



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

MARÍLIA FONTES BARBOSA

**ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS E DA BIOSÍNTESE DOS ALCALOIDES
PIPERIDÍNICOS DE *Senna spectabilis***

UBERLÂNDIA

2023

MARÍLIA FONTES BARBOSA

**ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS E DA BIOSÍNTESE DOS ALCALOIDES
PIPERIDÍNICOS DE *Senna spectabilis***

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

Área de concentração Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Amanda
Danuello Pivatto

UBERLÂNDIA

2023

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

B238
2023

Barbosa, Marília Fontes, 1991-
Estudo químico dos frutos e da biossíntese dos
alcaloides piperidínicos de *Senna spectabilis* [recurso
eletrônico] / Marília Fontes Barbosa. - 2023.

Orientadora: Marcos Pivatto.

Coorientadora: Amanda Danuello Pivatto.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.535>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. I. Pivatto, Marcos, 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Defesa de Doutorado Acadêmico, 144, PPGQUI				
Data:	Trinta de agosto de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00 h	Hora de encerramento:	18:30 h
Matrícula do Discente:	11913QMI011				
Nome do Discente:	Marilia Fontes Barbosa				
Título do Trabalho:	"Estudo químico dos frutos e da biossíntese dos alcaloides piperidínicos de Senna spectabilis"				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química de Produtos Naturais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	"Prospecção química de espécies nativas do Cerrado brasileiro visando a descoberta de novos compostos bioativos"				

Reuniu-se, por *webconferência*, link <https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/marcos-pivatto-2>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Raquel Maria Ferreira de Sousa, da Universidade Federal de Uberlândia; João Henrique Ghilardi Lago, da Universidade do ABC; Antônio Eduardo Miller Crotti, da Universidade de São Paulo; Lorena Ramos Freitas de Sousa, da Universidade Federal de Catalão, 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 exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e de 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):

Aprovado.

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

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 30/08/2023, às 18:33, 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 **Antônio Eduardo Miller Crotti, Usuário Externo**, em 30/08/2023, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2023, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joao Henrique Ghilardi Lago, Usuário Externo**, em 30/08/2023, às 18:34, 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 **Lorena Ramos Freitas de Sousa, Usuário Externo**, em 31/08/2023, às 15:32, 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 **4744453** e o código CRC **BD2E9039**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Silvana, pelo incentivo, apoio incondicional e entendimento do processo nas horas que eu não estive presente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, por tornar possível a realização deste trabalho de Doutorado em Química de Produtos Naturais.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto, que numa manhã despretensiosa, me apresentou a Química dos Produtos Naturais e fez com que eu me apaixonasse cada dia mais pela área e pela pesquisa, nesses longos 7 anos. Pela orientação, incentivo, pelas incontáveis trocas de conhecimentos, pela inspiração de ser um bom profissional, pela paciência e sobretudo pela amizade e confiança.

A professora Dra. Amanda Danuello pela coorientação e contribuição permitindo o aprimoramento desse trabalho.

A professora Dra. Adriana Aparecida Lopes, da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), pela experiência e disponibilidade para a realização dos experimentos biossintéticos, parte fundamental na execução desse trabalho.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) pelos ensinamentos ao longo da jornada, pelo convívio e pela amizade.

Ao colega Dr. Mario Machado e a Dra. Arlene Nossol pela amizade e pela realização das análises de espectrometria de massas, realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU.

Aos irmãos científicos do NPCBio, e a todos os meus grandes amigos, pelo convívio, pelas trocas científicas e de vida, deixando a etapa mais leve e agradável.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPEMIG pelo apoio financeiro aos projetos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa, o meu muito obrigado!

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

Marie Curie

RESUMO

Senna spectabilis (Fabaceae) é uma importante espécie presente em todo o território brasileiro, rica em diversidade química, que tem como constituintes majoritários os alcaloides piperidínicos que apresentam ação sobre o sistema nervoso central, atuando na inibição da acetilcolinesterase, enzima relacionada ao processo cognitivo, cuja deficiência está relacionada a doença de Alzheimer. Essa variedade de moléculas ativas, colocam as plantas como protagonistas promissores na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. No entanto, a crescente degradação ambiental compromete a produção desses metabólitos. Tais fatos nos motivaram para o estudo químico dos frutos de *S. spectabilis*, visando o isolamento de novos compostos, bem como o estudo da biossíntese dos alcaloides piperidínicos, para uma melhor compreensão das vias de produção desses metabólitos. Inicialmente o extrato etanólico dos frutos verdes foi preparado, submetido a extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. A fração alcaloídica (CH₂Cl₂) foi submetida a cromatografia em coluna, o que resultou no isolamento dos alcaloides (–)-cassina (**8**) (12,0 mg) e (–)-espectralina (**14**) (11,4 mg), e na mistura dos homólogos 3-*O*-feruloilcassina (**26**) e 3-*O*-feruloilespectralina (**27**) (14,4 mg). Os compostos isolados tiveram suas estruturas elucidadas através de técnicas espectrométricas (IES-EM) e espectroscópicas (RMN). Na elucidação das vias biossintéticas, sementes foram cultivadas em terra para atestar o metabolismo ativo da espécie, confirmado pelas análises de CG-EM que demonstraram na fração em clorofórmio a presença do alcaloide (**8**), bem como seu aumento substancial ao longo do período de crescimento. As condições de cultivo *in vitro*, das sementes de *S. spectabilis* foram otimizadas, sendo o meio de cultura *Wood Plant* (WP) o que apresentou os melhores resultados. Nos experimentos de crescimento com adição de 1-¹³C-D-glicose (54 dias) foi observado padrão de incorporação nos alcaloides piperidínicos, na fração em clorofórmio das partes aéreas (EC-PA). Dessa fração, foi isolado o alcaloide (**8**) (0,5 mg). A análise dos resultados de CLAE-IES-EM e CG-EM indicaram que a formação desses alcaloides em *S. spectabilis* é proveniente da via do acetato.

Palavras-chave: Alcaloides piperidínicos, biossíntese, produtos naturais, *Senna spectabilis*

ABSTRACT

Senna spectabilis (Fabaceae) is an important species found throughout the Brazilian territory, rich in chemical diversity, with piperidine alkaloids as its major constituents. These alkaloids exhibit action on the central nervous system by inhibiting acetylcholinesterase, an enzyme linked to cognitive processes, whose deficiency is associated with Alzheimer's disease. This array of active molecules positions plants as promising protagonists in the discovery and development of new medicines. However, due to the escalating environmental degradation compromised the production of these metabolites. These facts have motivated us to conduct a chemical study of *S. spectabilis* fruits, aiming to isolate new compounds, as well as investigate the biosynthesis of piperidine alkaloids for a better understanding of the pathways responsible for producing these metabolites. Initially, the ethanolic extract of green fruits was prepared and subjected to liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarity. The alkaloid fraction (CH₂Cl₂) was subjected to column chromatography resulting in the isolation of the alkaloids (–)-cassine (**8**) (12.0 mg) and (–)-spectaline (**14**) (11.4 mg), along with a mixture of homologs 3-*O*-feruloylcassine (**26**) and 3-*O*-feruloylspectaline (**27**) (14.4 mg). The isolated compounds structures were elucidated through spectroscopic techniques (IES-MS) and spectrometric methods (NMR). For the elucidation of biosynthetic pathways, seeds were cultivated in soil to confirm the active metabolism of the species, as evidenced by GC-MS analyses demonstrating the presence of alkaloid (**8**) in the chloroform fraction, with its substantial increase over the growth period. *In vitro* cultivation conditions of *S. spectabilis* seeds were optimized, being *Wood Plant* (WP) culture medium, which presented the best results. In growth experiments with the addition of 1-¹³C-*D*-glucose (54 days), a pattern of incorporation into piperidine alkaloids was observed in the chloroform fraction of the aerial parts (EC-PA), analyzed via GC-MS. From this fraction, alkaloid (**8**) (0.5 mg) was isolated. The analysis of HPLC-IES-MS and GC-MS results suggests that the formation of these alkaloids in *S. spectabilis* originates from the acetate pathway.

Keywords: Piperidine alkaloids, biosynthesis, natural products, *Senna spectabilis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Substâncias originadas de plantas com potencial farmacológico	22
Figura 2.	Classificação dos fármacos aprovados entre 1981–2019	23
Figura 3.	<i>Senna spectabilis</i> : detalhes da planta, flores, folhas, frutos, sementes, casca	24
Figura 4.	Alcaloides piperidínicos de <i>Senna spectabilis</i> (sin. <i>Cassia spectabilis</i>)	26
Figura 5.	Semelhança estrutural entre 21 e a ACh	27
Figura 6.	Alcaloides piperidínicos isolados de formigas-de-fogo (<i>Solenopsis saevissima</i>)	28
Figura 7.	Alcaloides piperidínicos isolados de <i>Solenopsis</i> ssp	28
Figura 8.	Alcaloides piperidínicos isolados do gênero <i>Prosopis</i>	29
Figura 9.	Alcaloides piperidínicos isolados da esponja do mar (59 e 60), de <i>D. floribundum</i> (61 e 62) e do besouro (63 e 64)	30
Figura 10.	Principais vias de biossíntese dos metabólitos secundários e conexões com metabolismo primário na produção de aminoácidos	32
Figura 11.	Determinação da razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dos fragmentos por EM com IE	34
Figura 12.	Determinação da razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ usando EM com IES	34
Figura 13.	Efeito da incorporação simples dos precursores marcados sobre o espectro de RMN de ^{13}C	36
Figura 14.	Efeito da incorporação dupla dos precursores marcados sobre o espectro de RMN de ^{13}C	37
Figura 15.	Biogênese do núcleo piperidínico a partir da lisina	38
Figura 16.	Biossíntese dos alcaloides da cicuta (<i>Conium maculatum</i>)	39
Figura 17.	Carbono radioativo (azul) observado na coniina a partir da administração do acetato de sódio [$1\text{-}^{14}\text{C}$] em plantas de cicuta (<i>Conium maculatum</i>)	40
Figura 18.	Interpretação alternativa dos dados de Leete (1963, 1964), observando o padrão de marcação dos carbonos radioativos (azul)	41

Figura 19.	Biossíntese da pinidina (68)	41
Figura 20.	Biogênese para a carpaína (69) (<i>Carica papaya</i>)	42
Figura 21.	Biossíntese da <i>N</i> -metilpeletierina (70)	43
Figura 22.	Biogênese da espicigerina (48) e semelhança com a leptofilina B (17)	43
Figura 23.	Proposta de biossíntese para os 3-piperidinóis 2,6-dissubstituídos	45
Figura 24.	Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico	54
Figura 25.	Fluxograma dos procedimentos cromatográficos	56
Figura 26.	CCD frações hexano (1 ^a –5 ^a extrações) (A e A’); diclorometano (1 ^a –5 ^a extrações) (B e B’); e acetato de etila (1 ^a –5 ^a extrações) (C e C’)	61
Figura 27.	CCD das subfrações coletadas do procedimento MDC01	61
Figura 28.	CCD das subfrações coletadas do procedimento MDC02	62
Figura 29.	Cromatograma da fração MDC02-F ₂ em coluna semipreparativa	62
Figura 30.	CCD das frações coletadas em CLAE semipreparativa da subfração MDC02-F ₂	63
Figura 31.	Cromatograma da fração MDC02-F ₂ (8) obtido por CG-DIC	63
Figura 32.	Cromatograma da fração MDC02-F ₂ (14) obtido por CG-DIC	64
Figura 33.	CCD das subfrações coletadas do procedimento MDC03	64
Figura 34.	CCD das subfrações que foram reagrupadas do procedimento MDC03	65
Figura 35.	CCD preparativa da fração MDC03-F ₁	65
Figura 36.	Cromatograma obtido por CLAE-EM do alcaloide 8	66
Figura 37.	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide 8	67
Figura 38.	EM/EM-IES-(+) do alcaloide 8 (25 eV)	67
Figura 39.	Cromatograma obtido por CLAE-EM do alcaloide 14	70
Figura 40.	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide 14	71
Figura 41.	EM/EM-IES-(+) do alcaloide 14 (25 eV)	71
Figura 42.	Cromatograma obtido por CLAE-EM do alcaloide 26	74
Figura 43.	EM-IES-(+) em alta resolução dos homólogos 26 (A) e 27 (B)	75
Figura 44.	EM/EM-IES-(+) dos homólogos 26 (A) e 27 (B) (25 eV)	76
Figura 45.	Proposta de fragmentação do homólogos 26/27	77

Figura 46.	Sementes de <i>S. spectabilis</i>	81
Figura 47.	CCD dos extratos CHCl ₃ (I) e EtOH (II) obtidos das plântulas	83
Figura 48.	CG-EM da mistura de 8 e 14 (A) e extrato CHCl ₃ das folhas (45 dias) (B)	83
Figura 49.	EM-IE do alcaloide (–)-cassina (<i>t_R</i> 13,1 min) isolado (A) e no extrato CHCl ₃ das folhas com 45 dias (B)	84
Figura 50.	CG-EM dos extratos em CHCl ₃ das folhas preparados ao longo dos 75 dias	85
Figura 51.	EM-IE de compostos da classe dos alcaloides piperidínicos (<i>t_R</i> 13,4 (A), 14,4 (B) e 14,8 min (C)), presentes no extrato em CHCl ₃ das folhas com 75 dias (Figura 50E)	86
Figura 52.	CG-EM dos extratos em CHCl ₃ dos caules preparados ao longo dos 75 dias	87
Figura 53.	CG-EM dos extratos em CHCl ₃ das raízes preparados ao longo dos 75 dias	88
Figura 54.	Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>S. spectabilis</i>	89
Figura 55.	Anatomia da plântula de <i>S. spectabilis</i>	90
Figura 56.	Explantes de <i>S. spectabilis</i>	91
Figura 57.	Explantes de <i>S. spectabilis</i> de 50 dias	91
Figura 58.	Explantes de <i>S. spectabilis</i> de 90 dias	92
Figura 59.	Experimento de marcação isotópica utilizando 1- ¹³ C-D-glicose em plântulas de <i>S. spectabilis</i>	94
Figura 60.	Cromatogramas obtidos por CLAE-EM dos extratos (CHCl ₃ e EtOH)	95
Figura 61.	EM-IES(+) do alcaloide 8 em EC-PA	96
Figura 62.	EM-IES(+) dos alcaloides oriundos dos experimentos de marcação isotópica da parte aérea	98
Figura 63.	Cálculo para comprovação da incorporação isotópica de ¹³ C no EM-IES	106
Figura 64.	Biogênese e padrão de enriquecimento com 1- ¹³ C-D-glicose no alcaloide 8	108
Figura 65.	EM/EM-IES-(+) de 8 em EC-PA	109
Figura 66.	CG-EM de 8 em EC-PA	110

Figura 67.	Perfil cromatográfico do extrato EC-PA em coluna analítica	111
Figura 68.	Cromatograma obtido por CLAE-EM da subfração SB-7	112
Figura 69.	EM-IES(+) em alta resolução do alcaloide 8	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados de RMN do alcaloide 8 em CDCl ₃	69
Tabela 2.	Dados de RMN do alcaloide 14 em CDCl ₃	73
Tabela 2.	Dados de RMN do alcaloide 26 em CDCl ₃	79
Tabela 4.	Preparo dos extratos de <i>S. spectabilis</i> a partir das plântulas	82
Tabela 5.	Tratamentos utilizados na indução de novos explantes <i>in vitro</i> a partir do cultivo de segmentos nodais de <i>S. spectabilis</i>	93
Tabela 6.	Preparo dos extratos de <i>S. spectabilis</i> a partir das plântulas suplementadas com 1- ¹³ C-D-glicose e controle	94
Tabela 7.	Análise dos experimentos de marcação isotópica utilizando 1- ¹³ C-D-glicose da parte aérea das plântulas de <i>S. spectabilis</i>	106

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A.	Espectros de RMN do alcaloide 8	126
Apêndice B.	Espectros de RMN do alcaloide 14	135
Apêndice C.	Espectros de RMN do alcaloide 26	144

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
AcOEt	Acetato de etila
BAP	Benzilaminopurina
B5	Meio basal Gamborg's
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG	Cromatografia a gás
CG-DIC	Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chama
CG-EM	Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas
CHCl ₃	Triclorometano
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ COOH	Ácido acético
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	Coenzima A
COSY	Correlação homonuclear
COX	Ciclooxigenase
CPKS5	Gene de policetídeo sintase do tipo III
d	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodo
ELSD	Detector evaporativo por espalhamento de luz
EM	Espectrometria de massas/espectro de massas
EM/EM	Espectrometria de massas em Tandem
EtOH	Etanol
FDA	Food and drug administration
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
GA3	Ácido giberélico
GPS	Sistema global de posicionamento

HCl	Ácido clorídrico
HMBC	Correlação de ligações múltiplas heteronucleares
HSQC	Coerência quântica simples heteronuclear
IBA	Ácido indolilbutírico
IE	Ionização por impacto de elétrons
IES	Ionização por <i>electrospray</i>
IGEB	Instituto de Genética e Bioquímica
IClPt	Revelador iodocloroplatinato
<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hertz - Hz)
M ^{•+}	Íon molecular
m	Multiplete
MEOH	Metanol
MS	Murashige e Skoog (meio de cultura)
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
PLP	Coenzima piridoxal fosfato
PN	Produtos naturais
PTFE	Politetrafluoretileno
RELAM	Rede de Laboratórios Multiusuários
<i>R_f</i>	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
UFOB	Universidade Federal do Oeste da Bahia
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UNAERP	Universidade de Ribeirão Preto
UV/Vis	Ultravioleta visível
WP	<i>Wood Plant</i> (meio de cultura)
q	Quadruplete
qt	Quintuplete
s	Simpleto
SAM	S-adenosil-L-metionina
sl	Simpleto largo
t	Triplete
δ	Deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Produtos Naturais	21
2.2	<i>Senna spectabilis</i> e os alcaloides piperidínicos	24
2.3	Outras fontes de alcaloides piperidínicos	27
2.4	Propagação <i>in vitro</i> de plantas com potencial medicinal	30
2.5	Vias biossintéticas	31
2.6	Elucidação das vias biossintéticas	33
2.7	Biossíntese dos alcaloides piperidínicos	37
2.8	Estudo biossintético dos alcalóides piperidínicos em <i>S. spectabilis</i>	44
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Instrumentação	47
4.2	Solventes e Reagentes	47
4.3	Cromatografia	48
4.3.1	<i>Cromatografia em coluna aberta</i>	48
4.3.2	<i>Cromatografia em camada delgada</i>	48
4.3.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	49
4.3.4	<i>Cromatografia gasosa</i>	50
4.4	Análises espectrométricas e espectroscópicas	51
4.4.1	<i>Espectrometria de Massas</i>	51
4.4.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	51
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
5.1	Obtenção dos materiais vegetais e preparo do extrato	53
5.2	Fracionamento do extrato de <i>S. spectabilis</i>	53
5.2.1	<i>Preparo do revelador de iodocloroplatinato</i>	54
5.3	Isolamento dos alcaloides piperidínicos dos frutos verdes	54
5.4	Germinação de sementes de <i>S. spectabilis</i>	56
5.5	Micropropagação das plântulas de <i>S. spectabilis</i>	57

5.5.1	<i>Preparo do meio de cultura Murashigue & Skoog (MS)</i>	57
5.5.2	<i>Preparo do meio de cultura Wood Plant (WP)</i>	57
5.5.3	<i>Preparo da solução antibiótico</i>	57
5.5.4	<i>Quebra da dormência das sementes</i>	58
5.5.5	<i>Cultivo in vitro de sementes de S. spectabilis</i>	58
5.6	Estudos biossintéticos	59
5.6.1	<i>Experimentos de marcação isotópica utilizando plântulas de S. spectabilis</i>	59
5.6.2	<i>Preparo dos extratos das plântulas</i>	59
5.6.3	<i>Isolamento dos alcaloides piperidínicos das plântulas</i>	59
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1	Estudo químico do extrato do etanólico dos frutos verdes de <i>S. spectabilis</i>	60
6.2	Isolamento dos alcaloides piperidínicos dos frutos verdes de <i>S. spectabilis</i>	61
6.2.1	<i>Identificação do alcaloide 8</i>	66
6.2.2	<i>Identificação do alcaloide 14</i>	70
6.2.3	<i>Identificação do alcaloide 26</i>	74
6.3	Triagem da biossíntese dos alcaloides em <i>S. spectabilis</i>	81
6.4	Cultivo <i>in vitro</i> de sementes de <i>S. spectabilis</i>	89
6.4.1	<i>Superação da dormência das sementes</i>	89
6.4.2	<i>Estabelecimento do cultivo in vitro de S. spectabilis</i>	89
6.5	Estudos biossintéticos	93
6.5.1	<i>Experimento in vitro de 1-¹³C-D-glicose</i>	93
7	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	115
	APÊNDICES	126

1. INTRODUÇÃO

A natureza tem contribuído expressivamente para o processo de descoberta de novos fármacos, dado que no período de 38 anos (1981–2019) cerca de 70% dos medicamentos aprovados tiveram seu desenvolvimento com base nos produtos naturais (PNs) (Newman; Cragg, 2020). Embora os produtos naturais (PNs) sejam utilizados no tratamento de diferentes patologias, muitos ainda apresentam efeitos colaterais indesejados, somado ao aumento da resistência por alguns microorganismos e eficácia limitada contra doenças complexas onde a patologia é decorrente de um conjunto de processos (multifatorial). Desse modo, se faz necessário a busca e o desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais eficientes, seletivos e acessíveis, do ponto de vista econômico, à toda população (Alkhzem; Woodman; Blagbrough, 2022; Makhoba *et al.*, 2022).

Senna spectabilis, pertencente à família Fabaceae, apresenta grande diversidade química, sendo os alcaloides piperidínicos os constituintes majoritários. Ela tem sido utilizada na medicina tradicional no tratamento de doenças crônicas e infecciosas (Jothy *et al.*, 2012), além de apresentar relatos na literatura de atividades como: antitumoral (Bolzani; Gunatilaka; Kingston, 1995), leishmanicida (Melo *et al.*, 2014), analgésica (Alexandre-Moreira *et al.*, 2003), antimicrobiana (Viegas Júnior *et al.*, 2004), anticonvulsivante (Nkantchoua *et al.*, 2018), anti-inflamatória (Viegas Júnior *et al.*, 2007), antimalárica (Pivatto *et al.*, 2014), e principalmente sobre o sistema nervoso central na inibição da acetilcolinesterase (AChE) (Viegas Júnior *et al.*, 2005).

Apesar dos avanços da química sintética, parte significativa dos fármacos de origem nos metabólitos secundários, ainda são provenientes do cultivo das plantas medicinais (Fumagali *et al.*, 2008). Todavia, esses compostos são restritos a espécies/gêneros e são produzidos em fases ou situações determinadas, dependendo de interações ecofisiológicas (Gobbo-Neto; Lopes, 2007). Aliado a isso, técnicas biotecnológicas *in vitro* como cultura de células, tecidos e transformação genética, estão sendo utilizadas para compreender as rotas biossintéticas. O conhecimento das vias biossintéticas é parte fundamental no entendimento de como os organismos produzem esses compostos, e consequentemente possibilitam a melhora na produção de metabólitos secundários com interesse farmacológico (Cardoso; Oliveira; Cardoso, 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produtos Naturais

Os PNs são metabólitos secundários encontrados em grupos de organismos como as plantas, que podem expressar a individualidade das espécies. Eles desempenham um papel fundamental para a manutenção, propagação e segurança da espécie que o produz, auxiliando na evolução e sobrevivência da planta. São produzidos por vias biossintéticas em processos celulares, que viabilizam a produção de diversas substâncias farmacologicamente ativas (Dewick, 2009; Bernardini *et al.*, 2018).

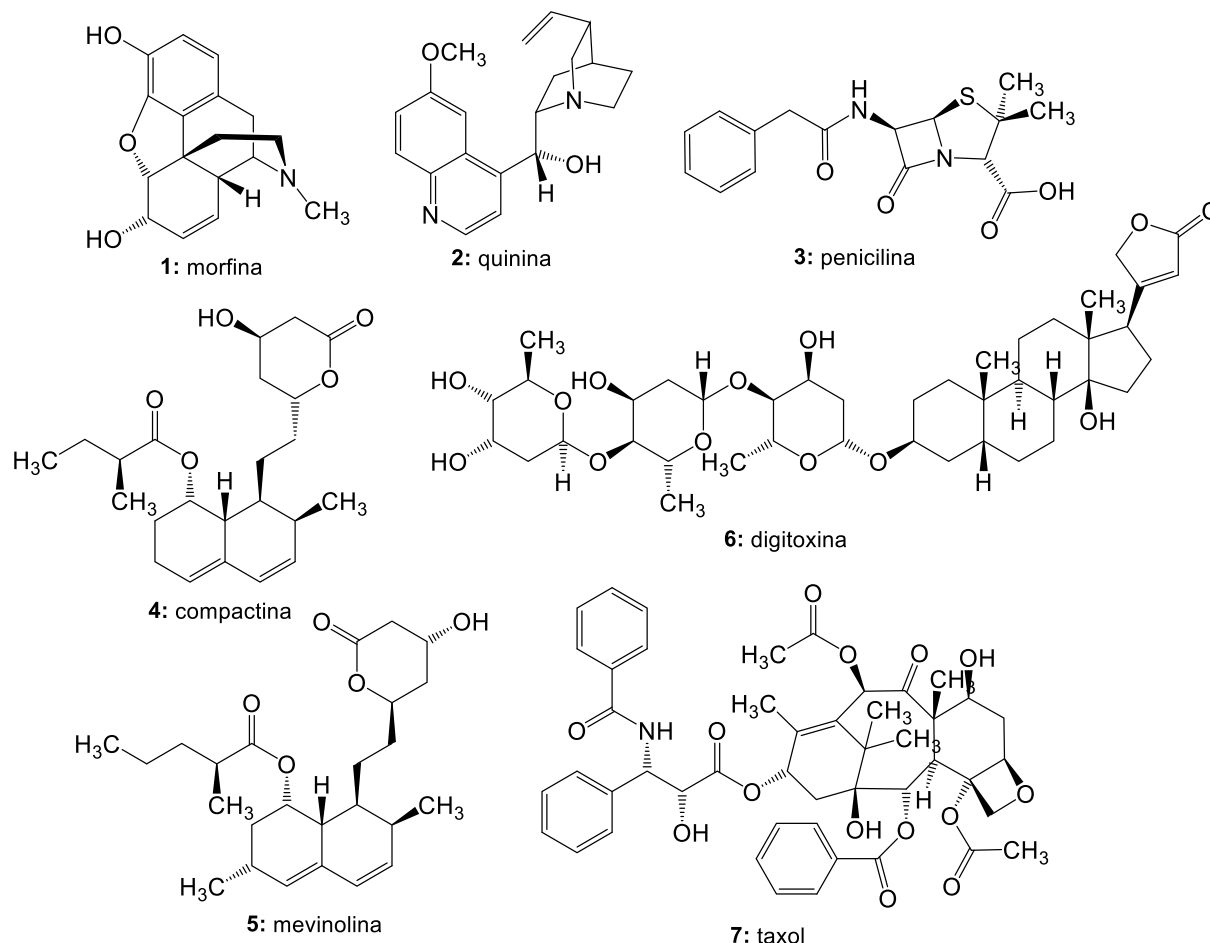
Essa diversidade dos PNs é atribuída a habilidade desses organismos em produzir estruturas moleculares complexas que podem interagir com diferentes alvos biológicos nos seres vivos. Nesse sentido, o processo de seleção natural é um propulsor que pode levar a alterações nas vias biossintéticas e como consequência da evolução, resultar na produção de novos metabólitos secundários. É por isso que as plantas são fontes importantes de arquiteturas de moléculas complexas do ponto de vista estrutural, e bem sucedidas do ponto de vista farmacológico (Wolfender; Queiroz, 2012; Bernardini *et al.*, 2018).

Baseado nisso, o início da história humana é entrelaçado com a dos PNs, especialmente aqueles obtidos de plantas, utilizados como alternativa para o alívio de dores e tratamento de doenças (Yuan *et al.*, 2016), sendo por muito tempo a principal alternativa terapêutica ou única opção de tratamento das enfermidades (Daley, 2017; Calixto, 2019). Logo, a associação do conhecimento tradicional aliada ao uso prático dos povos tradicionais, trouxe grandes avanços terapêuticos, o que levou ao isolamento de muitos compostos bioativos (Phillipson, 2001).

Consequentemente, diversas substâncias ativas que ficaram conhecidas pelo uso popular se tornaram marcos históricos, dentre elas a morfina (**1**) (Figura 1), o primeiro e mais conhecido medicamento analgésico de origem natural, isolado da papoula (*Papaver somniferum*) (Brook; Bennett; Desai, 2017); a quinina (**2**), extraída das cascas de cinchona e utilizada para o tratamento da malária (Tisnerat *et al.*, 2022); a penicilina (**3**), isolada dos fungos do gênero *Penicillium* (Gaynes, 2017), que representa um marco fundamental no desenvolvimento dos antibióticos; as estatinas, como a compactina (**4**) e a mevinolina (**5**), isoladas de *Penicillium citrinum* e *Penicillium brevicompactum*, respectivamente, que são inibidoras da biossíntese do colesterol e abriram caminho para a síntese de uma série de antilipêmicos sintéticos e semissintéticos (Neto *et al.*, 2019); a digitoxina (**6**), um glicosídeo isolado das folhas

de espécies do gênero *Digitalis*, utilizado para o tratamento da insuficiência cardíaca crônica (Rad *et al.*, 2020); e o taxol (7), um antitumoral isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Bernardini *et al.*, 2018).

Figura 1. Substâncias originadas de plantas com potencial farmacológico.

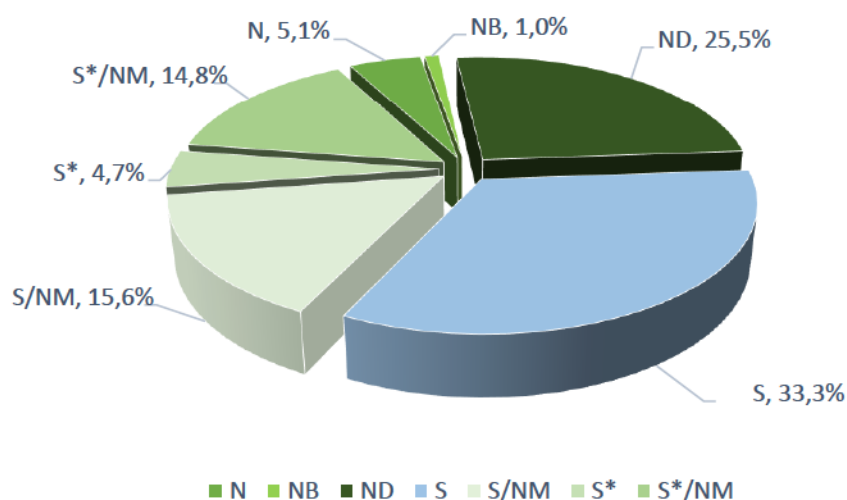


Fonte: Autora.

Nesse sentido o mercado farmacêutico dos grandes centros tecnológicos tem se beneficiado do conhecimento dos PNs. Em 2019, a indústria farmacêutica apresentava uma renda anual avaliada em cerca de US\$ 1,1 trilhão de dólares (Iqvia, 2019), podendo exceder US\$ 1,5 trilhão até 2023, com taxa de 3 a 6% de crescimento nos próximos cinco anos (Faleiros *et al.*, 2021). As substâncias biologicamente ativas originárias de plantas, representam uma parcela relevante desse mercado que atua no desenvolvimento de novos fármacos já que são utilizadas como fonte direta de agentes terapêuticos, matéria prima para o desenvolvimento de fármacos semi-sintéticos, ou como inspiração para o desenho de novas moléculas (Calixto, 2019).

Cerca de um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo são PNs ou derivados. Isso fica evidente ao analisar o levantamento realizado por Newman e Cragg (2020), dos novos medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Segundo relato dos autores, entre 1981 e 2019 foram aprovadas 1394 pequenas moléculas como novos fármacos, dos quais 930 (66,7%) são originados de PNs; destes, 15,6% são sintéticos/miméticos de PN, 4,7% são sintéticos com grupo farmacofórico de PN, 14,8% são sintéticos com grupo farmacofórico de PN/mimético de PN, 5,1% são PNs inalterados, 1,0% são medicamentos botânicos de misturas definidas e 25,5% são derivados de PNs (Figura 2) (Newman; Cragg, 2020).

Figura 2. Classificação dos fármacos aprovados entre 1981–2019.



Nota: S*/NM – sintético (grupo farmacológico de produto natural)/mimético de produto natural, N – produto natural inalterado, NB – medicamento botânico (mistura definida), ND – derivado semissintético de produto natural, S – sintético, S/NM – sintético/mimético de produto natural e S* – sintético (grupo farmacológico de produto natural).

Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).

Nesse cenário, a biodiversidade do Brasil ganha evidência, representando uma das maiores do planeta, com mais de 50.000 espécies de plantas, cerca de 20–22% do total mundial. Porém, grande parte das espécies seguem inexploradas do ponto de vista científico, sendo que algumas já se perderam definitivamente, devido a constante degradação da biodiversidade, em consequência do crescimento econômico desordenado, apoiado na necessidade crescente por maior produção agrícola, atividade industrial descontrolada e urbanização de áreas anteriormente preservadas (Oliveira *et al.*, 2015; Pilon *et al.*, 2017). Logo, apesar da relevância dos PNs no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, até o momento o número de produtos desenvolvidos e comercializados a partir de substâncias farmacologicamente ativas

derivadas da biodiversidade brasileira ainda é pequeno (Calixto, 2019; Cragg; Newman, 2013). Dessa forma, ainda há muito a ser explorado.

2.2 *Senna spectabilis* e os alcaloides piperidínicos

Senna spectabilis (sin. *Cassia spectabilis*) pertence à família Fabaceae, que compreende cerca de 200 gêneros e aproximadamente 1500 espécies no Brasil, é uma das espécies mais importantes do gênero *Senna* (Lorenzi, 2002). Considerada uma árvore comum no Cerrado e no Nordeste semi-árido (Caatinga), tem porte médio (6 a 9 metros); é popularmente conhecida como são-jão, cássia do nordeste, canafístula-de-besouro e pau-de-ovelha. É considerada como ornamental ao ser aproveitada no paisagismo e arborização das ruas, devido a beleza das flores (Figura 3) (Lorenzi, 2002a). Na medicina tradicional tem sido reconhecida pelo tratamento de amenorreias, gripes e resfriados (Corrêa, 1984), além de ser relatada como laxante, analgésica, antiinflamatória e antiulcerogênica (Viegas Júnior *et al.*, 2004; Pivatto *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012).

Figura 3. *Senna spectabilis*: detalhes da planta, flores, folhas, frutos, sementes, casca.



Fonte: Adaptado de Lorenzi (2002a).

Em *S. spectabilis* já foram relatadas diferentes classes de metabólitos secundários como triterpenos pentacíclicos, esteróides, antraquinonas, flavonoides, pironas, ácidos graxos e glicosídeos, embora os alcaloides piperidínicos sejam os constituintes majoritários nas folhas, flores e frutos verdes (Selegato *et al.*, 2017). Os alcaloides piperidínicos pertencem a uma categoria de compostos heterocíclicos nitrogenados, sendo que o núcleo piperidínico é amplamente utilizado como bloco de construção e precursor/reagente em síntese de compostos orgânicos. Esse núcleo, presente em diversos PNs e em medicamentos, geralmente é derivado de precursores como a lisina ou acetato, de onde resultam características peculiares que contribuem para a diversidade biológica (Dey *et al.*, 2020; Abdelshaheed *et al.*, 2021).

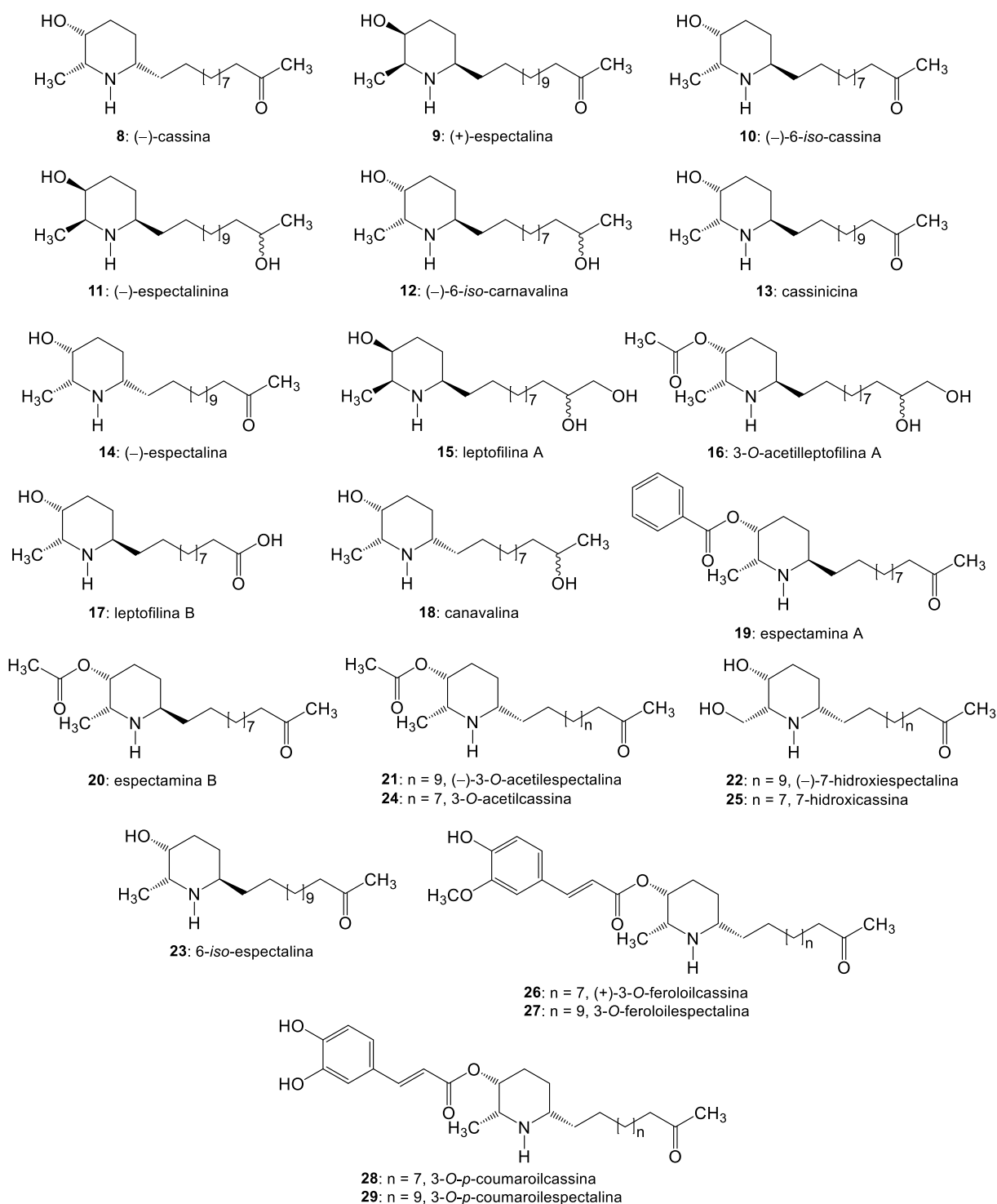
O primeiro alcaloide piperidínico, a (–)-cassina (**8**) (Figura 4), foi isolada das folhas e

galhos de *S. spectabilis* (Highet, 1964), tendo sua configuração absoluta demonstrada como sendo 2-(*R*)-metil-3-(*R*)-hidroxi-6-(*S*)-(11-oxododecil)-piperidina (Rice; Coke, 1966). Foi submetida a ensaios para avaliar as atividades antinoceptiva (Silva *et al.*, 2011), anti-inflamatória (Kamo *et al.*, 2003), antiprotozoária (Moo-Puc *et al.*, 2007), antimalárica (Pivatto *et al.*, 2014) e citotóxica (Sriphong *et al.*, 2003). Após algum tempo, foram isolados os alcaloides (+)-espectalina (**9**) e (-)-6-*iso*-cassina (**10**) (Christofidis; Welter; Jadot, 1977), e ambos apresentaram atividade antitripanossoma (Lim *et al.*, 2018), enquanto apenas **10** apresentou atividades antidepressiva, anticonvulsionante (Silva *et al.*, 2011) e antioxidante (Freitas *et al.*, 2011). Em 1977, a (-)-espectalinina (**11**), a (-)-6-*iso*-carnavalina (**12**) (Christofidis; Welter; Jadot, 1977) e a cassinicina (**13**) foram isoladas das sementes de *S. spectabilis* (Mulchandani; Hassarajani, 1977).

Em 1995 cinco novos alcaloides piperidínicos foram isolados das folhas de *Cassia leptophylla*, identificada erroneamente e posteriormente corrigida como *C. spectabilis*, sendo eles a (-)-espectalina (**14**), a leptofilina A (**15**), a 3-*O*-acetilleptofilina A (**16**), a leptofilina B (**17**) e a canavalina (**18**), sendo que **14** e **18** apresentaram citotoxicidade em células Vero de ovário de macaco e hamster chinês (Bolzani; Gunatilaka; Kingston, 1995). O derivado **14** também apresentou atividade antinociceptiva (Alexandre-Moreira *et al.*, 2003), antimalárica (Pivatto *et al.*, 2014) e inibidor moderado de ciclooxigenases, indicando potencial antiinflamatório (Viegas Júnior *et al.*, 2007). Já em 2003, foram isoladas a espectamina A (3-*O*-benzoil-6-*iso*-cassina) (**19**), que apresentou alta citotoxicidade no ensaio utilizando linhagens de células tumorais (Sriphong *et al.*, 2003) e espectamina B (3-*O*-acetil-6-*iso*-cassina) (**20**), sendo que ambas foram ativas no ensaio para inibição específica de ânions superóxido de macrófagos, relacionados à processos inflamatórios (Kamo *et al.*, 2003).

Posteriormente, a partir das flores e frutos verdes de *S. spectabilis*, três novos alcaloides foram isolados, (-)-3-*O*-acetilespectalina (**21**), (-)-7-hidroxispectalina (**22**) e 6-*iso*-espectalina (**23**) (Viegas Júnior *et al.*, 2004). Dentre os metabólitos isolados, **21** apresentou dano ao DNA utilizando a levedura *S. cerevisiae* (Viegas Júnior *et al.*, 2004), além de atividade inibitória moderada da peroxidação do lipossoma e sobre as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) (Viegas Júnior *et al.*, 2007).

Figura 4. Alcaloides piperidínicos de *Senna spectabilis* (sin. *Cassia spectabilis*).

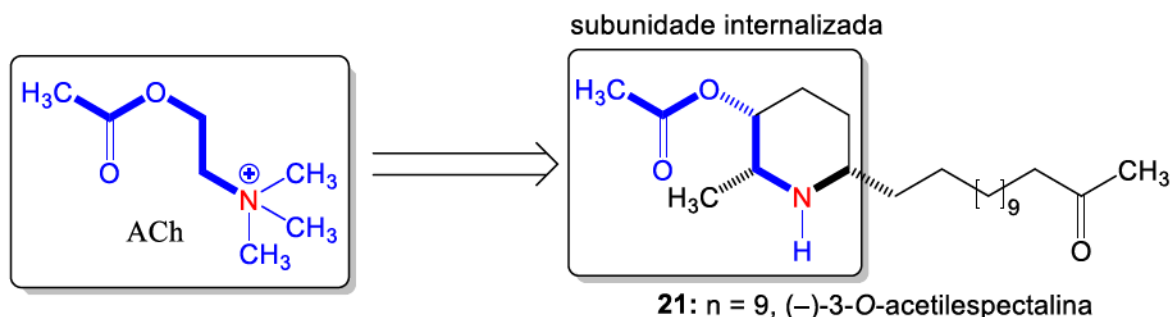


Fonte: Autora.

Além das atividades relatadas, foi observado na estrutura de **21** uma subunidade de acetilcolina (ACh) internalizada (Figura 5), sugerindo que esse composto poderia ser um inibidor da AChE, que foi confirmado na sequência por Viegas Júnior e colaboradores (2005a, 2005b). O composto **23** também apresentou atividades anticonvulsante e depressora

do sistema nervoso central (Silva *et al.*, 2011), além de tripanossomicida no ensaio utilizando *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Lim *et al.*, 2018).

Figura 5. Semelhança estrutural entre **21** e a ACh.



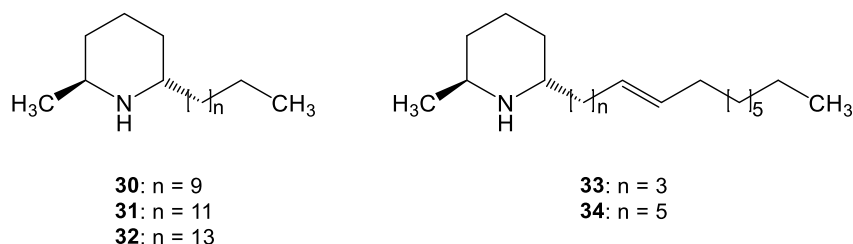
Fonte: Autora.

Em 2005, um estudo utilizando a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* foi realizado, com os frutos de *S. spectabilis*, sendo identificada uma série de alcaloides piperidínicos homólogos, dos quais a 3-*O*-acetilcassina (**24**), a 7-hidroxycassina (**25**), a (+)-3-*O*-feruloilcassina (**26**), a 3-*O*-feruloilespectralina (**27**), a 3-*O*-*p*-coumaroilcassina (**28**) e a 3-*O*-*p*-coumaroilespectralina (**29**), foram relatados pela primeira vez (Pivatto *et al.*, 2005). Mais tarde, **26** foi isolado dos frutos de *S. spectabilis* e avaliada quanto ao potencial anti-inflamatório e inibidor das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), apresentando atividade inibitória moderada nesse ensaio (Viegas Júnior *et al.*, 2007).

2.3 Outras fontes de alcaloides piperidínicos

Os alcaloides piperidínicos também foram encontrados nas formigas-de-fogo do gênero *Solenopsis*, que foram acidentalmente importadas da América do Sul para os Estados Unidos na década de 1930 (Shi *et al.*, 2015). O veneno das formigas *Solenopsis saevissima* exibiram atividades hemolítica, inseticida e antibiótica, devido à presença da mistura dos alcaloides **30–34** (Figura 6) (Macconnell; Blum, 1970).

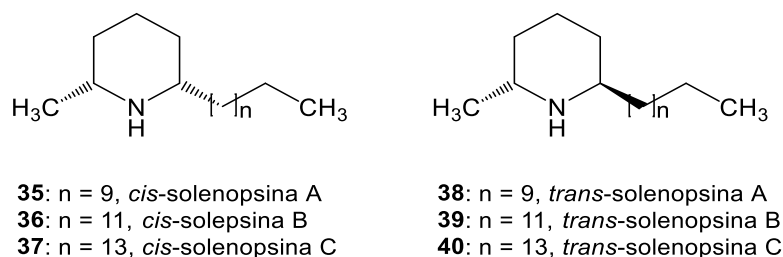
Figura 6. Alcaloides piperidínicos isolados das formigas-de-fogo (*Solenopsis saevissima*).



Fonte: Autora.

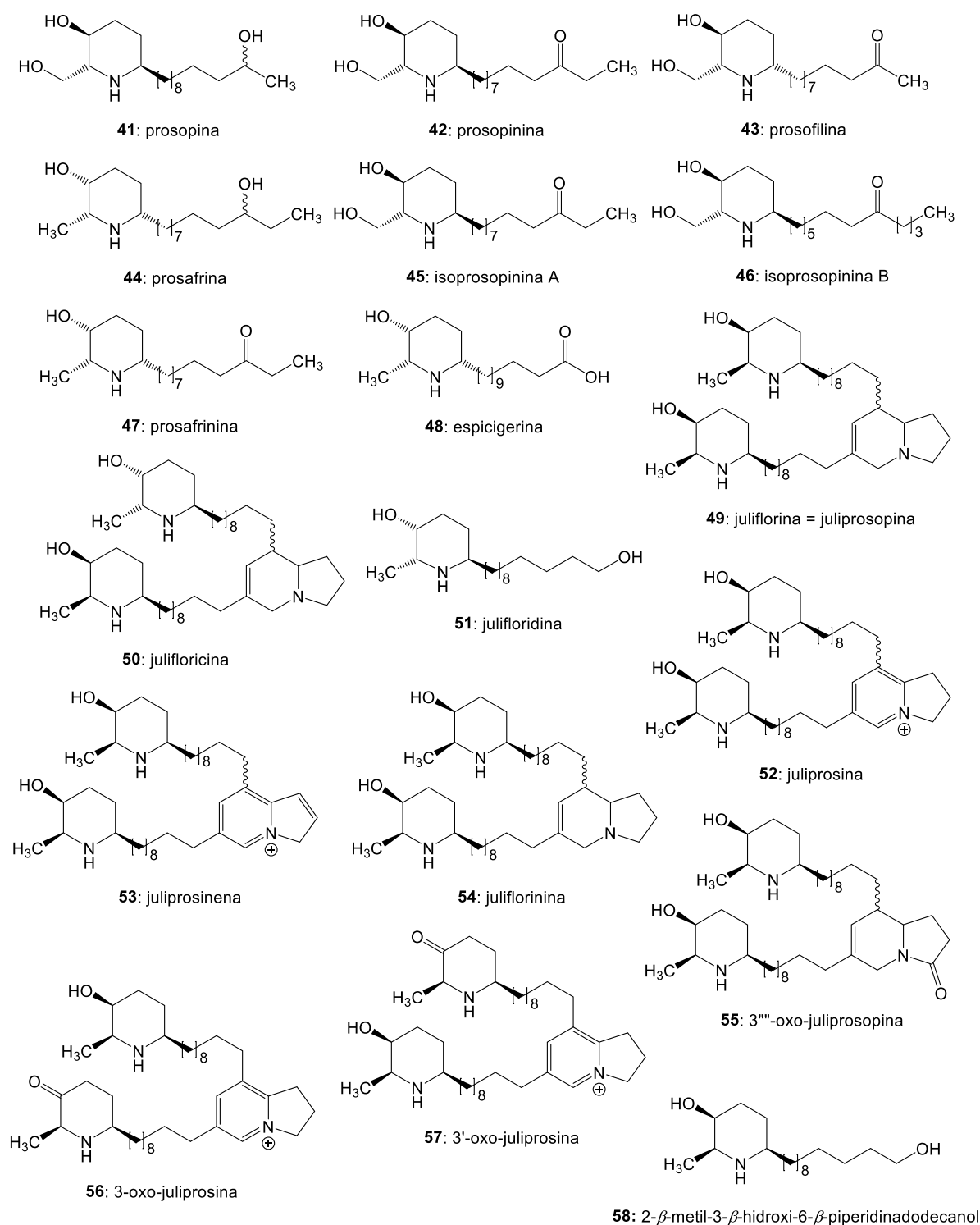
Em 1999, Braekman e colaboradores, isolaram uma série de novos alcaloides piperidínicos homólogos e estereoisômeros (**35–40**) (Figura 7) das formigas-de-fogo que também apresentaram atividades citotóxica, hemolítica, necrótica, antibacteriana, inseticida e antifúngica (Braekman *et al.*, 1999).

Figura 7. Alcaloides piperidínicos isolados de *Solenopsis* ssp.



Fonte: Autora.

As espécies do gênero *Prosopis*, pertencente à família Fabaceae, também se mostraram fontes importantes de alcaloides piperidínicos (Figura 8). Foram isolados das cascas do tronco e raízes de *Prosopis africana*, os alcaloides prosopina (**41**), prosopinina (**42**), prosofilina (**43**), prosafrina (**44**), isoprosopinina A (**45**), isoprosopinina B (**46**) e prosafrinina (**47**) (Khuong-huu *et al.*, 1972a, 1972b). Logo depois, a espicigerina (**48**) foi isolada de *Prosopis spicigera* (Jewers *et al.*, 1976). De *Prosopis juliflora* foram isolados os alcaloides juliflorina (**49**), julifloricina (**50**) e julifloridina (**51**) (Ahmad; Basha; Haque, 1978); juliprosopina (juliflorina) (**49**) (Ott-Longoni; Viswanathan; Hesse, 1980); juliprosina (**52**) (Datwyler *et al.*, 1981); juliprosinena (**53**), juliflorinina (**54**) (Ahmad; Sultana; Qazi, 1989); 3'''-oxo-juliprosopina (**55**), 3-oxo-juliprosina (**56**), 3'-oxo-juliprosina (**57**) (Nakano *et al.*, 2004). E de *Prosopis alba* foi isolado o alcaloide 2- β -metil-3- β -hidroxi-6- β -piperidinadodecanol (**58**) (Astudillo *et al.*, 1998).

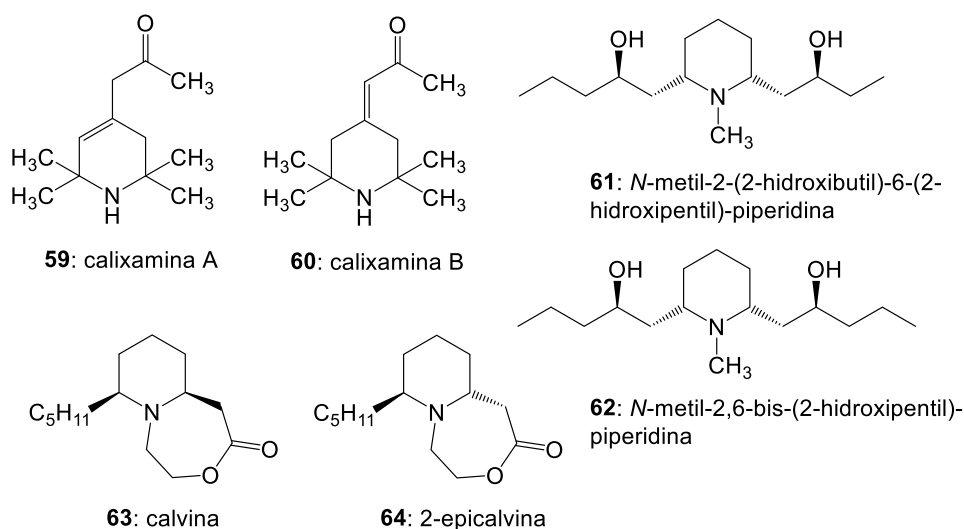
Figura 8. Alcaloides piperidínicos isolados de espécies do gênero *Prosopis*.

Fonte: Autora.

Outra fonte inusitada responsável por uma variedade de alcaloides piperidínicos é a esponja do mar do Caribe, *Calyx podatypa*, de onde foram isolados os alcaloides calixamina A (59) e calixamina B (60). De *Dialypetalum floribundum*, planta endêmica de

Madagascar, mas que também é encontrada no Brasil, foram isoladas a *N*-metil-2-(2-hidroxi-*n*-butil)-6-(2-hidroxi-*n*-pentil)piperidina (**61**) e a *N*-metil-2,6-bis-(2-hidroxi-*n*-pentil)piperidina (**62**). Do fluido corporal do besouro (*Besouros coccinelídeos*), utilizado para se proteger de predadores, foram isolados os alcaloides calvina (**63**) e 2-epicalvina (**64**) (Krebs; Ramiarantsoa, 1998; O'Hagan, 2000).

Figura 9. Alcaloides piperidínicos isolados da esponja do mar (**59 e 60**), de *D. floribundum* (**61 e 62**) e do besouro (**63 e 64**).



Fonte: Autora.

2.4 Propagação *in vitro* de plantas com potencial medicinal

A variedade de estruturas químicas biologicamente ativas disponíveis na natureza, que geralmente estão presentes em pequenas quantidades na planta, as colocam em constante foco exploratório para a descoberta de novos medicamentos (Kishimoto *et al.*, 2017). Uma grande parcela de metabólitos ativos ainda é proveniente do cultivo de plantas medicinais, apesar dos avanços da química sintética. Todavia, muitos desses compostos são restritos a espécies/gêneros, podem estar presentes em habitats que sofrem constante degradação, frequente diminuição de diversidade genética e são produzidos em fases ou situações determinadas, além de depender da interação com o ecossistema (Fumagali *et al.*, 2008). Diante disso, as técnicas biotecnológicas como o cultivo *in vitro* de plantas a partir de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais, podem gerar novas perspectivas na produção de quantidades suficientes de metabólitos secundários de interesse farmacológico (Santarém, 2000).

A cultura de tecidos é uma técnica de indução e proliferação de células vegetais a partir

das sementes ou de fragmentos de tecido vivo da planta, desde que esse tecido responda às condições de indução, levando à regeneração de um novo indivíduo (Lemma; Banjaw; Megersa, 2020; Hasnain *et al.*, 2022). Com desenvolvimento *in vitro*, em meio artificial e condições assépticas, a regeneração rápida e eficaz desses tecidos dependem do genótipo, da fonte dos explantes e das condições da cultura (Andrade, 2002).

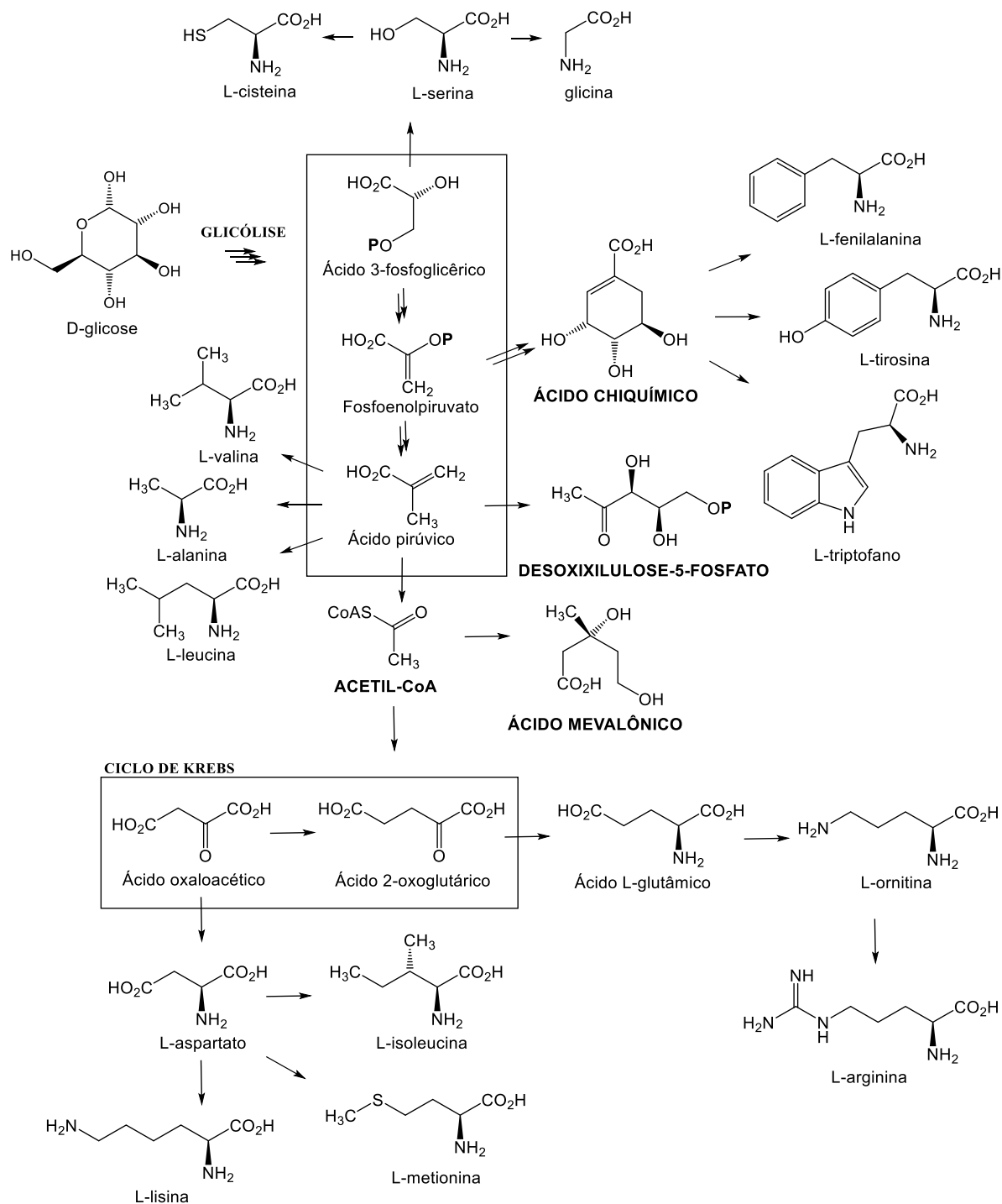
Os melhores resultados da propagação da planta *in vitro* começam com a escolha da espécie, que deve incluir uma planta que produza metabólitos em grande concentração, bem como a resistência a doenças e vigor vegetativo. A escolha da parte do explante, também é relevante, visto que a capacidade de regeneração desse órgão depende da maturidade, do estágio fisiológico e do tipo de tecido. Por fim, as condições de cultura são fatores decisivos, sendo divididos em físicos e químicos. Enquanto o ambiente físico inclui temperatura, luz, passagem de ar, limites físicos dos recipientes e propriedades físicas do ambiente de cultura; o ambiente químico inclui a presença no meio de cultura de macro e micronutrientes, vitaminas, fontes de nitrogênio e carbono, reguladores de crescimento vegetal e agente solidificante (Andrade, 2002; Haque *et al.*, 2022).

Para maximizar o desenvolvimento vegetal e a produtividade metabólica, esses fatores devem ser otimizados. Dessa forma, a técnica possibilita a reprodução e redução de tempo na produção de matrizes, e auxilia no melhoramento genético bem como no estudo das vias biossintéticas (Andrade, 2002; Duta-Cornescu *et al.*, 2023).

2.5 Vias biossintéticas

Mais de trezentos mil PNs já foram descobertos e catalogados e apesar dessa magnitude, apenas cerca de 33.000 reações enzimáticas foram caracterizadas e confirmadas, deixando os PNs em sua maioria, sem comprovação biossintética completa ou intermediária (Zheng *et al.*, 2022). As vias biossintéticas são dirigidas a partir do metabolismo da glicose que é produzida na fotossíntese (Dhaniaputri *et al.*, 2022). Este glicosídeo é a molécula central na formação dos metabólitos secundários, sendo os intermediários ácido chiquímico, acetil-CoA, ácido mevalônico e desoxixilulose-5-fosfato os mais importantes (Figura 10) (Srivastav; Egbuna; Tiwari, 2020).

Figura 10. Principais vias de biossíntese dos metabólitos secundários e conexões com metabolismo primário na produção de aminoácidos.



Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

Para compreensão das vias biossintéticas são administrados, precursores isotopicamente marcados, ao organismo ou cultura de células em estudo. Diferentes precursores podem ser utilizados para levar ao metabólito secundário de interesse, uma vez que existem várias vias

metabólicas (Herbert, 1981). A escolha do precursor é feita através da análise retrobiossintética, que ocorre a partir da estrutura química do metabólito de interesse, levando em conta que o elemento marcado numa posição específica do precursor seja transferido para posição(ões) específica(s) desse metabólito (Bacher et al., 1999).

As proporções de isótopos estáveis dos elementos mais comuns em organismos vivos na natureza apresentam distribuição isotópica de ^{13}C (1,1%), ^{15}N (0,36%), ^{17}O (0,03%) e ^2H (0,015%) (Herbert, 1981). Logo, podem ser empregados precursores que contenham esses isótopos, em posições definidas, de uma maneira que a razão isotópica (ex.: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) do metabólito secundário seja diferente do natural. Nesse processo, o metabólito precisa ser isolado e ter seu conteúdo isotópico determinado/estabelecido através da análise dos isotopômeros (contração de isômeros isotópicos, que são isômeros com átomos isotópicos, tendo o mesmo número de cada isótopo de cada elemento, mas diferindo em suas posições) (Lane; Fan; Higashi, 2008; Dewick, 2009).

2.6 Elucidação das vias biossintéticas

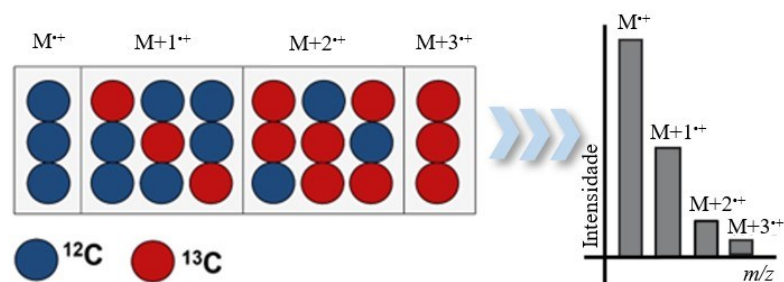
Para obtenção de informações sobre a(s) marcação(ões) dos metabólitos podem ser utilizados instrumentos como a espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN) que têm a capacidade de detectar o nêutron adicional de um isótopo estável (Wiechert, 2001).

A espectrometria de massas, técnica bastante sensível, pode estar acoplada a um sistema cromatográfico como a cromatografia a gás (CG-EM) ou a líquido (CL-EM) (Godin; Fay; Hopfgartner, 2007; Klein; Heinzle, 2012). Na cromatografia a gás, os metabólitos que foram separados na coluna passam por um processo de ionização por elétrons (IE), no qual moléculas com diferente composição isotópica, produzirá sinais de massas maiores nos espectros de massas (EMs), quando precursores marcados foram incorporados. Tendo em vista que o íon molecular $[\text{M}^+]$ de muitos metabólitos frequentemente não é observado no EM os isotopômeros do metabólito podem ser determinados a partir dos íons fragmentos, cujos padrões de marcação podem diferenciar o enriquecimento isotópico em carbonos específicos (Patterson, 1997; Ruhl *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2018).

A distribuição isotópica do fragmento decorre da intensidade das massas do padrão isotópico M^+ , $\text{M}+1^+$, $\text{M}+2^+$, etc, no qual M^+ representa a probabilidade da presença dos elementos mais abundantes (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , etc), correspondendo à massa nominal da molécula; $\text{M}+1^+$, corresponde a presença de um isótopo de maior massa (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , etc);

e assim por diante. A abundância natural de $M+1^{++}$ corresponde principalmente devido à contribuição de ^{13}C na amostra (1,1% de átomos de carbono), dessa forma o incremento na distribuição isotópica assim como o aparecimento de sinais adicionais ($M+3^{++}$, $M+4^{++}$, etc), antes não observados, indicam a presença de metabólitos com átomos marcados através dos experimentos de biossíntese (Figura 11) (Schierbeek *et al.*, 2011).

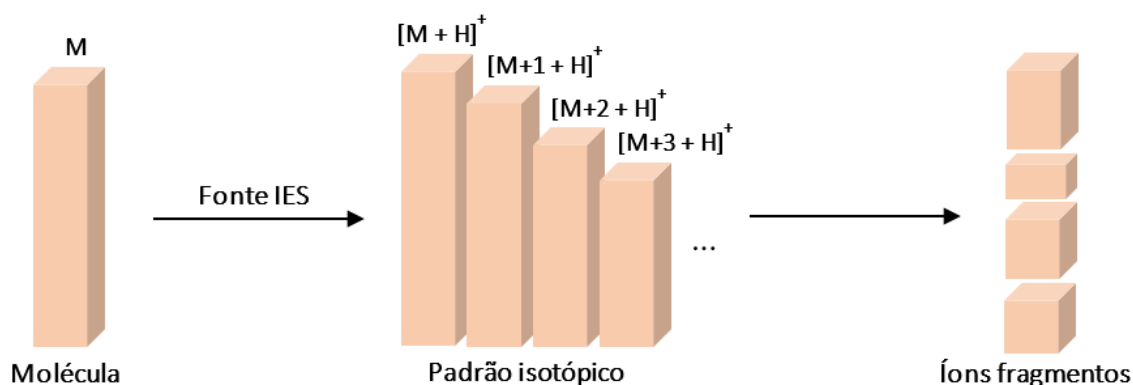
Figura 11. Determinação da razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dos fragmentos por EM com IE.



Fonte: Adaptado de Midani, Wynn e Schnell (2017).

O processo de detecção na EM com ionização por *electrospray* (EM-IES) é similar ao da EM-IE, no entanto o que se observa são espécies iônicas, como as moléculas protonadas $[M + H]^+$, moléculas cationizadas com Na^+ , K^+ , etc. Os fragmentos também podem auxiliar na identificação das posições da molécula onde estão as marcações (Figura 12) (Wiechert, 2001; Godin; Fay; Hopfgartner, 2007).

Figura 12. Determinação da razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ usando EM com IES.



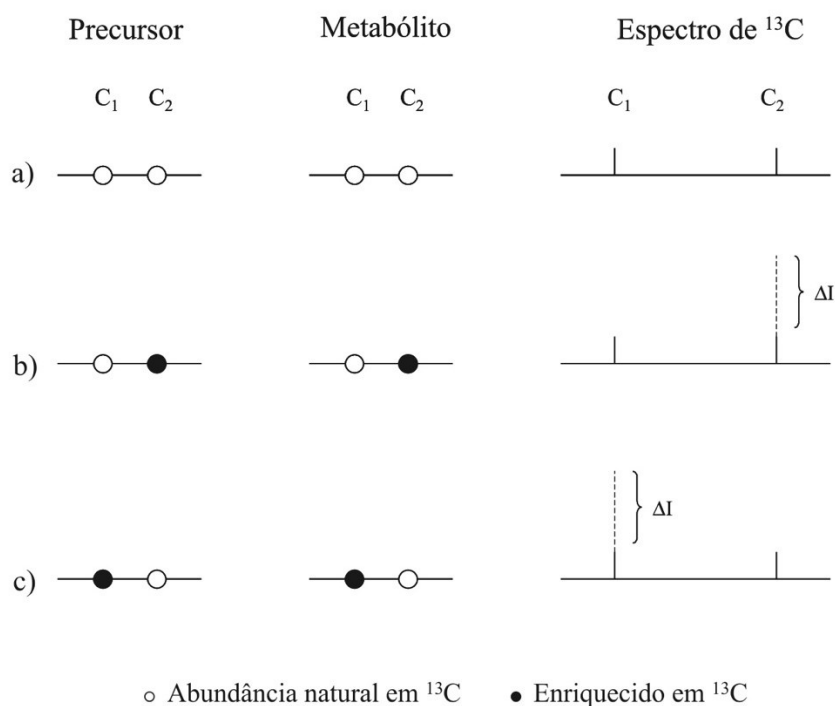
Fonte: Adaptado de Godin, Fay e Hopfgartner (2007).

Outra técnica para a comprovação da incorporação dos precursores é a ressonância magnética nuclear (RMN). A RMN é baseada na interação dos núcleos magneticamente ativos com campo magnético externo aplicado de forma que qualquer núcleo magneticamente ativo

pode ser detectável.

Até a década de 80, muitos experimentos utilizavam a incorporação de substratos enriquecidos com isótopos radioativos (^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{35}S), no qual o composto enriquecido era destruído em sequências de degradações complexas, monitorando a emissão da radiação de seus fragmentos (Macedo Júnior, 2007). Com o avanço das técnicas surgiram os isótopos estáveis que também produzem informações importantes, entretanto devido à baixa sensibilidade dos núcleos em sua maioria, os mais utilizados são ^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P (Gathungu *et al.*, 2020). A baixa quantidade isotópica de ^{13}C na natureza, pode ser uma observação importante, que possibilita analisar com certa facilidade, as variações no padrão percentual de abundância isotópica de ^{13}C , devido a pequenos incrementos desse elemento ao metabolismo, gerarem significativos aumentos na intensidade do sinal correspondente ao carbono marcado no espectro de RMN de ^{13}C .

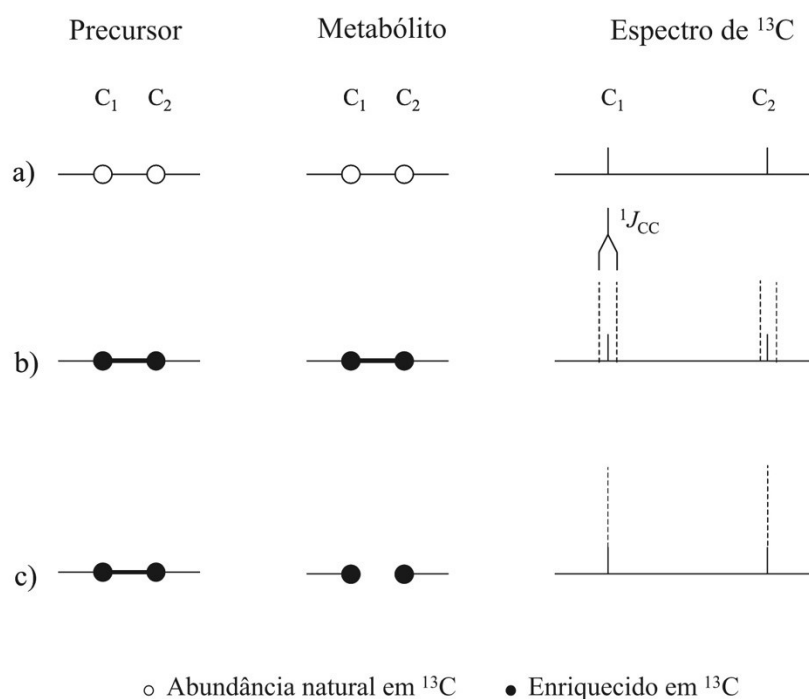
Existem diferentes métodos de marcação com ^{13}C empregados no estudo das vias biossintéticas, como: a marcação simples (Figura 13), quando o precursor é enriquecido em apenas uma posição; e a marcação dupla (Figura 14), quando o precursor é enriquecido em duas posições. Na marcação simples, a análise da incorporação do precursor é determinada pela comparação do espectro de RMN de ^{13}C do composto marcado (Figura 13b e 13c) com o espectro do composto não marcado (Figura 13a), dessa forma a diferença nas intensidades dos sinais revela a incorporação do precursor (Figura 13) (Macedo Júnior, 2007).

Figura 13. Efeito da incorporação simples dos precursores marcados sobre o espectro de RMN de ^{13}C .

Fonte: Adaptado de Macedo Júnior (2007).

Quando a marcação é dupla (Figura 14), a probabilidade de dois átomos de ^{13}C estarem adjacentes, que antes era baixa, passa a ser maior, assim o que pode ser observado no espectro de RMN ^{13}C é um acoplamento $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ ($^1J_{\text{CC}}$) com o aumento da intensidade desses satélites no espectro do composto enriquecido (Figura 14b), caso a ligação mantenha-se intacta ao longo da rota biossintética. Se a conexão entre os carbonos marcados do precursor for quebrada e mesmo assim os fragmentos marcados forem incorporados no produto final, serão observados simpletos aumentados provenientes dos carbonos originados do precursor marcado (Figura 14c), similar ao da incorporação simples. Normalmente, a magnitude dos acoplamentos $^1J_{\text{CC}}$ é diferente entre os pares de carbono da mesma unidade precursora, permitindo distinguir os pares que se encontram acoplados. Ainda é possível observar um segundo acoplamento $^2J_{\text{CC}}$ da interação de duas unidades adjacentes do precursor (Macedo Júnior, 2007).

Figura 14. Efeito da incorporação dupla dos precursores marcados sobre o espectro de RMN de ^{13}C .

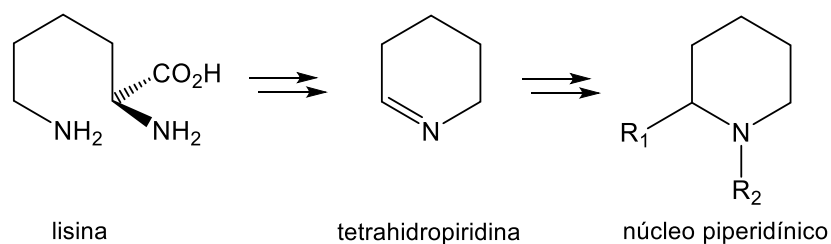


Fonte: Adaptado de Macedo Júnior (2007).

2.7 Biossíntese de alcaloides piperidínicos

Os alcaloides piperidínicos apresentam grande diversidade química, sendo o núcleo piperidínico um dos fragmentos mais comuns em PNs (Bari *et al.*, 2020). Nesse contexto, as vias biossintéticas de alguns alcaloides piperidínicos já foram estudadas através de métodos de administração de precursores marcados (Bunsupa; Yamazaki; Saito, 2016). Segundo Robinson (1917), o precursor na biogênese do núcleo piperidínico (Figura 15) seria o aminoácido lisina, sendo a tetrahidropiridina o intermediária (Robinson, 1917). Schiedt e Hoss (1958), administraram $[1-^{14}\text{C}]$ -L-lisina marcada em espécies de cicuta, e detectaram a produção de coniina radioativa, porém a marcação não foi comprovada no anel piperidínico, já que não foram realizados estudos de degradação (Lopez; Cid; Bianchini, 1999). Dessa forma, a hipótese de lisina como precursor perdeu força, ao serem realizados experimentos com $[2-^{14}\text{C}]$ -DL-lisina nos caules de cicuta (*C. maculatum*), não sendo observada nenhuma incorporação (Leete, 1963).

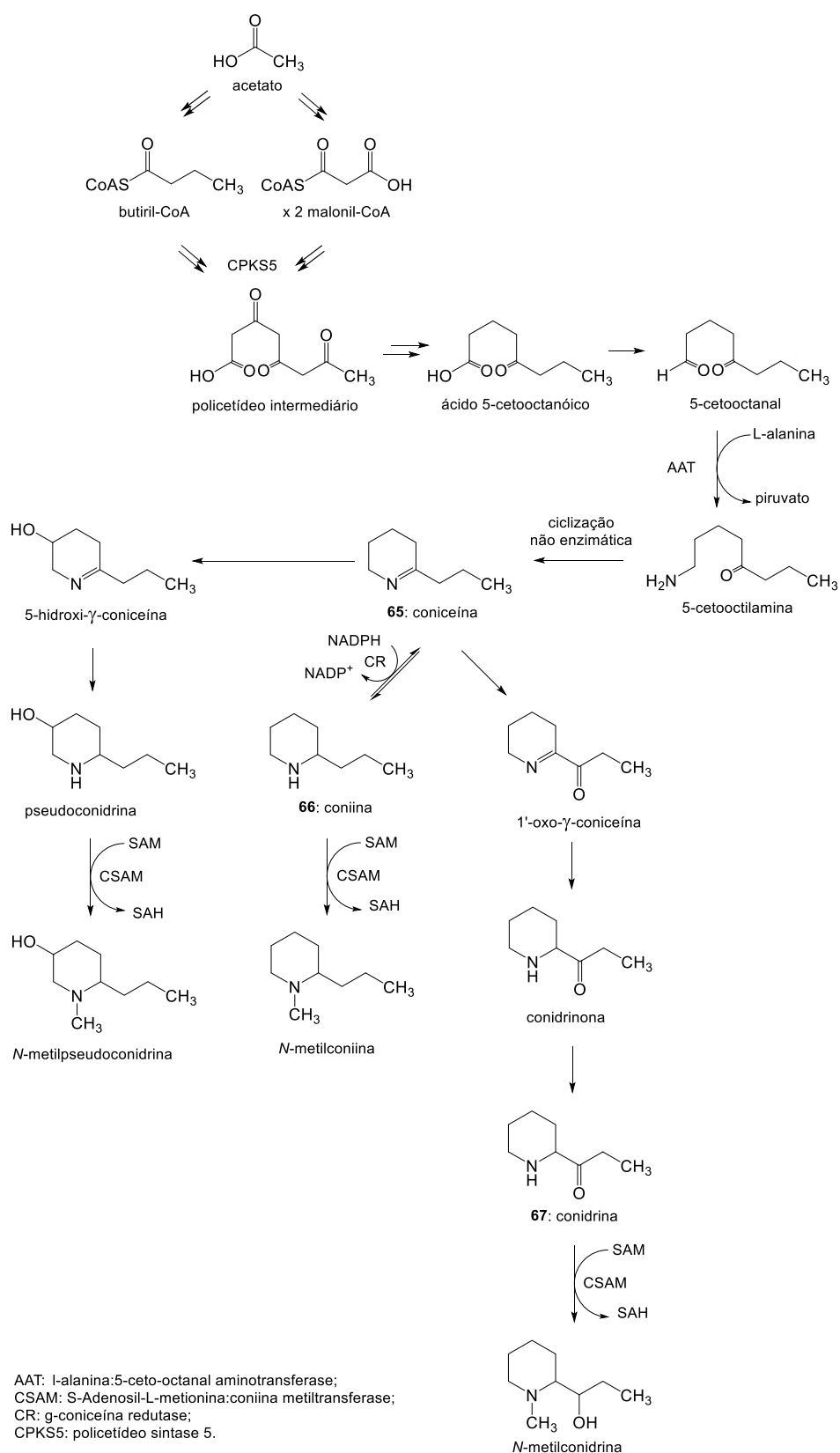
Figura 15. Biogênese do núcleo piperidínico a partir da lisina.



Fonte: Autora.

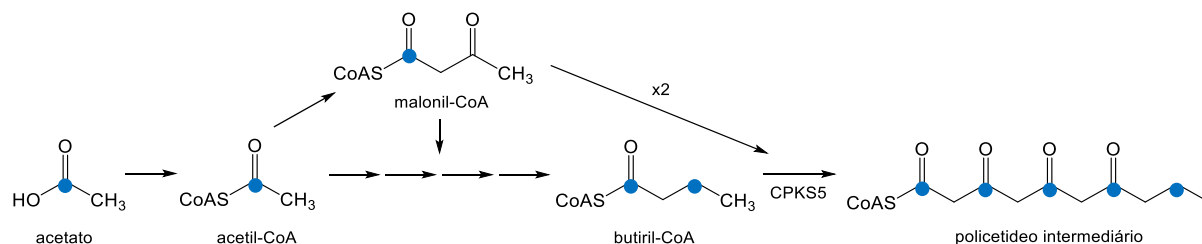
Esses resultados levaram os pesquisadores a acreditar que a [1-¹⁴C]-L-lisina estaria sofrendo metabolização a unidades de acetato, que posteriormente seriam incorporados na estrutura da coniceína (**65**) e em seguida na coniina (**66**) (Figura 16). Entretanto, mesmo com essa proposta, experimentos com lisina marcada não produziu **65** marcado, levando a suposição de que os alcaloides da cicuta seriam biossintetizados a partir de outra via como a do acetato (Lopez; Cid; Bianchini, 1999). Essas informações levaram Leete (1963) a administrar [1-¹⁴C]-acetato de sódio nas plantas jovens de *C. maculatum*, de onde observou, após a degradação química, que os alcaloides **66** e conidrina (**67**) apresentavam marcação uniforme nas posições pares, pressupondo-se que a provável rota de formação desses alcaloides seria derivada a partir de unidades de acetato, tendo um policetídeo como intermediário (Figura 17) (Leete, 1963; Leete, 1964; Hotti; Rischer, 2017).

Figura 16. Biossíntese dos alcaloides da cicuta (*Conium maculatum*).



Fonte: Adaptado de Hotti e Risher (2017).

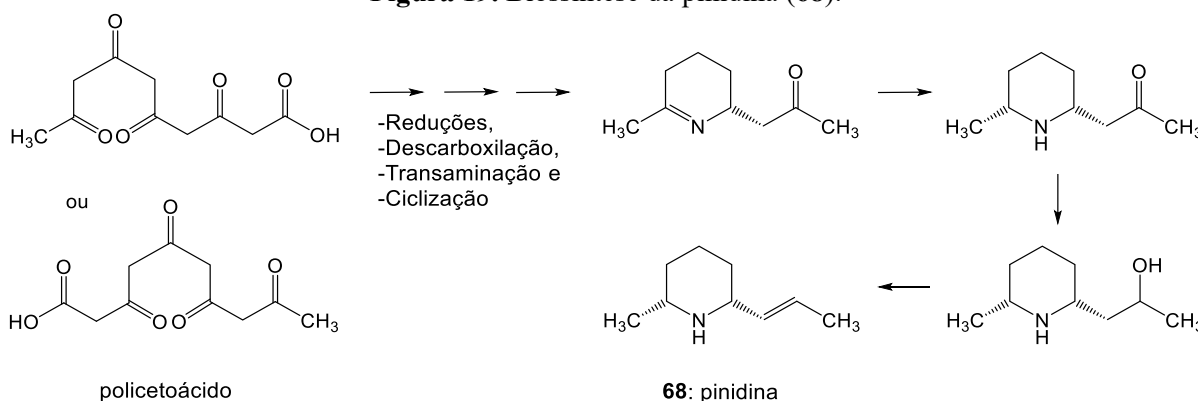
Figura 18. Interpretação alternativa dos dados de Leete (1963,1964), observando o padrão de marcação dos carbonos radioativos (azul).



Fonte: Adaptado de Hotti e Rischer (2017).

A pinidina (**68**) (Figura 19) encontrada em espécies de *Pinus*, apresenta biossíntese semelhante à da coniina. Inicialmente foi sugerido que **68** seria formada pela combinação linear de unidades de acetato, porém não foram avaliados outros precursores (Leete; Juneau, 1969; Leete; Lechleiter; Carver, 1975). Posteriormente, as relações estruturais de piperidínicos 2,6-disubstituídos isolados de *Pinus ponderosa*, deram suporte a hipótese via poliketídica. Assim, a biogênese desses compostos foi proposta através de um policetoácido, com perda do grupo carboxílico, transaminação e ciclização para formação do anel piperidínico e por fim reações que modificam a cadeia lateral, levariam a formação de **68**. Vale ressaltar que reações catalisadas por enzimas estereoespecíficas seriam responsáveis pela quiralidade da série, uma vez que todos os derivados produzidos pela planta apresentam a mesma configuração (Tawara; Stermitz; Blokhin, 1995).

Figura 19. Biossíntese da pinidina (**68**).

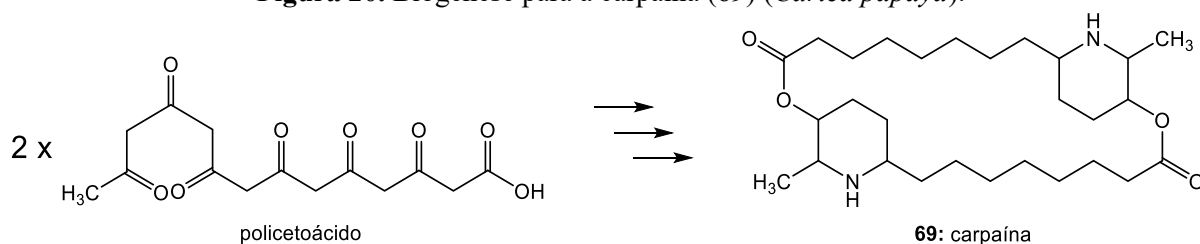


Fonte: Autora.

A carpaína (**69**) (Figura 20), isolada das folhas de *Carica papaya* Linn., também teve sua biossíntese investigada com base em experimentos utilizando os precursores [2-¹⁴C]-acetato, [U-¹⁴C]-lisina e [2-¹⁴C]-mevalonato, demonstrando incorporação eficiente

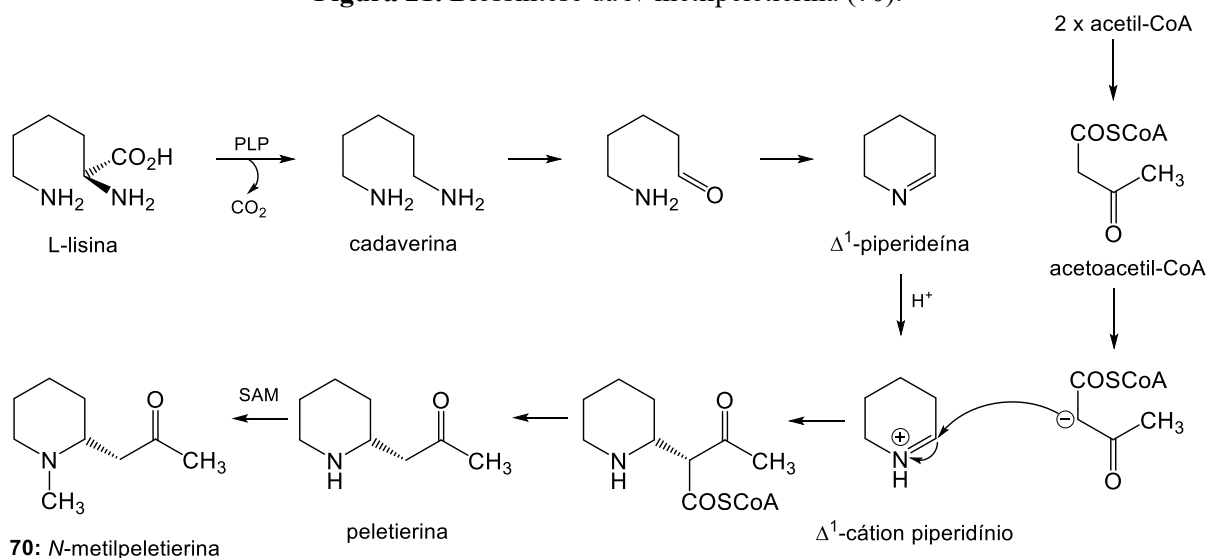
quando acetato marcado foi utilizado com precursor. Baseado na análise estrutural da carpaína, é possível observar que ela contém uma cadeia de carbonos do mesmo tamanho que a do ácido mirístico, em que a biogênese foi proposta a partir de dois policetoácidos de 14 carbonos, o que dá suporte para a biogênese de **69** similar à de **68** (Figura 20) (Bevan; Ogan, 1964; Leete, 1971).

Figura 20. Biogênese para a carpaína (**69**) (*Carica papaya*).



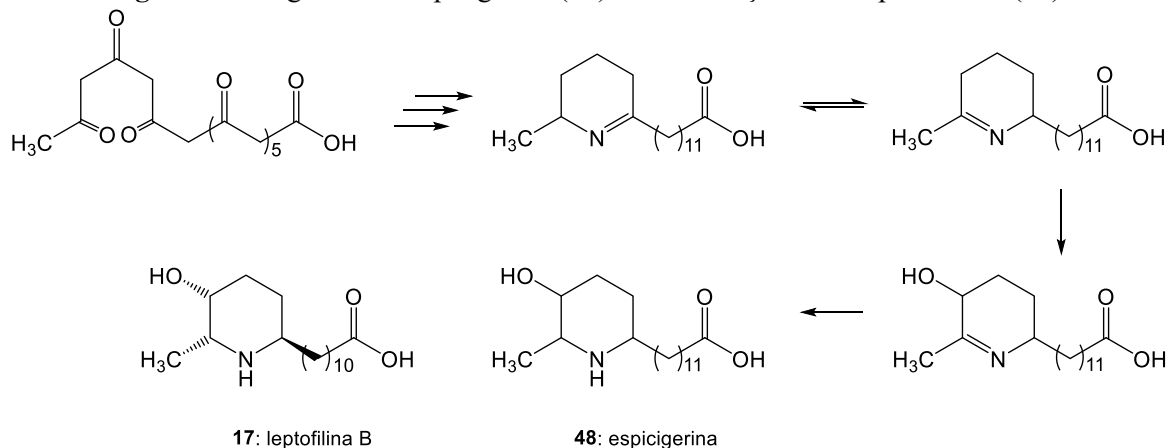
Fonte: Autora.

O estudo da biossíntese da *N*-metilpeletierina (**70**), encontrada em *Sedum sarmentosum* e também na casca da romã (*Punica granatum*), apresentou biossíntese mista. Em experimentos com brotos excisados de *Sedum sarmentosum*, que foram mantidos em processo de cultivo com [6-¹⁴C]-DL-lisina, foi observado no estudo de degradação que **70** tinha toda a atividade confinada no C-6 do núcleo piperidínico, evidenciando uma cadeia C₅N intacta derivada da lisina (Gupta; Spenser, 1969). A origem da cadeia lateral, foi proposta a partir de estudos com brotos de *Sedum sarmentosum* cultivados com [1,2-¹³C₂]-acetato e [1,2,3,4-¹³C₄]-acetoacetato, no qual experimentos de RMN ¹³C permitiram observar que a unidade C₃ era derivada do precursor [1,2,3,4-¹³C₄]-acetoacetato (Hemscheidt; Spenser, 1990). Dessa forma, o anel piperidínico tem origem na lisina e o substituinte no acetoacetil-CoA. Assim, a peletierina teria na biossíntese reações de descarboxilação, desaminação e ciclização para formação do anel piperidínico (Δ^1 -piperideína), seguida de uma reação de condensação com a unidade acetoacetil-CoA (Figura 21) (Szoke, 2013).

Figura 21. Biossíntese da *N*-metilpeletierina (**70**).

Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

Leete (1975), ao esclarecer a biossíntese de **68**, ainda sugeriu a biogênese da espicigerina (**48**), isolada de *Prosopis spicigera* (Figura 22). Segundo ele, a similaridade estrutural entre estes dois compostos, indica que **48** teria uma rota biossintética semelhante à de **68**, e a presença do grupo carboxila terminal seria um indício do acetato como precursor (Leete; Lechleiter; Carver, 1975). A leptofilina B (**17**), um dos alcaloides isolados de *Senna spectabilis*, apresenta grande semelhança estrutural com **48**, diferindo apenas por uma unidade metilênica a menos na extensão da cadeia lateral. Esse dado também pode indicar uma via biossintética comum para os alcaloides de *S. spectabilis*, no entanto, ainda não há estudos com marcação isotópica para confirmar a hipótese.

Figura 22. Biogênese da espicigerina (**48**) e semelhança com a leptofilina B (**17**).

Fonte: Autora.

2.8 Estudo biossintético dos alcaloides piperidínicos em *S. spectabilis*

Diante das diversas propostas de biogênese e/ou biossíntese apresentadas até aqui e da falta de estudos utilizando precursores marcados que poderiam esclarecer a via biossintética dos 3-piperidinois-2,6-dissubstituídos presentes em *S. spectabilis*, que apresentam grande relevância biológica, fica evidente a necessidade de estudos para elucidar a biossíntese desses alcaloides. Assim, baseado nas propostas de biogênese de alcaloides piperidínicos relatados na literatura chegamos a duas propostas (Figura 23): sendo que na **I**, a formação do anel piperidínico e da cadeia carbônica lateral tem origem na via do acetato, através a condensação de unidades de acetato para formação de um policetoácido seguido de reações de redução, descarboxilação, transaminação e ciclização para formação da imina que posteriormente levaria a formação do 3-piperidinol-2,6-dissubstituído, enquanto que em **II** a biossíntese seria por via mista através da obtenção do anel piperidínico formado a partir da lisina, e a cadeia linear ligada ao C-6 seria obtida a partir da via policetoácido (via do acetato). Assim, esses aspectos são fundamentais para determinar a sequência de reações envolvidas na biossíntese desses alcaloides.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar os alcaloides piperidínicos dos frutos verdes de *S. spectabilis* e estudar as vias biossintéticas destes metabólitos, através de experimentos de marcação isotópica.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato etanólico e realizar o estudo químico dos frutos de *S. spectabilis*;
- Estabelecer uma metodologia de cultivo *in vitro* de plântulas de *S. spectabilis*;
- Realizar o estudo de marcação isotópica, utilizando precursores estáveis (^{13}C) dos alcaloides piperidínicos nas plântulas de *S. spectabilis*;
- Avaliar os produtos da biossíntese utilizando técnicas de cromatografia a gás (CG) e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) acopladas a espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

- Banho de ultrassom Quimis 033502.
- 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 (componentes: evaporador rotativo Quimis, banho de aquecimento Buchi B-465 e bomba de vácuo Buchi V-100).
- Banho ultratermostático Quimis modelo Q214M2.
- Autoclave Vertical Primatec modelo CS
- Câmara de Fluxo Laminar Veco
- Medidor de pH Lucadema modelo AF 405

4.2 Solventes e Reagentes

- Etanol (EtOH): Synth P.A. ACS
- Metanol (MeOH): Synth P.A. ACS
- Metanol (MeOH): J. T. Baker HPLC
- Hexano: Vetec P.A.
- Acetato de etila (AcOEt): Vetec P.A.
- Diclorometano (CH_2Cl_2): Vetec P.A. ACS
- Triclorometano ou clorofórmio (CHCl_3): Êxodo Científica P.A.
- Hidróxido de amônio (NH_4OH): Synth P.A. ACS
- Solventes de grau analítico (P.A.), purificados por destilação fracionada: etanol, hexano, cloreto de metileno, clorofórmio e acetato de etila.
- Ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$): Synth P.A. ACS
- Ácido hexacloroplatínico IV: Vetec P.A.
- Iodeto de potássio: Vetec P.A.
- Clorofórmio-*d* 99,8% ACROS Organics.
- Ácido giberélico - giberelina (GA_3)

- Benzilaminopurina (BAP)
- Ácido indolilbutírico (IBA)
- Cercobin®
- Sacarose: Synth P.A. ACS
- D-glicose anidra (dextrose): Synth P.A. ACS
- Gellex (Gellan Gum): Caisson
- Meio Basal Murashige e Skoog (MS)
- Meio Basal Wood Plant (WP)
- Meio Basal Gamborg's (B5)
- Fluconazol 1,0 g
- Ampicilina 1,0 mg/g
- Succinato sódico de clonafenicol 1,0 g
- Vixmicina 1,0 g
- Sulfato de gentamicina 40,0 mg/mL
- D-glicose-1-¹³C, 99% ¹³C: Sigma-Aldrich

4.3 Cromatografia

4.3.1 Cromatografia em coluna aberta

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

- Sílica gel (SiO₂) para cromatografia *flash* (40–63 µm, diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich.

4.3.2 Cromatografia em camada delgada

Os experimentos de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizados utilizando placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV_{254/366}) 0,20 mm de espessura Macherey-Nagel e nebulização de revelador específico para alcaloides (iodocloroplatinato).

As placas preparativas foram preparadas utilizando 25 g de sílica gel 60 (Vetec), 25 g de sílica gel para CCD preparativa (CCDP) com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) e 100 mL

de água destilada. A aplicação da mistura foi feita sobre placas de vidro de 20 × 20 cm com espessura de 1,0 mm através de espalhador Quickfit. Estas foram secas a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 1 h e em seguida foram ativadas em estufa a 120 °C por 2 h.

4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para as análises de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), foi utilizado um cromatógrafo da Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) da Universidade Federal de Uberlândia, campus Umuarama:

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu®, modelo LC-6AD, composto pelos seguintes módulos: sistema de bomba binário LC-6AD, degaseificador DGU-20A_{5R}, forno CTO-20A, coletor de frações FRC-10A, auto-injetor SIL-10AF e detectores de ultravioleta visível (UV/Vis) por arranjo de diodos (DAD, modelo SPD-M20A) e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD, do inglês *evaporative light scattering detector*) LT II, controlados pelo software LC Solutions.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent modelo Infinity 1260, acoplado a um Espectrômetro de Massas de alta resolução tipo *Quadropole (Time of Flight)* Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por *electrospray* (IES).

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

- Coluna analítica Phenomenex® Lunna C₁₈ (250,0 × 4,6 mm, 5 µm) protegida pela respectiva pré-coluna. Como fase móvel (FM), foram utilizados 2 gradientes constituídos de água com ácido acético (0,1%) (A) e metanol (B). O primeiro gradiente consistiu de 5–100% de B (30 min), e em seguida foi mantido 100% de B (5 min), enquanto o segundo consistiu de 5–100% de B (50 min), e em seguida foi mantido 100% de B (5 min). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume injetado foi de 50 µL (C = 1,0 mg mL⁻¹, utilizando MeOH como solvente). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 µm.
- Coluna semipreparativa Phenomenex® Luna C₁₈ (250,0 × 10,0 mm, 10 µm). Como FM, foram utilizados dois gradientes constituídos de água com ácido acético (0,1%) (A) e metanol (B). O primeiro gradiente consistiu de 5–100% de B (30 min), e em seguida foi

mantido 100% de B (5 min). O fluxo utilizado foi de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado foi de $50 \text{ }\mu\text{L}$ ($C = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$). O segundo gradiente consistiu de 35–100% de B (30 min), e em seguida foi mantido 100% de B (5 min). O fluxo utilizado foi de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado foi de $200 \text{ }\mu\text{L}$ ($C = 50,0 \text{ mg mL}^{-1}$). As amostras foram solubilizadas com MeOH e previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

- Coluna Agilent® Poroshell C₁₈ ($10,0 \times 2,1 \text{ mm}$, $2,7 \text{ }\mu\text{m}$). Como fase móvel foi utilizado um gradiente com água com ácido fórmico (0,1%) (A) e metanol (B). O gradiente consistiu de 2–98% de B (15 min), sendo que em seguida foi mantido 100% de B (2 min). O fluxo utilizado foi de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado foi de $1 \text{ }\mu\text{L}$ ($C = 1,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras foram solubilizadas com MeOH e previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

4.3.4 Cromatografia gasosa

As análises de cromatografia a gás foram realizadas utilizando CG-DIC (Laboratórios Multiusuários – RELAM, IQ/UFU) e CG-EM (Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia (UFU), campus Umuarama), ambos na Universidade Federal de Uberlândia:

- Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC) Shimadzu modelo 2010. Foi utilizada uma coluna capilar Zebron ZB-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, $0,25 \text{ }\mu\text{m}$). A análise foi realizada utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 3 mL min^{-1} . As temperaturas do injetor e detector foram de $290 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O volume de injeção foi de $1,0 \text{ }\mu\text{L}$ de solução (1 mg mL^{-1}) em diclorometano (CH_2Cl_2). Foi utilizado o modo *split* de injeção (1:20). A temperatura do forno foi programada para aquecer de 100 a $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com velocidade de $13 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Tempo total de análise $21,0 \text{ min}$.
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) Agilent Technologies modelo 7890B GC System/5977B GC/MSD, com potencial de ionização de 70 eV . A análise foi realizada utilizando hélio como gás transportador com fluxo constante $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Foi utilizada uma coluna capilar Agilent 19091S-433 HP-5ms ($30 \text{ m} \times 250 \text{ }\mu\text{m}$, $0,25 \text{ }\mu\text{m}$). A temperatura do injetor ajustada a $210 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com uma proporção de divisão de 1:20, temperatura do forno inicialmente mantida a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e

depois aumentada a uma velocidade de $13\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ min a $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantida durante 8 min com tempo de execução de 21 min. O intervalo de massa analisado foi de 55–550 u .

4.4 Análises espectrométricas e espectroscópicas

4.4.1 Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Umuarama, utilizando o equipamento:

- Espectrômetro de massas de alta resolução QTOF, marca Agilent®, modelo 6520 B, com fonte de ionização por *electrospray* (IES).

A ionização foi realizada utilizando gás nebulizante a 58 psi, gás secante aquecido a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fluxo de $8,0\text{ L min}^{-1}$ e no capilar foi aplicado 4,5 kV de energia. Os dados foram adquiridos no modo positivo, e o intervalo de massa analisado foi de 100–3200 u . As massas obtidas do espectrômetro de massas em alta resolução foram acuradas e comparadas com aquelas obtidas do programa ChemDraw Ultra 12.0 (massas exatas), utilizadas para calcular o erro em ppm. Para isso foi utilizada a equação abaixo:

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

4.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas no laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU, campus Santa Mônica, utilizando o equipamento:

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla), operando em frequências de 400 e 100 MHz para os núcleos de hidrogênio e carbono, respectivamente. Os experimentos foram realizados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando TMS como padrão interno ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado e em seguida foram realizados os

seguintes experimentos: RMN de ^1H e ^{13}C , e experimentos bidimensionais como COSY (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*, $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*, $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$), HMBC (*Heteronuclear Multiplebond Coherence*, $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$).

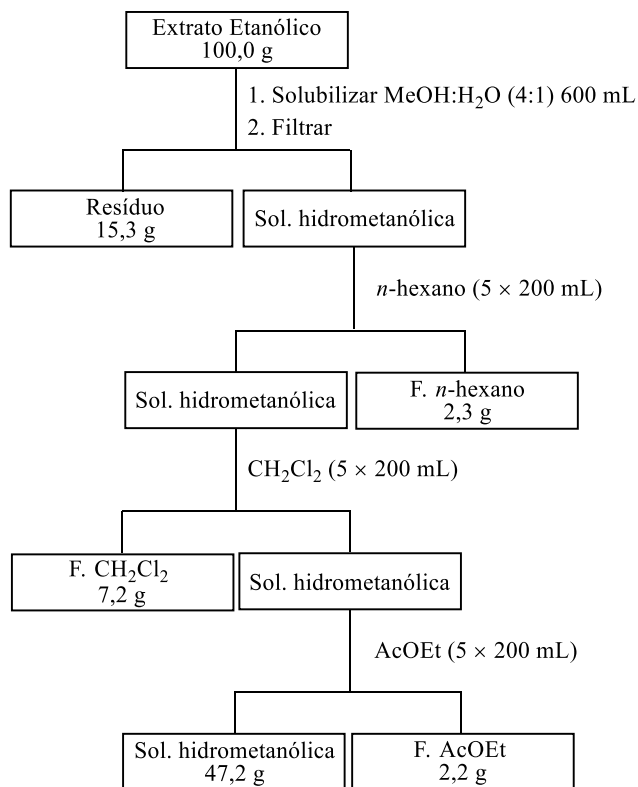
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Obtenção dos materiais vegetais e preparo do extrato

O extrato etanólico (250,0 g) dos frutos verdes de *Senna spectabilis* foi preparado a partir do material vegetal coletado (1,0 Kg) em março/2019 próximo à Arena Sabiazinho (ginásio Tancredo Neve) Uberlândia. Os dados geográficos foram registrados utilizando um sistema de posicionamento global (GPS, do inglês: *Global Positioning System*). Latitude (Sul): 18°91'44.22'', longitude (Oeste): 48°23'13.14''). A identificação botânica foi realizada pelos professores Prof. Dr. Ivan Schiavini da Silva (Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia) e Profa. Dra. Juliana Gastaldello Rando (Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB), e a exsicata (HUFU78.388) foi depositada no Herbarium Uberlandense (HUFU). Os frutos verdes foram triturados em liquidificador e submetidos à extração com etanol. Os processos de extração foram repetidos (5×2 L), com intervalo de três dias entre as extrações. As sementes foram coletadas em junho/2020 e março/2023, no mesmo local que os frutos. Após a coleta, as sementes foram armazenadas em frasco de vidro à temperatura ambiente sem incidência de luz (Carvalho, 2010).

5.2 Fracionamento do extrato de *S. spectabilis*

Parte do extrato etanólico (100,0 g) dos frutos verdes de *S. spectabilis* foi solubilizado em 600,0 mL de solução metanol/água (4:1), filtrado e em seguida submetido à extração líquido-líquido com hexano (5×200 mL), diclorometano (5×200 mL) e acetato de etila (5×200 mL), respectivamente (Figura 24). Os solventes da extração foram removidos por destilação em evaporador rotativo sob pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. As frações obtidas foram analisadas por CCD para verificar a presença dos alcaloides e avaliar a eficiência do procedimento. As placas foram reveladas com o iodocloroplatinato (IClPt).

Figura 24. Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico.

Fonte: Autora.

5.2.1 Preparo do revelador de iodocloroplatinato

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

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

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

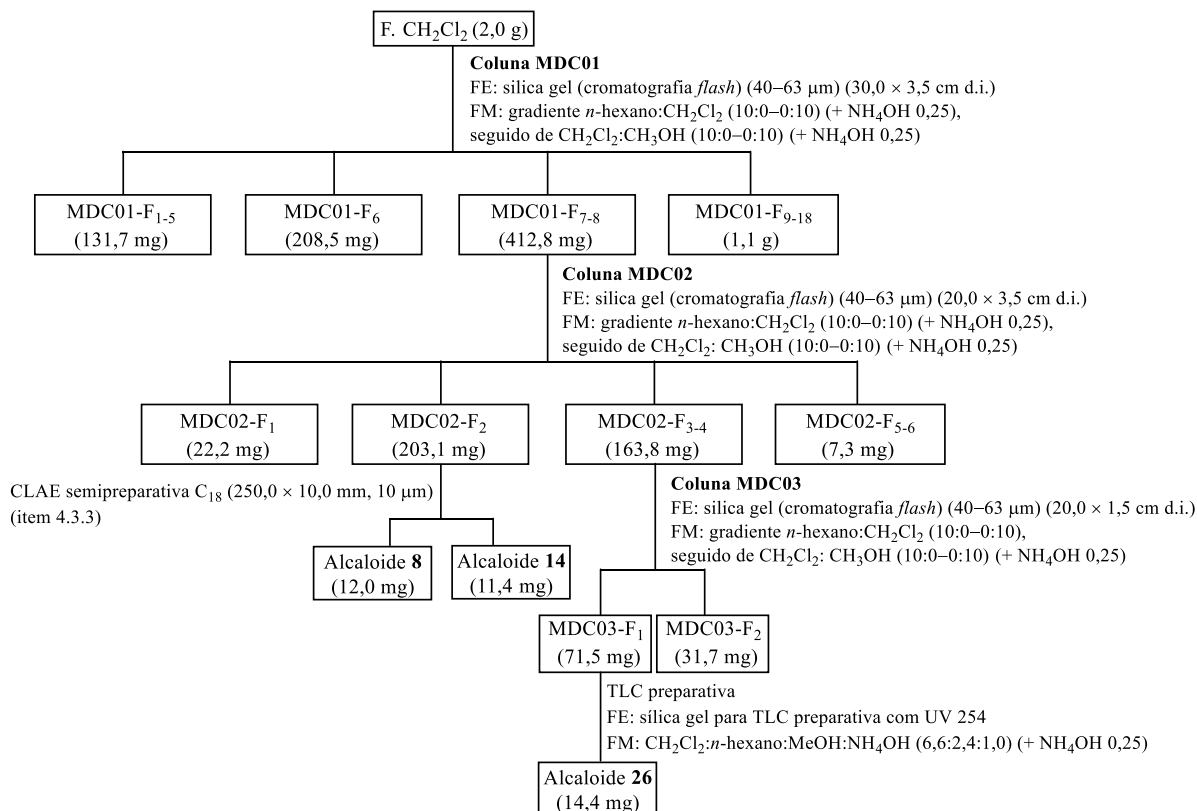
5.3 Isolamento dos alcaloides piperidínicos dos frutos verdes

Após análise por CCD, parte da fração alcaloidica (CH₂Cl₂) (2,0 g) foi submetida a CC (126,3 g, 30,0 × 3,5 cm d.i.), utilizando como FE sílica para cromatografia *flash* (40–63 μm) (Figura 25). A eluição foi feita no modo gradiente, utilizando como FM um sistema de solventes iniciando com hexano-CH₂Cl₂-NH₄OH (10:0:0,25) até 100% de CH₂Cl₂ e posteriormente CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25) com incrementos na mesma proporção até chegar em 100% de MeOH. As subfrações foram avaliadas por CCD e reagrupadas após avaliação da similaridade dos valores do fator de retenção (*R_f*) e aspecto físico (cor e aspecto físico). Depois

de reunidas as 18 subfrações foram denominadas MDC01, no qual a fração MDC01-F₇ (339,4 mg) e MDC01-F₈ (73,4 mg) foram reagrupadas e submetidas novamente a CC (126,3 g, 30,0 × 3,5 cm d.i.), utilizando as mesmas condições cromatográficas (Figura 25). As subfrações foram avaliadas por CCD e reagrupadas em novas 6 frações denominadas MDC02. Parte da subfração MDC02-F₂ (90 mg) ainda foi submetida a CLAE semipreparativa utilizando uma coluna com fase estacionária de C₁₈ (250,0 × 10,0 mm, 10 mm), sendo as subfrações monitoradas por CCD e CG-DIC, de onde foi possível isolar os alcaloides **8** (12,0 mg) e **14** (11,4 mg).

A subfração MDC02-F₃₋₄ (163,8 mg) foi submetida a CC (13,4 g, 20,0 × 1,5 cm d.i.), utilizando também como FE sílica para cromatografia *flash* (40–63 µm). A eluição foi feita no modo gradiente, utilizando como FM um sistema de solventes iniciando com hexano-CH₂Cl₂-NH₄OH (10:0:0,25) até 100% de CH₂Cl₂ e posteriormente CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25) com incrementos na mesma proporção até chegar em 100% de MeOH. As subfrações foram avaliadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de *R_f* e as 2 subfrações foram denominadas MDC03. Parte da fração MDC03-F₁ (52,7 mg) foi submetida a CCD preparativa, utilizando como FE sílica gel para CCDP (contendo indicador de fluorescência de UV₂₅₄) e como FM um sistema de solventes hexano-CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (2,4:6,6:1,0:0,25), de onde foi obtido o alcaloide **26** (14,4 mg) (Figura 25).

Figura 25. Fluxograma dos procedimentos cromatográficos.



Fonte: Autora.

5.4 Germinação de sementes de *S. spectabilis*

Inicialmente foram utilizadas sementes coletadas em junho de 2020, que foram selecionadas e escarificadas manualmente (lixa n. 80) para avaliar o processo de germinação. Posteriormente as sementes foram cultivadas em terra vegetal orgânica, e deixadas em ambiente arejado sem incidência direta de sol com rega uma vez ao dia ao longo de 75 dias. O aparecimento de radículas e cotilédones foi observado a partir do quarto dia de germinação, sendo observada a germinação ao final de uma semana.

As plântulas foram acompanhadas ao longo de 75 dias, sendo que a cada 15 dias um lote de 20 plântulas foram colhidas e separadas em folhas, caules e raízes, trituradas com o auxílio de gral e pistilo e submetidas à extração com CHCl_3 , na proporção de 10 mL do solvente por grama de material vegetal, e sonicado em ultrassom por 30 minutos em temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida o material vegetal remanescente foi extraído com EtOH (20 mL), utilizando o mesmo procedimento.

Para avaliar se as plântulas (coletados nos diferentes períodos 15–75 dias) estavam

produzindo os alcaloides piperidínicos, os extratos dos diferentes órgãos foram submetidos à análise por CCD e a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As amostras foram preparadas na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

5.5 Micropropagação das plântulas de *S. spectabilis*

As plântulas de *S. spectabilis* foram geradas por meio de sementes utilizando meio de cultura WP contendo 4% de glicose, 0,25% de gellex e pH ajustado para $6,0 \pm 0,05$. Os experimentos envolvendo micropropagação do material vegetal foram realizados sob supervisão da Prof. Dra. Adriana Aparecida Lopes da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

5.5.1 Preparo do meio de cultura Murashigue & Skoog (MS)

O meio de cultura foi preparado a partir de 10% solução-estoque Murashigue & Skoog (1962), previamente preparado e acondicionado em geladeira na temperatura de 4°C , gelificado com 0,25% de Gellex e 3% de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 e em seguida autoclavado a 121°C e 1,2 atm para completa esterilização.

5.5.2 Preparo do meio de cultura Wood Plant (WP)

O meio de cultura foi preparado a partir de 10% solução-estoque Lloyd e McCown (1981), previamente preparado e acondicionado em geladeira na temperatura de 4°C , gelificado com 0,25 % de Gellex e 4% de glicose, sendo o pH ajustado para 6,0 e em seguida autoclavado a 121°C e 1,2 atm para completa esterilização.

5.5.3 Preparo da solução antibiótico

A solução de antibiótico foi preparada a partir de fluconazol 1,0 g, ampicilina $1,0 \text{ mg g}^{-1}$, succinato sódico de clonafenicol 1,0 g, vixmicina 1,0 g, 7 ampolas de sulfato de gentamicina $40,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e 250 mL de água destilada.

5.5.4 Quebra da dormência das sementes

Para superar a dormência das sementes foram utilizados dois tratamentos, sendo o primeiro (S1) a escarificação química, que consistiu em deixar as sementes em ácido sulfúrico 96% por 45 minutos com agitação constante. Em seguida, as sementes foram transferidas para ambiente asséptico, lavagem com água destilada (5×300 mL) e secas em papel toalha. O segundo tratamento (S2), constituiu na imersão das sementes em etanol 70% para desinfecção superficial. Em seguida, as sementes foram escarificadas (em ambiente asséptico) com lixa n. 80 do lado oposto ao hilo até o aparecimento do endosperma e posteriormente imersas em solução fungicida Cercobin® por 45 minutos sob agitação constante.

5.5.5 Cultivo *in vitro* de sementes de *S. spectabilis*

O cultivo *in vitro* das sementes de *S. spectabilis* foi realizado em frascos de vidro (130 mL) com 25 mL do meio de cultura (item 5.5.1) em câmara asséptica, com frascos vedados com tampa plástica de polipropileno e filme plástico. Em seguida, os frascos foram transferidos para sala de crescimento ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 18×6 h, claro $\times$ escuro), onde foram mantidas até a germinação e crescimento das plântulas. As plântulas com 30 dias (aproximadamente 5,0 cm) foram retiradas dos frascos e seccionadas em diferentes partes. Os segmentos nodais obtidos a partir das partes aéreas foram transferidos para outro frasco de cultura *in vitro* (em câmara de fluxo laminar), contendo meios de cultura previamente autoclavados. Os frascos com os explantes foram tampados e transferidos para salas de crescimento sob condições de temperatura e fotoperíodo controlados, como descrito anteriormente. Para estes experimentos foram utilizados explantes que germinaram e não apresentaram contaminação ao longo dos processos, além de meios de cultura e reguladores vegetais como:

- WP + 20 g L⁻¹ de glicose;
- MS + 20 g L⁻¹ de glicose;
- Gamborg (B5);
- MS + 2 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de IBA;
- WP + 20 g L⁻¹ de sacarose;
- MS + 20 g L⁻¹ de sacarose;

- MS + 30 g L⁻¹ de sacarose;
- MS + 2 mg L⁻¹ de BAP + GA3;
- MS + GA3.

5.6 Estudos biossintéticos

5.6.1 Experimentos de marcação isotópica utilizando plântulas de *S. spectabilis*

As plântulas de *S. spectabilis* com 2 meses (aprox. 8 cm de altura) foram transferidas para o meio WP basal suplementado com o precursor isotopicamente marcado: 1-¹³C-D-glicose (4% m v⁻¹). O meio de cultura WP foi suplementado com 1-¹³C-D-glicose (20,0 g L⁻¹), além de 2,5 g L⁻¹ de gellex com pH ajustado para 6,0 ± 0,05 (previamente autoclavado). Após a transferência as plântulas foram mantidas à 22 °C ± 3 °C durante 40 dias em fotoperíodo de 18 horas luz e 6 horas escuro.

5.6.2 Preparo dos extratos das plântulas

Após os períodos de 40 dias, as plântulas foram retiradas do meio de cultura, separadas em parte aérea (folhas e caules) e raízes, trituradas com o auxílio de gral e pistilo e submetidas à extração com CHCl₃, na proporção de 10 mL do solvente por grama de material vegetal, com sonicação em ultrassom por 30 minutos em temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido três vezes, e em seguida o material vegetal remanescente foi extraído com EtOH, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente. Os solventes das extrações foram removidos por destilação em evaporador rotativo sob pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. Os extratos foram submetidos a análise por espectrometria de massas, para verificação de incorporação dos precursores nos alcaloides piperidínicos.

5.6.3 Isolamento dos alcaloides piperidínicos das plântulas

Os extratos alcaloidicos, obtidos dos experimentos com o precursor marcado, foram submetidos a CLAE analítica C₁₈ (250,0 × 4,6 mm, 5 µm), com detector de *light scattering*, onde foram feitas injeções sucessivas e coletados os picos referentes aos alcaloides que foram analisados por CLAE-EM.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

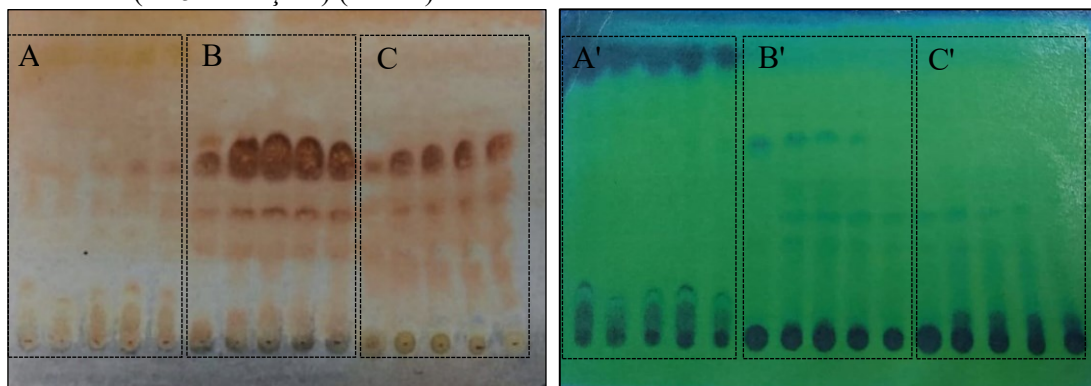
6.1 Estudo químico do extrato etanólico dos frutos verdes de *S. spectabilis*

O extrato etanólico (100,0 g) foi solubilizado em MeOH-H₂O (4:1, 600 mL), filtrado e em seguida submetido a extração líquido/líquido utilizando hexano (2,3 g), diclorometano (7,2 g) e acetato de etila (2,2 g). Com base nos valores das massas obtidas em cada uma das frações foi possível concluir que as substâncias presentes no extrato etanólico dos frutos verdes de *S. spectabilis* apresentam maior afinidade pelo diclorometano.

Para avaliar a eficiência do processo de extração e a presença dos alcaloides, as frações obtidas foram submetidas a CCD. As cromatoplasmas foram avaliadas em câmara de UV (254 e 365 nm) e reveladas com ICIpt. Foi utilizado hidróxido de amônio no sistema de solventes, para reduzir a retenção dos alcaloides na sílica (grupos silanóis) devido ao caráter básico dos alcaloides, o que dificulta a separação dessa classe de compostos quando sílica é utilizada como fase estacionária (Pivatto, 2010; Pivatto *et al.*, 2014).

Ao avaliar as cromatoplasmas das frações (Figura 26), foi observado manchas marrons características de alcaloides, principalmente nas frações de diclorometano (Figura 26B) e acetato de etila (Figura 26C). Essas manchas não foram observadas quando inspecionadas em câmara de UV 254 nm, o que indica a ausência de grupos cromóforos nesses alcaloides. A partir da avaliação das placas, também foi possível constatar que a maior massa e o maior número de alcaloides estavam concentrados na fração CH₂Cl₂, assim ela foi selecionada para continuidade do estudo químico e foi submetida a cromatografia em coluna para purificação destes metabólitos.

Figura 26. CCD frações hexano (1^a–5^a extrações) (A e A'); diclorometano (1^a–5^a extrações) (B e B'); e acetato de etila (1^a–5^a extrações) (C e C').



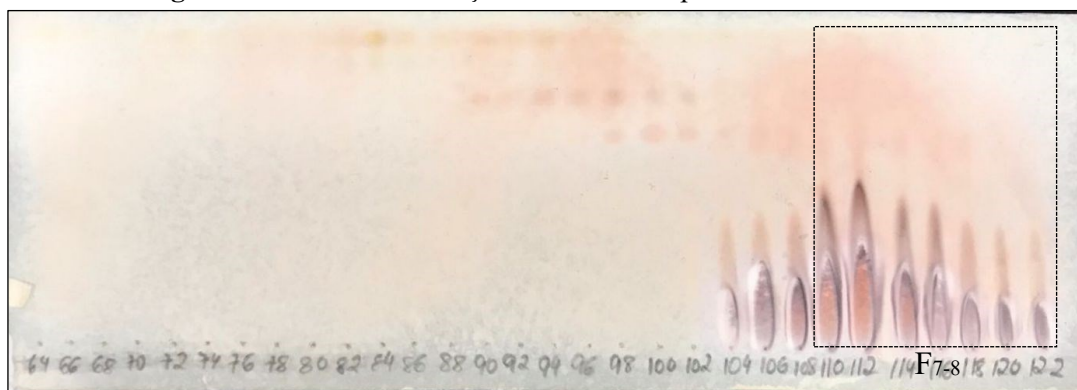
Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25), revelador ICIPt (A–C) e inspeção sob luz UV 254 nm (A'–C').

Fonte: Autora.

6.2 Isolamento dos alcaloides piperidínicos dos frutos verdes de *S. spectabilis*

Parte da fração alcaloídica (CH₂Cl₂, 2,0 g) foi submetida a CC para purificar os alcaloides piperidínicos (Item 5.3). Do processo denominado MDC01 foram coletadas 364 frações que foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f , assim como a cor e aspecto físico (Figura 27).

Figura 27. CCD das subfrações coletadas do procedimento MDC01.



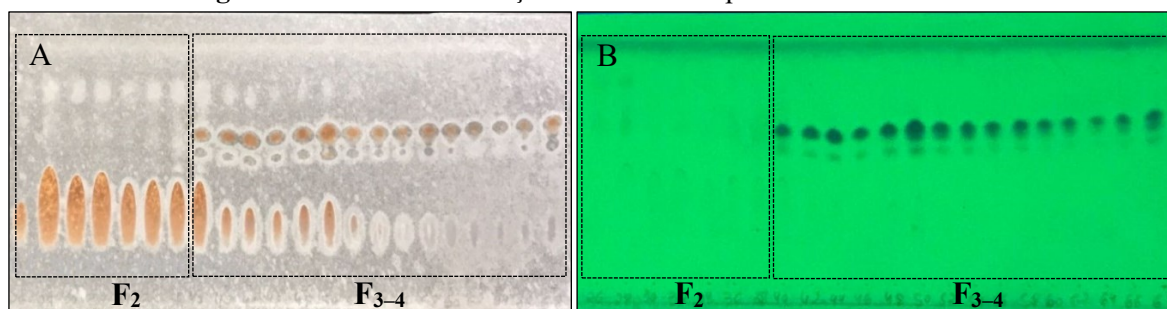
Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25) e revelador ICIPt.

