

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE
(AChE) EM ESPÉCIES DO GÊNERO *ONYCHOPETALUM* (ANNONACEAE)
PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

BRUNA RIBEIRO DE LIMA

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE
(AChE) EM ESPÉCIES DO GÊNERO *ONYCHOPETALUM* (ANNONACEAE)
PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.**



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, PPGQ, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientador: Dr. Felipe Moura Araújo da Silva

Coorientadora: Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro

*Bolsista CAPES

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732p Lima, Bruna Ribeiro de
Prospecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) em espécies do gênero *Onchopetalum* (Annonaceae) para o tratamento da doença de Alzheimer / Bruna Ribeiro de Lima . 2019
187 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Coorientadora: Maria Lúcia Belém Pinheiro
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. docking molecular. 2. benziltetrahidroprotoberberínicos. 3. icer. 4. leaf spray. I. Silva, Felipe Moura Araújo da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Prospecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE)
em espécies do gênero *Onychopetalum* (Annonaceae) para o
tratamento da doença de Alzheimer

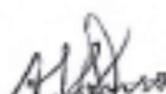
BRUNA RIBEIRO DE LIMA

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas, como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

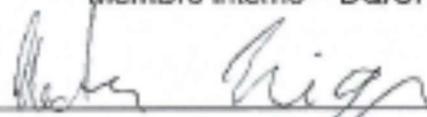
Aprovada em 19 de novembro de 2019.



Prof. Dr. FELIPE MOURA ARAUJO DA SILVA
Presidente/Orientador - CA/UFAM



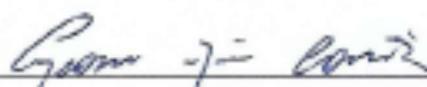
Prof. Dr. AFONISO DUARTE LEÃO DE SOUZA
Membro interno – DQ/UFAM



Prof. Dr. HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN
Membro interno – UEA



Profa. Dra. ANA LÍGIA LEANDRINI DE OLIVEIRA
Membro externo – FCF/UFAM



Prof. Dr. GEONE MAIA CORRÊA
Membro Externo – ICET/UFAM

*Aos meus pais Francinete Ribeiro e
Raimundo Lima, pelo amor, incentivo e
apoio nas minhas escolhas e decisões ao
longo desses anos.*

A eles eu dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me dado força e coragem para enfrentar os desafios.

A minha família, em especial aos meus pais, Francinete Ribeiro e Raimundo Lima, pela educação, carinho e amor durante todos esses anos. A distância que nos separa só aumenta o amor que sinto por vocês. Ao meu namorado Thiago Kunast, por todo amor, paciência e pelo grande apoio durante a minha vida acadêmica na UFAM.

Ao meu Orientador Dr. Felipe Moura Araújo da Silva, pelos ensinamentos e por todo apoio e oportunidade de crescimento profissional. Obrigada pela paciência, confiança e constante incentivo.

Um agradecimento em especial Professora Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro pela coorientação e conhecimento transmitido durante esses anos.

Ao professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza por ter acreditado no meu potencial e pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas.

A professora Dra. Quezia Cass da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade das análises biológicas com ICER e a todos do grupo de pesquisa SEPARARE. Agradeço a Dra. Juliana Lima por toda ajuda e empenho no decorrer dos testes e aos MSc. Welma Beatriz e MSc. Luciano Rodrigues pela acolhida durante minha estadia em São Carlos.

Ao professor Dr. Emerson Lima da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UFAM e as alunas Carol Valentim e Jéssica Maciel pelo suporte no desenvolvimento da semissíntese dos alcaloides.

Aos professores Dr. Hector Koolen, Dr. Emmanoel Vilaça e Dr. Anderson Guimarães pelas valiosas observações e sugestões na qualificação.

À Central Analítica pelo espaço e apoio para realização desse trabalho. Ao Laboratório de Ressonância Magnética (NMRLAB-UFAM) pelo suporte com as análises. Aos professores e alunos dos laboratórios LAEQ (Laboratório de abertura de amostras e ensaios químicos) e LABMICRA (Laboratório de bioensaios e microrganismos da Amazônia) por serem sempre solícitos.

Aos meus amigos do Laboratório de Espectrometria de Massas (LABCEM-UFAM) pela oportunidade de aprendizado e por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho, em especial amiga e Dra. Elzalina Soares.

Aos meus amigos, que sempre me incentivaram durante a minha carreira acadêmica, em especial Paula Paz, Richarson Almeida, Noam Gadelha, Magaly Martins, Hanna Mafra, Airi Souza, Gilmara Padro, Adriana Spirotto, Ketlen Ohse, Bruno Amorim, Gilmar Prado, Dayanne Rabelo, Matheus Raiol, Weider Paz e Robson Sales.

A CAPES pela bolsa concedida.

Por fim agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

*“A maior recompensa para o
trabalho não é o que se ganha, mas o
que ele nos torna.”*

(John Ruskin)

RESUMO

Onychopetalum é um gênero Neotropical botanicamente próximo ao gênero *Unonopsis*, cujas espécies são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (DA). Estudos fitoquímicos apontam *Unonopsis* como fonte promissora de alcaloides, substâncias previamente reportadas como potenciais inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChEIs), enquanto que a composição alcaloídica de *Onychopetalum* permanece praticamente inexplorada. A enzima acetilcolinesterase (AChE) continua a ser um alvo altamente viável para a melhora sintomática da DA, constituindo atualmente uma das principais estratégias para o tratamento dessa doença. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi prospectar potenciais AChEIs nas folhas das espécies *O. amazonicum* e *O. periquino* através da integração de análises baseadas em espectrometria de massas (MS), estudos de *docking* molecular, modificações semissintéticas e ensaios farmacológicos por meio de biorreatores enzimáticos capilares (ICER). As análises baseadas em MS permitiram a identificação provisoriamente de alcaloides aporfínicos, benzilisoquinolínicos, oxoaporfínicos e tetrahidroprotoberberínicos nas folhas de ambas as espécies, sendo os tetrahidroprotoberberínicos observados como constituintes majoritários nas folhas de *O. amazonicum*. A análise de *docking* molecular na estrutura de *Torpedo californica* (TcAChE), sugeriu atividade moderada para as substâncias desreplacadas, enquanto os derivados benzilados planejados foram descritos como altamente ativos indicando que interações do tipo π e baseadas em carga podem ser determinantes para o aumento do potencial de inibição frente à enzima AChE, além de destacar a potencialidade de derivados *N*-benzilados. Os procedimentos de semissíntese, a partir dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina possibilitaram a obtenção dos derivados benziltetrahidroprotoberberínicos, (-)-(7*S*,13*aS*)-7-benzilestefolidina, (-)-(7*R*,13*aS*)-7-benzilestefolidina, (-)-(*S*)-2-*O*-benzilestefolidina, (-)-(*S*)-10-*O*-benzilestefolidina, (-)-(*S*)-2-*O*-isocoripalmina e (-)-(*S*)-*O*-*O*-dibenzilestefolidina, sendo os alcaloides (-)-(7*S*,13*aS*)-7-benzilestefolidina, (-)-(7*R*,13*aS*)-7-benzilestefolidina e (-)-(*S*)-10-*O*-benzilestefolidina descritos pela primeira vez na literatura. Os ensaios com ICER demonstraram porcentagens de inibição variando entre 35,22-90,49% para as substâncias testadas, com os derivados benzilados apresentando melhores resultados que seus precursores. Essas observações, juntamente com as principais interações destacadas nas análises de *docking* molecular, podem ser úteis no design de novos AChEIs. No geral, a abordagem proposta

demonstrou a utilidade do alcaloide estefolidina como um modelo adequado para o design racional de AChEIs, podendo servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer.

Palavras-chave: *docking* molecular, benziltetrahidroprotoberínicos, ICER, *Leaf Spray*

ABSTRACT

Onychopetalum is a Neotropical genus botanically close to the *Unonopsis* genus, whose species are used in traditional medicine to treating neurodegenerative disease, such as Alzheimer's disease (AD). Phytochemical studies point to *Unonopsis* as a promising source of alkaloids, substances previously reported as potential inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChEIs), while the alkaloid composition of *Onychopetalum* remains almost unexplored. The acetylcholinesterase enzyme (AChE) remains a highly viable target for the symptomatic improvement of AD, and is currently the main strategies for the treatment of this disease. Therefore, the objective of the present work was to prospect potential AChEIs in leaves of the species *O. amazonicum* and *O. periquino* through the integration of mass spectrometry (MS) based analysis, molecular docking studies, semisynthetic modifications and pharmacological assays by capillary enzyme reactor (ICER). The MS based analysis allowed the tentative identification of aporphine, benzyltetrahydroisoquinoline, oxoaporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids on the leaves of both species, tetrahydroprotoberberine being observed as major constituents in the leaves of *O. amazonicum*. Docking analysis based on the crystal structure of *Torpedo californica* AChE (TcAChE) suggested moderate activity for the dereplicated substances, while the planned benzylated derivatives were described as highly active, indicating that π -type and charge-based interactions may be determinant for increasing the inhibition potential against AChE enzyme, and highlighted the *N*-benzylated derivatives as potential AChEIs. Semisynthesis procedures from stepholidine and isocorypalmine alkaloids allowed the obtention of benzyltetrahydroprotoberberines derivatives (-)-(7*S*, 13*aS*)-7-benzylstepholidine, (-)-(7*R*,13*aS*)-7-benzylstepholidine, (-)-(S)-2-*O*-benzylstepholidine, (-)-(S)-10-*O*-benzylstepholidine, (-)-(S)-2-*O*-benzylisocorypalmine, (-)-(S)-2-*O*-benzylstepholidine and (-)-(S)-*O*-*O*-dibenzylstepholidine, being the alkaloids (-)-(7*S*, 13*aS*)-7-benzylstepholidine, (-)-(7*R*,13*aS*)-7-benzylstepholidine and (-)-(S)-10-*O*-benzylstepholidine, described for the first time in the literature. The ICER assays showed inhibition percentages varying between 35.22-90.49% for the tested substances, with benzylated derivatives presenting better results than their precursors. These observations, along with the key interactions highlighted in molecular docking analysis, may be helpful in designing new AChEIs. Overall, the proposed approach demonstrated the usefulness of stepholidine alkaloid as a

suitable model for the rational design of AChEIs, therefore, these results can be useful in the development of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: molecular docking, benzyltetrahydroprotoberberine, ICER, *Leaf Spray*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	-----	Deslocamento químico
ACh	-----	Acetilcolina
AChE	-----	Acetilcolinesterase
AChEIs	-----	Inibidores de Acetilcolinesterase
APCI	-----	Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
APTS	-----	3-aminopropiltriétoxissilano
BFA	-----	Benzilados Fração Aquosa
BFD	-----	Benzilados Fração Diclorometano
Ch	-----	Colina
CH ₂ Cl ₂	-----	Diclorometano
CID	-----	Dissociação Induzida por Colisão (do inglês <i>Collision-induced dissociation</i>)
C18	-----	Octadecilsilano
Da	-----	Dalton
DA	-----	Doença de Alzheimer
DAD	-----	Detector de Arranjo de Diodo (do inglês <i>Diode Array Detector</i>)
DART	-----	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
DESI	-----	<i>Desorption Electrospray Ionization</i>
ESI	-----	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>Electrospray Ionization</i>)
FDA	-----	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	-----	Cromatografia Gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
HMBC	-----	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	-----	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HR-MS	-----	Espectrometria de massas de alta resolução (do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
HSQC	-----	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	-----	Hertz
ICER	-----	Biorreatores Enzimáticos Capilares (do inglês <i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>)
IC ₅₀	-----	Capacidade inibitória
IT	-----	<i>Ion Trap</i>
<i>J</i>	-----	Constante de acoplamento
KH ₂ PO ₄	-----	Fosfato monopotássico
K _i	-----	Constante de Inibição
K _M	-----	Constante de Michaelis-Menten
LS	-----	<i>Leaf spray</i>
LTP	-----	<i>Low Temperature Plasma</i>
MeOH	-----	Metanol
MS	-----	Espectrometria de Massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
<i>m/z</i>	-----	Razão massa/carga
NH ₄ OAc	-----	Acetato de amônio

FRT ----- Fração rica em alcaloides tetrahidroprotoberberínicos
RMN-----Ressonância Magnética Nuclear (do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*)
RMSD-----*Root Means Square Deviation*
TFA-----Ácido Trifluoroacético (do inglês *Trifluoroacetic Acid*)
TIC-----Cromatograma de Íons Totais (do inglês *Total Ion Chromatogram*)
T_R-----Tempo de Retenção
TRIS-----Tris (hidroximetil) aminometano
TSQ-----*Triple Stage Quadrupole*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da família Annonaceae.	26
Figura 2. Distribuição regional das espécies de Annonaceae no Brasil.	26
Figura 3. Principais espécies de Annonaceae comercializadas no Brasil: (A) atemoia (híbrido de <i>A. cherimola</i> x <i>A. squamosa</i>), (B) graviola (<i>A. muricata</i> L.) e (C) fruta-do-conde ou pinha (<i>A. squamosa</i> L.).	27
Figura 4. Exemplos dos principais alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico encontrados em Annonaceae.	29
Figura 5. Exemplos de esqueletos derivados do esqueleto benziltetraidroisoquinolínico.	30
Figura 6. Rota biossintética dos alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos.	31
Figura 7. Formação de alcaloide aporfínico.	32
Figura 8. Rota biossintética dos alcaloides tetrahidroprotoberberínicos.	32
Figura 9. Alcaloides tetrahidroprotoberberínicos isolados de Annonaceae.	33
Figura 10. Exemplos de íons diagnósticos observadas para alcaloides benziltetraidroisoquinolínico (A) e tetrahidroprotoberberínicos (B).	34
Figura 11. Exemplos de fragmentações chave observadas para alcaloides aporfínicos (A) e oxoaporfínicos (B).	35
Figura 12. Ocorrência das espécies de <i>Onychopetalum</i> no Brasil.	36
Figura 13. Exemplos de alcaloides reportados na espécie <i>O. amazonicum</i>	37
Figura 14. Sinapse colinérgica.	39
Figura 15. Mecanismo de hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE.	40
Figura 16. Representação sítio ativo da AChE de <i>Torpedo californica</i>	41
Figura 17. AChEIs aprovados pelo FDA para o tratamento da DA.	42
Figura 18. Exemplo de alcaloides com ação frente a AChE.	43
Figura 19. Sistema LC-MS utilizando biorreator enzimático.	44
Figura 20. Exemplo de imobilização enzimática baseado em ligação covalente.	45
Figura 21. Exemplo de simulação de <i>docking</i> molecular. (A) Estrutura tridimensional da proteína com ligante; (B) Tipos de interações entre ligante e proteína.	47
Figura 22. Fonte de ionização ambiente <i>Leaf Spray</i> (A) substituição da caixa por um conector Db15 (B) folha cortada em formato triangular (base e altura de 10 mm) mantida por um conector de alta voltagem.	51
Figura 23. Estrutura dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina e seus prováveis sítios de benzilação.	54
Figura 24. Perfil LS-MS das folhas de <i>O. amazonicum</i>	62
Figura 25. Espectro LS-MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 328 e 342 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de <i>O. amazonicum</i>	63
Figura 26. Propostas de fragmentações para os íons de <i>m/z</i> 342, 328, 330 e 286 observados em LS-MS/MS das folhas <i>O. amazonicum</i>	64
Figura 27. Espectro LS-MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 330 e 286 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de <i>O. amazonicum</i>	65
Figura 28. Espectro LS-MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 282, 296, 312 e 326 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de <i>O. amazonicum</i>	66
Figura 29. Propostas de fragmentações para os íons de <i>m/z</i> 282, 296, 312 e 326 observados em LS-MS/MS das folhas <i>O. amazonicum</i>	66
Figura 30. Espectro LS-MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 266 e 280 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de <i>O. amazonicum</i>	67

Figura 31. Proposta de fragmentação para alcaloides aporfínicos encontrados na espécie <i>O. amazonicum</i> com (A) hidroxila e metoxila adjacentes e (B) ponte metilenodioxio no anel A.....	68
Figura 32. Cromatograma de íons totais (TIC) HPLC-MS da fração alcaloídica de <i>O. amazonicum</i>	69
Figura 33. Espectro MS/MS do íon de <i>m/z</i> 342 presente no pico III na fração alcaloídica da espécie <i>O. amazonicum</i>	70
Figura 34. Espectro MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 282 e 268 presentes nos picos V e VI respectivamente na fração alcaloídica da espécie <i>O. amazonicum</i>	71
Figura 35. Espectro MS/MS do íon de <i>m/z</i> 282 presente no pico VII na fração alcaloídica da espécie <i>O. amazonicum</i>	72
Figura 36. Propostas de fragmentação para o íon de <i>m/z</i> 282 observado no espectro LC-MS/MS do pico VII.....	72
Figura 37. Espectro MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 312 e 298 presentes nos picos IX e XI respectivamente, na fração alcaloídica da espécie <i>O. amazonicum</i>	73
Figura 38. Espectro MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 276 e 292 presentes nos picos VII e XIII respectivamente, na fração alcaloídica da espécie <i>O. amazonicum</i>	74
Figura 39. Estruturas alcaloídicas caracterizadas por LS-MS/MS e HPLC- DAD-MS/MS.....	77
Figura 40. Perfil de LS-MS comparativo entre as folhas de <i>O. periquino</i> e <i>O. amazonicum</i>	78
Figura 41. Cromatogramas de íons totais (TIC) por LC-MS das frações alcaloídicas de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i>	79
Figura 42. Principais interações observadas para os complexos galantamina-AChE (A), <i>N</i> -metilanonaina-AChE (B), e normuciferina-AChE (C).....	82
Figura 43. Derivados previstos a partir da benzilação do alcaloide tetrahidroprotoberberínico estefolidina.....	84
Figura 44. Derivados previstos a partir da benzilação do alcaloide tetrahidroprotoberberínico isocoripalmina.....	85
Figura 45. Principais interações observadas para os complexos estefolidina-AChE (A), 10h-AChE (B), 10f-AChE (C), 10g-AChE (D) e 10b-AChE (E).....	87
Figura 46. Espectro de <i>full scan</i> da amostra OaP.....	89
Figura 47. Espectros de MS/MS dos íons de <i>m/z</i> 328 e 342 [M+H] ⁺	90
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra FRAT. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e relação da integração dos sinais na mistura (B).....	91
Figura 49 Espectro <i>full scan</i> da fração BFA.....	93
Figura 50. Espectro <i>full scan</i> da fração BFD.....	93
Figura 51. Cromatogramas das amostras BFA (A) e BFA1 (B) obtidas por HPLC-MS.....	94
Figura 52. Cromatogramas das amostras BFD (A) e BFD 3 (B) obtidas por HPLC-MS.....	95
Figura 53. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFA 1.1.....	97
Figura 54. Espectro de MS/MS para o íon de <i>m/z</i> 418[M+H] ⁺ da amostra BFA 1.1.....	97
Figura 55 Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.1. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).....	99
Figura 56. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.1. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da	

região dos hidrogênios metoxílicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (D).	100
Figura 57. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.1. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C).	101
Figura 58. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFA 1.1	102
Figura 59. Mapa de NOESY (¹ H 500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.1	103
Figura 60. Estrutura do alcaloide (-)-(7R,13aS)-7-benzilestefolidina.	103
Figura 61. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFA 1.2	105
Figura 62. Espectro de MS/MS para o íon de <i>m/z</i> 418 [M+H] ⁺ da amostra BFA 1.2..	105
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.2. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).	107
Figura 64. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.2. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C).	108
Figura 65. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.2. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (D).	109
Figura 66. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFA 1.2.....	110
Figura 67. Mapa de NOESY (¹ H 500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 1.2	111
Figura 68. Estrutura do alcaloide (-)-(7S,13aS)-7-benzilestefolidina.	111
Figura 69. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFD 3.6	113
Figura 70. Espectro de MS/MS para o íon <i>m/z</i> 418[M+H] ⁺ da amostra BFD3.6.....	113
Figura 71. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFD3.6. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).	115
Figura 72. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 3.6. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C).	116
Figura 73. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFA 3.6. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), (B), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (D).	117
Figura 74. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.6.....	118
Figura 75. Estrutura do alcaloide (-)-(S)-2- <i>O</i> -benzilestefolidina.	118
Figura 76. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BF D3.7.	120
Figura 77. Espectro de MS/MS para o íon <i>m/z</i> 418 [M+H] ⁺ da amostra BFD 3.7.....	120
Figura 78. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFD 3.7. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).	122
Figura 79. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFD 3.7. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos e dos hidrogênios metilênicos (B).....	123
Figura 80. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD ₃ OD) da amostra BFD 3.7. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da	

região dos hidrogênios metilênicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (D).	124
Figura 81. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.7.	125
Figura 82. Estrutura do alcaloide (-)-(S)-10- <i>O</i> -benzilestefolidina.	125
Figura 83. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFD 3.8.	127
Figura 84. Espectro de MS/MS para o íon m/z 432 $[M+H]^+$ na amostra BFD 3.8.	127
Figura 85. Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.8. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).	129
Figura 86. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.8. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).	130
Figura 87. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.8. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (C).	131
Figura 88. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.8.	132
Figura 89. Estrutura do alcaloide (-)-(S)-2- <i>O</i> -benzilisocoripalmina.	132
Figura 90. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFD3.11.	134
Figura 91. Espectro de MS/MS para o íon m/z 508 $[M+H]^+$ da amostra BFD 3.11.	134
Figura 92. Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.11. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).	136
Figura 93. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.11 Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C).	137
Figura 94. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.11. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (B) e ampliação da região dos metoxílicos (C).	138
Figura 95. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.11.	139
Figura 96. Estrutura do alcaloide (-)-(S)- <i>O,O</i> -dibenzilestefolidina.	139
Figura 97. Hiperbólica de Michaelis-Menten para produção de Ch com a variação ACh no sistema ICER- <i>eelAChE</i>	141
Figura 98. Espectro obtido pelo sistema LC-MS com ICER- <i>eelAChE</i> após a injeção de 70 μ M de ACh, gerando os íons de m/z 146 (ACh) e de m/z 104 (Ch).	142
Figura 99. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença do inibidor de referência galantamina (100 μ M).	142
Figura 100. Resultado da triagem de novos inibidores utilizando o sistema ICER- <i>eelAChE</i> . A galantamina um reconhecido inibidor de AChE, foi utilizada como referência.	144
Figura 101. Determinação da capacidade inibitória (IC_{50}) das amostras (A) AM03 e (B) AM04 frente à <i>eelAChE</i> no ICER.	145
Figura 102. Gráficos de duplos recíproco das amostras (A) AM03 e (B) AM04.	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de Annonaceae empregadas tradicionalmente na medicina	27
Tabela 2. Caracterização de alcaloides isoquinolínicos das folhas <i>O. amazonicum</i> identificados por LS-MS/MS e HPLC-MS/MS	75
Tabela 3. Caracterização de alcaloides isoquinolínicos das folhas <i>O. periquino</i> identificados por HPLC-MS/MS	79
Tabela 4. Resultado do <i>docking</i> molecular para os alcaloides desreplcados de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i>	83
Tabela 5. Resultado do <i>docking</i> molecular para os derivados previstos através da benzilação dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina.	86
Tabela 6. Dados de RMN ¹ H do alcaloide estefolidina	92
Tabela 7. Frações obtidas pela análise em CLAE em escala semi-preparativa da amostra BFD 3	95
Tabela 8. Dados de RMN ¹ H, HSQC e HMBC da amostra BFA 1.1	104
Tabela 9. Dados de RMN ¹ H, HSQC e HMBC da amostra BFA 1.2	112
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H, HSQC e HMBC da amostra BFD 3.6	118
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H, HSQC e HMBC da amostra BFD 3.7.	125
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H, HSQC e HMBC da amostra BFD 3.8	132
Tabela 13. Dados de RMN ¹ H, HSQC e HMBC da amostra BFD 3.11	139
Tabela 14. Relação dos candidatos a inibidores testados	143

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Extração alcaloídica das folhas de <i>O. periquino</i>	52
Esquema 2: Representação do estudo químico da fração alcaloídica das folhas de <i>O. amazonicum</i>	55
Esquema 3: Fracionamento em coluna C18 da fração aquosa (BFA) do produto da benzilação dos alcaloides de <i>O. amazonicum</i>	57
Esquema 4: Fracionamento em coluna C18 da fração em diclorometano (BFD) produto da benzilação dos alcaloides de <i>O. amazonicum</i>	57
Esquema 5: Esquema de representação do sistema on-line HPLC-MS utilizado no ensaio enzimático <i>in vitro</i> para atividade anticolinesterase.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Família Annonaceae	26
2.1.1 Etnobotânica da Família Annonaceae	27
2.1.2 A Fitoquímica da Família Annonaceae	28
2.2 Espectrometria de massas (MS) para caracterização de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico	33
2.3 O gênero <i>Onychopetalum</i>	36
2.3.1 A espécie <i>O. amazonicum</i>	37
2.3.2 A espécie <i>O. periquino</i>	38
2.4 A doença de Alzheimer	38
2.4.1 Alcaloides como candidatos a AChEIs para tratamento da doença de Alzheimer	42
2.4.2 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> para determinação de AChEIs	43
2.5 <i>Docking</i> Molecular	46
3. OBJETIVOS	48
3.1 Geral	48
3.2 Específicos	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Solventes	49
4.2 Análises cromatográficas	49
4.2.1 Cromatografia em coluna (CC)	49
4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	49
4.3 Métodos espectroscópicos/espectrométricos	49
4.5 Desreplicação de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico das folhas de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i>	50
4.5.1 Coleta e identificação do material botânico	50
4.5.2 Análises de MS com fonte ambiente <i>Leaf spray</i> (LS-MS) das folhas de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i>	50
4.5.3 Marcha química para obtenção de alcaloides	51
4.5.4 Análises de HPLC-DAD-MS/MS das frações alcaloídicas das folhas de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i>	52
4.6 Prospeção de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico das folhas de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i> como potenciais inibidores da AChE	53
4.6.1 Estudo de <i>docking</i> molecular dos alcaloides desreplicados nas folhas <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i> e derivados benzilados	53
4.6.2 Obtenção da mistura estefolidina e isocoripalmina a partir da fração alcaloídica das folhas de <i>O. amazonicum</i>	54

4.6.3 Benzilação da mistura dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina.....	55
4.6.4 Análises por ESI-MS/MS e HPLC-MS das frações BFA e BFD	56
4.6.5 Fracionamento cromatográfico dos derivados benzilados	56
4.6.6 Ensaio enzimático <i>in vitro</i>	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Desrepliação de alcaloides derivados de esqueleto isoquinolínico das folhas de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i>	62
5.1.1 Estudo do perfil químico por LS-MS da <i>O. amazonicum</i>	62
5.1.2 HPLC-DAD-MS/MS da fração alcaloídica de <i>O. amazonicum</i>	68
5.1.3. Estudo do perfil alcaloídico por <i>Leaf spray</i> (LS-MS) da espécie <i>O. periquino</i>	78
5.1.4. HPLC-DAD-MS/MS da fração alcaloídica de <i>O. periquino</i>	78
5.2 Prospecção de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico das folhas de <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i> como potenciais inibidores da AChE	80
5.2.1 Estudo de <i>docking</i> molecular dos alcaloides desreplcados nas folhas <i>O. amazonicum</i> e <i>O. periquino</i>	80
5.2.2 Estudo de <i>docking</i> molecular dos derivados benzilados dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina	83
5.2.3 Confirmação estrutural de estefolidina e isocopiralmina na fração FRAT e avaliação da pureza da amostra	89
5.2.4 Análises dos produtos da benzilação da mistura dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina.....	93
5.2.5 Determinação estrutural das substâncias benziladas isoladas das amostras BFA e BFD	97
5.2.6 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial de inibição frente a AChE.....	141
5.2.6.4 Determinação da constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação no ICER-AChE	145
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	147
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
8. ANEXOS	167

1. INTRODUÇÃO

Onychopetalum é um gênero Neotropical pertencente à família Annonaceae, sendo constituído apenas por duas espécies (*O. amazonicum* R. E. Fr e *O. periquino* (Rusby) D.M Johnson & N. A Murray). Suas espécies são caracterizadas como árvores com distribuição restrita a Região Amazônica (MAAS et al., 2007). *Onychopetalum*, juntamente com *Unonopsis* e *Bocageopsis* são considerados gêneros botanicamente próximos, sendo esta estreita relação sustentada por pesquisas filogenéticas e fitoquímicas (MAAS et al., 2007; SILVA et al., 2015). Do ponto de vista fitoquímico, *Unonopsis* e *Bocageopsis* são fontes promissoras de substâncias bioativas, enquanto a composição química do gênero *Onychopetalum* permanece praticamente inexplorada (ALMEIDA et al., 1976; SOARES et al., 2015; LIMA et al., 2016; SILVA et al., 2016). Algumas espécies pertencentes a esses gêneros são utilizadas na medicina tradicional, como por exemplo, *U. veneficiorum* e *U. stipitata*, cujas folhas são empregadas no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (DA) (ADAMS et al., 2007).

