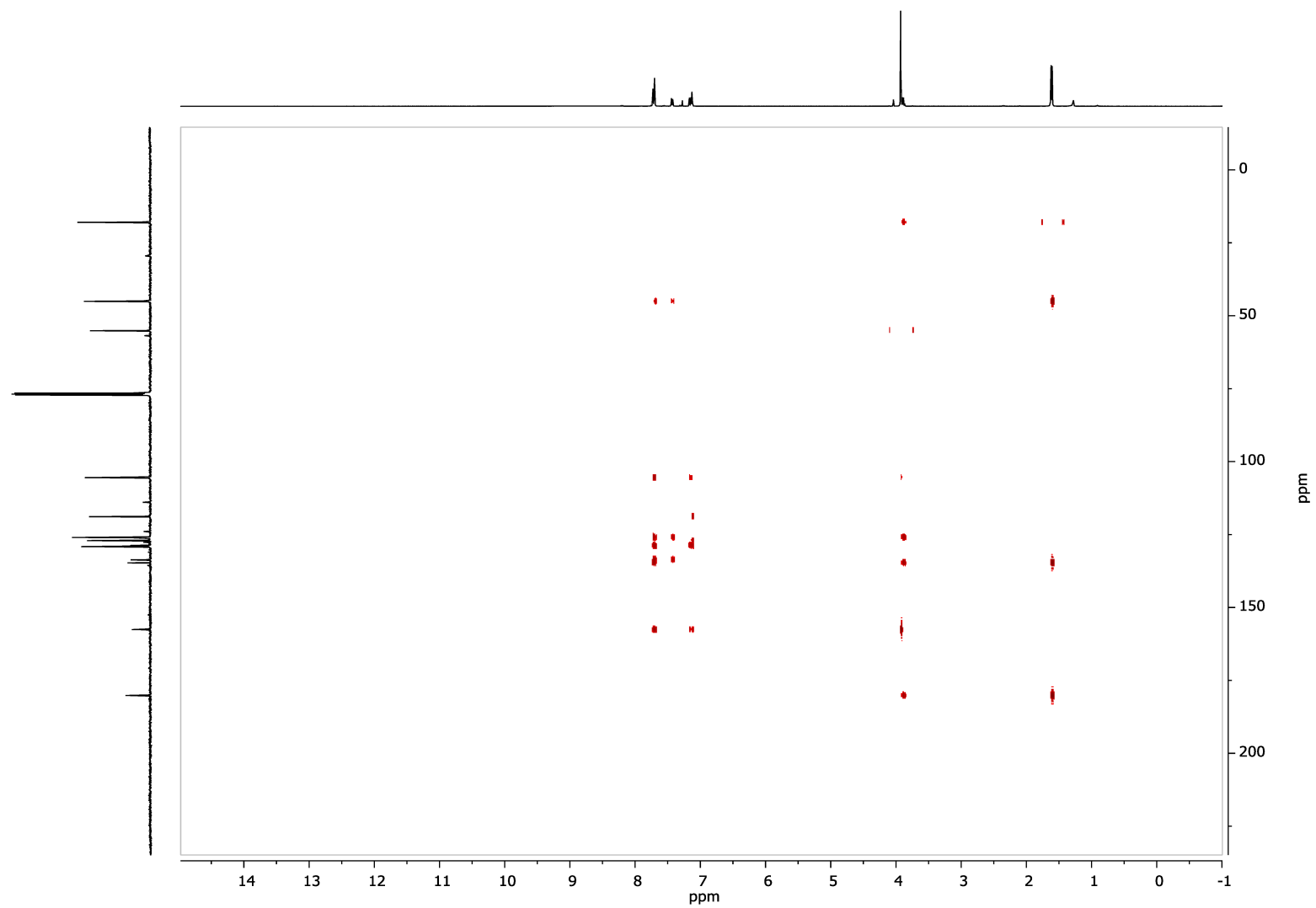
Fonte: a autora.

Figura 55 – Mapa de contorno HSQC (δ 7,0–8,0) para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl₃.



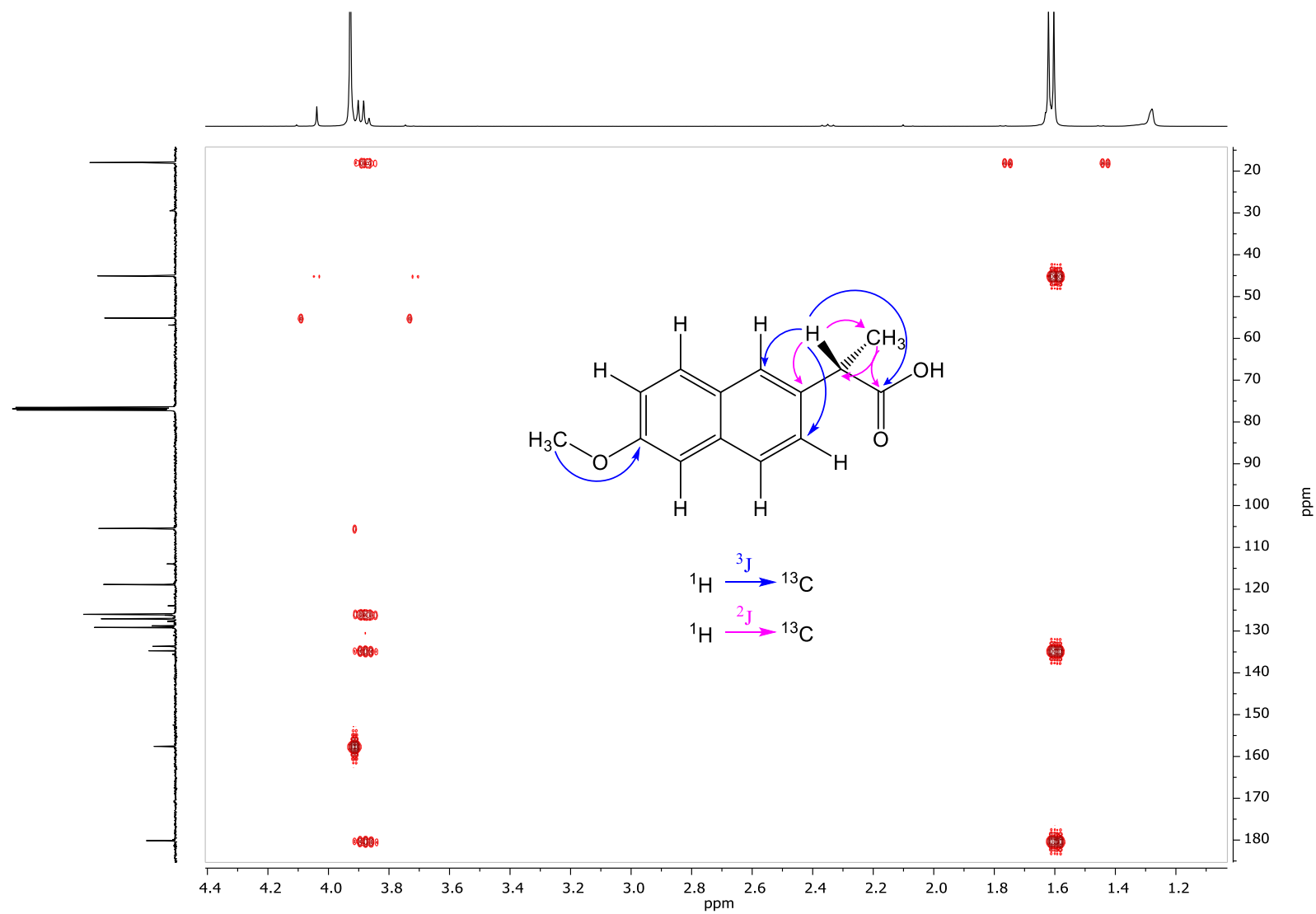
Fonte: a autora.

Figura 56 – Mapa de contorno HSBC para o (*S*)-NPX (Naxotec®) em CDCl₃ (400 MHz)



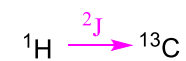
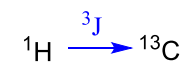
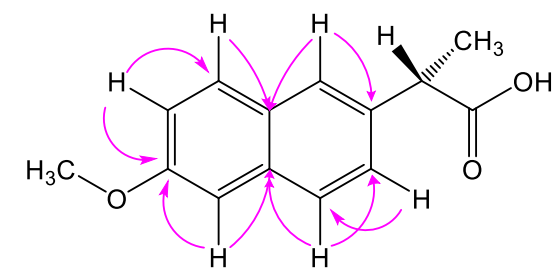
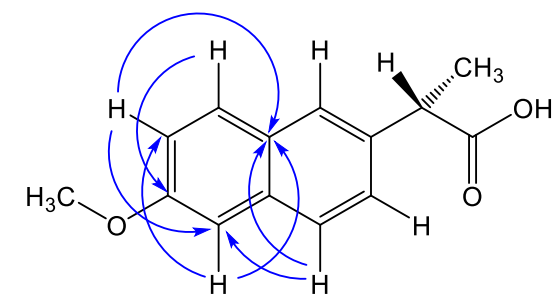
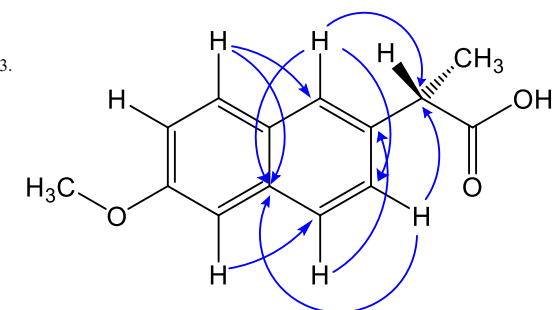
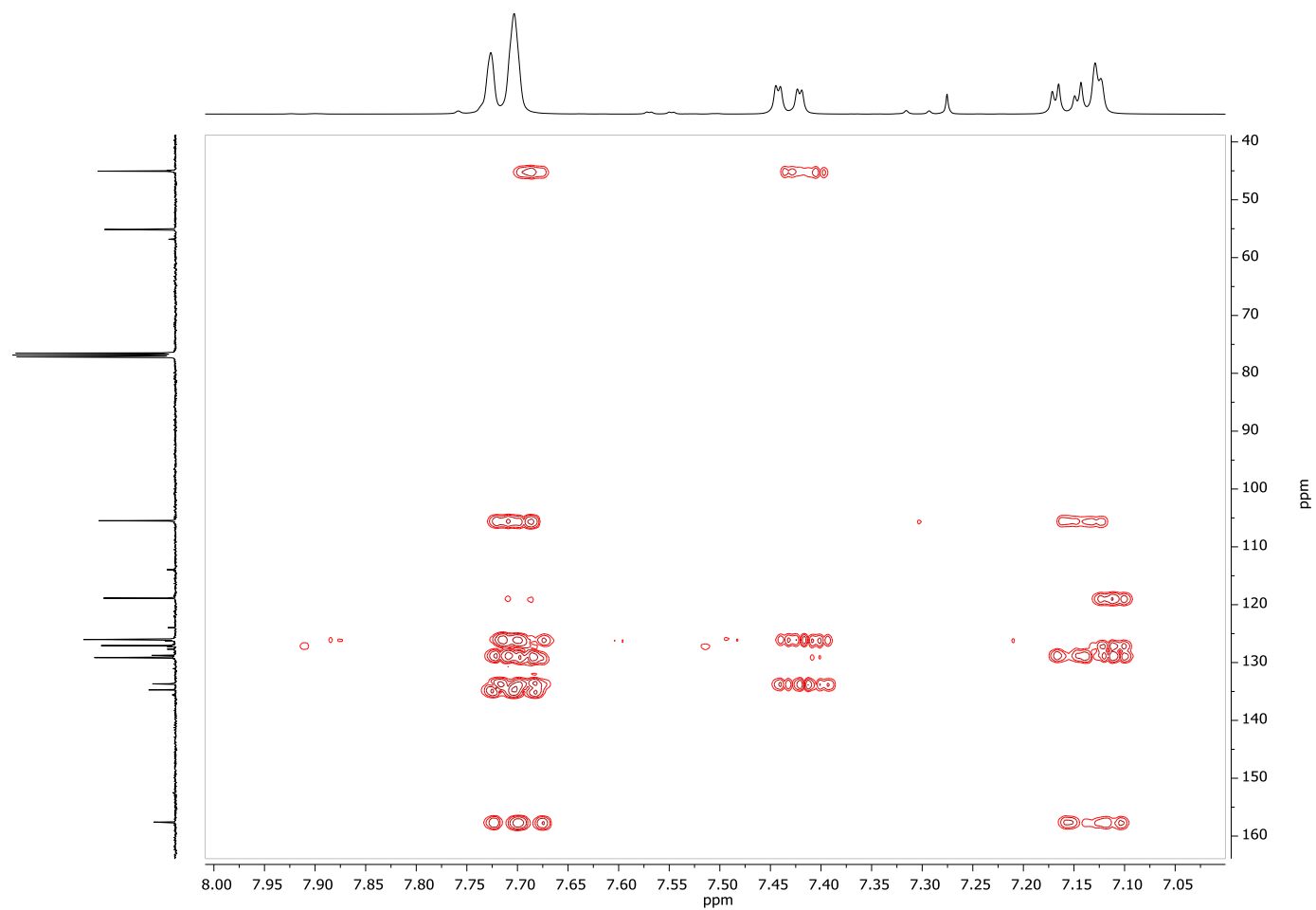
Fonte: a autora.

Figura 57 – Mapa de contorno HSBC (δ 1,2–4,4) para o (*S*)-NPX (Naxotec[®]) em CDCl₃.



Fonte: a autora.

Figura 58 – Mapa de contorno HSBC (δ 7,0–8,0) para o (*S*)-NPX (Naxotec®) em CDCl_3 .