Fonte: Autora.

As subfrações MDC01 F₇₋₈ foram reagrupadas e submetidas a nova cromatografia em coluna (MDC02). Desse procedimento foram coletadas 92 frações que foram analisadas por CCD e reagrupadas em seis subfrações de acordo com a similaridade nos valores de R_f (Figura 28). A subfração MDC02-F₂ apresentou uma mancha na cromatoplaça (Figura 28A) e de acordo com os estudos que já temos realizado no grupo, com outros órgãos da espécie de

S. spectabilis, essa mancha deve ser referente a mistura de alcaloides homólogos **8/14** (Pivatto *et al.*, 2005; Pivatto *et al.*, 2014; Lacerda *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2018), o que foi confirmado pela análise de CLAE-ELSD (**8** (t_R 19,0 min) e **14** (t_R 25,6 min)) (Figura 29). Parte dessa fração (90,0 mg) foi submetida a CLAE semipreparativo, sendo as frações coletadas na ausência de detector e posteriormente analisadas por CCD (Figura 30) e CG-DIC (Figuras 31 e 32), de onde foram isolados os compostos **8** (t_R 15,0 min, 12,0 mg) e **14** (t_R 16,6 min, 11,4 mg).

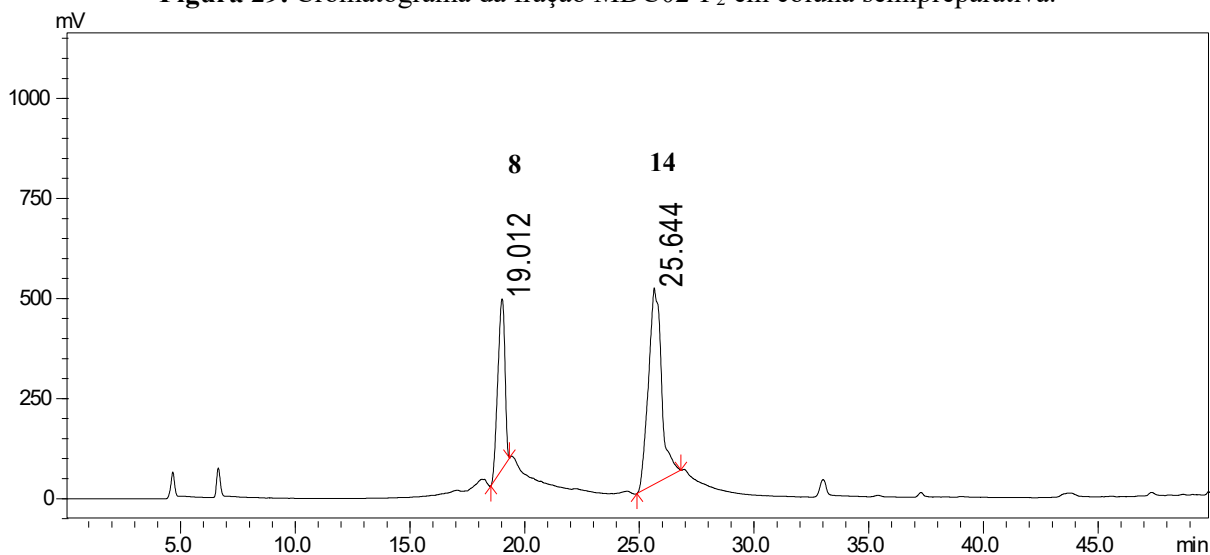
Figura 28. CCD das subfrações coletadas do procedimento MDC02.



Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25). Revelador ICIPt (A), inspeção sob luz UV 254 nm (B).

Fonte: Autora.

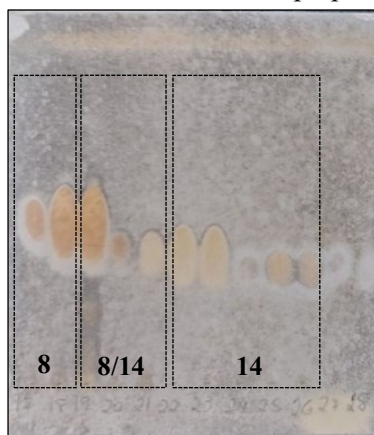
Figura 29. Cromatograma da fração MDC02-F₂ em coluna semipreparativa.



Condições: Coluna Phenomenex® C₁₈ (250,0 × 10,0 mm, 10 μm), gradiente (50 min), 35–100% de MeOH-HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg mL⁻¹, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 2,0 mL min⁻¹ e detector ELSD.

Fonte: Autora.

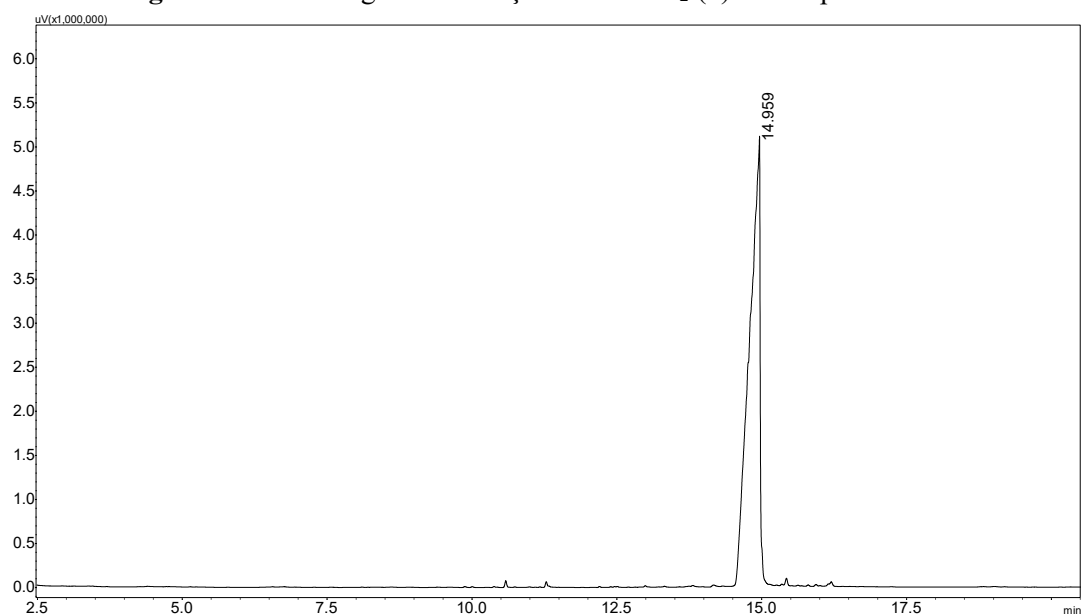
Figura 30. CCD das frações coletadas na CLAE semipreparativa da subfração MDC02-F₂.



Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25) e revelador ICIPt.

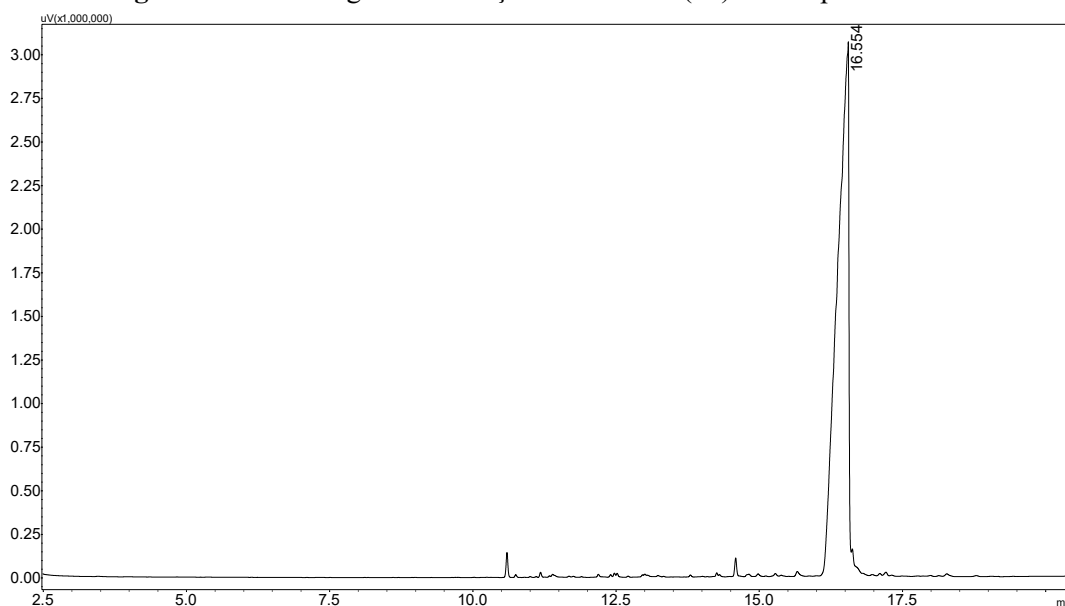
Fonte: Autora.

Figura 31. Cromatograma da fração MDC02-F₂ (8) obtido por CG-DIC.



Fonte: Autora.

Figura 32. Cromatograma da fração MDC02-F₂ (14) obtido por CG-DIC.



Fonte: Autora.

Dando continuidade ao estudo químico, a subfração MDC02-F₃₋₄ foi submetida a cromatografia em coluna (MDC03) (item 5.3), sendo coletadas 99 subfrações que foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f (Figura 33).

Figura 33. CCD das subfrações coletadas do procedimento MDC03.

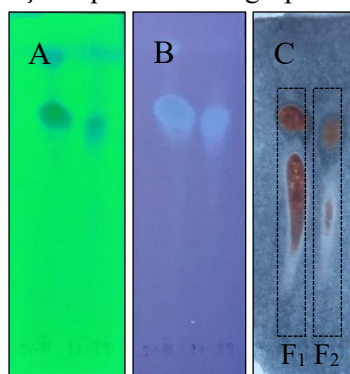


Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25) e revelador ICIpt.

Fonte: Autora.

As subfrações reagrupadas MDC03-F₁ (71,5 mg) e MDC03-F₂ (31,7 mg) foram submetidas a análise por CCD, inspecionadas em câmara de UV 254 e 366 nm e posteriormente reveladas com ICIpt (Figura 34), o que permitiu observar a presença de duas manchas com diferentes valores de R_f , que apresentavam absorção no UV e também revelavam com o reagente de ICIpt, sugerindo que esses alcaloides apresentavam grupo cromóforo. Assim, parte da subfração MDC03-F₁ (52,7 mg), foi submetida a CCDP.

Figura 34. CCD das subfrações que foram reagrupadas do procedimento MDC03.

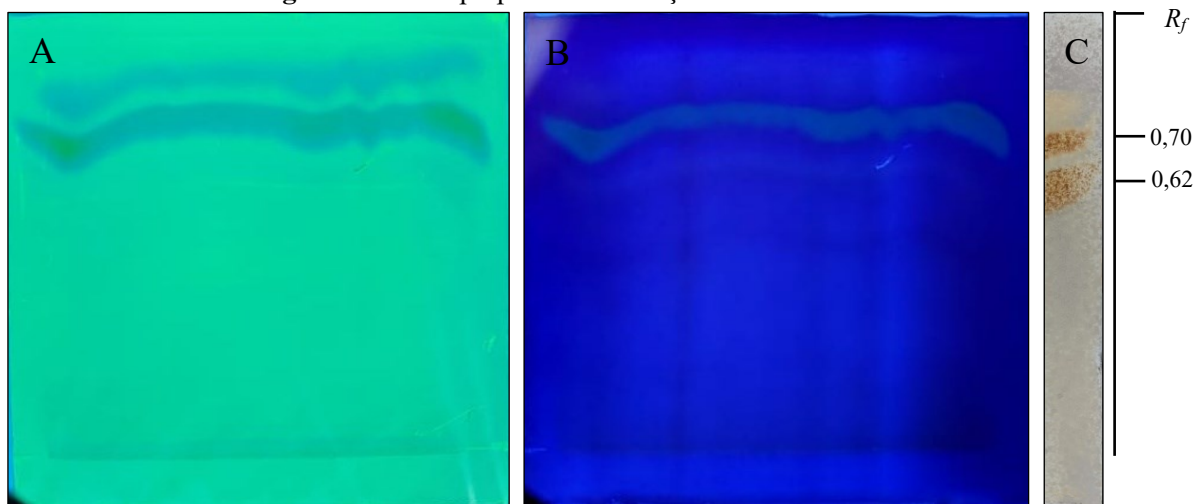


Nota: FE: sílica, FM: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH (9:1:0,25); inspeção sob luz UV 254 nm (A) e 366 nm (B); e revelador ICIPT (C).

Fonte: Autora.

Para acompanhar a eficiência da separação por CCDP, parte da placa foi revelada com ICIPT (Figura 35C), o que permitiu observar a separação de dois alcaloides, **26** (R_f 0,70), que absorve na região do UV 254 e 366 nm e revela com ICIPT, e possivelmente a mistura dos homólogos **8** e **14** (R_f 0,62), que só é observado com revelador de ICIPT. Assim, foi efetuada a raspagem da sílica da placa e extração com metanol (3 ×) em ultrassom (15 min), para obtenção do alcaloide **26**.

Figura 35. CCD preparativa da fração MDC03-F₁.

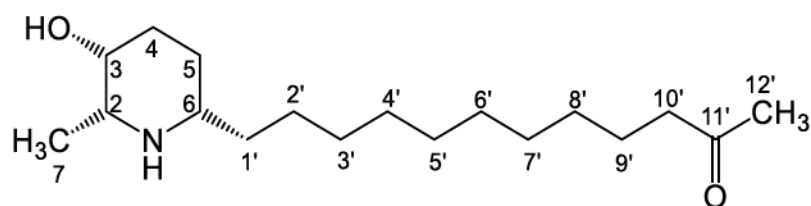


Nota: FE: sílica gel para CCDP com indicador de fluorescência (UV 254 nm), FM: CH₂Cl₂-hexano-MeOH-NH₄OH (6,6:2,4:1,0:0,25); inspeção sob luz UV 254 nm (A) e 366 nm (B); e revelador ICIPT (C).

Fonte: Autora.

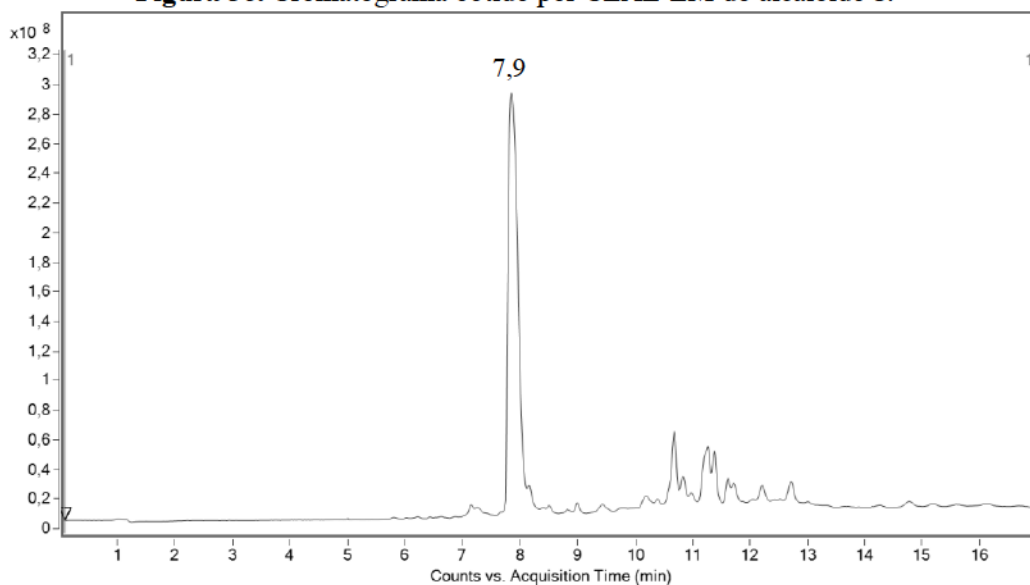
Os homólogos **8** e **14** e o alcaloide **26** foram analisados por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (EM-IES) e por ressonância magnética nuclear (RMN), para elucidação das suas estruturas.

6.2.1 Identificação do alcaloide 8

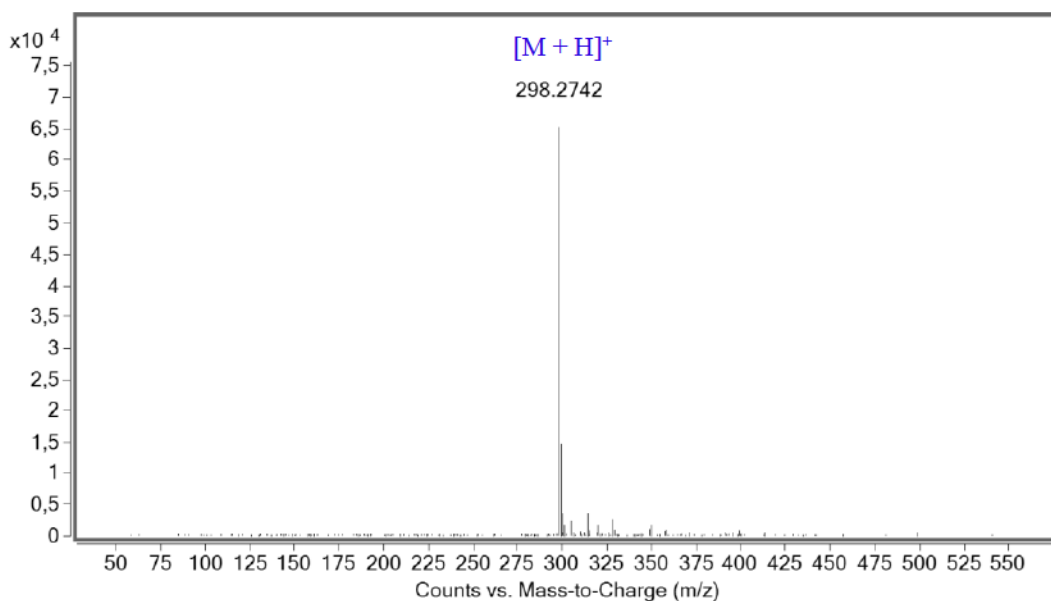


O alcaloide (–)-cassina (**8**) (12,0 mg) foi submetido à análise por CLAE-EM, o que permitiu observar um pico majoritário em t_R 7,9 min (Figura 36). A análise do EM-IES(+) em alta resolução possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{18}H_{35}NO_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 298,2742 $[M + H]^+$, calculado para $C_{18}H_{36}NO_2^+$, 298,2741 (Δ 0,33 ppm) (Figura 37).

Figura 36. Cromatograma obtido por CLAE-EM do alcaloide **8**.

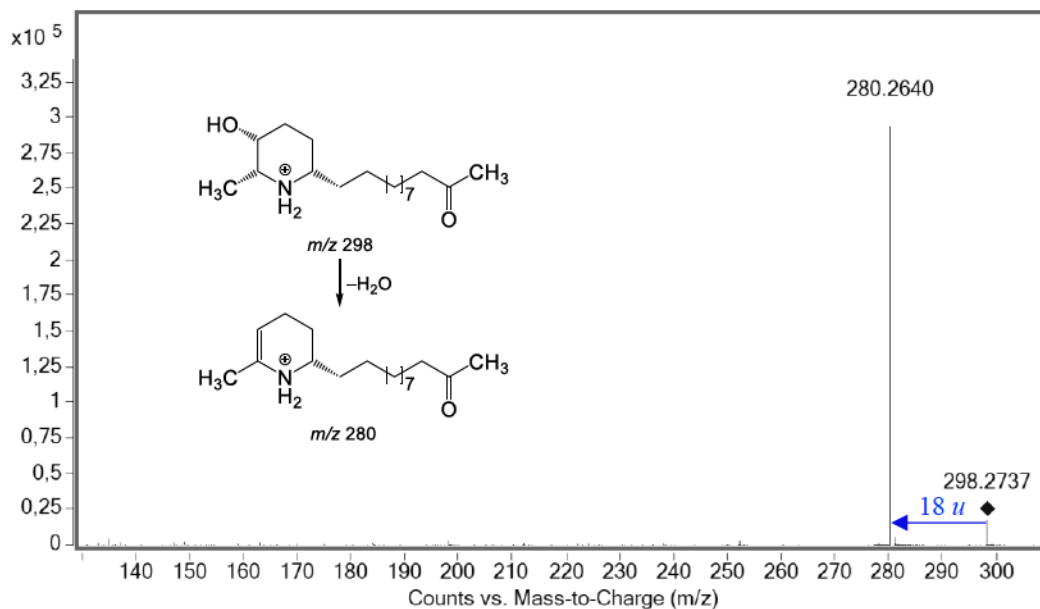


Condições: Coluna Agilent Zorbax C_{18} ($5,0 \times 2,1$ mm, $1,8 \mu m$), gradiente (17 min), 2–98% de MeOH- HCO_2H 0,1%; $C = 1,0$ mg mL^{-1} , $V_{inj.} = 1,0 \mu L$, fluxo $3,0$ mL min^{-1} e detector EM-IES(+).
Fonte: Autora.

Figura 37. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **8**.

Fonte: Autora.

A análise do espectro de EM/EM, obtido a partir da molécula protonada (m/z 298), permitiu observar o íon fragmento de m/z 280, cuja diferença (18 *u*) foi correlacionado à eliminação neutra de água (Figura 38).

Figura 38. EM/EM-IES-(+) do alcaloide **8** (25 eV).

Fonte: Autora.

A análise dos espectros de RMN ¹H de **8** (Tabela 1) (Apêndice A1–A2), iniciou pela caracterização do núcleo piperidínico trissubstituído. Assim, foi observado um duplo

quadrupletto em δ 3,13 (1H, $J = 6,1$ e $1,3$ Hz), referente ao H-2. Um dupletto em δ 1,42 (3H, $J = 6,1$ Hz), que foi atribuído a metila (H-7), que apresentou acoplamento (^3J) com H-2 no mapa de contorno COSY (Apêndice A3–A5), confirmando a posição da metila no C-2. Em δ 3,78 (1H) foi observado um simpleto largo atribuído ao H-3, que apresentou correlação com H-2, H-4a e H-4b, no mapa de contorno COSY; também foram observados três multipletos em δ 1,54 (1H), 2,01 (1H) e 1,73 (1H), que foram atribuídos aos H-4a, H-4b e H-5, que apresentaram correlações entre si no mapa de contorno COSY, além de um multipletto em δ 2,88 (1H) que correlaciona com H-5, no mapa de contorno COSY, e foi atribuído à H-6. Ademais, o H-6 apresentou correlação no mapa de contorno COSY com H-5, H-1'a e H-1'b, indicativo de substituintes nessa posição (Tabela 1).

Para confirmação da cadeia lateral ligada ao anel piperidínico, foi observado um simpleto em δ 2,05 (3H) atribuído H-12' da metil cetona na extremidade da cadeia. No mapa de contorno HMBC (Apêndice A14–A16) foi observada correlação (^2J) entre o sinal δ 209,53, referente ao carbono carbonílico (C-11'), com o sinal δ 2,05 (H-12'), confirmando a posição desse grupo. No RMN ^{13}C , na região de δ 25,59–29,57, foram observados sete sinais (C-2'–C-8'), que foram correlacionados com os hidrogênios em δ 1,18 (m, H-2'–H-8') no mapa de contorno HSQC, além de quatro metilenos em δ 23,99 (C-9'), 33,39 (C-1') e 43,94 (C-10'), atribuídos com base nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT135 (Apêndice A6–A11). No mapa de contorno HMBC, também foi observada correlação (^2J) entre a carbonila (δ 209,53) e o tripleto em δ 2,33 (H-10'). Assim, a estrutura do composto **8** foi estabelecida a partir dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , além das correlações observadas nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC (Apêndice A3–A5, A12–A16). Esses dados estão de acordo com aqueles reportados na literatura (Pivatto *et al.*, 2014).

No equilíbrio conformacional do composto **8** o grupo OH ocupa a posição axial, que é favorável à ligação de hidrogênio intramolecular com o átomo de nitrogênio do núcleo piperidínico, devido aos substituintes metila (C-2) e cadeia linear (C-6), respectivamente, ocuparem posições equatorial. Assim, a constante de acoplamento de 1,3 Hz observada para o H-2 (dq em δ 3,13) que se refere ao acoplamento axial/equatorial (geralmente $J = 0$ –5 Hz) sugere que o H-2 está *cis* em relação ao H-3. Já para os sinais referentes aos H-5 e H-6 não foi possível observar desdobramento e consequentemente constante de acoplamento. No entanto, a comparação dos dados obtidos com aqueles da literatura indicam que o composto isolado tem a mesma estereoquímica da (–)-cassina.

Tabela 1. Dados de RMN do alcaloide **8** em CDCl₃.

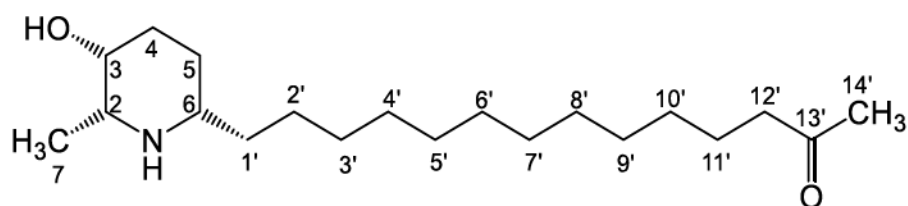
CC(=O)[C@H](CCCC[C@H](CCCC[C@H]1CC[C@@H](C1)O)C

Autora Pivatto <i>et al.</i>, 2014 Autora							
Posição	¹ H δ _H ^a mult. ^c (<i>J</i> em Hz)	¹³ C δ _C ^a (mult.) ^c	¹ H δ _H ^b mult. ^c (<i>J</i> em Hz)	¹³ C δ _C ^b (mult.) ^c	COSY	HSQC	HMBC
2	3,13 dq (6,1; 1,3)	57,07 (CH)	2,82 dq (6,5; 1,0)	56,20 (CH)	H-7, H-3	H-2	H-7
3	3,78 sl	66,46 (CH)	3,59 sl	68,04 (CH)	H-4a, H-4b, H-3	H-3	H-7
4a	1,54 m	30,73 (CH ₂)	1,51 m	32,11 (CH ₂)	H-4b	H-4a	
4b	2,01 m		1,91 m		H-4, H-3	H-4b	
5	1,73 m	22,24 (CH ₂)	1,50 m	25,78 (CH ₂)	H-6, H-4a	H-5	H-3
6	2,88 m	58,28 (CH)	1,40 m				
7	1,42 d (6,1)	15,94 (CH ₃)	2,59 m	57,60 (CH)	H-5, H-1'a, H-1'b	H-6	
1'a	1,61 m	33,39 (CH ₂)	1,16 d (6,5)	18,52 (CH ₃)	H-2, H-4a, H-4b	H-7	
1'b	1,94 m		1,40 m	36,71 (CH ₂)		H-1'a	
2'			1,50 m			H-1'b	
3'			1,30 m	25,99 (CH ₂)		H-2'	
4'				29,72 (CH ₂)		H-3'	
5'	1,18 m	25,59–29,57 ^d (CH ₂)	1,26 sl	29,64 (CH ₂)		H-4'	
6'				29,76 (CH ₂)		H-5'	
7'				29,60 (CH ₂)		H-6'	
8'				29,39 (CH ₂)		H-7'	
9'	1,48 qt (7,4)	23,99 (CH ₂)	1,56 m	29,95 (CH ₂)		H-8'	
10'	2,33 t (7,4)	43,94 (CH ₂)	2,41 t (7,0)	24,09 (CH ₂)	H-9	H-9'	
11'	–	209,53 (C)	–	44,04 (CH ₂)			H-10'
12'	2,05 s	29,98 (CH ₃)	2,12 s	209,63 (C)			H-10', H-12'
				30,07 (CH ₃)		H-12'	

^aExperimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ¹H e ¹³C, ^b500 e 125 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^cMultiplicidade: s (simpleto); d (duplete); t (triplete); q (quadruplete); qt (quintuplete); m (multiplete). As multiplicidades dos carbonos foram atribuídas com base nos espectros de DEPT. ^dValor atribuído com base no deslocamento químico calculado (ChemDraw Ultra v. 12) e podem estar interconvertidos dentro da coluna.

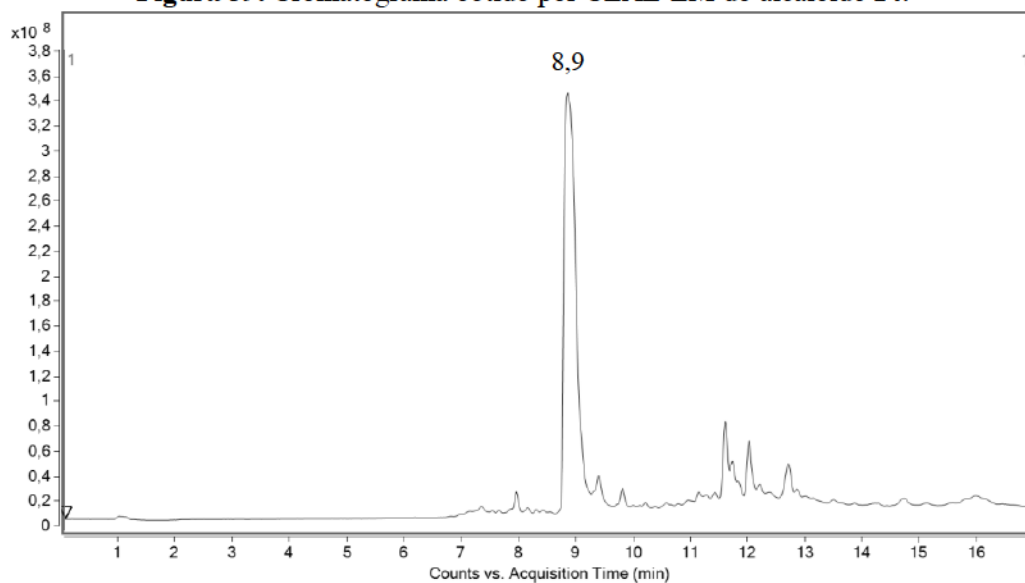
Fonte: Autora.

6.2.2 Identificação do alcaloide **14**

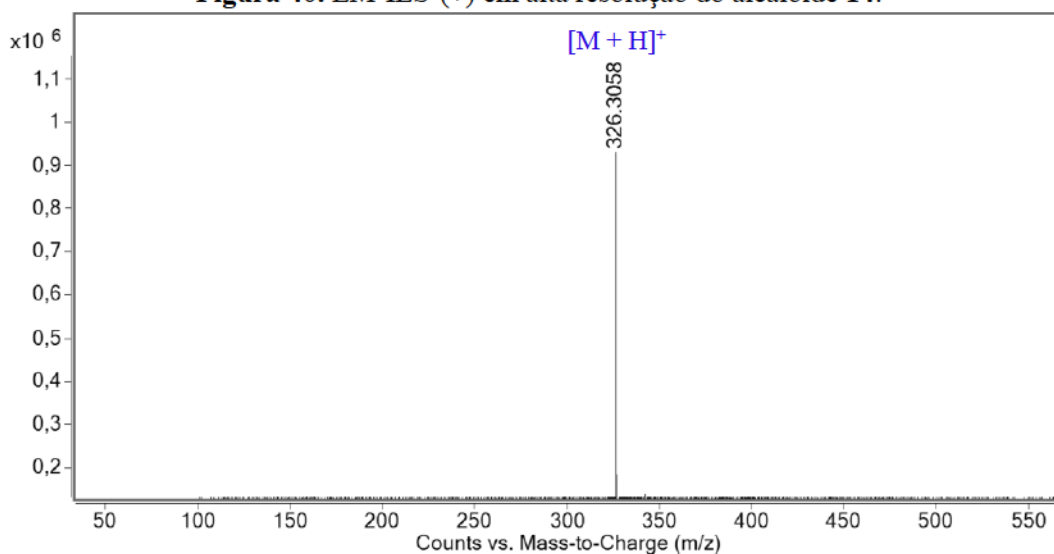


O alcaloide (–)-espectralina (**14**) (11,4 mg) foi submetido à análise por CLAE-EM, o que permitiu observar um pico majoritário em t_R 8,9 min (Figura 39). A análise do EM-IES(+) em alta resolução possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{20}H_{39}NO_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 326,3058 $[M + H]^+$, calculado para $C_{20}H_{40}NO_2^+$, 326,3054 (Δ 1,2 ppm) (Figura 40).

Figura 39. Cromatograma obtido por CLAE-EM do alcaloide **14**.

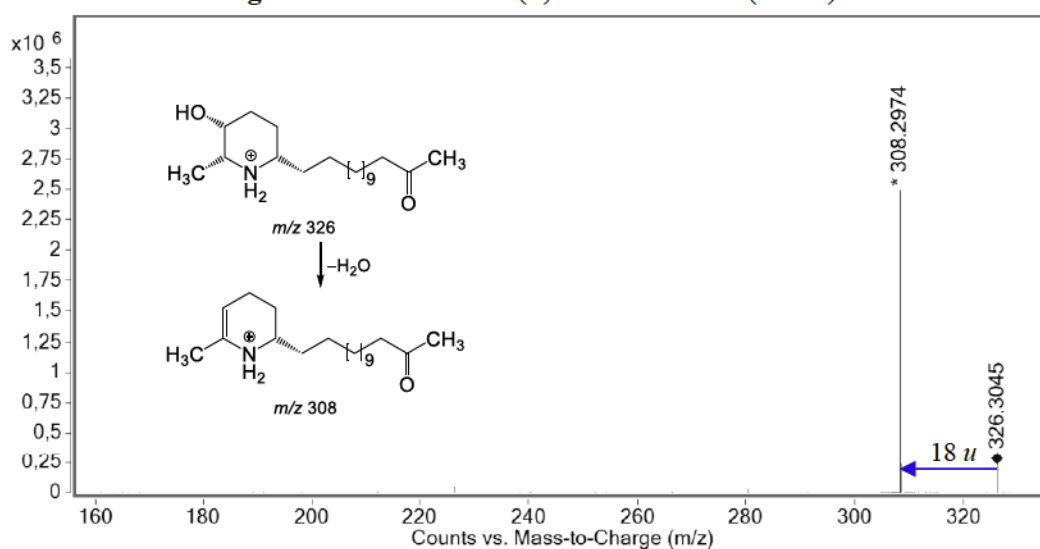


Condições: Coluna Agilent Zorbax C18 ($5,0 \times 2,1$ mm, $1,8 \mu m$); gradiente (17 min), 2–98% de MeOH- HCO_2H 0,1%; $C = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, $V_{inj.} = 1,0 \mu L$, fluxo $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e detector: EM-IES(+).
Fonte: Autora.

Figura 40. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **14**.

Fonte: Autora.

Ao ser submetido à análise por EM/EM, o sinal de m/z 326, gerou o íon fragmento de m/z 308, cuja diferença também foi correlacionada à eliminação neutra de água (18 u), indicando assim que o núcleo piperidínico de **14** é similar ao de **8** e que a diferença entre esses compostos está no tamanho da cadeia em C-6, diferindo em duas unidades metilênicas (Figura 41).

Figura 41. EM/EM-IES-(+) do alcaloide **14** (25 eV).

Fonte: Autora.

A análise dos espectros de RMN de **14** (Tabela 2) (Apêndice B) permitiu observar grande similaridade com os sinais do alcaloide **8**. No entanto, a cadeia carbônica lateral, conectada ao C-6 do núcleo piperidínico, apresentou duas unidades metilênicas adicionais, o

que também pode ser observado no espectro de RMN ^{13}C , na região de δ 29,32–29,71 (C-3'–C-10') (Apêndice B6–B8). A estrutura do composto **14** foi estabelecida a partir das correlações observadas nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC (Apêndice B3–B5; B12–B16), e está de acordo com os dados reportados na literatura (Pivatto *et al.*, 2014).

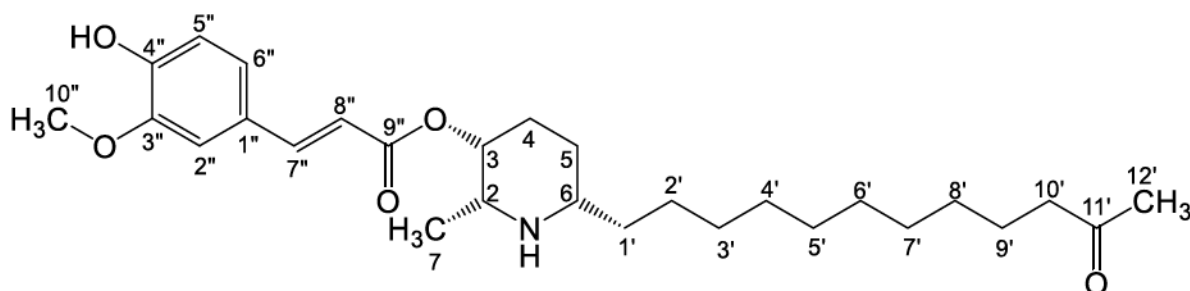
Tabela 2. Dados de RMN do alcaloide **14** em CDCl₃.

(-)-espectralina (14)							
Autora		Pivatto <i>et al.</i> , 2010			Autora		
Posição	¹ H δ _H ^a mult. ^c (J em Hz)	¹³ C δ _C ^a (mult.) ^c	¹ H δ _H ^b mult. ^c (J em Hz)	¹³ C δ _C ^b (mult.) ^c	COSY	HSQC	HMBC
2	3,16 q (6,1; 1,4)	57,34 (CH)	2,78 dq (7,0; 1,5)	56,35 (CH)	H-7, H-3	H-2	H-7
3	3,82 m	66,42 (CH)	3,59 sl	67,97 (CH)	H-4a, H-4b, H-2	H-3	H-7
4a	1,55 m	30,61 (CH ₂)	1,63 m	32,57 (CH ₂)	H-3, H-4a, H-5	H-4a	
4b	2,03 m		1,90 m		H-4b, H-3	H-4b	
5a	1,75 m	22,06 (CH ₂)	1,39 m	26,01 (CH ₂)	H-4a, H-4b, H-6	H-5a	
5b	1,85 m		1,52 m		H-4a, H-6	H-5b	
6	2,90 m	58,65 (CH)	2,58 m	57,79 (CH)	H-5, H-1'a, H-1'b	H-6	
7	1,49 d (6,1)	15,99 (CH ₃)	1,12 d (7,0)	18,16 (CH ₃)	H-2	H-7	
1'a	2,01 m	33,34 (CH ₂)	1,49 m	36,34 (CH ₂)	H-1'b	H-1'a	
1'b	1,70 m		1,35 m		H-1'a, H-2'	H-1'b	
2'	1,26 m	25,66 (CH ₂)	1,36 m	25,79 (CH ₂)	H-1'a	H-2'	
3'				30,51 (CH ₂)		H-3'	
4'				30,61 (CH ₂)		H-4'	
5'				30,70 (CH ₂)		H-5'	
6'				30,67 (CH ₂)		H-6'	
7'	1,19 m	29,32–29,71 ^d (CH ₂)	1,29 sl	30,67 (CH ₂)		H-7'	
8'				30,58 (CH ₂)		H-8'	
9'				30,24 (CH ₂)		H-9'	
10'				30,86 (CH ₂)		H-10'	
11'	1,49 d (6,1)	24,02 (CH ₂)	1,55 m	24,89 (CH ₂)	H-12'	H-11'	H-12'
12'	2,34 t (7,4)	43,97 (CH ₂)	2,46 t (7,0)	44,32 (CH ₂)	H-11'	H-12'	H-11', H-14'
13'	–	209,61 (C)	–	212,21 (C)			H-12', H-14'
14'	2,06 s	29,98 (CH ₃)	2,12 s	29,76 (CH ₃)	H-12'	H-14'	

^aExperimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ¹H e ¹³C, ^b500 e 125 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^cMultiplicidade: s (simpleto); d (duplete); t (triplete); q (quadruplete); qt (quintuplete); m (multiplete). As multiplicidades dos carbonos foram atribuídas com base nos espectros de DEPT. ^dValor atribuído com base no deslocamento químico calculado (ChemDraw Ultra v. 12) e podem estar interconvertidos dentro da coluna.

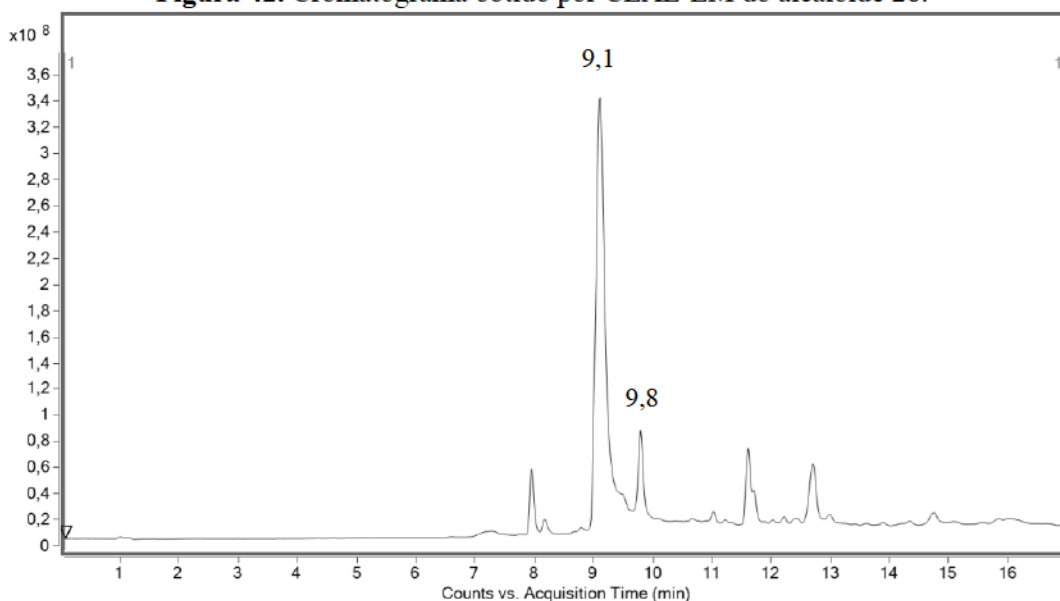
Fonte: Autora.

6.2.3 Identificação do alcaloide 26



O alcaloide 3-*O*-feruloilcassina (**26**) (14,4 mg) foi submetido à análise por CLAE-EM, que permitiu observar um pico majoritário com t_R 9,1 min (Figura 42). A análise do EM-IES-(+) em alta resolução possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{28}H_{43}NO_5$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a oito. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 474,3218 $[M + H]^+$, calculado para $C_{28}H_{44}NO_5^+$, 474,3214 (Δ 0,8 ppm) (Figura 43A).

Figura 42. Cromatograma obtido por CLAE-EM do alcaloide **26**.

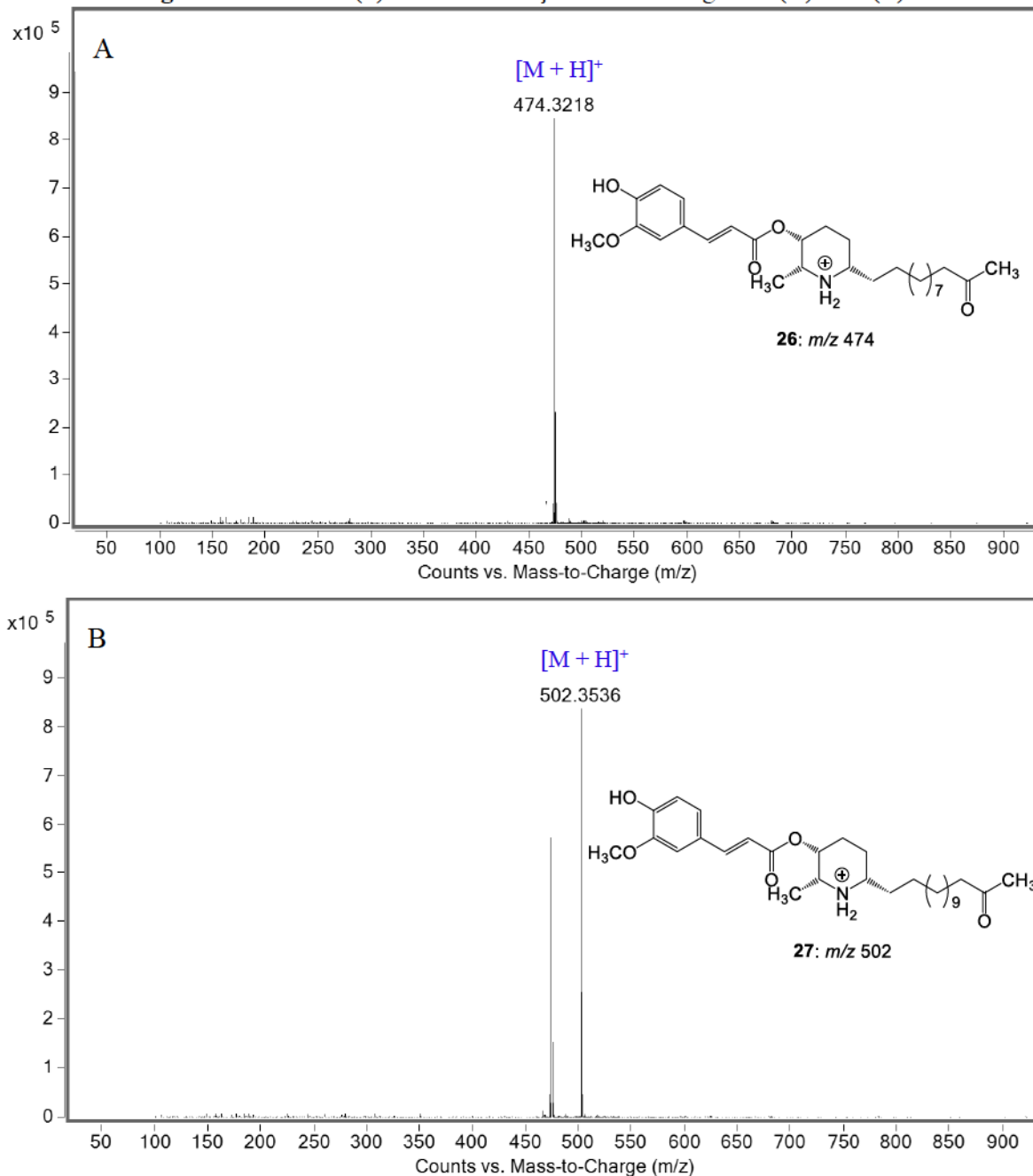


Condições: Coluna Agilent Zorbax C18 (5,0 × 2,1 mm, 1,8 μ m); gradiente (17 min), 2–98% de MeOH-HCO₂H 0,1%; C = 1,0 mg mL⁻¹, V_{inj.} = 1,0 μ L, fluxo 3,0 mL min⁻¹ e detector: EM-IES-(+).
Fonte: Autora.

Na análise do CLAE-EM-IES-(+) também foi observada a presença do homólogo 3-*O*-feruloilespectalina (**27**), no pico com t_R 9,8 min (Figura 42). A análise do EM-IES-(+) em alta resolução permitiu estabelecer a fórmula molecular $C_{30}H_{47}NO_5$, com índice de deficiência de

hidrogênio igual a oito. A molécula protonada apresentou um sinal em m/z 502,3536 $[M + H]^+$, calculado para $C_{30}H_{48}NO_5^+$, 502,3527 (Δ 1,8 ppm) (Figura 43B).

Figura 43. EM-IES-(+) em alta resolução dos homólogos **26** (A) e **27** (B).

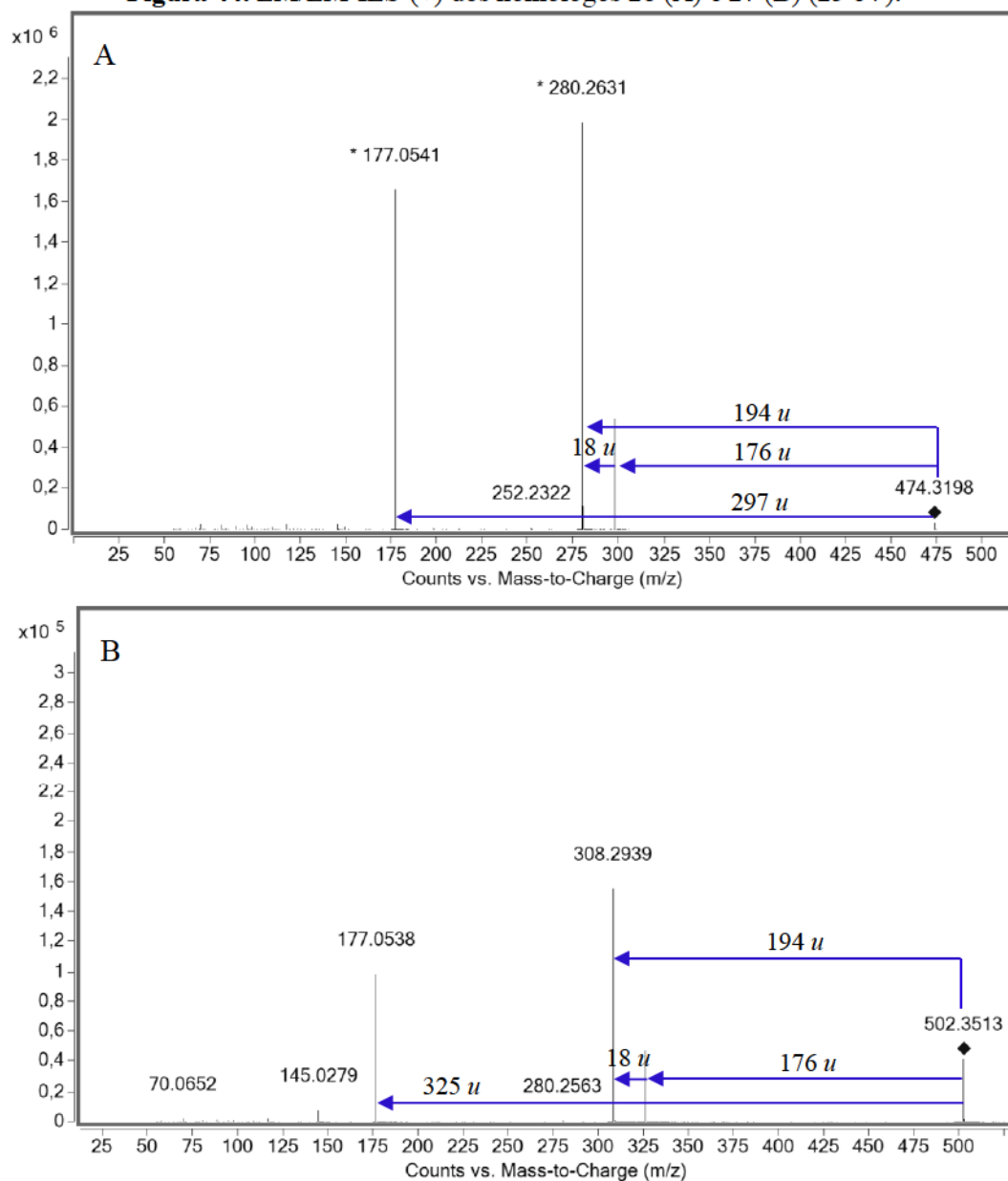


Fonte: Autora.

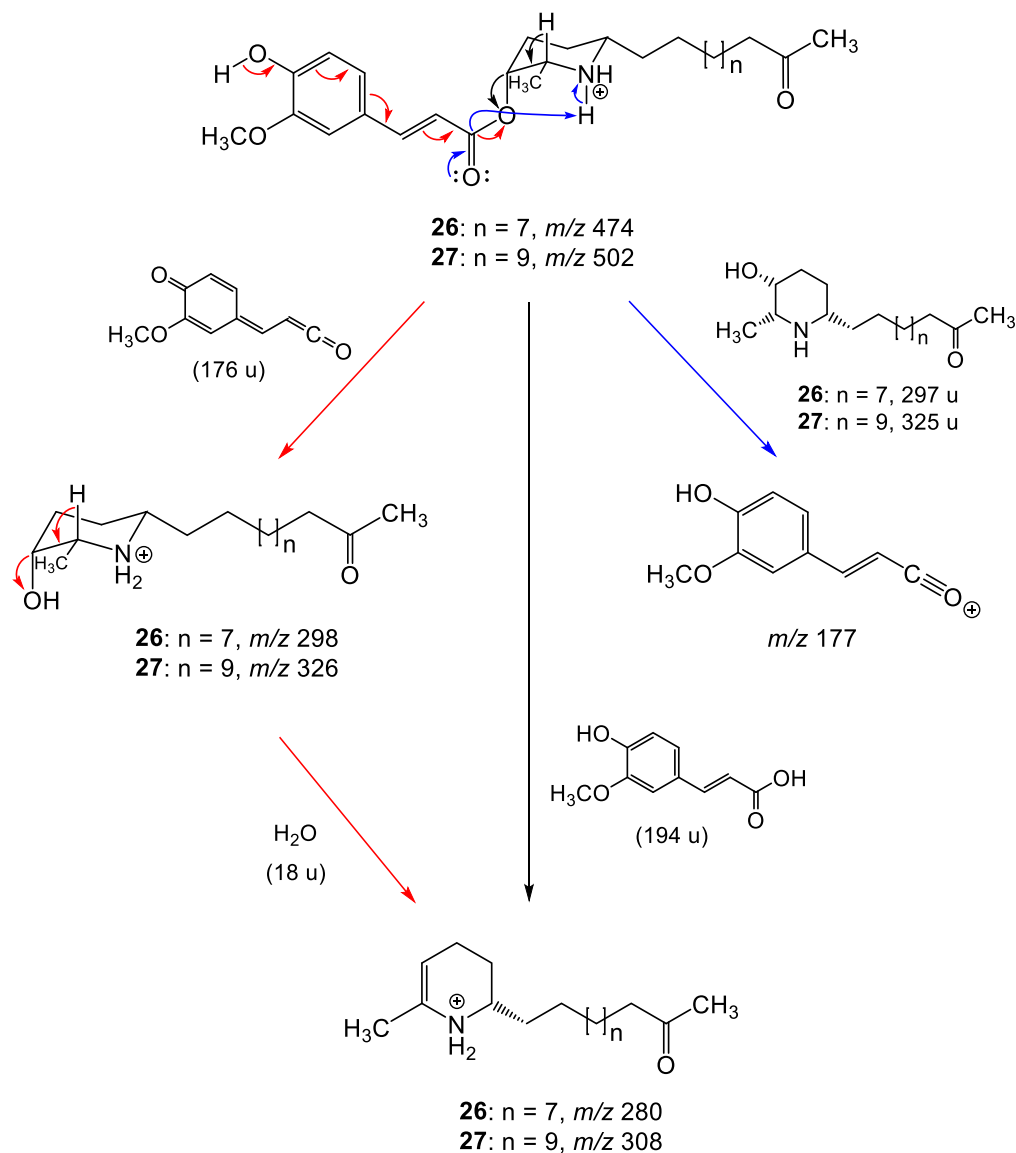
Quando o sinal de m/z 474 foi submetido à análise por EM sequencial, foram observados os fragmentos de m/z 298, 280 e 177 (Figura 44A). O íon fragmento de m/z 298 foi correlacionado a eliminação neutra do grupo feruloil (176 u) (Figura 45), seguido da eliminação neutra de água (18 u), para chegar no íon fragmento de m/z 280. A eliminação neutra do grupo

piperidínico (297 *u*) leva ao íon fragmento de *m/z* 177 (íon acílio). No EM/EM do homólogo 27 (Figura 44B) foi observado padrão de fragmentação semelhante ao de 26 (Figura 45).

Figura 44. EM/EM-IES-(+) dos homólogos 26 (A) e 27 (B) (25 eV).



Fonte: Autora.

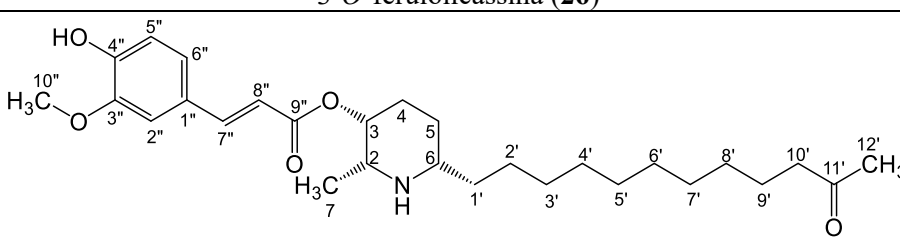
Figura 45. Proposta de fragmentação para os homólogos **26/27**.

Fonte: autora.

A análise dos espectros de RMN de **26** (Tabela 3) (Apêndice C) permitiu observar grande similaridade com os sinais do alcaloide **8**. Adicionalmente, foram observados dois dupletos em δ 6,41 (1H) e δ 7,81 (1H), atribuídos aos H-8'' e H-7'', com constante de acoplamento de 16,0 Hz (Apêndice A5–A8), sugerindo a presença do sistema de hidrogênios olefinicos vicinais com configuração *trans*. Sinais na região de 6,00–8,50 ppm indicaram a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Foi observado um simpleto largo em δ 7,11 atribuído ao H-2'', um duplete largo em δ 7,08 ($J = 8,2$ Hz) atribuído ao H-6'', que apresentou correlação com o duplete em δ 6,81 (H-5'', $J = 8,2$ Hz) no mapa de contorno COSY. Foi observado um sinal em δ 3,83 (3H, s), característico de metoxila (H-10''), que foi conectada

no C-3'' do anel aromático através da observação da correlação (^3J) com o sinal δ 146,97, no mapa de contorno HMBC (Apêndice C18–C23). O sinal em δ 148,28 (C-4''), bastante desblindado indica a presença de um substituinte eletronegativo nessa posição e de acordo com os dados da EM está condizente com uma hidroxila. Adicionalmente, a análise do mapa de contorno HMBC também permitiu observar a conexão do sistema olefínico com o anel aromático, através da correlação (^3J) observada entre o sinal δ 6,41 (H-8'') com o sinal δ 127,29 (C-1''), assim como a correlação dos sinais dos hidrogênios olefínicos H-7'' (δ 7,81) e H-8'' (δ 6,41) com o sinal da carbonila de éster (δ 166,77). Também foi observada a desproteção do sinal referente ao H-3 (1H, δ 5,02), devido ao efeito retirador de elétrons do grupo éster. Assim, essas informações corroboram a proposta de uma unidade feruloil conectada ao C-3 do anel piperidínico e suportam a estrutura do alcaloide 3-*O*-feruloilcassina.

Tabela 3. Dados de RMN do alcaloide **26** em CDCl₃.

3- <i>O</i> -feruloilcassina (26)							
							
Autora		Viegas Júnior <i>et al.</i> , 2007			Autora		
Posição	¹ H δ _H ^a mult. ^c (<i>J</i> em Hz)	¹³ C δ _C ^a (mult.) ^c	¹ H δ _H ^b mult. ^c (<i>J</i> em Hz)	¹³ C δ _C ^b (mult.) ^c	COSY	HSQC	HMBC
2	3,17 dq (6,1; 1,2)	55,14 (CH)	3,14 m	54,40 (CH)	H-7, H-3	H-2	H-7
3	5,02 sl	68,61 (CH)	4,99 sl	69,00 (CH)	H-3, H-4a, H-4b	H-3	H-7
4a	2,09 m	28,49 (CH ₂)	1,62 m	29,10–29,70 (CH ₂)	H-4b	H-4a	
4b	1,56 m		1,48 m		H-4a	H-4b	
5a	1,52 m	24,02 (CH ₂)	1,62 m	25,60 (CH ₂)	H-5a, H-1'a, H-1'b	H-5a	
5b	1,45 m		1,48 m			H-5b	
6	2,84 m	57,72 (CH)	2,80 m	56,90 (CH)	H-6, H-1'a, H-1'b	H-6	
7	1,30 d (6,5)	16,71 (CH ₃)	1,19 m	16,90 (CH ₃)		H-7	
1'a	1,61 m	34,53 (CH ₂)	1,48 m	34,90 (CH ₂)	H-6, H-1'a, H-6, H-2'	H-1'a	
1'b	1,82 m					H-1'b	
2'	1,25 m	25,84 (CH ₂)	1,26–1,18 sl	29,10–29,70 (CH ₂)	H-1'b	H-2'	
3'						H-3'	
4'						H-4'	
5'						H-5'	
6'						H-6'	
7'						H-7'	
8'						H-8'	
9'	1,66 m	24,27 (CH ₂)	1,48 m	23,80 (CH ₂)	H-10'	H-9'	H-10'
10'	2,32 t (7,5)	43,95 (CH ₂)	2,34 t (7,5)	43,80 (CH ₂)	H-9'	H-10'	
11'	–	209,53 (C)	–	209,60 (C)			H-10', H-12'
12'	2,05 s	29,98 (CH ₃)	2,06 s	29,81 (CH ₃)		H-12'	
1''	–	127,29 (C)	–	126,80 (C)			H-8'', H-5''
2''	7,11 sl	109,90 (CH)	7,06 sl	109,60 (CH)		H-2''	H-6''
3''	–	146,97 (C)	–	147,00 (C)			H-10'', H-2'', H-5''

4''	—	148,28 (C)	—	148,30 (C)			H-6'', H-5'', H-2''
5''	6,81 d (8,1)	123,69 (CH)	6,82 d (8,5)	114,90 (CH)	H-6''	H-5''	H-2''
6''	7,08 dl (9,0)	114,81 (CH)	7,00 dl (8,5)	123,30 (CH)	H-5''	H-6''	
7''	7,81 d (16,0)	146,31 (CH)	6,36 d (15,5)	114,90 (CH)	H-8''	H-7''	H-2'', H-6''
8''	6,41 d (16,0)	115,03 (CH)	7,68 d (15,5)	145,70 (CH)	H-7''	H-8''	
9''	—	166,77 (C)	—	166,70 (C)			H-8'', H-7''
10''	3,83 s	56,23 (CH ₃)	3,81 s	55,90 (CH ₃)		H-10''	

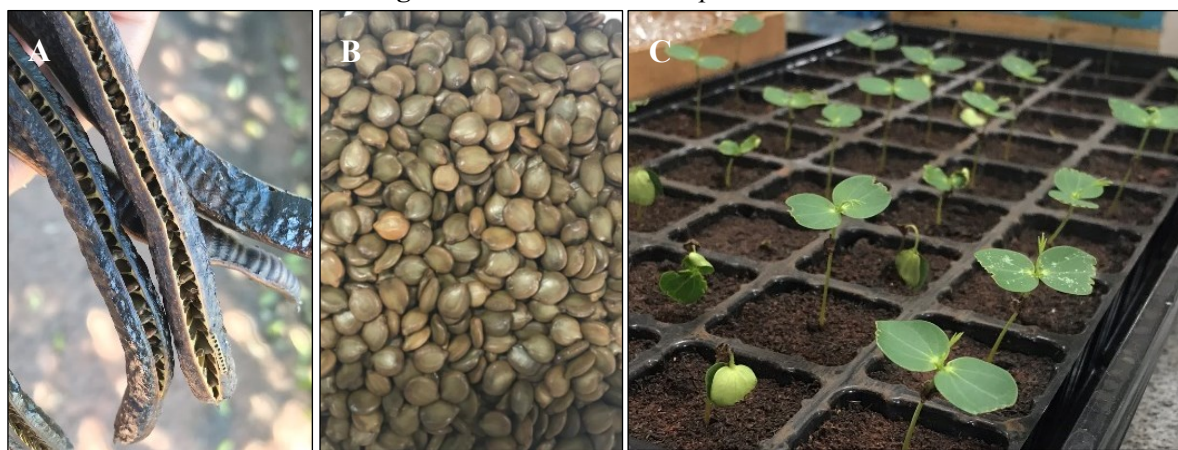
^aExperimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ¹H e ¹³C, ^b500 e 125 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^cMultiplicidade: s (simpleto); d (duplete); t (triplete); q (quadruplete); qt (quintuplete); m (multiplete). As multiplicidades dos carbonos foram atribuídas com base nos espectros de DEPT. ^dValor atribuído com base no deslocamento químico calculado (ChemDraw Ultra v. 12) e podem estar interconvertidos dentro da coluna.