A demência senil do tipo Alzheimer ou DA é uma desordem neurodegenerativa progressiva, considerada a forma mais comum de demência. Estima-se que na população mundial cerca de 33 milhões de pessoas sofram com DA, podendo este valor quadruplicar até 2050 (BROOKMEYER et al., 2007; PATTERSON, 2018). As características neurodegenerativas da DA incluem a deposição de placas β -amilóide ($A\beta$) e a morte de neurônios colinérgicos, acompanhados por redução drástica da concentração de neurotransmissores, tais como acetilcolina (ACh) (ANAND & SINGH, 2013; WANG et al., 2017). O término da transmissão colinérgica e a redução de acetilcolina é principalmente ocasionado pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) que hidrolisa a ACh a colina e acetato (GAUTHIER, 2002; SILMAN et al., 2005; DANDAN et al., 2015). Uma vez que o sistema colinérgico desempenha um importante papel no processo de aprendizado e memória, e a atividade enzimática da ACh está relacionada com a redução de Ch, substâncias inibidoras da AChE (AChEIs) têm sido propostas no desenvolvimento de drogas para o tratamento da DA (BRATUS et al., 2000; DONEV et al., 2009; BOHNEN et al., 2018).

Nos últimos anos, técnicas empregando a cromatografia de bioafinidade têm sido utilizadas para a realização de triagem e identificação e caracterização de potenciais AChEIs (VANZOLINI et al., 2013a). O uso de biorreatores enzimáticos capilares (ICER

do inglês, *Immobilized Capillary Enzyme Reactor*) permite maior reprodutibilidade e uma rápida avaliação enzimática (SILVA et al., 2013a). Em adição, métodos *in silico* (ex. *docking* molecular) e cristalográficos têm permitido entender como AChE interage com ligantes no sítio ativo, auxiliando assim no design de novos AChEIs (BERMÚDEZ-LUGO et al., 2011; DAS et al., 2017). Como exemplo, a determinação cristalográfica da enzima de *Torpedo californica*, permitiu a visualização do sítio ativo da AChE e sugeriu que interações π - π podem ser de grande relevância para ação de AChEIs (DVIR et al., 2010).

A partir da identificação do alcaloide galantamina como um poderoso AChEI (NG et al., 2015), a prospecção de novos AChEIs tem sido impulsionada no campo da química de produtos naturais. Notoriamente, muitos destes produtos naturais têm sido utilizados como modelos (ex. galantamina e huperzina A) em procedimentos semissintéticos com o objetivo de aumentar suas atividades biológicas ou reduzir efeitos colaterais (HÖGENAUER et al., 2001; ATANASOVA et al., 2015). Em relação aos alcaloides, diversas classes incluindo, derivados isoquinolínicos, indólicos piperidínicos, entre outros, têm sido reportados como promissores AChEIs (MURRAY et al., 2013).

Algumas das ferramentas analíticas atuais mais versáteis para a caracterização desta classe de substância é a espectrometria de massas (MS do inglês *Mass Spectrometry*), associada ou não a técnicas cromatográficas (ex. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (KOKKOTOU et al., 2014; MARSHALL et al., 2015; PÉREZ-VICTORIA et al., 2016). Mais recentemente, abordagens baseadas em MS por ionização ambiente, incluindo ionização por *Desorption Electrospray Ionization* (DESI), *Direct Analysis in Real Time* (DART) e *Leaf Spray* (LS) têm se caracterizado como métodos de amostragem rápidos e de baixo custo, sendo úteis para a prospecção de compostos orgânicos, em especial alcaloides (LIU et al., 2011; MONGE et al., 2013; MARTÍNEZ-JARQUÍN & WINKLER, 2017). De maneira integrativa, todas as técnicas citadas acima possibilitam inúmeras abordagens analíticas, seja na busca por novas substâncias de valor farmacológico, ou mesmo na caracterização química satisfatória de matrizes complexas, auxiliando nas etapas de seleção cromatográfica e permitindo um isolamento seletivo de compostos ainda não identificados (MARSHALL et al., 2015; SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015).

Portanto, o foco do presente projeto foi à prospecção de AChEIs nas espécies *O. amazonicum* e *O. periquino* através da combinação de análises instrumentais (LS-MS, HPLC-DAD-MS/MS), estudos *in silico* (*docking* molecular), modificações estruturais

(semissíntese) e ensaios farmacológicos (ICER), fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DA, além de contribuir com o conhecimento químico do gênero *Onychopetalum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Annonaceae

Annonaceae é considerada uma das dez maiores famílias botânicas do mundo. Possui distribuição pantropical (Figura 1), podendo ocorrer como árvores, arvoretas e lianas. É constituída por cerca de 109 gêneros e 2440 espécies (RIBEIRO et al., 1999; CHATROU et al., 2012; BEECH et al., 2017). No Brasil, são registrados 29 gêneros (372 espécies) e cerca de 269 espécies distribuídas na Região Norte, como reportado na figura 2 (MAAS et al., 2015).

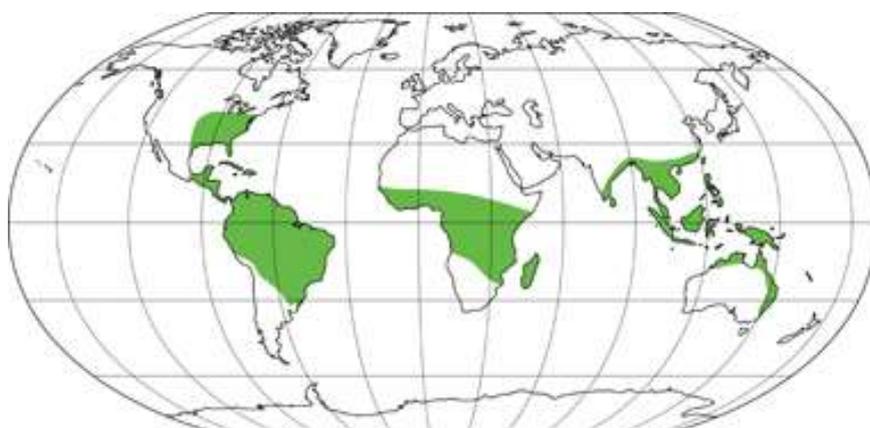


Figura 1. Distribuição geográfica da família Annonaceae.

Fonte: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/images/webcurso_spv/mapas/annonaceae.jpg

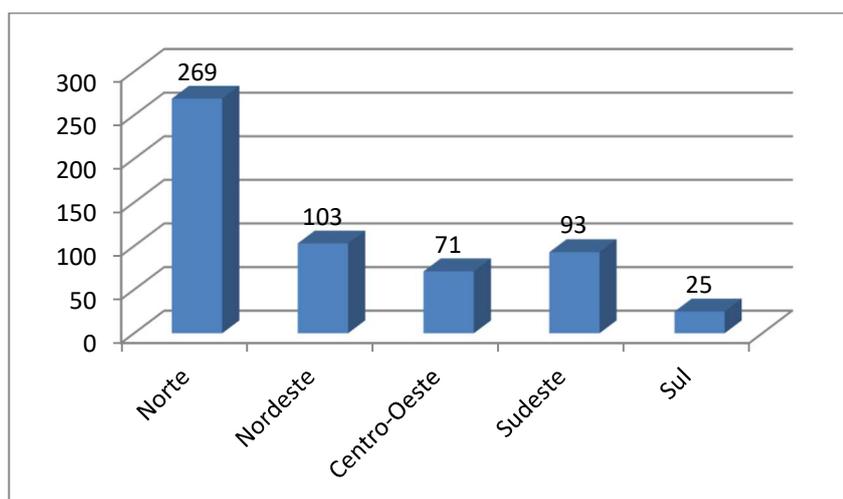


Figura 2. Distribuição regional das espécies de Annonaceae no Brasil.

Fonte: Adaptado de MAAS et al., 2015

2.1.1 Etnobotânica da Família Annonaceae

Destaca-se nessa família o interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, tais como a graviola (*Annona muricata* L.), a fruta-do-conde ou pinha (*A. squamosa* L.), a cherimoia (*A. cherimola* Mill.) e a atemoia (híbrido de *A. cherimola* x *A. squamosa*) (FERREIRA et al., 2015). Segundo o Programa Brasileiro para Modernização da Horticultura- PBMH, a comercialização desses frutos está concentrada nas CEASAs dos estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, com destaque para as espécies atemoia, graviola e pinha (Figura 3) (PBMH, 2013).

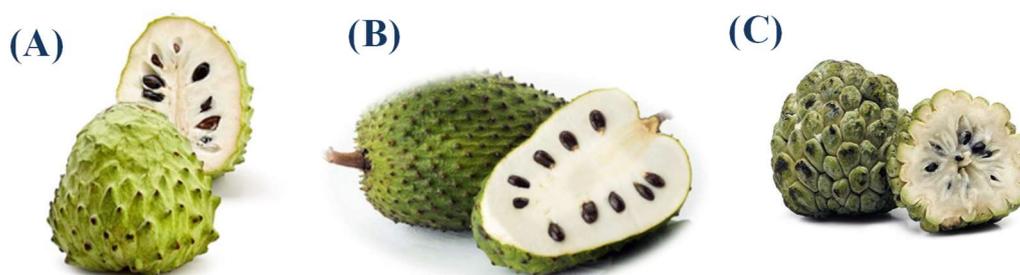


Figura 3. Principais espécies de Annonaceae comercializadas no Brasil: (A) atemoia (híbrido de *A. cherimola* x *A. squamosa*), (B) graviola (*A. muricata* L.) e (C) fruta-do-conde ou pinha (*A. squamosa* L.).

Fontes: (A) <https://saude.abril.com.br>; (B) <https://br.fotolia.com/tag/graviola> (graviola); (C) <https://www.vivercomflores.com.br>

Além da importância econômica, muitas espécies da família Annonaceae são utilizadas na medicina popular. Tais finalidades, vão de terapêuticas contra doenças cognitivas (*Unonopsis stipitata*), diabetes (*A. squamosa*) e no tratamento de tumores (*A. leptopetala*) (ADAMS et al., 2007; AGRA et al., 2007; GAJALAKSHMI et al., 2011). Na tabela 1 estão reportadas algumas espécies de Annonaceae empregadas tradicionalmente para fins medicinais. Destacam-se espécies pertencentes aos gêneros *Annona* e *Xylopia*, comumente utilizadas na Região Amazônica (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; VÁSQUEZ et al., 2014).

Tabela 1. Espécies de Annonaceae empregadas tradicionalmente na medicina

Espécie	Parte da Planta	Preparo	Uso Popular
<i>Annona muricata</i>	Folhas	Infusão, Decocção	Palpitações, malária, problemas no fígado e diabetes (NOVY et al., 1997; GRANDI et al., 1989; VÁSQUEZ et al., 2014)

<i>A. glabra</i>	Folhas		Decocção	Vermífugo (AGRA et al., 2007)
<i>A. coriacea</i>	Folhas Cascas	e	Infusão	Dores de ouvido (BUENO et al., 2005)
<i>Monodora myristica</i>	Folhas		Infusão	Malária e constipação (LEKANA-DOUKI et al., 2011)
<i>Polyalthia longifolia</i>	Cascas		Decocção	Febre (KATKAR et al., 2010)
<i>P. suaveolens</i>	Cascas		Decocção	Febre e malária (TSABANG et al., 2012)
<i>Uvariopsis korupensis</i>	Casca		Decocção	Dores estomacais e febre (BELE et al., 2011)
<i>Xylopia aromatica</i>	Folhas Cascas	e	Decocção	Anti-inflamatório e digestivo (GRANDI et al., 1989)
<i>X. buxifolia</i>	Folhas		Infusão	Perda de peso (NOVY et al., 1997)
<i>X. frutescens</i>	Folhas		Infusão	Analgésico e anti-inflamatório (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002)

2.1.2 A Fitoquímica da Família Annonaceae

As espécies de Annonaceae são ricas em metabólitos secundários, sendo os alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico os constituintes mais recorrentes (LEBOEUF et al., 1982). Dentre os compostos não alcaloídicos, os mais reportados são acetogeninas e terpenos (ALALI et al., 1999; FOURNIER et al., 1999).

2.1.2.1 Alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico

Os principais tipos de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico encontrados em espécies de Annonaceae são: isoquinolínicos simples (**1**) (YANG et al., 2004), benziltetraidroisoquinolínicos (**2**) (CAMPOS et al., 2008), bisbenzilisquinolínicos (**3**) (MAHIOU et al., 2000) protoberberínicos (**4**) (MALEBO et al., 2013), tetrahidroprotoberberínicos (**5**) (COSTA et al., 2015), aporfínicos (**6**) (SILVA et al., 2018a), oxoaporfínicos (**7**) (SILVA et al., 2012a) e fenantrênicos (**8**) (LOPEZ-MARTINZ et al., 2002) (Figura 4).

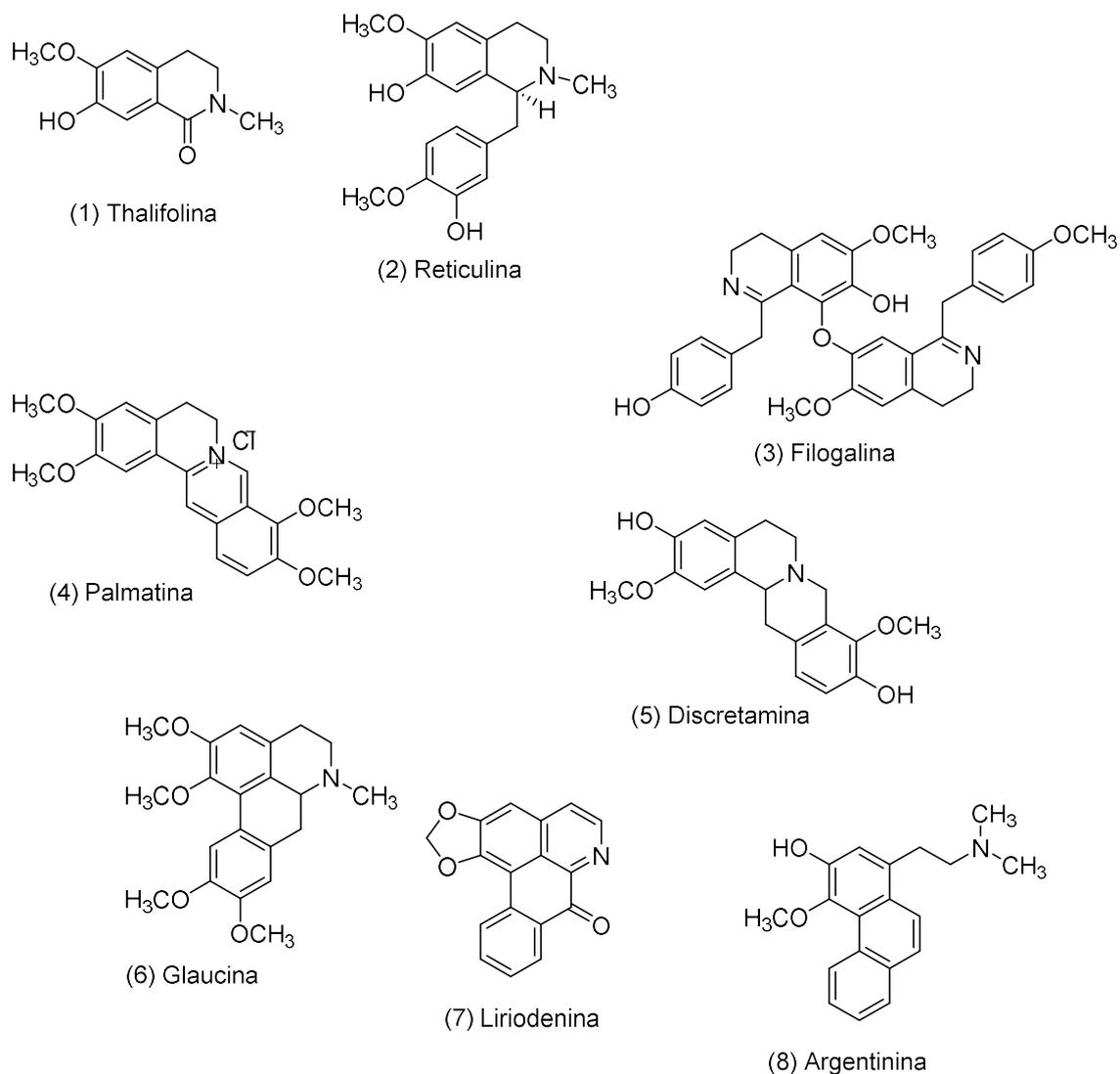


Figura 4. Exemplos dos principais alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico encontrados em Annonaceae.

Dentre esses alcaloides, destacam-se os benziltetraidroisoquinolínicos, já que são precursores de diversos tipos de esqueletos, tais como: cularina, pavina, isopavina, morfina, aporfínico, bisbenzilisoquinolínico, protoberberínico e novo tipo de alcaloide denominado oxahomoaporfínico (Figura 5) (HANGEL & FACCHINI, 2013; PAZ et al., 2019). Segundo Dewick (2009) a rota biossintética do esqueleto benziltetraidroisoquinolínico inicia-se a partir do aminoácido *L*-tirosina. Duas moléculas de *L*-tirosina paralelamente sofrem reação, uma é descarboxilada para formar a dopamina e a outra sofre uma reação de transaminação dando origem ao ácido 4-hidroxifenilpirúvico. Posteriormente, os produtos das duas reações sofrem condensação através da reação de Mannich, formando assim o benziltetraidroisoquinolínico (*S*)-

norcoclaurina. Reações seguintes de metilação e oxidação levam a formação de (*S*)-reticulina, sendo precursora dos alcaloides aporfinicos e protoberberínicos (Figura 6).

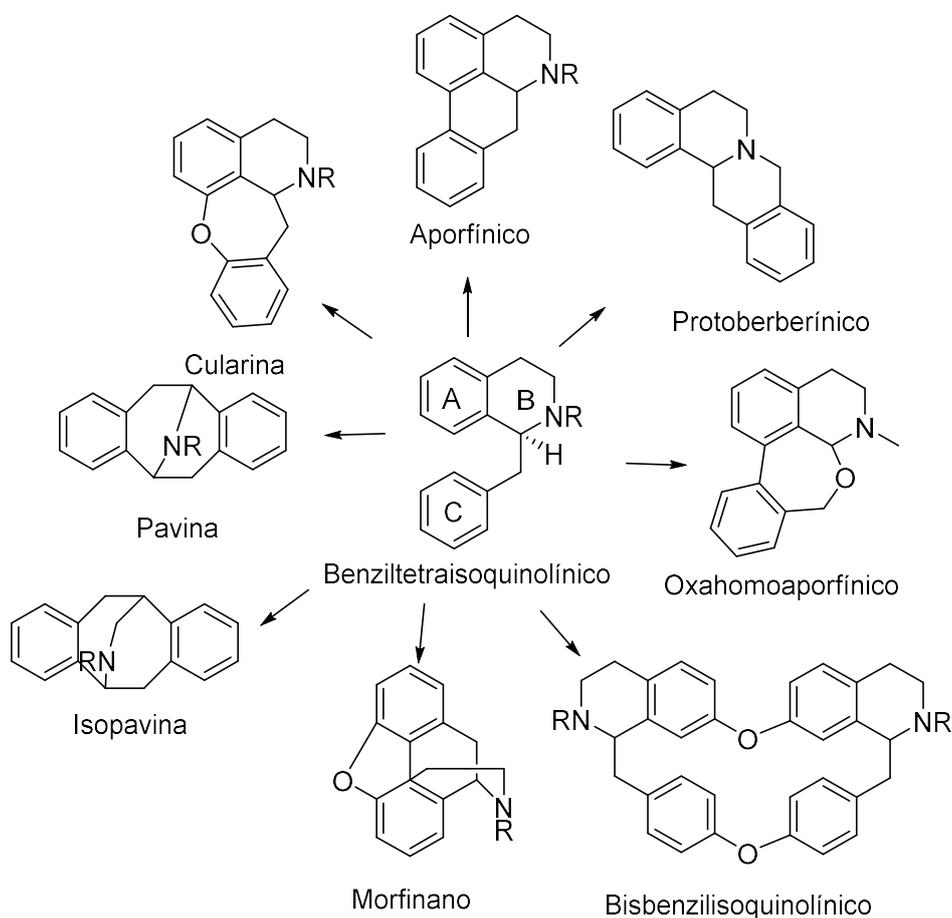


Figura 5. Exemplos de esqueletos derivados do esqueleto benziltetraidroisoquinolínico.
Fonte: Adaptado de HANGEL & FACCHINI, 2013.

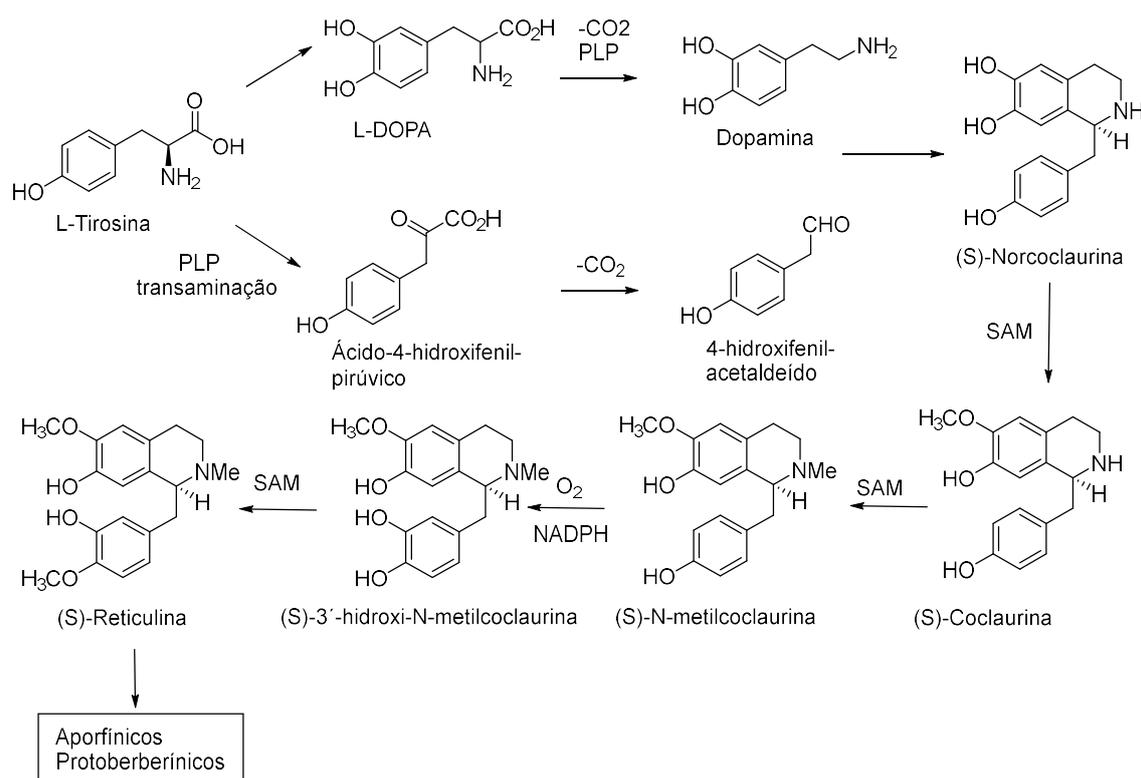


Figura 6. Rota biossintética dos alcalóides benziltetraidroisoquinolínicos.
 Fonte: DEWICK, 2009.