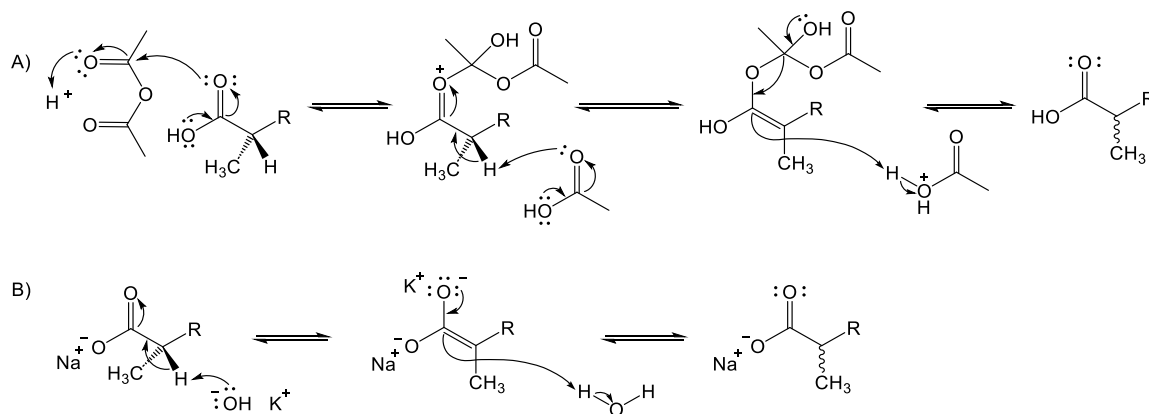


Fonte: a autora.

5.4 Racemização do (+)-(*S*)-NPX

Foram avaliadas reações para racemização de **7a** em meio ácido (Figura 59A) e em meio básico (Figura 47B), conforme descrito no item 4.3.4. O mecanismo proposto para a reação de racemização em meio ácido se inicia com a protonação do oxigênio carbonílico do anidrido acético e consequente ataque nucleofílico do oxigênio da carbonila do ácido carboxílico (**7a**) ao carbono do anidrido que sustenta o oxigênio protonado, forçando o rompimento da ligação π (C=O) e migração do par de elétrons para o oxigênio. Na sequência, alguma espécie, presente no meio reacional, com caráter básico captura o hidrogênio alfa a carbonila do carbono assimétrico, promovendo a regeneração da carga formal neutra sobre o oxigênio através da conjugação dos elétrons, que pertenciam a ligação C-H . Nessa etapa o centro estereogênico passa a formar uma dupla ligação (estrutura planar). A recomposição do carbono assimétrico, a partir do ataque nucleofílico do alceno a um hidrogênio ácido do meio reacional, possibilita a formação de uma nova ligação com hidrogênio, que pode ser por ambas as faces do carbono sp^2 gerando o (*rac*)-NPX (Figura 47A). Já o mecanismo proposto para a reação de racemização em meio básico tem início com o ataque nucleofílico do OH^- disponível no meio reacional, ao hidrogênio alfa do naproxeno sódico, que pode estabilizar a base conjugada através de um sistema de ressonância com o oxigênio da carbonila. Ao reestabelecer a dupla ligação C=O, o par de elétrons retorna para o carbono alfa possibilitando o ataque nucleofílico à uma molécula de água, presente no meio reacional, capturando um hidrogênio que pode ser adicionado ao carbono alfa (sp^2) em ambas as faces, gerando o (*rac*)-NPX (Figura 59B).

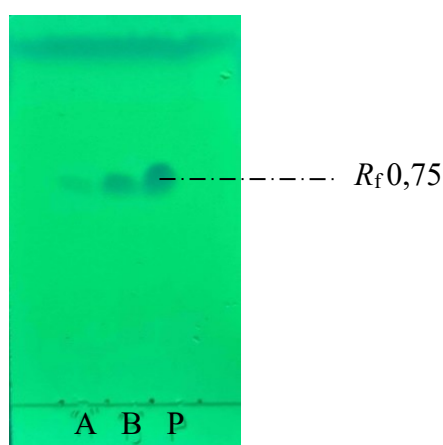
Figura 59 – Propostas de mecanismos para as reações de racemização do (*S*)-NPX em meio ácido (A) e básico (B).



Fonte: a autora.

Depois de 24 h de reação, os produtos foram recuperados através de extração líquido-líquido, conforme descrito no item 4.2.4, sendo que a reação em meio ácido apresentou 80% de rendimento e a reação em meio básico apresentou 88% de rendimento. Os produtos foram inicialmente analisados por CCD, para avaliar se houve alguma mudança indesejada na estrutura de **7a**. Como resultado, foi possível observar os mesmos valores de R_f 0,75 (Figura 60), indicando que a estrutura não foi alterada.

Figura 60 – CCD dos produtos obtidos das reações de racemização em meio ácido (A), meio básico (B) e do padrão **7a** (P).

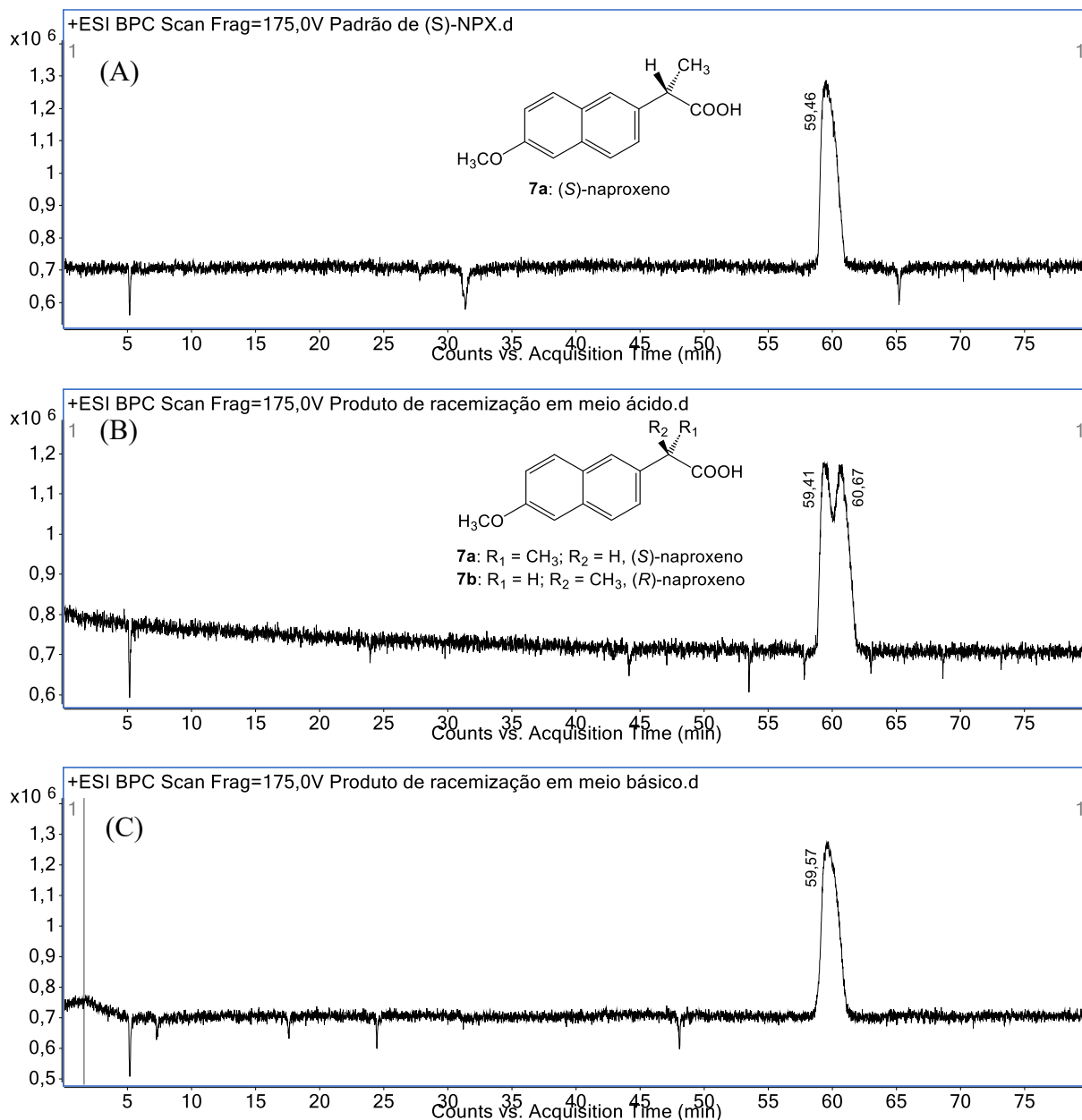


Condições: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH (9,5:0,5) e revelador: inspeção em câmara UV a 254 nm.

Fonte: a autora.

Na sequência, os produtos das reações em meio ácido e básico foram submetidos a análises por CLAE-IES-EM-(+), utilizando uma coluna de FE quiral (Figura 61) e CLAE-DAD, para verificar a eficiência da racemização de **7a** para (*rac*)-NPX.

Figura 61 – CLAE do (S)-NPX (**7a**) (A) e dos produtos obtidos da racemização em meio ácido (B) e em meio básico (C).



Condições: Coluna Phenomenex® Lux celulose-4 (250 mm × 4,6 mm × 5 μm), método isocrático (80 min), MeOH–HOAc 0,1% (60:40); C = 0,35 mg.mL⁻¹, Fluxo = 0,4 mL.min⁻¹, V_{inj} = 4 μL, detector EM-IES-(+).

Fonte: a autora.

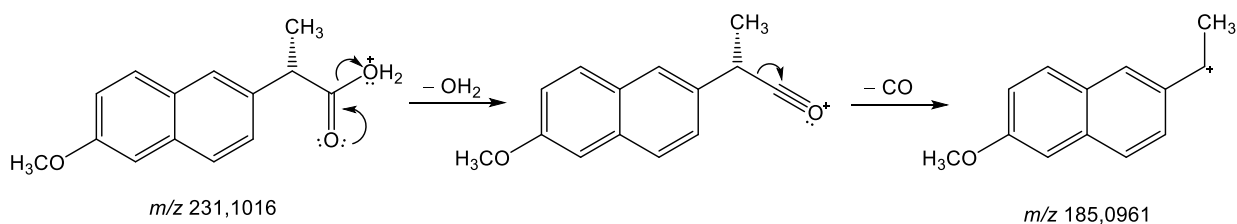
Os cromatogramas obtidos demonstram a presença do **7a** (t_R 59,46 min) como produto nas duas reações, porém apenas a reação em meio ácido demonstrou a presença de outro composto com t_R 60,67 min. Os espectros de massas (Figura 63B), obtidos para ambos os picos t_R 59,41 e 60,67 min (Figura 61B), foram idênticos aos observados para o padrão de **7a** (Figura 61A e 63A). Mesma observação foi feita na análise dos espectros de UV-vis (Figura 64). Esses

dados indicam que os produtos obtidos na reação em meio ácido, resolvidos pela FE da coluna quiral, são a mistura dos enantiômeros (*S*)-NPX e (*R*)-NPX e que a reação em meio básico não foi eficiente para a racemização.

No espectro de massas em alta resolução do (*S*)-NPX (**7a**) (t_r 59,46 min) (Figuras 61A e 63A) foi possível observar sinais referentes às moléculas protonada $[M + H]^+$ e sodiada $[M + Na]^+$ em m/z 231,1023 e 253,0849, calculados para $C_{14}H_{15}O_3^+$ 231,1016 (Δ 3,0 ppm) e $C_{14}H_{14}O_3Na^+$ 253,0835 (Δ 5,5 ppm), respectivamente. Foi possível observar ainda um fragmento de m/z 185 que é condizente com a saída 46u da molécula protonada (Figura 62).

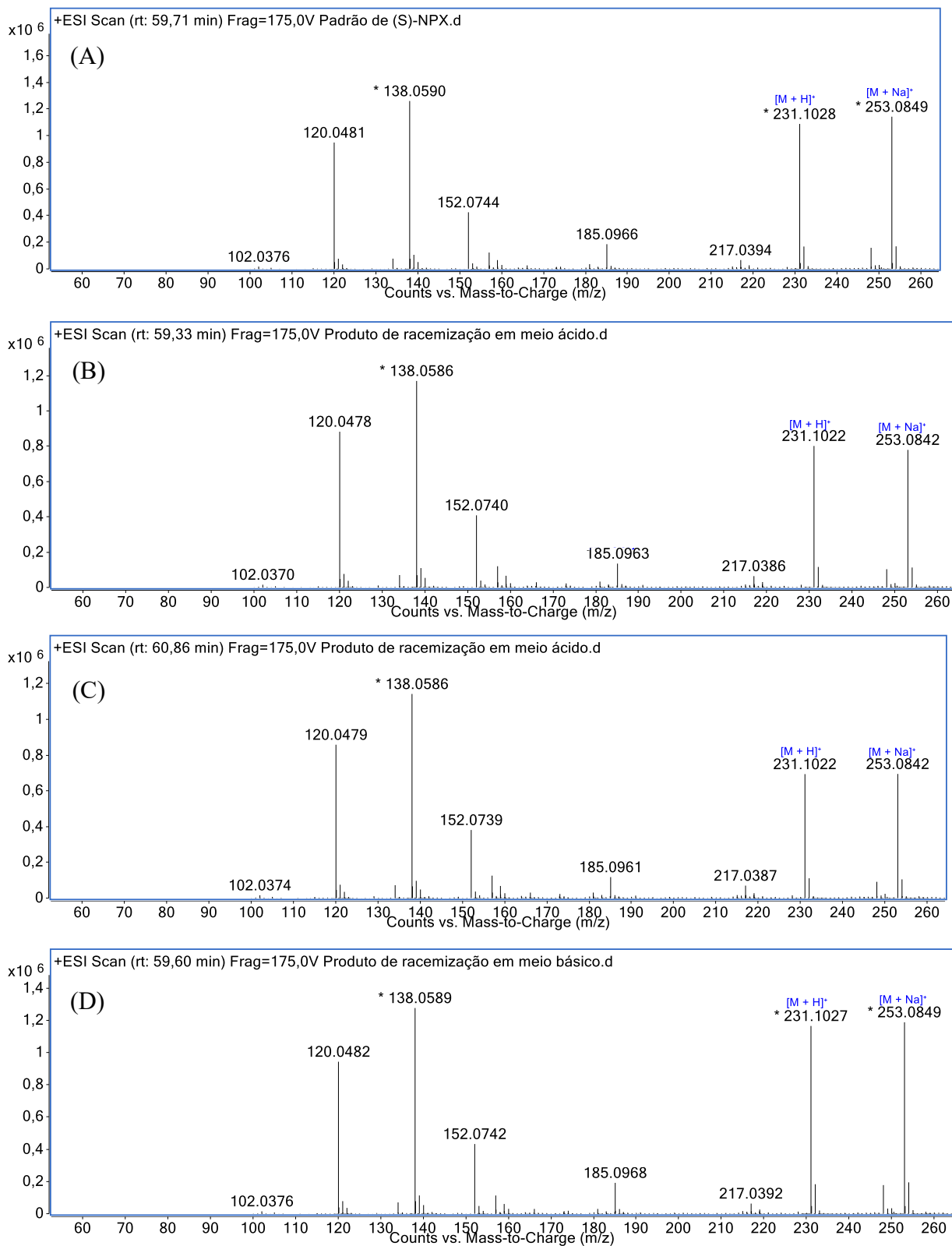
Na análise dos espectros de UV-Vis (Figura 64) dos produtos da reação em meio ácido com t_R 59,41 (A) e 60,67 min (B) (Figura 61B), foi possível observar semelhança nos espectros onde a banda predominante apresentou máximo de absorbância em λ 230 nm. Estes dados indicam que a reação para racemização foi eficiente.