Fonte: Autora.

6.3 Triagem da biossíntese dos alcaloides em *S. spectabilis*

Para obtenção das plântulas foram utilizadas sementes selecionadas de *S. spectabilis* (Figura 46 A–B), que foram deixadas ao sol por 2 semanas para secagem e maturação. Em seguida, para acelerar o processo germinativo, as sementes foram escarificadas manualmente (lixa n. 80), para quebrar a dormência exógena provocada pela impermeabilidade do tegumento à água, natural de espécies da família Fabaceae, e facilitar a absorção de água e oxigênio (Floriano, 2004). Em seguida as sementes foram colocadas em terra vegetal orgânica, ambiente arejado sem incidência direta de sol, e com rega uma vez ao dia ao longo de 75 dias. O aparecimento de radículas e cotilédones foi observado a partir do quarto dia de germinação, e na totalidade nas sementes com uma semana (Figura 46C).

Figura 46. Sementes de *S. spectabilis*.



Nota: Sementes nas vagens (A), sementes *in natura* (B), plântulas germinadas com quatro dias (C).
Fonte: Autora.

A cada intervalo de germinação (15 dias), um lote de plântulas foi colhido (20 unidades), separado em folhas, caules e raízes, triturados com o auxílio de almofariz e pistilo e submetidos à extração com CHCl_3 seguida de EtOH, utilizando sonicação em ultrassom (item 5.4). Após a extração, a solução resultante foi filtrada em papel de filtro. Foi possível observar maior massa dos extratos nas extrações com etanol (Tabela 4).

Tabela 4. Preparo dos extratos de *S. spectabilis* a partir das plântulas.

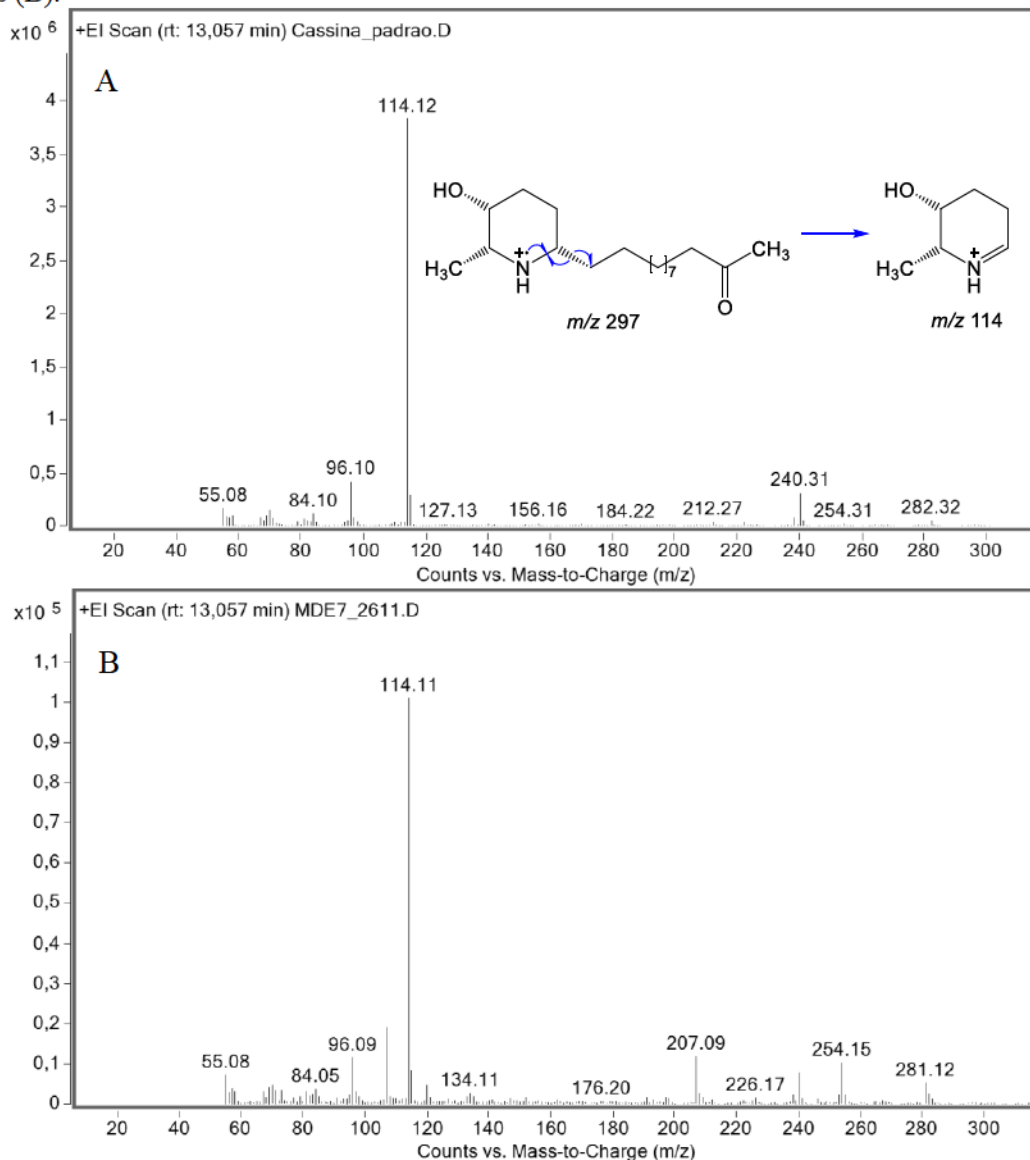
Parte vegetal	Material vegetal^a (g)	Período (dias)	Massa extrato CHCl₃ (mg)	Massa extrato EtOH (mg)
Folhas	1,4436	15	5,7	70,9
Caules	1,1692		1,9	38,7
Raízes	0,4179		1,0	8,6
Folhas	1,6747	30	10,5	76,4
Caules	1,4118		4,1	55,4
Raízes	0,3425		6,3	10,7
Folhas	2,3246	45	16,7	121,4
Caules	0,9629		3,8	55,3
Raízes	0,5920		1,0	20,0
Folhas	2,7843	60	14,7	33,9
Caules	1,0867		5,0	37,9
Raízes	0,5079		1,0	10,2
Folhas	4,7780	75	25,7	145,6
Caules	1,4555		7,3	56,8
Raízes	0,9593		3,3	27,7

^a20 Plântulas

Para avaliar se as plântulas, coletadas nos diferentes períodos, estavam produzindo os alcaloides, os extratos dos diferentes órgãos foram submetidos à análise por CCD, utilizando como revelador ICIPt. A análise das CCDs permitiu observar que os extratos em CHCl₃ exibiam manchas características dos alcaloides a partir de 45 dias (Figura 47-I-C, 1–3), sendo visualizados mais nitidamente nas folhas coletadas com 75 dias (Figura 47-I-E, 1), quando comparado com o padrão da mistura de alcaloides (–)-cassina/espectralina (**8** e **14**) (Figura 47- I, PC). O extrato etanólico das plântulas, ainda que tenha apresentado maiores massas nas extrações, não apresentou manchas características para alcaloides (Figura 47-II). Dessa maneira, os extratos em CHCl₃ e o padrão (–)-cassina/(–)-espectralina foram submetidos à análise por CG-EM.

O pico base de m/z 114 é um fragmento comum a esses homólogos e correspondente a eliminação da cadeia lateral em C-6 ($\bullet\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{COCH}_3$), via cisão homolítica (Freitas *et al.*, 2018).

Figura 49. EM-IE do alcalóide (–)-cassina (t_R 13,1 min) isolado (A) e no extrato CHCl_3 das folhas com 45 dias (B).

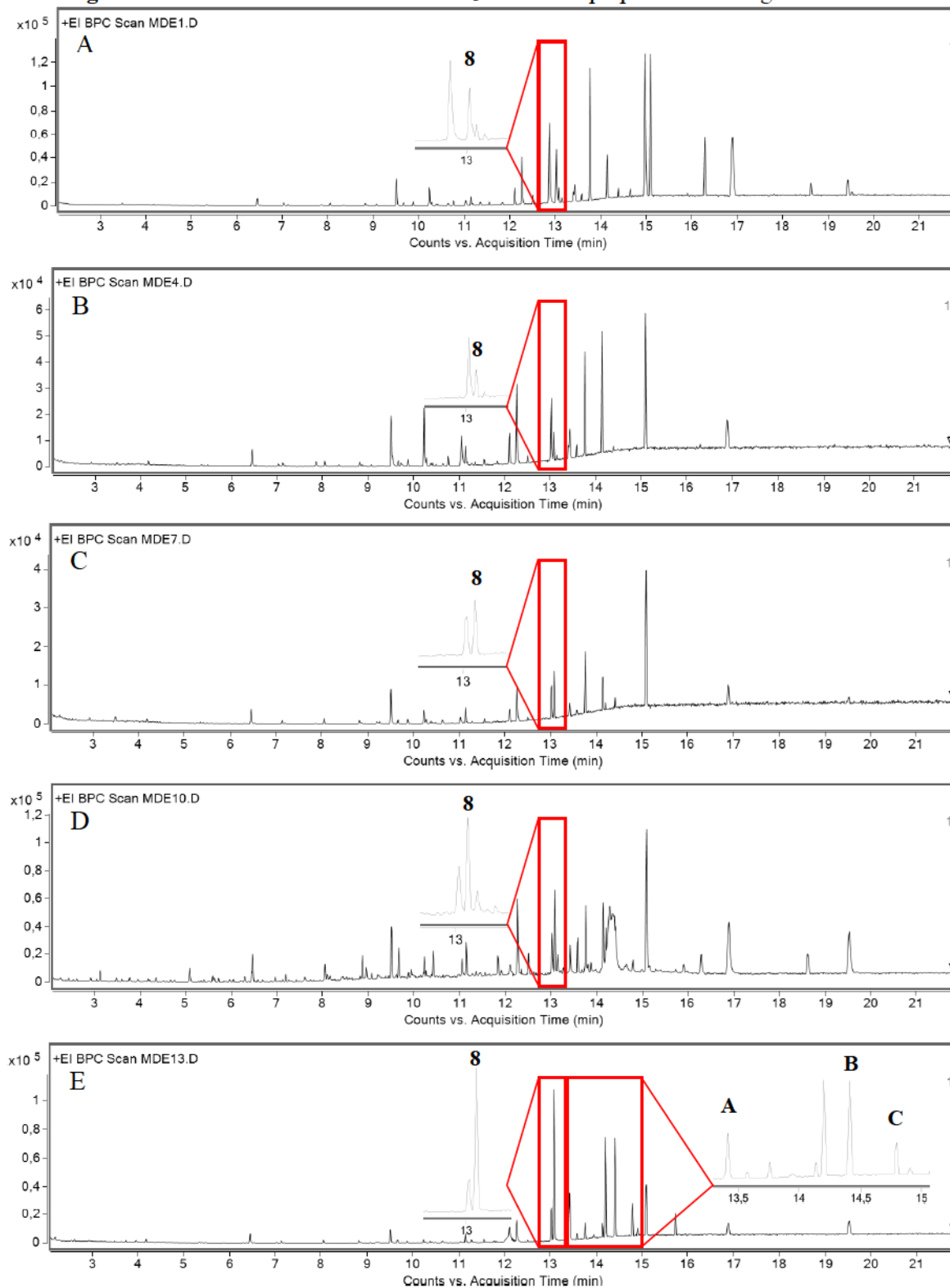


Fonte: Autora.

Assim, os homólogos **8** e **14** foram monitorados nos extratos em CHCl_3 ao longo do período de germinação (75 dias), sendo observado um aumento acentuado na área do sinal em t_R 13,1 min no extrato em CHCl_3 das folhas (Figura 50). No cromatograma do extrato em CHCl_3 das folhas (75 dias) (Figuras 50E), também foi possível observar três picos (t_R 13,4; 14,4 e 14,8 min), cujos espectros de massas apresentam o mesmo pico base (m/z 114), característico do

padrão de fragmentação dos alcaloides piperidínicos (Figuras 51) (Freitas *et al.*, 2018), corroborando a existência de outros metabólitos da mesma classe nos extratos das plântulas.

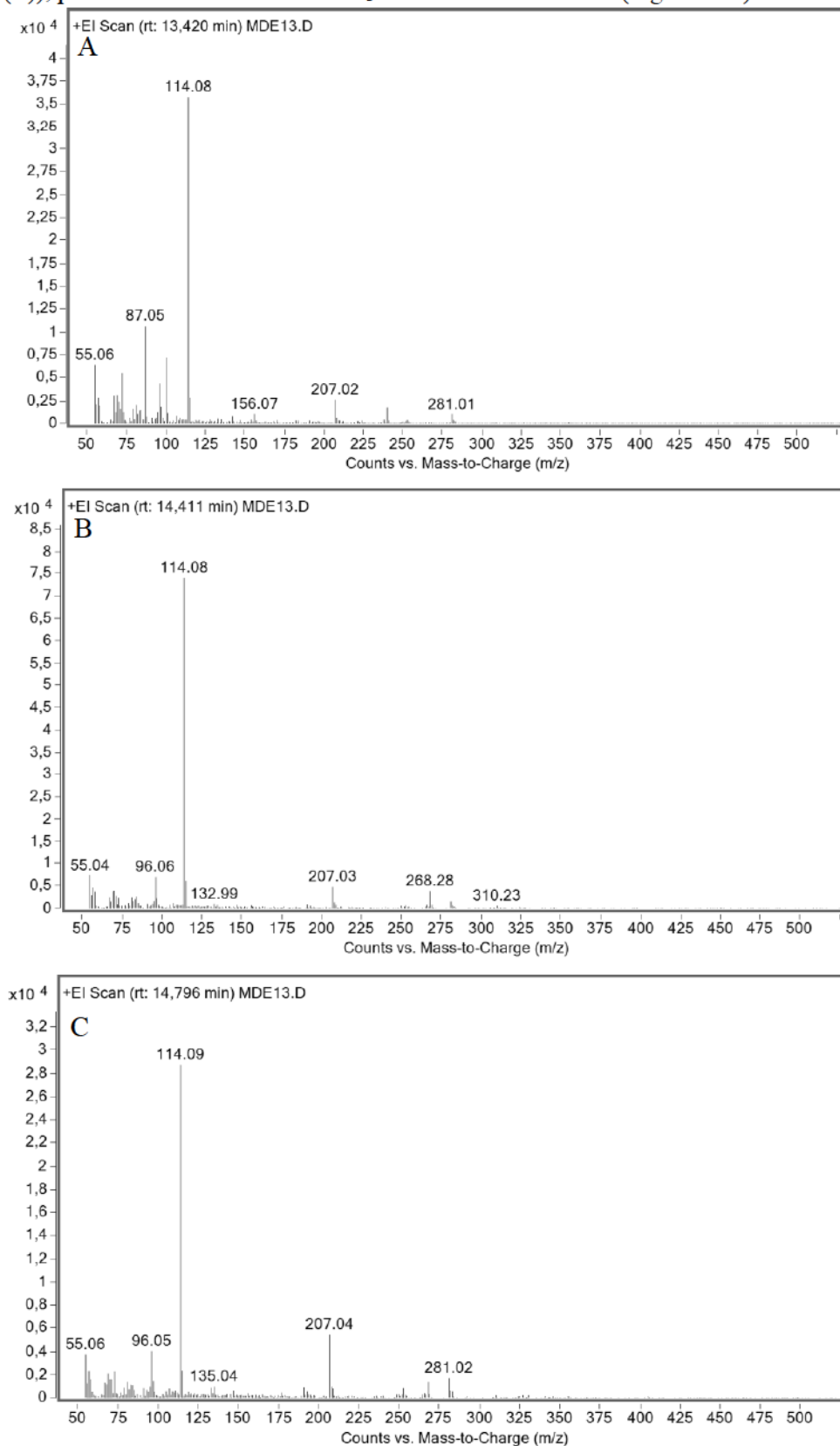
Figura 50. CG-EM dos extratos em CHCl_3 das folhas preparados ao longo dos 75 dias.



Nota: Plântulas: 15 dias (A), 30 dias (B), 45 dias (C), 60 dias (D) e 75 dias (E).

Fonte: Autora.

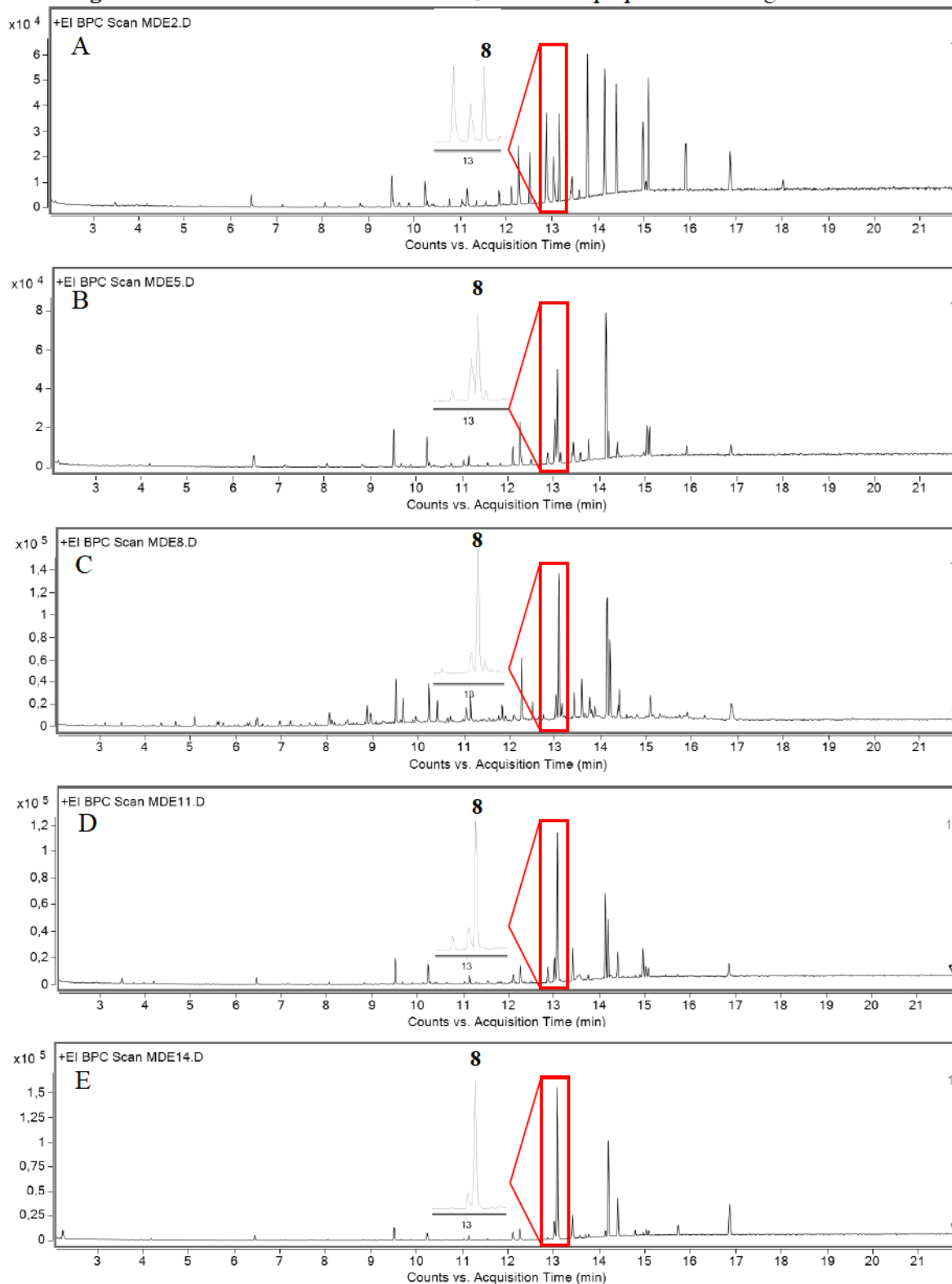
Figura 51. EM-IE de compostos da classe dos alcaloides piperidínicos (t_R 13,4 (A), 14,4 (B) e 14,8 min (C)), presentes no extrato em CHCl_3 das folhas com 75 dias (Figura 50E).



Fonte: Autora.

Nos extratos em CHCl_3 dos caules (Figura 52) e raízes também foi possível observar a presença do alcaloide **8**, sendo maior no período de 75 dias. (Figura 53).

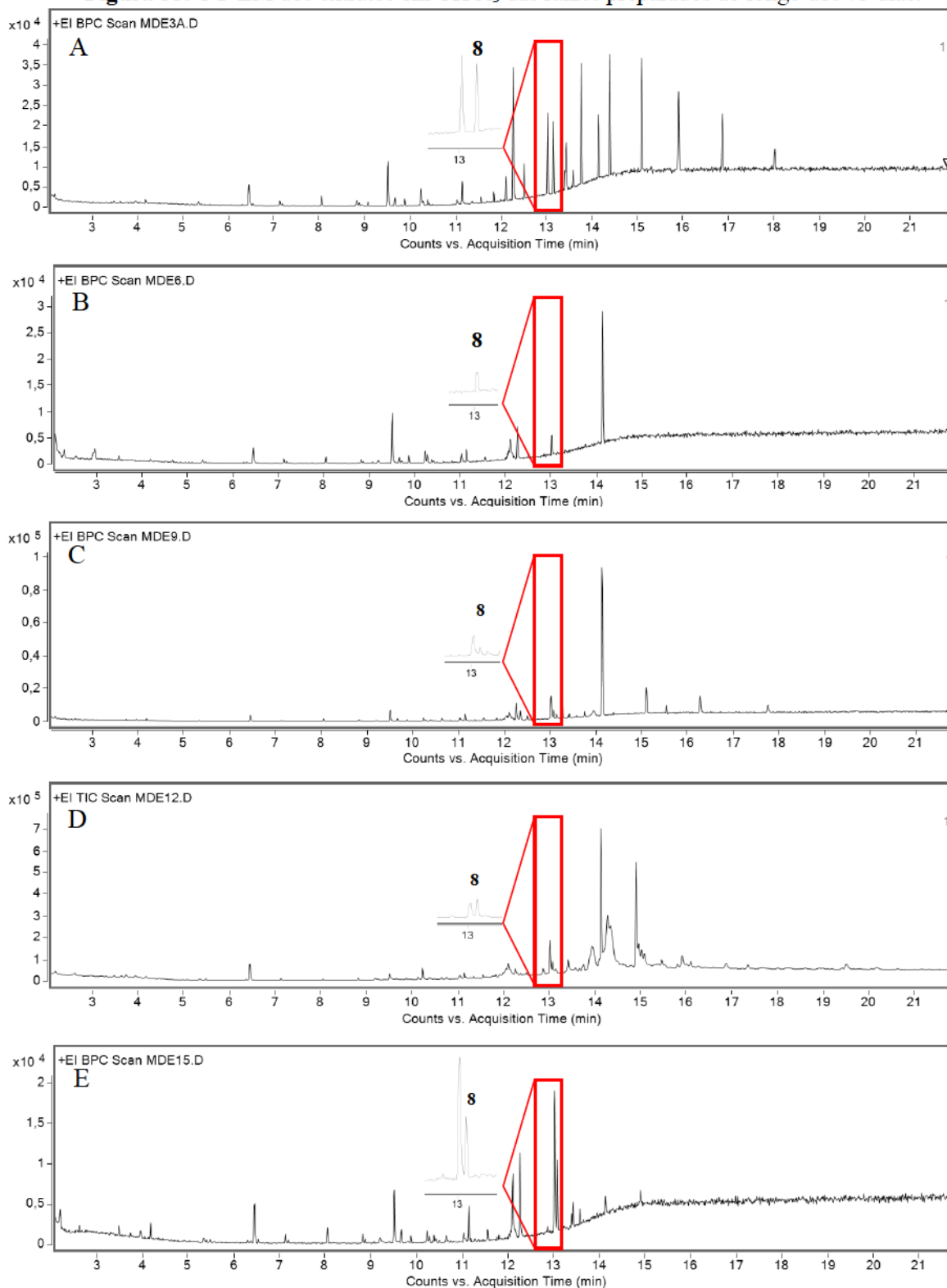
Figura 52. CG-EM dos extratos em CHCl_3 dos caules preparados ao longo dos 75 dias.



Nota: Plântulas: 15 dias (A), 30 dias (B), 45 dias (C), 60 dias (D) e 75 dias (E).

Fonte: Autora.

Figura 53. CG-EM dos extratos em CHCl_3 das raízes preparados ao longo dos 75 dias.



Nota: Plântulas: 15 dias (A), 30 dias (B), 45 dias (C), 60 dias (D) e 75 dias (E).

Fonte: Autora.

Com base nas análises cromatográficas e espectrométricas, da germinação das sementes

em diferentes períodos na terra (15–75 dias), foi observado que o metabolismo das plântulas, em relação à produção dos alcaloides piperidínicos, estava ativo a partir do 45º dia.

6.4 Cultivo *in vitro* de sementes de *S. spectabilis*

6.4.1 Superação da dormência das sementes

Os métodos de superação de dormência ocasionaram diferentes respostas em relação ao desenvolvimento das sementes (Figura 54) de *S. spectabilis*. O tratamento com imersão em ácido sulfúrico proporcionou baixa taxa de emergência (28%), enquanto a escarificação mecânica apresentou maior eficácia (64%), no entanto, como esse método é mais agressivo, acabou levando a contaminação por fungos, sendo necessário posteriormente a submissão das sementes em solução fungicida, para proteção das plântulas durante a fase inicial de desenvolvimento.

Figura 54. Germinação *in vitro* das sementes de *S. spectabilis*.



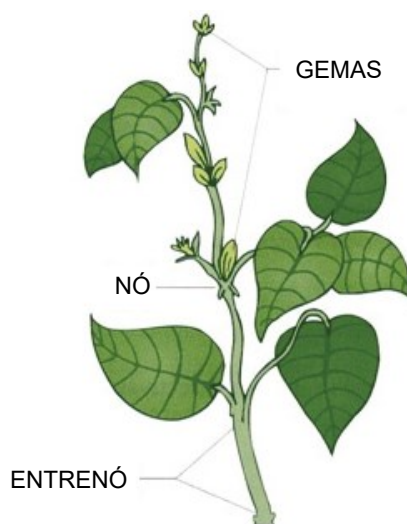
Nota: Emissão de radícula (A), sistema radicular (B) e plântula em desenvolvimento (C).
Fonte: Autora.

6.4.2 Estabelecimento do cultivo *in vitro* de *S. spectabilis*

Na primeira etapa do cultivo *in vitro*, todas as plântulas (S1 e S2) que foram mantidas no meio de cultura MS (Sado; Tavares; Chu, 2014), apresentaram amarelamento do meio de cultura, que é um indício de consumo de toda a fonte de energia e necessidade de transferência para um novo meio. A partir disso, segmentos nodais de S1 (oriundos da escarificação química)

foram obtidos de partes aéreas das plântulas, retirados da região próxima dos entrenós (1 cm acima do entrenó) (Figura 55) e transferidos para novo meio.

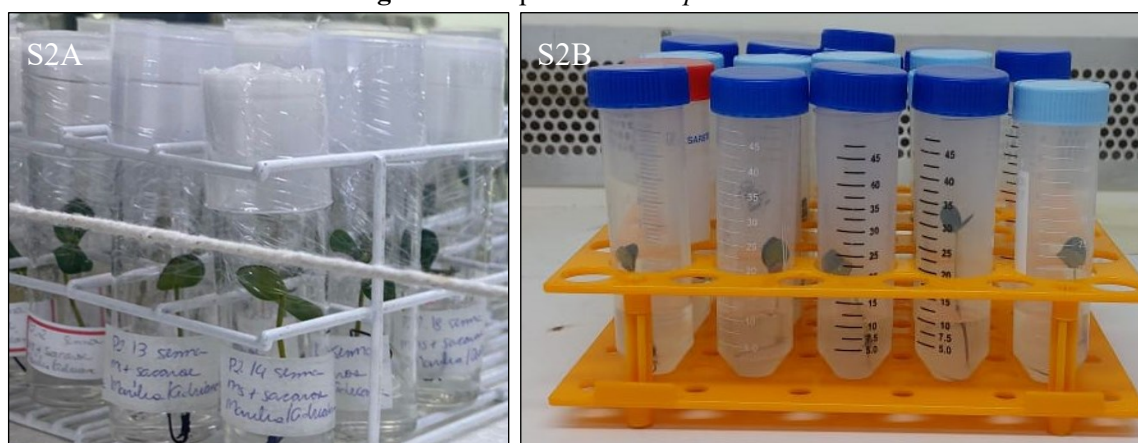
Figura 55. Anatomia da plântula de *S. spectabilis*.



Fonte: Autora.

O grupo S2 (oriundos da escarificação mecânica - lixa) foram divididos em S2A e S2B. O grupo S2A foi transferido para novo meio de cultura após a obtenção dos segmentos nodais, e o grupo S2B que havia apresentado contaminação, foi transferida para uma solução de antibiótico, onde permaneceu por 50 min. (Figura 56S2B), para eliminar as bactérias do cultivo *in vitro*. Em seguida, o grupo S2B também foi transferido para novo meio de cultura (Figura 56S2B).

Figura 56. Explantes de *S. spectabilis*.



Nota: Plântulas transferidas para novo meio de cultura (S2A), plântulas em solução com antibiótico (S2B).

Fonte: Autora.

Os explantes com aproximadamente 50 dias (Figura 57), ainda permaneceram com tecidos verdes e com suas folhas, que estavam mais expandidas com novos nós, gemas axilares e gemas apicais. A partir da análise visual, foi possível observar que os explantes do tratamento S1 (Figura 57S1) apresentaram crescimento mais saudável quando comparadas com aqueles do tratamento S2 (Figura 57A e B). Contudo os três grupos seguiram gerando novos segmentos nodais que foram inoculados em novos meios de cultura (Figura 57).

Figura 57. Explantes de *S. spectabilis* de 50 dias.



Nota: Plântulas germinadas via escarificação química (S1), plântulas germinadas via escarificação mecânica sem nenhum tratamento (S2A) e tratamento com antibiótico (S2B).

Fonte: Autora.

Na avaliação dos explantes cultivados após 90 dias, foi observado a morte de 80%

daqueles do grupo S1, 70% do grupo S2A e 100% do grupo S2B (Figura 58A). Assim, foi possível constatar que o meio de cultura utilizado, seguindo a metodologia descrita na literatura não era o mais adequado. A etapa de otimização das condições para o cultivo *in vitro* é complexa visto que cada espécie vegetal requer uma combinação específica de nutrientes, vitaminas e hormônios que propiciem o desenvolvimento saudável, assim foram necessários ajustes na metodologia. Dessa forma, dos explantes remanescentes (S1 e S2A) foram obtidos segmentos nodais a partir de um nó, dois nós e um nó com a folha seccionada, que foram transferidos para frascos maiores (Figura 58B), onde foram avaliados diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento (Tabela 5).

Figura 58. Explantes de *S. spectabilis* de 90 dias.



Nota: Explantes mortos (A) e explantes transferidos para novo meio de cultura (B).

Fonte: Autora.

Tabela 5. Tratamentos utilizados na indução de novos explantes *in vitro* a partir do cultivo de segmentos nodais de *S. spectabilis*.

Nº de tratamentos	Descrição
T1	Meio + 20 g L ⁻¹ de glicose (Basal)
T2	Meio WP + 20 g L ⁻¹ de sacarose
T3	Meio MS + 20 g L ⁻¹ de glicose (Basal)
T4	Meio MS + 2 mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de IBA
T5	Meio MS + 20 g L ⁻¹ de sacarose
T6	Meio MS + 30 g L ⁻¹ de sacarose
T7	Meio MS + 2 mg L ⁻¹ de BAP + GA3
T8	Meio MS + GA3
T9	Meio Gamborg (B5)

Após 30 dias dos novos tratamentos (120 dias de cultivo), os segmentos nodais cultivados em WP basal (T1) apresentaram maior taxa de sobrevivência e continuaram se desenvolvendo significativamente quando comparados aos segmentos dos outros tratamentos (T2–T9) (Tabela 5). Assim, foi possível inferir que o meio WP basal foi o meio de cultura mais apropriado para a germinação das sementes de *S. spectabilis*. Esses resultados foram importantes para viabilizar as novas culturas *in vitro*.

6.5 Estudos biossintéticos

6.5.1 Experimento *in vitro* de 1-¹³C-D-glicose

A glicose é um açúcar solúvel, encontrado em todo o reino vegetal e além de excelente combustível, é um precursor versátil responsável por um grande número de intermediários na biossíntese (Nelson; Cox, 2014). Além de fonte de energia e carbono tem função reguladora, influenciando em todas as fases do ciclo de vida da planta, interage com outras moléculas sinalizadoras e juntas controlam o crescimento e desenvolvimento da planta (Jeandet *et al.*, 2022). Em virtude disso, a 1-¹³C-D-glicose foi o primeiro precursor utilizado nos estudos de marcação isotópica para elucidar a biossíntese dos alcaloides piperidínicos de *S. spectabilis*.

Dessa forma, quinze plântulas sadias com 54 dias, foram transferidas para meio WP basal suplementado com o precursor marcado 1-¹³C-D-glicose, onde permaneceram 40 dias em

encubação. Em seguida, as plântulas (Figura 59) foram retiradas do meio, separadas em parte aérea e raízes e submetidas a extração utilizando clorofórmio e etanol, respectivamente (Item 5.6.2) (Tabela 6).

Figura 59. Experimento de marcação isotópica utilizando $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-glicose em plântulas de *S. spectabilis*.



Nota: Plântulas germinadas (A), plântula fora do meio (B), parte aérea e raízes (C).

Fonte: Autora.

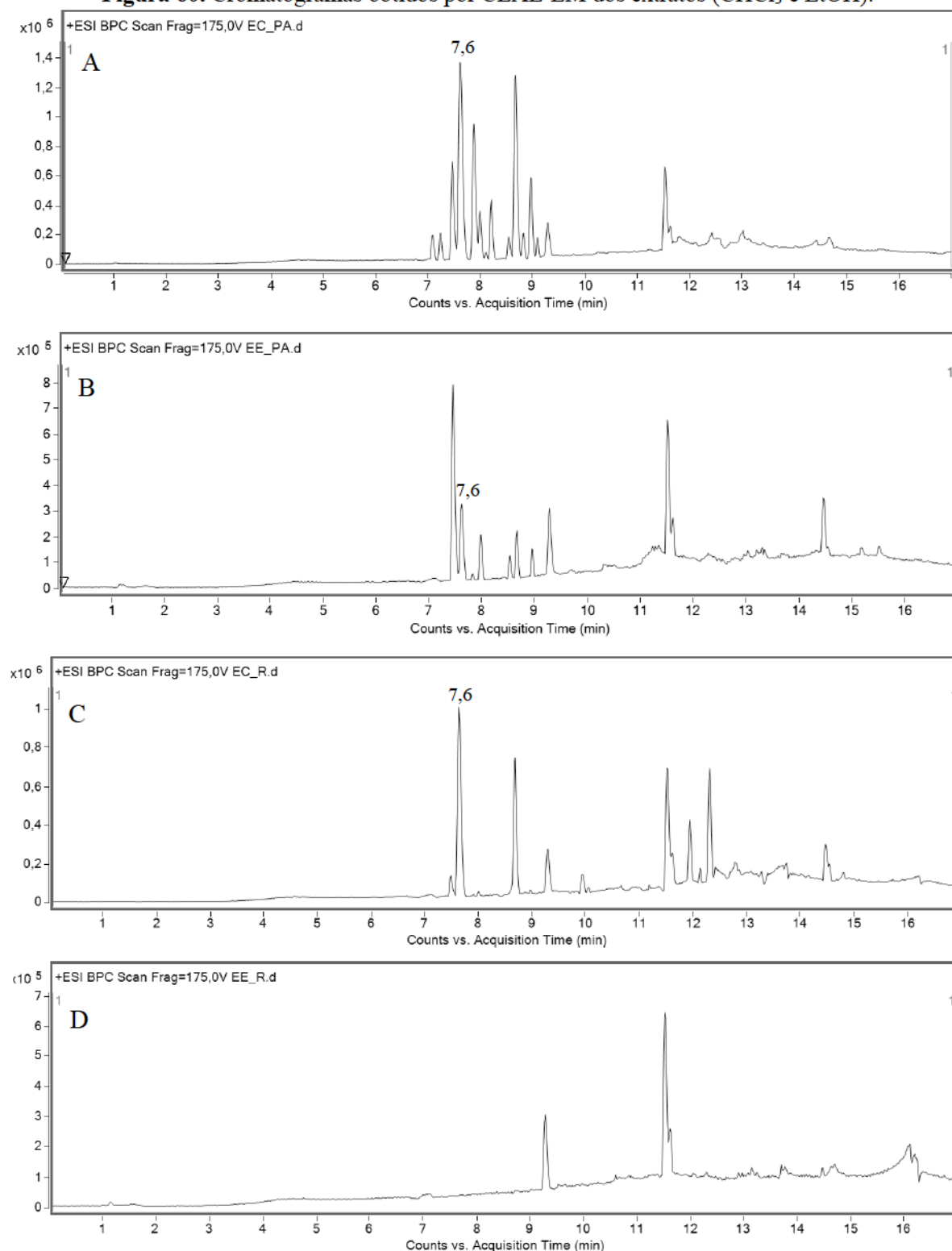
Tabela 6. Preparo dos extratos de *S. spectabilis* a partir das plântulas suplementadas com $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-glicose e controle.

Parte vegetal	Material vegetal ^a (g)	Extração com CHCl_3 (mg)	Extração com EtOH (mg)
Parte aérea	3,28 ^b	32,5	56,4
Raízes	4,76 ^b	7,7	89,4
Parte aérea	2,02 ^c	51,4	57,3
Raízes	5,91 ^c	26,5	130,4

^a15 Plântulas; ^b $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-glicose, ^ccontrole.

Após a obtenção dos extratos (CHCl_3 e EtOH) oriundos dos experimentos de marcação isotópica, estes foram submetidos as análises por CLAE-EM para avaliação da incorporação de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-glicose nos alcaloides piperidínicos. Os cromatogramas (Figura 60) apresentaram diferentes perfis cromatográficos, sendo o pico em t_R 7,6 min referente ao alcaloide **8** e presente nos extratos em clorofórmio (EC-PA) e etanol (EE-PA) das partes aéreas e em clorofórmio das raízes (EC-R) (Figura 60A–C).

Figura 60. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM dos extratos (CHCl_3 e EtOH).



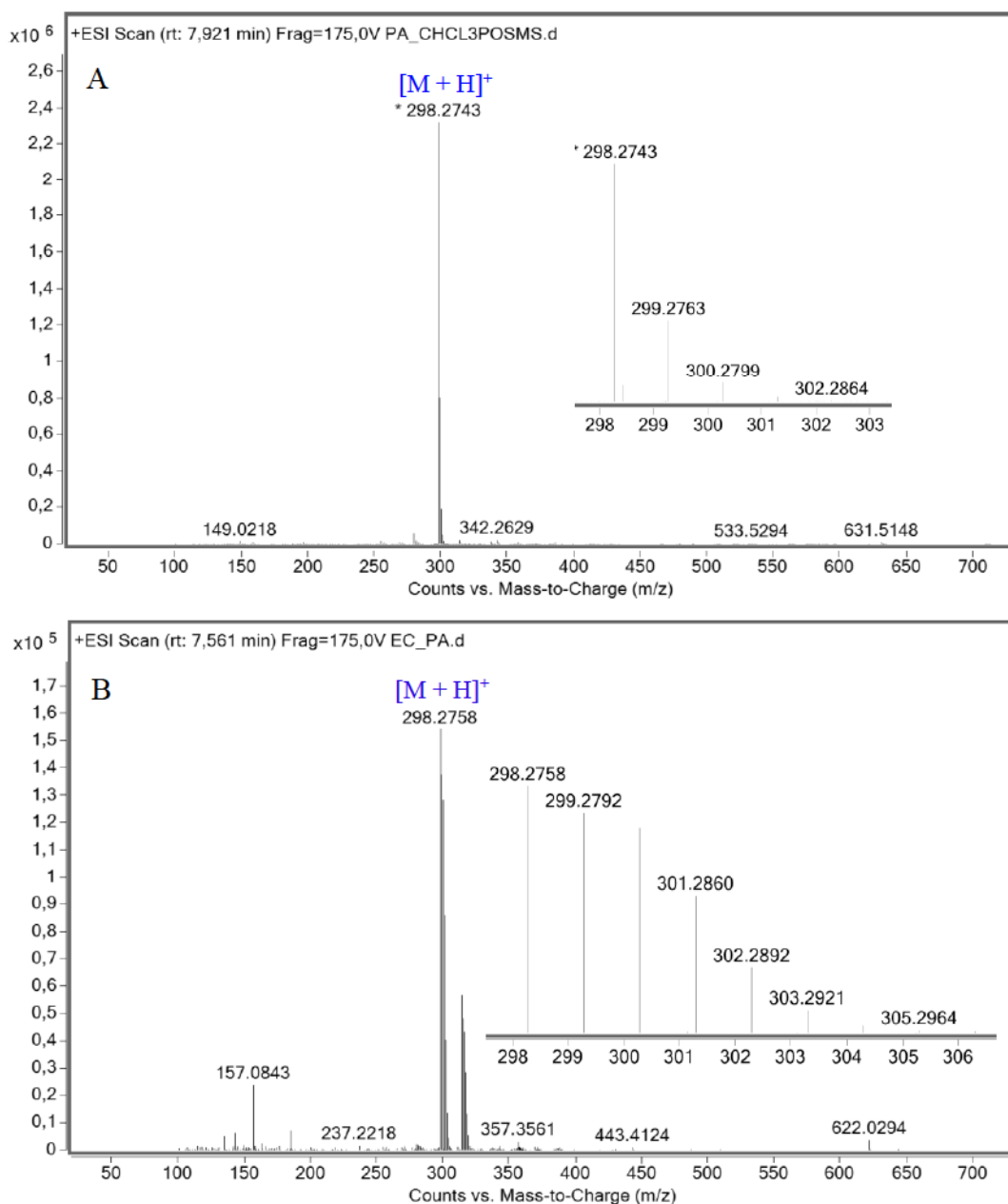
Condições: Coluna Agilent Zorbax C18 (5,0 × 2,1 mm, 1,8 μm); gradiente (17 min), 2–98% de MeOH-HCO₂H 0,1%; C = 1,0 mg mL⁻¹, V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo 3,0 mL min⁻¹ e detector de EM-IES(+).
Nota: Perfil cromatográfico dos extratos EC-PA (A), EE-PA (B), EC-R (C) e EE-R (D).

Fonte: Autora.

No EM do extrato em CHCl_3 das partes aéreas, na região de m/z 298, referente a

molécula protonada do alcaloide **8** $[M + H]^+$, foi possível observar um padrão isotópico com aumento na intensidade dos sinais $[M+1 + H]^+$, $[M+2 + H]^+$, $[M+3 + H]^+$, etc (Figura 61B), quando comparado com o EM do alcaloide **8** sem marcação (Figura 61A), indicando que houve incorporação.

Figura 61. EM-IES(+) do alcaloide **8** em EC-PA.



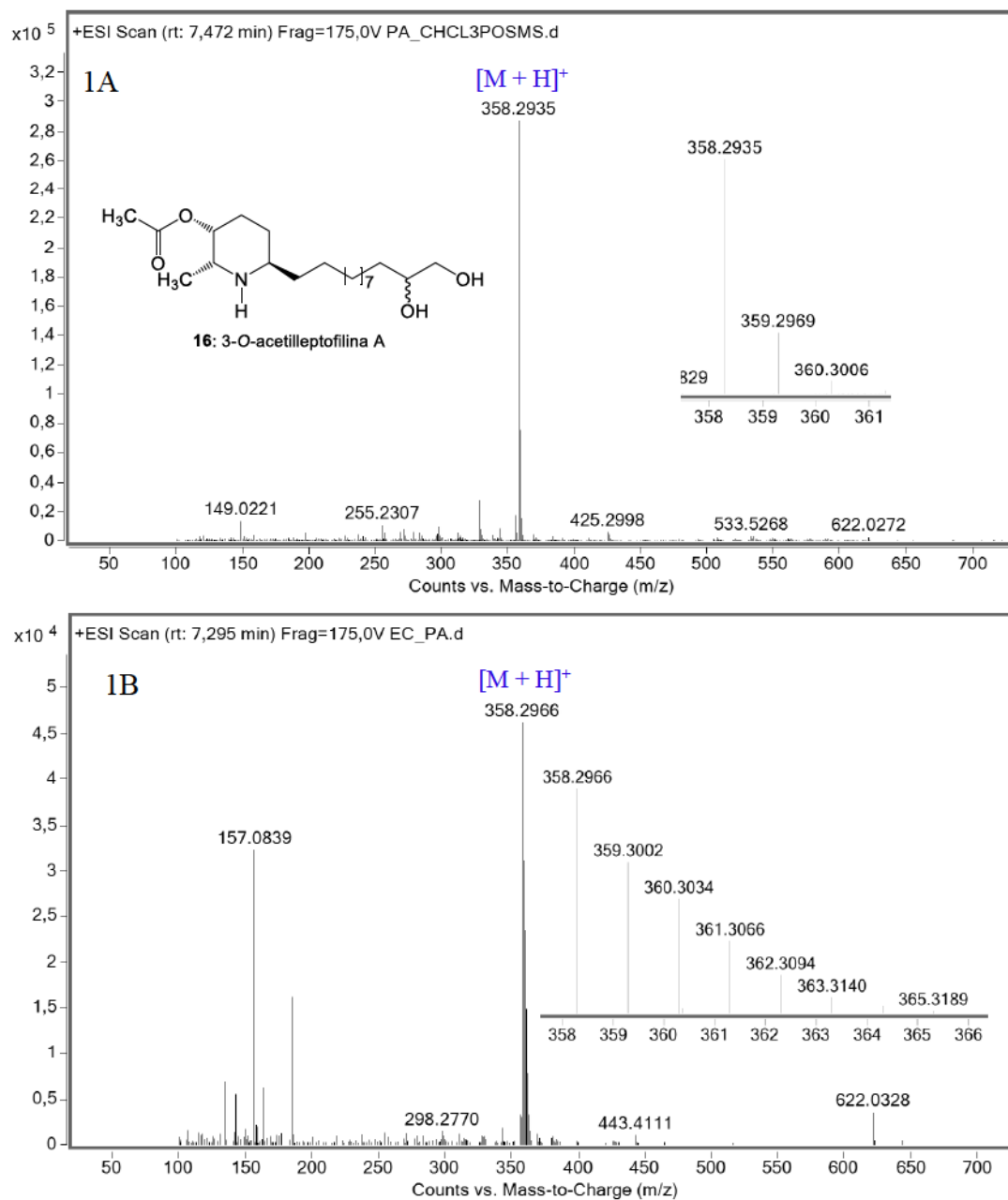
Nota: Alcaloide **8** sem incorporação (A) e com incorporação (B).

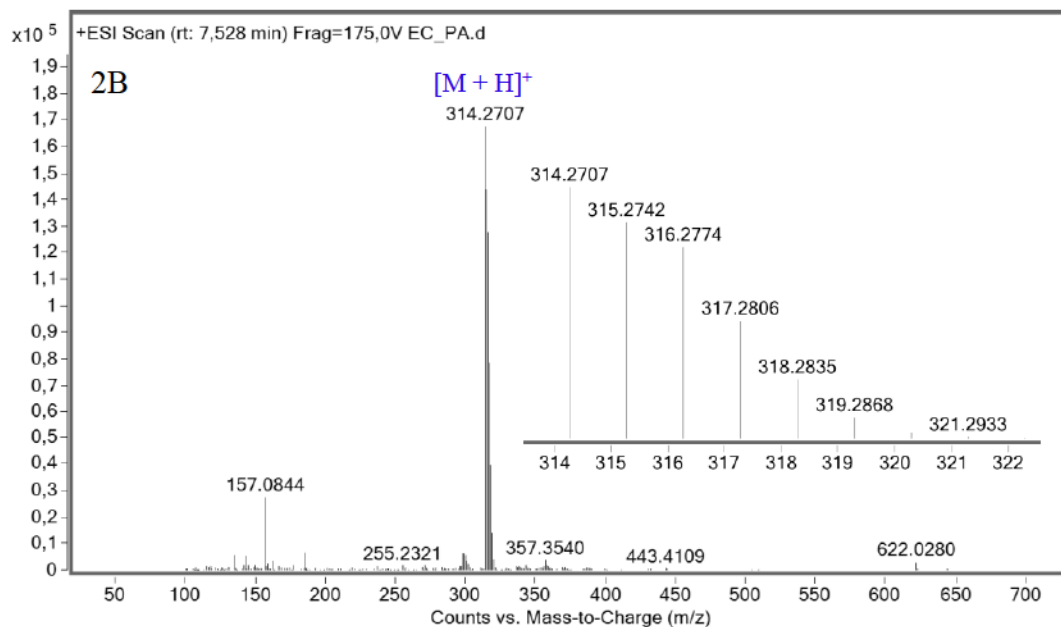
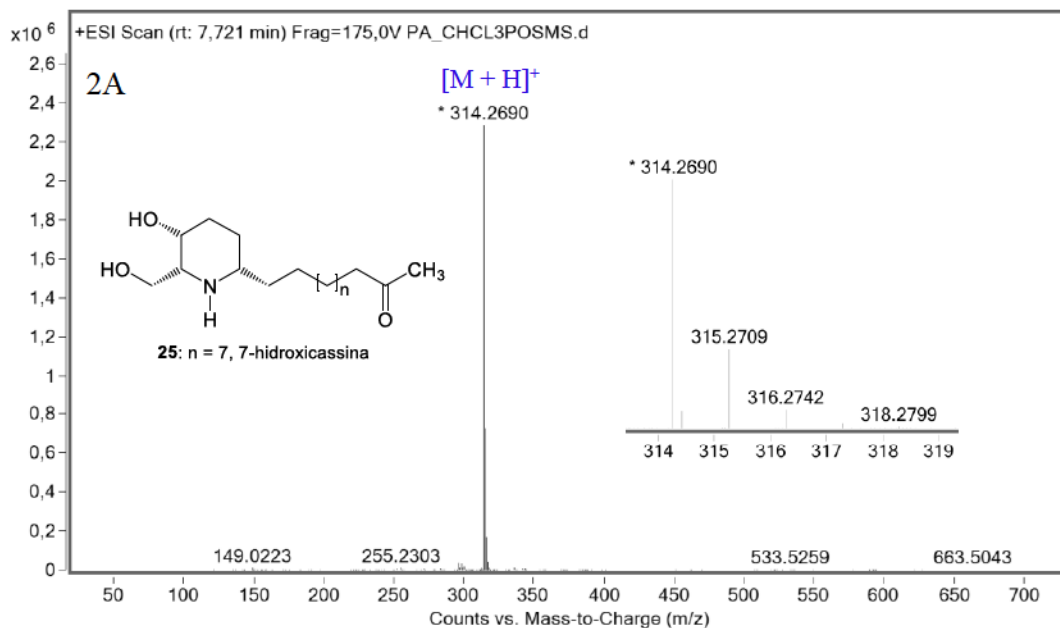
Fonte: Autora.

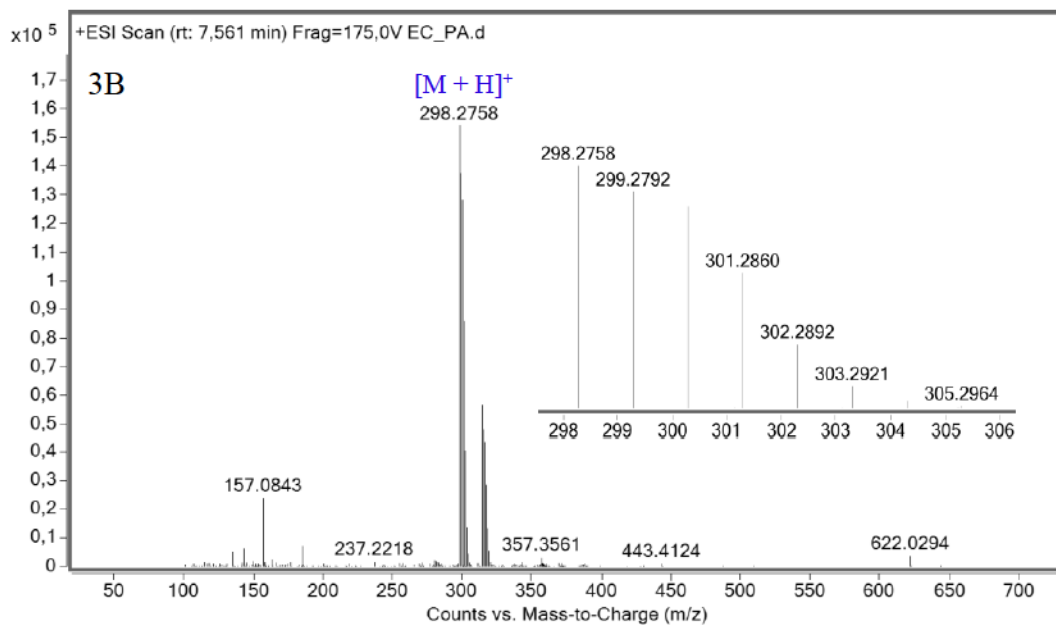
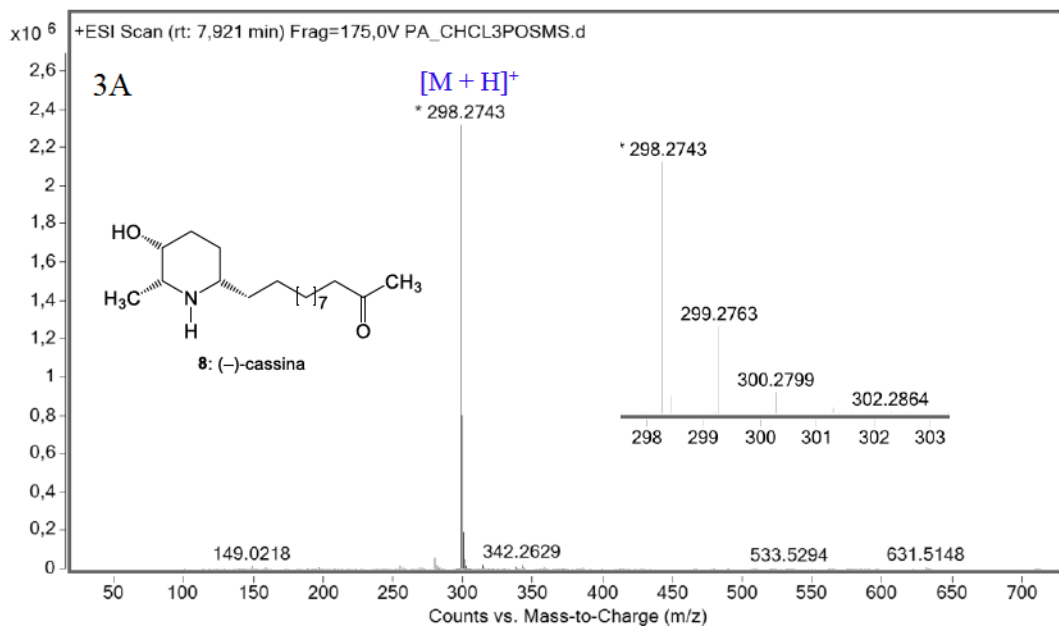
Os alcaloides piperidínicos 3-*O*-acetilleptofilina A (**16**) (m/z 358 $[M + H]^+$) (t_R 7,47 min (Figura 62-1A) e t_R 7,30 min (Figura 62-1B)); 7-hidroxicassina (**25**) (m/z 314 $[M + H]^+$)

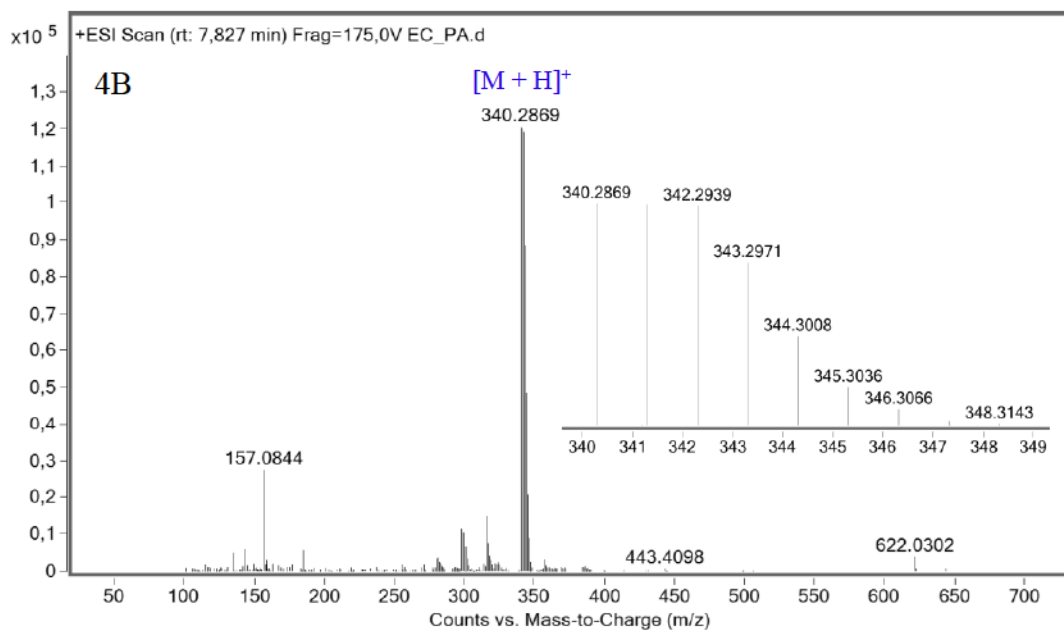
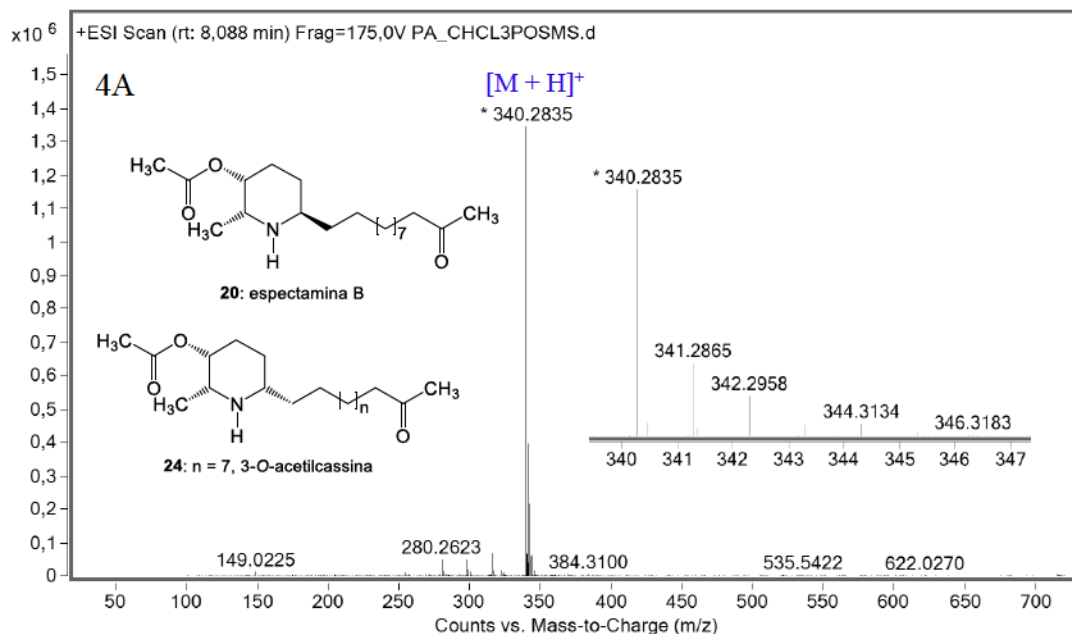
(t_R 7,72 min (Figura 62-2A) e t_R 7,53 min (Figura 62-2B)); cassina (m/z 298 [M + H]) (t_R 7,92 min (Figura 62-3A) e t_R 7,56 min (Figura 62-3B)); espectamina B ou 3-*O*-acetilcassina (**20/24**) (m/z 340 [M + H]) (t_R 8,09 min (Figura 62-4A) e t_R 7,83 min (Figura 62-4B)); 6-*isso*-carnavalina ou carnavalina (**12/18**) (m/z 300 [M + H]) (t_R 8,20 min (Figura 62-5A) e t_R 7,96 min (Figura 62-5B)); 7-hidroxiespectralina (**22**) (m/z 342 [M + H]) (t_R 8,52 min (Figura 62-6A) e t_R 8,52 min (Figura 62-6B)); 3-*O*-acetilespectralina (**21**) (m/z 368 [M + H]) (t_R 9,02 min (Figura 62-7A) e t_R 8,83 min (Figura 62-7B) e espectralinina (**11**) (m/z 328 [M + H]) (t_R 9,19 min (Figura 62-8A) e t_R 9,03 min (Figura 62-8B)) apresentaram perfil de incremento no padrão isotópico similar aquele observado para o alcaloide **8**.