Os aporfínicos constituem um dos maiores grupos de alcalóides isoquinolínicos em Annonaceae. Esses metabólitos já foram isolados de diversos gêneros tais como: *Annona*, *Bocageopsis*, *Guatteria*, *Unonopsis*, *Duguetia*, *Xylopia* e *Onychopetalum* (SILVA et al., 2007; VENDRAMIN et al., 2013; ZAWAWI et al., 2012; LIMA, 2015; SOARES et al., 2015; COSTA et al., 2018; SILVA et al., 2018a). Quimicamente, estes alcalóides são caracterizados como bases tetracíclicas formadas pelo acoplamento oxidativo direto entre os anéis aromático A e C de núcleos típicos benzilisoquinolínicos (STÉVIGNY et al., 2004) (Figura 7). Os aporfínóides apresentam uma crescente lista de atividades biológicas, tendo sido confirmadas suas atividades antimicrobiana (COSTA et al., 2013), leishmanicida (SILVA et al., 2012a), citotóxica (SANTOS et al., 2017), anti-inflamatória (WEI et al., 2018), entre outras.

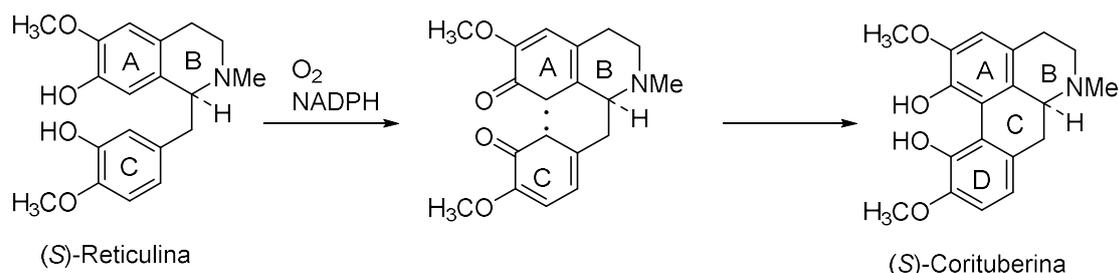


Figura 7. Formação de alcaloide aporfínico.

Fonte: DEWICK, 2009.

Os tetrahidroprotoberberínicos são alcaloides com esqueleto do tipo protoberberínico. Esse grupo de alcaloides tem atraído recentemente atenção devido sua ação no sistema nervoso central. Estudos classificam alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos com grande potencial no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da esquizofrenia, dependência de drogas e como inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (TSAI & LEE, 2010; LAPISH et al., 2014; QIAN et al., 2012; MANUSZAK et al., 2018). Estes compostos são formados pela oxidação (via enzimática), da amina terciária do núcleo benzilisoquinolínico, seguida de reação do tipo Mannich, resultando na ciclização da molécula (DEWICK, 2009) (Figura 8). Na família Annonaceae esses alcaloides têm sido reportados em alguns gêneros, tais como *Annona* (COSTA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016), *Onychopetalum* (LIMA, 2015), *Xylopia* (SILVA et al., 2009), *Duguetia* (FECHINE et al., 2002) e *Guatteria* (SANTOS et al., 2018) (Figura 9).

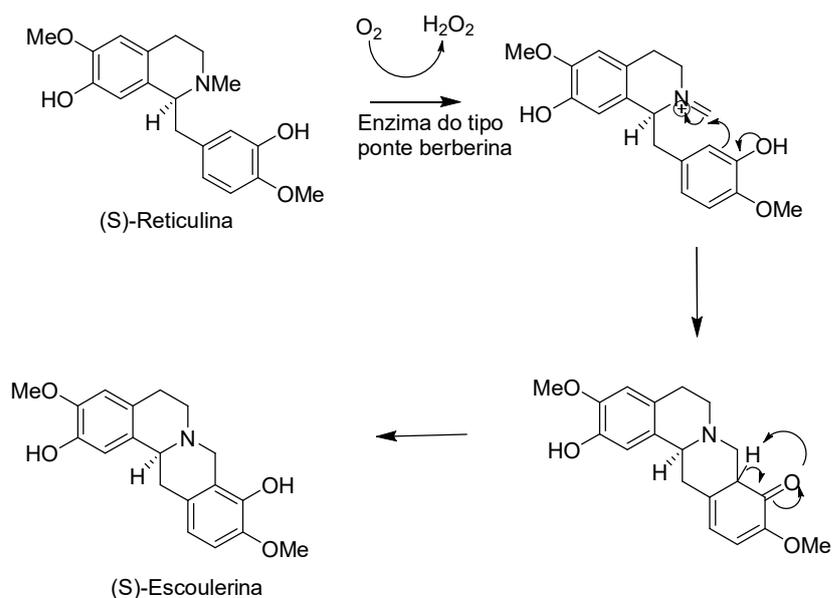
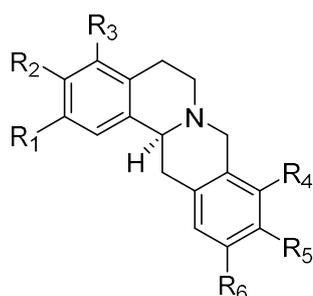


Figura 8. Rota biossintética dos alcaloides tetrahidroprotoberberínicos.

Fonte: DEWICK, 2009.



Coritenchina: $R_1=R_2=R_5=OCH_3$; $R_6=OH$; $R_3=R_4=H$
Xylopinina: $R_1=R_2=R_5=R_6=OCH_3$; $R_3=R_4=H$
Tetraidropseudocolumbamina: $R_1=OH$; $R_2=R_5=R_6=OCH_3$; $R_3=R_4=H$
Tetraidropalmatina: $R_1=R_2=R_4=R_5=OCH_3$; $R_3=R_6=H$
Coripalmina: $R_1=R_4=R_5=OCH_3$; $R_2=OH$; $R_3=R_6=H$
Estefolidina: $R_1=R_5=OH$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=R_6=H$
Isocoripalmina: $R_1=OH$; $R_2=R_4=R_5=OCH_3$; $R_3=R_6=H$
Discretamina: $R_1=R_4=OCH_3$; $R_2=R_5=OH$; $R_3=R_6=H$

Figura 9. Alcaloides tetrahidroprotoberberínicos isolados de Annonaceae.

2.2 Espectrometria de massas (MS) para caracterização de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico

A técnica de espectrometria de massas (MS do inglês *Mass Spectrometry*) baseia-se na determinação da massa de íons na fase gasosa com base na relação massa/carga (m/z) (PITT, 2009). Destaca-se por ser uma técnica analítica que apresenta alta sensibilidade, baixo limite de detecção, seletividade e aplicação nos principais campos das ciências Ômicas: proteômica, lipidômica e metabolômica, com destaque na química de produtos naturais (AEBERSOLD & MANN, 2006; HOFFMANN & STROOBANT, 2007; DETTMER et al., 2007; HU & ZHANG, 2017). Para análise de matrizes complexas, como produtos naturais, a MS normalmente é acoplada a técnicas de separação, como exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). O uso do sistema de HPLC-MS fornece maior rapidez nas análises, na avaliação da pureza das bandas cromatográficas, bem como na caracterização de compostos por experimentos de fragmentação (HPLC-MS/MS). Tais identificações são comumente analisadas com fontes de ionização a pressão atmosférica como *eletrospray* (ESI) e *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; CASS, 2015).

O reconhecimento de fragmentações chave através de dissociação induzida por colisão (CID do inglês *Collision-induced dissociation*) têm sido cada vez mais reportado em estudos com alcaloides isoquinolínicos, demonstrando ser uma maneira rápida e segura de identificá-los em matrizes complexas (SILVA et al., 2012b; SOARES et al., 2015; SILVA et al., 2016). A formação de íons característicos (íons diagnósticos) por fragmentações de alcaloides do tipo benziltetraidroisoquinolínicos permite determinar os seus substituintes nas unidades isoquinolínica e benzílica (SCHMIDT et al., 2005) (Figura 10A). Os alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos, por sua vez, têm íons diagnósticos gerados a partir de reações retro-Diels-Alder (RDA), o que possibilita a

caracterização do padrão de substituição dos anéis A e D (DEMARQUE et al., 2016) (Figura 10B).

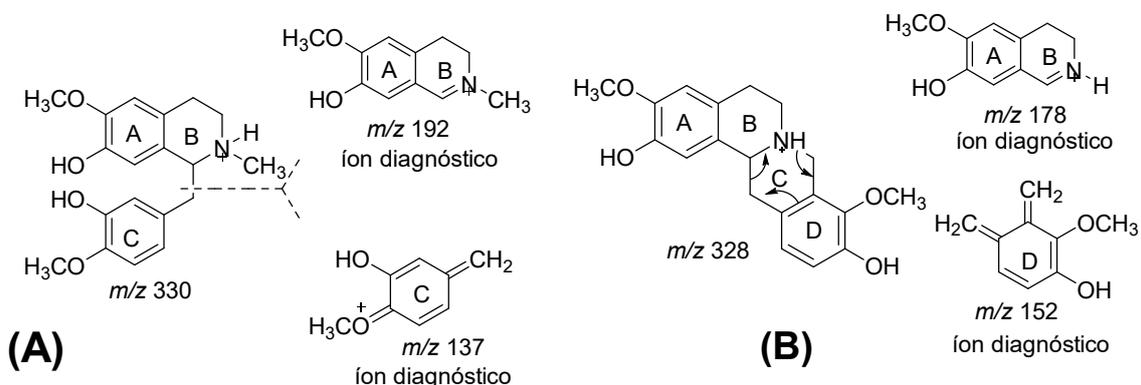


Figura 10. Exemplos de íons diagnósticos observadas para alcaloides benziltetraidroisoquinolínico (A) e tetrahidroprotoberberínicos (B).

Fragmentações chave em alcaloides aporfínicos evidenciam a presença de diferentes grupos substituintes. A primeira perda é um indício da saída do grupo amino e seu respectivo substituinte (-17 Da NH_3 ou -31 Da CH_3NH_2), enquanto as etapas seguintes são referentes à saída de grupos periféricos. A presença de metoxilas adjacentes são evidenciadas por perdas competitivas de 15 Da (CH_3) e 31 Da (OCH_3), enquanto metoxila adjacente a hidroxila, levam a perdas consecutivas de 32 Da (CH_3OH) e 28 Da (CO). Estruturas contendo ponte metilenodioxo são caracterizadas por perdas consecutivas de 30 Da (CH_2O) e 28 Da (CO) (STÉVIGNY et al., 2004) (Figura 11A). Por outro lado, o perfil de fragmentação para alcaloides oxoaporfínicos tem sido relatado com perdas iniciais referentes à saída dos grupos periféricos, como pode ser exemplificado na figura 11B (SILVA et al., 2017).

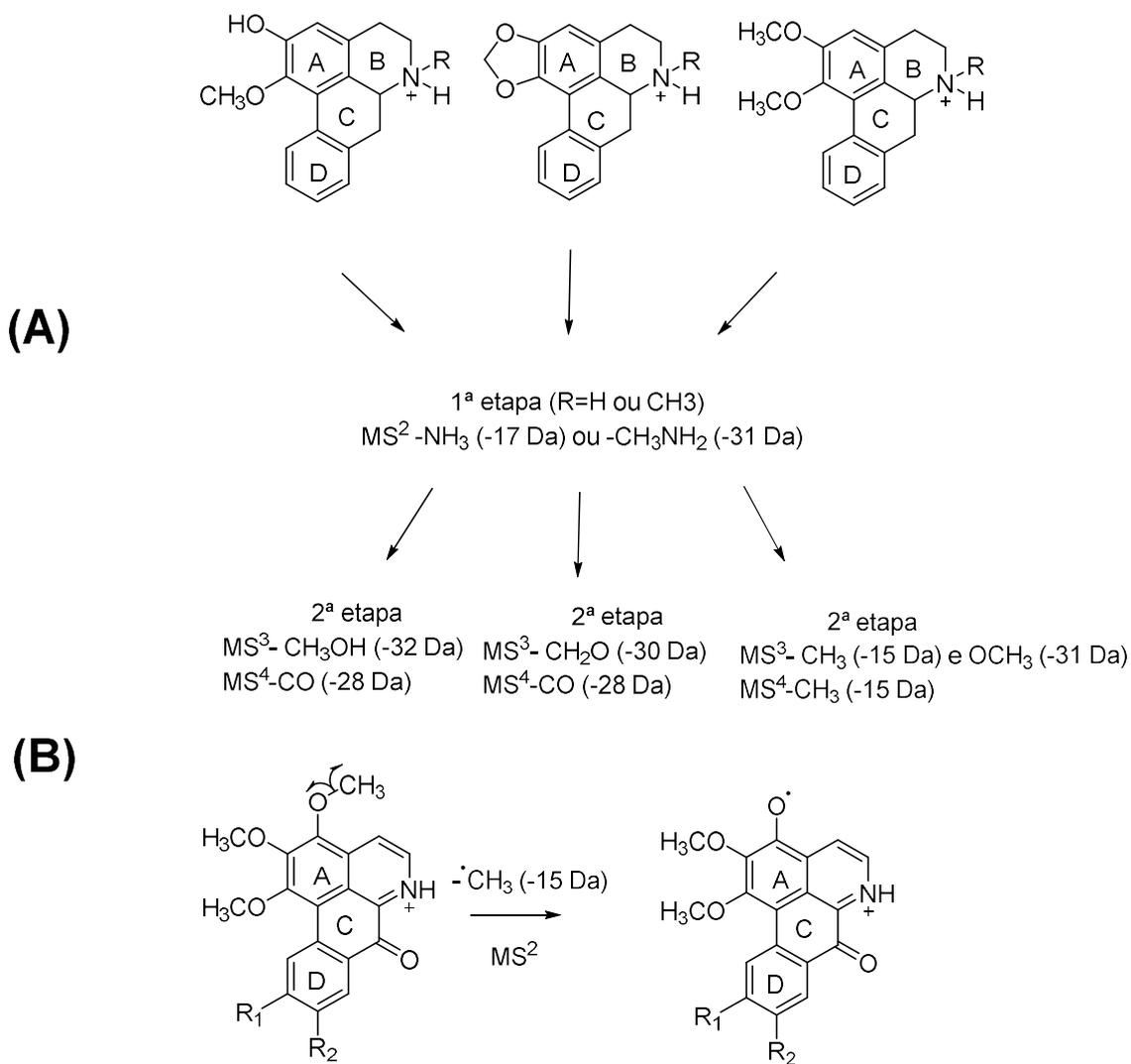


Figura 11. Exemplos de fragmentações chave observadas para alcaloides porfínicos (A) e oxoaporfínicos (B).

Além dos estudos com ionização a pressão atmosférica, têm se destacado na espectrometria de massas a utilização de técnicas por ionização ambiente. Tais métodos proporcionam a ionização sob condições com pouca ou nenhuma preparação das amostras (ALBERICI et al., 2010). Técnicas de ionização ambiente são consideradas como métodos de amostragem rápidos e de baixo custo para análise direta de misturas complexas (LIU et al., 2011; MONGE et al., 2013). Pode-se destacar a ionização ambiente por *Leaf Spray* (LS), uma técnica que se baseia na formação direta de íons a partir material vegetal. O método consiste na aplicação de solvente e alta tensão no tecido foliar (em formato triangular), resultando em *spray* com gotas ionizadas (SNYDER et al., 2015).

Essa técnica tem sido utilizada na investigação do perfil químico das folhas, sendo útil para a triagem de alcaloides (LIU et al., 2011). Em um estudo realizado por Muller & Cooks (2014) a classe de alcaloide pirrolidínico foi identificada nas folhas de *Hibiscus moscheutos*. Alcaloides poli-hidroxilados foram reportados através da triagem por LS em folhas de amoreira (ZHANG et al., 2013). Recentemente, alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico foram caracterizados na espécie *Hippeastrum aulicum*, onde juntamente com dados de GC-MS e RMN foi possível identificar 31 compostos (BESSA et al., 2017).

2.3 O gênero *Onychopetalum*

Onychopetalum é um gênero constituído pelas espécies *O. amazonicum* R. E. Fr e *O. periquino* (Rusby) D.M Johnson & N. A Murray com distribuição é restrita à Região Amazônica. No Brasil, (Figura 12) suas espécies são encontradas nas regiões Norte e Centro-Oeste com ocorrência em florestas não inundadas (MAAS et al., 2007; MAAS et al., 2015). *Onychopetalum* é o menor gênero do informal “grupo *Unonopsis*”, agrupamento realizado por similaridades botânicas na década de 50 com os gêneros *Bocageopsis* e *Unonopsis*. Tal apontamento recentemente está sendo apoiado por pesquisas fitoquímicas e filogenéticas (MAAS et al., 2007; SILVA et al., 2015).

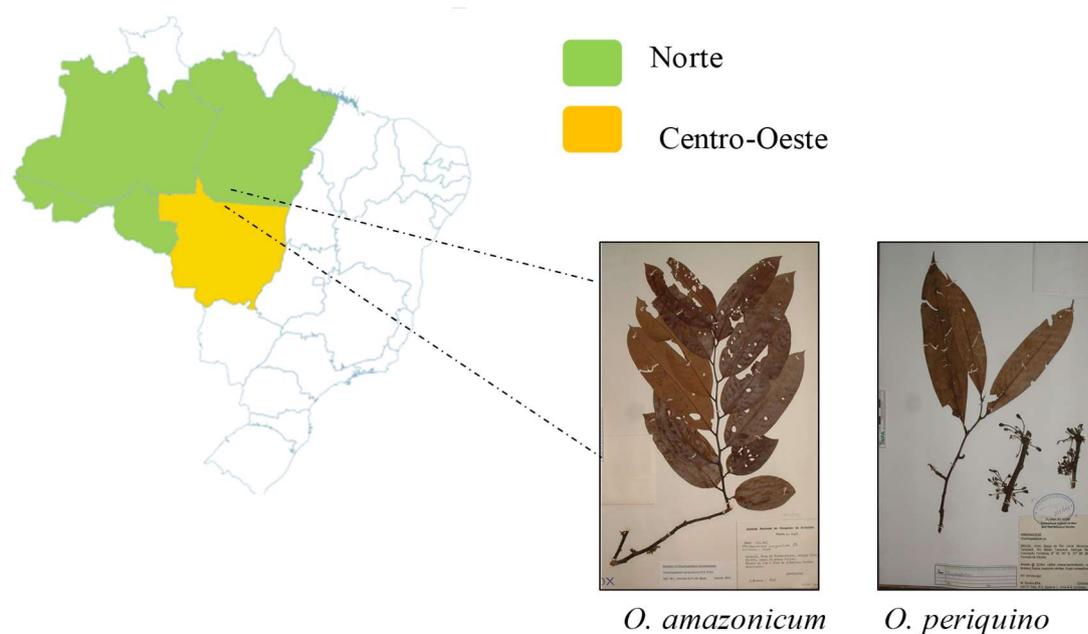


Figura 12. Ocorrência das espécies de *Onychopetalum* no Brasil.

Fonte: MAAS et al., 2015; <http://www.splink.org.br/form?lang=pt&collectioncode=INPA>

2.3.1 A espécie *O. amazonicum*

A espécie *O. amazonicum* é constituída por árvores de 10 a 30 metros de altura. Sua distribuição ocorre na Região Amazônica Brasileira e Venezuelana. É conhecida popularmente como envira preta e envira caju, apresentando floração nos meses de janeiro, junho e setembro, com frutificação de setembro a janeiro (MAAS et al., 2007).

É a única espécie no gênero estudada fitoquimicamente, podendo destacar o isolamento dos alcaloides onichina (9) (azafluorenona), estefolidina (10) e isocoripalmina (11) (terahidroprotoberberínicos), nornuciferina, anonaina, asimilobina, e *O*-metilisopilina (12) (aporfínicos) e norjuzifina (13) (benziltetraidroisoquinolínicos) (ALMEIDA et al., 1976; LIMA, 2015) (Figura 13). Além dos relatos alcaloídicos, investigações com óleos essenciais reportam a predominância de sesquiterpenos nas folhas, cascas e galhos (LIMA et al., 2016) e policarpol nas cascas (SILVA et al., 2015)

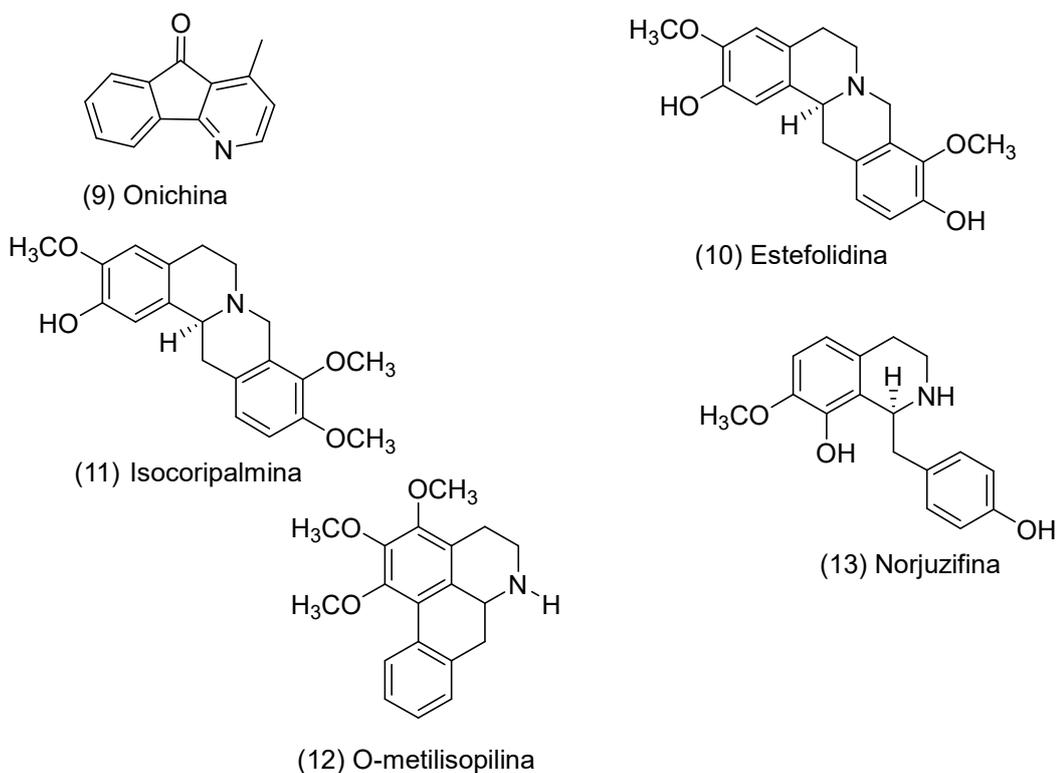


Figura 13. Exemplos de alcaloides reportados na espécie *O. amazonicum*.

2.3.2 A espécie *O. periquino*

Esta espécie caracteriza-se como uma árvore que pode atingir 30 metros de altura, tendo sua distribuição na Amazônia Peruana, Brasileira e Boliviana. Sua ocorrência é em florestas não inundadas, com o período de frutificação de agosto a fevereiro (MAAS et al., 2007). Seus frutos são caracterizados com um sabor agradável sendo apreciados pela população tradicional e animais silvestres (FARIAS, 2009). Na literatura não existem dados sobre a sua composição química.

2.4 A doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, considerada a forma mais comum de demência em idosos. Atualmente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de alguma forma de demência e cerca de dois terços apresentam DA (PRINCE et al., 2016; PATTERSON et al., 2018). Esta é considerada um distúrbio multifatorial, onde a região no cérebro inicialmente afetada é o hipocampo (lobo temporal), responsável por importantes funções cerebrais como a consolidação da memória (SOININEN et al., 2012; DANDAN et al., 2015). As características neurodegenerativas da DA incluem deposição e agregação de β -amilóide ($A\beta$) e proteína *tau*, estresse oxidativo e a morte de neurônios colinérgicos, acompanhada pela drástica redução de neurotransmissores, tal como acetilcolina (ACh) (SINHA & LIEBERBURG, 1999; SMALL et al., 1997; TERRY & BUCCAFUSCO, 2003; GELLA & DURANY, 2009; MORRIS et al., 2015).

A ACh, formada a partir da acetilcoenzima A (Acetil-CoA) e colina, é responsável pela transmissão de impulsos neurológicos através das sinapses colinérgicas. Na DA baixos níveis de ACh estão associados com a disfunção cognitiva e perda da memória. O término da transmissão colinérgica é ocasionado na maioria dos casos pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) que hidrolisa a ACh gerando ácido acético e colina (Figura 14) (GAUTHIER, 2002; SILMAN et al., 2005; DANDAN et al., 2015). A hidrólise enzimática da ACh ocorre no sítio catalítico, no qual a tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos de serina (Ser200), histidina (His440) e Ácido glutâmico (Glu327) está presente. O resíduo histidina funciona como catalisador ácido-base, já a serina age como nucleófilo. A reação com éster carboxílico, leva a formação de uma enzima acil e liberação de colina. Posteriormente a enzima acil sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água, formando ácido acético e regenerando a enzima livre, como representado na Figura 15 (COLIVIC et al., 2013; ARAÚJO et al 2016).