Figura 62 – Proposta de fragmentação para o (*S*)-NPX em IES.



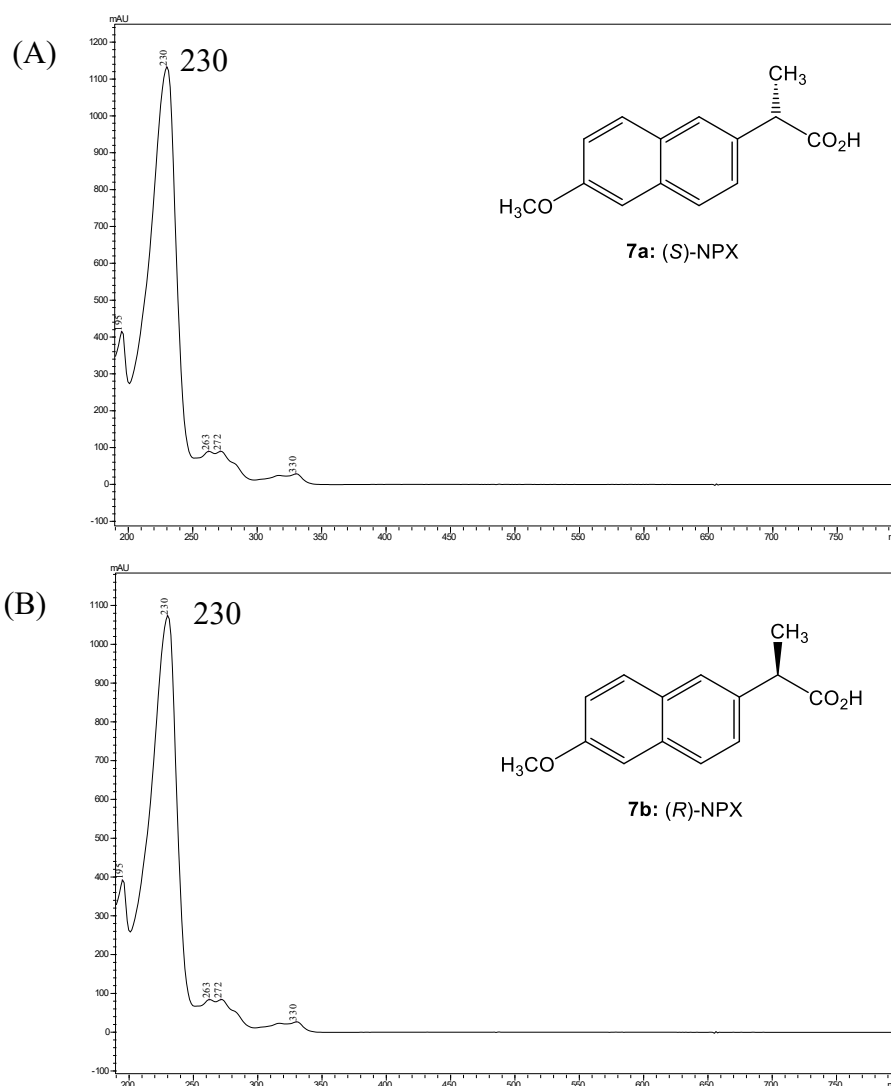
Fonte: a autora.

Figura 63 – EM-IES-(+) de **7a** t_R 59,46 min (A); dos picos em t_R 59,41 (B) e em t_R 60,67 min (C), produto da reação em meio ácido; e do pico em t_R 59,57 min (D), produto da reação em meio básico (Figura 61).



Fonte: a autora.

Figura 64 – UVs dos picos em t_R 59,41 (A) e 60,67 min (B), do produto da reação para racemização em meio ácido (Figura 61B).



Fonte: a autora.

5.5 Preparação dos ésteres de Mosher

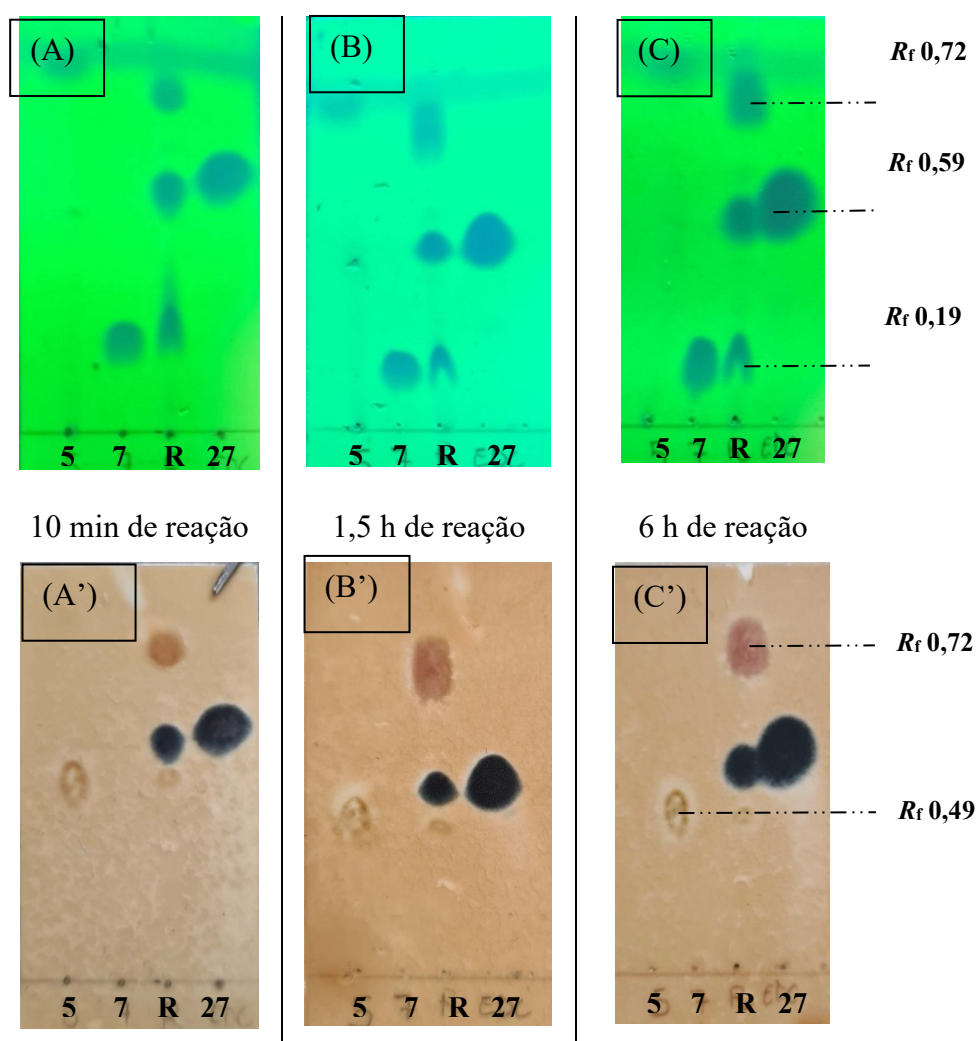
5.5.1 Síntese e purificação dos ésteres de Mosher

Os ésteres de Mosher foram preparados seguindo a metodologia proposta no item 4.2.5 e está de acordo com a reação de esterificação de Steglich, utilizada para derivatização de ácidos carboxílicos e álcoois (Neises; Steglich, 1978).

A reação foi realizada primeiramente utilizando **7a** e **24**, seguindo a metodologia descrita no item 4.3.5, monitorada por CCD por 8 h (Figura 65). Ao final, foi possível observar

uma nova mancha na cromatoplaça com R_f 0,72, quando revelada com ICIPt indicando a formação do produto esterificado, que tem R_f maior que aqueles do padrão de cassina (**5**) (R_f 0,49) e de **7a** (R_f 0,19). É importante destacar que a mancha observada na CCD depois de revelada com ICIPt, também foi observada quando foi feita a inspeção em câmara com luz UV 254 nm, indicando a presença de nitrogênio e grupo cromóforo na estrutura, respectivamente, o que está de acordo com o esperado para o produto da reação.

Figura 65 – CCDs da reação de esterificação de Steglich; 10 min (A e A'), 1,5 h (B e B'), e 6 h (C e C') de reação.

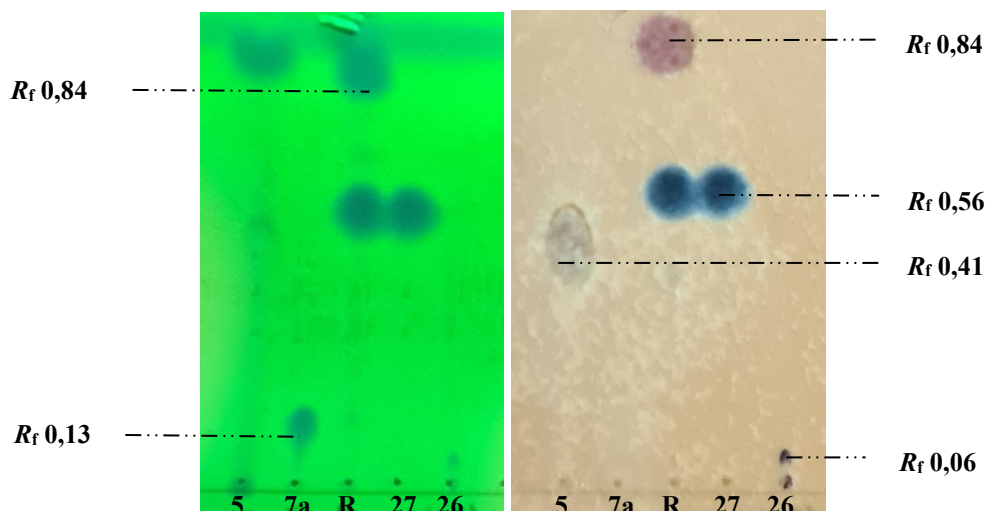


Condições: FE: sílica, FM: CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (8,5:1,5:0,25) e revelador: câmara com luz UV 254 nm (A, B e C) e ICIPt (A', B' e C').

Fonte: A autora

A reação foi finalizada com a adição de uma solução de $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (30,0 mL) e submetida a extração líquido-líquido com CH_2Cl_2 ($5 \times 25,0$ mL). As fases orgânicas foram agrupadas, o solvente removido por destilação e o produto analisado por CCD (Figura 65).

Figura 65 – CCD do produto da reação de esterificação.



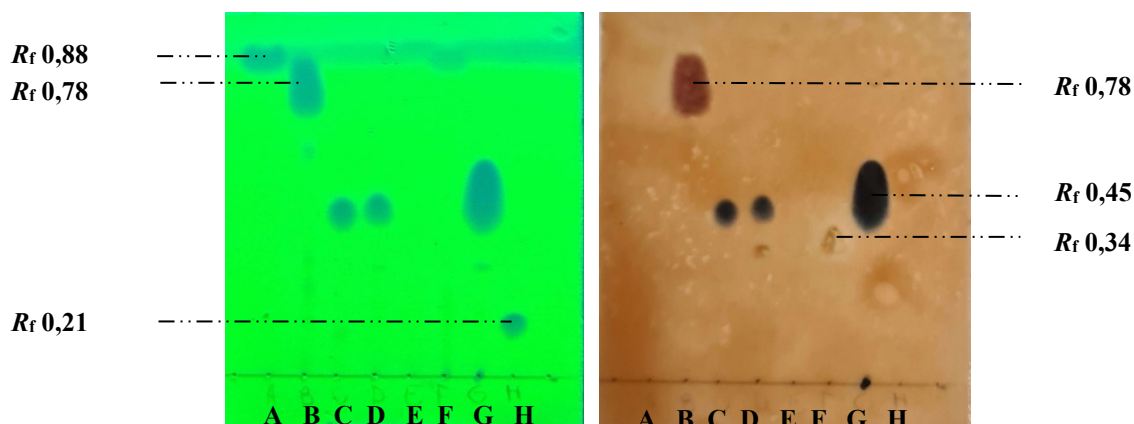
Nota: **5**: (–)-cassina, **7a**: (S)-NPX, **R**: reação, **26**: EDC e **27**: DMAP.

Condições: FE: sílica, FM: CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (8,5:1,5:0,25) e revelador: câmara com luz UV 254 nm e IClPt, respectivamente.