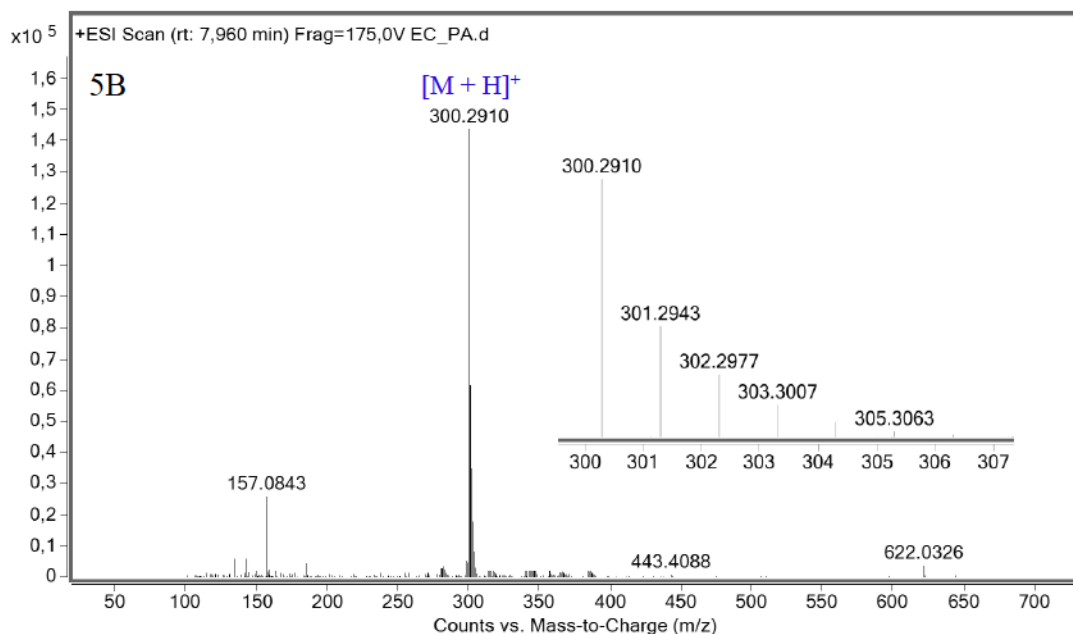
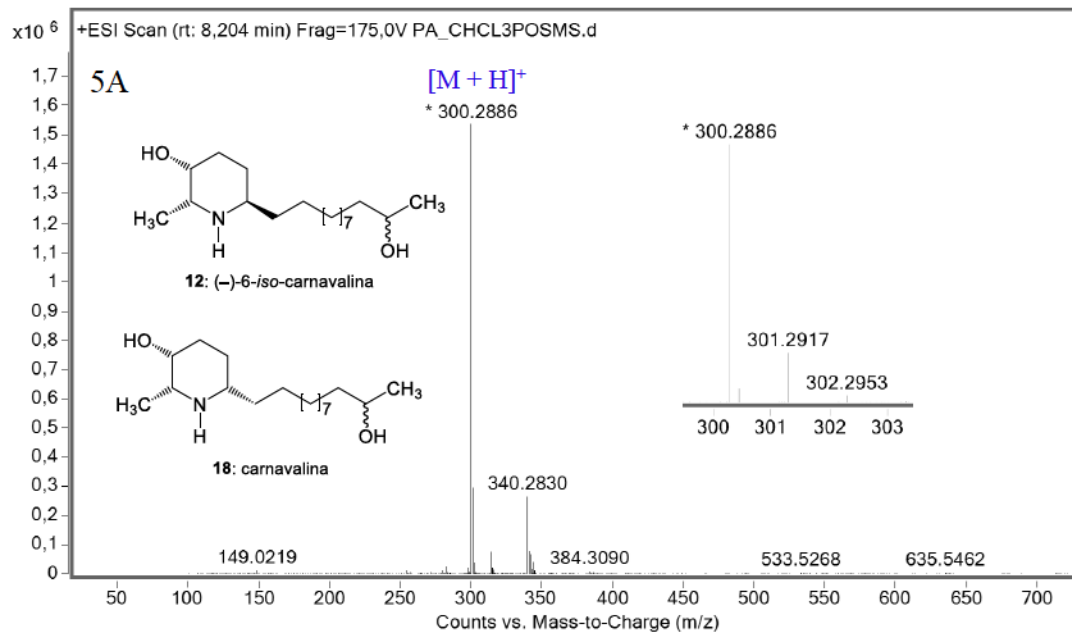
Figura 62. EM-IES-(+) dos alcaloides oriundos dos experimentos de marcação isotópica da parte aérea.

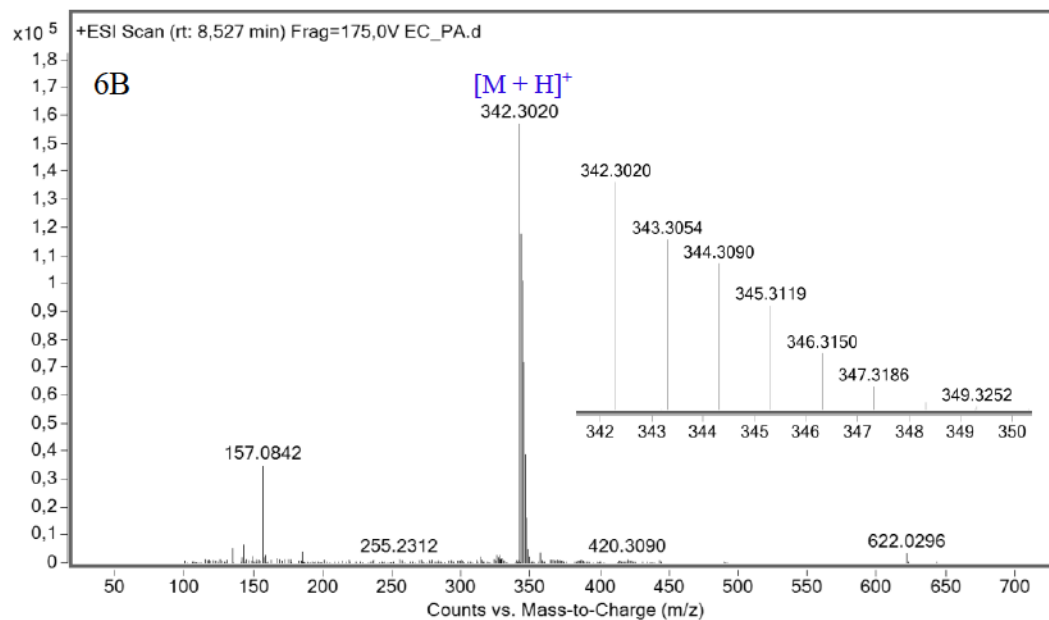
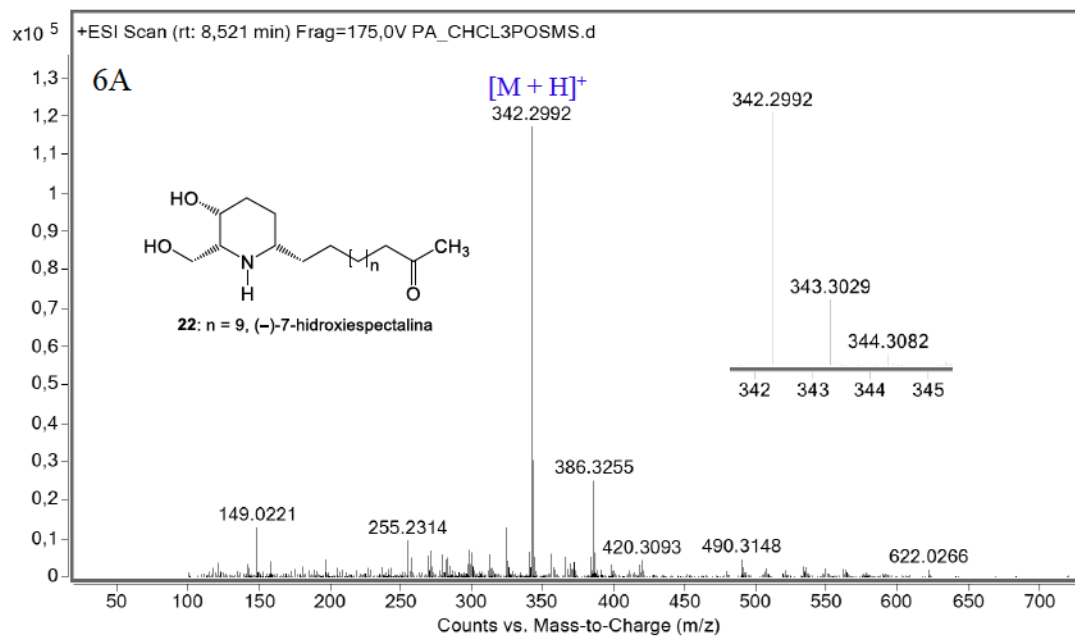


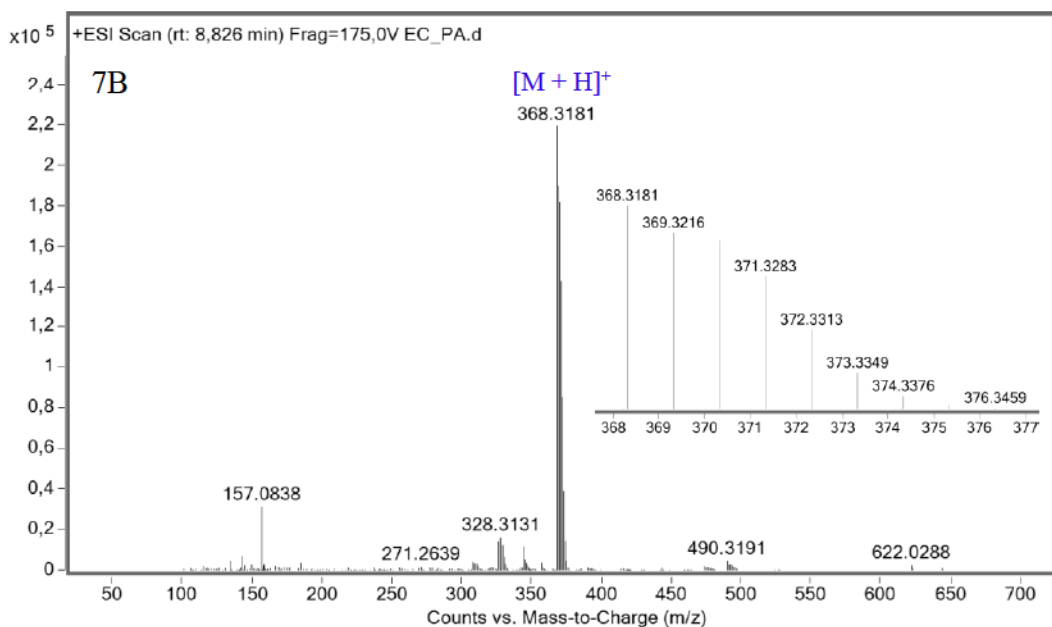
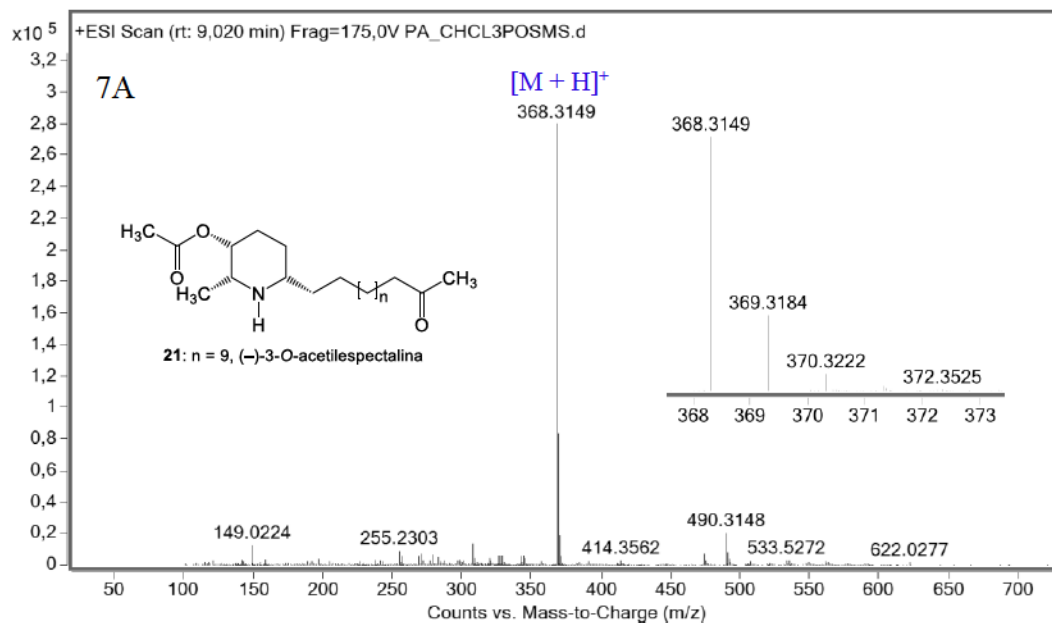


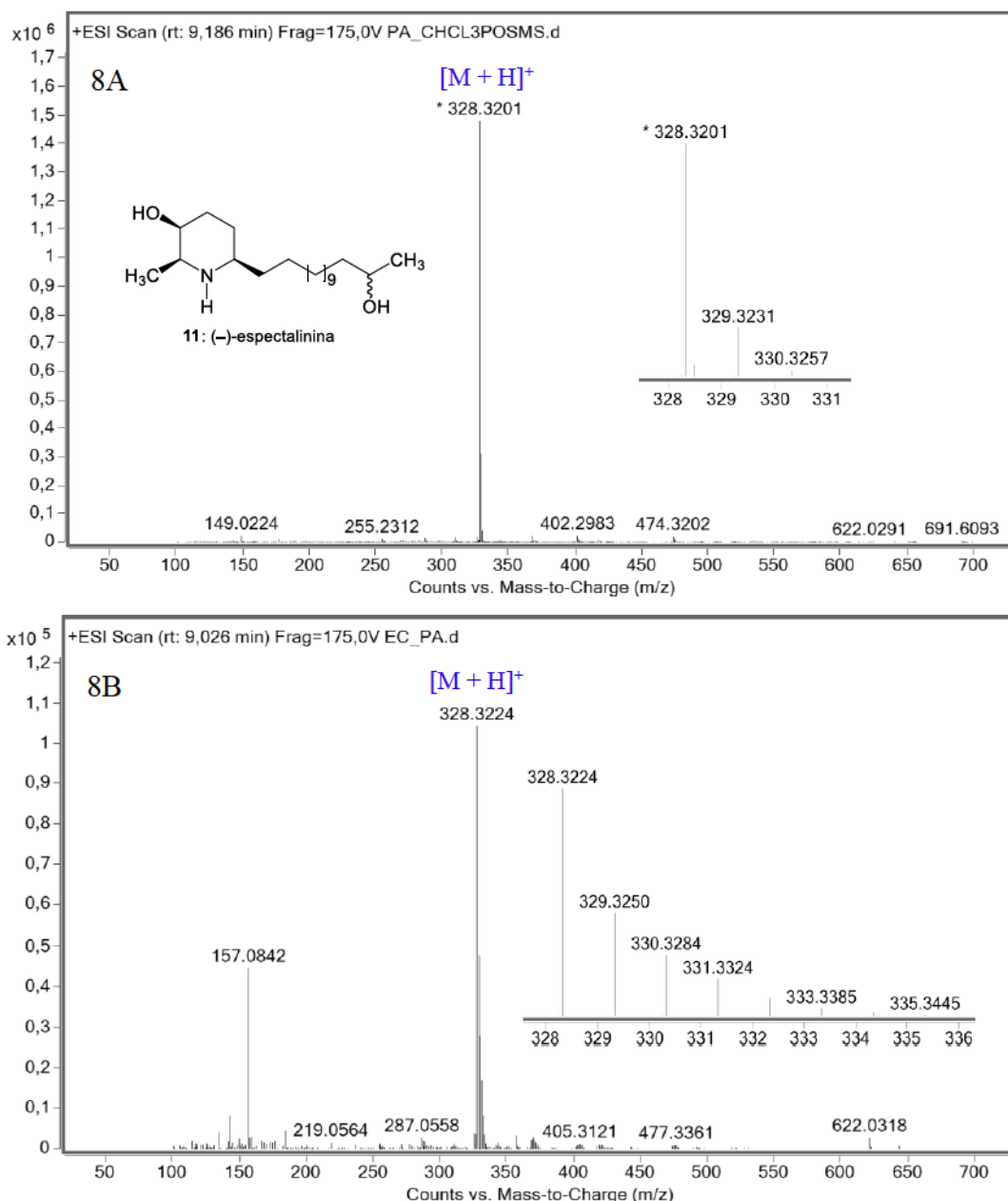








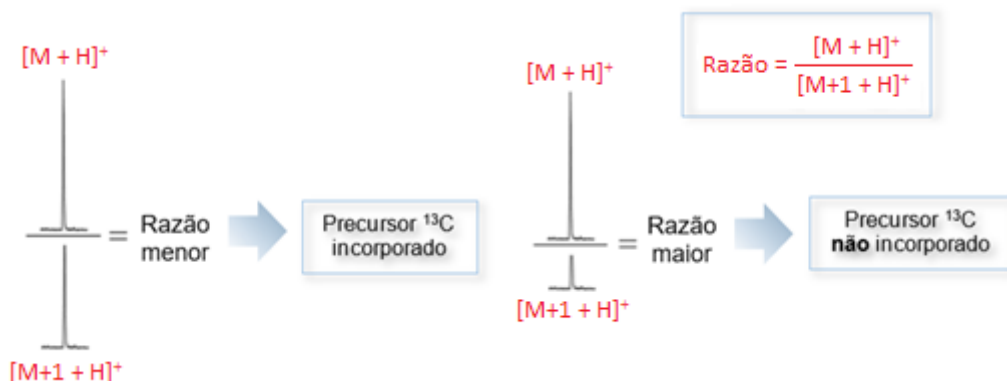




Nota: Padrão isotópico dos alcaloides sem incorporação (A) e com incorporação (B).

Fonte: Autora.

Para cada unidade de ^{13}C incorporado à estrutura de cada alcaloide era esperado observar no EM a adição de novas unidades de massas no padrão isotópico (Zhang *et al.*, 2019). Para comprovação do incremento no padrão isotópico através do experimento com ^{13}C (Figura 63), foi feita uma comparação que tem como base a razão entre a área do pico do íon molecular $[M + H]^+$ e a área do pico do isótopo subsequente $[M+1 + H]^+$, tanto para o composto controle quanto para o composto marcado, de forma que quanto menor for o valor dessa razão, maior é a indicação da incorporação de ^{13}C no processo biossintético em estudo (Musquiari *et al.*, 2021).

Figura 63. Cálculo para comprovação da incorporação isotópica de ^{13}C no EM-IES.

Fonte: Autora.

Assim, a partir dos EM-IES-(+) obtidos da análise do extrato em CHCl_3 das partes aéreas do experimento de marcação com $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-D-glicose}$ administrado nas plântulas de *S. spectabilis*, foram feitos os cálculos para avaliar se houve ou não a incorporação de ^{13}C nos alcaloides piperidínicos (Tabela 7). A análise desses dados confirma a incorporação de ^{13}C , via glicose marcada, nos alcaloides identificados, visto que a razão $[M+H]^+/[M+1+H]^+$ é menor que a razão do controle (sem marcação).

Tabela 7. Análise dos experimentos de marcação isotópica utilizando $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-D-glicose}$ da parte aérea das plântulas de *S. spectabilis*.

m/z	GLIC	CONT	m/z	GLIC	CONT
358 (16)	$[M+1+H]^+$	1,48 ^a	300 (12/18)	$[M+1+H]^+$	2,33 ^a
	$[M+2+H]^+$	1,96 ^a		$[M+2+H]^+$	4,12 ^a
	$[M+3+H]^+$	3,10 ^a		$[M+3+H]^+$	8,03 ^a
	$[M+4+H]^+$	5,88 ^a		$[M+4+H]^+$	17,21 ^a
	$[M+5+H]^+$	14,08 ^a		$[M+5+H]^+$	46,51 ^a
	$[M+6+H]^+$	30,30 ^a		$[M+6+H]^+$	121,95 ^a
	$[M+7+H]^+$	90,90 ^a			
314 (25)	$[M+1+H]^+$	1,16 ^a	342 (22)	$[M+1+H]^+$	2,07 ^a
	$[M+2+H]^+$	1,31 ^a		$[M+2+H]^+$	3,28 ^a
	$[M+3+H]^+$	2,13 ^a		$[M+3+H]^+$	5,98 ^a
	$[M+4+H]^+$	4,25 ^a		$[M+4+H]^+$	11,76 ^a
	$[M+5+H]^+$	11,90 ^a		$[M+5+H]^+$	28,57 ^a
	$[M+6+H]^+$	41,66 ^a		$[M+6+H]^+$	76,92 ^a
	$[M+7+H]^+$	142,80 ^a		$[M+7+H]^+$	200,00 ^a

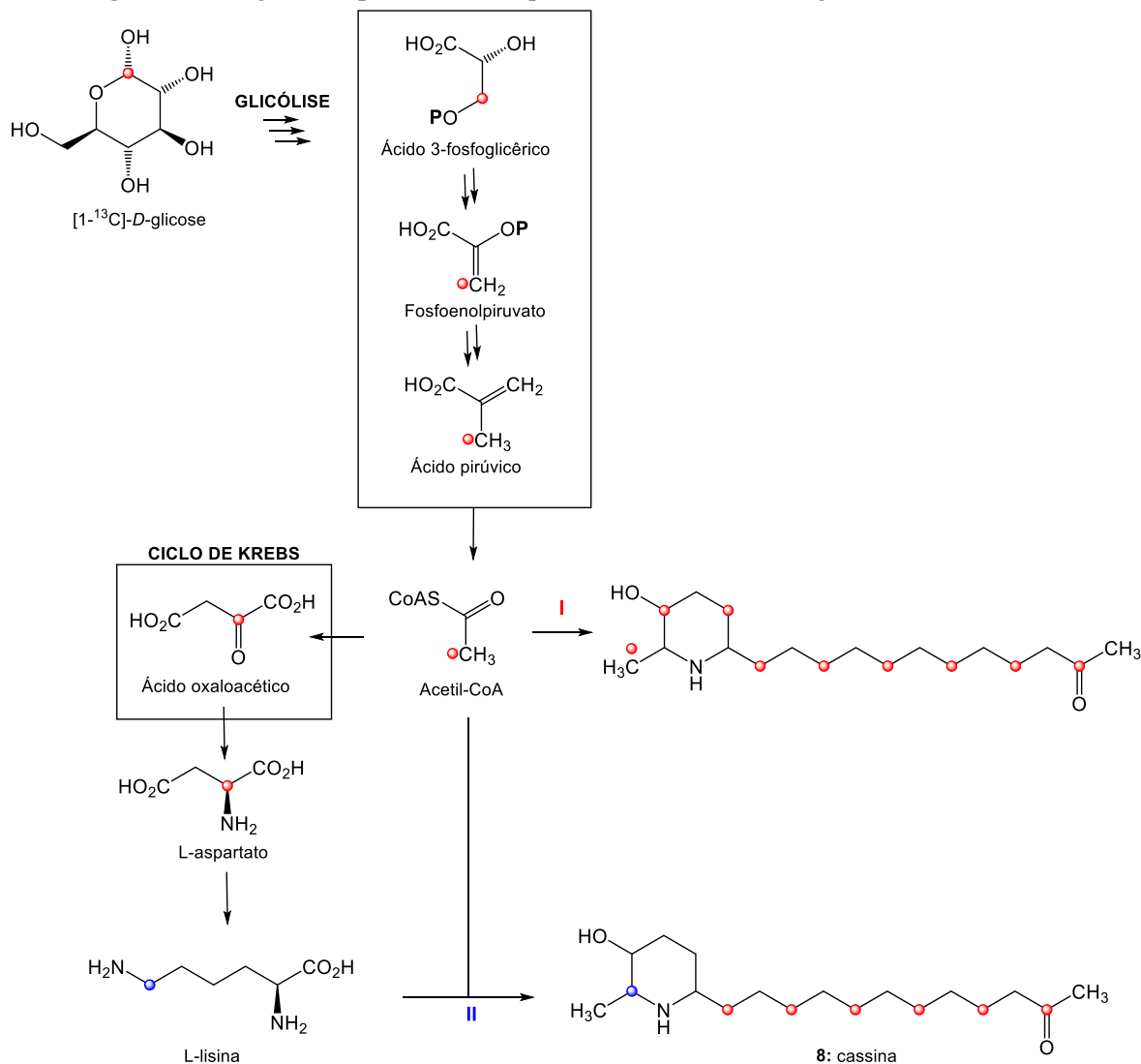
298 (8)	$[M+1 + H]^+$	1,12 ^a	2,89 ^b	368 (21)	$[M+1 + H]^+$	1,15 ^a	3,35 ^b
	$[M+2 + H]^+$	1,20 ^a	12,16 ^b		$[M+2 + H]^+$	1,20 ^a	14,79 ^b
	$[M+3 + H]^+$	1,79 ^a	47,84 ^b		$[M+3 + H]^+$	1,53 ^a	50,00 ^b
	$[M+4 + H]^+$	3,80 ^a	196,07 ^b		$[M+4 + H]^+$	2,56 ^a	196,07 ^b
	$[M+5 + H]^+$	11,11 ^a	769,23 ^b		$[M+5 + H]^+$	5,61 ^a	—
	$[M+6 + H]^+$	34,48 ^a	—		$[M+6 + H]^+$	15,38 ^a	—
	$[M+7 + H]^+$	111,11 ^a	—		$[M+7 + H]^+$	52,63 ^a	—
	$[M+8 + H]^+$	769,23 ^a	—		$[M+8 + H]^+$	200,00 ^a	—
340 (20/24)	$[M+1 + H]^+$	1,00 ^a	3,79 ^b	328 (11)	$[M+1 + H]^+$	2,19 ^a	4,78 ^b
	$[M+2 + H]^+$	1,01 ^a	6,24 ^b		$[M+2 + H]^+$	3,74 ^a	36,10 ^b
	$[M+3 + H]^+$	1,36 ^a	23,14 ^b		$[M+3 + H]^+$	6,17 ^a	238,09 ^b
	$[M+4 + H]^+$	2,48 ^a	21,14 ^b		$[M+4 + H]^+$	12,82 ^a	—
	$[M+5 + H]^+$	5,81 ^a	87,71 ^b		$[M+5 + H]^+$	29,41 ^a	—
	$[M+6 + H]^+$	13,69 ^a	476,19 ^b		$[M+6 + H]^+$	76,92 ^a	—
	$[M+7 + H]^+$	50,00 ^a	—		$[M+7 + H]^+$	166,66 ^a	—
	$[M+8 + H]^+$	125,00 ^a	—				

Nota: m/z : massa referente a molécula protonada do composto $[M + H]^+$; $[M+1 + H]^+$: molécula protonada com incremento de uma unidade de massa referente a incorporação de uma unidade do precursor isotopicamente marcado; $[M+2 + H]^+$: molécula protonada com incremento de duas unidades de massa referente a incorporação de duas unidades do precursor isotopicamente marcado; e assim sucessivamente; GLIC(¹³C): 1-¹³C-D-glicose, CONT: controle; ^aRazão ($[M + H]^+ / [M+1 + H]^+$) no experimento de incorporação isotópica utilizando 1-¹³C-D-glicose, ^bRazão ($[M + H]^+ / [M+1 + H]^+$) no controle (experimento sem precursor isotopicamente marcado).

Como os alcaloides piperidínicos de *S. spectabilis* estão presentes como pares homólogos, era esperado encontrar padrões diferentes de incorporação dependendo do tamanho da cadeia carbônica e substituintes no C-6 e C-3, respectivamente. Assim, os seguintes padrões de incorporação foram observados nos alcaloides: **12/18**, $[M+1 + H]^+$ até $[M+6 + H]^+$; **11**, **16**, **22** e **25**, $[M+1 + H]^+$ até $[M+7 + H]^+$; e **8**, **21**, **20/24**, $[M+1 + H]^+$ até $[M+8 + H]^+$ (Figura 62) (Tabela 7). Com base na biogênese proposta na Figura 23, e nos estudos das vias de biossíntese dos metabólitos secundários a partir da glicose, seriam esperados alguns padrões de incorporação. Levando em consideração o estudo da biogênese do alcaloide **8** pela via do acetato, eram previstos padrões isotópicos de adição de M+1 até M+9, referentes a formação do anel piperidínico (3 marcações) e cadeia carbônica (6 marcações); já para a formação do anel pela via da lisina era esperado um padrão de M+1 até M+7, sendo o núcleo piperidínico

(1 marcação) via da lisina e a cadeia lateral (6 marcações) via do acetato, sinalizando uma via mista de biossíntese (Figura 64).

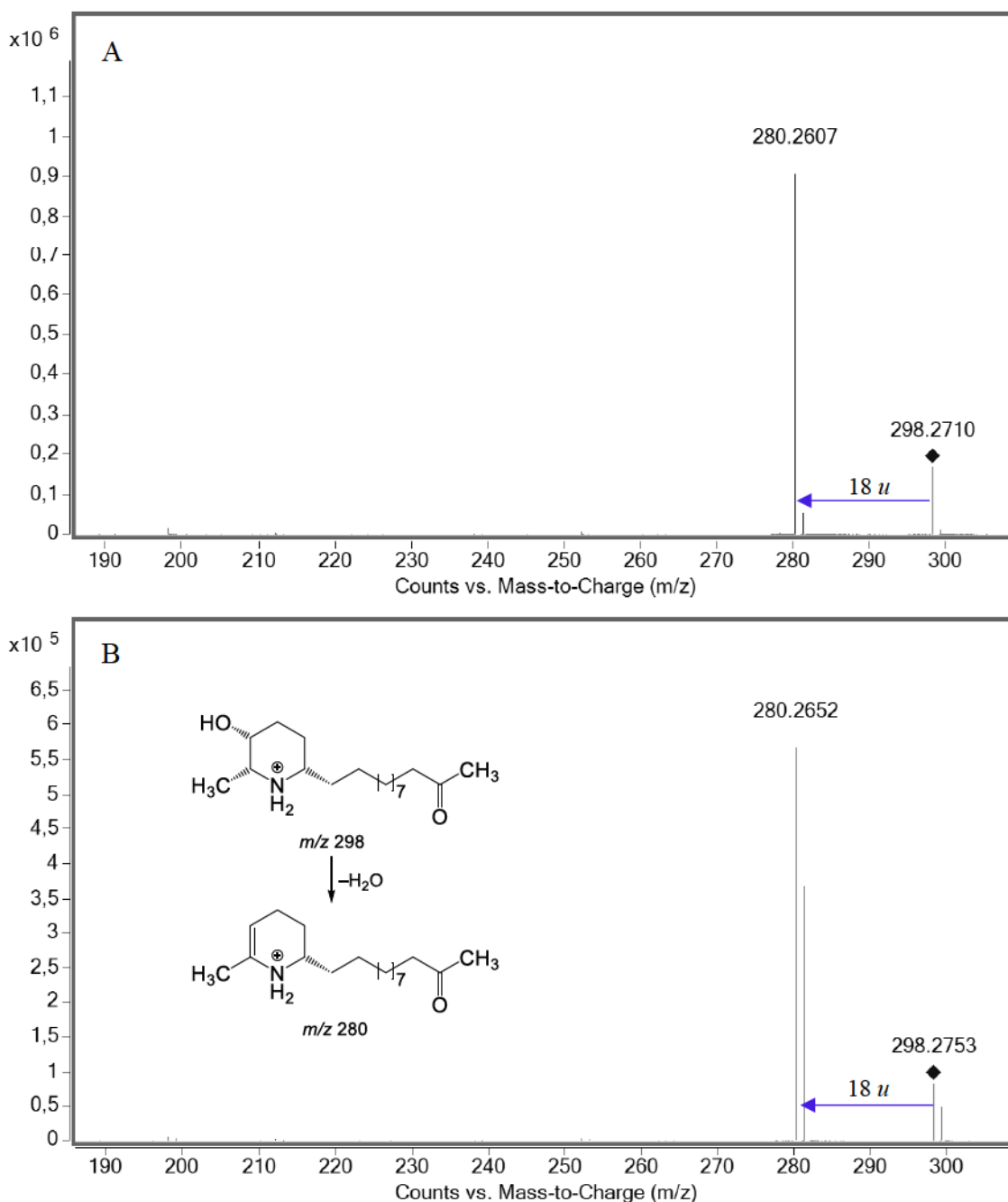
Figura 64. Biogênese e padrão de enriquecimento com 1-¹³C-D-glicose no alcaloide **8**.



Nota: caminho I: via do acetato; caminho II: via mista (lisina e acetato).

Fonte: Autora.

O padrão isotópico de $[M+8 + H]^+$, observado no EM de **8** (Figura 62-3B), sugere que a biossíntese desse alcaloide não seja por uma via mista, já que o padrão isotópico esperado por essa via seria de até $[M+7 + H]^+$. A análise do EM/EM, permitiu observar o íon fragmento de m/z 280 em ambos os extratos, atribuído à eliminação neutra de água (18 u), tais dados confirmam a estrutura do alcaloide **8** porém esse fragmento não apresenta informação adicional para a comprovação da via de biossíntese (Figura 65).

Figura 65. EM/EM-IES-(+) de **8** em EC-PA.

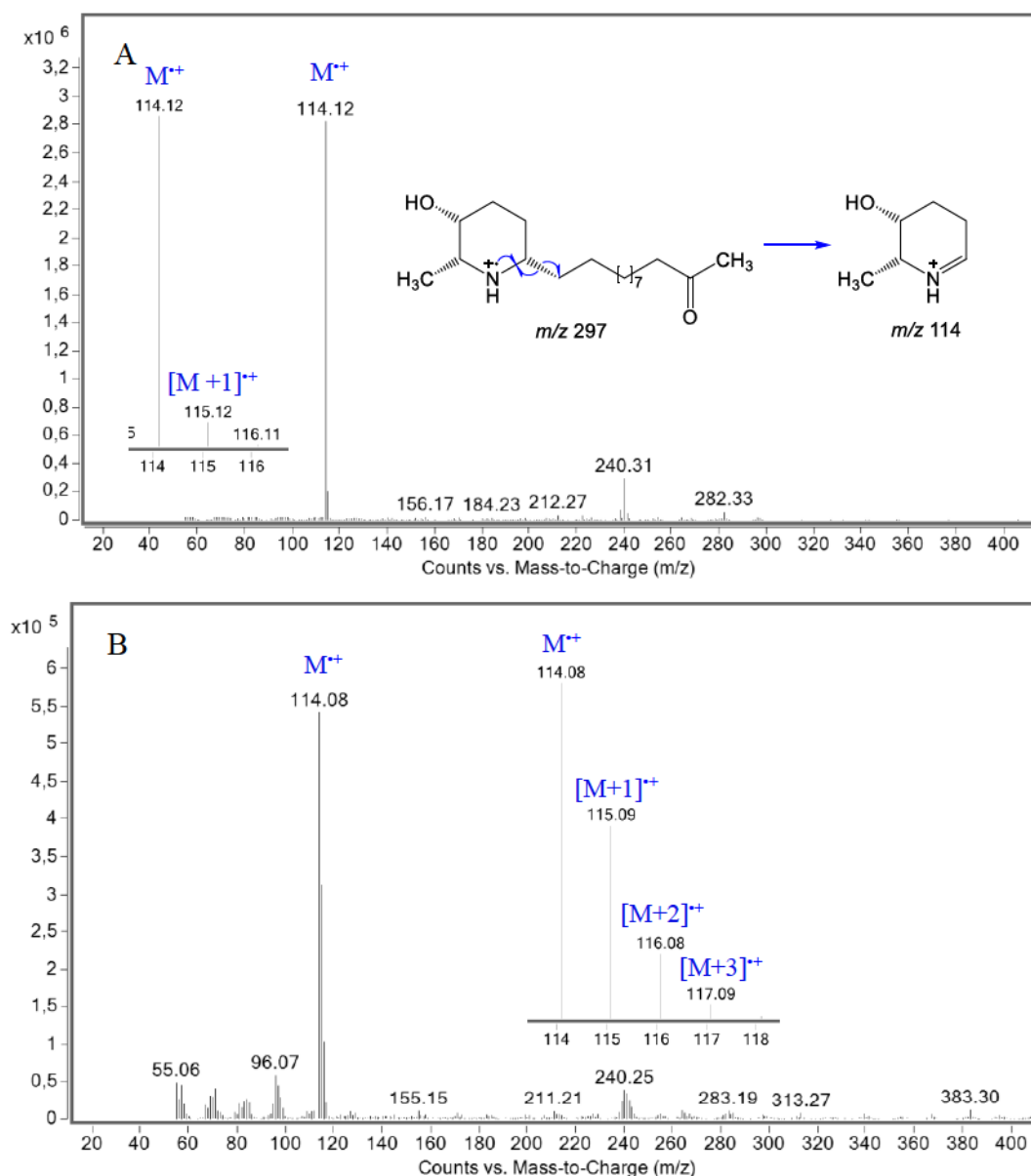
Nota: Experimento sem precursor marcado (A) e com precursor marcado (B).

Fonte: Autora.

Adicionalmente o extrato EC-PA foi submetido a análise por CG-EM, que utiliza a ionização por elétrons (IE). Nesse método, como não há filtro para os íons moleculares ou fragmentos, todas as espécies carregadas que são formadas no processo de ionização podem apresentar padrão isotópico e assim contribuir para a identificação da via biossintética. Dessa forma, foi observado no EM-IE de **8** que o pico base em m/z 114, referente à eliminação da cadeia lateral em C-6 ($\bullet\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{COCH}_3$) (Figura 66A), apresentava um padrão isotópico

indicando a incorporação de três unidades de ^{13}C no íon fragmento que representa o anel piperidínico, sendo os sinais de m/z 115, 116 e 117, referentes a $[\text{M}+1]^{++}$, $[\text{M}+2]^{++}$ e $[\text{M}+3]^{++}$, respectivamente (Figura 66B). A análise desses dados corroborara a hipótese de formação de **8** pela via do acetato (Figura 64).

Figura 66. CG-EM do alcaloide **8** em EC-PA.



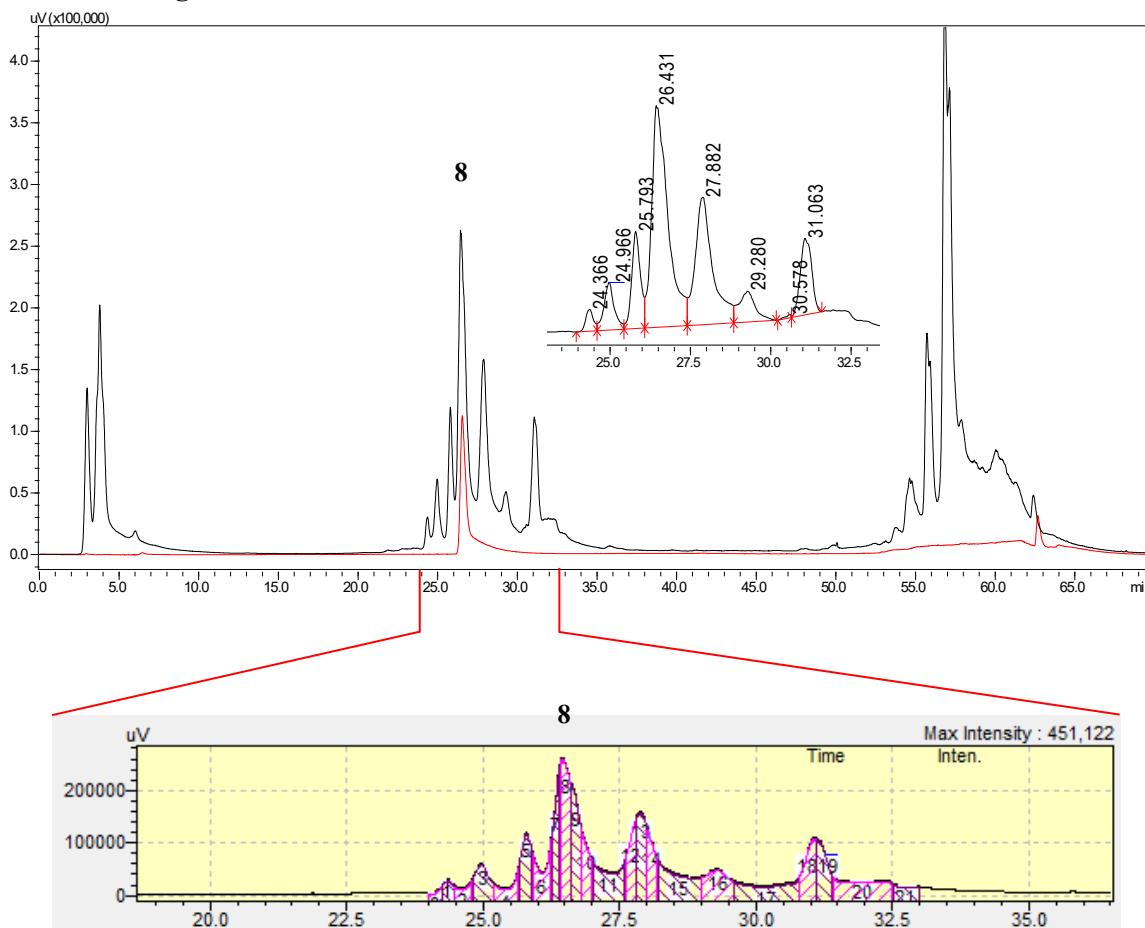
Nota: Experimento sem precursor marcado (A) e com precursor marcado (B).

Fonte: Autora.

Após a obtenção dos dados de EM o extrato EC-PA foi submetido a CLAE-DAD-ELSD analítica para dar início ao fracionamento cromatográfico e obtenção dos compostos puros para análises de RMN (Item 5.6.3). A análise cromatográfica do extrato EC-PA (19,3 mg) permitiu

observar a presença de **8** (t_R 26,54 min) (Figura 67), que foi submetido ao fracionamento nas mesmas condições descritas. O isolamento foi realizado através da coleta automática dos picos de acordo com os tempos de retenção, sendo coletadas vinte e duas subfrações (Figura 67).

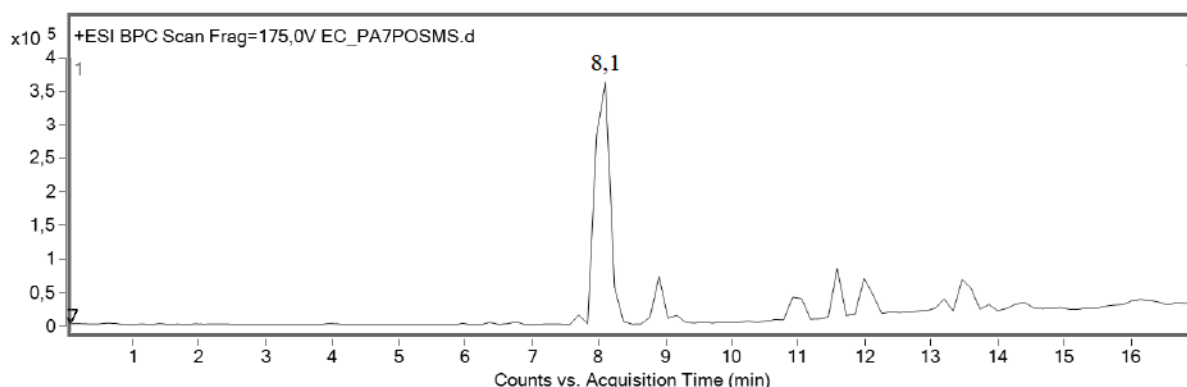
Figura 67. Perfil do fracionamento do extrato EC-PA em coluna analítica.



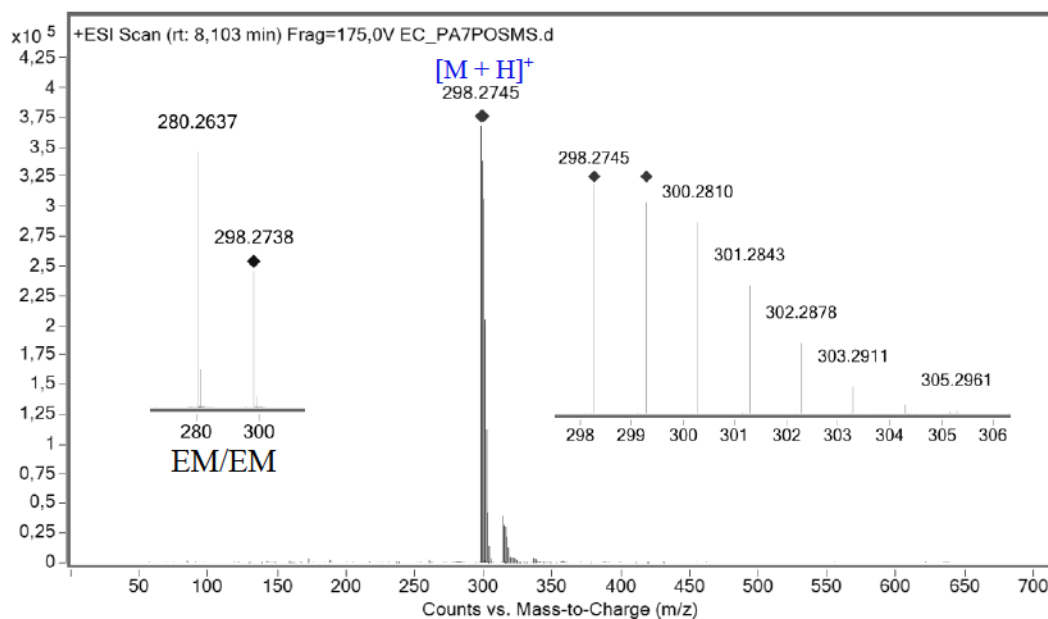
Condições: Coluna Phenomenex® C₁₈ (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (50 min), 5–100% de MeOH-HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 9,65 mg mL⁻¹, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹ e detector ELSD.

Fonte: Autora.

As frações coletadas foram analisadas por CCD de onde foi possível observar que a subfração SF-7 (0,5 mg) apresentava o mesmo valor de R_f que o alcaloide **8**, e assim foi submetida a análise por CLAE-EM. O cromatograma apresentou um pico intenso em t_R 8,1 min (Figura 68), cujo EM-IES-(+) em alta resolução possibilitou verificar o íon referente à molécula protonada em m/z 298,2745 $[M + H]^+$, calculado para C₁₈H₃₆NO₂⁺, 298,2741 (Δ 1,3 ppm). Quando o sinal de m/z 298 foi submetido à análise por EM sequencial (EM/EM), foi observado o fragmento de m/z 280, correspondente à eliminação neutra de água (18 u) (Figura 69), dados que confirmam a estrutura do alcaloide **8**.

Figura 68. Cromatograma obtido por CLAE-EM da subfração SB-7.

Condições: Coluna Agilent Zorbax C18 (5,0 × 2,1 mm, 1,8 μm); gradiente (17 min), 2–98% de MeOH-HCO₂H 0,1%; C = 1,0 mg mL⁻¹, V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo 3,0 mL min⁻¹ e detector de EM-IES(+).
Fonte: Autora.

Figura 69. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **8**.

Fonte: Autora.

Os experimentos de incorporação utilizando 1-¹³C-D-glicose e análises por EM indicaram que a produção dos alcaloides piperidínicos em *S. spectabilis* é através da via do acetato. No entanto, experimentos adicionais de RMN de ¹³C de **8** ainda são necessários e podem contribuir, inclusive para avaliar as posições das marcações.

7 CONCLUSÕES

Senna spectabilis é reconhecida pela presença de alcaloides piperidínicos na forma de pares homólogos que apresentam grande relevância biológica. O estudo químico dos frutos verdes de *S. spectabilis* permitiu observar que a fração alcaloidica (CH₂Cl₂) obtida da extração líquido-líquido, acumula os alcaloides (–)-cassina (**8**) e (–)-espectralina (**14**), que foram isolados, além da mistura dos homólogos 3-*O*-feruloilcassina (**26**) e 3-*O*-feruloilespectralina (**27**), presente em menor quantidade. Também foi possível observar a presença de outros alcaloides que não foram isolados no trabalho, mas detectados por CCD.

A CG-DIC e CLAE-ELSD foram ferramentas cruciais para a identificação e isolamento dos pares homólogos, posto que tais substâncias não absorvem na luz na região do ultravioleta por não apresentarem cromóforos em suas estruturas, e possuírem diferenças estruturais pequenas que inviabiliza o isolamento utilizando técnicas cromatográficas convencionais. Os alcaloides isolados (–)-cassina (**8**) (12,0 mg) e (–)-espectralina (**14**) (11,4 mg), e a mistura dos homólogos 3-*O*-feruloilcassina (**26**) e 3-*O*-feruloilespectralina (**27**) (14,4 mg) foram submetidos as análises espectrométricas (CLAE-IES-EM) e espectroscópicas (RMN) para a confirmação das estruturas.

Com base na CG-EM foi possível monitorar a presença do alcaloide **8** nos diferentes órgãos das plântulas, cultivadas em terra a partir de sementes de *S. spectabilis* ao longo de 75 dias, e constatar que o metabolismo das plântulas, em relação à produção dos alcaloides piperidínicos estava ativo a partir do 45º dia. Foi possível ainda otimizar as condições de cultivo *in vitro* das sementes de *S. spectabilis*, a partir dos diferentes métodos de superação da dormência, meios de cultura e reguladores vegetais. Foi possível constatar que o tempo de coleta das sementes influencia diretamente na taxa de germinação, sendo o ideal a utilização de sementes novas com menos de um ano. Na quebra da dormência das sementes o método de escarificação química foi mais eficaz e o meio de cultura WP basal sem uso de reguladores, também se mostrou mais adequado para o cultivo *in vitro* das sementes.

Nos experimentos de biossíntese utilizando glicose marcada (1-¹³C-D-glicose), foi possível observar que os extratos preparados com CHCl₃ apresentaram melhor extração dos alcaloides. Nas análises por CLAE-EM e CG-EM foi observado a presença do alcaloide **8** nos extratos EC-PA, EE-PA, EC-R e no controle. A partir das análises dos EM-IES-(+) dos sinais na região das moléculas protonadas foi possível observar clara mudança no padrão isotópico, indicando que houve incorporação de ¹³C nos metabólitos, o que foi confirmado pelos cálculos

de incorporação isotópica. A EM-IE ainda se mostrou uma técnica complementar visto que na EM/EM-IES não seria possível observar um padrão isotópico na fragmentação, além de fundamental para compreensão do padrão de incorporação de três unidades de acetato na síntese do anel piperidínico. O padrão de incorporação evidenciado pelo padrão isotópico de $M+3$ no sinal de m/z 114, que é o pico base no EM, a partir dos sinais presentes de m/z 115, 116 e 117 nos alcaloides obtidos dos experimentos de biossíntese com glicose marcada, corroboram a marcação de três carbonos no anel piperidínico, condizente com a hipótese da via acetato. Portanto, os padrões de fragmentação, e enriquecimento isotópico das amostras indicaram que tanto o anel piperidínico quanto a cadeia carbônica lateral são produzidos pela via do acetato.

Dessa forma, ainda são necessários experimentos adicionais com o precursor isotopicamente marcado 1- ^{13}C -acetato de sódio, assim, como experimentos de RMN ^{13}C , para confirmação da hipótese. No entanto, considerando os dados experimentais obtidos até o momento, fica evidente que a via do acetato se torna cada vez mais consistente como sendo aquela responsável pela produção dos alcaloides piperidínicos de *S. spectabilis*.

REFERÊNCIAS

- ABDELSHAHEED, M. M.; FAWZY, I. M.; EL-SUBBAGH, H. I.; YOUSSEF, K. M. Piperidine nucleus in the field of drug discovery. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 188, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00335-y>
- AHMAD, V. U.; BASHA, A.; HAQUE, W. New Alkaloids from *Prosopis juliflora* DC. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 33, p. 347–348, 1978. <https://doi.org/10.1515/znb-1978-0322>
- AHMAD, V. U.; SULTANA, A.; QAZI, S. Alkaloids from the leaves of *Prosopis juliflora*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 3, p. 497–501, 1989. <https://doi.org/10.1021/np50063a005>
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JÚNIOR, C.; MIRANDA, A. L. P.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Antinociceptive profile of (–)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Médica**, v. 69, p. 795–799, 2003. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43201>
- ALKHZEM, A. H.; WOODMAN, T. J.; BLAGBROUGH, I. S. Design and synthesis of hybrid compounds as novel drugs and medicines. **RSC Advances**, v. 12, p. 19470–19484, 2022. <https://doi.org/10.1039/d2ra03281c>
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 2002, 16p.
- ASTUDILLO, S. L.; JURGENS, S. K.; SCHMEDA-HIRSCHMAN, G.; GRIFFITH, G. A.; HOLT, D. J.; JENKINS, P. R. DNA binding alkaloids from *Prosopis alba*. **Planta Medica**, v. 65, p. 161–162, 1999. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960454>
- BACHER, A.; RIEDER, C.; EICHINGER, D.; ARIGONI, D.; FUCHS, G.; EISENREICH, W. Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 567–598, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00388.x>
- BARI, A.; IQBAL, A.; KHAN, Z. A.; SHAHZAD, S. A.; YAR, M. Synthetic approaches toward piperidine related structures: a review. **Synthetic Communications**, v. 50, p. 2572–2589, 2020. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1776878>
- 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>
- BEVAN, C. W. L.; OGAN, A. U. Studies on west african medicinal plants-I. Biogenesis of carpaine in *Carica papaya* linn. **Phytochemistry**, v. 3, n. 5, p. 591–594, 1964. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82933-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82933-7)
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929–5934,

1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00254-6](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(95)00254-6)

BRAEKMAN, J.-C.; CHARLIER, A.; DALOZE, D.; HEILPORN, S.; PASTEELS, J.; PLASMAN, V.; WANG, S. New piperidine alkaloids from two ladybird beetles of the genus *Calvia* (Coccinellidae). **European Journal of Organic Chemistry**, p. 1749–1755, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199907\)1999:7<1749::AID-EJOC1749>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199907)1999:7<1749::AID-EJOC1749>3.0.CO;2-O)

BROOK, K.; BENNETT, J.; DESAI, S. P. The chemical history of morphine: an 8000-year journey, from resin to de-novo synthesis. **Journal of Anesthesia History**, v. 3, n. 2, p. 50–55, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.janh.2017.02.001>

BUNSUPA, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. Lysine-derived alkaloids: overview and update on biosynthesis and medicinal applications with emphasis on quinolizidine alkaloids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 1002–1012, 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160506151213>

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, p. 1–7, 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2010.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. S.; CARDOSO, F. C. I. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124–132, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620190201>

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

CORREIA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>

DALEY, D. K. Plant Crude Drugs. In: BADAL, S.; DELGODA, R. (Ed.) **Pharmacognosy: fundamentals, applications and strategy**. London: Academic Press, 2017. Cap. 6, p. 81–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00006-8>

DATWYLER, P.; OTT-LONGONI, R.; SCHOPP, E.; HESSE, M. 188. Über juliprosin, ein weiteres alkaloid aus *Prosopis juliflora* A. Dc. **Helvetica Chimica Acta**, v. 64, n. 6, p. 1959–1963, 1981. <https://doi.org/10.1002/hlca.19810640629>

DEY, P.; KUNDU, A.; KUMAR, A.; GUPTA, M.; LEE, B. M.; BHAKTA, T.; DASH, S.; KIM, H. S. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). **Recent Advances in Natural Products Analysis**, 2020, p. 505–567. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 509 p. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>

DHANIAPUTRI, R.; SUWONO, H.; AMIN, M.; LUKIATI, B. Introduction to plant metabolism, secondary metabolites biosynthetic pathway, and *in-silico* molecular docking for determination of plant medicinal compounds: an overview. **Advances in Biological Sciences Research**, v. 22, p. 373–382, 2022. <https://doi.org/10.2991/absr.k.220406.053>

DUTA-CORNESCU, G.; CONSTANTIN, N.; POJOGA, D.-M.; NICUTA, D.; SIMON-GRUITA, A. Somaclonal variation-advantage or disadvantage in micropropagation of the medicinal plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 838, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>

FALEIROS, D. R.; ALVARES-TEODORO, J.; SILVA, E. N.; GODMAN, B. B.; PEREIRA, R. G.; ANDRADE, E. I. G.; ACURCIO, F. A. A.; GUERRA JÚNIOR, A. A. Budget impact analysis of medicines: estimated values versus real-world evidence and the implications. **Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research**, v. 22, n. 2, p. 271–281, 2021. <https://doi.org/10.1080/14737167.2021.1927716>

FLORIANO, E. P. Germinação e dormência de sementes florestais, **Caderno Didático nº 2**, 1ª ed. Santa Rosa, 2004.

FREITAS, T. R.; DANUELLO, A.; VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M. Mass spectrometry for characterization of homologous piperidine alkaloids and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 15, p. 1303–1310, 2018. <https://doi.org/10.1002/rcm.8172>

FREITAS, R. M.; SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; FENG, D. Antioxidant mechanisms of *iso*-6-cassine in suppressing seizures induced by pilocarpine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 437–443, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000043>

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. Q.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400022>

GATHUNGU, R. M.; KAUTZ, R.; KRISTAL, B. S.; BIRD, S. S.; VOUIROS, P. The integration of LC-MS and NMR for the analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 39, p. 35–54, 2020. <https://doi.org/10.1002/mas.21575>

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. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GODIN, J.-F.; FAY, L.-B.; HOPFGARTNER, G. Liquid chromatography combined with mass spectrometry for ^{13}C isotopic analysis in life science research. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 751–774, 2007. <https://doi.org/10.1002/mas.20149>

GUPTA, R. N.; SPENSER, I. D. Biosynthesis of the piperidine nucleus. The mode of incorporation of lysine into pipercolic acid and into piperidine alkaloids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 1, p. 88–94, 1969. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)78195-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)78195-2)

HAQUE, M. I.; SINGH, P. K.; GHUGE, S.; KUMAR, A.; RAI, A. C.; KUMAR, A.; MODI, A. Chapter 1 - A general introduction to and background of plant tissue culture: Past, current, and future aspects, Editors: RAI, A. C.; KUMAR, A.; MODI, A.; SINGH, M. **Advances in Plant Tissue Culture**, Academic Press, 2022, p. 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00019-9>.

HASNAIN, A.; NAQVI, S. A. H.; AYESHA, S. I.; KHALID, F.; ELLAHI, M.; IQBAL, S.; HASSAN, M. Z.; ABBAS, A.; ADAMSKI, R.; MARKOWSKA, D.; BAAZEEM, A.; MUSTAFA, G.; MOUSTAFA, M.; HASAN, M. E.; ABDELHAMID, M. M. A. Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontier in Plant Science**, v. 13, p. 1009395, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>

HEMSCHEIDT, T.; SPENSER, I. D. Biosynthesis of *N*-methylpelletierine: vindication of a classical biogenetic concept. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 17, p. 6360–6363, 1990. <https://doi.org/10.1021/ja00173a025>

HERBERT, R. B. **The Biosynthesis of Secondary Metabolites**. Department of Organic Chemistry, University of Leeds, Chapman and Hall Ltd, London, 1981. 222 p.

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>

HOTTI, H.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; ARVAS, M.; TEERI, T.H.; RISCHER, H. Polyketide synthases from poison hemlock (*Conium maculatum* L.). **The FEBS Journal**, 2015, v. 282, n. 21, p. 4141–4156, 2015. <https://doi.org/10.1111/febs.13410>

HOTTI, H.; RISCHER, H. The killer of Socrates: coniine and related alkaloids in the plant kingdom. **Molecules**, v. 22, p. 1–23, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22111962>

IQVIA INSTITUTE. The global use of medicine in 2019 and outlook to 2023 – Forecasts and areas to watch. Parsippany. 2019. Disponível em < <https://www.iqvia.com/insights/the-iqviainstitute/reports/the-global-use-of-medicine-in-2019-and-outlook-to-2023>>. Acesso em 10 de março de 2022.

JEANDET, P.; FORMELA-LUBOINSKA, M.; LABUDDA, M.; MORKUNAS, I. The role of sugars in plant responses to stress and their regulatory function during development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 5161, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23095161>

JEWERS, K.; NAGLER, M. J.; ZIRVI, K. A.; AMIR, F. Lipids, sterols, and a piperidine

alkaloid from *Prosopis Spicigera* leaves. **Phytochemistry**, v. 15, p. 238–240, 1976.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89105-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89105-0)

JOTHY, S. L.; TOREY, A.; DARAH, I.; CHOONG, Y. S.; SARAVANAN, D.; CHEN, Y.; LATHA, W.; 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. <https://doi.org/10.3390/molecules170910292>

KAMO, T.; MACHARA, K.; SATO, K.; HIROTA, M. Spectamines A and B, possible inhibitor of superoxide anion production of macrophages from *Cassia spectabilis*. **Heterocycles**, v. 60, n. 6, p. 1303–1306, 2003. <https://doi.org/10.3987/COM-03-9755>

KHUONG-HUU, Q.; RATTLE, G.; MONSEUR, X.; GOUTAREL, R. II. Structures de la prosopine et de la prosopinine, alcaloides du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 81, p. 425–442, 1972a. <https://doi.org/10.1002/bscb.19720810141>

KHUONG-HUU, Q.; RATTLE, G.; MONSEUR, X.; GOUTAREL, R. III. Nouveaux alcaloides du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub.: isoprosopinines A et B, prosophylline, prosafrine et prosafrinine. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 81, p. 443–458, 1972b. <https://doi.org/10.1002/bscb.19720810142>

KISHIMOTO, S.; TSUNEMATSU, Y.; SATO, M.; WATANABE, K. Elucidation of biosynthetic pathways of natural products. **The Chemical Record**, v. 17, p. 1–15, 2017. <https://doi.org/10.1002/tcr.201700015>

KLEIN, S., HEINZLE, E. Isotope labeling experiments in metabolomics and fluxomics. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 261–272, 2012. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1167>

KREBS, H. C.; RAMIARANTSOA, H. Piperidine alkaloids and other constituents of *Dialypetalum foribundum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 911–913, 1998. <https://doi.org/10.1002/CHIN.199842219>

LACERDA, R. B. M.; FREITAS, T. R.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, T. L.; SILVA, C. V.; CANDIDO, P. A.; OLIVEIRA, R. J.; VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M. Isolation, leishmanicidal evaluation and molecular docking simulations of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5816–5823, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.032>

LANE, A. N.; FAN, T. W.; HIGASHI, R. M. Isotopomer-based metabolomic analysis by NMR and mass spectrometry. **Methods in Cell Biology**, v. 84, p. 541–588, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84018-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84018-0)

LEETE, E. The biosynthesis of coniine from four acetate units. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 21, p. 3523–3524, 1963. <https://doi.org/10.1021/ja00904a065>

LEETE, E. Biosynthesis of the Hemlock Alkaloids. The incorporation of acetate-1- C^{14} into coniine and conhydrine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 12, p. 2509–2513, 1964. <https://doi.org/10.1021/ja01066a039>

LEETE, E. Biosynthesis of coniine from octanoic acid in hemlock plants (*Conium maculatum*). **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, n. 12, p. 3835, 1970. <https://doi.org/10.1021/ja00715a074>

LEETE, E. Biosynthesis of the hemlock and related piperidine alkaloids. **Accounts of Chemical Research**, v. 4, n. 3, p. 100–107, 1971. <https://doi.org/10.1021/ar50039a004>

LEETE, E.; JUNEAU, K. N. Biosynthesis of pinidine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 20, p. 5614–5618, 1969. <https://doi.org/10.1021/ja01048a031>

LEETE, E.; LECHLEITER, J. C.; CARVER, R. A. Determination of the “starter” acetate unit in the biosynthesis of pinidine. **Tetrahedron**, n. 44, p. 3779–3782, 1975. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)91271-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91271-1)

LEETE, E.; OLSON, J. O. 5-Oxo-octanoic acid and 5-oxo-octanal, precursors of coniine. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, n. 23, p. 1651–1652, 1970. <https://doi.org/10.1039/C29700001651>

LEMMA, D. T.; BANJAW, D. T.; MEGERSA, H. G. Micropropagation of medicinal plants. Review. **International Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 7, n. 2, p. 796–802, 2020.