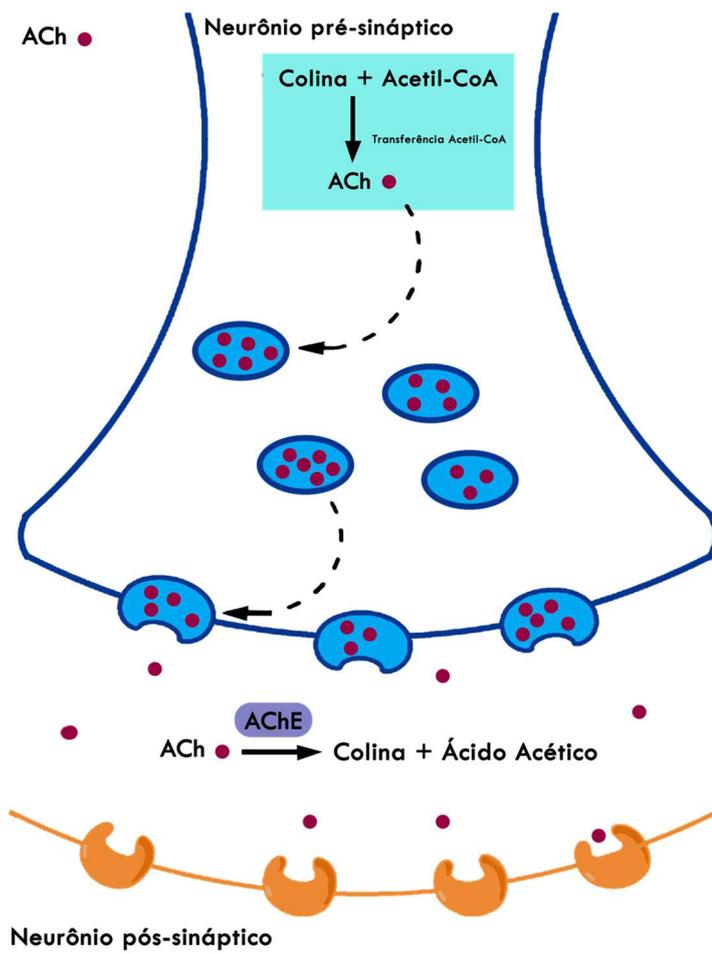


Figura 14. Sinapse colinérgica
Fonte: ARAÚJO, 2016

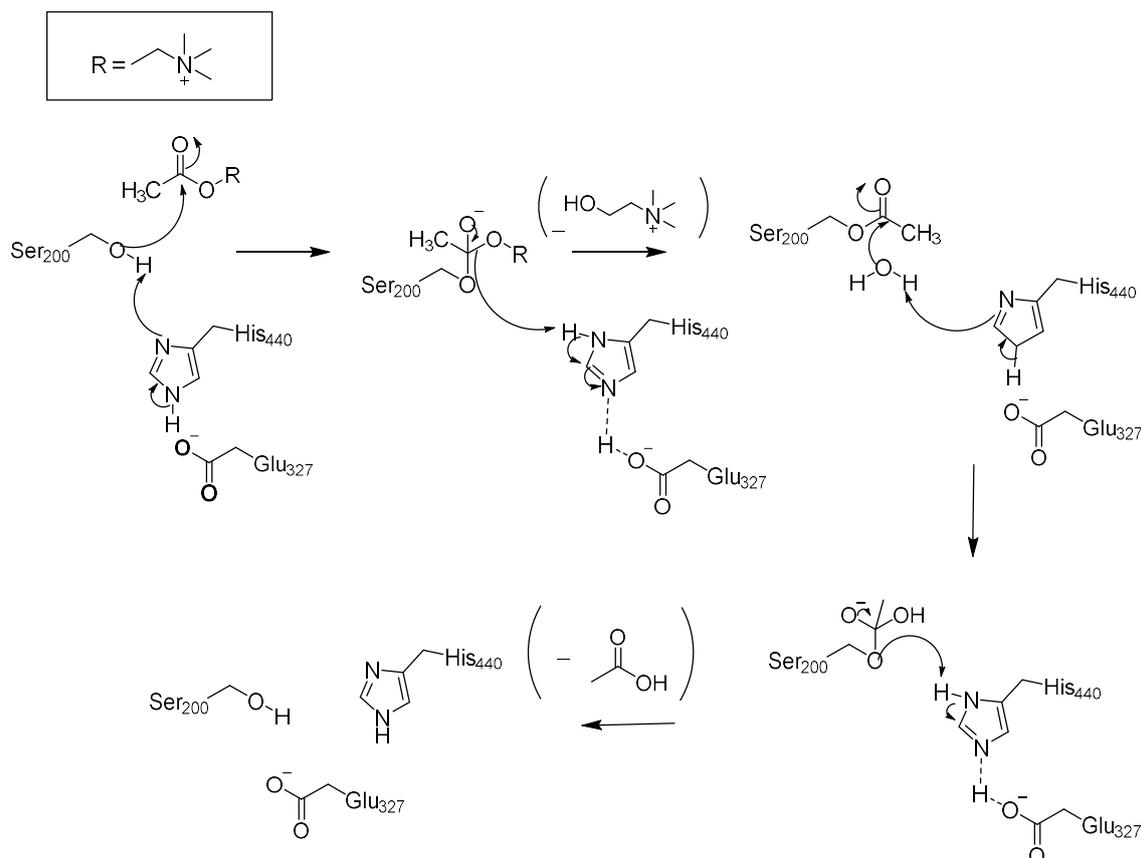


Figura 15. Mecanismo de hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE
 Fonte: Adaptado de COLIVIC et al., 2013; ARAÚJO, 2016.

Uma das principais terapias adotadas no tratamento da DA baseia-se no uso de inibidores da AChE (AChEIs) (LANE et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2017). Em um trabalho realizado por Dvir e colaboradores (2010), foi reportado na estrutura cristalina da AChE de *Toxopneustes purpurascens*, a visualização em resolução atômica do sítio ativo da proteína. Inesperadamente tal sítio ativo está localizado no fundo da cavidade, sendo este revestido em grande parte por resíduos aromáticos, sugerindo que interações do tipo π - π podem ser de grande relevância para a ação dos AChEIs. Na figura 16 está representada a cavidade da AChE com a localização do sítio catalítico.

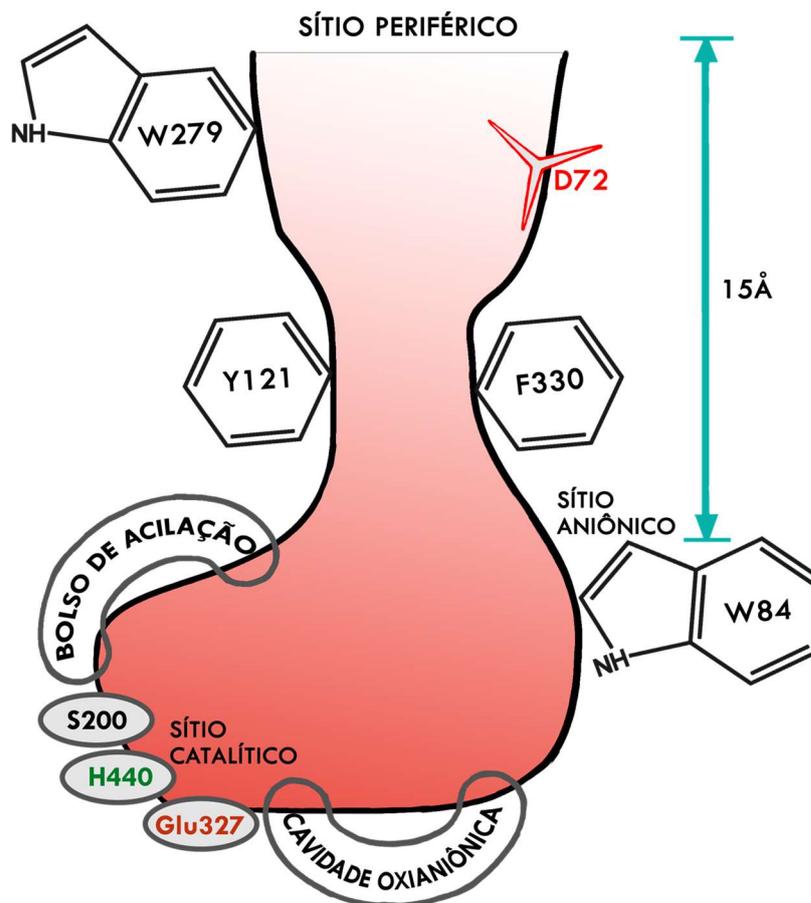


Figura 16. Representação sítio ativo da AChE de *Torpedo californica*.
 Fonte: Adaptado de DVIR, 2010

Ainda não há disponível um tratamento capaz de alterar a evolução da doença, porém AChEI é considerado uma estratégia terapêutica para distúrbios neurológicos como a DA, uma vez que atenua os sintomas da doença (HOUGHTON et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2007; ANAND & SINGH, 2013; DANDAN et al., 2015; MOHAMMAD et al., 2017). Embora a tacrina (**14**) (Figura 17) tenha sido a primeira droga aprovada para o tratamento da DA, esta foi descontinuada devido a efeitos colaterais, desafios de administração e complacência e hepatotoxicidade. Atualmente, a galantamina (Razadyne®) (**15**), o donepezil (Aricept®) (**16**) e a rivastigmina (Exelon®) (**17**) são AChEIs utilizados como fármacos e liberados pela agência reguladora americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) (HERRMANN et al., 2011; PATTERSON, 2018).

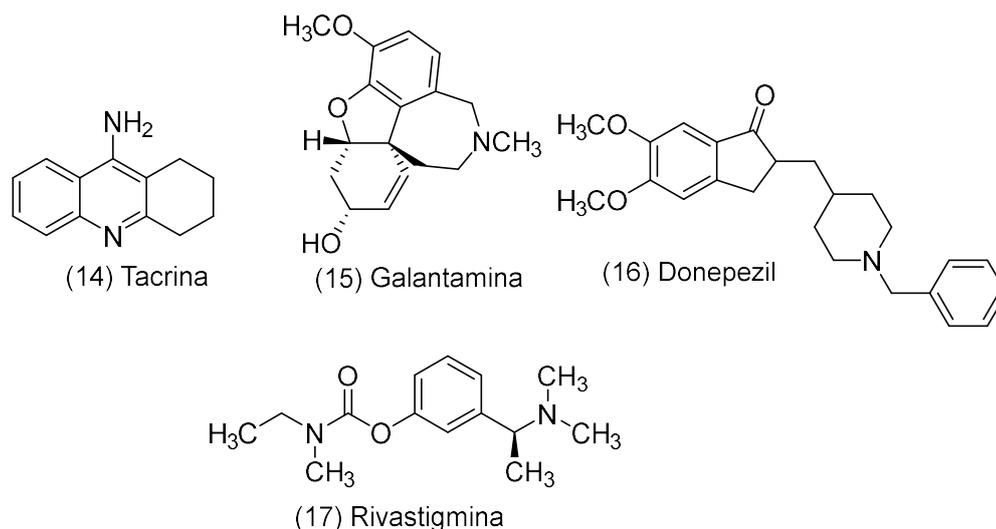


Figura 17. AChEIs aprovados pelo FDA para o tratamento da DA.

2.4.1 Alcaloides como candidatos a AChEIs para tratamento da doença de Alzheimer

A partir da identificação do alcaloide galantamina como um potente AChEI (NG et al., 2015), a prospecção de novos AChEIs tem sido impulsionada no campo da química de produtos naturais. Como exemplo, os alcaloides β -carbolínicos harmalina (18) e harmina (19) (Figura 18) apresentaram uma significativa ação inibitória frente a esta enzima. Recentemente também foi investigada a ação *in vivo* desses alcaloides na função colinérgica, onde os mesmos exibiram uma melhora no déficit de memória em camundongos, destacando a significativa dosagem de harmalina utilizada (2mg/kg), podendo este ser um promissor candidato anti-amnésico para tratar Alzheimer e doenças relacionadas (ZHAO et al., 2013; LI et al., 2018).

A investigação de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico também tem sido relatada na literatura. O estudo realizado por Hostalkova e colaboradores (2019) com alcaloides isolados das cascas de *Berberis vulgaris*, evidenciou a relevante capacidade inibitória frente à AChE dos alcaloides berberina (20) e palmatina (21), sendo essas atividades inibitórias mais potente que a inibição da própria galantamina. A capacidade inibitória contra AChE também foi avaliada no hipocampo de ratos adultos com alcaloides semelhantes a galantamina, o alcaloide montanina (22) exibiu uma considerável inibição (50%) a 1nM sugerindo ser uma molécula promissora para novas investigações na busca de AChEIs (PAGLIOSA et al., 2010).

A ação inibitória frente a essa enzima também foi investigada para os alcaloides do tipo quinolínicos, pirrolizidínicos e indólicos (ZHAN et al., 2010; BENAMAR et al.,

2016; MANTOANI et al., 2016). É importante destacar o alcaloide huperzina A (23), isolado de *Huperzia serrata* (Figura 18) também descrito como AChEI, demonstrando ser um inibidor reversível com melhor capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica que os inibidores de referência. Em ensaios clínicos a huperzina A promoveu significativas melhoras no déficit de memória e função cognitiva além de não apresentar efeitos colaterais consideráveis (WANG et al., 2006; XING et al., 2014). Notoriamente, muitos destes produtos naturais têm sido utilizados como modelos (ex. galantamina e huperzina A) em procedimentos semissintéticos com o objetivo de aumentar suas atividades biológicas ou reduzir efeitos colaterais (HÖGENAUER et al., 2001; ATANASOVA et al., 2015).

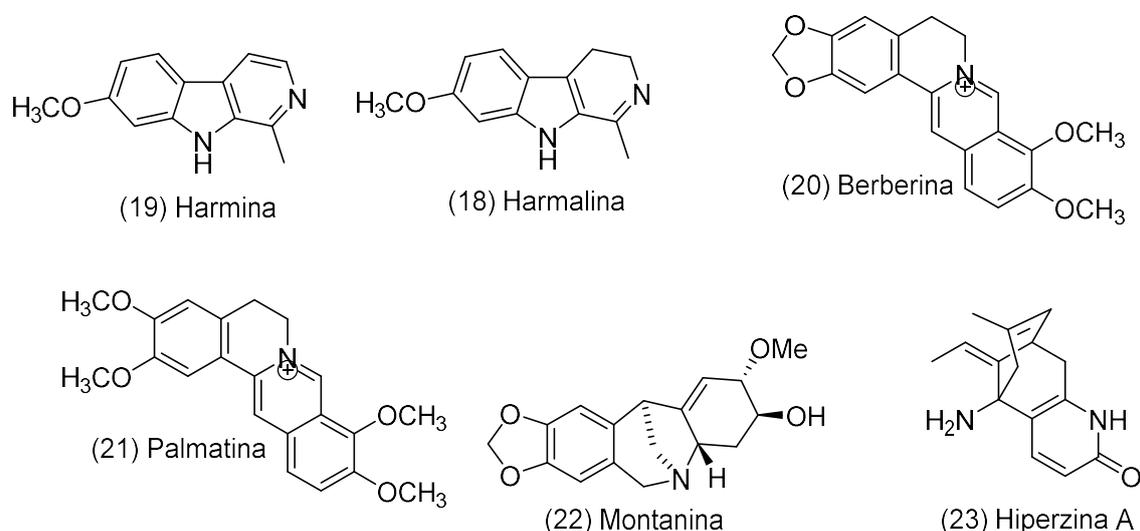


Figura 18. Exemplo de alcaloides com ação frente a AChE.

2.4.2 Ensaios biológicos *in vitro* para determinação de AChEIs

O ensaio bioquímico para determinar a inibição da enzima AChE mais utilizado é o método espectrofotométrico de Ellman (ELLMAN et al., 1961). Este ensaio consiste na reação do reagente de Ellman, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico), com a tiocolina, formada pela reação enzimática da AChE com acetiltiocolina, produzindo o ácido-5-tio-2-nitrobenzóico. Esse ensaio, entretanto, possui algumas desvantagens dentre elas, o uso de substrato não natural e o fato de ser um ensaio indireto com sonda marcadora, o que pode ocasionar resultados falsos positivos. O método espectrofotométrico de Ellman, no entanto, é empregado intensivamente para a avaliação da inibição anticolinesterase, porém é importante ressaltar a necessidade de ensaios adicionais para eliminar os resultados falsos positivos (RHEE et al., 2003).

Outra abordagem direta e eficiente empregada na triagem de novos AChEIs é o uso da cromatografia de bioafinidade com biorreatores enzimáticos capilares (ICER do

inglês, *Immobilized Capillary Enzyme Reactor*) (SILVA et al., 2013a; VANZOLINI et al. 2013a; VANZOLINI et al. 2013b; VILELA et al., 2014; TORRES et al., 2016; WANG et al., 2018). A cromatografia de bioafinidade consiste na utilização de alvos biológicos imobilizados (biorreator) em um suporte cromatográfico, que pode então ser utilizado como fase estacionária nas análises de cromatografia (HPLC). Uma das vantagens dessa técnica, além da detecção por absorvância, o monitoramento pode ser feito por outros detectores como, por exemplo, o espectrômetro de massas, permitindo alta reprodutibilidade e sensibilidade de detecção (Figura 19) (MORAES et al., 2014; VANZOLINI et al. 2013b; VILELA et al., 2018). Essa abordagem possibilita monitorar as interações substrato-proteína e inibidor-proteína, fornecendo informações importantes sobre mecanismo e comportamento de tais processos (CASS, 2015).

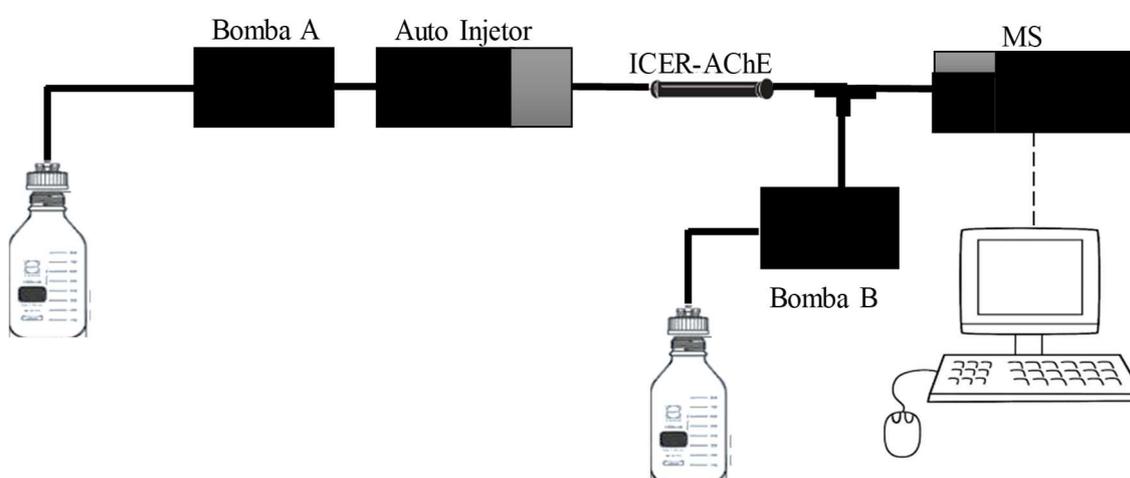


Figura 19. Sistema LC-MS utilizando biorreator enzimático.
Fonte: VANZOLINI et al. 2013c

Embora existam diversos métodos para imobilização de enzimas a imobilização enzimática em suporte cromatográfico é comumente realizada por ligações covalentes, consistindo na formação dessas ligações entre os grupos funcionais presentes na superfície do capilar de sílica com os resíduos de aminoácidos da enzima (CARDOSO et al., 2009). Na figura 20, está exemplificado uma das formas mais comuns de imobilização enzimática baseada em ligações covalentes.

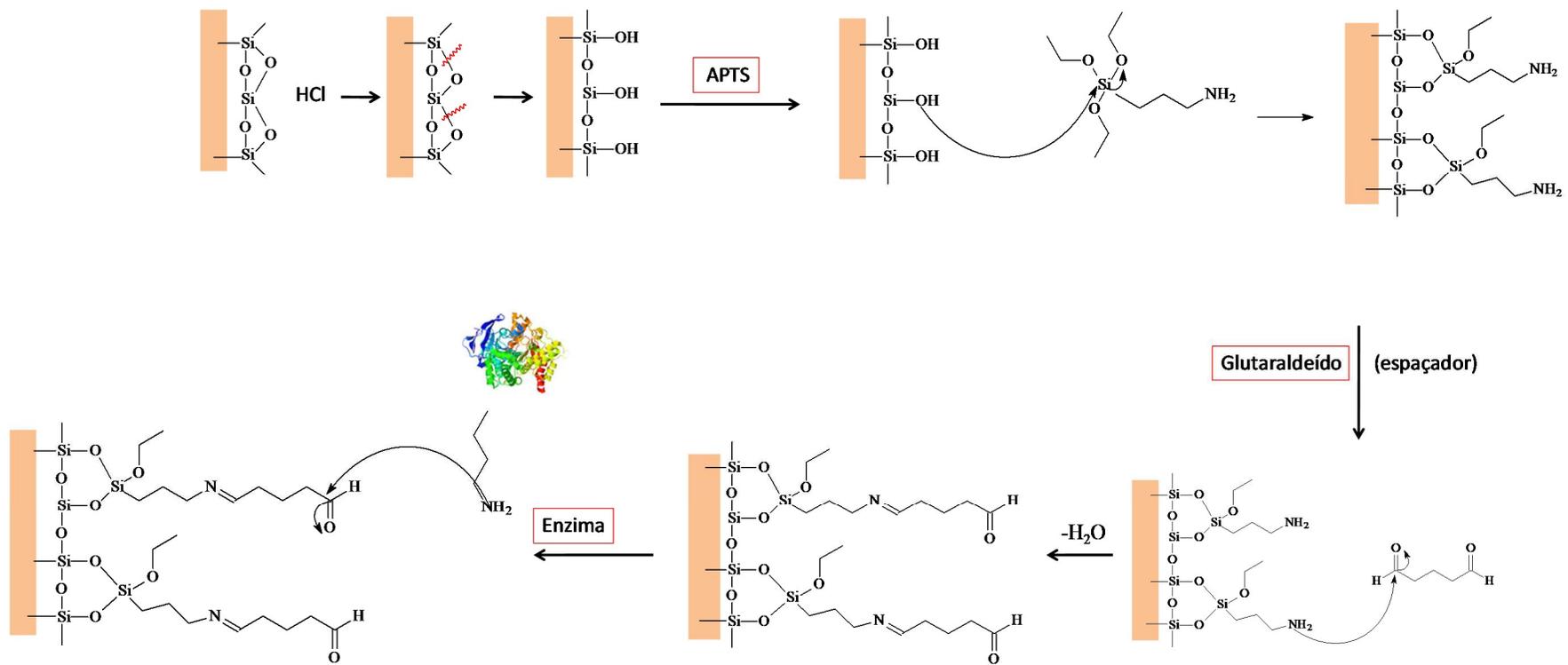


Figura 20. Exemplo de imobilização enzimática baseado em ligação covalente.
 Fonte: LIMA, 2018.

2.5 Docking Molecular

Com o desenvolvimento de melhores métodos teóricos computacionais, atualmente os estudos de modelagem molecular tornaram-se uma poderosa ferramenta na busca de novos fármacos. O método *in silico*, denominado como *docking* molecular, é um dos métodos mais aplicados nesse contexto. Com este método é possível realizar uma triagem virtual que tem como objetivo prever as orientações e conformações mais prováveis entre um ligante ancorado em determinado alvo, gerando uma estimativa da atividade do ligante com a proteína (KITCHEN et al., 2004; TROTT & OLSON, 2009). Essa afinidade, que tem dimensões energéticas, pode ser relacionada à atividade do ligante.

Segundo Verdonk e colaboradores (2003) os programas de *docking* molecular são formados por dois tipos de componentes: algoritmo de busca e função de pontuação. O que define a potencialidade de programas de *docking* molecular é a habilidade dos componentes em reproduzir os modos de ligação experimentais dos ligantes. O algoritmo de busca é um conjunto de comandos e procedimentos que é empregado na pesquisa de possíveis modos de ligação entre a proteína e o ligante. Já a função de pontuação (ou função de energia) avalia através dos valores de energia de ligação a aptidão da proteína pelo ligante. Mediante esses dois componentes é possível selecionar conformações ancoradas, onde quanto maior afinidade, mais interações estabilizantes entre ligante e a proteína, gerando valores mais baixos (PIERRI et al., 2010). Na figura 21 está exemplificado uma simulação de *docking* entre proteína AChE e ligante galantamina.

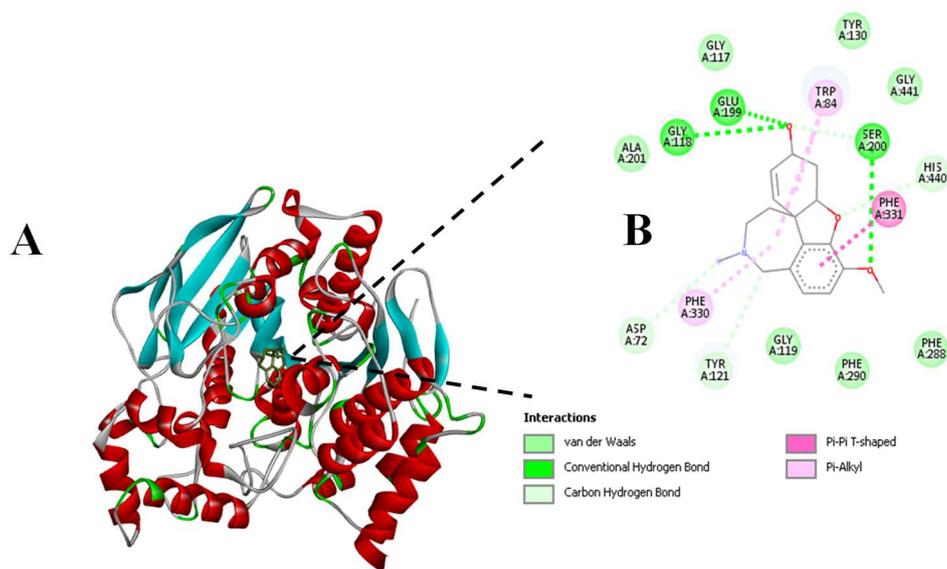


Figura 21. Exemplo de simulação de *docking* molecular. (A) Estrutura tridimensional da proteína com ligante; (B) Tipos de interações entre ligante e proteína.