Fonte: A autora

O produto obtido da reação de esterificação (99,7 mg) foi submetido à CC (IMC4), utilizando como fase estacionária sílica *flash* (14,2 g, $24,5 \times 1,5$ cm d.i.) e como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com hexano: CH_2Cl_2 : NH_4OH (10:0:0,5) e finalizou com CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (0:10:0,5). As frações coletadas (100) foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f (Figura 67), resultando nas frações IMC4-F₁₋₆₆ (10,8 mg), IMC4-F₆₇₋₆₉ (53,0 mg), IMC4-F₇₀₋₇₇ (12,8 mg), IMC4-F₇₈₋₈₁ (17,5 mg), e IMC4-F₈₂₋₁₀₀ (5,5 mg).

Figura 67 – CCD das frações IMC4-F₁₋₆₆, IMC4-F₆₇₋₆₉, IMC4-F₇₀₋₇₇, IMC4-F₇₈₋₈₁, e IMC4-F₈₂₋₁₀₀ e controles (**5**, **7a**, e **27**).



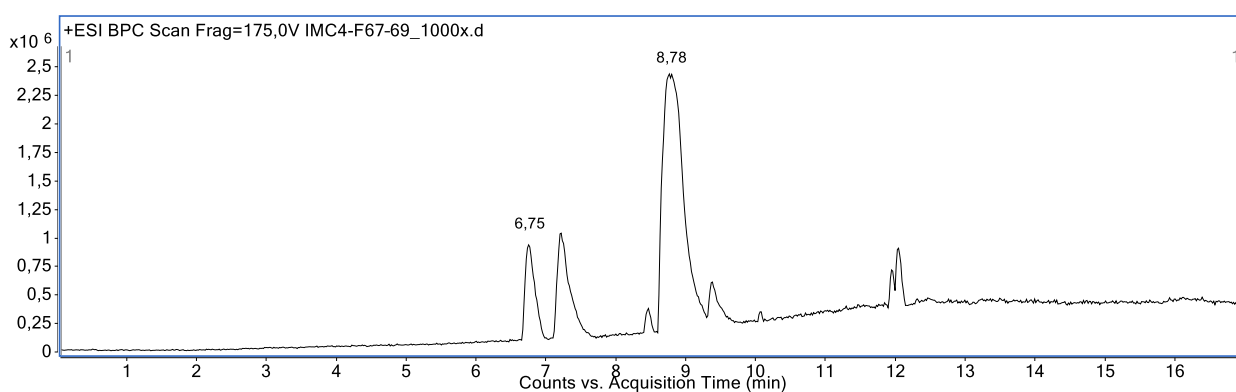
Nota: A: IMC4-F₁₋₆₆; B: IMC4-F₆₇₋₆₉; C: IMC4-F₇₀₋₇₇; D: IMC4-F₇₈₋₈₁; E: IMC4-F₈₂₋₁₀₀; F: (–)-cassina (**5**), G: DMAP (**27**), H: (S)-NPX (**7a**)

Condições: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (8,5:1,5:0,25) e revelador: câmara com luz UV 254 nm e ICIPt, respectivamente.

Fonte: a autora.

A fração IMC4-F₆₇₋₆₉ que apresentou resultado positivo na análise por CCD utilizando ICIPt e que absorveu luz a 254 nm na câmara de UV-Vis, foram analisadas por CLAE-EM-IES-(+) (Figura 68).

Figura 68 – CLAE-EM-IES-(+) da fração IMC4-F₆₇₋₆₉.

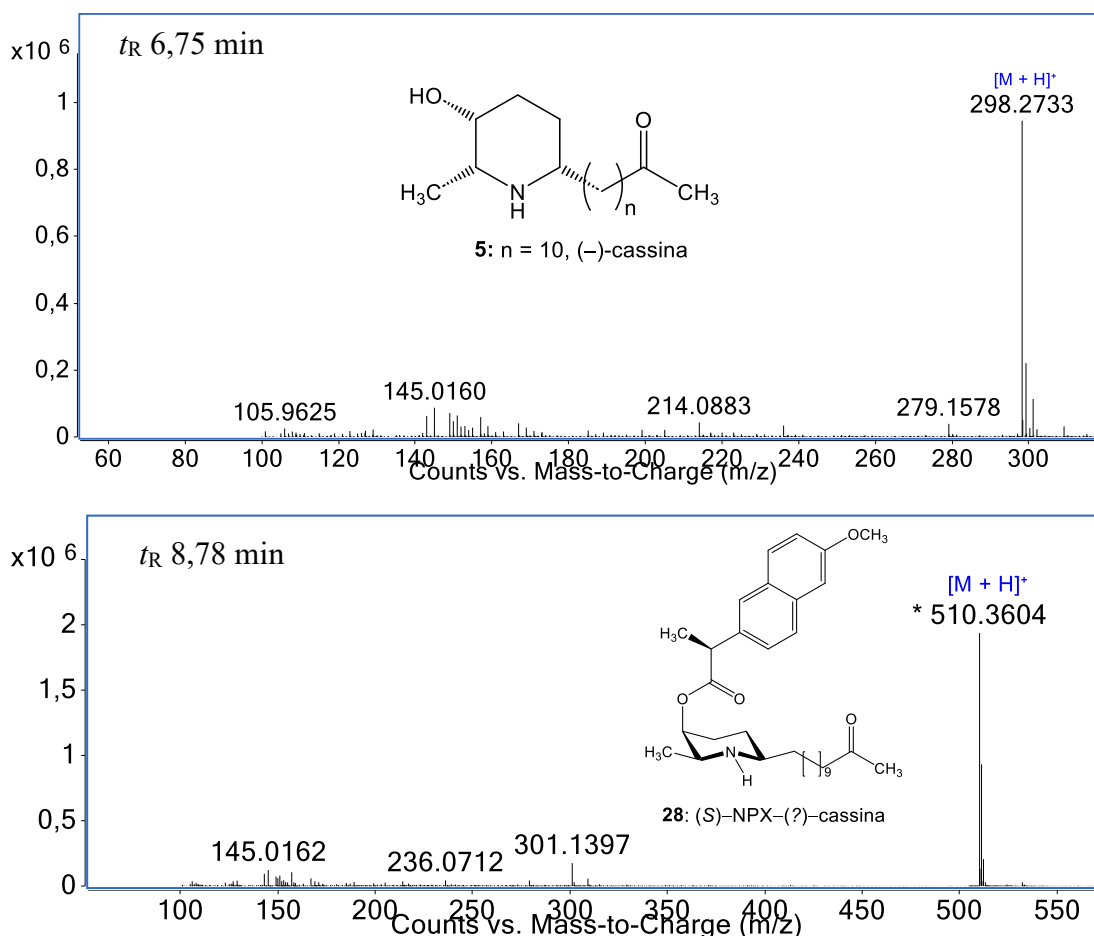


Condições: Coluna Agilent® Poroshell C18 (100 mm × 3 mm × 2,7 μm), gradiente (17 min), 10–98% de MeOH–HOAc 0,1% (0–10 min) e em seguida 98–100% de MeOH–HOAc 0,1% (10–17 min); C = 0,10 mg.mL⁻¹, V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo = 1,0 mL.min⁻¹.

Fonte: a autora.

Os sinais observados no cromatograma (Figura 68), com t_R 6,75 e 8,78 min, apresentaram EM-IES-(+) em alta resolução (Figura 69), compatíveis com as moléculas protonadas $[M + H]^+$ de **5** (m/z 298,2730) e **28** (m/z 510,3606), calculadas para $C_{18}H_{36}NO_2^+$ 298,2733 (Δ 1,0 ppm) e $C_{32}H_{48}NO_4^+$ 510,3604 (Δ -0,39 ppm), respectivamente. Estes dados corroboram a proposta de síntese do éster de Mosher.

Figura 69 – EM-IES-(+) dos produtos (**5** (t_R 6,75 min) e **28** (t_R 8,78 min)) observados na fração IMC4-F₆₇₋₆₉ (Figura 67).

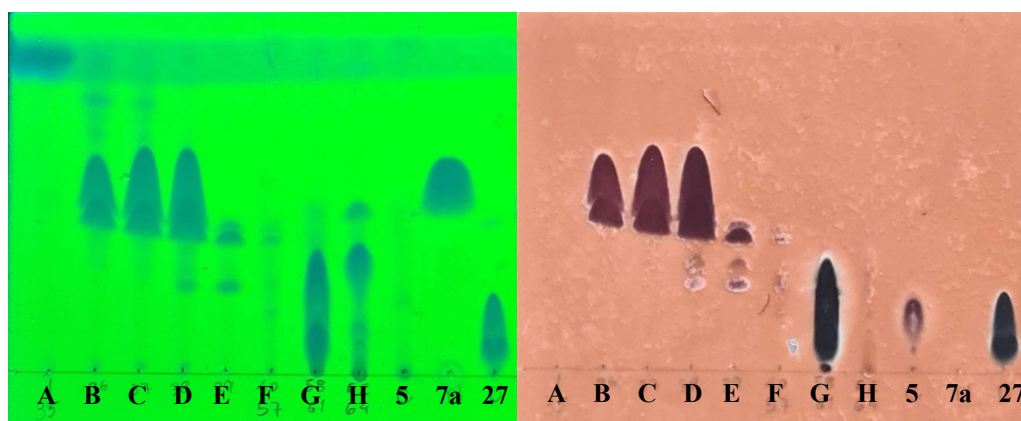


Fonte: a autora.

A reação foi repetida utilizando a mistura racêmica do naproxeno (**7a** e **7b**) com o cloridrato da cassina (**24**). Foi mantida por 8 h, finalizada com a adição de 30,0 mL de $Na_2CO_{3(aq)}$, e submetida a extração líquido-líquido com CH_2Cl_2 ($5 \times 25,0$ mL). O produto obtido (168,5 mg) foi submetido à CC (IMC5), utilizando como fase estacionaria sílica *flash* (15 g, $26,0 \times 1,5$ cm d.i) e como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com hexano: CH_2Cl_2 : NH_4OH (10:0:0,5) e finalizou com CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (0:10:0,5). As

frações coletadas (65) foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f (Figura 70), resultando nas frações IMC5-F₁₋₃₅ (5,0 mg), IMC5-F₃₆₋₃₉ (87,3 mg), IMC5-F₄₀₋₅₇ (4,2 mg), IMC5-F₅₈₋₆₁ (30,0 mg), e IMC5-F₆₂₋₆₅ (34,0 mg). As frações que apresentaram resultado positivo, tanto para luz UV 254 quanto para IClPt, indicam a presença dos ésteres e foram analisados por CLAE-EM-IES-(+) (Figura 71).

Figura 70 – CCD das frações IMC5-F₁₋₃₅, IMC5-F₃₆₋₃₉, IMC5-F₄₀₋₅₇, IMC5-F₅₈₋₆₁, e IMC5-F₆₂₋₆₅ e controles (5, 7a, e 27).

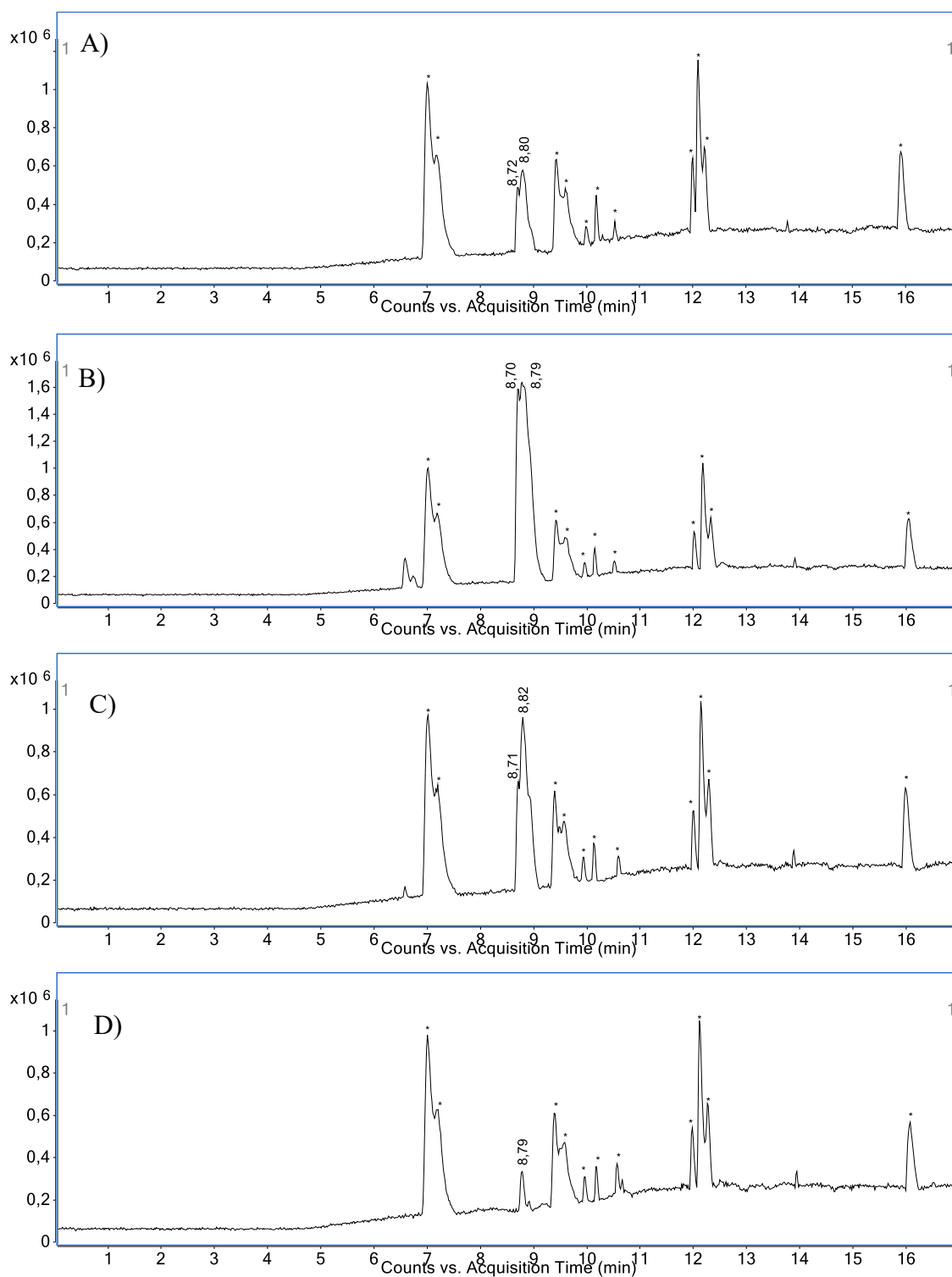


Nota: A: IMC5-F₁₋₃₅; B: IMC5-F₃₆; C: IMC5-F₃₇; D: IMC5-F₃₈; E: IMC5-F₃₉; F: IMC5-F₄₀₋₅₇; G: IMC5-F₅₈₋₆₁; H: IMC5-F₆₂₋₆₅.