LIM, K. T.; AMANAH, A.; CHEAR, N. J.-Y.; ZAHARI, Z.; ZAINUDDIN, Z.; ADENAN, M. I. Inhibitory effects of (+)-spectaline and *iso*-6-spectaline from *Senna spectabilis* on the growth and ultrastructure of human-infective species *Trypanosoma brucei rhodesiense* bloodstream form. **Experimental Parasitology**, v. 184, p. 57–66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.11.007>

LOPEZ, T. A.; CID, M. S.; BIANCHINI, M. L. Biochemistry of hemlock (*Conium maculatum* L.) alkaloids and their acute and chronic toxicity in livestock. A review. **Toxicon**, v. 37, p. 841–865, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(98\)00204-9](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00204-9)

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002b. p. 291.

MACCONNELL, J. G.; BLUM, M. S. The chemistry of fire ant venom. **Tetrahedron**, v. 27, n. 6, p. 1129–1139, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90860-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90860-9)

MACEDO JÚNIOR, F. C. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116–124, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100023>

MAKHOBBA, X. H.; VIEGAS JÚNIOR, C.; MOSA, R. A.; VIEGAS, F. P. D.; POOE, O. J. Potential impact of the multi-target drug approach in the treatment of some complex diseases, drug design. **Development and Therapy**, v. 14, p. 3235–3249, 2020. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S257494>

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

MIDANI, F. S.; WYNN, M. L.; SCHNELL, S. The importance of accurately correcting for the natural abundance of stable isotopes. **Analytical Biochemistry**, v. 520, 27–43, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016>.

MOO-PUC, R. E.; MENA-REJON, G. J.; QUIJANO, L.; CEDILLO-RIVERA, R. Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 415–416, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.028>

MULCHANDANI, N. B.; HASSARAJANI, S. A. Cassinicine, a new alkaloids and anthraquinones from *Cassia Spectabilis* and their biogenetic relationship. **Planta Médica**, v. 32, p. 357, 1977. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097612>

MUSQUIARI, B.; CREVELIN, E. J.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; CASTELLO, A. C. D.; CASTILLO-ORDOÑEZ, W. O.; GIULIATTI, S.; LOPES, A. A. Precursor-directed biosynthesis in *Tabernaemontana catharinensis* as a new avenue for alzheimer's disease-modifying agents. **Planta Medica**, v. 87, p. 136–147, 2021. <https://doi.org/10.1055/a-1315-2282>

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; YAMADA, K.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Growth inhibitory alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) leaves. **Phytochemistry**, v. 65, p. 587–591, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.01.006>

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7 Porto Alegre: Artmed, 2019, 1278 p.

NETO, R. N. M.; WEBER-SOARES, L.; DIAS, L. R. L.; SILVA, L. C. N.; MIRANDA, R. C. M. Biotechnological production of statins: metabolic aspects and genetic approaches. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 20, n. 15, p. 1244–1259, 2019. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190718165746>

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, p. 770–803, 2020. <http://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NKANTCHOUA, G. C. N.; NJAPDOUNKE, J. S. K.; FIFEN, J. J.; TAIWE, G. S.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.042>

O'HAGAN, D. Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 435–446, 2000. <https://doi.org/10.1039/A707613D>

OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F.; PASSOS, F. B.; AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, F. F.; SOUSA, S. R. Crescimento de espécies nativas em um plantio de recuperação de Cerrado sentido restrito no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 1, p. 25–32, 2015.

OTT-LONGONI, R.; VISWANATHAN, N.; HESSE, M. 222. Die konstitution des alkaloides juliprosopin aus *Prosopis juliflora* A. DC. **Helvetica Chimica Acta**, v. 63, n. 222, p. 2119–2129, 1980. <https://doi.org/10.1002/hlca.19800630738>

PATTERSON, B. W. Use of stable isotopically labeled tracers for studies of metabolic kinetics: an overview. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 46, n. 3, p. 322–329, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(97\)90260-2](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(97)90260-2)

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237–243, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00456-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00456-8)

PILON, A. C.; VALLI, M.; DAMETTO, A. C.; PINTO, M. E. F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07451-x>

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JÚNIOR, 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 cometabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431–1438, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800023>

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

RAD, M. M.; ABDOSSI, V.; MORADI, P.; RAKHSHANDEHROO, F.; MEHRAFARIN, A. Expression analysis of gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) and cardenolide and digitoxin production in *Digitalis purpurea* L. using polyamines and methyl jasmonate as elicitors. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 22, n. 6, p. 1551–1561, 2020.

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

ROBERTS, M. F. The formation of γ -coniceine from 5-keto-octanal by a transaminase of *Conium maculatum*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 12, p. 3057–3060, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97351-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97351-5)

ROBERTS, M.F. Origin of the methyl carbon of methylconiine in *Conium maculatum*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1841–1845, 1974a. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(74\)85099-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(74)85099-5)

ROBERTS, M.F. An S-adenosyl-L-methionine, coniine methyltransferase from *Conium maculatum*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1847–1851, 1974b. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(74\)85100-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(74)85100-9)

ROBERTS, M.F. Purification and properties of L-alanine: 5-keto-octanal aminotransferase from *Conium maculatum*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 9, p. 1381–1386, 1977. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88787-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88787-7)

ROBINSON, R. LXXV. A Theory of the mechanism of the phytochemical synthesis of certain alkaloids. **Journal of Chemical Society**, v. 111, n. 876, 1917. <https://doi.org/10.1039/CT9171100876>

RÜHL, M.; RUPP, B.; NÖH, K.; WIECHERT, W.; SAUER, U.; ZAMBONI, N. Collisional fragmentation of central carbon metabolites in LC-MS/MS increases precision of ¹³C metabolic flux analysis. **Biotechnology Bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 763–771, 2012. <https://doi.org/10.1002/bit.24344>

SADO, M.; TAVARES, A. R.; CHU, E. P. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid increases reserve compounds and spectraline contents in *Senna spectabilis* calli. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 35, p. 3567–3575, 2014. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.13856>

SANTARÉM, E. R. SAAT: Transformação de plantas mediada por ultra-som e agrobacterium. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 725–730, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000400029>

SCHIERBEEK, H.; VAN DEN AKKER, C. H.; FAY, L. B.; VAN GOUDOEVER, J. B. High-precision mass spectrometric analysis using stable isotopes in studies of children. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 2, p. 312–330, 2012. <https://doi.org/10.1002/mas.20344>

SELEGATO, D. M.; MONTEIRO, A. F.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P.; PAVANI, V. D.; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Update: Biological and chemical aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, 415–426, 2017. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160322>

SHI, Q.; HU, L.; WANG, W.; MEER, R. K. V.; PORTER, S. D.; CHEN, L. Workers and alate queens of *Solenopsis geminata* share qualitatively similar but quantitatively different venom alkaloid chemistry. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 76, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00076>

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. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.83772>

SILVA, K. A. B. S.; MANJAVACHI, M. N.; PASZCUK, A. F.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; CALIXTO, J. B. Plant derived alkaloid (–)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and

neuropathic pain models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 967–977, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.002>

SRIPHONG, L.; SOTANAPHUN, U.; LIMSIRICHAIKUL, S.; WETWITAYAKLUNG, P.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PUMMANGURA, S. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*, p. 1054–1056, 2003. <https://doi.org/10.1055/s-2003-45156>

SRIVASTAV, V. K.; EGBUNA, C.; TIWARI, M. Chapter 1 - Plant secondary metabolites as lead compounds for the production of potent drugs, Editors: EGBUNA, C.; KUMAR, S.; IFEMEJE, J. C.; EZZAT, S. M.; KALIYAPERUMAL, S. **Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery**, Elsevier, 2020, p. 3–14.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817890-4.00001-9>.

SZŐKE, É., LEMBERKOVICS, É., KURSINSZKI, L. (2013). **Alkaloids Derived from Lysine: Piperidine Alkaloids**. In: Ramawat, K., Mérillon, JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_10

TAWARA, J. N.; STERMITZ, F. R.; BLOKHIN, A. V. Alkaloids of young ponderosa pine seedlings and late steps in the biosynthesis of pinidine. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 705–708, 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00928-M](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00928-M)

TISNERAT, C.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; GOSSELET, F.; SONNET, P. Antimalarial drug discovery: from quinine to the most recent promising clinical drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 19, p. 3326–3365, 2022.
<https://doi.org/10.2174/0929867328666210803152419>

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M., BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M., TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.12, p. 908–910, 2004. <https://doi.org/10.1021/np0303963>

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New anti-alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 915–926, 2005a.
<https://doi.org/10.2174/138955705774329546138>

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

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

WEI, X.; SHI, B.; KOO, I.; YIN, X.; LORKIEWICZ, P.; SUHAIL, H.; RATTAN, R.; GIRI, S.; MCCLAIN, C. J.; ZHANG, X. Analysis of stable isotope assisted metabolomics data

acquired by GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 980, p. 25–32, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.002>

WIECHERT, W. ^{13}C Metabolic Flux Analysis. **Metabolic Engineering**, v. 3, p. 195–206, 2001. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0187>

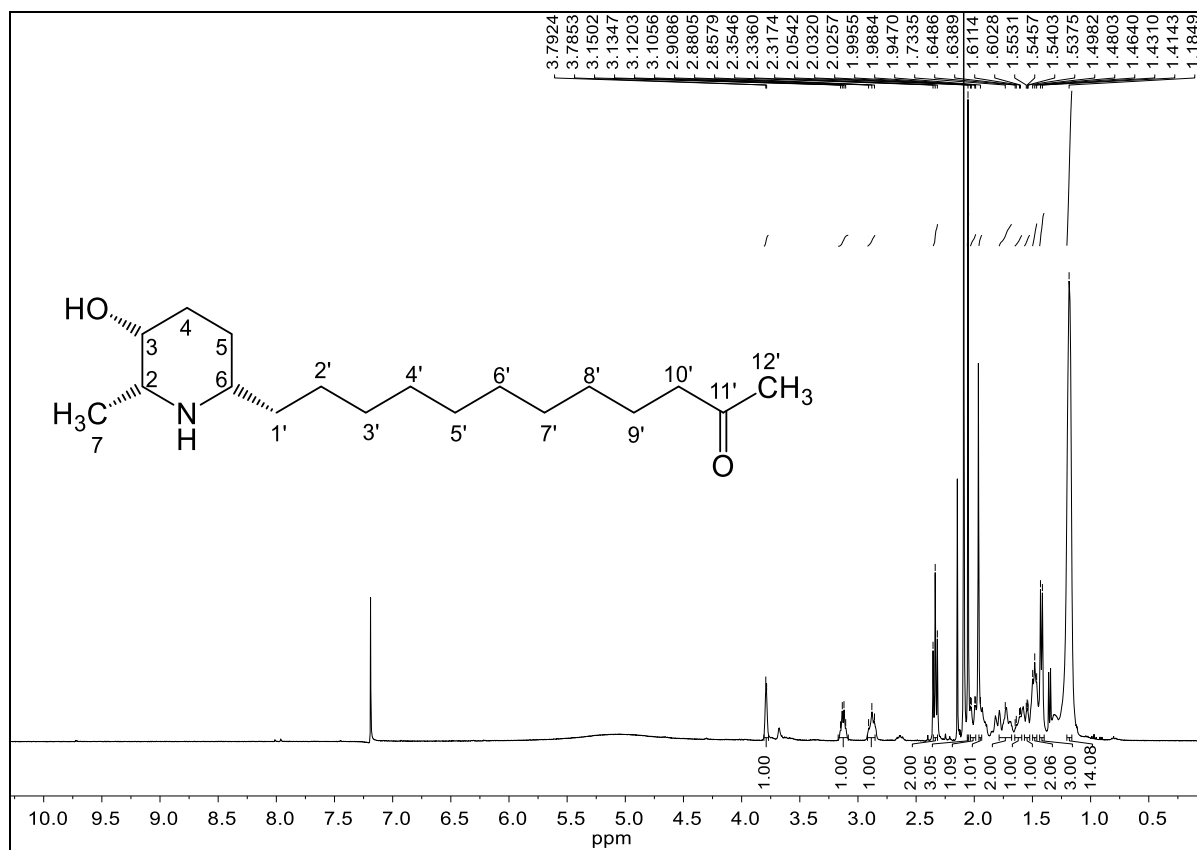
WOLFENDER, J.; QUEIROZ, E. F. New approaches for studying the chemical diversity of natural resources and the bioactivity of their constituents. **Chimia**, v. 66, n. 5, p. 324–329, 2012. <https://doi.org/10.2533/chimia.2012.324>

YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>

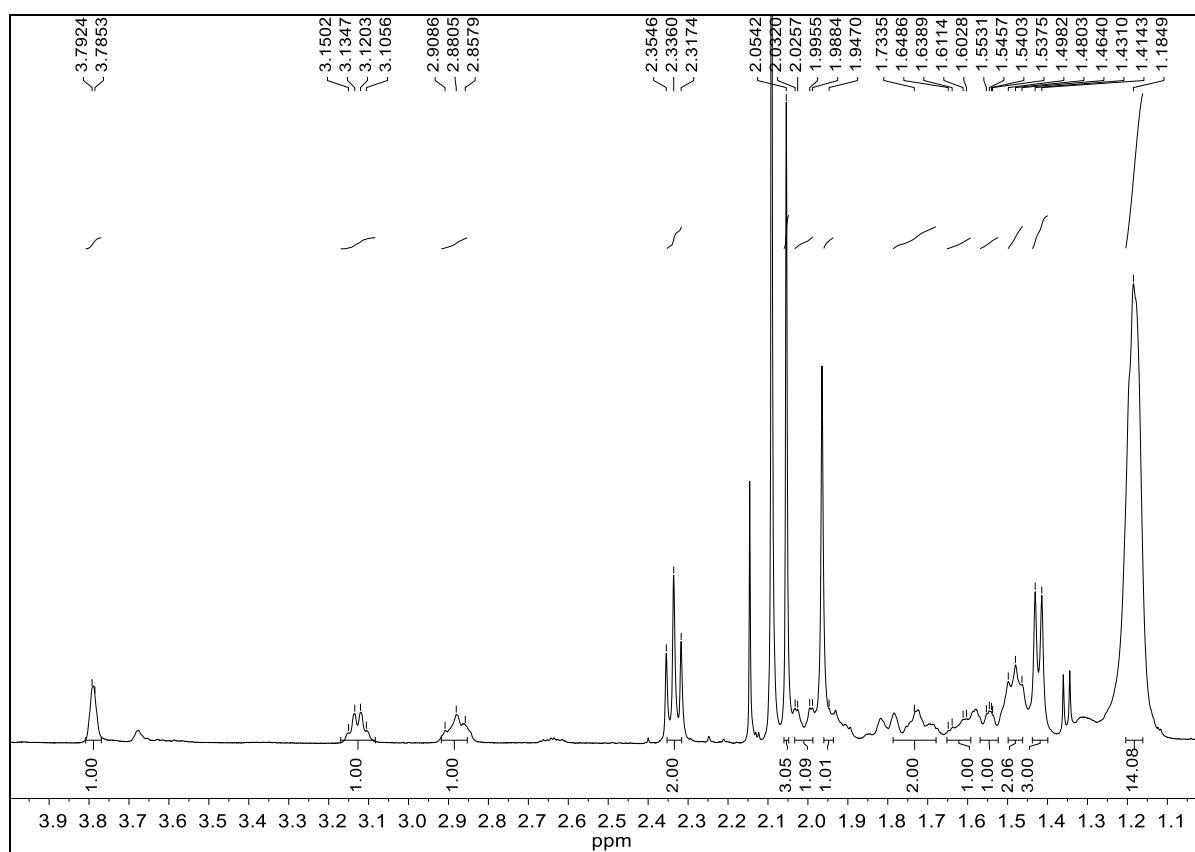
ZHANG, Y., SHI, J., NI, Y. Q.; LIU, Y.; ZHAO, Z.; ZHAO, X.; GAO, Z Tracing the mass flow from glucose and phenylalanine to pinoresinol and its glycosides in *Phomopsis* sp. XP-8 using stable isotope assisted TOF-MS. **Scientific Reports**, n. 9, p. 18495, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54836-1>

ZHENG, S.; ZENG, T.; LI, C.; CHEN, B.; COLEY, C. W.; YANG, Y.; WU, R. Deep learning driven biosynthetic pathways navigation for natural products with BioNavi-NP. **Nature Communications**, v. 13, n. 3342, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30970-9>

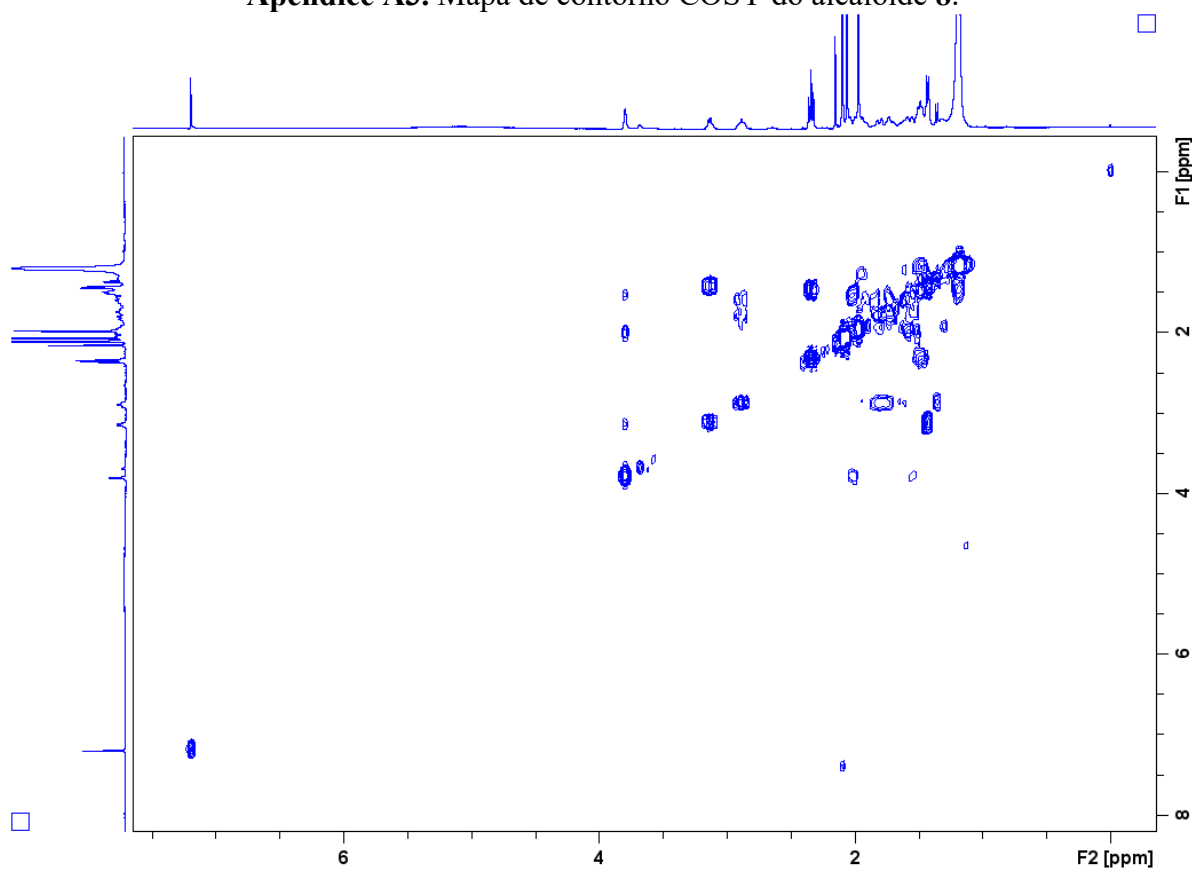
APÊNDICE A

Apêndice A1. Espectro de RMN de ^1H do alcaloide **8** (400 MHz, CDCl_3).

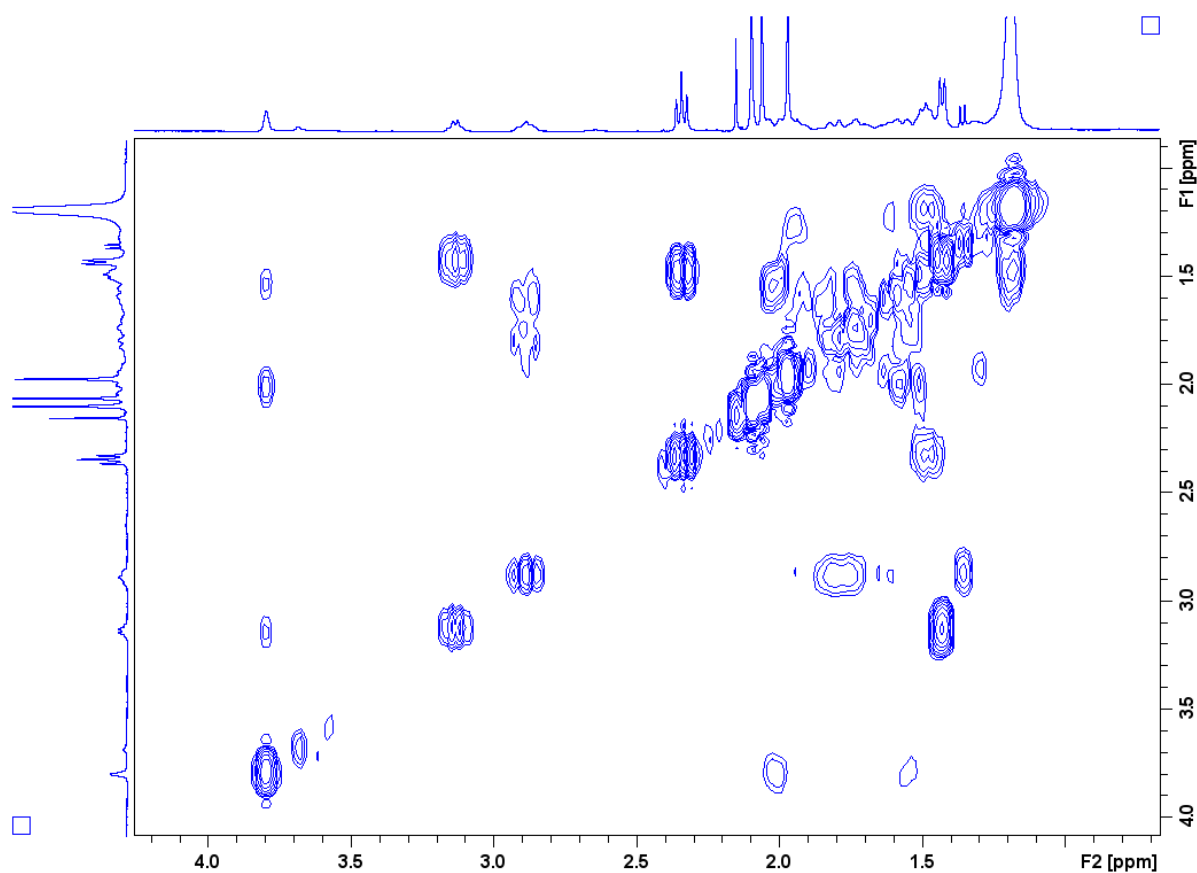
Apêndice A2. Ampliação do espectro A1 (δ 1,10–3,90) do alcaloide **8**.



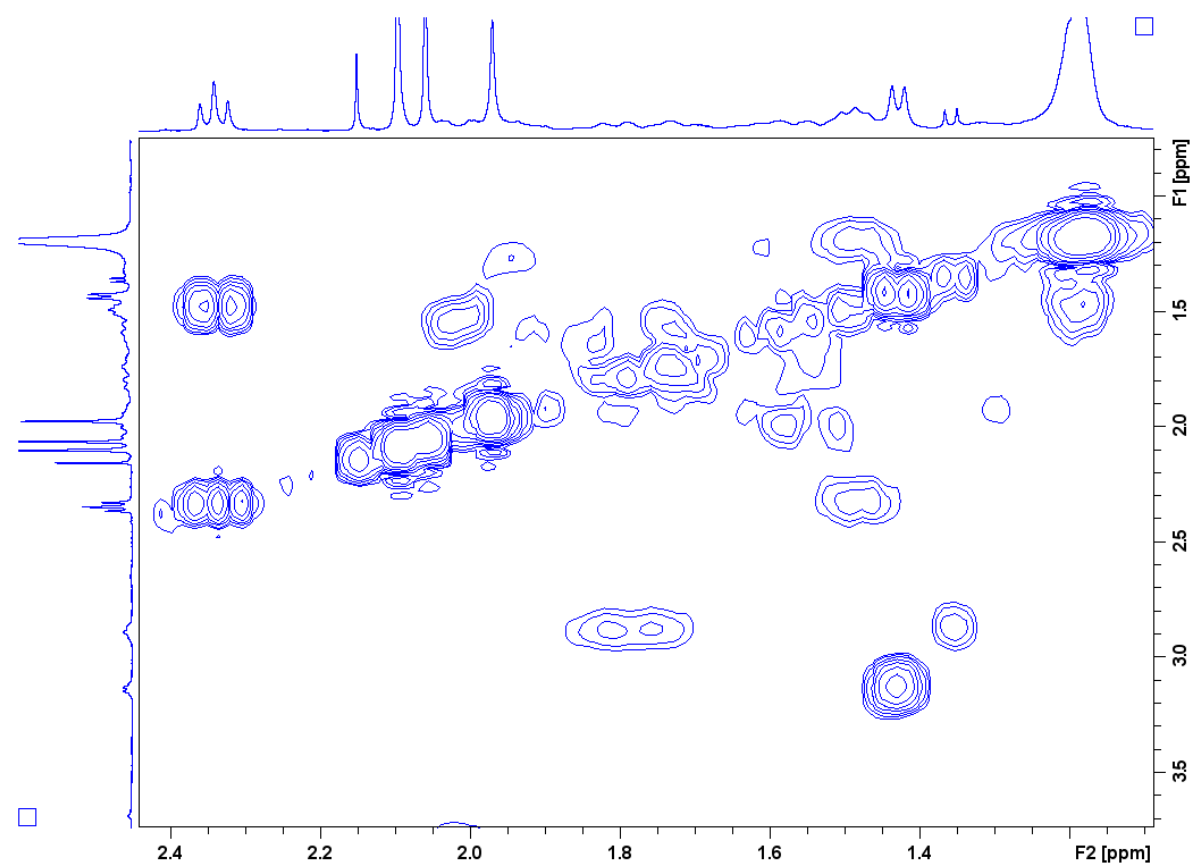
Apêndice A3. Mapa de contorno COSY do alcaloide **8**.



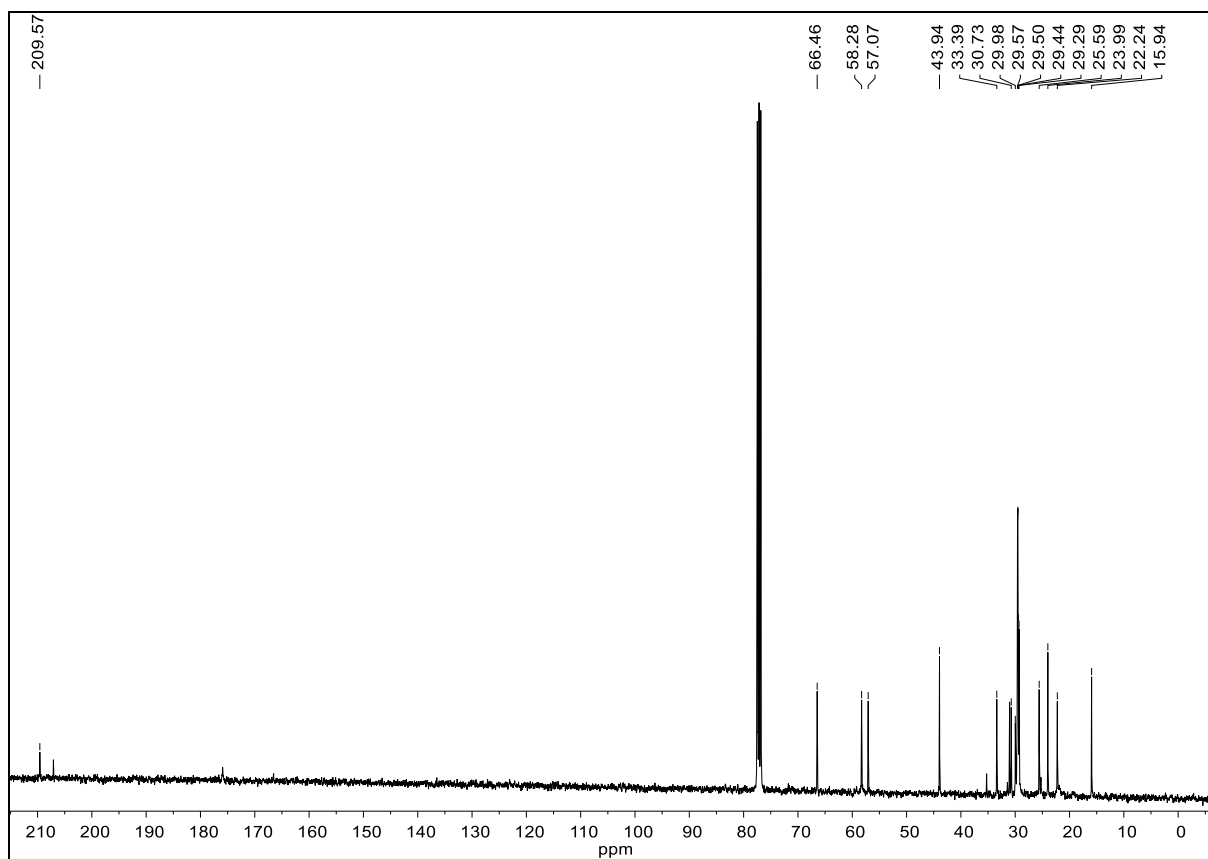
Apêndice A4. Mapa de contorno COSY (δ 1,0–4,2) do alcaloide **8**.



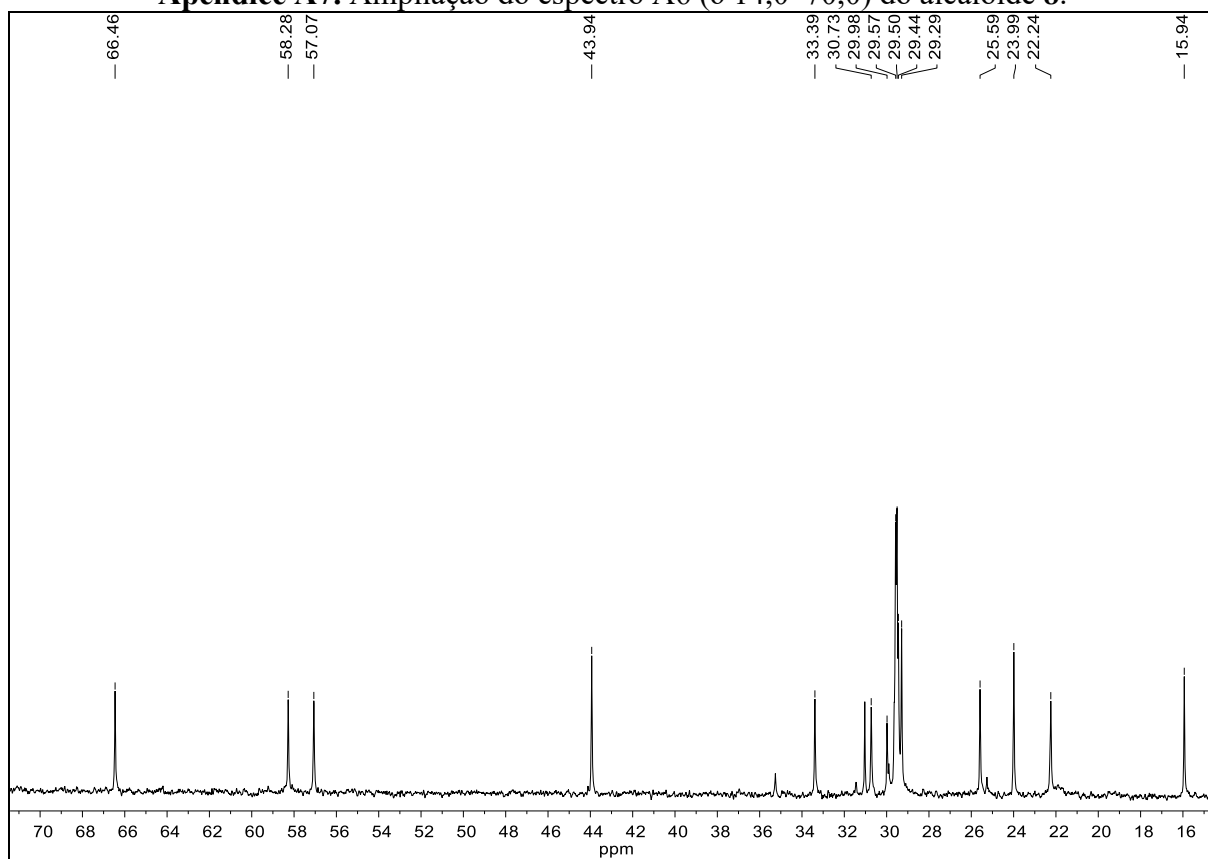
Apêndice A5. Mapa de contorno COSY (δ 1,0–2,4) do alcaloide **8**.

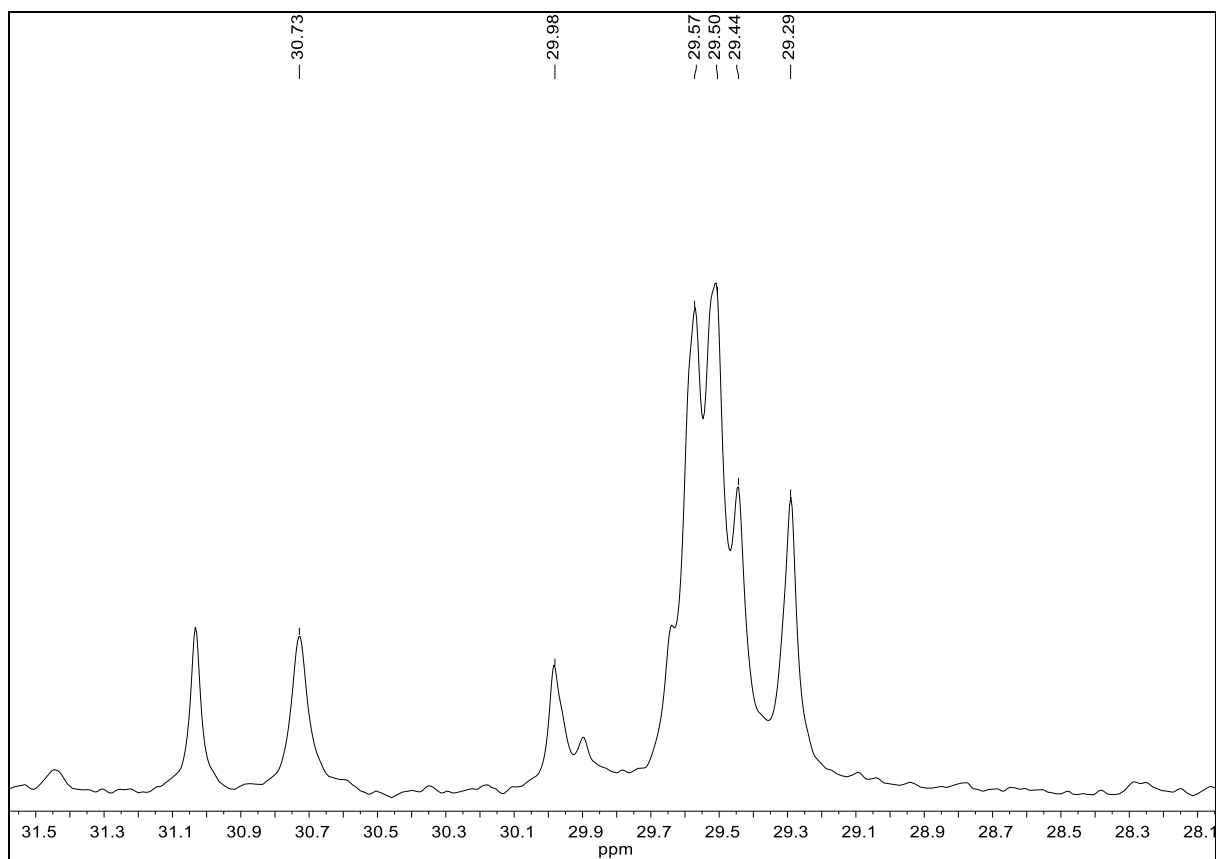
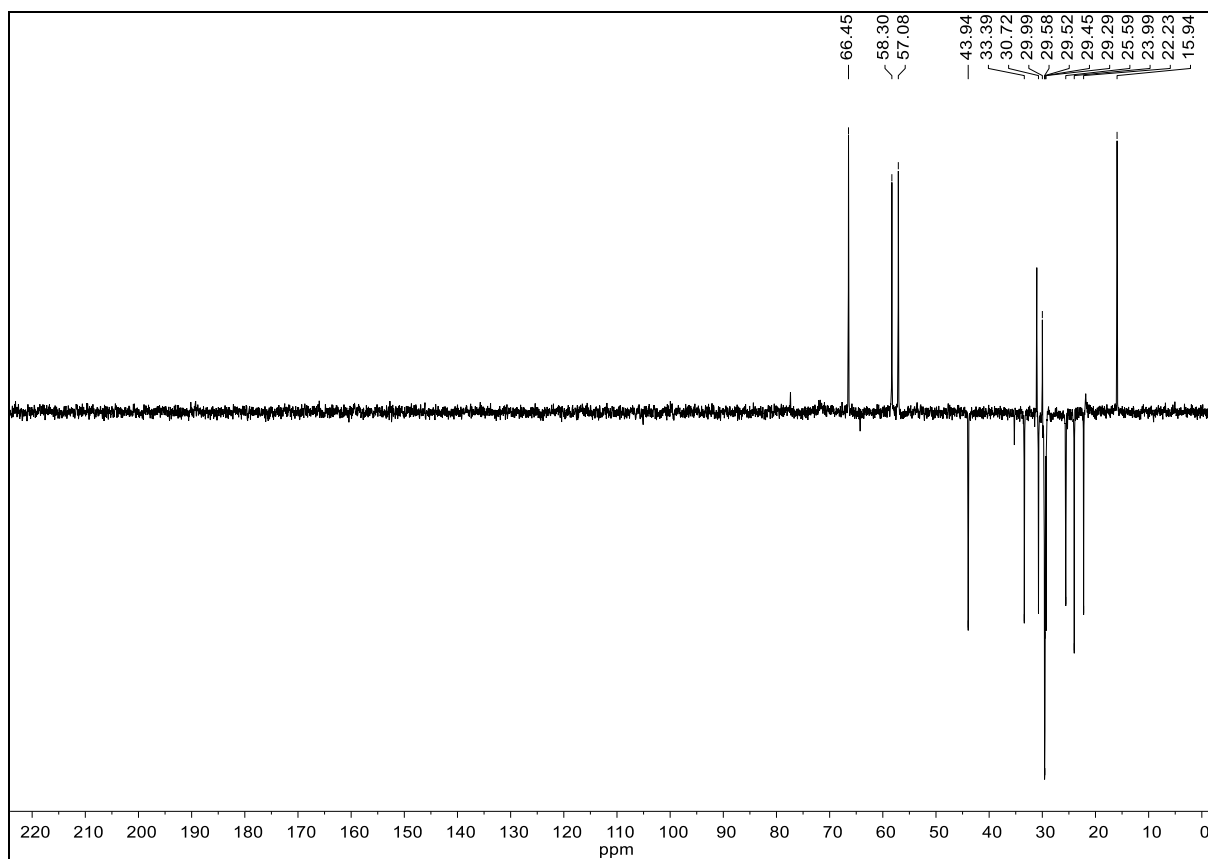


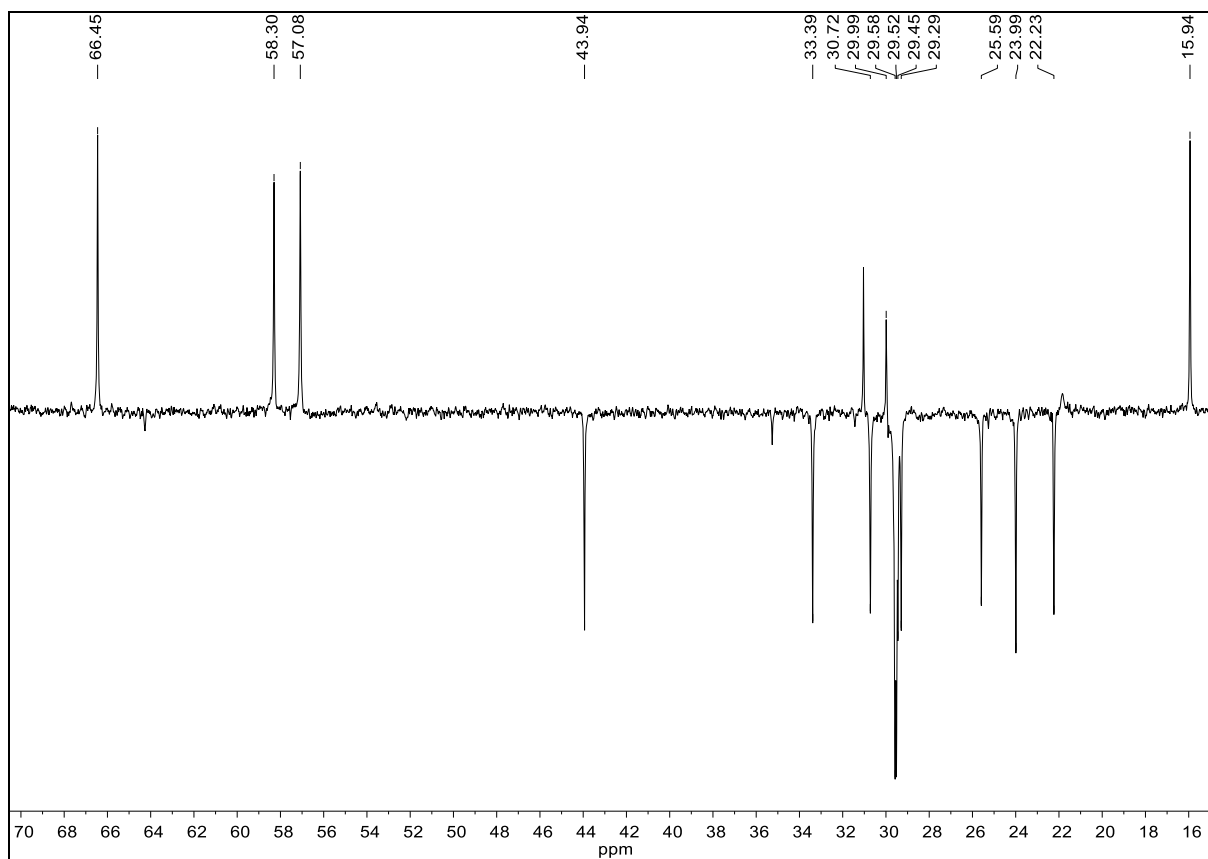
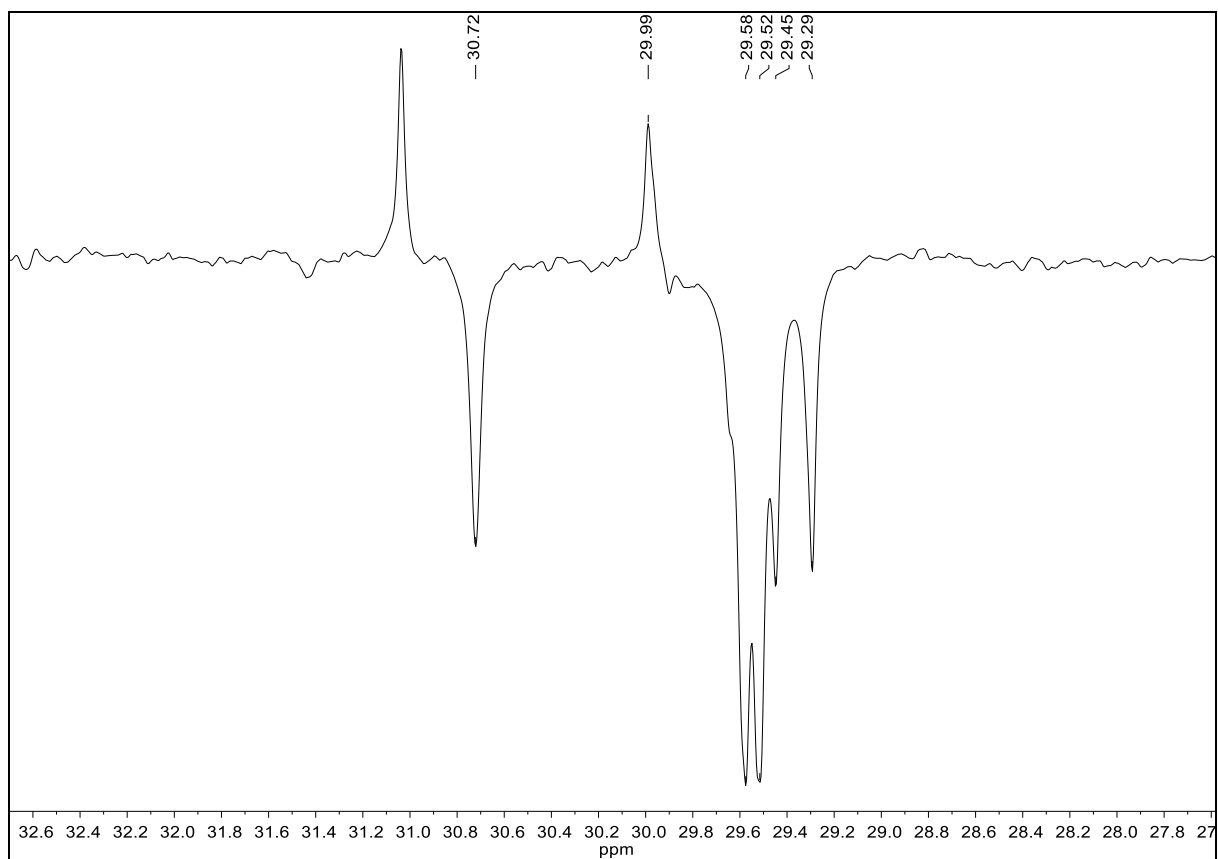
Apêndice A6. Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide **8** (100 MHz, CDCl_3).



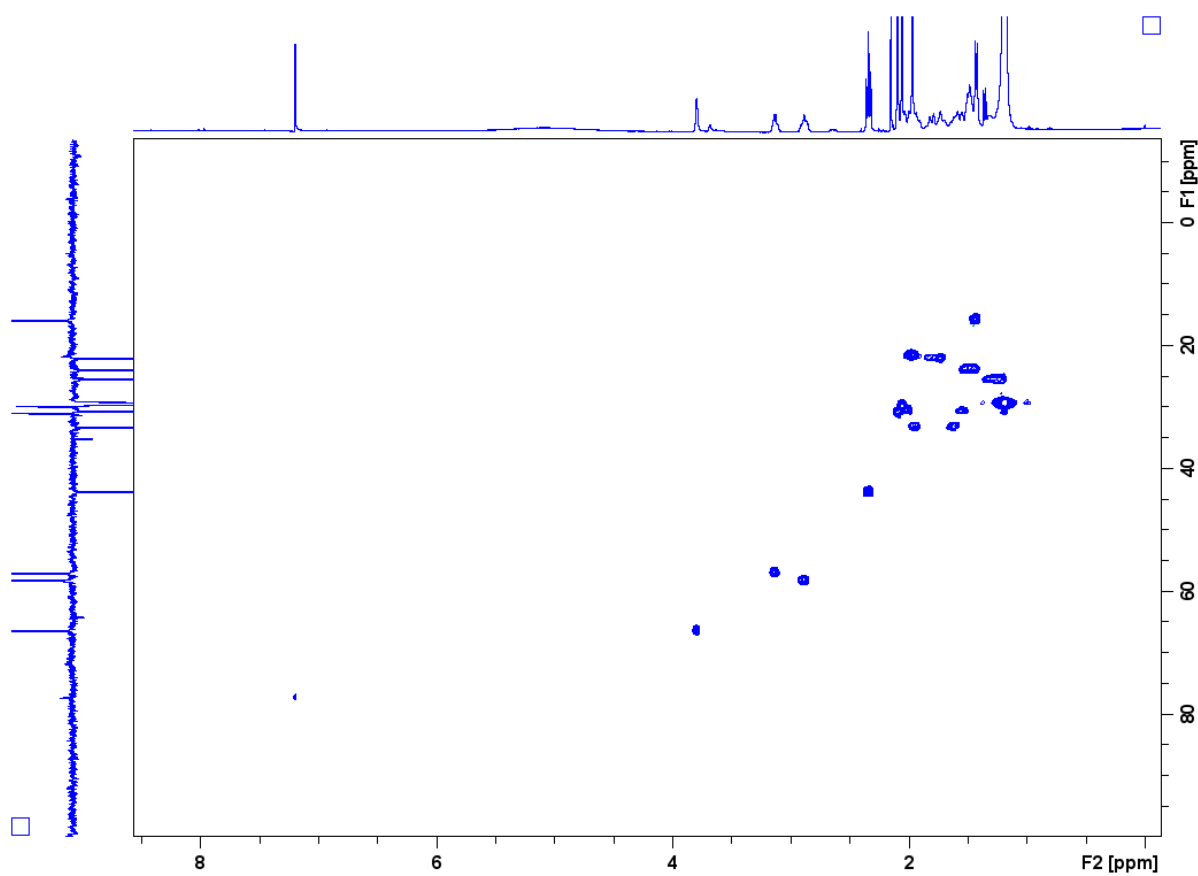
Apêndice A7. Ampliação do espectro A6 (δ 14,0–70,0) do alcaloide **8**.



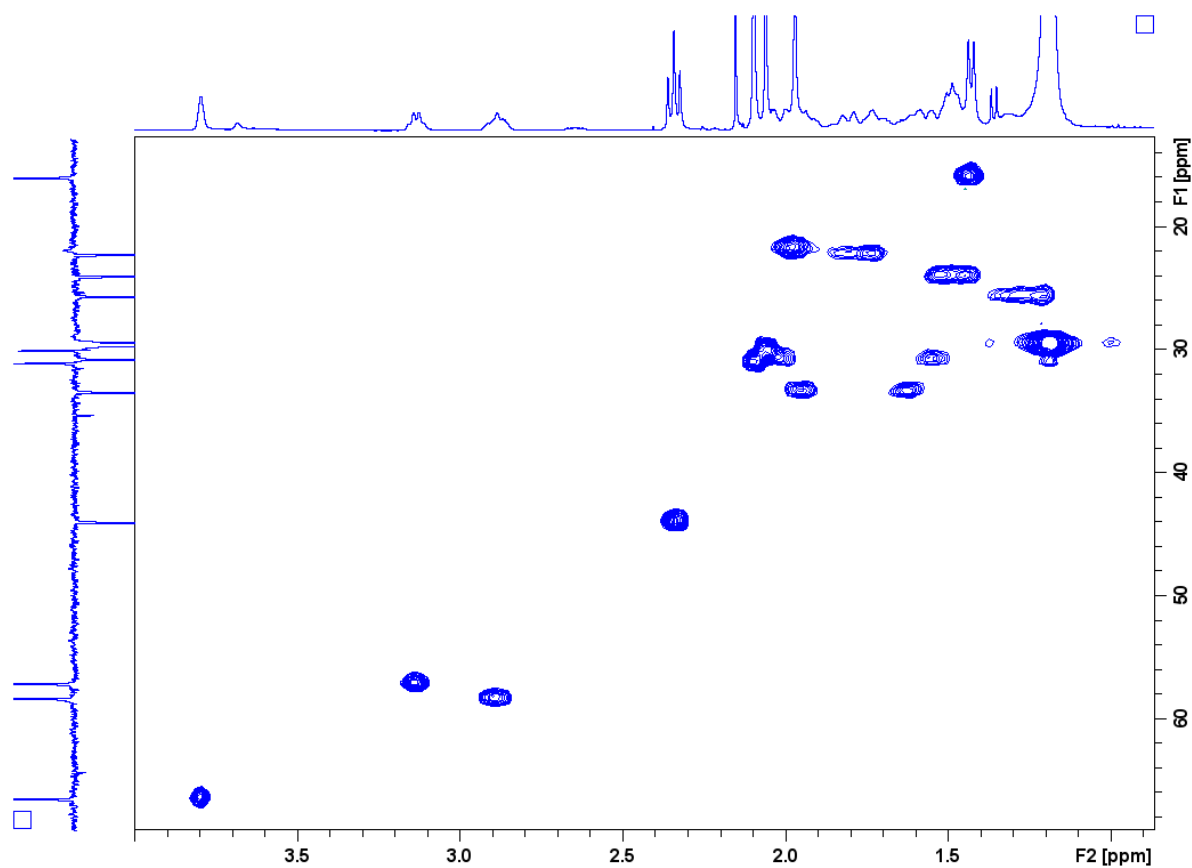
Apêndice A8. Ampliação do espectro A6 (δ 28,5–31,2) do alcaloide **8**.**Apêndice A9.** Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) do alcaloide **8**.

Apêndice A10. Ampliação do espectro A9 (δ 15,0–70,0) do alcaloide **8**.**Apêndice A11.** Ampliação do espectro A9 (δ 27,8–32,6) do alcaloide **8**.

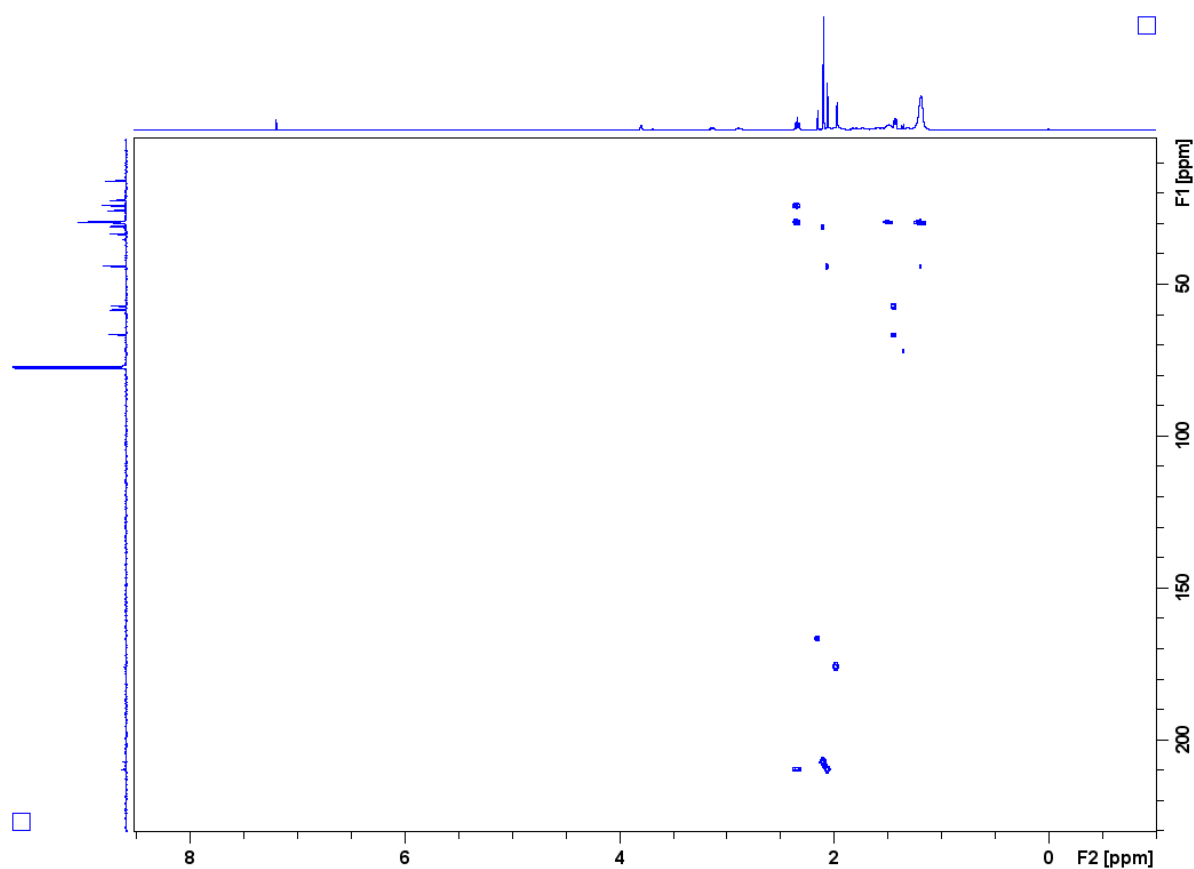
Apêndice A12. Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide **8**.



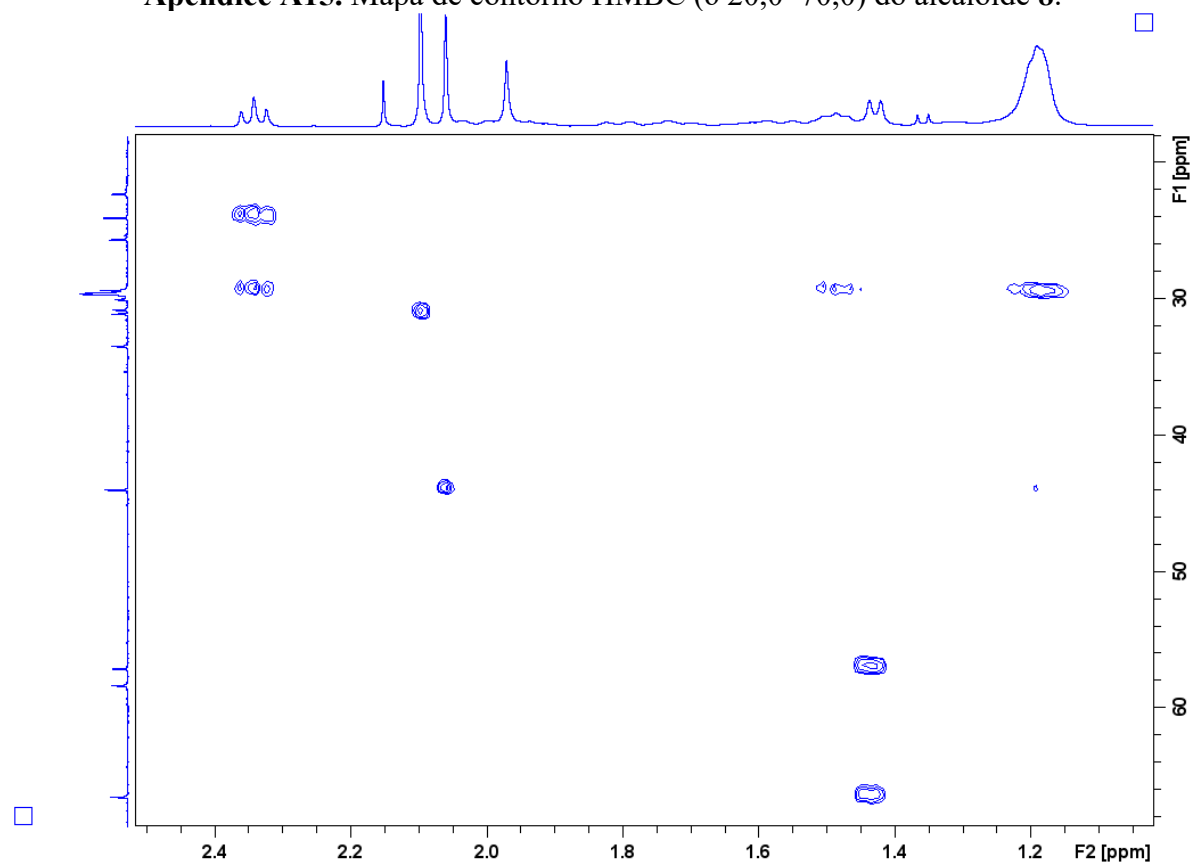
Apêndice A13. Mapa de contorno HSQC (δ 15,0–70,0) do alcaloide **8**.

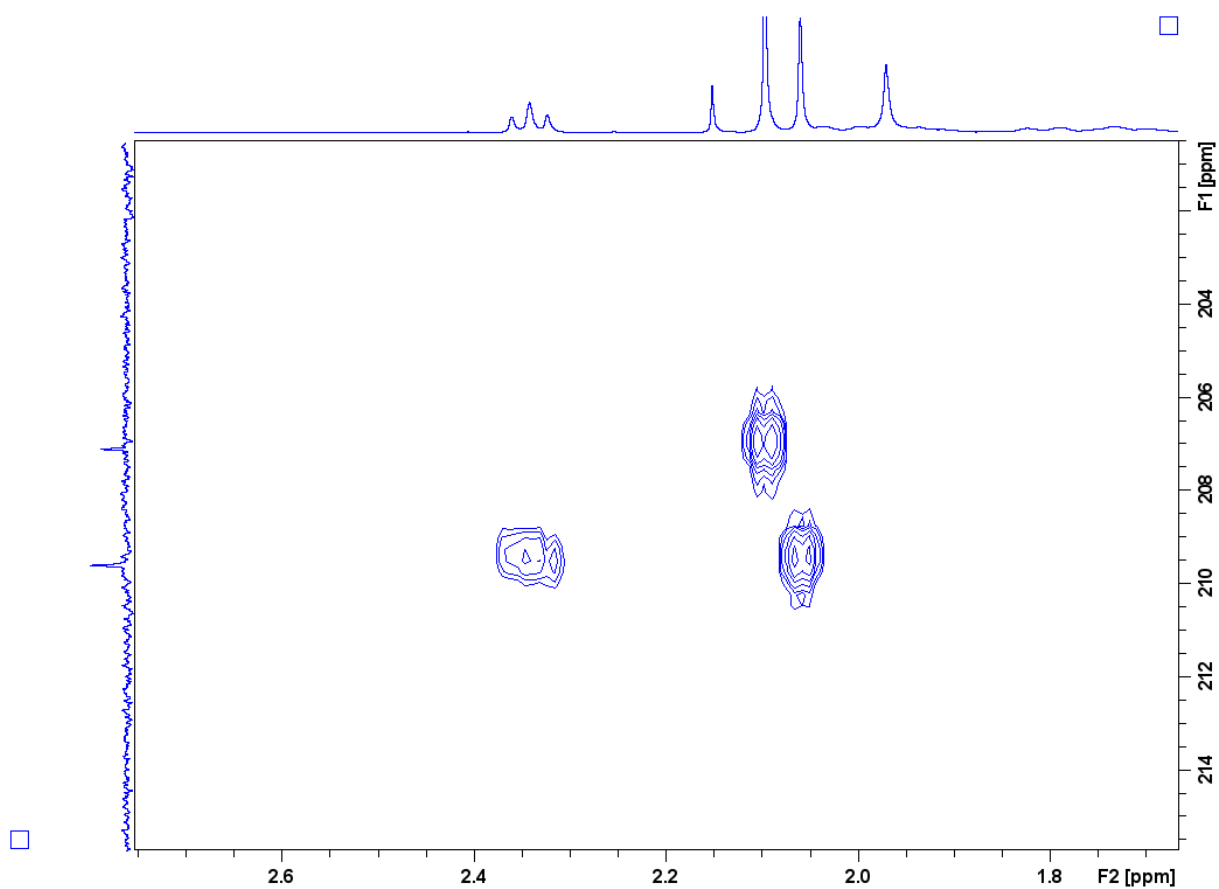


Apêndice A14. Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl₃) do alcaloide **8**.