Fonte: Arquivo pessoal

Diante disso, os estudos de *docking* são vistos como ferramentas computacionais úteis que auxiliam na triagem de novos ligantes. Na literatura tem sido crescente o uso dos dados de *docking* molecular para seleção de possíveis AChEIs. Segundo Bermúdez-Lugo e colaboradores (2011) a ancoragem, tem permitido melhorar a compreensão das interações no sítio ativo da AChE, possibilitando a triagem e o design de novos AChEIs. Em um trabalho realizado com alcaloides do esqueleto lycopodano a triagem virtual através da ancoragem molecular indicou aumento da potencialidade com a possibilidade de modificações estruturais (HALLDORSDDOTTIR et al., 2010). O acréscimo do potencial de inibição, monitorado por ancoragem molecular também foi observado nas modificações estruturais em alcaloides derivados do esqueleto quinazolinocarbolina (WANG et al., 2010).

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar potenciais inibidores de acetilcolinesterase (AChE) nas espécies *Onychopetalum amazonicum* e *O. periquino*, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer, além de contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero *Onychopetalum*.

3.2 Específicos

- ✓ Desrepliar os principais alcaloides presentes nas folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino* por meio das técnicas de LS-MS e HPLC-DAD-MS;
- ✓ Avaliar *in silico* (*docking* molecular) o potencial de inibição das substâncias desrepladas, bem como dos derivados planejados, frente à enzima AChE;
- ✓ Realizar semissíntese a partir dos alcaloides majoritários de *O. amazonicum* a fim de obter os derivados planejados com significativo potencial de inibição frente à enzima AChE;
- ✓ Realizar o isolamento dos derivados planejados;
- ✓ Caracterizar através de técnicas de RMN 1D/2D e MS as substâncias isoladas;
- ✓ Avaliar através do ensaio de ICER o potencial de inibição das substâncias isoladas e mecanismo de ação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solventes

Na obtenção das frações alcaloídicas foram utilizados solventes grau P.A. Todos os solventes utilizados para cromatografia e experimentos de MS foram comprados com grau de pureza HPLC da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), e a água deionizada foi obtida por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). As análises por RMN foram realizadas com solventes deuterados.

4.2 Análises cromatográficas

4.2.1 Cromatografia em coluna (CC)

Os fracionamentos cromatográficos em coluna de vidro foram realizados utilizando como fases estacionárias sílica gel 60 (230-400 mesh) e C18. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a natureza das amostras.

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises em HPLC analítico foram realizadas em cromatógrafo Acella[®] (Thermo Scientific) equipado com bomba Acella[®] Pump Plus, autoamostrador Acella[®] Autosampler Plus, válvula de injeção Rheodyne (25 µL), operando simultaneamente com detector de arranjo de diodos (DAD) Acella[®] PDA Plus Detector e MS (TSQ Quantum Access).

As análises em HPLC semi-preparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC[®] (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário), degaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 ou 500 µL).

4.3 Métodos espectroscópicos/espectrométricos

As análises por MS foram realizadas no LABCEM-UFAM e no Núcleo de Pesquisa em Cromatografia (Separare) da Universidade Federal de São Carlos. Os espectros foram obtidos através de espectrômetros do tipo *Íon-trap* (IT) (LCQ Fleet, Thermo scientific; esquire6000, Bruker Daltonics), triplo-quadrupolo (QqQ) (TSQ *Quantum* Access, Thermo scientific) ou Q-TOF (Impact HD, Bruker Daltonics). Os espectrômetros de massas foram equipados com fonte ESI, APCI ou *leaf spray* operando no modo positivo de aquisição.

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética (NMRLAB) da Central Analítica-UFAM. Os espectros de uma e duas dimensões (1D e 2D) foram obtidos em equipamento Bruker (Avance III HD), operando a 11,7 Tesla (T), observando ^1H a 500,13 e ^{13}C a 125,76 MHz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em metanol (CD_3OD) e clorofórmio (CDCl_3) deuterados. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.5 Desrepliação de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico das folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino*

4.5.1 Coleta e identificação do material botânico

O material foliar da espécie *O. periquino* foi coletado em maio de 2017 na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Acre (UFAC) em Rio Branco-Acre. A coleta foi realizada em parceria com Prof. Dr. Carromberth Fernandes - UFAC. A identificação foi realizada pelo o Prof. Dr. Marcos Silveira do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza UFAC, e sua exsicata foi depositada sob nº 7552 no Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal (LABEV-UFAC). As folhas de *O. amazonicum* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em março de 2014 de indivíduo previamente marcado (nº 163) e identificado durante a execução do projeto flora da Reserva Ducke (RIBEIRO et al., 1999). Sua exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o N °218341. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AE0F182. O material vegetal foi imediatamente seco a temperatura (20° C) ambiente durante 20 dias.

4.5.2 Análises de MS com fonte ambiente *Leaf spray* (LS-MS) das folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino*

A fim de verificar o perfil alcaloídico das folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino* foram realizadas análises utilizando a técnica de ionização ambiente por LS-MS. O sistema LS-MS foi desenvolvido no LABCEM-UFAM de acordo com metodologia descrita por SNEHA e colaboradores (2017). A fonte por ionização ambiente foi construída através da substituição da caixa da fonte por um conector padrão Db15. O reconhecimento da nova fonte foi realizado através do bloqueio das entradas 9 e 10 e a conexão de um resistor diretamente nas entradas 7 e 8 (Figura 22A).

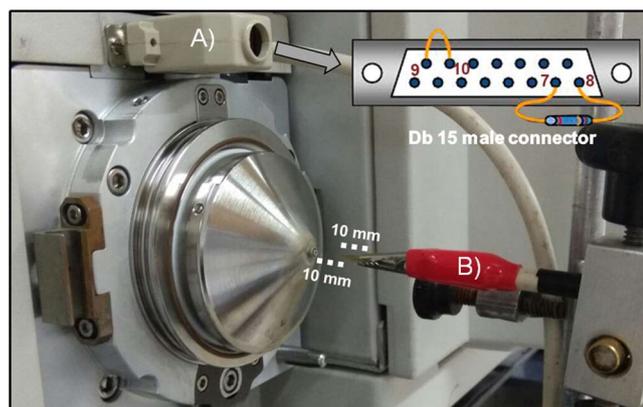


Figura 22. Fonte de ionização ambiente *Leaf Spray* (A) substituição da caixa por um conector Db15 (B) folha cortada em formato triangular (base e altura de 10 mm) mantida por um conector de alta voltagem.

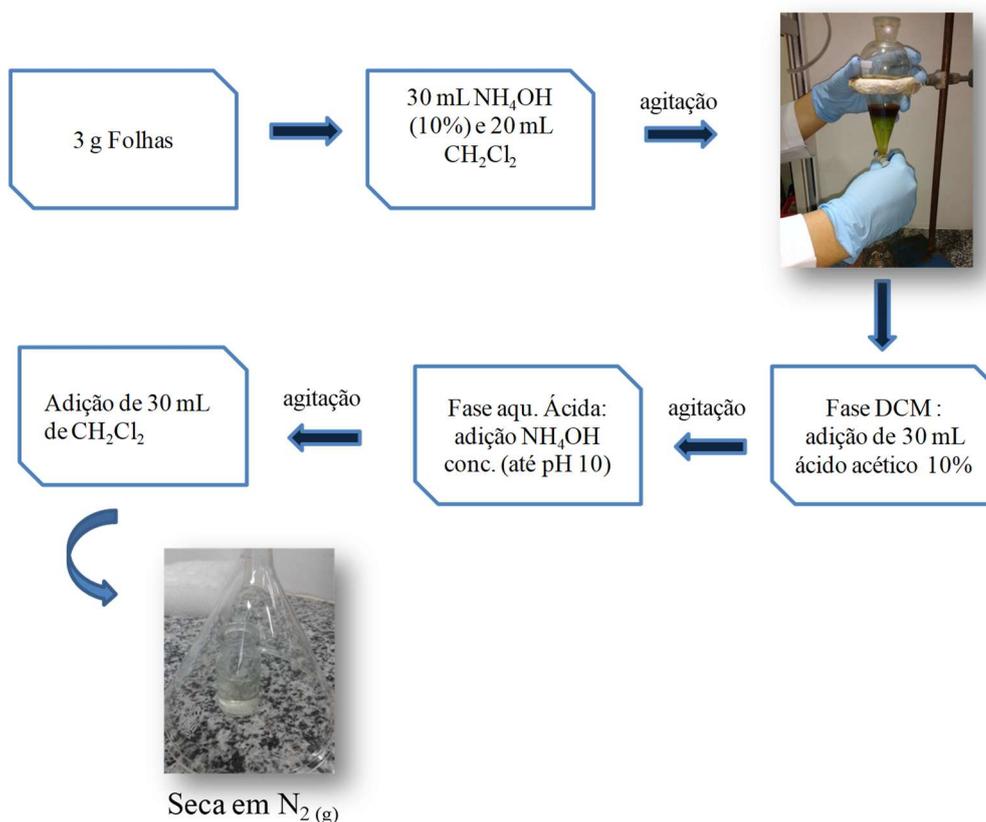
As folhas secas foram cortadas (base e altura de 10 mm) em formatos triangulares e mantidas em um clipe metálico a 10 mm de distância do capilar de transferência (Figura 22B). As análises de MS e MS/MS foram realizadas em um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo (QqQ) (TSQ *Quantum* Acess, Thermo scientific) e os espectros foram adquiridos no modo positivo de aquisição. Uma voltagem (4,5 kV) foi aplicada diretamente no tecido vegetal, logo após adição de 10 μ L de MeOH grau HPLC. A temperatura e voltagem do capilar utilizada foi de 150 $^{\circ}$ C e 85 V, respectivamente, com o monitoramento da faixa de massas: m/z 100-600. Para os experimentos de MS/MS, o argônio foi utilizado como gás de colisão com energias que variaram 20 a 30 eV.

4.5.3 Marcha química para obtenção de alcaloides

As frações alcaloídicas das duas espécies de *Onychopetalum* foram obtidas de acordo com metodologia descrita previamente na literatura (SOARES et al., 2015). A fração alcaloídica de *O. amazonicum* foi obtida conforme descrito a seguir: 500 mg de material vegetal (folhas) foram transferidos para um recipiente de vidro, adicionando-se 5 mL de hidróxido de amônio a 10% (NH_4OH) e 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), agitando-se em seguida. Após extração, a fase CH_2Cl_2 foi transferida para um funil de separação, acrescentando-se 5 mL de ácido acético a 10%. A fração aquosa ácida, foi tratada com hidróxido de amônio concentrado, até alcançar o pH 10, acrescentando-se em seguida 5 mL de CH_2Cl_2 . Após a extração, a fase orgânica foi separada e seca sob uma corrente gasosa de nitrogênio.

Para obtenção da fração alcaloídica das folhas de *O. periquino* foi necessário maior quantidade do material vegetal (esquema 1), sendo assim realizadas algumas modificações como descrito a seguir: 3g de material vegetal (folhas) foram transferidos

para um funil de separação, adicionando-se 30 mL de hidróxido de amônio a 10% (NH_4OH) e 30 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), agitando-se em seguida. A fase CH_2Cl_2 (mais densa) foi transferida para um funil de separação, acrescentando-se 30 mL de ácido acético a 10%. A fração aquosa ácida, foi tratada com hidróxido de amônio concentrado, até alcançar o pH 10, acrescentando-se em seguida 30 mL de CH_2Cl_2 . Após a extração, a fase orgânica foi separada e seca sob uma corrente de nitrogênio.



Esquema 1: Extração alcaloídica das folhas de *O. periquino*.

4.5.4 Análises de HPLC-DAD-MS/MS das frações alcaloídicas das folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino*

As frações alcaloídicas foram diluídas a 1 mg/mL em MeOH e analisadas (volume de injeção de 10 μL) em sistema de LC, modelo Acella® (Thermo Scientific), equipado com uma coluna Luna C18 (5 μm , 150 x 4,60 mm id) Phenomenex (Torrance, CA, EUA). Para a fração alcaloídica da espécie *O. amazonicum* foi utilizado uma fase móvel que consistia de uma solução aquosa acidificada (0,01% de ácido trifluoracético - TFA ou 1% de ácido fórmico) (A) e MeOH (B), enquanto para a fração alcaloídica da espécie *O. periquino* a fase móvel utilizada foi uma solução aquosa acidificada (0,1% de ácido fórmico) (A) e MeOH (B). Para ambas as amostras a eluição foi realizada através de um

gradiente de 20-80% de B ao longo de 14 min., seguido de 80% de B por 10 min, a um fluxo de 1 mL/min. Os espectros UV foram registrados na faixa de 200-400 nm.

A saída do detector de arranjo de diodos (DAD) foi conectada através de uma válvula de desvio (fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$) a um espectrômetro de massas tipo triplo-quadrupolo (QqQ) (TSQ *Quantum* Acess, Thermo scientific). A ionização foi realizada com a fonte APCI operando em modo positivo. As condições de ionização foram às seguintes: *discharge current*, 5 μA ; *vaporizer temperature*, 350 $^{\circ}\text{C}$; *capillary temperature*, 270 $^{\circ}\text{C}$; *sheath gas*, 35 psi; *aux gas*, 15 arb; *mass range*, m/z 100-800.

4.6 Prospecção de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico das folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino* como potenciais inibidores da AChE

4.6.1 Estudo de *docking* molecular dos alcaloides desreplcados nas folhas *O. amazonicum* e *O. periquino* e derivados benzilados

Os estudos de *docking* molecular foram realizados de acordo com metodologia previamente descrita (SANTOS et al., 2016). As estruturas 3D dos alcaloides desreplcados nas folhas de *O. amazonicum*, *O. periquino* e dos benzilados planejados a partir dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina (Figura 23) foram geradas e checados em relação ao estado protonado (pH 7.4) via *Marvin Sketch* (CHEMAXON, 2017). Em seguida, para verificar as estruturas otimizadas com menor energia, as estruturas foram tratadas pelo método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013) utilizando o software *MOPAC2016* (STEWART, 2016). As estruturas refinadas foram convertidas em arquivos PDBQT por meio da ferramenta *Autodock tools* (MORRIS et al., 2009). A estrutura cristalina tridimensional de *Torpedo californica* (*TcAChE*) complexada com galantamina foi recuperada no banco de dados de proteínas *Protein Data Bank* (PDB) (código: 1QTI) com resolução de 2,5 Å (BARTOLUCCI et al., 2001). O *grid box* foi definido em relação ao sítio ativo ocupado pelo ligante, utilizando os parâmetros *size X* = 28, *size Y* = 28 e *size Z* = 26. Finalmente, o procedimento de *docking* molecular foi realizado através do software *AutodockVina* (TROTT & OLSON, 2009). Os resultados foram processados através do software *Discovery Studio* (DISCOVERY STUDIOVISUALIZER, 2016).

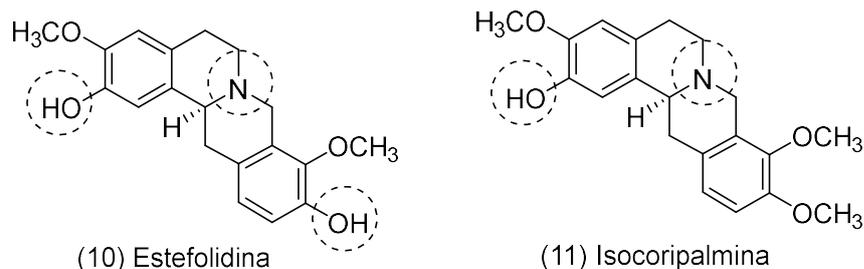
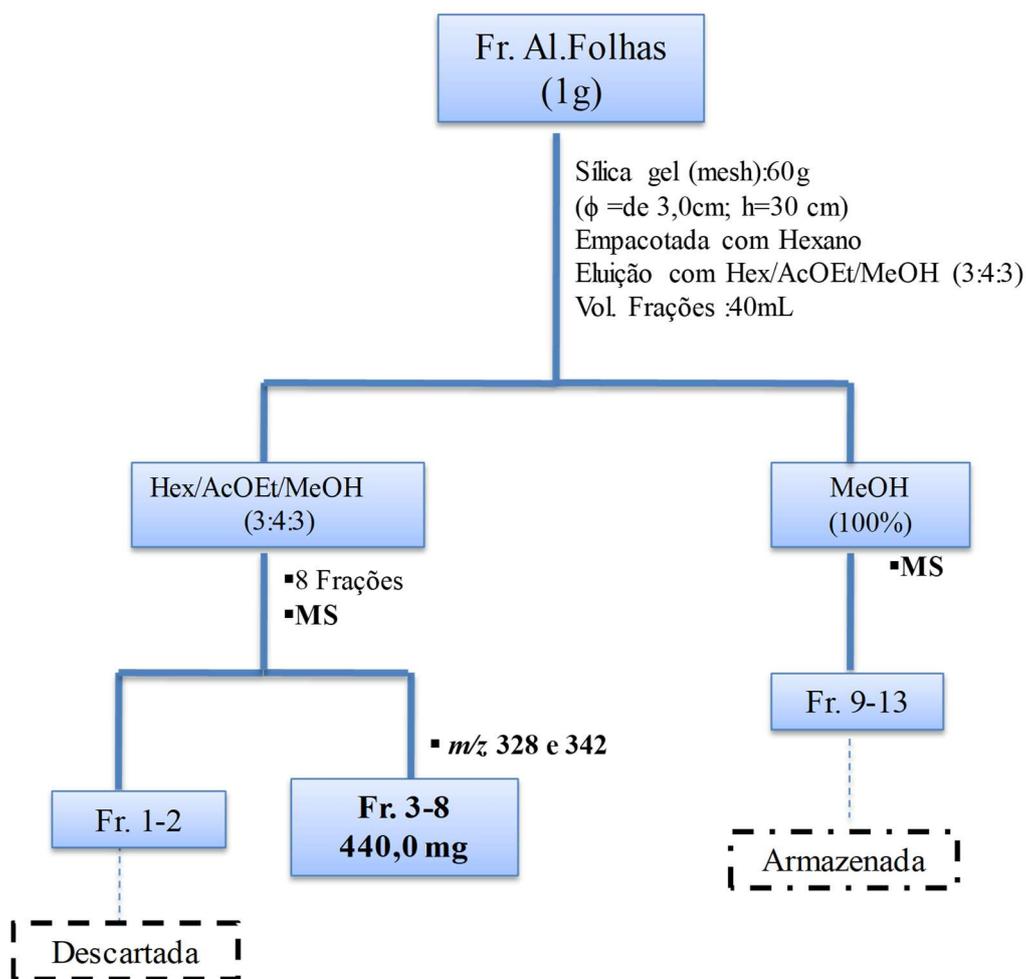


Figura 23. Estrutura dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina e seus prováveis sítios de benzilação.

4.6.2 Obtenção da mistura estefolidina e isocoripalmina a partir da fração alcaloídica das folhas de *O. amazonicum*

A fração alcaloídica das folhas de *O. amazonicum* foi obtida de acordo com a metodologia previamente descrita (LIMA, 2015). Cerca 300 g de folhas trituradas foram maceradas com 2L de NH_4OH 10% e 2L de CH_2Cl_2 por 72h. Em seguida a fase orgânica foi transferida para um funil de separação e extraída com solução de ácido acético 10% (2x 500mL). Posteriormente, a camada aquosa ácida obtida foi ajustada com NH_4OH (concentrado) até pH 10 e extraída com 600 mL de DCM. A fase DCM final, contendo a fração alcaloídica, foi concentrada em um evaporador rotativo, seca em um dessecador e pesada (1,36 g).

Cerca de 1g da fração alcaloídica foi cromatografada em coluna aberta conforme ilustrado no esquema 2. Após análises por espectrometria de massas, as frações 3-8, contendo a mistura dos compostos majoritários estefolidina e isocoripalmina foram reunidas, resultando na nova fração rica em alcaloides tetrahidroprotoberberínico (FRAT) (440 mg), sendo esta encaminhada para análise de RMN e posteriormente para procedimento de semissíntese.



Esquema 2: Representação do estudo químico da fração alcaloídica das folhas de *O. amazonicum*.

4.6.3 Benzilação da mistura dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina

O procedimento de benzilação foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFAM sob a supervisão do Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

Os compostos benzilados foram preparados seguindo um método sintético adaptado em uma etapa (KARIMOVA et al., 2014). A FRAT (0,44 g) foi adicionado a um balão de fundo redondo contendo KOH (0,56 g) e DMF (10 mL). A mistura resultante foi agitada e aquecida (40 °C) durante 30 min e depois foi adicionado brometo de benzila (1,2 mL). Após 24h, a mistura foi particionada com água destilada (20 mL) e diclorometano (20mL). A fração benzilada diclorometânica (BFD) (0,7 g) foi seca sob uma corrente gasosa de nitrogênio, enquanto a fração benzilada aquosa (BFA) (1,4g) foi liofilizada.

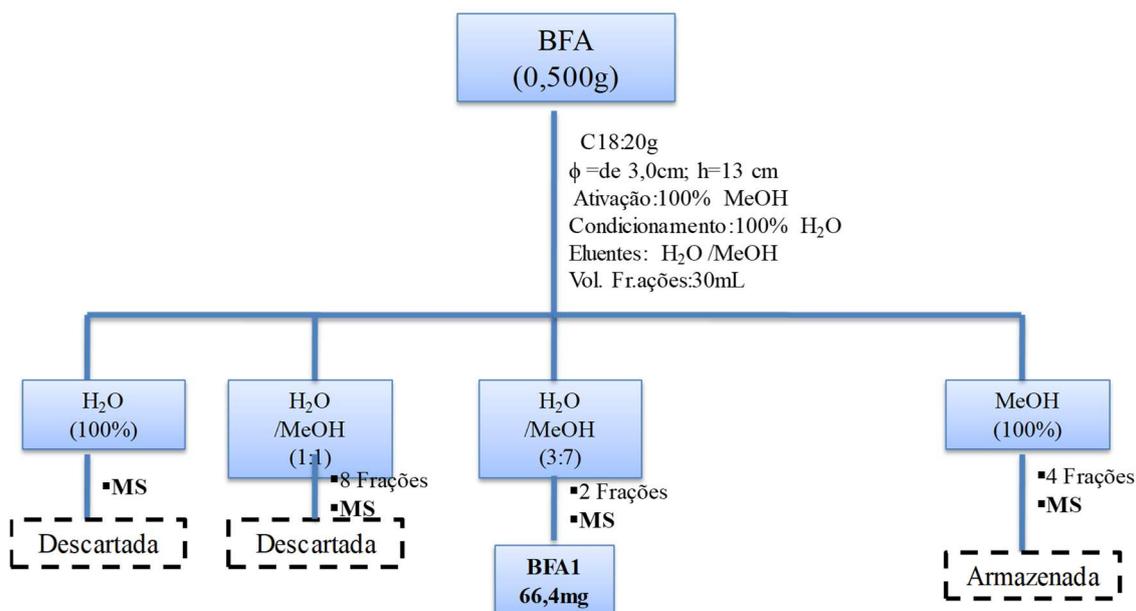
4.6.4 Análises por ESI-MS/MS e HPLC-MS das frações BFA e BFD

As duas fases obtidas a partir da benzilação alcaloídica (BFA e BFD) foram diluídas a concentração de 10 ppm em metanol grau HPLC, sendo os espectros de *full scan* obtidos por inserção direta em espectrômetro de massas *Ion trap* modelo LCQ Fleet (Thermo scientific) equipado com fonte de ESI e operando em modo positivo de aquisição. A faixa de massa analisada foi de m/z 100-800. Os espectros de MS/MS foram obtidos com energias de colisão entre 20 e 30 % utilizando o gás hélio para colisão.

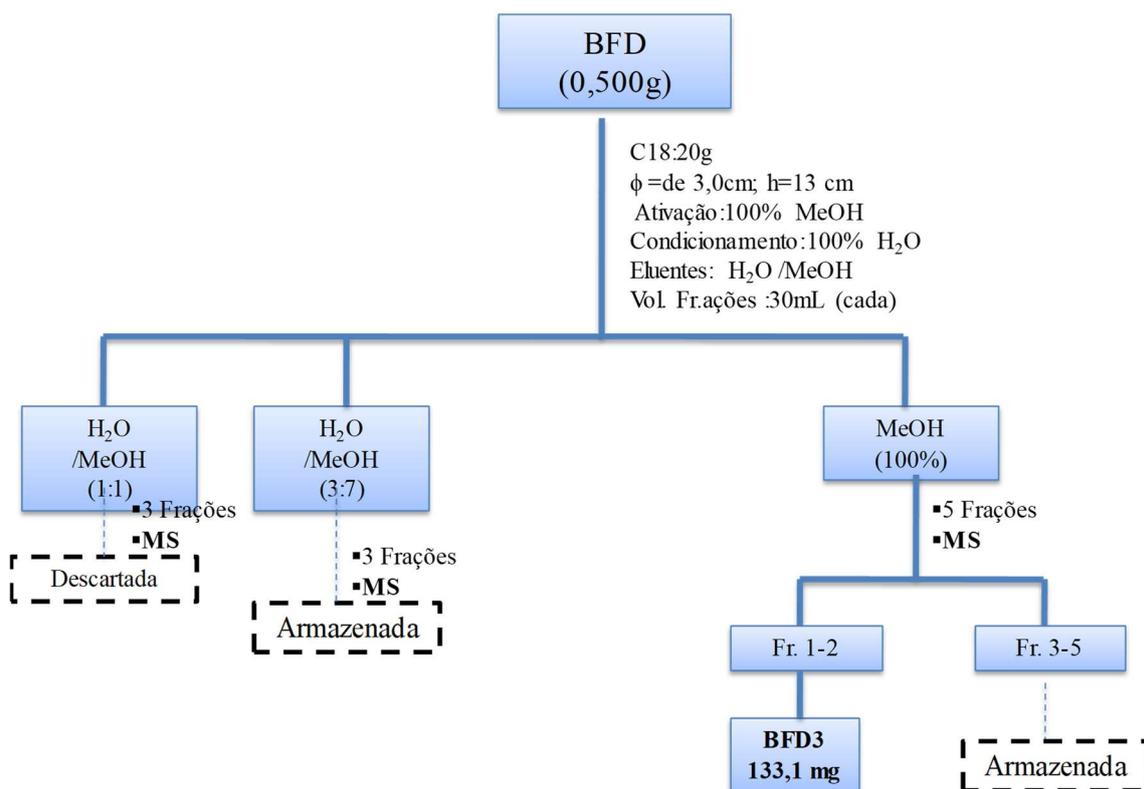
Para a análise de HPLC-DAD-APCI-MS das fases aquosa e CH₂Cl₂ utilizou-se um sistema HPLC, modelo Acella® (Thermo Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Acess (Thermo scientific), dotado de uma fonte de APCI (modo positivo) e monitorando a faixa de m/z 100-1000. As amostras foram solubilizadas, individualmente, com 1 mg/mL em H₂O (Milli-Q) na fração de BFA e 1 mg/mL em MeOH na fração de BFD. Ambas foram analisadas (com 10 µL volume de injeção) com uma coluna Luna C18 (5 µm, 150 x 4,60 mm id) Phenomenex (Torrance, CA, EUA). A fase móvel utilizada consistia de uma solução aquosa de ácido fórmico a 0, 2% (A) e MeOH (B). O gradiente de eluição foi de 20 – 50 % (B) 7 min, 50-80 % (B) 10 min, seguido de 10 min a 80 % de (B). O detector DAD foi ajustado para o monitoramento entre 200-400 nm.