Condições: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (8,5:1,5:0,25) e revelador: câmara com luz UV 254 nm e IClPt, respectivamente.

Fonte: a autora.

Figura 71 – CLAE-EM-IES-(+) das frações IMC5-F₃₆ (A), IMC5-F₃₇ (B), IMC5-F₃₈ (C) e IMC5-F₃₉ (D).



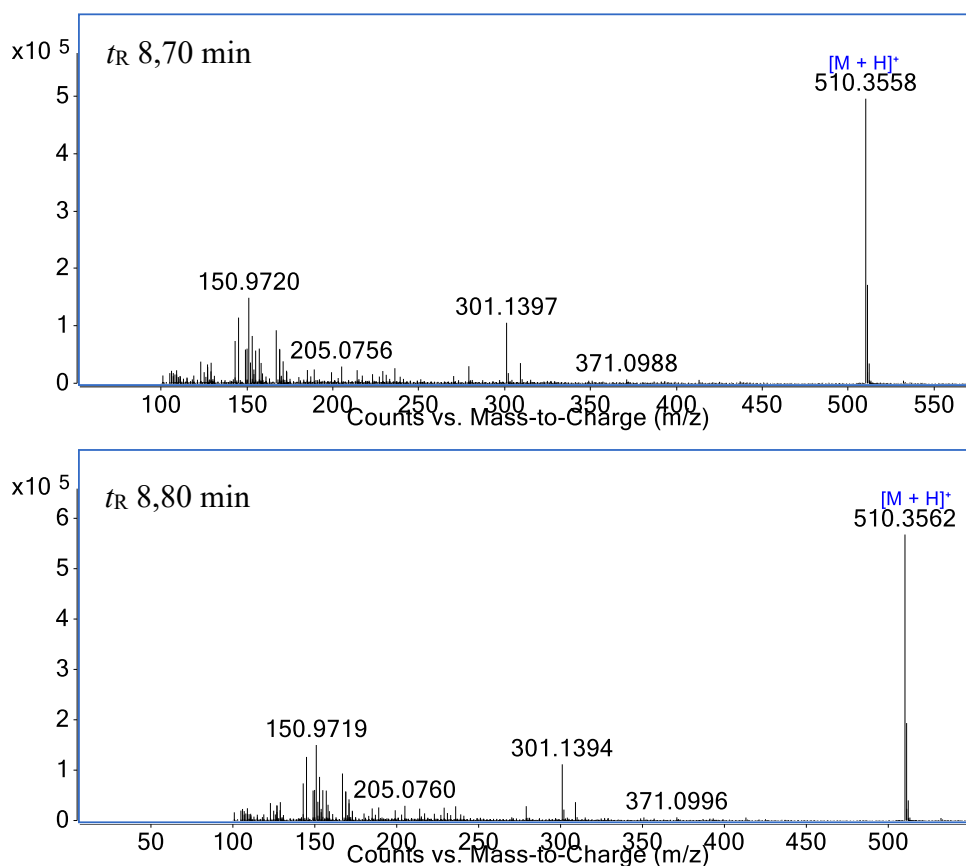
Condições: Coluna Agilent® Poroshell C18 (100 mm × 3 mm × 2,7 μ m), gradiente (17 min), 10–98% de MeOH–HOAc 0,1% (0–10 min) e em seguida 98–100% de MeOH–HOAc 0,1% (10–17 min); C = 1,0 μ g.mL⁻¹, V_{inj.} = 1,0 μ L, fluxo = 1,0 mL.min⁻¹.

Nota: Os picos marcados com asteriscos (*) representam contaminantes presentes do solvente.

Fonte: a autora.

Os sinais (t_R 8,70 e 8,80 min) observados nos cromatogramas (Figura 71), apresentaram EM-IES-(+) em alta resolução (Figura 72), compatíveis com as moléculas protonadas $[M + H]^+$ de **30** (m/z 510,3606) e **32** (m/z 510,3606), calculadas para $C_{32}H_{48}NO_4^+$ 510,3558 (Δ -9,4 ppm) e $C_{32}H_{48}NO_4^+$ 510,3562 (Δ -8,6 ppm), respectivamente. Estes dados evidenciam a formação dos ésteres de Mosher (NPX-cassina).

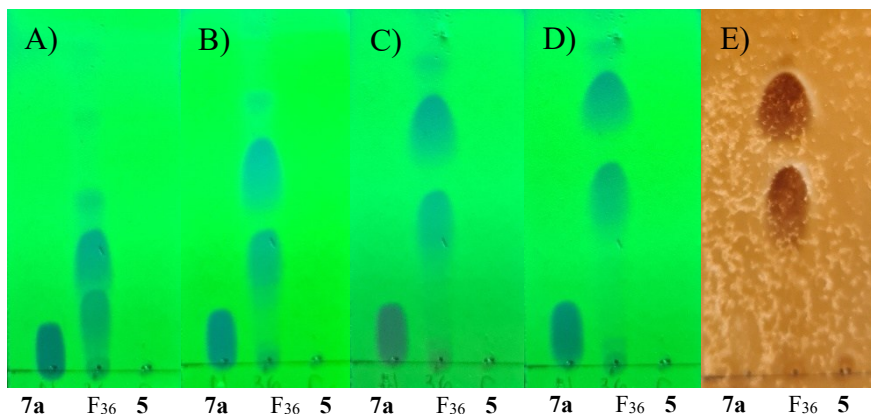
Figura 72 – EM-IES-(+) dos produtos com t_R 8,70 e 8,80 min, observados nas frações IMC5-F₃₆, F₃₇, F₃₈ e F₃₉ (Figura 70).



Fonte: a autora.

A fração IMC5-F₃₆ contendo os ésteres foi analisada por CCD (Figura 73), onde foi otimizado um sistema de solventes (hexano:AcOEt:NH₄OH (6:4:0,3)) que pudesse separar os diastereômeros ((*S*)-NPX-cassina e (*R*)-NPX-cassina). Posteriormente parte da amostra (4,2 mg) foi submetida a CCD preparativa, que foi desenvolvida duas vezes com o sistema de solventes previamente desenvolvido que consistiu em hexano:AcOEt:NH₄OH (6,0:4,0:0,3) (Figura 74). A visualização das manchas foi feita utilizando câmara com luz UV 254 nm.

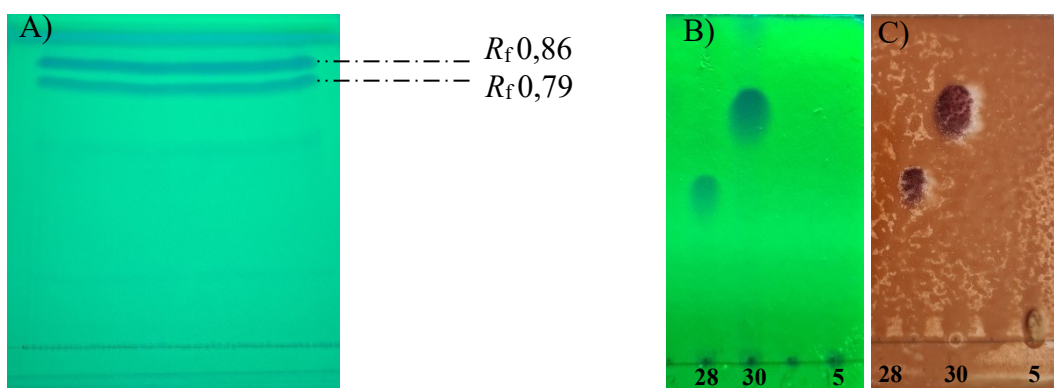
Figura 73 – CCD da fração IMC5-F₃₆ e controles (**7a** e **5**); desenvolvimento da CCD 1 vez (A), 2 vezes (B), 3 vezes (C), 4 vezes (D e E).



Condições: FE: sílica, FM: hexano:acetato de etila:NH₄OH (6:4:0,3) e revelador: câmara com luz UV 254 nm (A, B, C e D) e ICIPT (E).

Fonte: a autora.

Figura 74 – CCDP da fração IMC5-F₃₆ (A) e CCD das frações coletadas (B e C).



Condições: FE: sílica, FM: hexano:AcOEt:NH₄OH (6:4:0,3) e revelador: câmara com luz UV 254 nm (A e B) e ICIPT (C).

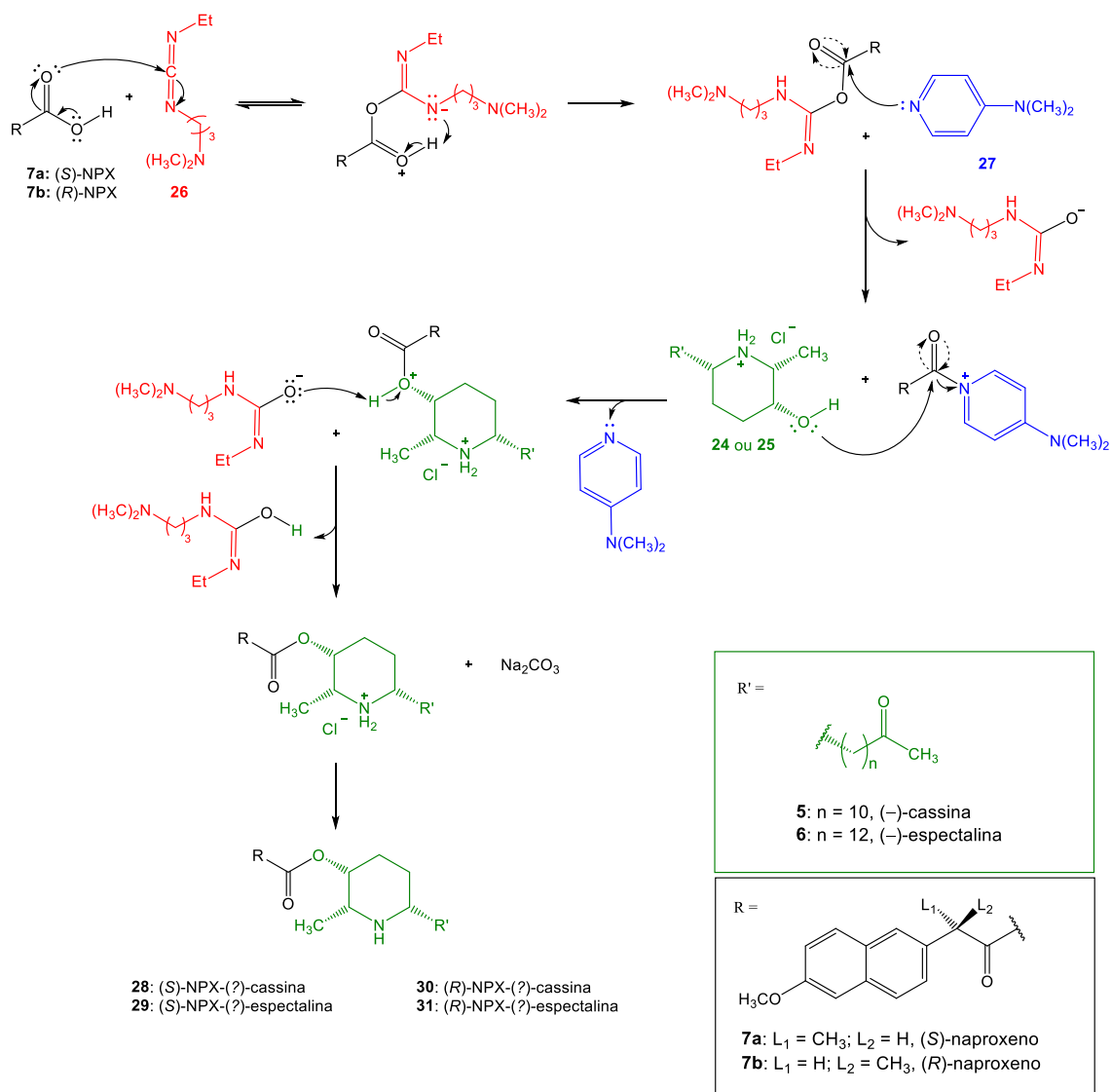
Fonte: a autora.

As informações obtidas corroboram para a formação e separação dos diastereoisômeros **28** e **30**, sendo possível aplicar os ésteres à análises de RMN ¹H com o intuito de determinar a estereoquímica absoluta do C-3 do anel piperidínico e a partir de dados de estereoquímica relativa, obtidos a partir das contantes de acoplamento e experimento de NOESY, estabelecer a estereoquímica absoluta dos demais centros estereogênicos (C-4 e C-2).

5.5.2 Proposta de mecanismo para a síntese dos ésteres de Mosher

O mecanismo proposto para a reação tem início com o ataque nucleofílico do oxigênio da carbonila do ácido carboxílico do respectivo NPX(**7a/7b**) no carbono eletrofílico do EDC (**26**), que atua como um agente de acoplamento (Figura 75). Na sequência, há uma transferência de hidrogênio intramolecular, seguida do ataque nucleofílico do DMAP (**27**) sobre a carbonila do éster intermediário, tornando o RDQ um eletrófilo mais potente. Em seguida, os grupos hidroxila de **24** e **25** atuam como nucleófilos atacando a carbonila do eletrófilo e liberando o catalisador (**26**), por ser um bom grupo abandonador. Nesse ponto, já é possível observar a formação do éster de Mosher, porém protonado. Na sequência, reações de equilíbrio ácido-base desprotonam a espécie levando a obtenção dos ésteres (*S*)-NPX-(?)-cassina (**28**), **29**, **30** e **31** (Figura 75).