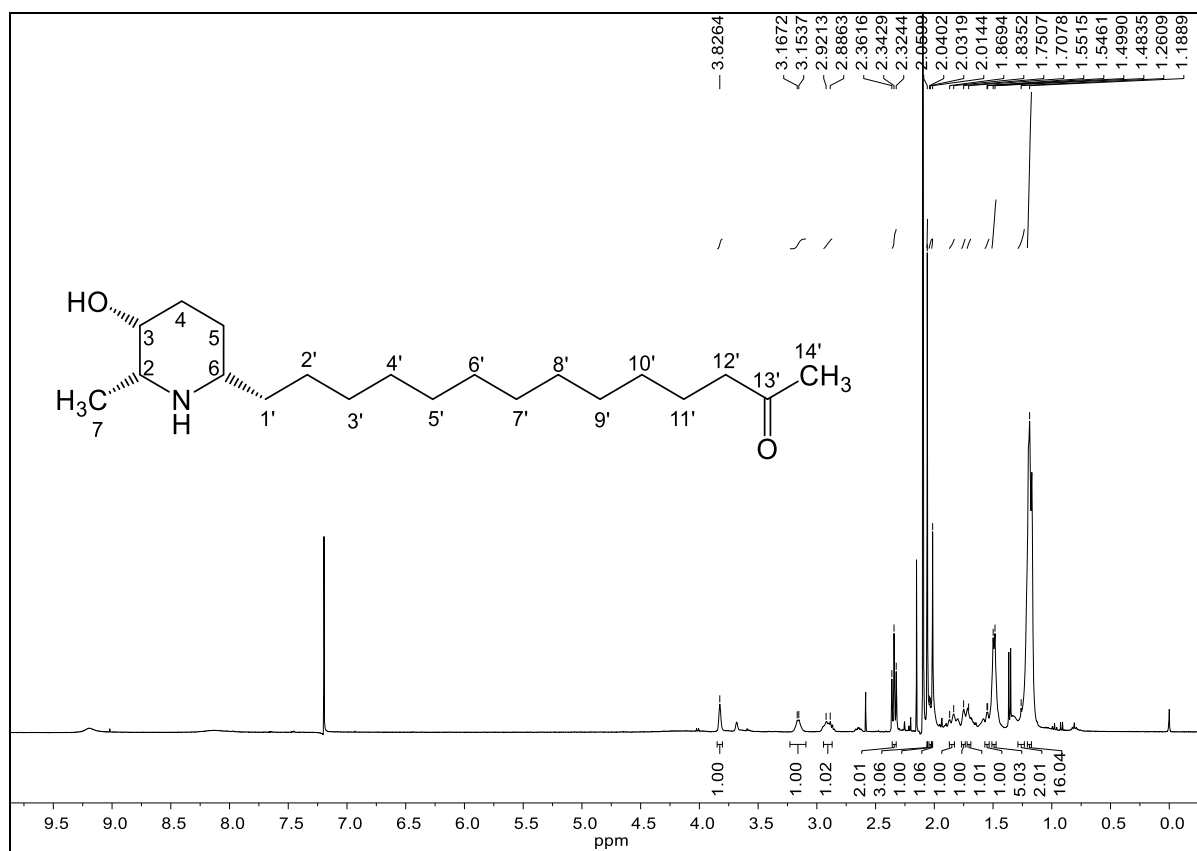


Apêndice A15. Mapa de contorno HMBC (δ 20,0–70,0) do alcaloide **8**.

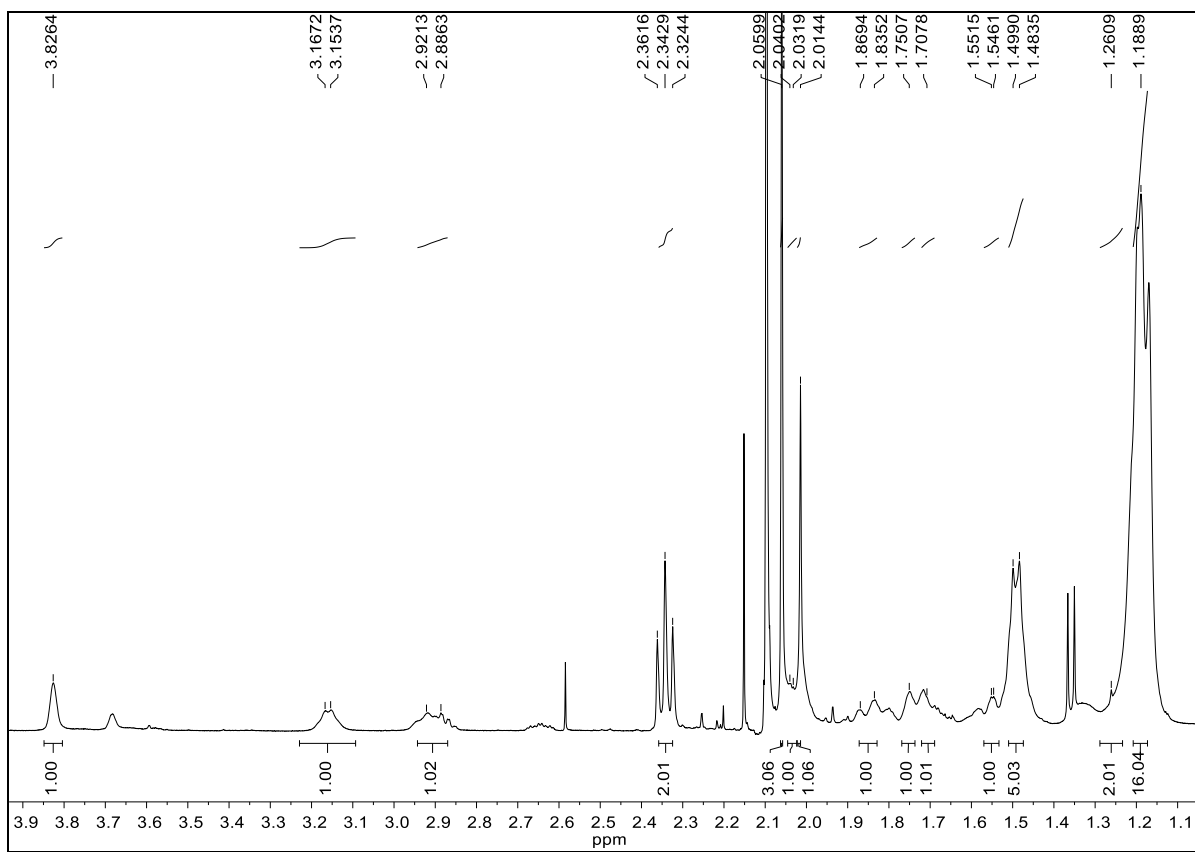


Apêndice A16. Mapa de contorno HMBC (δ 202,0–214,0) do alcaloide **8**.

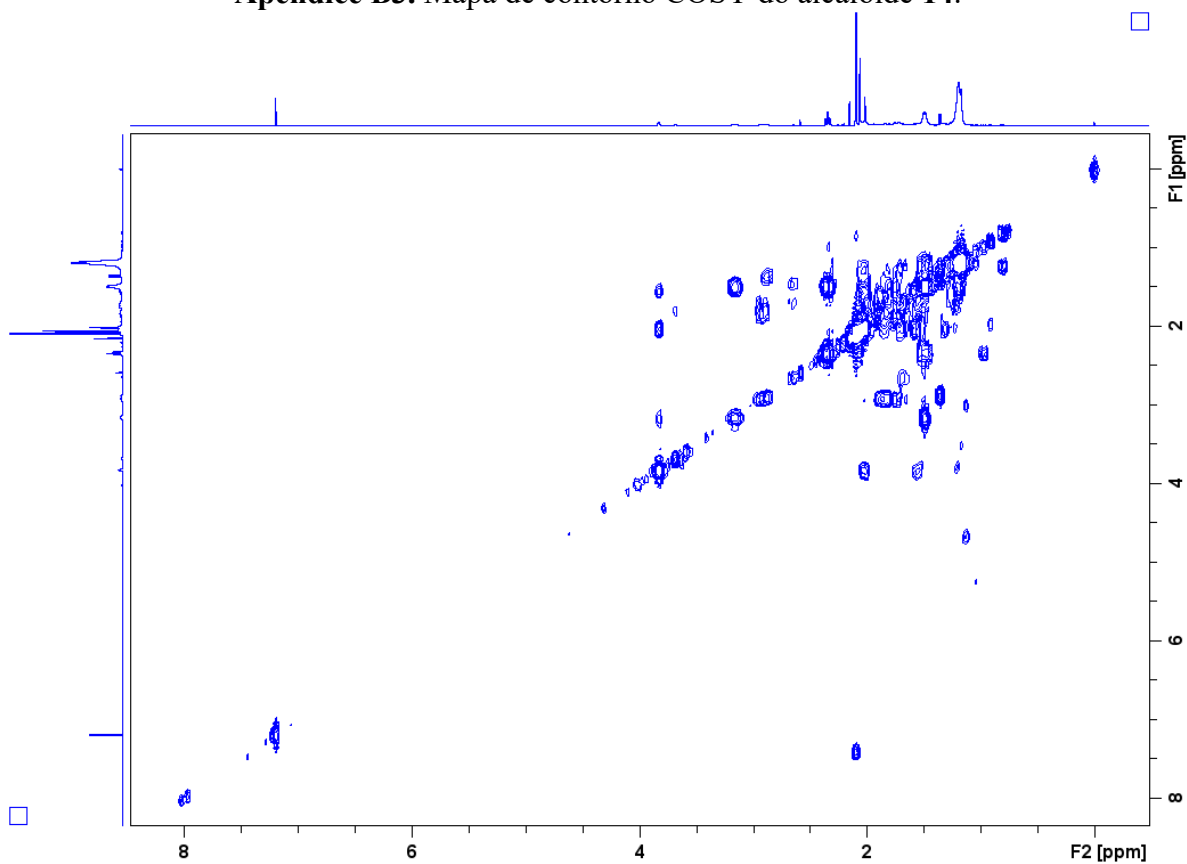
APÊNDICE B

Apêndice B1. Espectro de RMN de ^1H do alcaloide **14** (400 MHz, CDCl_3).

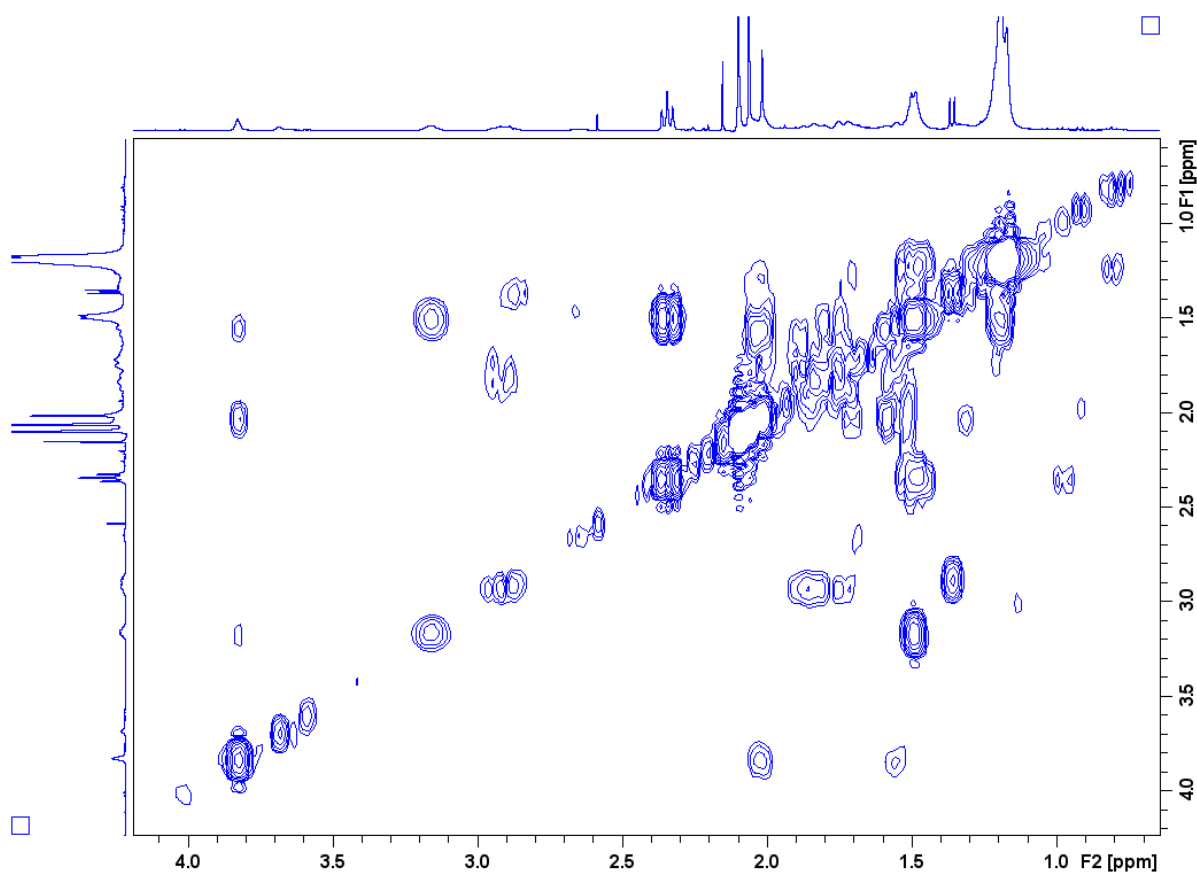
Apêndice B2. Ampliação do espectro B1 (δ 1,10–3,90) do alcaloide **14**.



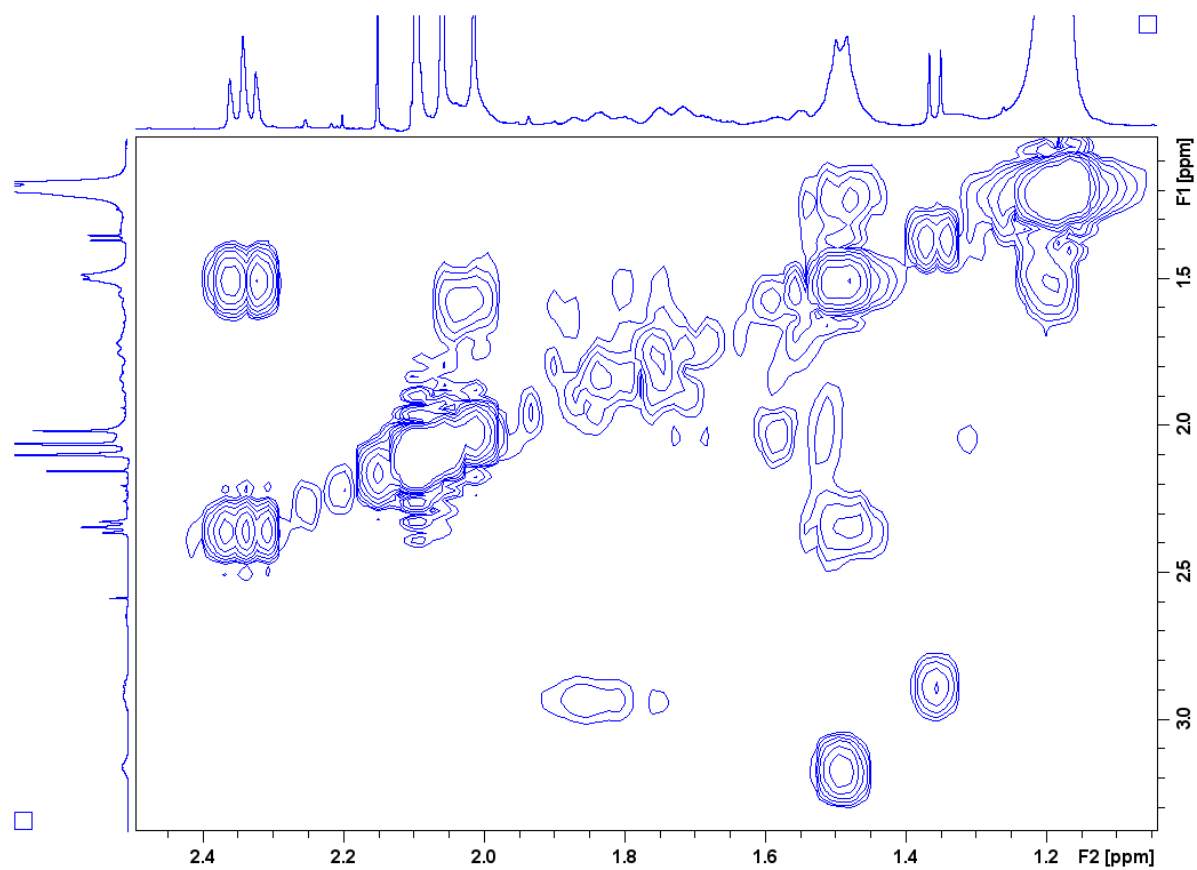
Apêndice B3. Mapa de contorno COSY do alcaloide **14**.



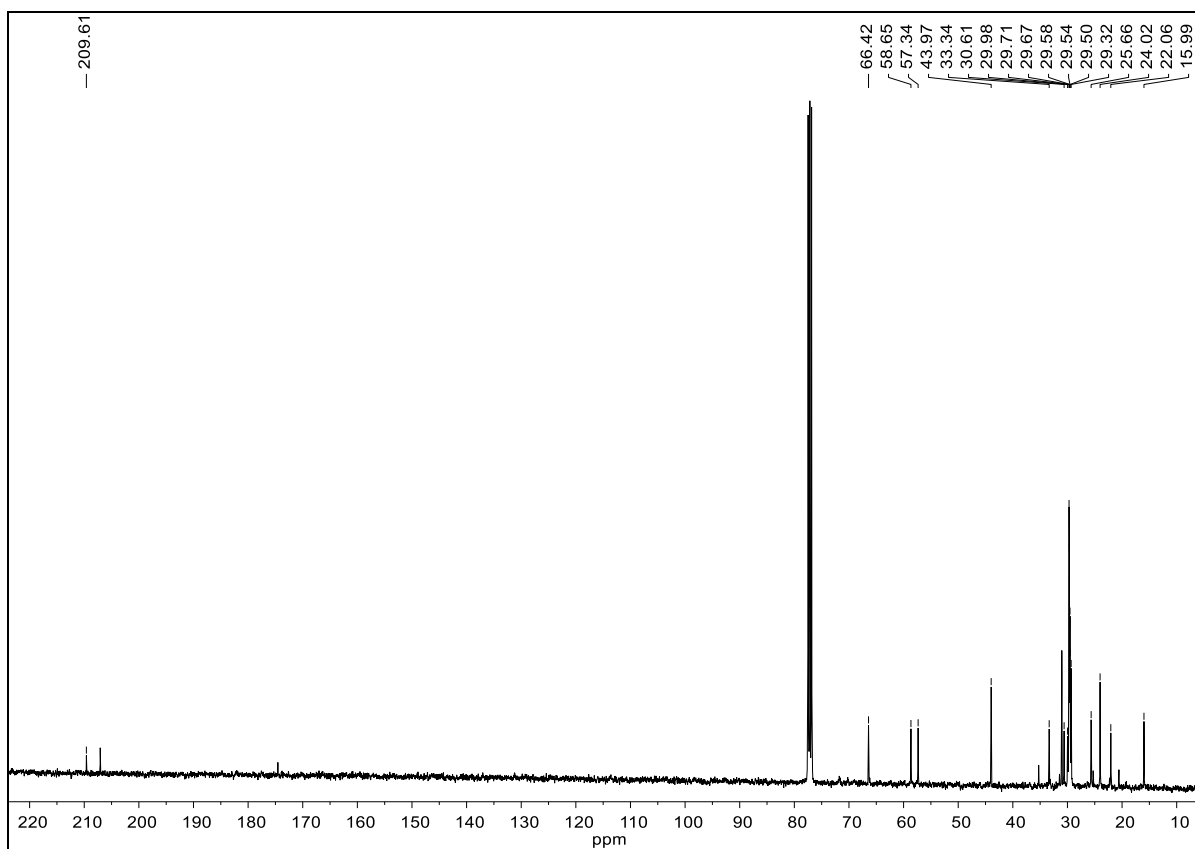
Apêndice B4. Mapa de contorno COSY (δ 1,0–4,0) do alcaloide **14**.



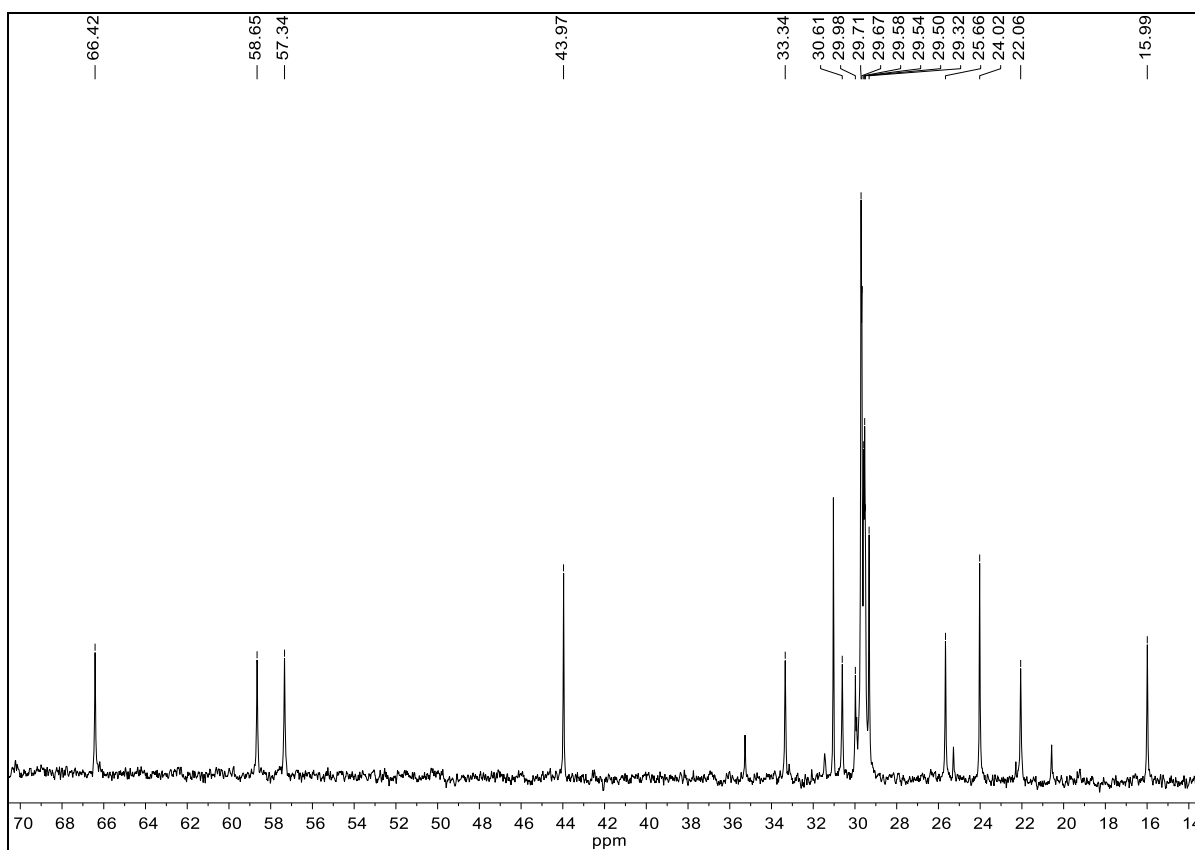
Apêndice B5. Mapa de contorno COSY (δ 1,2–2,4) do alcaloide **14**.



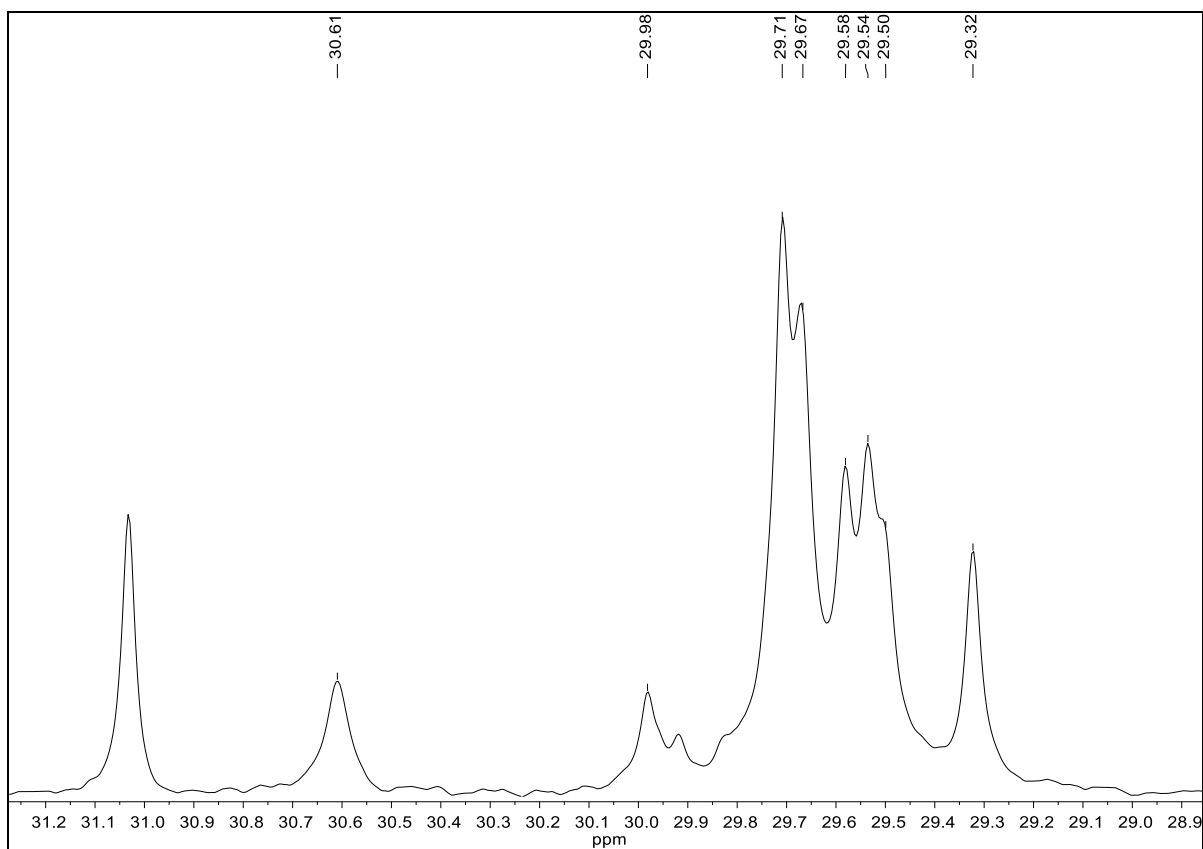
Apêndice B6. Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide **14** (100 MHz, CDCl_3).



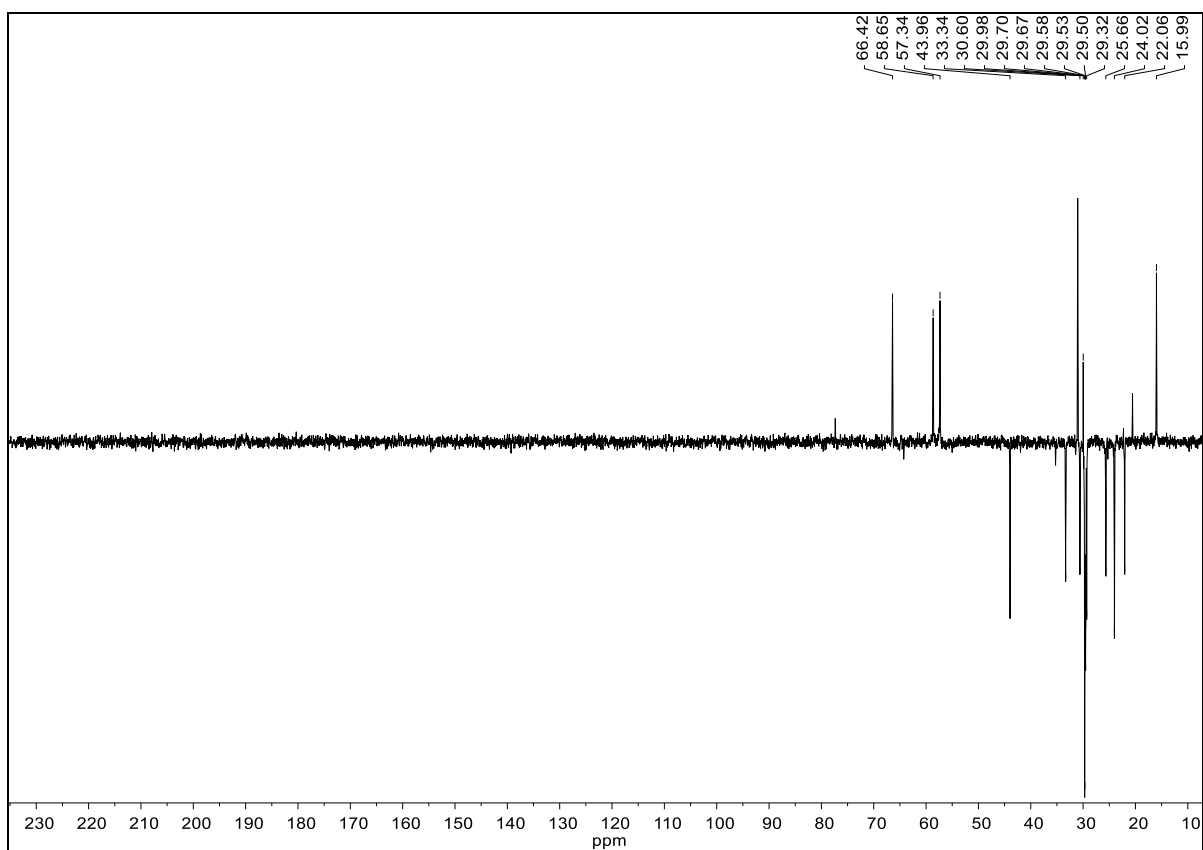
Apêndice B7. Ampliação do espectro B6 (δ 14,0–70,0) do alcaloide **14**.

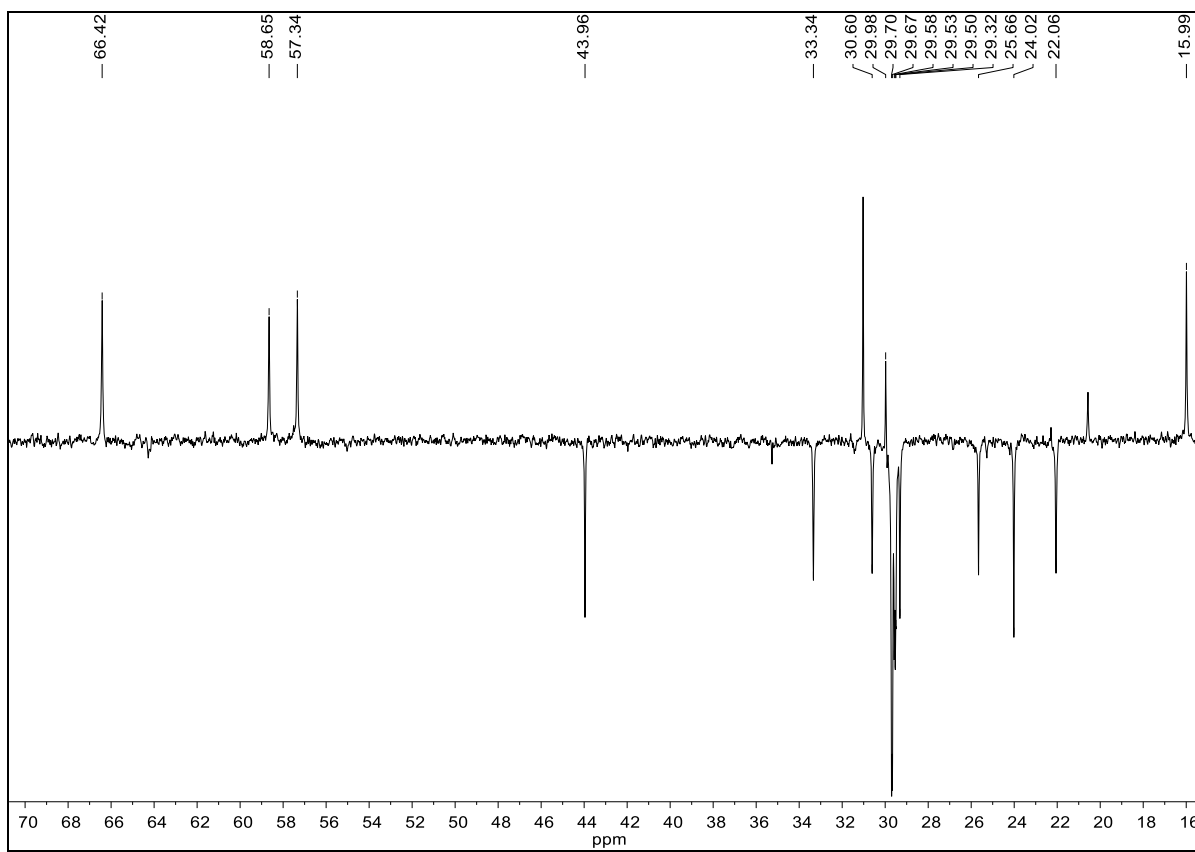
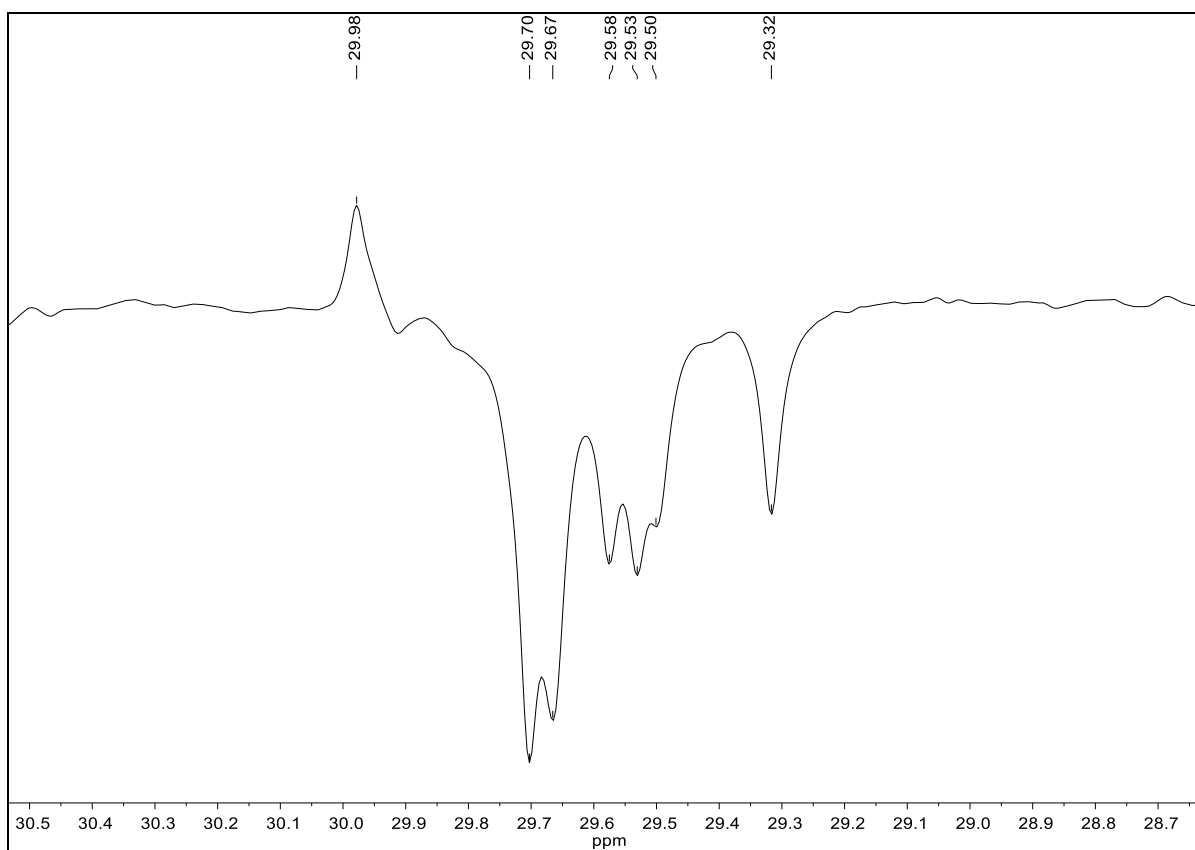


Apêndice B8. Ampliação do espectro B7 (δ 29,25–31,25) do alcaloide **14**.

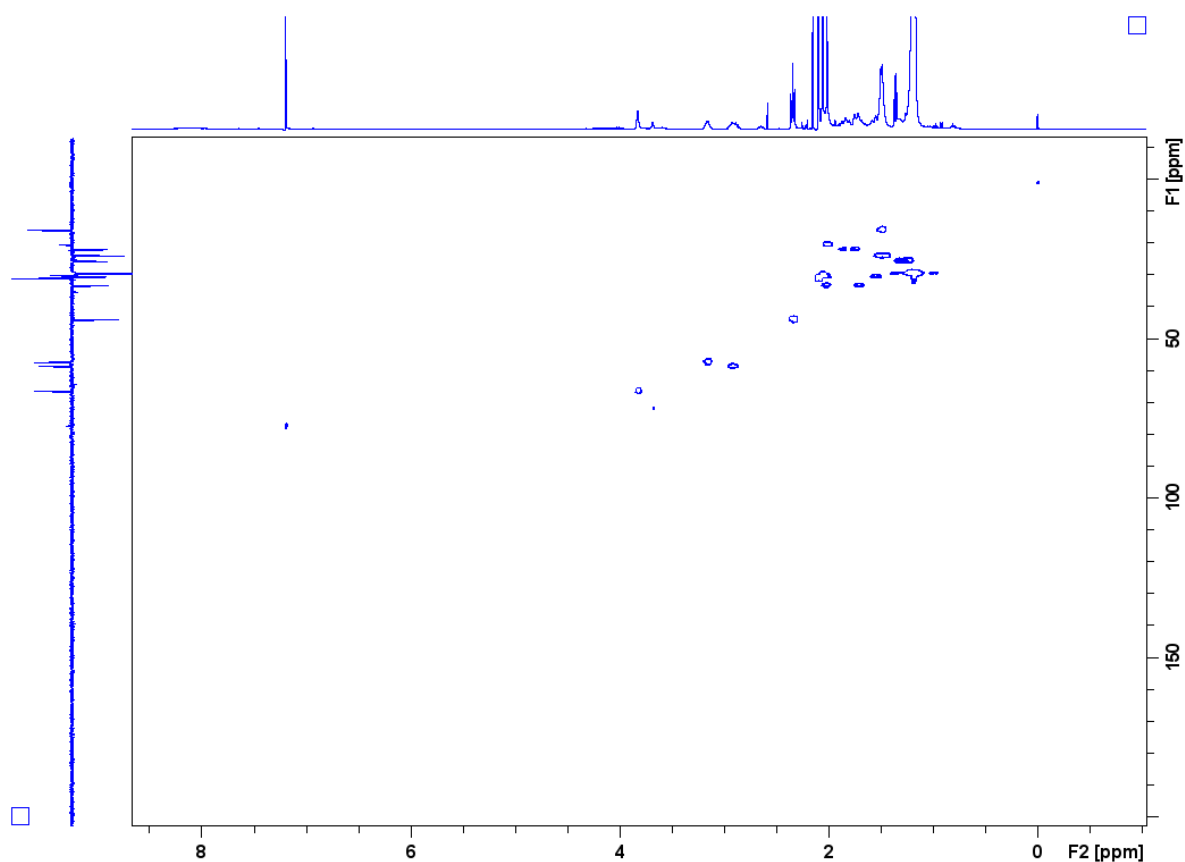


Apêndice B9. Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) do alcaloide **14**.

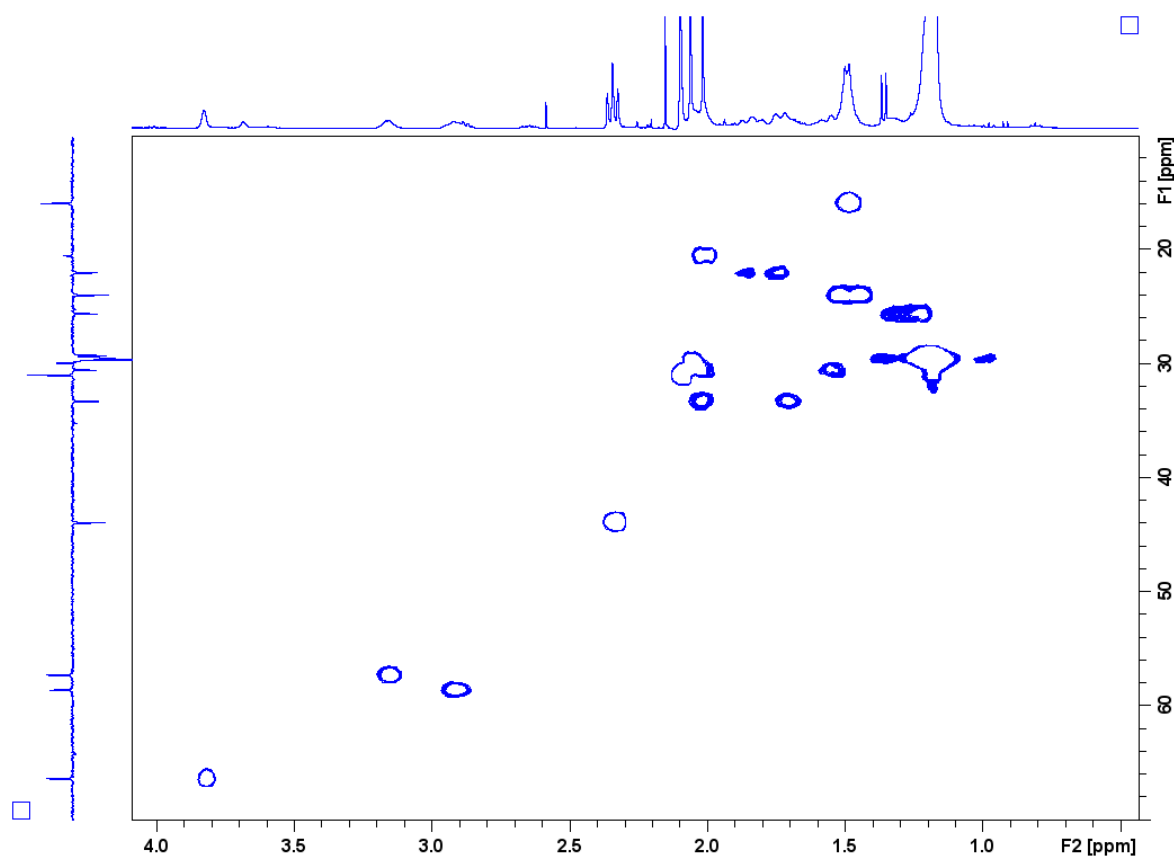


Apêndice B10. Ampliação do espectro B9 (δ 16,0–70,0) do alcaloide **14**.**Apêndice B11.** Ampliação do espectro B10 (δ 28,7–30,5) do alcaloide **14**.

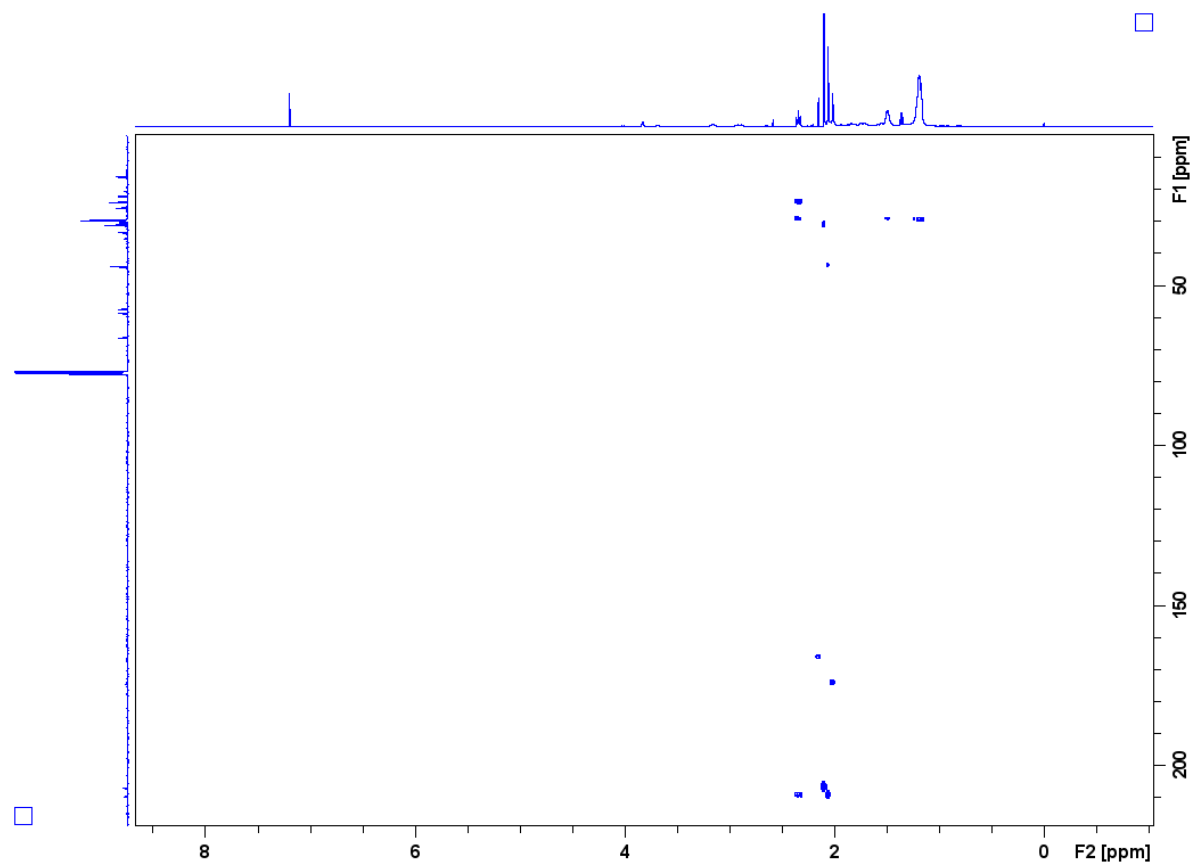
Apêndice B12. Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide **14**.



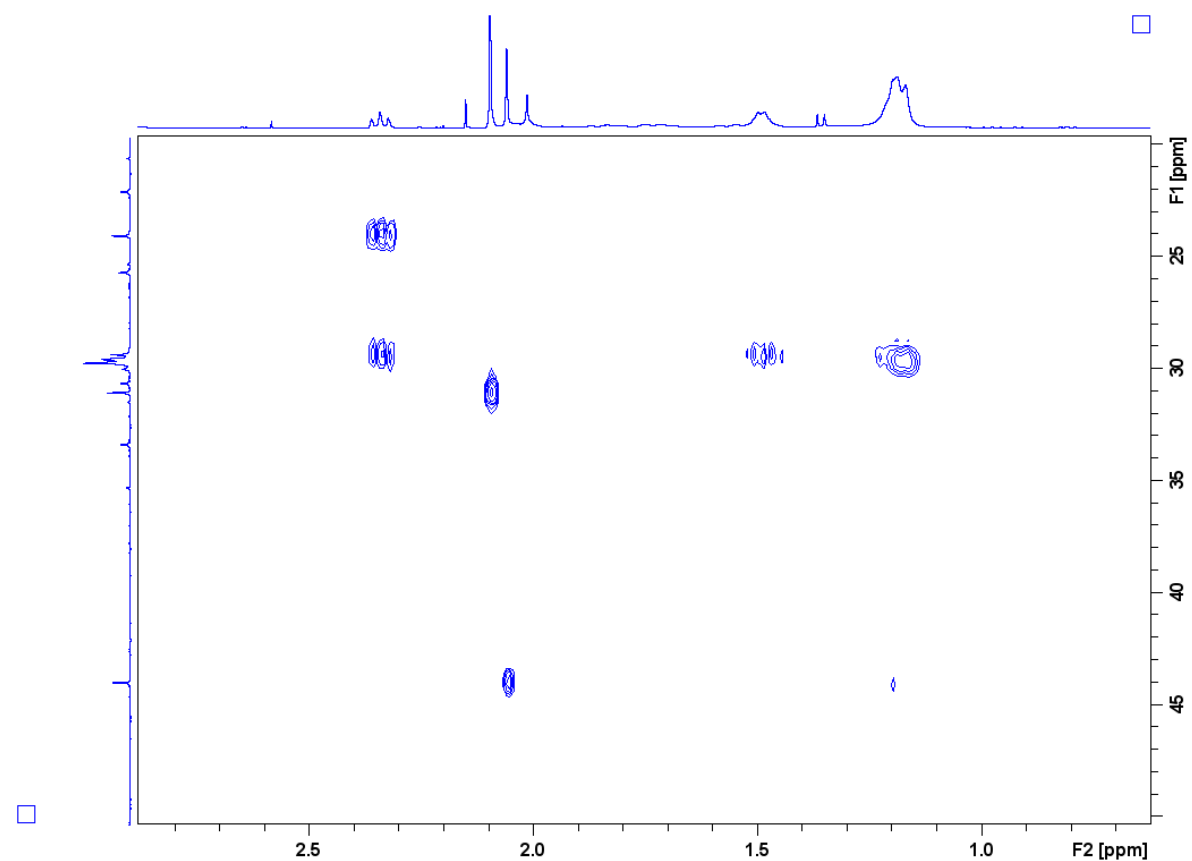
Apêndice B13. Mapa de contorno HSQC (δ 10,0–70,0) do alcaloide **14**.



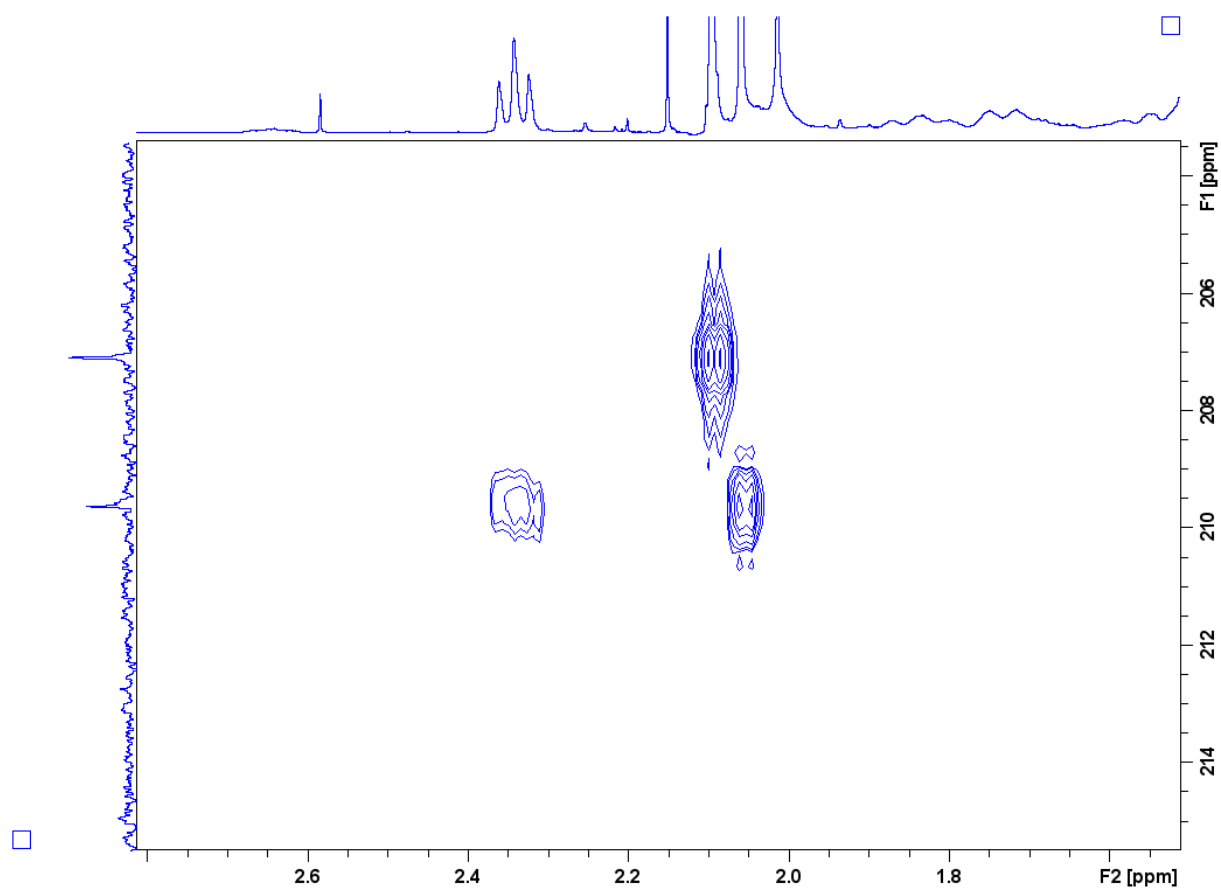
Apêndice B14. Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide **14**.



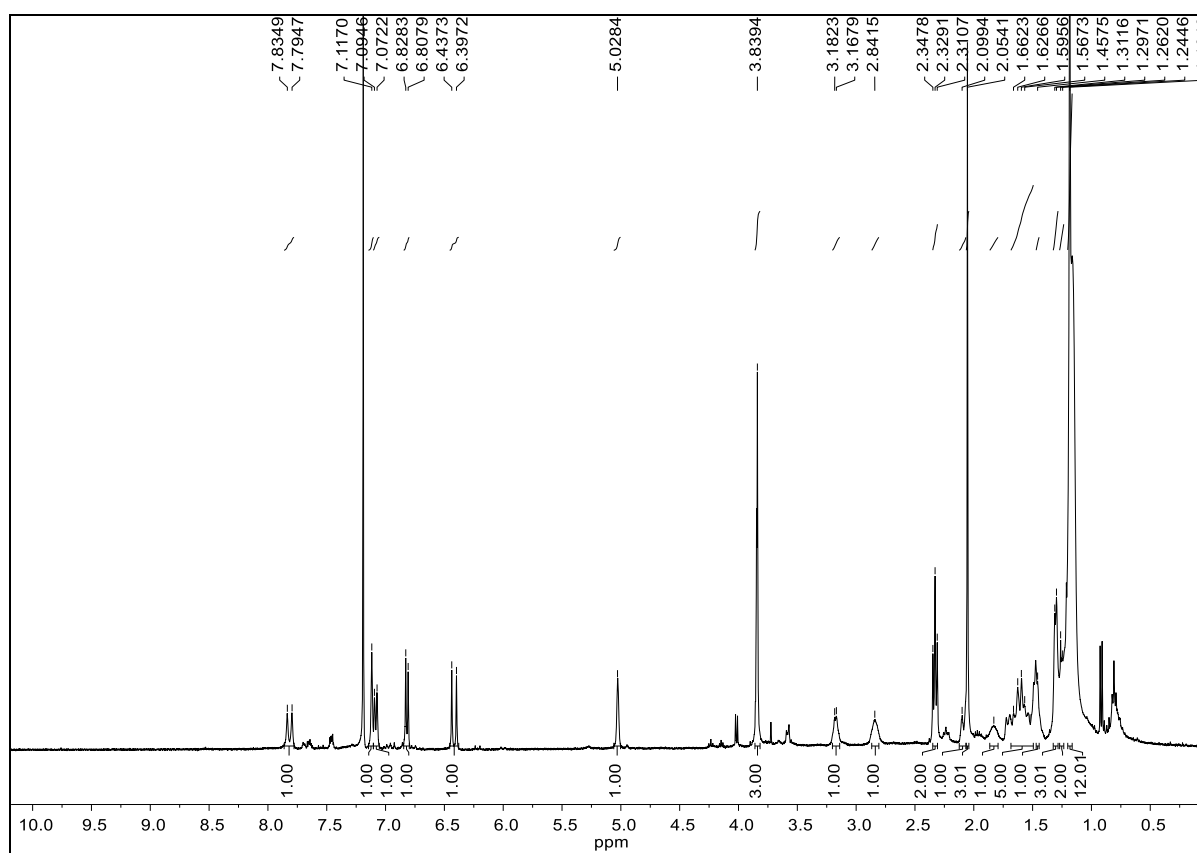
Apêndice B15. Mapa de contorno HMBC (δ 20,0–50,0) do alcaloide **14**.



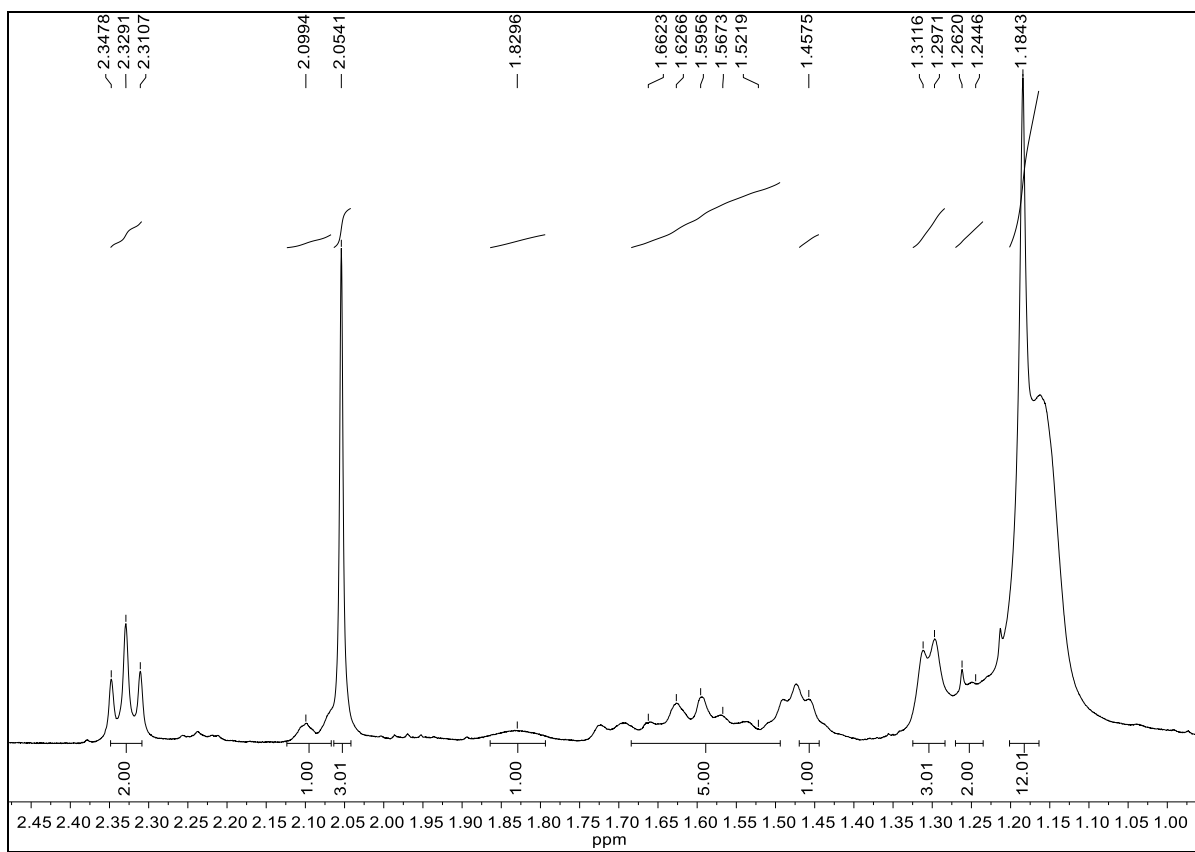
Apêndice B16. Mapa de contorno HMBC (δ 204,0–214,0) do alcaloide **14**.