4.6.5 Fracionamento cromatográfico dos derivados benzilados

Com intuito de remover interferentes e substâncias indesejadas, as amostras foram submetidas a um fracionamento em coluna aberta. Cerca de 0, 500 g de BFA (esquema 3) e BFD (esquema 4) separadamente foram tratados em uma coluna com cerca de 20 g de C18, sendo utilizado como fase móvel água (Milli-Q) e metanol (grau HPLC). Logo após as frações obtidas foram submetidas a fracionamento cromatográfico semi-preparativo.



Esquema 3: Fracionamento em coluna C18 da fração aquosa (BFA) do produto da benzilação dos alcaloides de *O. amazonicum*.



Esquema 4: Fracionamento em coluna C18 da fração em diclorometano (BFD) produto da benzilação dos alcaloides de *O. amazonicum*.

Após escalonamento adequado do método utilizado em escala analítica, as frações benziladas BFA1 (66,4 mg) e BFD3 (133,1 mg) foram submetidas ao fracionamento semi-preparativo em um cromatógrafo Shimadzu[®]. As amostras foram solubilizadas, individualmente, com 100 µL H₂O (Milli-Q) na fração BFA e 100 µL DMSO na BFD. Em cada injeção foi utilizada uma carga máxima na coluna de 20 mg em um *looping* de 100µL. Nesta etapa utilizou-se uma coluna Luna C18 (5 µm, 250 x 10.00 mm) Phenomenex com fluxo de 3,5 mL/min, sendo monitorados os comprimentos de onda 235 e 280nm. As fases móveis, assim como gradiente de eluição, foram às mesmas utilizadas no item 4.6.4. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas, sendo posteriormente encaminhadas as mais promissoras para análises de RMN 1D e 2D, Alfa-D e massas de alta resolução.

4.6.6 Ensaio enzimático *in vitro*

Para avaliação inibitória foram selecionados os alcaloides benzilados isolados, os precursores (estefolidina e isocoripalmina) e aporfínico nornuciferina, sendo codificados AM01 a AM09. A atividade inibitória dos alcaloides selecionados foi avaliada contra a enzima AChE utilizando-se o ensaio enzimático *in vitro* on-line, o qual se baseia no uso da AChE imobilizada na parede interna de capilares de sílica fundida, AChE-ICER. Os ensaios foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Cromatografia (Separare) da Universidade Federal de São Carlos, sob supervisão da Profa. Dra. Quezia Cass, seguindo a metodologia já estabelecida pelo grupo de pesquisa (SILVA et al., 2013; VANZOLINI et al., 2013a; VILELA et al., 2018).

4.6.6.1 Imobilização da enzima AChE no capilar

4.6.6.1.1 Tratamento do capilar

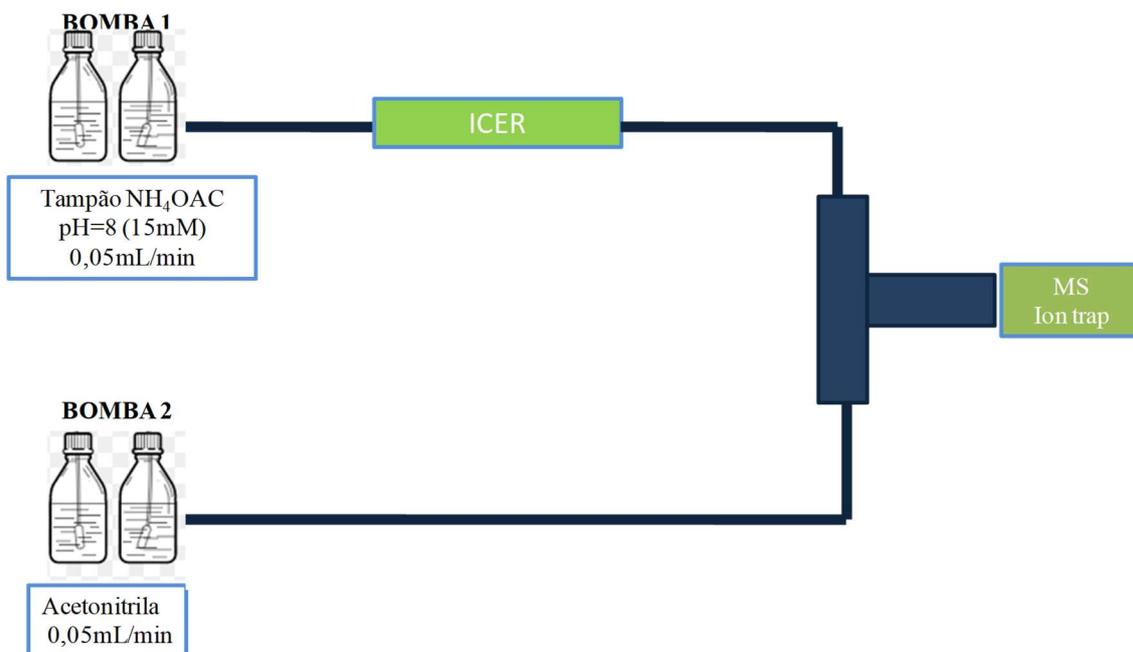
O capilar de sílica fundida (0,10 mm d.i x 0,375 mm) foi tratado com 2,5 mL de HCl 2 M, seguido de 1 mL de água. O capilar foi colocado na estufa por 1h a 95°C e posteriormente tratado com 1 mL da solução 3-aminopropiltriétoxissilano -APTS (10%), preparado com água. Em seguida, o capilar permaneceu na estufa a 95°C por 30 min, e foi levado a temperatura ambiente por 12 h. Todas as soluções foram eluídas com auxílio de uma bomba seringa e a uma vazão de 130 µL.min⁻¹.

4.6.6.1.2 Imobilização da AChE

Após o tratamento do capilar foi realizado a imobilização da enzima, para isso utilizou-se a enzima de peixe elétrico-*ee*/AChE (Sigma, Merck -código C3389). Inicialmente, à $130 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ foi eluído 1,5 mL de glutaraldeído (1% KH_2PO_4 50 mM pH 7,4), seguido de 2 mL da solução de fosfato (KH_2PO_4 50 mM pH 7,4). A solução enzimática (2U/mL preparada em KH_2PO_4 50 mM pH 7,4) foi eluída no capilar em $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (3x 0,5 mL). Posteriormente o ICER-*ee*/AChE foi lavado com 1mL de tampão TRIS-HCl (100 mM pH 8,0) e estocado com as extremidades imersas em tampão TRIS-HCl (100 mM pH 8,0) a 4°C .

4.6.6.2 Sistema *on line* HPLC-MS

O sistema de HPLC-MS é representado no esquema 5, para montagem desse sistema foi utilizado um cromatógrafo modelo SHIMADZU PROMINENCE composto por duas bombas LC-20AD e um auto injetor SIL-20A, acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap, modelo Esquire6000 (Bruker Daltonics), equipado com uma fonte de ionização ESI. Empregou-se uma solução tampão de acetato de amônio (NH_4OAc 15 mM, pH8), com uma vazão de 0,05 mL/min (bomba1). Uma segunda bomba (bomba 2) forneceu acetonitrila após o ICER-AChE*eel* e antes do espectrômetro de massas ao longo de uma conexão em forma de “T”, com a mesma vazão utilizada na bomba1. O tempo total de análise foi de 6 min, utilizando um volume de injeção de 10 μL . Os parâmetros do MS foram: voltagem do capilar: -3172 V; pressão do gás de nebulização (N_2): 30 psi; vazão de secagem nebulização (N_2): $7.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; temperatura da fonte de ionização: 340°C . As análises foram realizadas no modo positivo de ionização (scan de m/z 40-550), com monitoramentos dos íons referente à acetilcolina (ACh) $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 146 e $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 104, este último referente ao produto da clivagem enzimática, colina (Ch).



Esquema 5: Esquema de representação do sistema on-line HPLC-MS utilizado no ensaio enzimático *in vitro* para atividade anticolinesterase.

4.6.6.3 Estudo cinético para o ICER-*eelAChE*

O parâmetro cinético, constante de Michaelis-Menten (K_M), foi determinado para o ICER-*eelAChE* a partir de estudos do estado estacionário. Para isso, foram preparadas soluções estoques de ACh (25, 50, 100, 225, 350, 500, 750, 1250 e 1750 μM). As amostras foram preparadas pipetando-se 80 μL NH_4OAc (15 mM, pH8), 10 μL de MeOH e 20 μL da solução estoque de ACh. As amostras foram preparadas em duplicatas. O valor da constante foi então obtida aplicando-se uma análise de regressão não linear (GraphPad Prisma5) com a plotagem do área da colina produzida versus cada concentração do substrato acetilcolina correspondente.

4.6.6.4 Inibição usando o ICER-*eelAChE*

Para o ensaio de inibição a galantamina foi utilizada como referência, uma vez que é um alcaloide inibidor de AChE (DARVESH et al., 2003). Inicialmente, uma triagem foi realizada sob concentração fixa de 100 μM do candidato a inibidor e 70 μM de ACh. As amostras para ensaio foram preparadas pipetando-se 10 μL da solução estoque do candidato ao inibidor (1 mM em MeOH), 20 μL de ACh 350 μM (NH_4OAc pH 5) e 70 μL de NH_4OAc (15 mM pH 8). Para cada candidato analisado foi testada uma atividade controle (na ausência do mesmo). A solução de atividade controle foi preparada pipetando-se 10 μL de MeOH, 20 μL de ACh 350 μM (NH_4OAc pH 5) e 70 μL de

NH₄OAc (15 mM pH 8). O ensaio foi realizado em duplicata para cada candidato a inibidor testado. A % de inibição foi calculada para cada amostra de acordo com equação 1 (VILELA et al., 2018).

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \frac{P_i}{P_0} \right] \times 100 \text{ equação 1}$$

Onde, P é referente à área de Ch produzida: (i) na presença do candidato a inibidor; (0) na ausência do candidato a inibidor. Os candidatos que apresentaram % de inibição maior que 90% foram selecionados para determinação da concentração inibitória (IC₅₀).

4.6.6.5 Determinação da capacidade inibitória

Para determinação de IC₅₀ foram calculados de acordo com Ch produzida pela hidrólise catalítica da ACh (100 μM 2 x K_m) nas diferentes concentrações dos candidatos selecionados (1 μM a 500 μM). Para os ensaios as amostras selecionadas (AM01 e AM02) foram preparadas com 20 μL de ACh 500 μM, 70 μL de NH₄OAc (15 mM pH8) e as concentrações crescentes 10 μM a 5000 μM dos candidatos. A solução de atividade controle utilizada foi preparada com 10 μL de MeOH, 20 μL de ACh 500 μM (NH₄OAc pH5) e 70 μL de NH₄OAc (15 mM pH8). Foi calculado também IC₅₀ do alcaloide de referência, galantamina. Todas as análises foram realizadas em duplicata e calculou-se a % I de acordo com equação 1. Os valores de IC₅₀ foram então obtidos aplicando-se uma análise de regressão não linear (GraphPad Prisma5) com a plotagem do % de inibição individual versus cada concentração do candidato a inibidor correspondente em escala logarítmica.

4.6.6.6 Determinação da constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação no ICER-AChE

O mecanismo de ação e a constante de inibição no estado estacionário (K_i) também foram determinados para os derivados AM01 e AM02. Para esse fim, a atividade AChE-ICER foi avaliada sob diferentes concentrações de ACh variando de 10 a 150 μM, sob concentrações fixa de cada um dos derivados AM01 e AM02 (0, 10, 50 e 75 μM). Gráficos Lineweaver-Burk foram usados para determinar o mecanismo de ação dos inibidores. Os valores de K_i foram determinados a partir do replot da inclinação das parcelas de Lineweaver-Burk versus a concentração de derivada respectiva.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desreplicação de alcaloides derivados de esqueleto isoquinolínico das folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino*

A fim de investigar o perfil alcaloídico da espécie *O. periquino* e ampliar o conhecimento do perfil da espécie *O. amazonicum*, o material foliar de ambas foi submetido as análises por LS-MS e suas respectivas frações alcaloídicas foram submetidas a análises de HPLC-DAD-MS/MS.

5.1.1 Estudo do perfil químico por LS-MS da *O. amazonicum*

O estudo do perfil químico de *O. amazonicum* realizado por LS-MS (Figura 24) permitiu observar a presença de íons de m/z 328 (100% de abundância relativa), 342 (64%), 282 (47%), 266 (24%), 326 (19%), 312 (20%), 296 (12%), 330 (12%), 286 (8%) e 280 (5%), todos os valores de m/z par, um indicativo de possíveis alcaloides protonados.

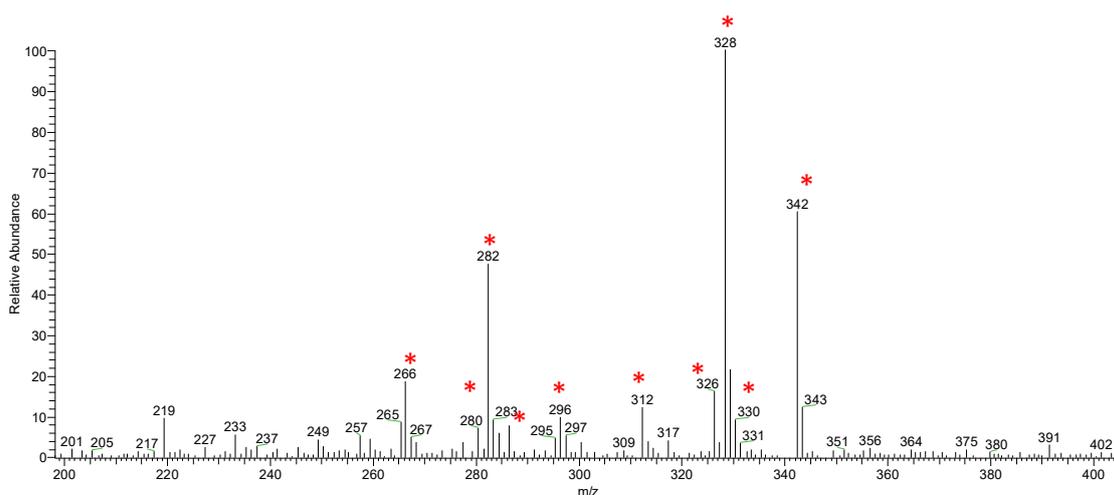


Figura 24. Perfil LS-MS das folhas de *O. amazonicum*

Os espectros de LS-MS/MS dos íons de m/z 328 e 342 (Figura 25) apresentaram altas perdas de massas gerando o fragmento de m/z 178, comumente observadas em alcaloides tetrahydroprotoberberínicos (SOARES et al., 2015a; LIMA, 2015). Na figura 26 estão reportadas as propostas de fragmentações para esses íons. O fragmento de m/z 178 consiste em um produto formado através de uma abertura do anel C via retro-Diels-Alder (RDA) dos alcaloides tetrahydroprotoberberínicos, contendo grupos metoxilas e hidroxilas no anel A (JEONG et al., 2012; DEMARQUE et al., 2016). Além disso, a perda de 150 Da (precursor de m/z 328) sugere a presença de grupos metoxila e hidroxila no

anel D, enquanto a perda de 164 Da (precursor de m/z 342) está de acordo com duas metoxilas no anel D. Os mesmos perfis de fragmentações foram observados anteriormente para os alcaloides estefolidina (**10**) e isocoripalmina (**11**), identificados como compostos majoritários na fração alcaloídica de *O. amazonicum* (LIMA, 2015) (Figura 13).

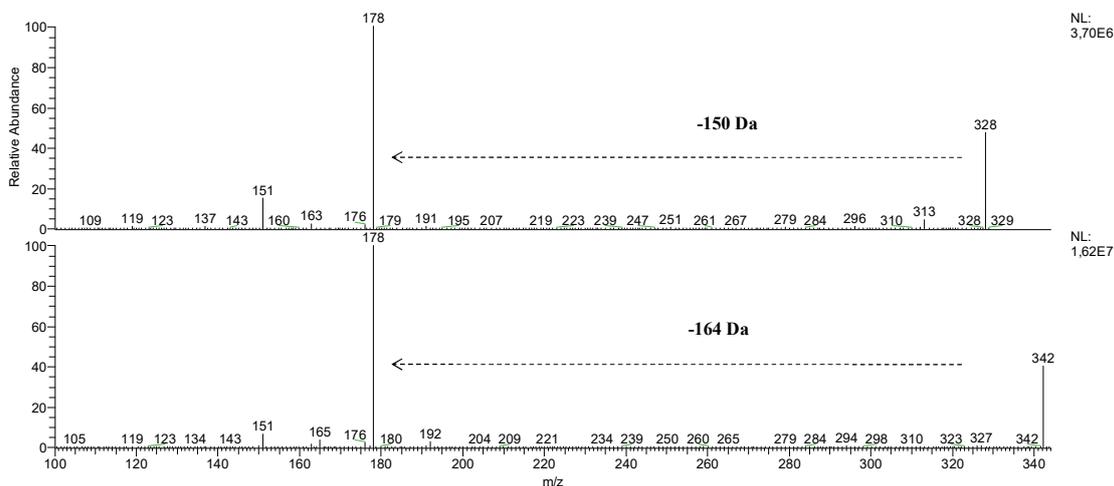
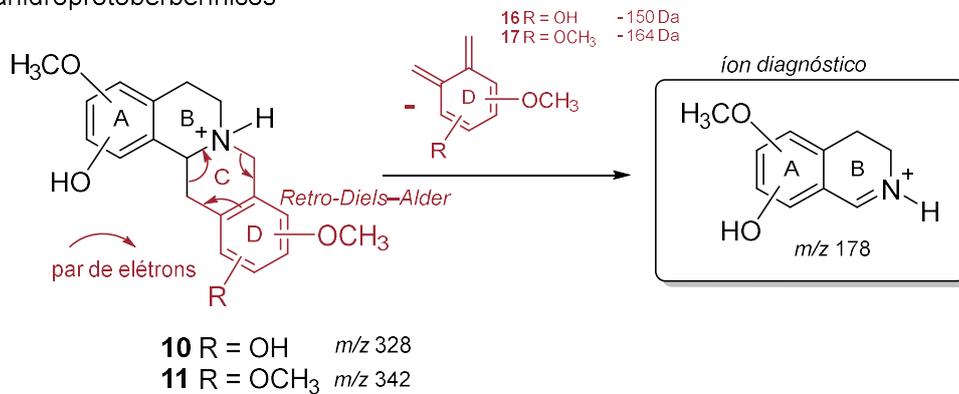


Figura 25. Espectro LS-MS/MS dos íons de m/z 328 e 342 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de *O. amazonicum*.

Similarmente, nos espectros de LS-MS/MS de m/z 330 e 286 (Figura 27), os picos base de m/z 192 (precursor de m/z 330) e 107 (precursor de m/z 286) foram previamente associados com esqueleto benziltetraidroisoquinolínico com e sem o grupo *N*-metil, respectivamente. A presença ou ausência desse grupo neste tipo de esqueleto influencia diretamente o padrão de fragmentação. O íon de m/z 192 está de acordo com a presença de grupos metoxila e hidroxila no anel A, enquanto o íon de m/z 107 está de acordo com a presença de um grupo hidroxila no anel C (SCHMIDT et al., 2005; SHANGGUAN et al., 2018) (Figura 26). Por outro lado, a perda de 138 Da (precursor de m/z 330) e 179 Da (precursor de m/z 286) sugere a presença dos grupos metoxila e hidroxila nos anéis C e A respectivamente. Essas perdas são consistentes com o perfil de fragmentação dos alcaloides reticulina (**24**) (SOARES et al., 2015) e norjuzifina (**25**) (LIMA, 2015).

A) Tetrahidroprotoberberínicos



B) Benziltetraidroisoquinolínicos

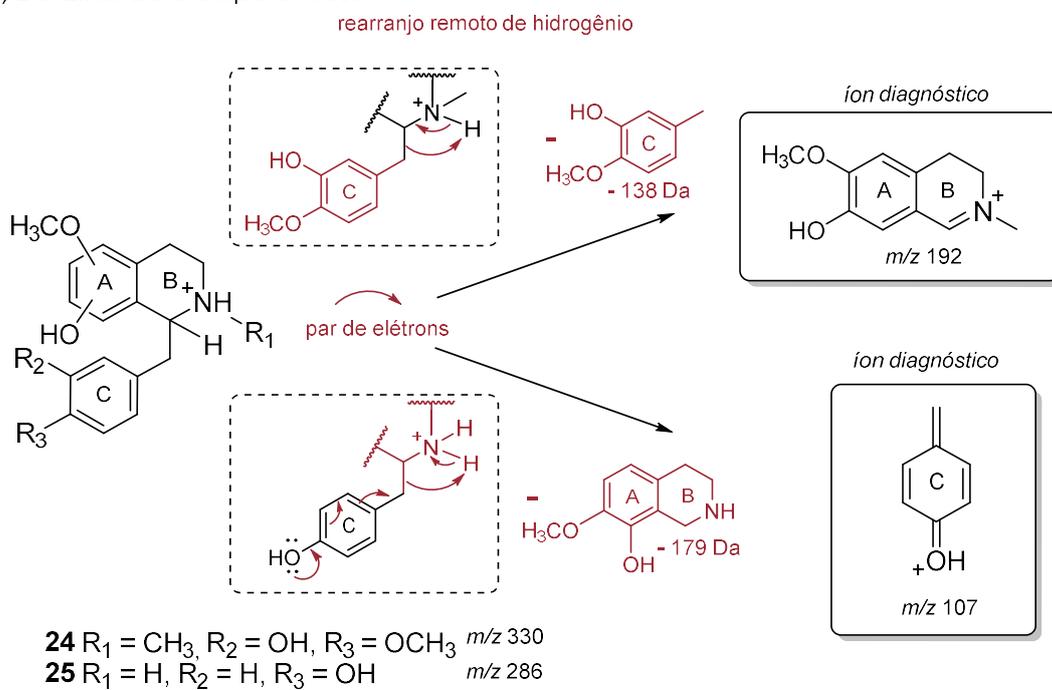


Figura 26. Propostas de fragmentações para os íons de m/z 342, 328, 330 e 286 observados em LS-MS/MS das folhas *O. amazonicum*.

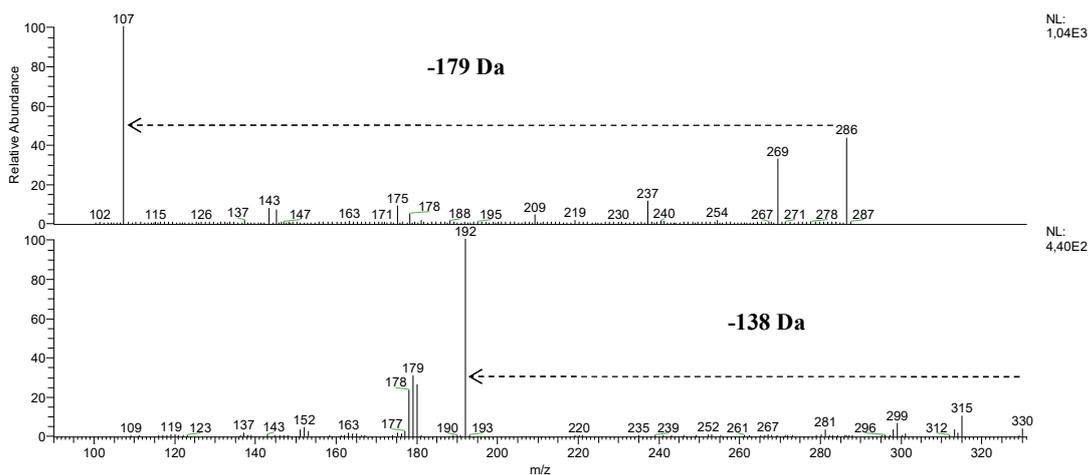


Figura 27. Espectro LS-MS/MS dos íons de m/z 330 e 286 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de *O. amazonicum*.

Os espectros de LS-MS/MS dos íons de m/z 282, 296, 312 e 326 (Figura 28) apresentaram padrões de fragmentação consistentes com alcaloides aporfínicos com presença (perda de 31 Da) ou ausência (perda 17 Da) do grupo *N*-metila. Suas perdas foram atribuídas a 17 Da ($-NH_3$) (m/z 282 \rightarrow 265 e m/z 312 \rightarrow 295) ou 31 Da ($-NH_2CH_3$) (m/z 296 \rightarrow 265 e m/z 326 \rightarrow 295) seguido por perdas competitivas de 15 Da ($-CH_3$) (m/z 265 \rightarrow 250 e m/z 295 \rightarrow 280) e 31 Da ($\cdot OCH_3$) (m/z 265 \rightarrow 234 e m/z 295 \rightarrow 264), confirmando a presença de metoxilas adjacentes no anel A (STÉVIGNY et al., 2004; SILVA et al., 2012b; SOARES et al., 2015a) (Figura 29). Portanto, os padrões de fragmentação observados para os íons m/z 282, 312, 296 e 326 são consistentes com os alcaloides nornuciferina (**26**), *O*-metilisopilina (**27**), nuciferina (**28**) e *N*-metil-*O*-metilisopilina (**29**), respectivamente. Podemos destacar os alcaloides nuciferina e *N*-metil-*O*-metilisopilina relatado pela primeira vez na espécie.