Figura 75 – Proposta de mecanismo para obtenção dos ésteres de Mosher **28**, **29**, **30** e **31**.



Fonte: A autora

5.6 Estudo computacional dinâmica molecular

Com objetivo de compreender as conformações de menor energia dos ésteres de Mosher formados, foram realizados cálculos computacionais envolvendo dinâmica molecular de DMBO. Tal estudo se faz necessário, visto que, a determinação da stereoquímica baseada em análises de RMN, são dependentes da conformação adquirida pelo produto derivado. Em primeira instancia, foi avaliado o equilíbrio barco-cadeira do ciclohexano, bem como o equilíbrio equatorial-axial dos substituintes do anel, visto que com a adição do **7** poderia ter acarretado mudanças na estabilidade da molécula. De acordo com os parâmetros de Cremer e Pople modificado, a somatória de ângulo diedrais internos do anel piperidínico, deve ser

próximo a 0°, o que indicará que o equilíbrio do ciclohexano está deslocado para a conformação cadeira. Sabendo que o solvente altera a estabilidade da molécula foi realizado as análises em clorofórmio, vácuo e metanol, obtendo valores de ângulo interno entre 0,034-0,045°, indicando a permanência do anel em sua conformação cadeira.

De maneira semelhante, foram realizados cálculos para avaliar a posição axial/equatorial dos substituintes do anel piperidínico. Os valores dos ângulos diedros (Ω , β e λ) (Figura 76), que estiverem próximos à 60° indicam que o substituinte está na posição axial, valores próximos à 180° indicam que o substituinte está na posição equatorial. Essa análise foi realizada com os dois confôrmeros possíveis (Figura 76) para estabelecer as posições relativas do CH₃ (C-2), ONPX (C-3) e cadeia alifática (R) (C-6), mantendo a estereoquímica, como a apresentada pela literatura, na qual todos os substituintes estão *cis*. Para isso, a molécula foi desenhada nos ângulos (iniciais) condizentes com o confôrmero “A” (Figura 76A), e em seguida, submetida à otimização de energia pelo programa xTB. Ao final da análise, foi possível avaliar os ângulos (final) de maior estabilidade do confôrmero “A” (Tabela 6). A metodologia foi repetida para o confôrmero “B” (Figura 76B).

Tabela 6 – Valores obtidos nos cálculos computacionais em estudos relativos ao equilíbrio equatorial e axial dos substituintes dos ésteres de Mosher obtidos.

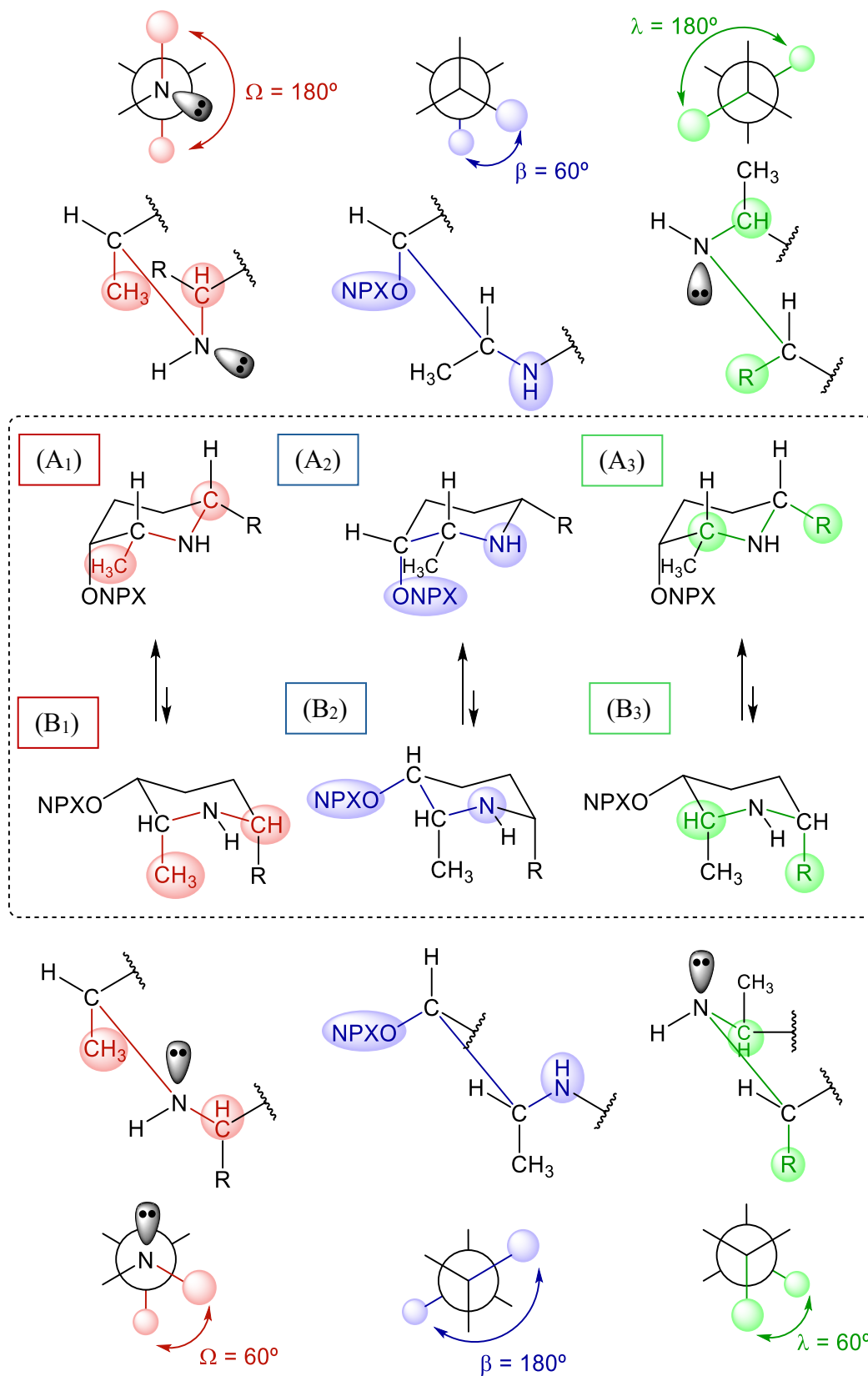
Substituintes	Confôrmero “A”		Confôrmero “B”	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Ω (CH ₃)	172,8° (A ₁)	-177,93°	52,9° (B ₁)	100,47°
β (ONPX)	52,9° (A ₂)	65,27°	172,8° (B ₂)	163,15°
λ (R = cadeia alifática)	172,8° (A ₃)	179,24°	52,9 (B ₃)	-102,70°

Observações: Em todas as análises foi obtido um desvio padrão < 0,98°.

Nota: A1, A2, A3, B1, B2 e B3 (Figura 76).

Fonte: a autora.

Figura 76 – Ângulos diedros responsáveis pelas conformações axiais-equatoriais do conformêro “A” (A) e do conformêro “B” (B).



Fonte: a autora.

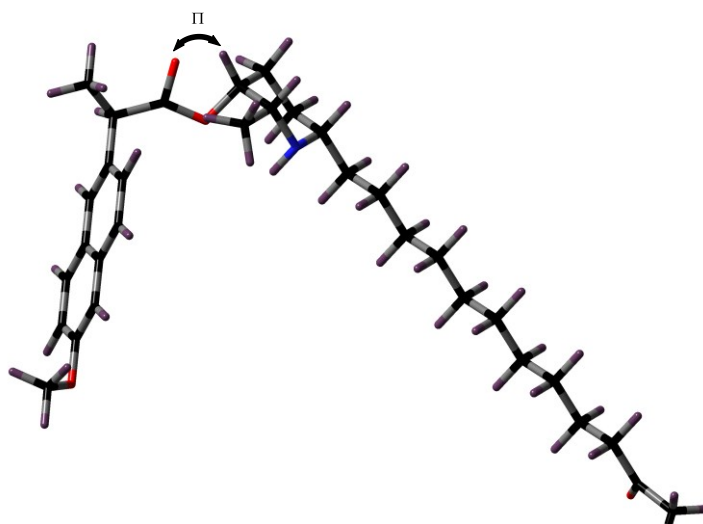
Como resultado, foi possível observar que a cadeia alifática e a metila se mantiveram na posição equatorial (Figura 76A). O substituinte ONPX foi mantido em axial, concluindo que a esterificação, conexão do NPX em **5** não gerou diferença significativa na conformação do anel piperidínico do composto original. Outra informação relevante pode ser obtida através dos cálculos, indicando que mesmo que a cadeia alifática e metila estivessem na posição axial como primeira posição, a conformação não se mantém estável e migra para ângulos maiores, próximos da conformação equatorial. Em concordância, também foram obtidas as energias totais de cada conformero, obtendo um resultado de energia livre de Gibbs (ΔG) de $-291,74 \times 10^3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ para a conformação “A”, com um $\Delta\Delta G = 40 \text{ kJ.mol}^{-1}$ em relação ao conformero “B”, indicando que A é o conformero mais estável. Através dos cálculos da constante de equilíbrio (k) foi possível concluir que a conformação “A” é 2,72 vezes mais estável que a conformação “B”, sendo os cálculos realizados com base na fórmula:

$$\Delta\Delta G^{\text{equatorial,axial}} = RT \times \ln k$$

Nota: $\Delta\Delta G^{\text{equatorial, axial}}$ = diferença das energias livre de Gibbs entre equatorial e axial; T = temperatura (K); R = constante universal dos gases perfeitos ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

O próximo estudo teórico foi realizado objetivando determinar o valor do ângulo diedro entre o oxigênio da carbonila do éster e o hidrogênio do *C-3 do alcaloide, nomeado como Π (Figura 77). A análise demonstrou um ângulo de $\Pi = 18,03^\circ \pm 0,86$ para o éster formado a partir do **7a** e $13,28^\circ \pm 0,85$ para o éster formado a partir do **7b**, estando de acordo com a literatura visto que o reportado é $\Pi \approx 0^\circ$ (Seco *et al.*, 2015).

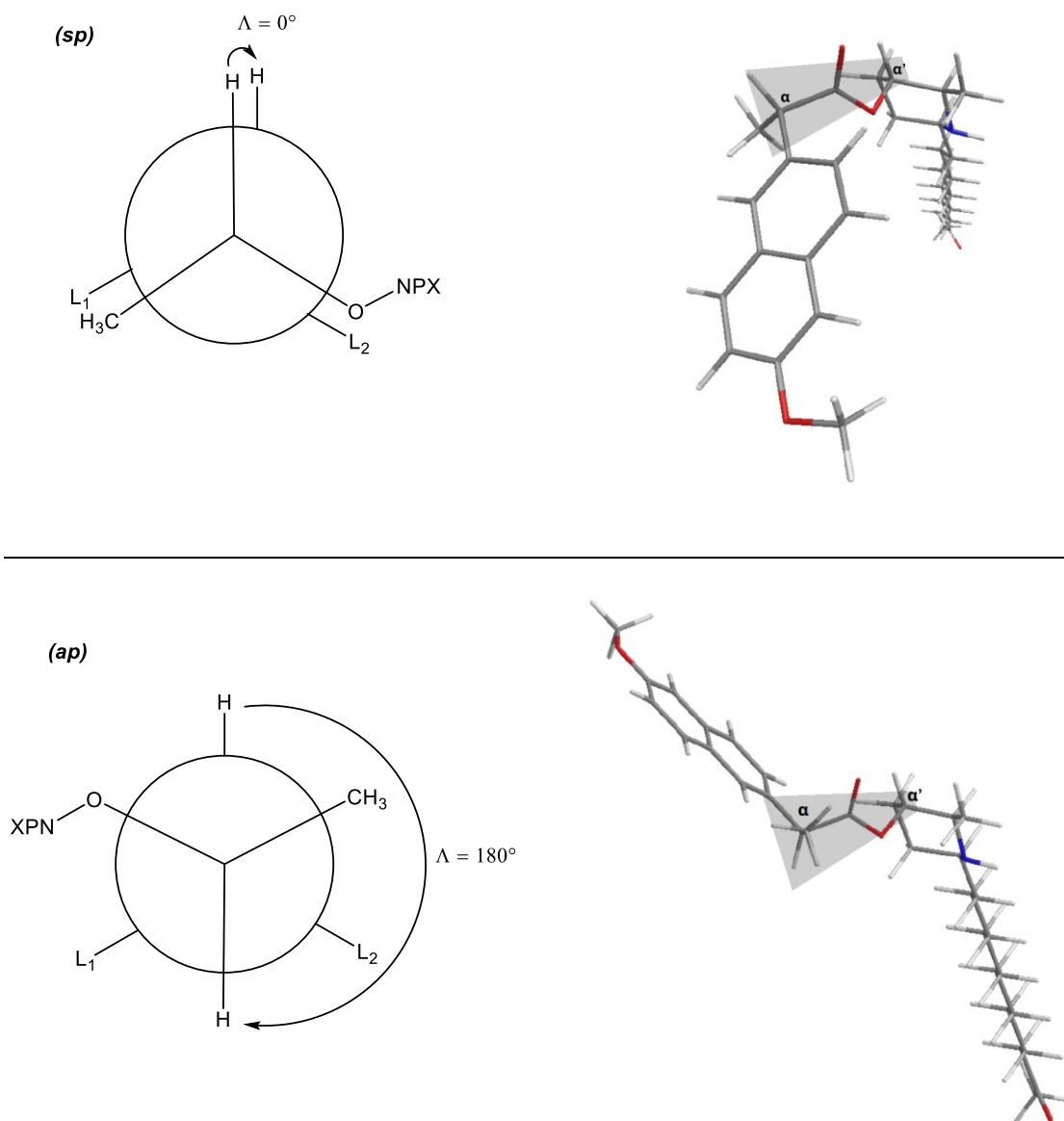
Figura 77 – Representação tridimensional do ângulo diedro entre o oxigênio da carbonila do éster e o hidrogênio do *C-3 do alcaloide.