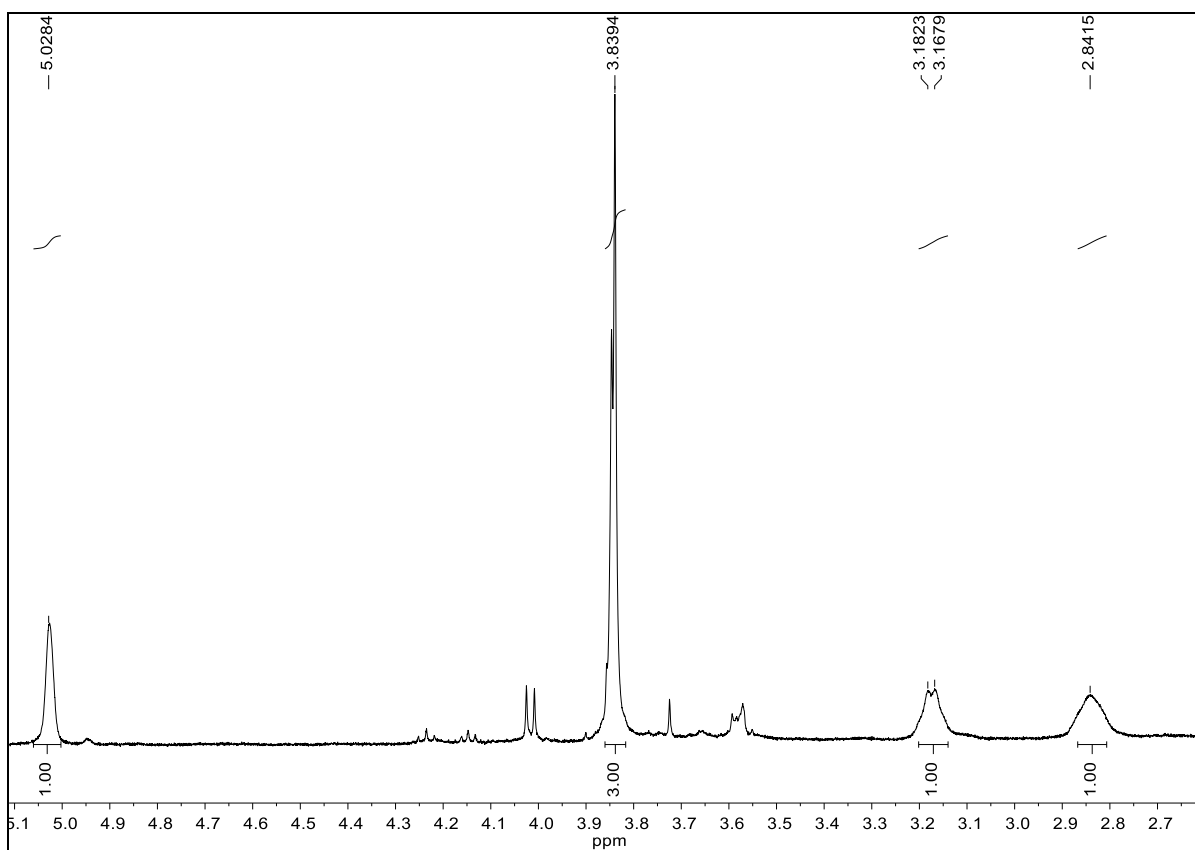
APÊNDICE C

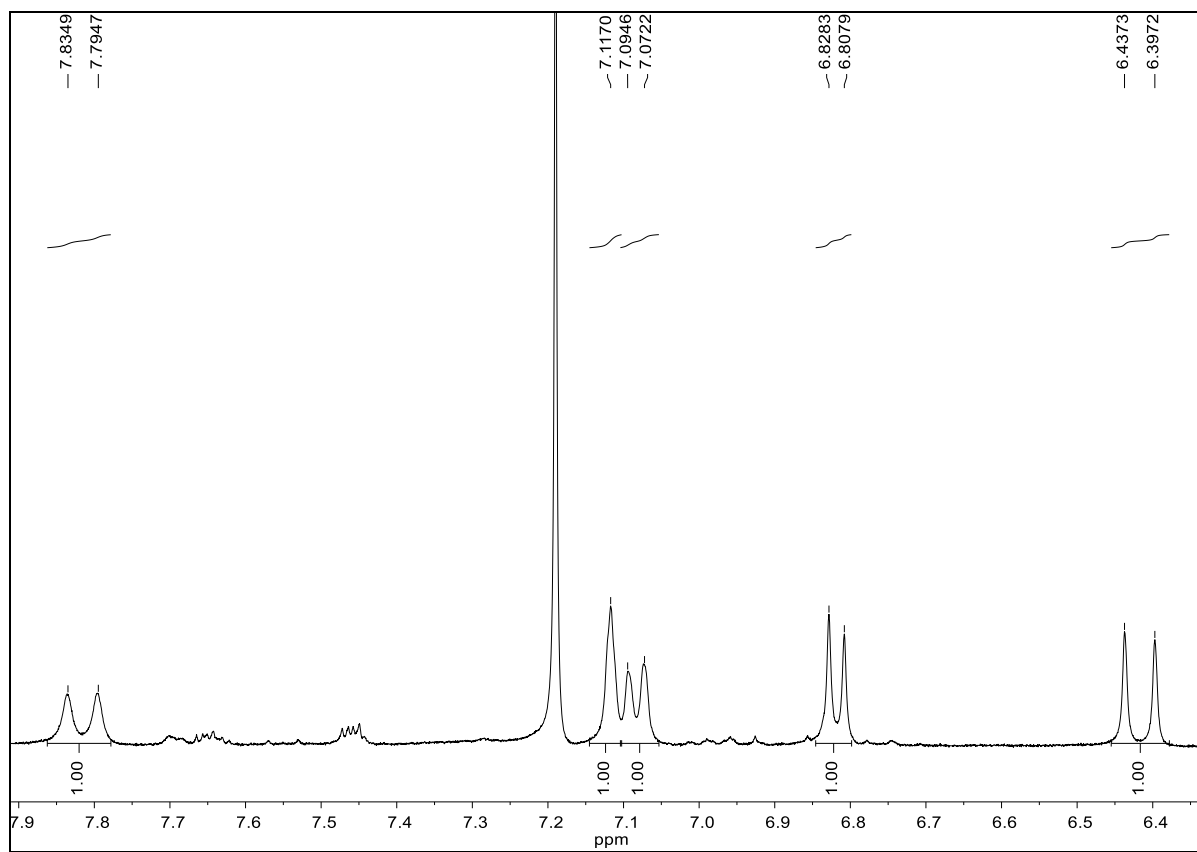
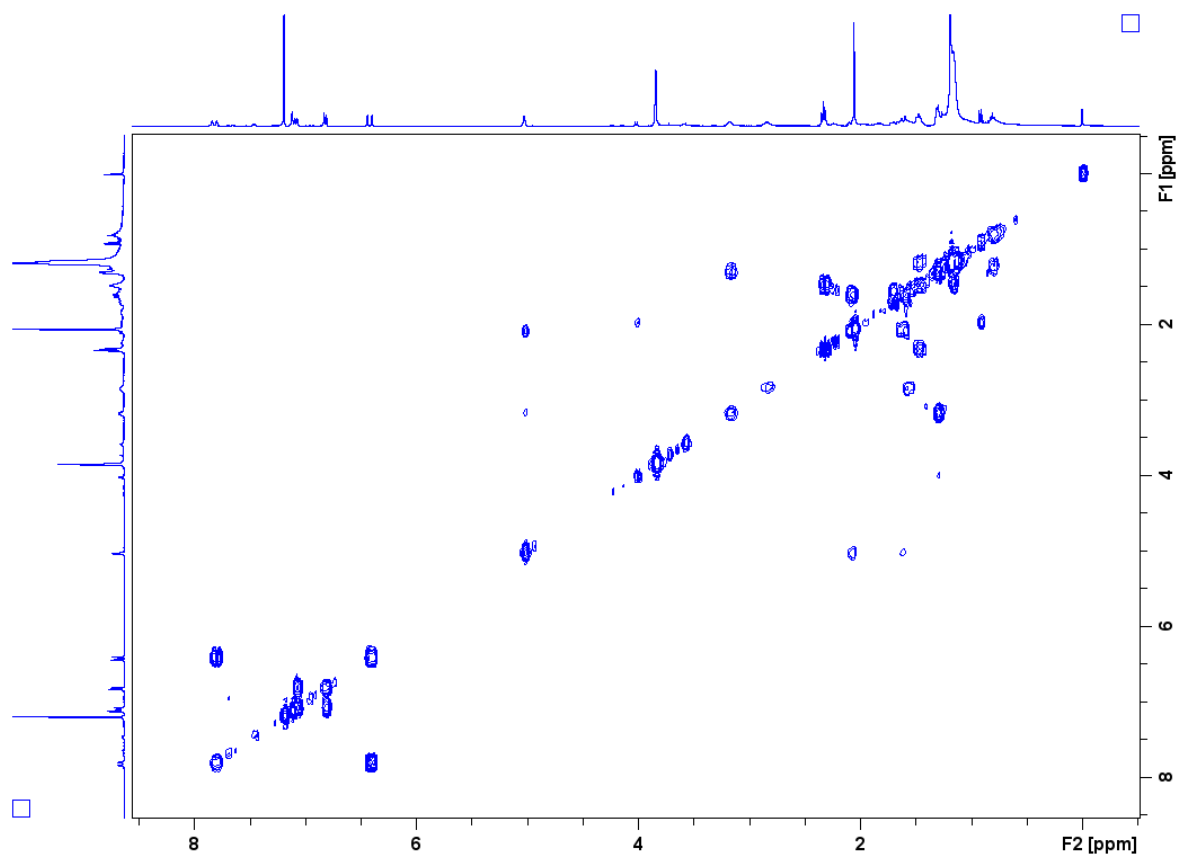
Apêndice C1. Espectro de RMN de ^1H do alcaloide **26** (400 MHz, CDCl_3).

Apêndice C2. Ampliação do espectro C1 (δ 1,00–2,45) do alcaloide **26**.

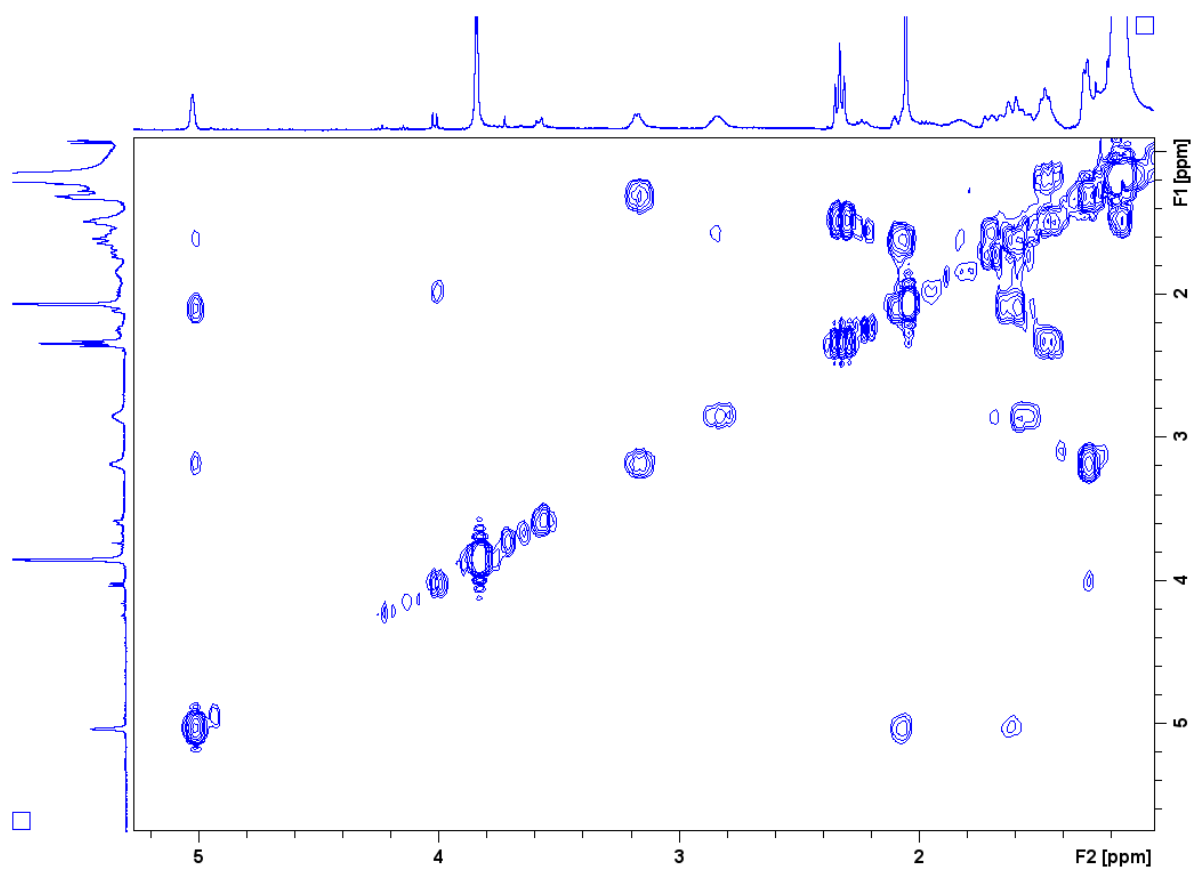


Apêndice C3. Ampliação do espectro C1 (δ 2,70–5,10) do alcaloide **26**.

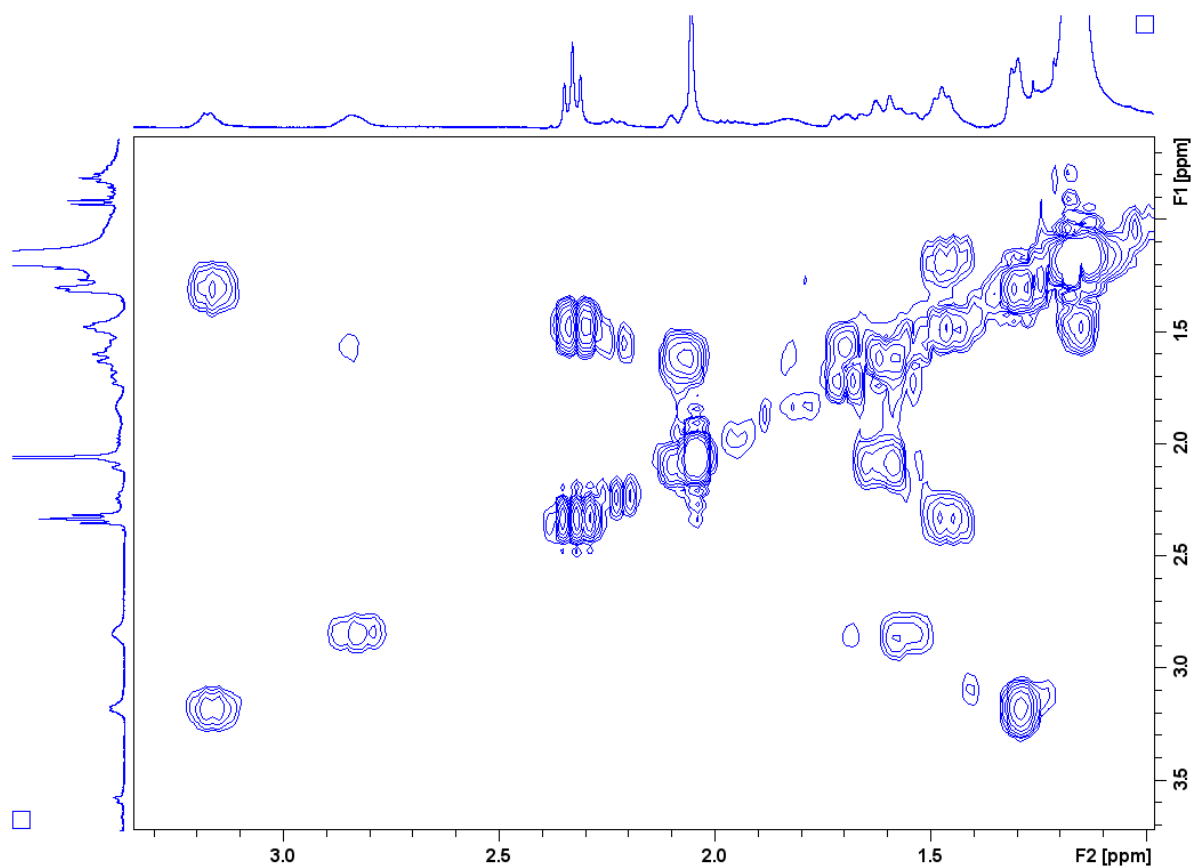


Apêndice C4. Ampliação do espectro C1 (δ 6,40–7,90) do alcaloide **26**.**Apêndice C5.** Mapa de contorno COSY do alcaloide **26**.

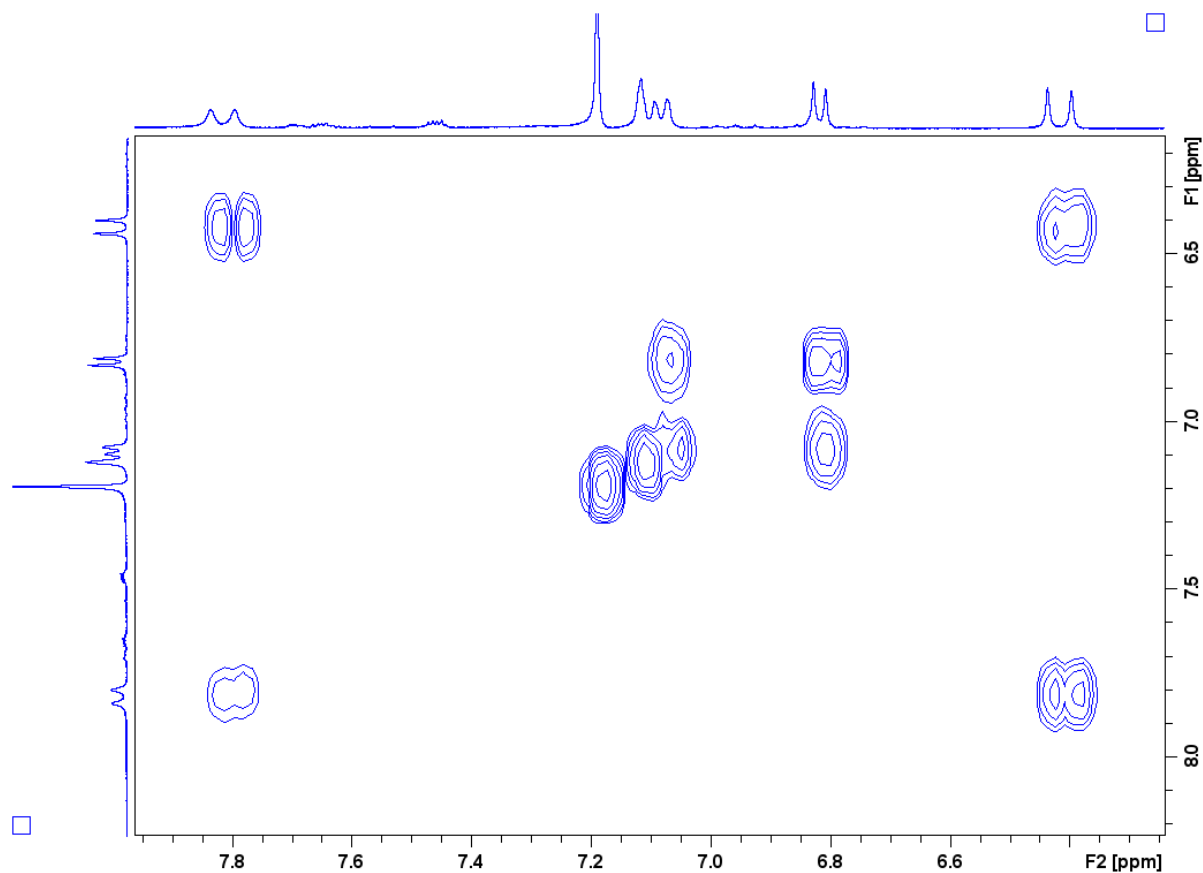
Apêndice C6. Mapa de contorno COSY (δ 1,5–5,5) do alcaloide **26**.



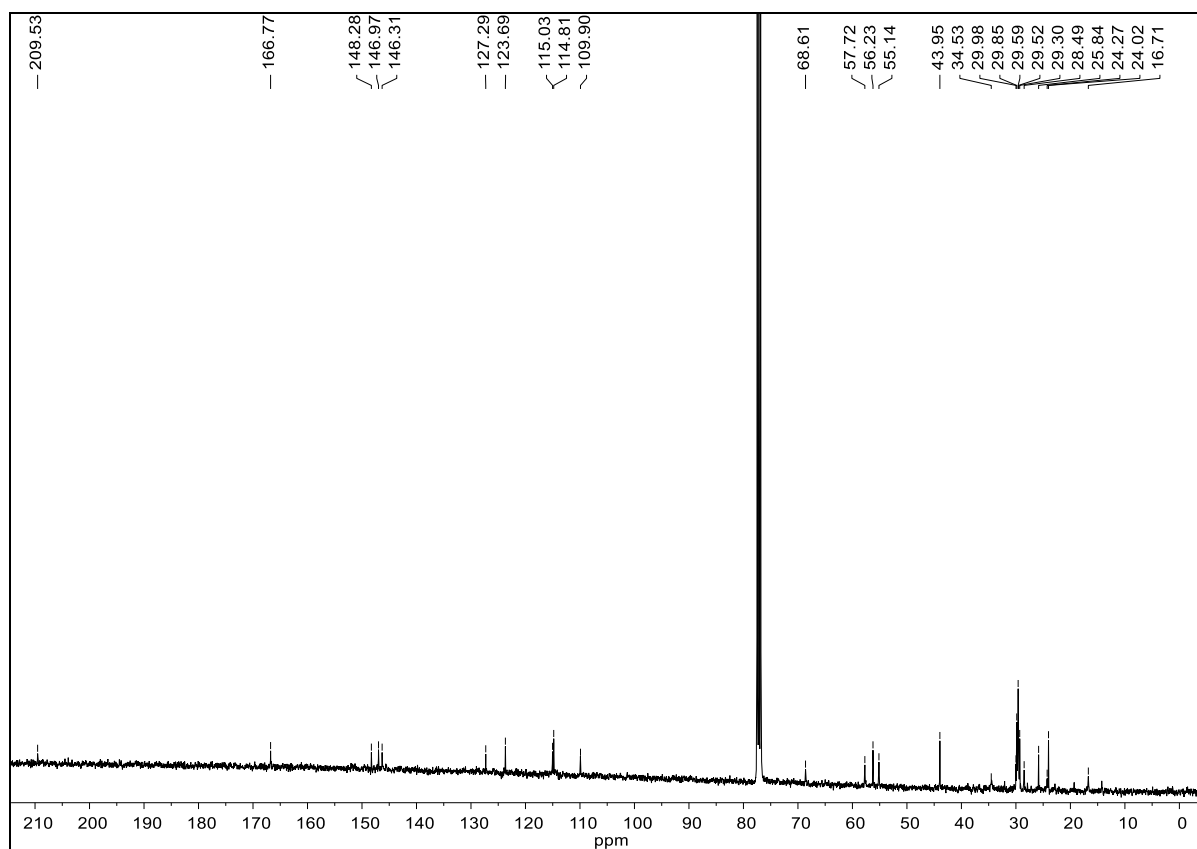
Apêndice C7. Mapa de contorno COSY (δ 1,0–3,5) do alcaloide **26**.



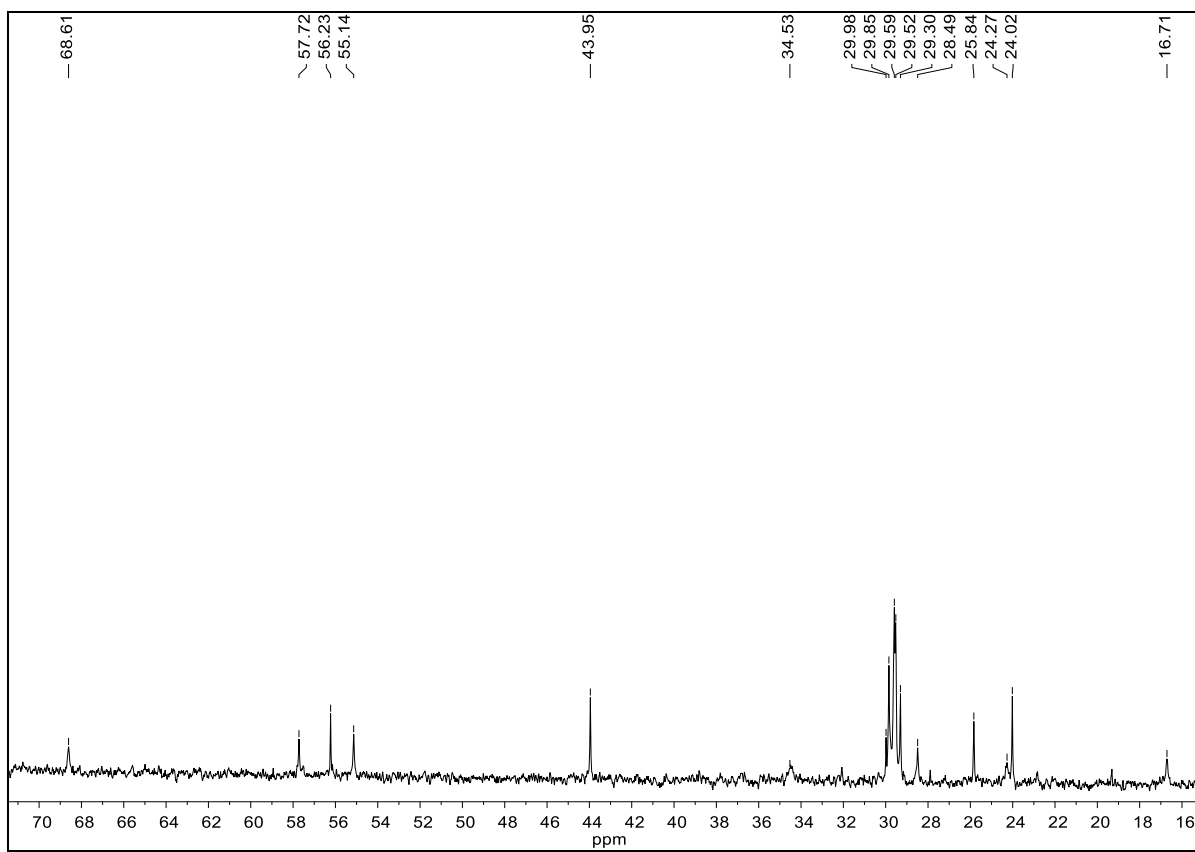
Apêndice C8. Mapa de contorno COSY (δ 6,0–8,0) do alcaloide **26**.



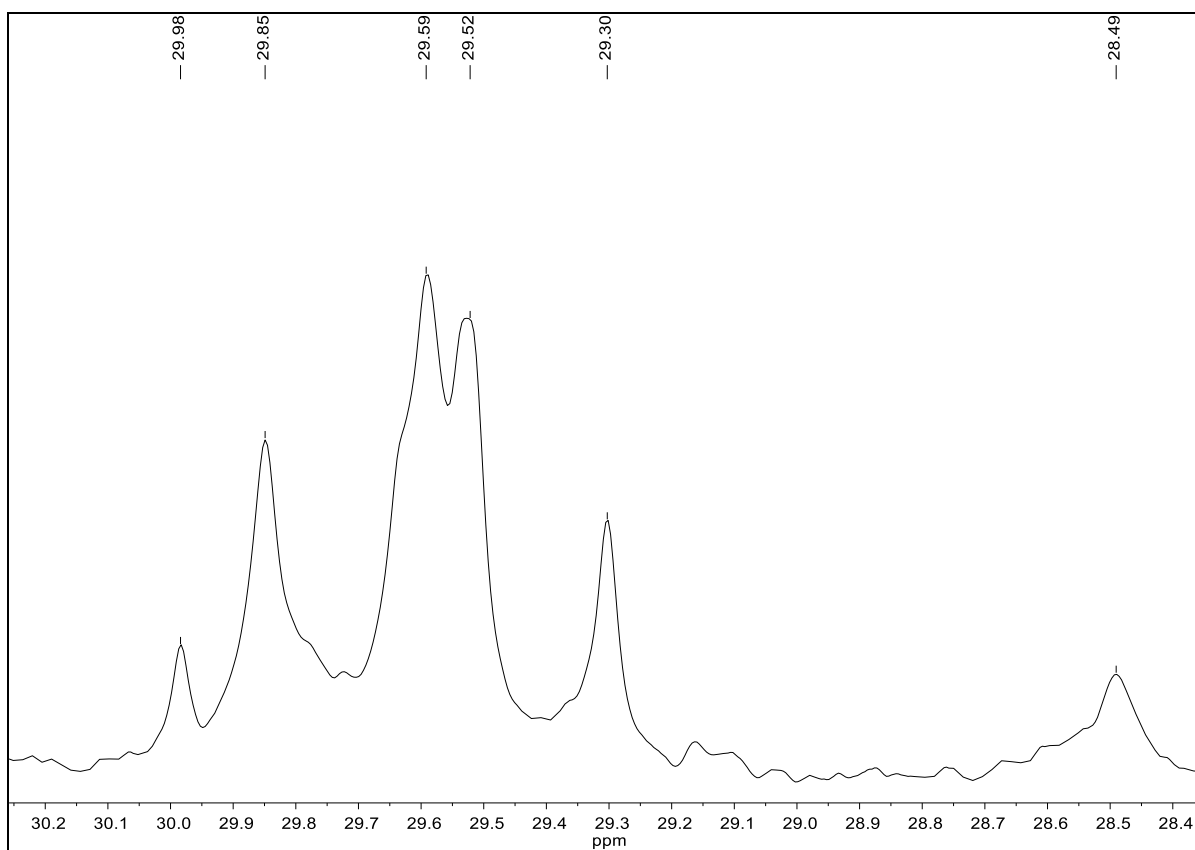
Apêndice C9. Espectro de RMN de ¹³C do alcaloide **26** (100 MHz, CDCl₃).



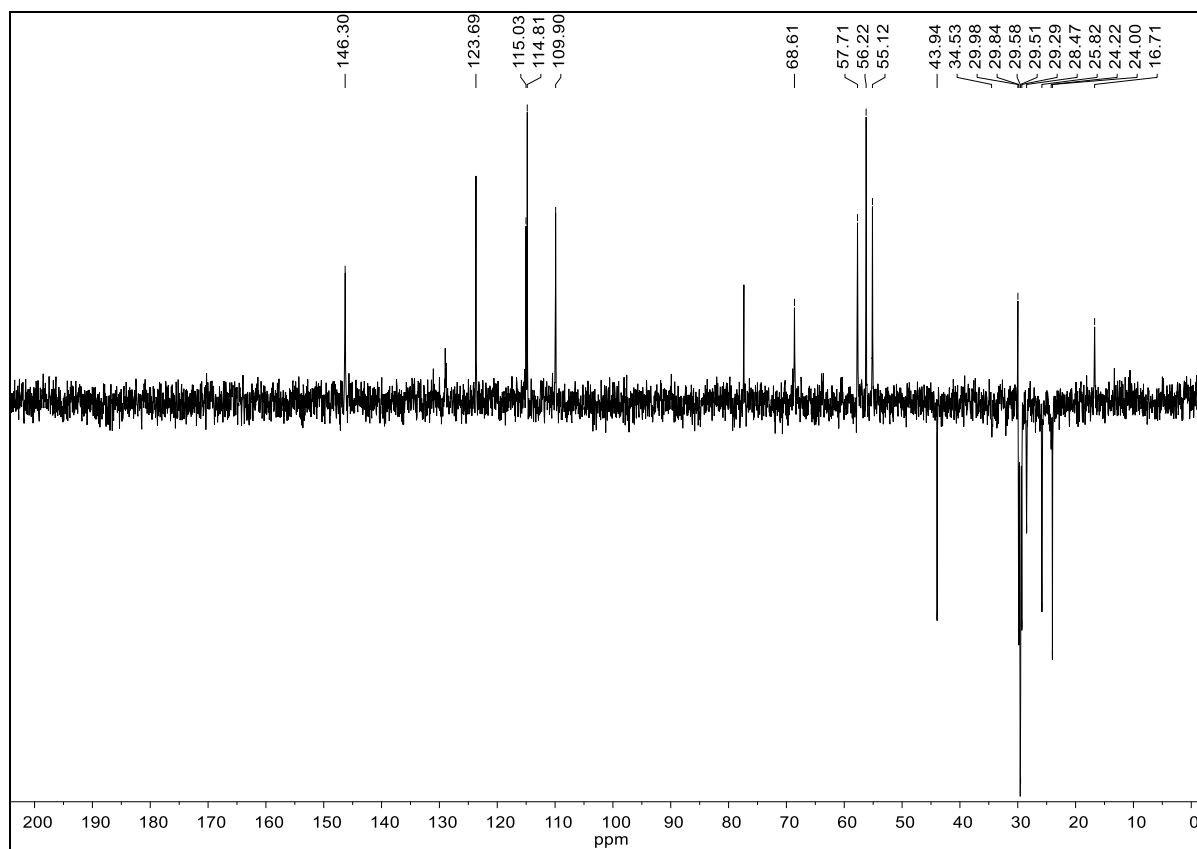
Apêndice C10. Ampliação do espectro C9 (δ 15,0–70,0) do alcaloide **26**.



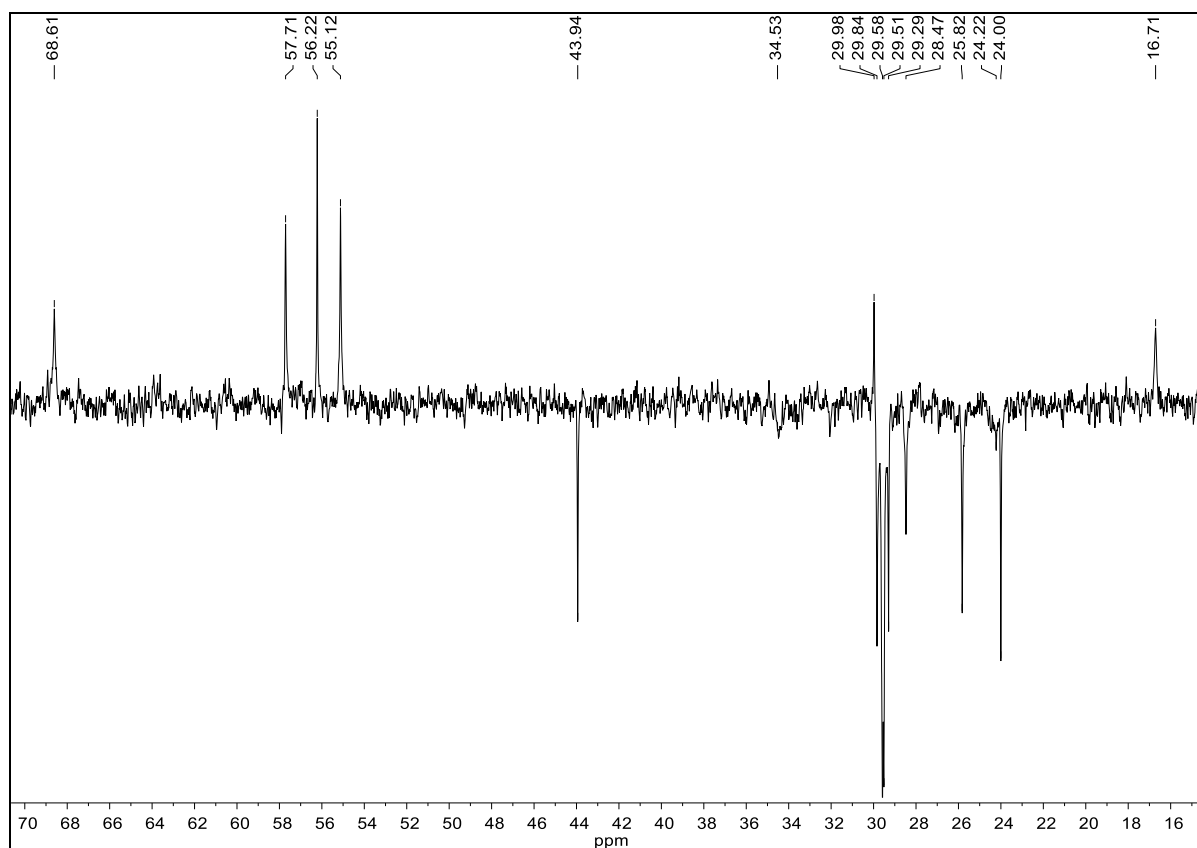
Apêndice C11. Ampliação do espectro C9 (δ 28,4–30,2) do alcaloide **26**.



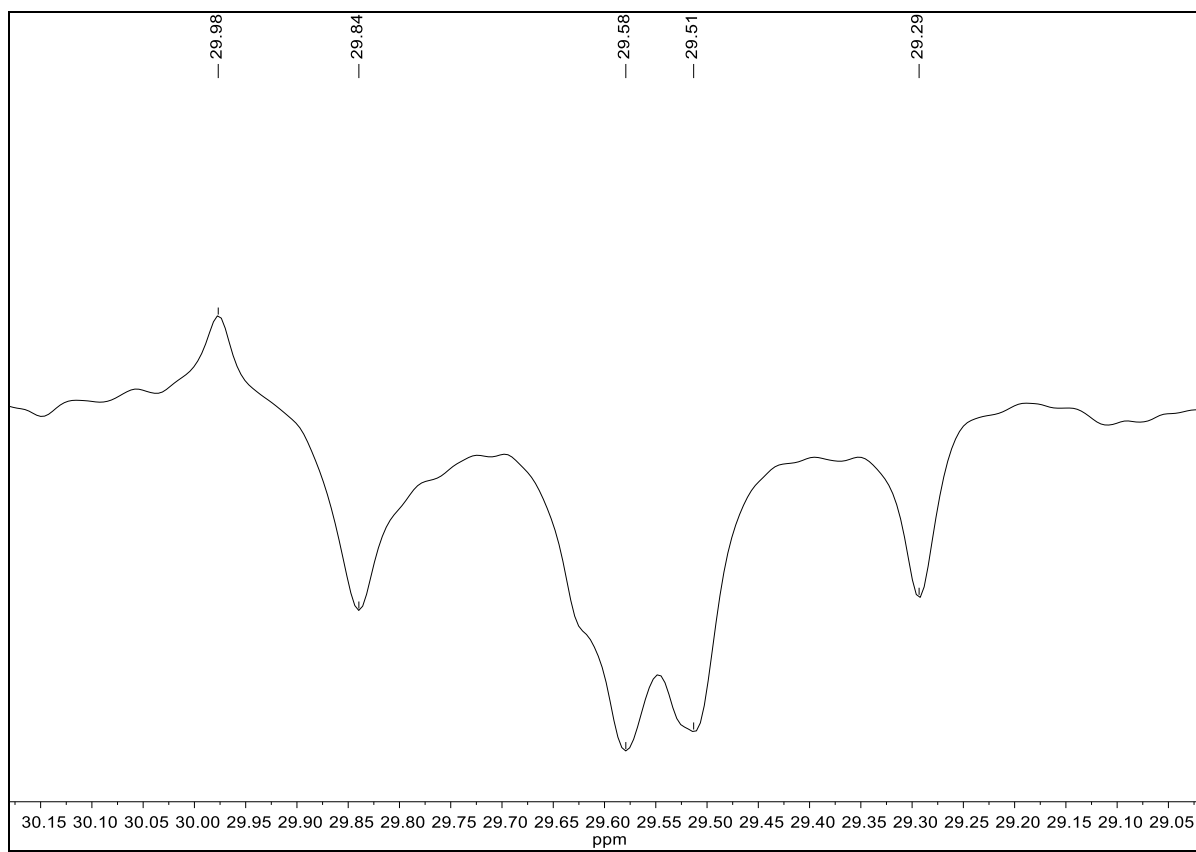
Apêndice C12. Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) do alcaloide **26**.



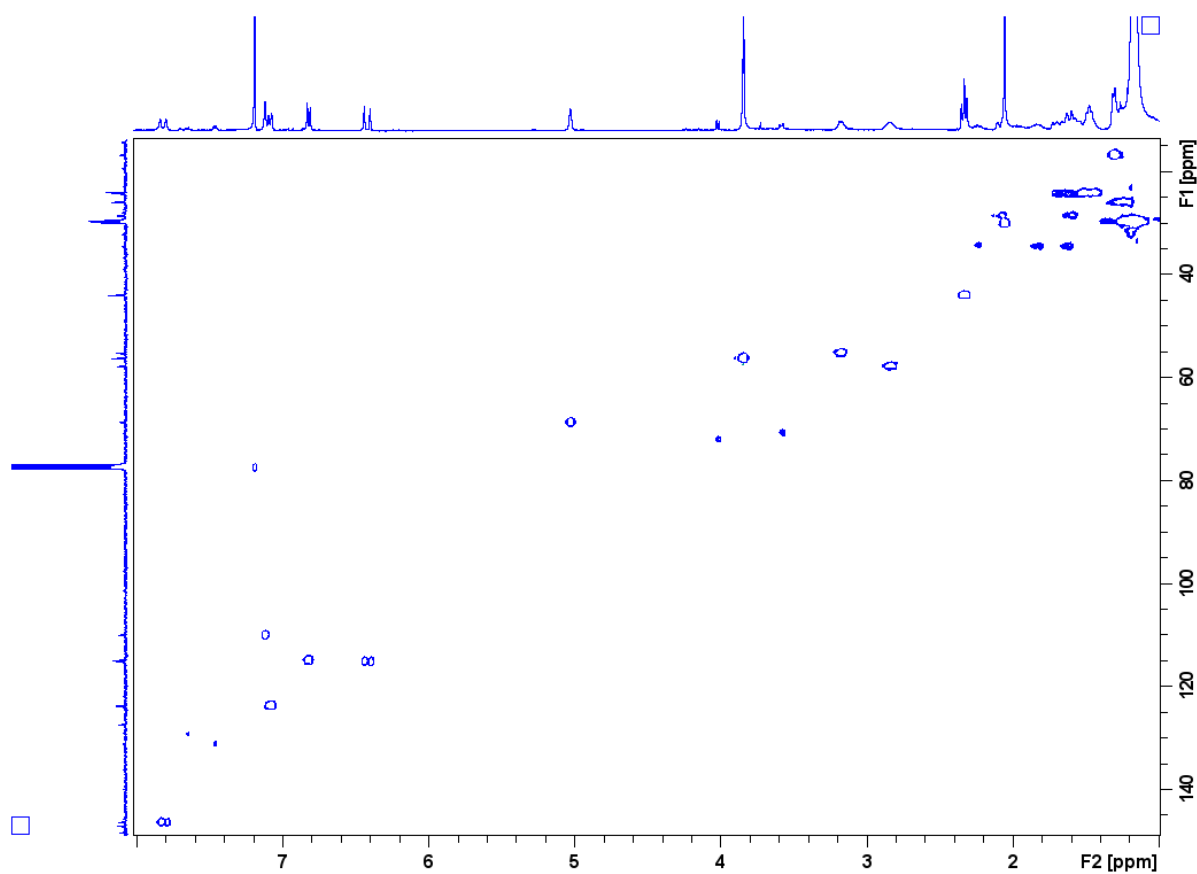
Apêndice C13. Ampliação do espectro C12 (δ 14,0–70,0) do alcaloide **26**.



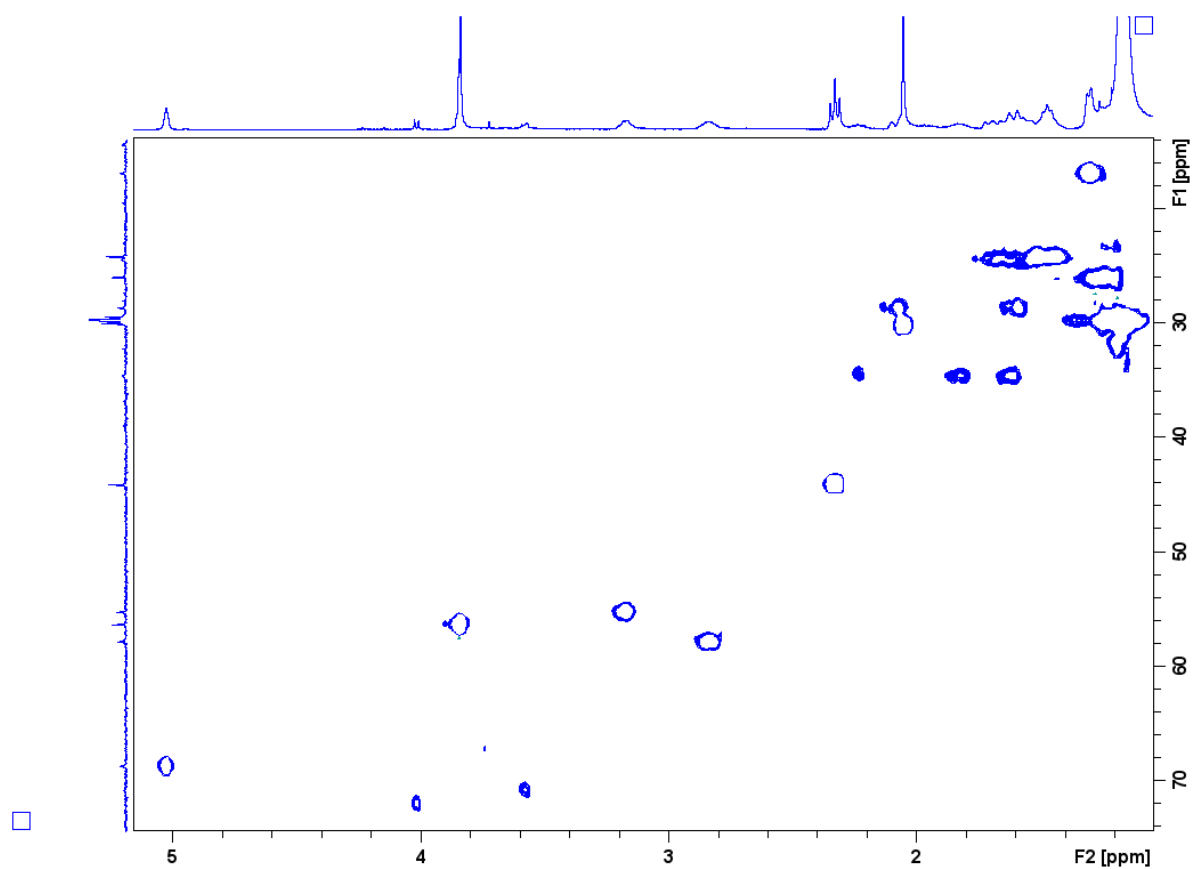
Apêndice C14. Ampliação do espectro C12 (δ 29,05–30,15) do alcaloide **26**.



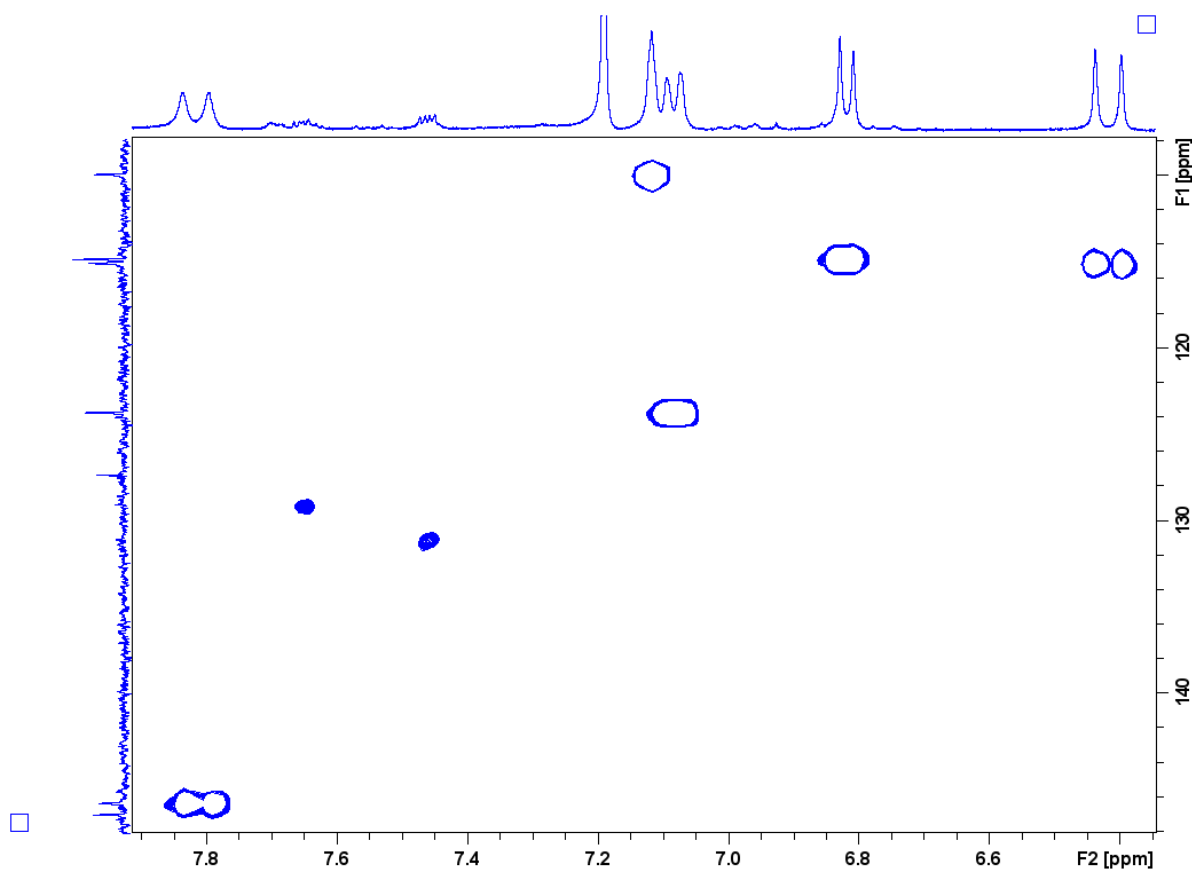
Apêndice C15. Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide **26**.



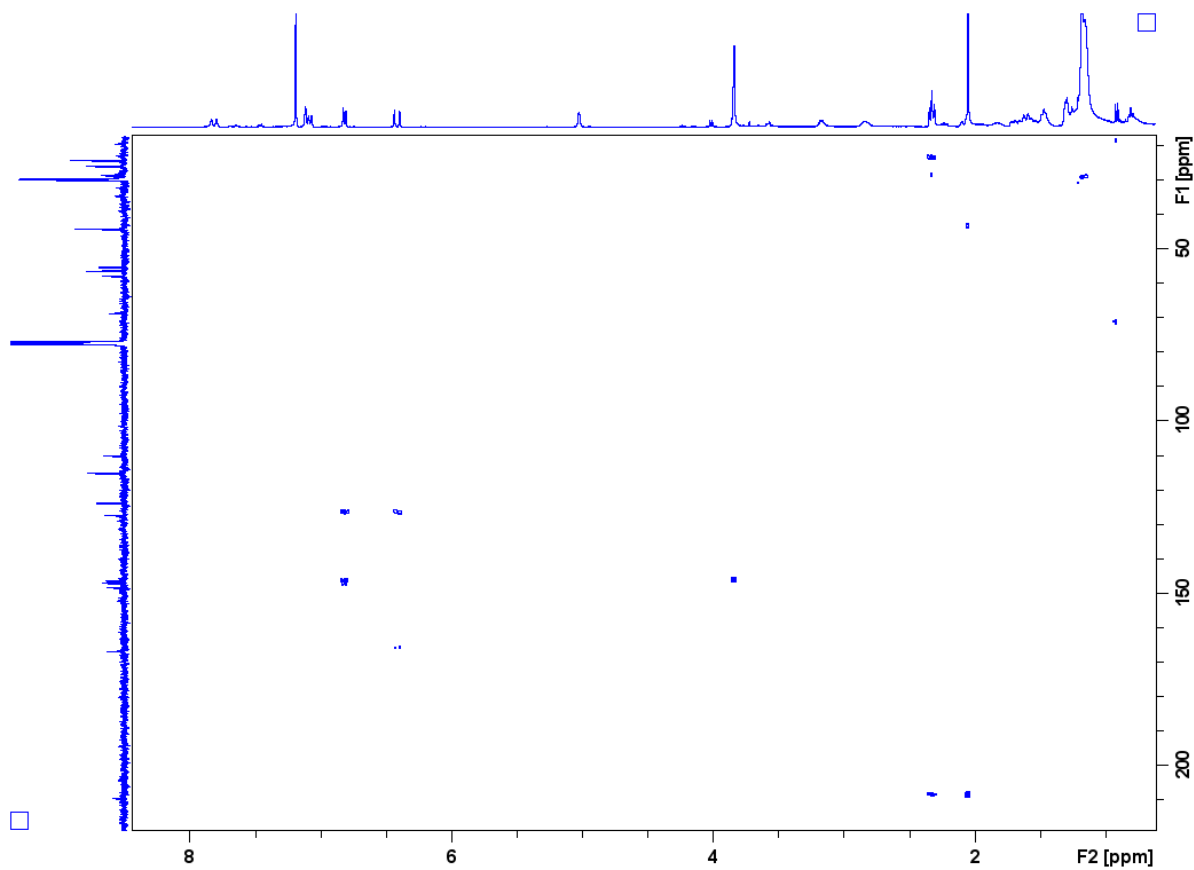
Apêndice C16. Mapa de contorno HSQC (δ 15,0–70,0) do alcaloide **26**.



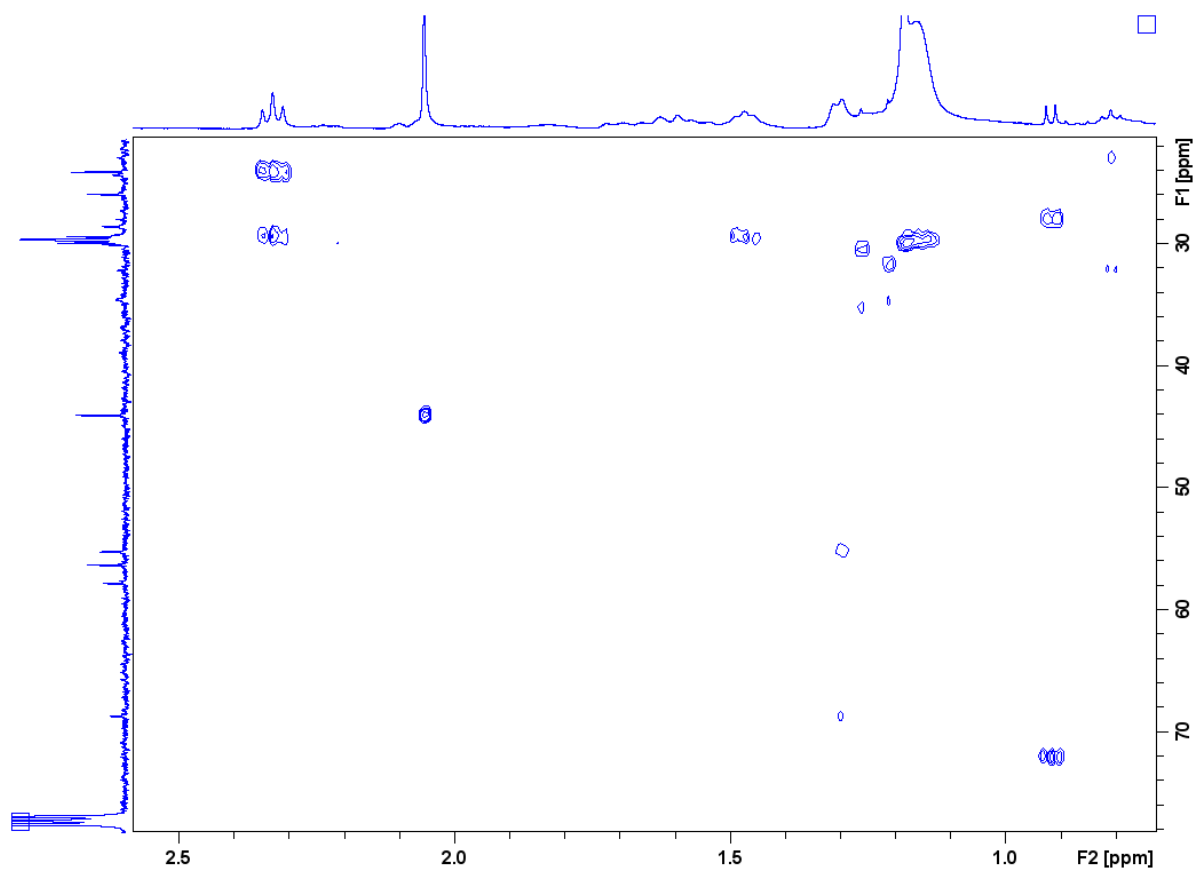
Apêndice C17. Mapa de contorno HSQC (δ 110,0–150,0) do alcaloide **26**.



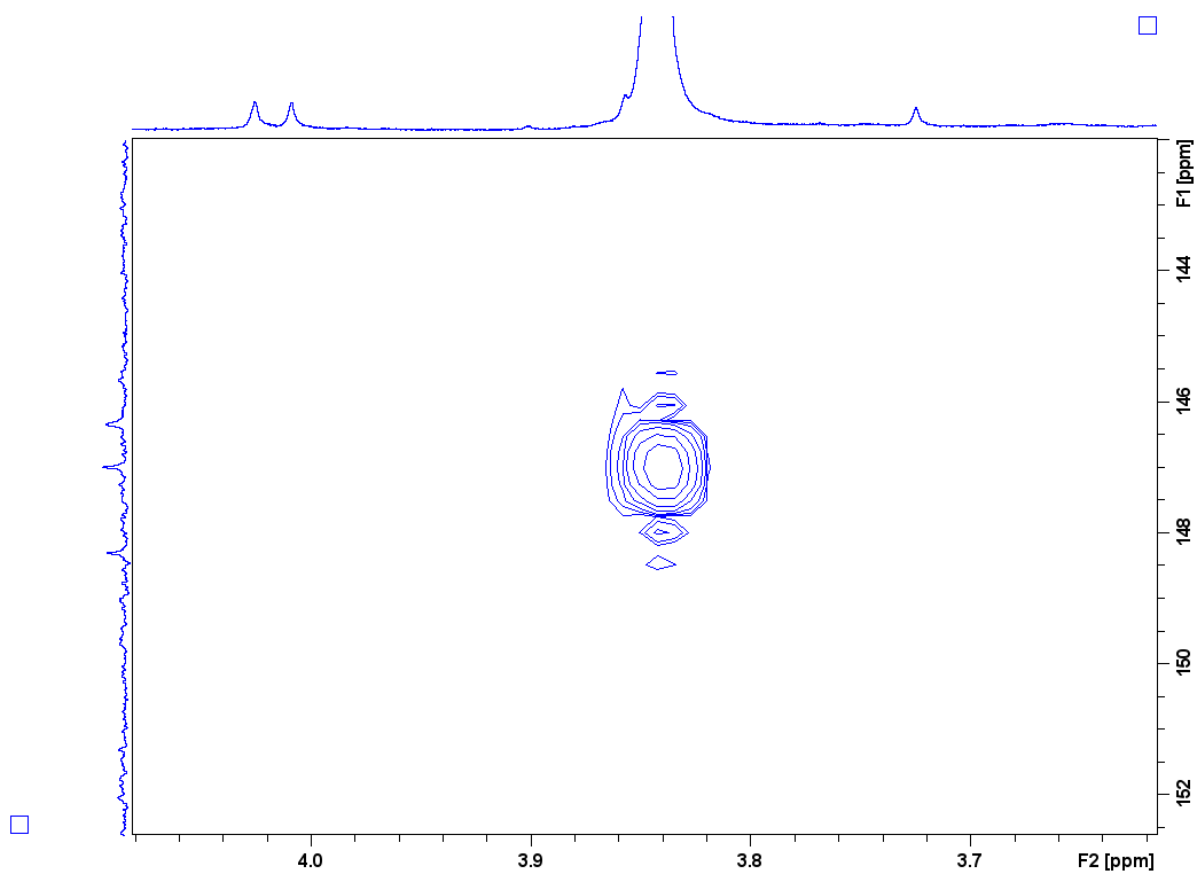
Apêndice C18. Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl₃) do alcaloide **26**.



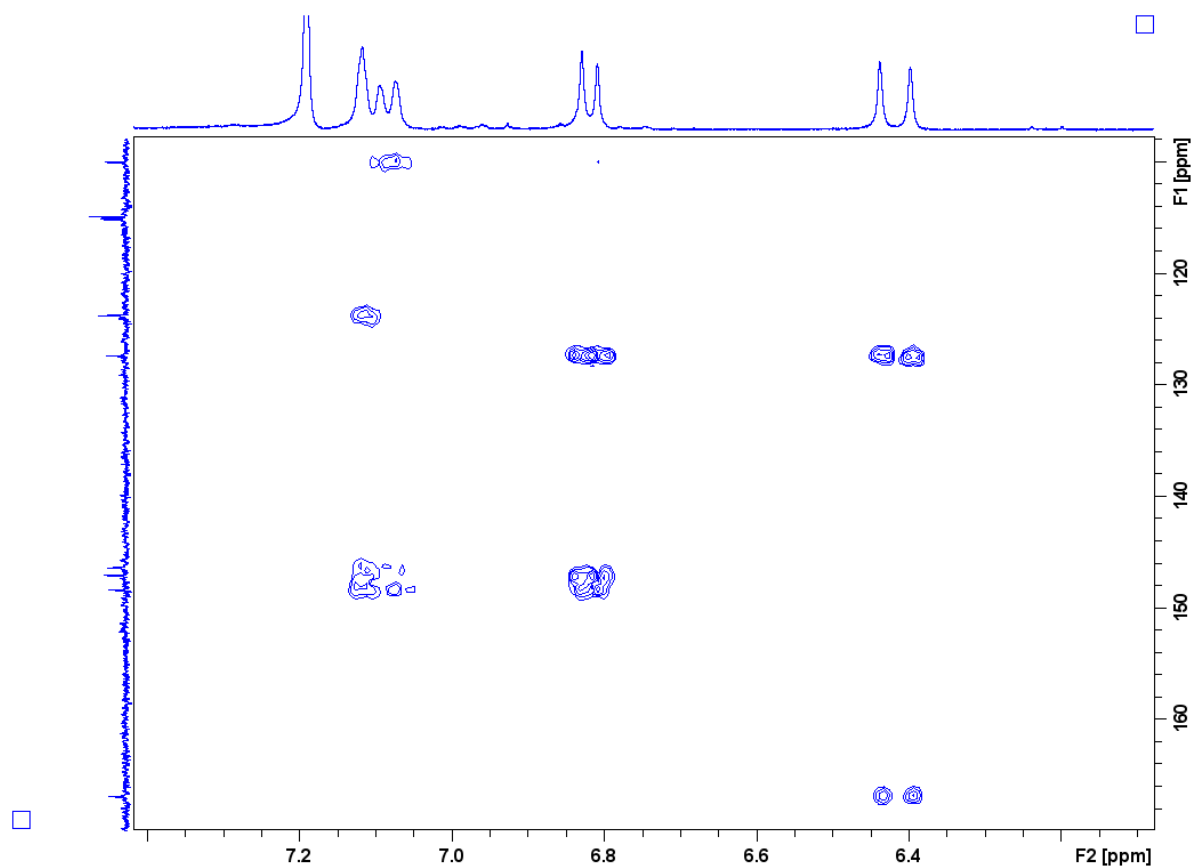
Apêndice C19. Mapa de contorno HMBC (δ 20,0–80,0) do alcaloide **26**.



Apêndice C21. Mapa de contorno HMBC (δ 142,0–152,0) do alcaloide **26**.



Apêndice C22. Mapa de contorno HMBC (δ 110,0–170,0,0) do alcaloide **26**.



Apêndice C23. Mapa de contorno HMBC (δ 204,0–214,0) do alcaloide **26**.