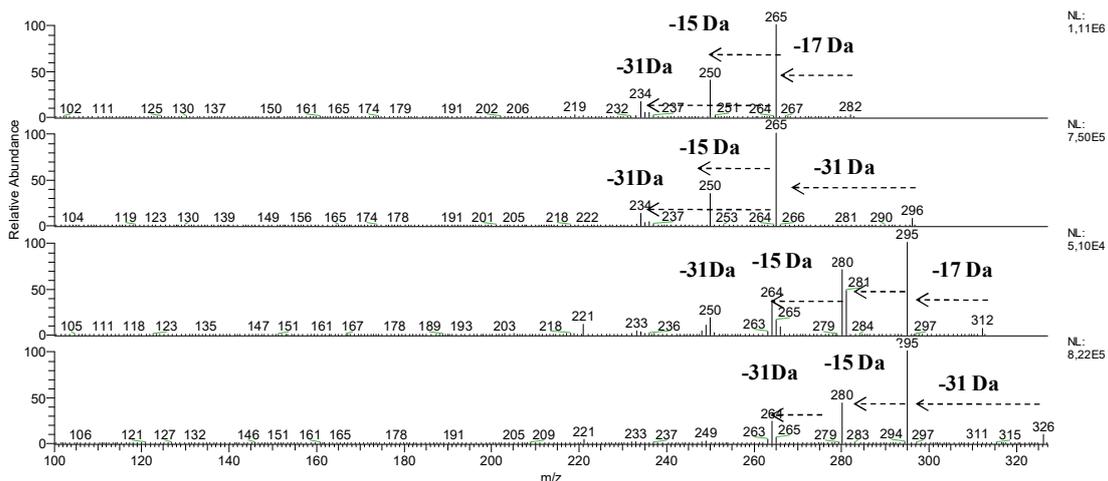


Figura 28. Espectro LS-MS/MS dos íons de m/z 282, 296, 312 e 326 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de *O. amazonicum*.

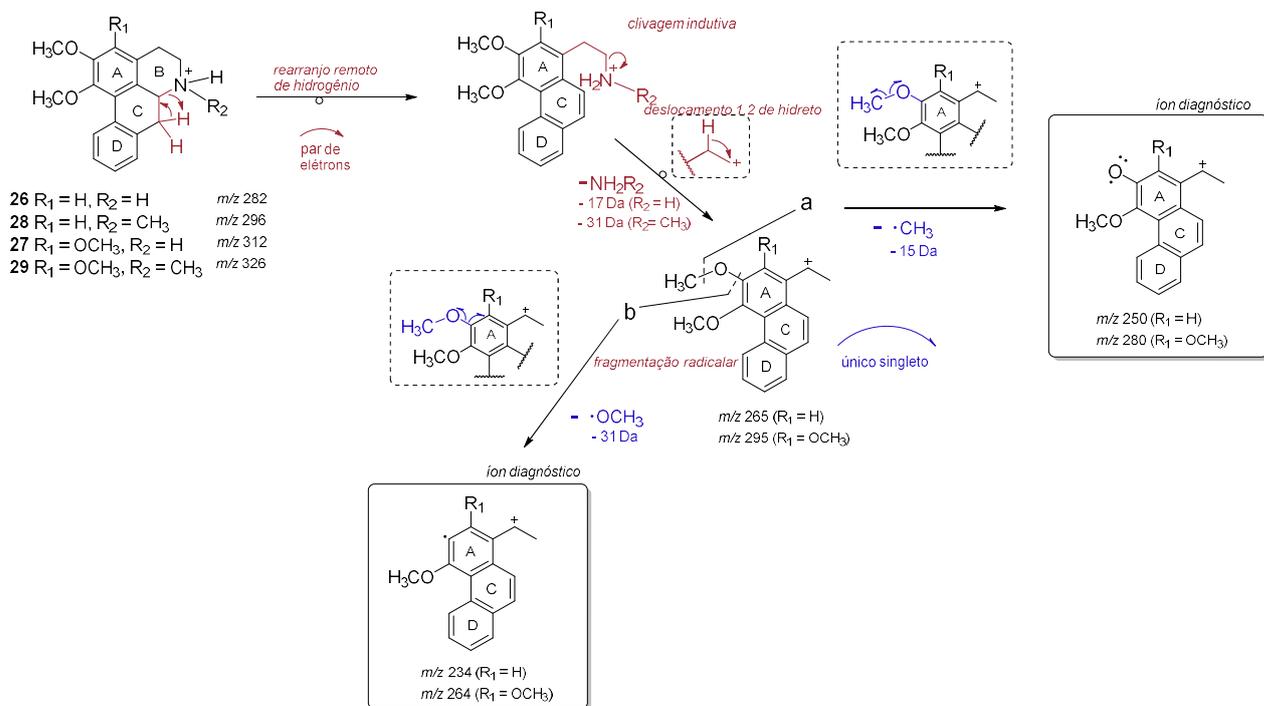


Figura 29. Propostas de fragmentações para os íons de m/z 282, 296, 312 e 326 observados em LS-MS/MS das folhas *O. amazonicum*.

Os espectros de LS-MS/MS das moléculas protonadas de m/z 266 e 280 (Figura 30) apresentaram fortes evidências de esqueletos aporfínicos contendo uma ponte metilenodioxí no anel A e ausência (perda 17 Da) ou presença (perda de 31 Da) do grupo *N*-metila, respectivamente (STÉVIGNY et al., 2004). A perda inicial de 17 Da ($-NH_3$) (m/z 266 \rightarrow 249) ou 31 Da ($-NH_2CH_3$) (m/z 280 \rightarrow 249), seguida por perdas subsequentes de 30 Da (CH_2O) (m/z 249 \rightarrow 219) e 28 Da ($-CO$) (m/z 219 \rightarrow 191), observadas em ambos os espectros, reforçam a proposta estrutural (Figura 31). Portanto, os padrões de fragmentações observados são consistentes com alcaloides aporfínicos anonaina (**30**) (SILVA et al., 2012b; SOARES, et al., 2015a; LIMA, 2015) e sua forma *N*-metil, *N*-metilanonaina (**31**).

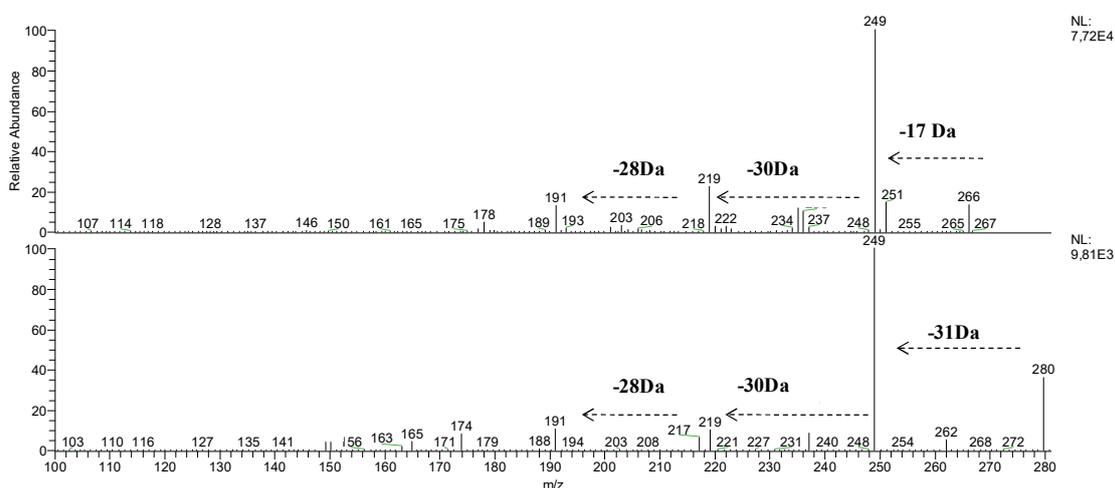


Figura 30. Espectro LS-MS/MS dos íons de m/z 266 e 280 ($[M+H]^+$) presentes nas folhas de *O. amazonicum*

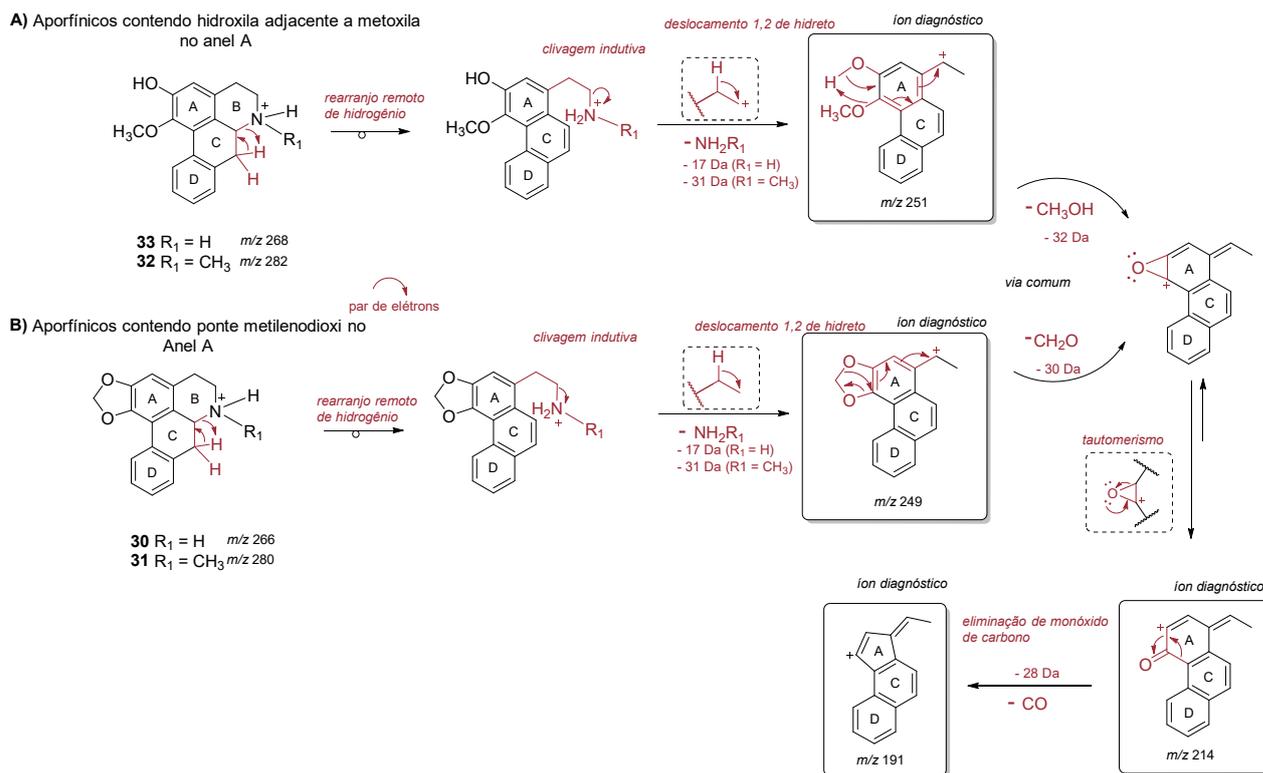


Figura 31. Proposta de fragmentação para alcaloides aporfínicos encontrados na espécie *O. amazonicum* com (A) hidroxila e metoxila adjacentes e (B) ponte metilenodioxí no anel A.

Assim, o perfil alcaloídico por LS-MS, permitiu a identificação provisoriamente de 10 alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico, com tetrahidroprotoberberínicos e aporfínicos como os principais compostos. Podendo caracterizar os alcaloides nuciferina, *N*-metilanonaina, *N*-metil-*O*-metilisopilina e reticulina, ainda não reportados na espécie. No entanto, deve-se notar que o reconhecimento de compostos isobáricos e minoritários na análise direta de MS, pode ter sido comprometido pelo efeito de matriz (LIN et al., 2010) sendo necessária a análise de HPLC-DAD-MS/MS para uma investigação mais abrangente.

5.1.2 HPLC-DAD-MS/MS da fração alcaloídica de *O. amazonicum*

O cromatograma de íons totais (TIC do inglês *Total Ion Chromatogram*) (Figura 32) da fração alcaloídica das folhas de *O. amazonicum* foi coerente com os dados de LS-MS (Tabela 2). Assim, os íons mais intensos reportados pelo LS-MS, alcaloides tetrahidroprotoberberínicos de m/z 328 e 342, foram atribuídos aos principais picos **I** (T_R 4,61 min) e **IV** (T_R 6,14 min) na análise de HPLC-DAD-MS. Os alcaloides aporfínicos não *N*-metilados de m/z 282, 266 e 312 foram observados com picos **X**, **XI** e **XIII** (T_R

9,03, 9,38 e 10,27 min, respectivamente), enquanto os seus homólogos *N*-metilados de *m/z* 296, 280 e 326 foram observados nos picos **VIII**, **IX** e **XII** (T_R 8,66, 8,90 e 9,83 min, respectivamente). Estruturas benziltetrahydroisoquinólicas também foram observadas no TIC, onde o íon de *m/z* 330 (pico **II**, T_R 5,26 min) e 286 (pico **V** T_R 6,91 min) apresentaram T_R próximo as estruturas tetrahidroprotoberberínicas. Nos anexos A1 a A13, estão reportados os espectros de massas dos íons referentes a cada pico do LC-MS.

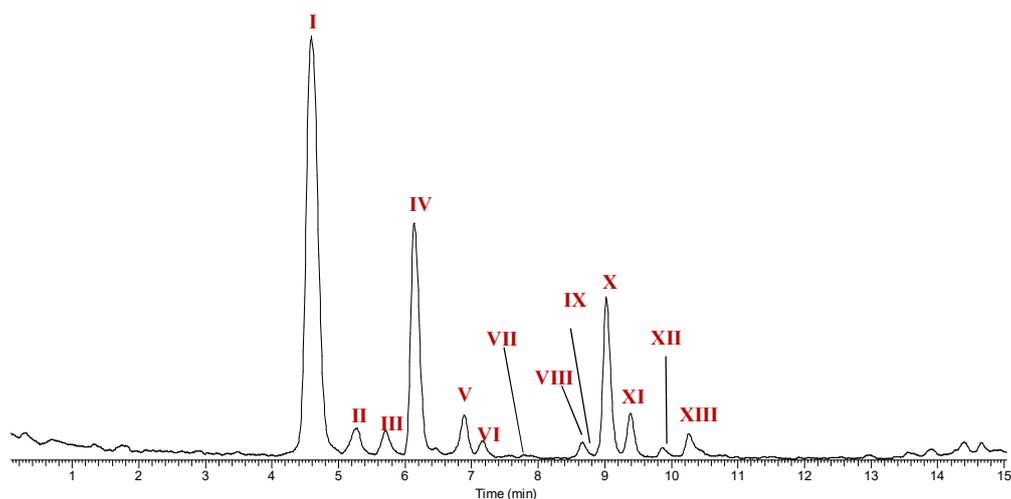


Figura 32. Cromatograma de íons totais (TIC) HPLC-MS da fração alcaloídica de *O. amazonicum*.

Como esperado, a análise de HPLC-MS também exibiu a presença de alcaloides isobáricos minoritários relacionados aos íons registrados por LS-MS de *m/z* 342 (pico **III** T_R 5,67 min), 282 (picos **V**, T_R 6,91 min e **VII** 7,80 min) e 312 (pico **IX**, T_R 8,90 min). O espectro de MS/MS do íon *m/z* 342 (pico **III**) registrou íons fragmentos de *m/z* 192 (pico base) e 165, sugerindo ser um derivado benziltetrahydroisoquinólico (SCHMIDT et al., 2005) (Figura 33).

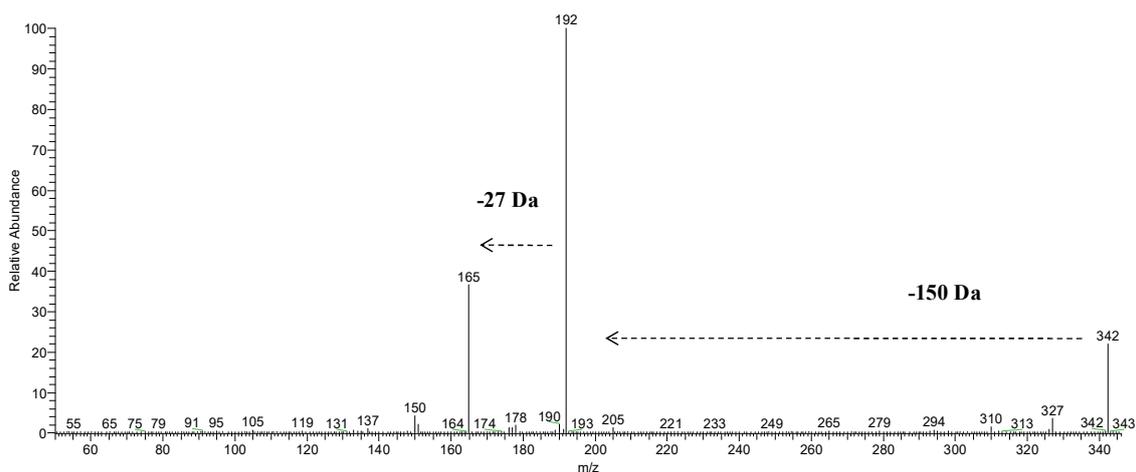


Figura 33. Espectro MS/MS do íon de m/z 342 presente no pico **III** na fração alcaloídica da espécie *O. amazonicum*.

O espectro de MS/MS do íon de m/z 282 (pico **V**) evidenciou uma perda inicial de 31 Da ($-\text{NH}_2\text{CH}_3$) (m/z 282 \rightarrow 251) e perdas subsequentes de 32 Da ($-\text{CH}_3\text{OH}$) (m/z 251 \rightarrow 219) e 28 Da ($-\text{CO}$) (m/z 219 \rightarrow 191) (Figura 34). De acordo com STÉVIGNY e colaboradores (2004) essas fragmentações chave sugerem a presença de uma estrutura porfínica *N*-metilada com grupos hidroxilas e metoxilas vicinais, sendo coerente com o padrão de fragmentação do alcaloide *N*-metilasimilobina (**32**) (SHANGGUAN et al., 2018). A sua forma não *N*-metilada, o alcaloide asimilobina (**33**) foi observada no pico **VI** (T_R 7,16 min, m/z 268), também confirmado pelo seu padrão de fragmentação, o que está de acordo com dados anteriormente reportados (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015; LIMA, 2015). Na figura 31 estão ilustradas as propostas de fragmentações para íons de m/z 282 (*N*-metilasimilobina) e 268 (asimilobina).

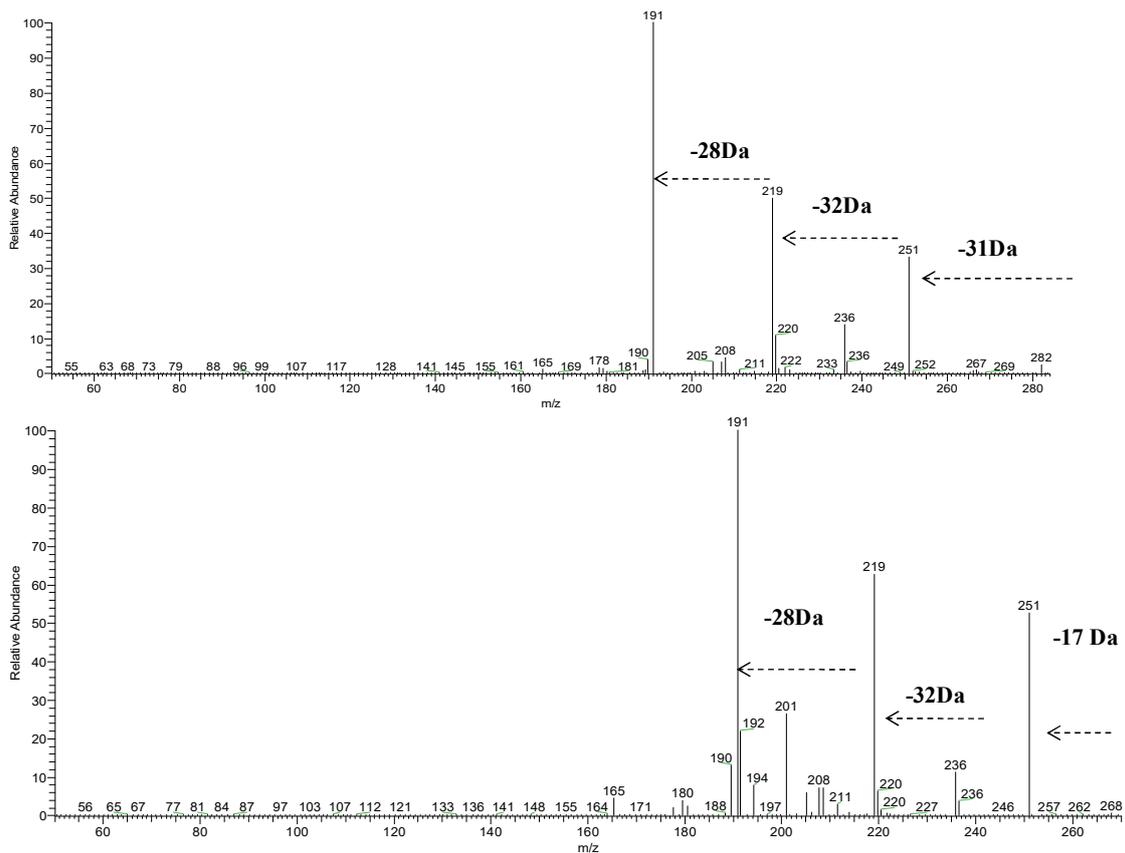


Figura 34. Espectro MS/MS dos íons de m/z 282 e 268 presentes nos picos V e VI respectivamente na fração alcaloídica da espécie *O. amazonicum*.

Outro alcaloide isobárico de m/z 282 (pico VII) apresentou no seu espectro de MS/MS uma perda inicial de 18 Da ($\text{-H}_2\text{O}$) (m/z 282 \rightarrow 264), seguido por perdas sequências de 30 Da ($\text{-CH}_2\text{O}$) (m/z 264 \rightarrow 234) e 28 Da (-CO) (m/z 234 \rightarrow 206) (Figura 35). Essa fragmentação incomum está de acordo com o alcaloide norushinsunina (34), um derivado 7-hidroxi-aporfínico contendo um grupo metilenodioxí no anel A (Figura 36). Esta observação sugere que uma substituição em C-7 em esqueletos aporfínicos tem influência sobre a primeira perda, mas não nas perdas subsequentes. A confirmação desta proposta foi realizada em comparação com espectro MS/MS com padrão previamente isolado e identificado por SILVA e colaboradores (2018b).

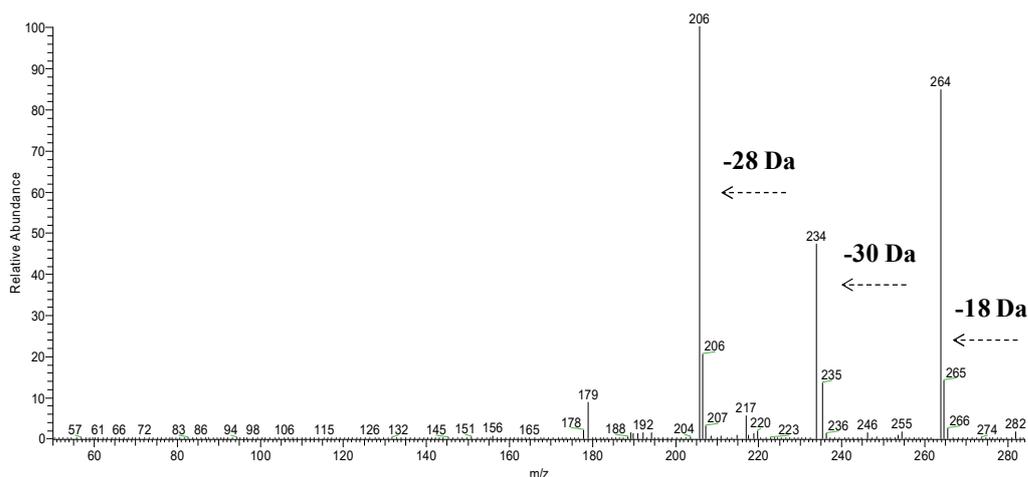


Figura 35. Espectro MS/MS do íon de m/z 282 presente no pico VII na fração alcaloídica da espécie *O. amazonicum*.