Fonte: a autora.

De forma semelhante, foram realizados estudos para determinar o valor do ângulo Λ (Figura 78), sendo necessário um valor próximo de 0° , resultando em uma conformação sinperiplanar (*sp*), ou um valor próximo à 180° para uma conformação antiperiplanar (*ap*).

Figura 78 – Representação tridimensional e na projeção de Newman, do ângulo diedro entre o hidrogênio do *C do naproxeno (α) e do hidrogênio do *C-3 do alcaloide (α').



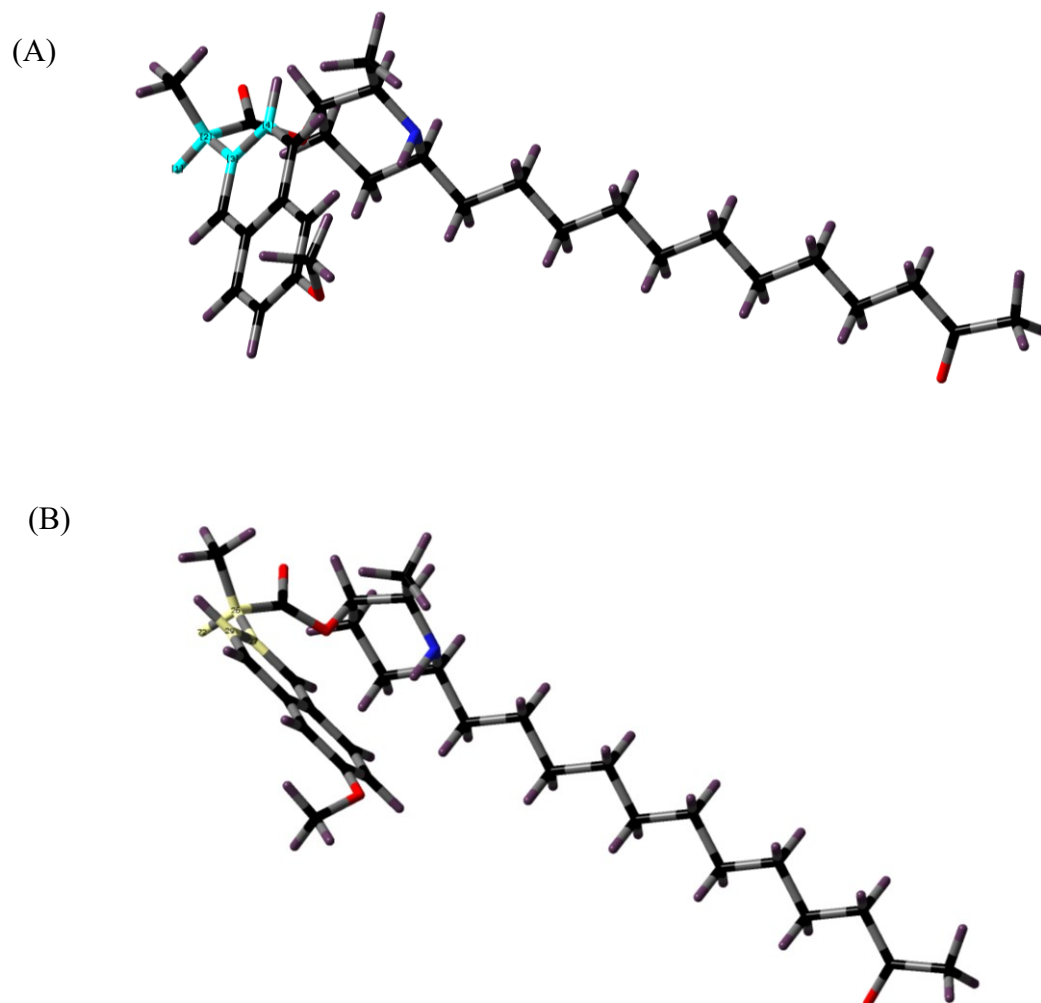
Fonte: a autora.

Como resultado, foi visualizado que o confôrmero de menor energia, sendo o de maior abundância e mais estável é o (ap), estando em concordância com os dados reportados na literatura por Błaŝewska *et al.* em 2007.

Por fim, foi avaliada a posição dos anéis aromáticos em relação ao anel piperidínico. Tal análise se faz necessária para determinar se os efeitos de anisotropia magnética do grupo naftil são de proteção (Figura 79A) ou desproteção (Figura 79B), provenientes do campo magnético formado pelo fluxo de elétrons aromáticos que dependendo da posição podem gerar uma interação construtiva ou destrutiva com o campo magnético externo da análise de RMN.

Para a determinação, foi utilizado o valor médio dos ângulos diedros marcados, sendo o efeito de proteção gerado pelos ângulos próximos à $\pm 180^\circ$ ou 0° , e os efeitos de desproteção gerados pelos ângulos próximos à $\pm 90^\circ$.

Figura 79 – Representação tridimensional do éster, demonstrando a posição teórica do grupo naftil gerando (A) proteção e (B) desproteção dos ligantes do anel piperidínico.



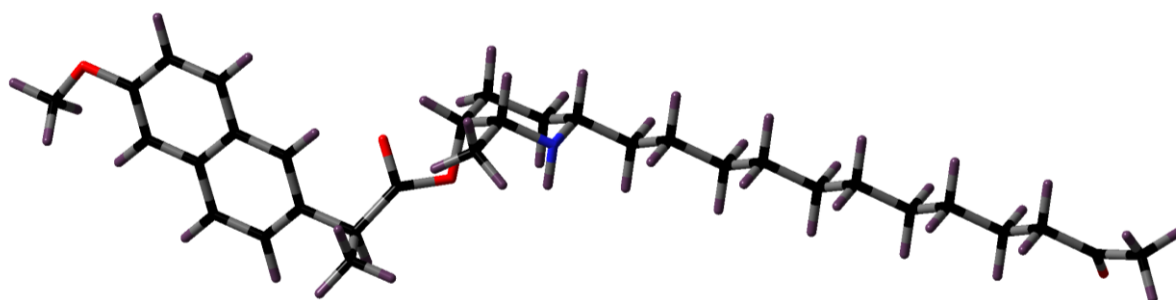
Fonte: a autora.

Os resultados mostraram que o estado de menor energia da molécula em relação a posição do grupo naftil é mais próximo à Figura 76A, com ângulos calculados de $24,59^\circ \pm 0,89$ para o éster formado a partir do **7a** e $-176,35 \pm 0,90$ para o éster formado a partir do **7b**.

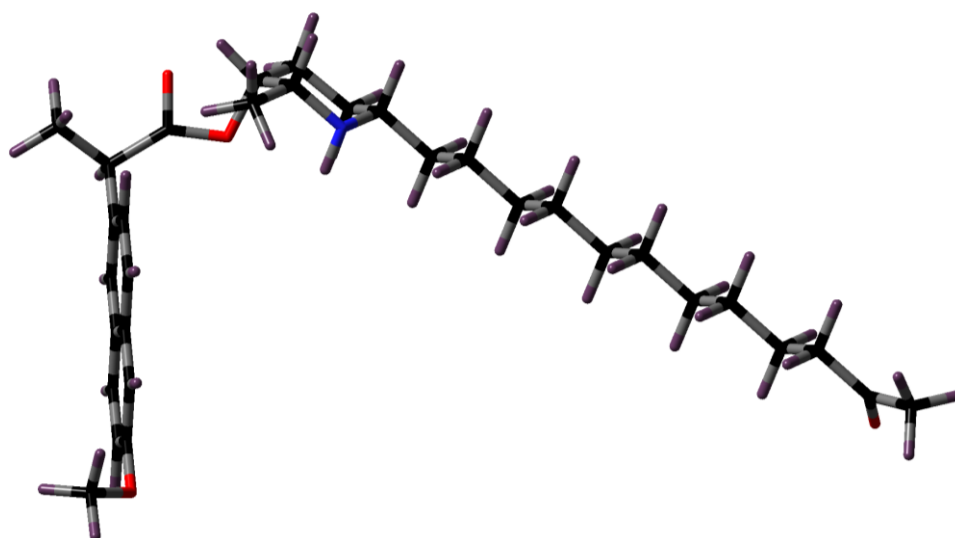
Os estudos computacionais realizados permitiram determinar a conformação teórica de menor energia para o éster (*S*)-naproxeno-cassina (**28**) (Figura 81A) e para o éster (*R*)-naproxeno-cassina (**30**) (Figura 81B).

Figura 81 – Representação tridimensional dos ésteres **28** (A) e **30** (B).

(A)



(B)



Fonte: a autora.

6. CONCLUSÃO

Os homólogos (–)-cassina (**5**) e (–)-espectralina (**6a**), metabólitos especiais majoritários de *Senna spectabilis*, são alcaloides piperidínicos quirais de comprovada atividade biológica. Para isolamento de **5** e **6**, houve a necessidade do uso de CLAE-ELSD, devido a pequena diferença estrutural de duas unidades de CH₂ e a ausência de grupos cromóforos nas moléculas.

A extração do (+)-(*S*)-NPX (**7a**) a partir de fármacos comercialmente vendidos, se mostrou uma alternativa economicamente viável para obtenção de um RDQ enantioméricamente puro, tendo benefícios quando comparados com RDQ's convencionais. A técnica CLAE-EM-IES-(+), com o uso de colunas quirais, se mostrou importante para demonstrar a eficácia racemização do **7a**, sendo a obtenção do **7b** realizada através da racemização em meio ácido.

A obtenção dos ésteres de Mosher, baseando na reação de esterificação de Steglich, se mostrou eficiente, sendo possível obter os ésteres isolados com técnicas simples como CC e CCDP. As frações enriquecidas com os ésteres foram identificadas por CCD, tendo as manchas na cromatoplaça indicadas por ICIPt, revelador específico para alcaloides e por detectores UV-VIS, pela presença do grupo naftil na estrutura.

Os cálculos teóricos realizados por meio de DMBO, na determinação das conformações dos ésteres de interesse, se demonstraram eficientes, demonstrando a permanência da cadeia lateral alifática em equatorial, bem como o efeito de proteção do grupo naftil do naproxeno e a conformação mais estável em *ap*. Com a obtenção dos ésteres e os estudos realizados quanto estabilidade conformacional, é ressaltado a viabilidade da metodologia desenvolvida, sendo possível determinar a estereoquímica absoluta e relativa dos alcaloides **5** e **6a**, por análises de RMN, utilizando a técnica da dupla derivatização quiral, aplicando como RDQ, o **7a**.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678–689, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2006000500015>.
- ALMEIDA, J. R.; RESENDE, L. M.; WATANABE, R. K.; CARREGARI, V. C.; HUANCHUIRE-VEGA, S.; CALDEIRA, C. A. S.; COUTINHO-NETO, A.; SOARES, A. M.; VALE, N.; GOMES, P. A. C. Snake venom peptides and low mass proteins: molecular tools and therapeutic agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 30, p. 3254–3282, 2017. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666161028155611>.
- ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C. Chemistry of natural products: plants that witness histories. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1117–1153, 2017.
<http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170068>.
- ARMAREGO, W. L.; CHAI, C. L. L. **Purification of Laboratory Chemicals**, 7. ed. Uberlandia: Butterworth-Heinemann, 2013. 1024 p. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64000-9>.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000300012>.
- BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 647–656, 1997.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421997000600014>.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Utilização de RMN de ¹H na determinação da configuração absoluta de álcoois. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1061–1065, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000600022>.
- BATISTA, A.; ANGRISANI, B.; LIMA, M. E.; SILVA, S.; SCHETTINI, V.; CHAGAS, H.; SANTOS JUNIOR, F.; BATISTA JUNIOR, J.; VALVERDE, A. Absolute configuration reassignment of natural products: an overview of the last decade. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 8, p. 1499–1518, 2021.
<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210079>.
- BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTT, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>.
- BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; MASCI, V. L.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838>.
- BESSA, N.G.F.De; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U; QUIRINO, M.S; CHAGAS JUNIOR, A. F. Prospeção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso

popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 41, p. 692–707, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722013000500010>.

BIĄŃEWSKA, K.; PANETH, P.; GAJDA, T. The assignment of the absolute configuration of diethyl hydroxy- and aminophosphonates by ^1H and ^{31}P NMR using raproxen as a reliable chiral derivatizing agent. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 878–887, 2007. <http://dx.doi.org/10.1021/jo062097z>.

CARVALHO, P. E. R. **Cássia-do-Nordeste: *Senna spectabilis* var. *excelsa***. Brasília, Df: Embrapa Florestas, 2010. 4 v.

CASTRO, A. T.; CASTRO, A. P.; SILVA, M. S.; SOUZA, I. M. M.; MARTINS-SOUZA, R. L.; CHAGAS-PAULA, D. A.; COELHO, L. F. L.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; VIEGAS, C. In vitro evaluation of the schistosomicidal effect of the extracts, fractions and major 3-hydroxy-2,6-dialkyl-substituted piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 17, p. 4197–4204, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.058>.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421998000100015>.

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. Spectaline and iso-6-carnavaline, two unprecedented piperidin alkaloids from seeds of *Cassia spectabilis*. **Tetrahedron**, v. 30, p. 3005–3006, 1977b. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(77\)88038-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)88038-1).

COELHO, F. A. S. Fármacos e quiralidade. **Química Nova na Escola**, v. 6, n. 3, p. 23–32, 2001.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica: curso básico universitário**. Ribeirão Preto: USP, 2005.

DALE, J. A.; DULL, D. L.; MOSHER, H. S. α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 2543–2549, 1969. <http://dx.doi.org/10.1021/jo01261a013>.

DANUELLO, A.; ROMEIRO, N. C.; GIESEL, G. M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JUNIOR, 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, n. 1, p. 163–170, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532012000100023>.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**: a biosynthetic approach. 3. ed. Nottingham: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. 546 p. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>.

EASSON, L. H.; STEDMAN, E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. **Biochemical Journal**, v. 27, n. 4, p. 1257–1266, 1933. <http://dx.doi.org/10.1042/bj0271257>.

EBBERS, E. J. **Racemization and asymmetric transformation of α -substituted carboxylic acids**. Ph.D. Tese, Universidade de Nijmegen, 1997. Seção 5.1.

FOLOPPE, N.; MACKERELL, A. D. Conformational properties of the deoxyribose and ribose moieties of nucleic acids: a quantum mechanical study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 34, p. 6669–6678, 1998. <http://dx.doi.org/10.1021/jp9818683>.

FRANCA, M. G. A.; PESSOA, C. O.; TREVISAN, M. T. S.; PAIVA, C. F.; LIMA, D. R.; SOUSA, A. F.; OLIVEIRA, F. C. E.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, M. G. V. Chemical composition, in vitro cytotoxic and anticholinesterase activities of flower extracts of *Senna spectabilis* var. *excelsa* and *Senna macranthera*. **Natural Product Research**, v. 36, n. 18, p. 4729–4733, 2021. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2021.2005052>.

FREITAS, L. C. G.; OLIVEIRA, G. S. (org.). **Aplicações de química teórica no estudo de materiais**: métodos in silico para nanomateriais. São Paulo: Edufscar, 2018. 244 p. DOI: [10.7476/9786580216123](https://doi.org/10.7476/9786580216123).

FREITAS, T. R. **Estudo da estereoquímica dos alcaloides piperidínicos de *Senna spectabilis* (fabaceae) e suas implicações na atividade anticolinesterásica**. 2022. 162 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

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 Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 15, p. 1303–1310, 2018. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.8172>.

FREITAS, T. R.; NOVAIS, R. M.; SANTOS, I. A.; MARTINS, D. O. S.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; JARDIM, A. C. G.; PIVATTO, M. In vitro antiviral activity of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* flowers on Chikungunya virus infection. **Pharmacological Reports**, v. 74, n. 4, p. 752–758, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s43440-022-00381-0>.

GALLO, K.; KEMMLER, E.; GOEDE, A.; BECKER, F.; DUNKEL, M.; PREISSNER, R.; BANERJEE, P. SuperNatural 3.0—a database of natural products and natural product-based derivatives. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 1, p. 654–659, 2022. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkac1008>.

GAYNES, R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, 2017. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200026>.

GUO, R.; WANG, T.; ZHOU, G.; XU, M.; YU, X.; ZHANG, X.; SUI, F.; LI, C.; TANG, L.; WANG, Z. Botany, phytochemistry, pharmacology and toxicity of *Strychnos nux-vomica* L.: a review. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 46, n. 1, p. 1–23, 2018. <http://dx.doi.org/10.1142/s0192415x18500015>.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.003>.

HAMIDI, S.; JOUYBAN, A. Pre-concentration approaches combined with capillary electrophoresis in bioanalysis of chiral cardiovascular drugs. **Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 229–243, 2015. <http://dx.doi.org/10.15171/ps.2015.42>.

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>.

HOFFMAN, R. S.; HOWLAND, M. A.; LEWIN, N. A.; NELSON, L. S.; GOLDFRANK, L. R. **Goldfrank's Toxicologic Emergencies**. McGraw Hill Professional, 2014. 1904 p.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ, J.; RAICH, L.; ARDÈVOL, A.; ROVIRA, C. The complete conformational free energy landscape of β -xylose reveals a two-fold catalytic itinerary for β -xylanases. **Chemical Science**, v. 6, n. 2, p. 1167–1177, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4SC02240H>.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

Jl, H.; LI, X.; ZHANG, H. **Natural products and drug discovery**. Embo Reports, v. 10, n. 3, p. 194–200, 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2009.12>.

JOTHY, S. L.; TOREY, A.; DARAH, I.; CHOONG, Y. S.; SARAVANAN, D.; CHEN, Y.; LATHA, L. Y.; DEIVANAI, S.; SASIDHARAN, S. *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn: a promising traditional herb in health improvement. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10292–10305, 2012. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules170910292>.

KOWALCZYK, A.; LIPIŃSKI, P. F.J.; KAROŃ, K.; RODE, J. E.; LYCZKO, K.; DOBROWOLSKI, J. C.; DONTEN, M.; KACZOREK, D.; POSZYTEK, J.; KAWĘCKI, R. Enantioselective sensing of (*S*)-thalidomide in blood plasma with a chiral naphthalene diimide derivative. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 167, p. e112446, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2020.112446>.

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. Isolation, leishmanicidal evaluation and molecular docking simulations of

piperidine alkaloids from *Senna spectabilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5816–5823, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.032>.

LEE, J.; CHOI, J. Y.; PARK, C. H. Characteristics of polymers enabling nano-comminution of water-insoluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1–2, p. 328–336, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.12.032>.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657–663, 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421997000600015>.

LINZE, Z.; SHAOJING, L.; SHAOYUE, H.; GUANRONG, L. Resolution and racemization of naproxen. **Chinese Journal of Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 1–2, 1985.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. 2a ed. Instituto Plantarum, 1998, v. 1, 385 p.

MA, R.; QU, H.; WANG, B.; WANG, F.; YU, Y.; YU, G. Simultaneous enantiomeric analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment by chiral LC-MS/MS: a pilot study in beijing, china. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 174, p. 83–91, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.122>.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000300016>.

MAHLIN, D.; PONNAMBALAM, S.; HÖCKERFELT, M. H.; BERGSTRÖM, C. A. S. Toward in silico prediction of glass-forming ability from molecular structure alone: a screening tool in early drug development. **Molecular Pharmaceutics**, Uppsala, v. 8, n. 2, p. 498–506, 2011. <http://dx.doi.org/10.1021/mp100339c>.

MARQUES, N. B.G.; JACOB, R. G.; PERIN, G.; LENARDÃO, E. J.; ALVES, D.; SILVA, M. S. NMR chiral discrimination of chalcogen containing secondary alcohols. **Chirality**: (NEW YORK, N.Y. PRINT), New York, v. 31, n. 1, p. 1–86, 2019. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/chir.23030>.

MELO, G. M. A.; SILVA, M. C. R.; GUIMARÃES, T. P.; PINHEIRO, K. M.; MATTA, C. B. B.; QUEIROZ, A. C.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 277–281, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.024>.

Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf.

MOMOSE, T.; TOYOOKA, N. Asymmetric synthesis of the alkaloid 2,6-disubstituted piperidin-3-ols, (–)-cassine and (+)-spectaline. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 36, p. 5785–5786, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)73860-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)73860-3).

MOROZOV, A. M.; SERGEEV, A. N.; ZHUKOV, S. V.; VARPETYAN, A. M.; RYZHOVA, T. S.; MURAVLYANTSEVA, M. M.; JAFAROV, V. T. Historical aspects of aseptics and antiseptics. **Bulletin of The Medical Institute**, n. 6, p. 94–103, 2021. <http://dx.doi.org/10.20340/vmi-rvz.2021.5.hlthcr.2>.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 17, n. 7, p. 522–524, 1978. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.197805221>.

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. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

NKANTCHOUA, G. C. N.; NJAPDOUNKE, J. S. K.; FIFEN, J. J.; SOTOINGTAIWE, G.; OJONG, L. J.; KANDEDA, A. K.; BUM, E. N. Anticonvulsant effects of *Senna spectabilis* on seizures induced by chemicals and maximal electroshock. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 18–28, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.042>.

OLADEJI, O. S.; ADELOWO, F. E.; OLUYORI, A. P. The genus *Senna* (Fabaceae): a review on its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **South African Journal of Botany**, v. 138, p. 1–32, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2020.11.017>.

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1971–1974, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000700048>.

OMS. World Health Organization model list of essential medicines– 23rd List: The selection and use of essential medicines 2023. Geneva: World Health Organization, 2023. 67p. (OMS/MHP/HPS/EML/2023.02). <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2023.02>.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; K., G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**, Cap. 3, p. 101–168, 2010.

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

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JUNIOR, 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. 6, p. 1431–1438, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532005000800023>.

PIVATTO, M.; BACCINI, L. R.; SHARMA, A.; NAKABASHI, M.; DANUELLO, A.; VIEGAS JUNIOR, C.; GARCIA, C. R. S.; BOLZANI, V. S. Antimalarial activity of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* and semisynthetic derivatives. **Journal of the**

Brazilian Chemical Society, v. 25, n. 10, p. 1900–1906, 2014.
<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140195>.

RANA, N. K.; SINGH, V. K. Enantioselective enolate protonation in sulfa–michael addition to α -substituted n-acryloyloxazolidin-2-ones with bifunctional organocatalyst. **Organic Letters**, Kanpur, v. 13, n. 24, p. 6520–6523, 2011. <http://dx.doi.org/10.1021/ol202808n>.

REICHEL, C.; BRUGGER, R.; BANG, H.; GEISLINGER, G.; BRUNE, K. Molecular Cloning and expression of a 2-Arylpropionyl-Coenzyme A epimerase: a key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. **Molecular Pharmacology**, v. 51, n. 4, p. 576–582, 1997. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.51.4.576>.

RICE JUNIOR, W. Y.; COKE, J. L. Structure and Configuration of Alkaloids.: ii. cassine. **Journal Of Chemistry**, v. 31, p. 1010–1012, 1966.
<https://doi.org/10.1021/jo01342a005>.

RÖMER, F.; KRASKA, T. Molecular dynamics simulation of the formation of pharmaceutical particles by rapid expansion of a supercritical solution. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 2, p. 769–777, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2010.08.010>.

ROMERO, A. L.; BAPTISTELLA, L. H. B.; COELHO, F.; IMAMURA, P. M. Resolução do ibuprofeno: um projeto para disciplina de química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1680–1685, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012000800031>.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. **Natural Product Extraction**: principles and applications. Campinas: RSCpublishing, 2013. 516 p.
<https://doi.org/10.1039/9781849737579>.

SANTOS, M.F.; ARAÚJO NETO, R.B.; NASCIMENTO, M.P.B.C.; LIMA, P.C. Determination of the genetic diversity among accessions of *Senna spectabilis* (canafistula) by using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6149–6155, 2013.
<http://dx.doi.org/10.4238/2013.december.2.12>.

SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. O gênero *Senna* (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 71, p. e01222018, 2020. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071002>.

SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 17–118, 2004. <http://dx.doi.org/10.1021/cr000665j>.

SECO, J. M.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. **The assignment of the absolute configuration by NMR using chiral derivatizing agents**: a practical guide. New York: Oxford University Press, 2015.

SILVA, D. H. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; CASTRO, N. G.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; ROCHA, M. S. Spectaline, cassine and semi-synthetic analogues as potential candidate drugs for the treatment of Alzheimer disease. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38–46, 2010. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20100005>.

SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; CERQUEIRA, G. S.; SABINO, E. B.; ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J.P.; FREITAS, R.M. Iso-6-spectraline effects on convulsions induced in epilepsy models. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 232–236, 2011. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-1483.83772>.

SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; FENG, D.; FREITAS, R. M. de. Evaluation of central nervous system effects of iso-6-cassine isolated from *Senna spectabilis* var. *excelsa* (Schrad) in mice. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 255–259, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.10.007>.

SILVA, M. C. R.; VILELA, A. F. L.; CARDOSO, C. L.; PILLI, R. A. Synthesis and Anticholinesterase Evaluation of *Cassine*, *Spectraline* and Analogues. **Scientia Pharmaceutica**, v. 90, n. 4, p. 63, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/scipharm90040063>.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2005. 550 p.

SINGH, M.; SETHI, S.; BHUSHAN, R. Liquid chromatographic methods for separation, determination, and bioassay of enantiomers of etodolac: a review. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 1, p. 18–30, 2020. <https://doi.org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jssc.201900649>.

SINGH, S. B.; MARTIN, G. E.; MCKITTRICK, B.; CROWTHER, J.; FRAENKEL, H.; LUNN, C.; BAYNE, M.; PERKINS, J. B.; GULLO, V. History and prospects of drug discovery and development collaboration between industry and academia. **Journal of Natural Products**, v. 4, n. 87, p. 1235–1245, 2024. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acs.jnatprod.4c00081>.

SMITH, C. R.; RAJANBABU, T. V. Catalytic asymmetric synthesis using feedstocks: an enantioselective route to 2-arylpropionic acids and 1-arylethyl amines via hydrovinylation of vinyl arenes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 3066–3072, 2009. <http://dx.doi.org/10.1021/jo900198b>.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. 1, Cap. 9, p. 388-461, 2013. VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, v. 105, n. 2, p. 140–156, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.21096>.

SOUSA NETO, L. R. **Utilização de métodos computacionais para descrever a interação da quitosana com contaminantes**. 2022. 139 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2022.

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

VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, v. 105, n. 2, p. 140–156, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.21096>.

VIEGAS JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279–1286, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000600025>.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S.B.; CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C.M.; BARREIRO, E. J. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4184–4190, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.030>.

WALSH, T. D.; KOONTZ, C. S. Determination of the enantiomeric purity of naproxen: an organic chemistry laboratory experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 5, p. 585, 1997. <http://dx.doi.org/10.1021/ed074p585>.

WANAT, M.; ANTHIERENS, S.; BUTLER, C. C.; SAVIC, L.; SAVIC, S.; PAVITT, S. H.; SANDOE, J. A. T.; TONKIN-CRINE, S. Management of penicillin allergy in primary care: a qualitative study with patients and primary care physicians. **Bmc Family Practice**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s12875-021-01465-1>.

WINK, M. Medicinal Plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12771–12791, 2012. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules171112771>.

XU, Y.; ZHANG, G.; FAN, W.; ZHANG, P.; ZHANG, X.; HONG, F. **Method for racemization of α -chiral carboxylic acid**. Procurador: Zhejiang Tianxin Pharmaceutical Co. Ltd. CN n. CN104418683. Depósito: 18 mar. 2015. Concessão: 06 set. 2015.