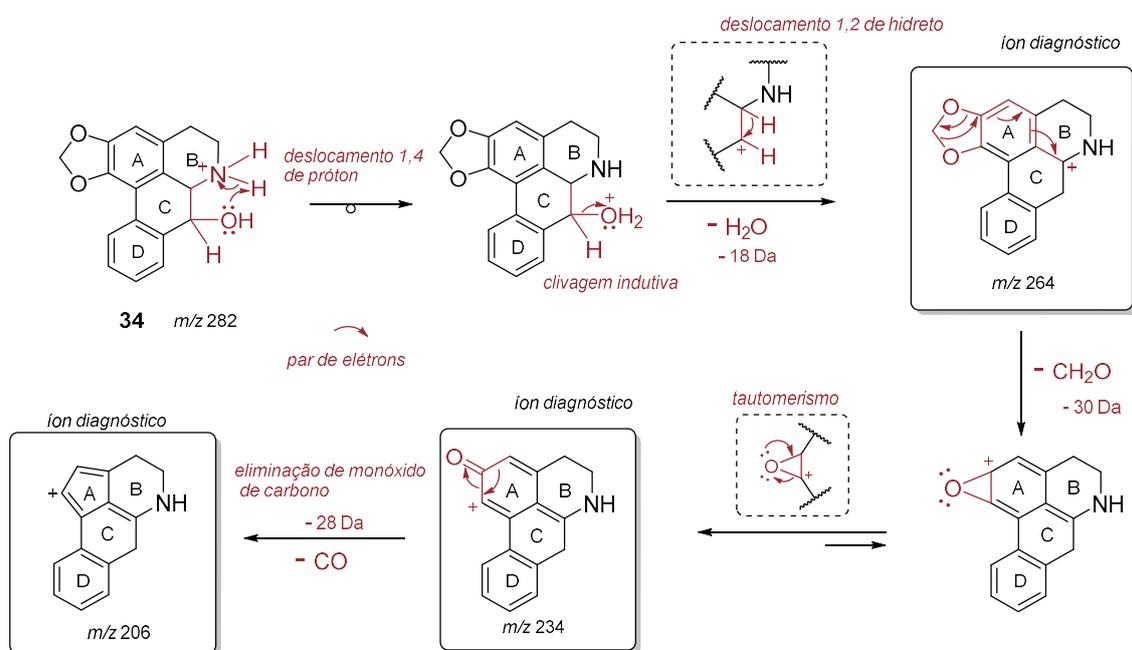


Figura 36. Propostas de fragmentação para o íon de m/z 282 observado no espectro LC-MS/MS do pico VII.

O íon isobárico de m/z 312 (pico IX) (Figura 37) apresentou um perfil de MS/MS coerente com um derivado *N*-metil-aporfínico contendo metoxilas adjacentes (m/z 312 \rightarrow 281 \rightarrow 266 \rightarrow 250), o que é compatível com o alcaloide *N*-metilisopilina (35). Seu homólogo não *N*-metilado foi observado no pico XI (m/z 298), confirmado pelo padrão de fragmentação (m/z 298 \rightarrow 281 \rightarrow 266 \rightarrow 250), sendo este atribuído ao alcaloide aporfínico isopilina (36). Adicionalmente, os íons de m/z 276 (pico VII) e 292 (pico XIII) foram identificados provisoriamente como liriodenina (37) e lisicamina (38)

respectivamente, através da comparação de seus espectros de MS/MS com dados previamente reportados (SILVA et al., 2017). Na figura 38 estão reportados os espectros MS/MS para os íons de m/z 276 e 292.

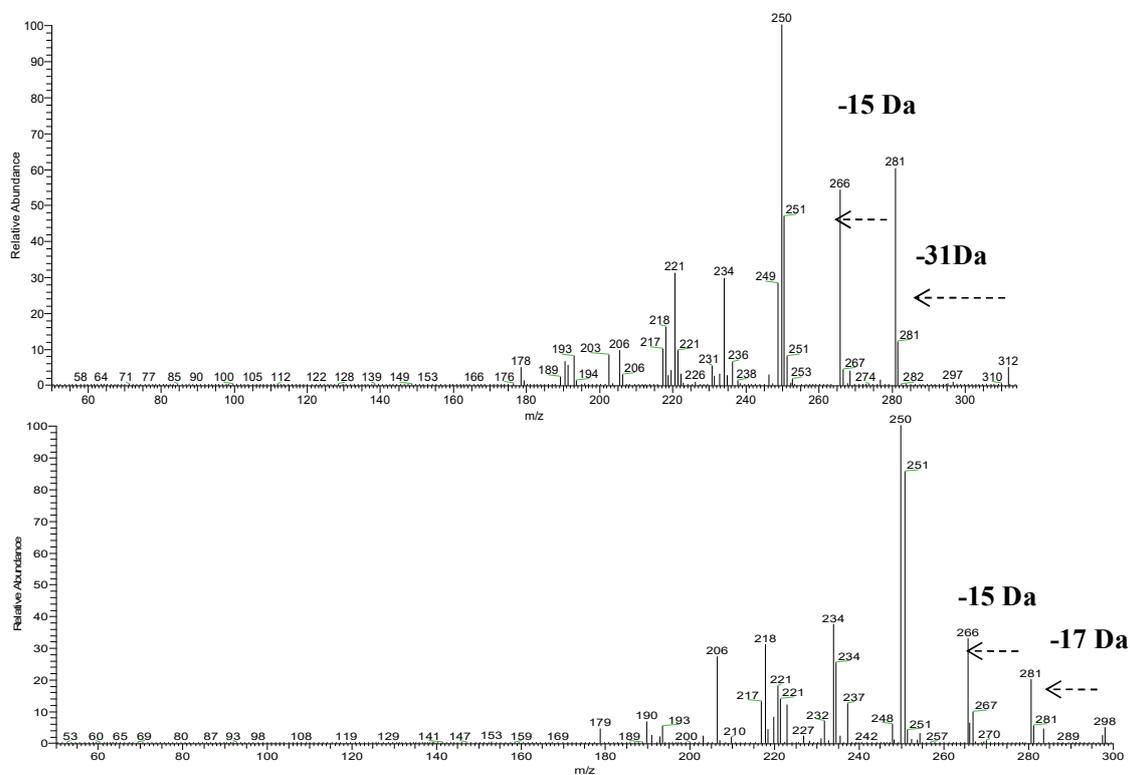


Figura 37. Espectro MS/MS dos íons de m/z 312 e 298 presentes nos picos IX e XI respectivamente, na fração alcalóidica da espécie *O. amazonicum*

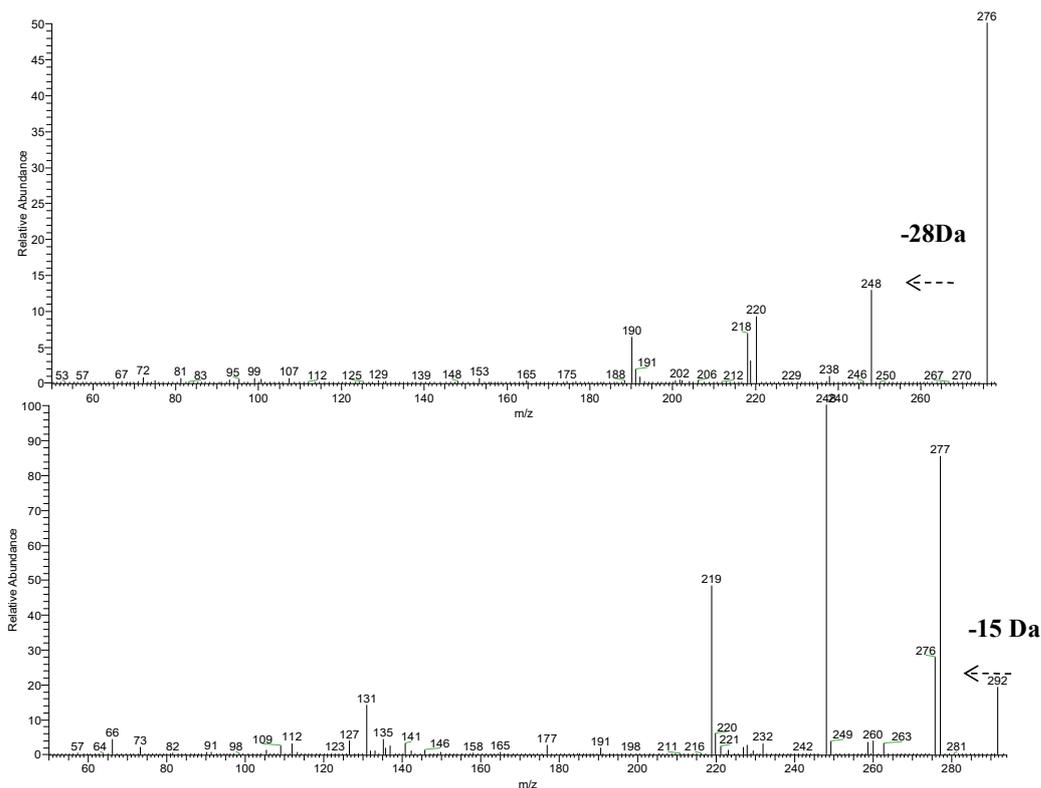


Figura 38. Espectro MS/MS dos íons de m/z 276 e 292 presentes nos picos **VII** e **XIII** respectivamente, na fração alcalóidica da espécie *O. amazonicum*.

Para reforçar a identificação provisoriamente dos alcalóides derivados do esqueleto isoquinolínico, o espectro de DAD para os principais picos cromatográficos foram comparados entre si. Inicialmente, observou-se a forte similaridade espectral entre os alcalóides tetrahidroprotoberberínicos presentes nos picos **I** e **IV** (Figuras A14 e A15 do material do anexo), confirmando que estas estruturas compartilham o mesmo padrão de substituição. Um comportamento semelhante foi também observado para os aporfínicos presentes nos picos **VIII** e **X**, **IX** e **XI**, e **XII** e **XIII** (Figuras A16 a A21 do material do anexo).

A discreta diferença entre os picos **IX** e **XI** pode ser devida ao efeito de co-eluição da *N*-metilanonaina (**31**) e *N*-metilisopilina (**35**) no pico **IX**, e anonaina (**30**) e isopilina (**36**) no pico **XI**. A ausência de desvios hipsocrômicos ou batocrômicos significativos para os outros picos, condiz com a inclusão de um grupo metil no nitrogênio. A proposta de substituição em C-3, com base no espectro de MS/MS, para os alcalóides aporfínicos *N*-metilisopilina (**35**), isopilina (**36**), *N*-metil-*O*-metilisopilina (**29**) e *O*-metilisopilina (**27**) foi confirmada através das absorvâncias em 270-280 nm e em 310-320 nm nos

espectros de UV (SANGSTER & STUART, 1965), sendo este padrão observado para alcalóides aporfínicos com ausência de substituição no anel D.

Assim, a análise HPLC-MS/MS adicionalmente à LS-MS permitiu a identificação provisoriamente de 17 alcalóides derivados do esqueleto isoquinolínicos (Tabela 2), com 10 ainda não relatados no gênero *Onychopetalum*, proporcionando uma investigação mais abrangente da espécie *O. amazonicum*. Na figura 39 estão reportadas as estruturas alcaloídicas caracterizadas por LS-MS/MS e HPLC- DAD-MS/MS.

Tabela 2. Caracterização de alcalóides isoquinolínicos das folhas *O. amazonicum* identificados por LS-MS/MS e HPLC-MS/MS

Pico	Compostos	T _R ^a	Classe ^b	[M+H] ⁺	MS/MS ^c	λ _{max} ^d	Técnica
I	Esfolidina (10)	4.61	T	328	178*, 151	227, 283	LS-MS; HPLC-MS
II	Reticulina (24)	5.26	B	330	299, 175, 137 192*, 143,		LS-MS; HPLC-MS
III	Desconhecido	5.67	B	342	192*, 165		HPLC-MS
IV	Isocoripalmina (11)	6.14	T	342	178*, 151 165,	232, 282	LS-MS; HPLC-MS
V	Norjuzifina (25)	6.91	B	286	269, 143, 237, 107*		LS-MS; HPLC-MS
	<i>N</i> -Metilasimilobina (32)		A	282	251, 191*	219,	HPLC-MS
VI	Asimilobina (33)	7.16	A	268	251, 191*	219,	HPLC-MS
VII	Norushinsunina (34)	7.80	A	282	264, 206*	234,	HPLC-MS
	Liriodenina (37)		O	276	248*, 220		HPLC-MS
VIII	Nuciferina (28)	8.66	A	296	265, 234*	250, 218, 233, 270	LS-MS; HPLC-MS
IX	<i>N</i> -Metilanonaina (31)	8.90	A	280	249*, 191	219, 239, 271, 312	LS-MS; HPLC-MS

	<i>N</i> -Metilisopilina (35)		A	312	281, 250*	266,			HPLC-MS
X	Nornuciferina (26)	9.03	A	282	265, 234*	250,	219, 233, 270		LS-MS; HPLC-MS
XI	Anonaina (30)	9.38	A	266	249*, 191	219,	245, 271, 315		LS-MS; HPLC-MS
	Isopilina (36)		A	298	281, 250*	266,			HPLC-MS
XII	<i>N</i> -Metil-O- metilisopilina (29)	9.83	A	326	295, 264	280*,	222, 231, 275		LS-MS; HPLC-MS
XIII	O-Metilisopilina (27)	10.27	A	312	295, 264	280*,	223, 232, 275		LS-MS; HPLC-MS
	Lisicamina (38)		O	292	277*, 248				HPLC-MS

^aTempo de retenção; ^bAporfinico(A), Benziltetrahydroisoquinolínicos (B), Tetrahydroprotoberberínico (C); ^c Íons obtidos pela análise QQ-MS/MS denotado com * pico base; ^d λ_{max} entre 200-400nm.

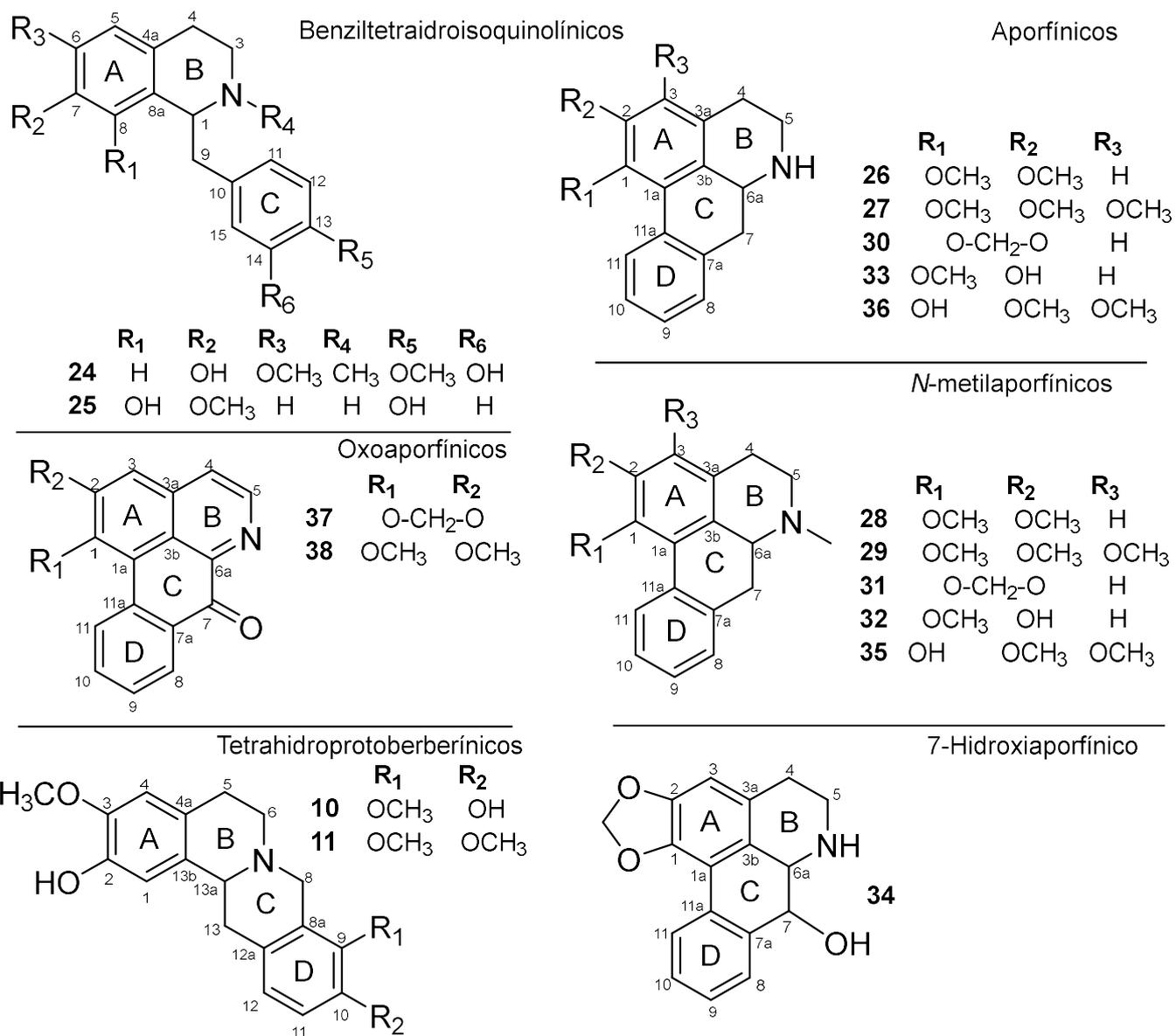


Figura 39. Estruturas alcaloídicas caracterizadas por LS-MS/MS e HPLC- DAD-MS/MS.

5.1.3. Estudo do perfil alcaloídico por *Leaf spray* (LS-MS) da espécie *O. periquino*

No espectro de LS-MS das folhas de *O. periquino* (Figura 40), foi observado um perfil complexo com diversos sinais registrados na região de m/z 200-400 e a ausência de sinais majoritários de m/z par. A causa poderia ser uma menor abundância de alcaloides quando comparado com perfil das folhas de *O. amazonicum*. Também poderia ser o efeito de matriz que pode ser gerado pela análise direta do material vegetal.

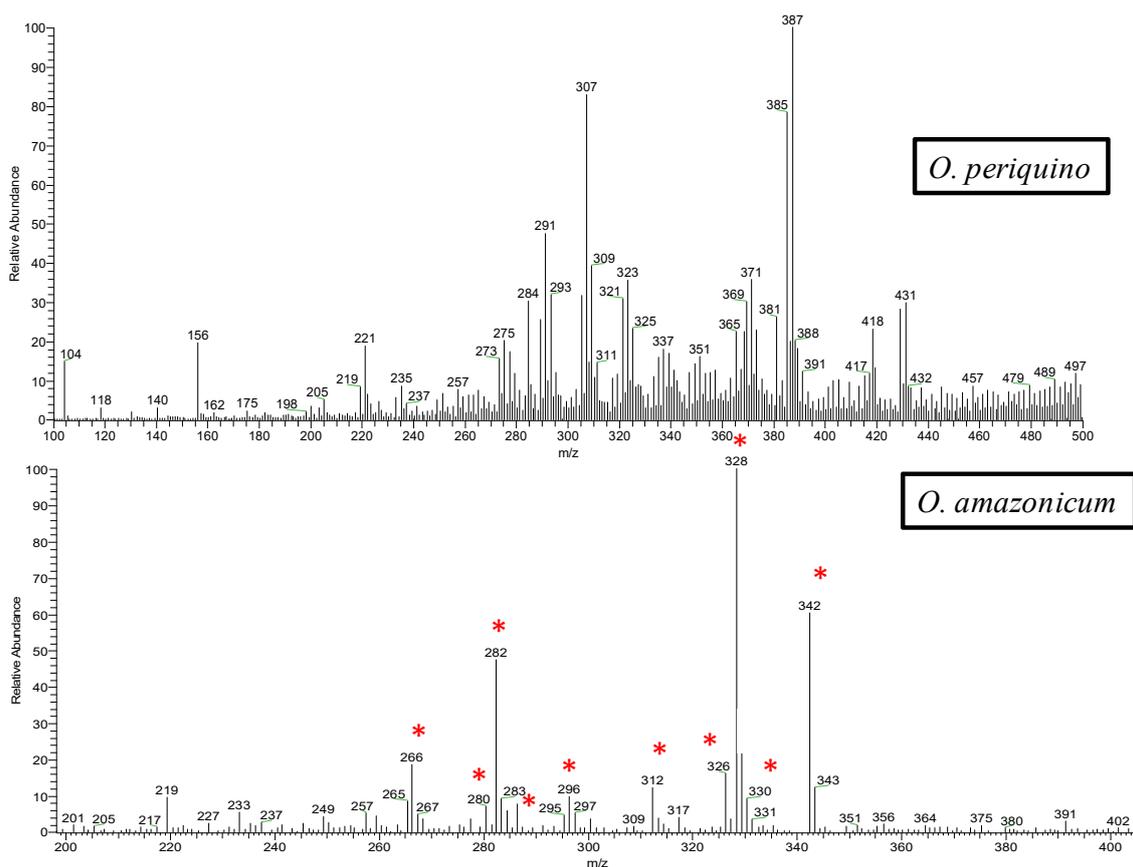


Figura 40. Perfil de LS-MS comparativo entre as folhas de *O. periquino* e *O. amazonicum*.

5.1.4. HPLC-DAD-MS/MS da fração alcaloídica de *O. periquino*

A investigação por HPLC-MS da fração alcaloídica de *O. periquino* (Figura 41) confirmou o perfil complexo, dos quais poucos sinais apresentaram m/z par. Os sinais desses picos: **I**, **II**, **III**, **V**, **X** e **XI** (Figuras A22 a A27 do material do anexo) apresentaram os mesmos perfis de fragmentação de picos correspondentes de *O. amazonicum*. Assim os alcaloides estefolidina (**10**), reticulina (**24**), norjuzifina (**25**), nornuciferina (**26**) e anonaina (**30**) foram provisoriamente identificados (Tabela 3), todos reportados pela primeira vez em *O. periquino*.

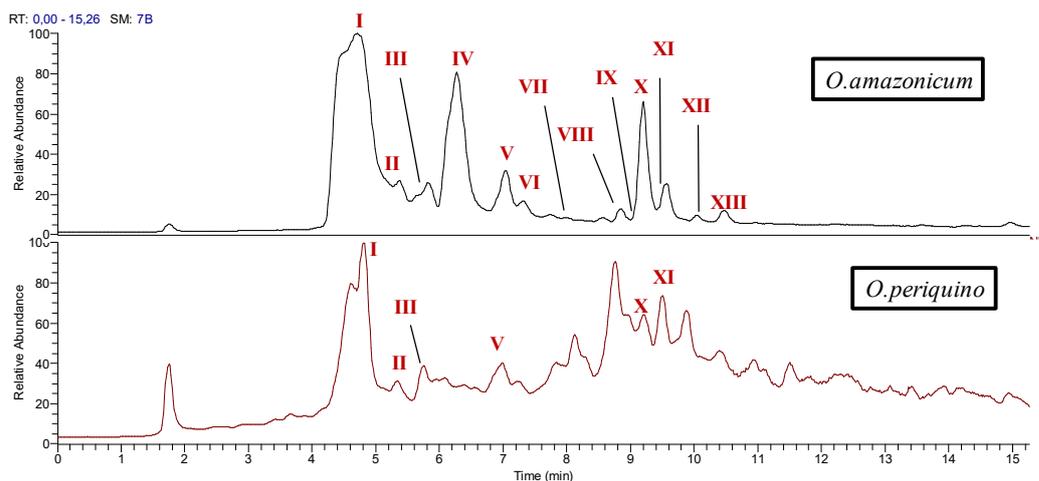


Figura 41. Cromatogramas de íons totais (TIC) por LC-MS das frações alcalóidicas de *O. amazonicum* e *O. periquino*.

Tabela 3. Caracterização de alcaloides isoquinolínicos das folhas *O. periquino* identificados por HPLC-MS/MS

Pico	Compostos	T _R ^a	Classe ^b	[M+H] ⁺	MS/MS ^c
I	Esfolidina (10)	4.60	T	328	178*, 151
II	Reticulina (24)	5.34	B	330	299, 192*, 175, 143, 137
III	Desconhecido	5.74	B	342	178*, 165, 151
V	Norjuzifina (25)	7.00	B	286	269, 237, 143, 107*
X	Nornuciferina (26)	9.20	A	282	265, 250, 234*
XI	Anonaina (30)	9.50	A	266	249*, 219, 191

^aTempo de retenção; ^bAporfínico (A), Benziltetrahydroisoquinolínicos (B), Tetrahydroprotoberberínicos (C); ^c Íons obtidos pela análise QqQ-MS/MS denotado com * pico base.

Assim a análise por HPLC-MS/MS da espécie *O. periquino* evidenciou um perfil alcalóidico menos promissor que *O. amazonicum*, visto que a maioria dos picos observados apresentaram sinais complexos com ausência de íons de *m/z* par.

5.2 Prospecção de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico das folhas de *O. amazonicum* e *O. periquino* como potenciais inibidores da AChE

A fim de identificar possíveis AChEIs nas espécies de *Onychopetalum*, uma abordagem baseada em *docking* molecular, semissíntese e cromatografia de bioafinidade foi conduzida com alcaloides previamente desreplicados.

5.2.1 Estudo de *docking* molecular dos alcaloides desreplicados nas folhas *O. amazonicum* e *O. periquino*

Os estudos de *docking* molecular entre a estrutura tridimensional da AChE (1QTI) e os alcaloides isoquinolínicos desreplicados nas espécies *O. amazonicum* e *O. periquino* foram conduzidos na região do sítio ativo, anteriormente ocupado pela galantamina. A análise do *docking* molecular foi baseada na variação de energia de ligação do complexo ligante-AChE e principais interações observadas com os subsítios da TcAChE (esterático - Ser200, Glu327 e His440; aniônico - Trp84 e Phe330; periférico - Trp279), em comparação com a estrutura cristalográfica do complexo galantamina-AChE, uma vez que este modelo tem sido aplicado com sucesso na triagem de AChEIs (ROLLINGER et al., 2004). As interações observadas para a galantamina (Figura 42A) foram semelhantes às descritas por Bartolucci e colaboradores (2001). O átomo de oxigênio do grupo *O*-metil estabeleceu ligação de hidrogênio com resíduo Ser200 do subsítio esterático, enquanto oxigênio da hidroxila estabeleceu ligações de hidrogênio com os resíduos Gly118 e Glu199. Em adição, interações π -alquil foram observadas com os resíduos do subsítio aniônico (Trp84 e Phe330).

Na tabela 4 são apresentados os resultados do *docking* molecular entre os alcaloides desreplicados e a enzima AChE (Anexos A28 a A30). Os alcaloides testados tiveram valores de energia que variaram de -8,9 a -11,2 kcal/mol. Dentre estes, apenas os alcalóides benzilisoquinolínicos reticulina ($\Delta G = -9,1$ kcal/mol) e norjuzifina ($\Delta G = -9,4$ kcal/mol), e os alcaloides aporfínicos trimetoxilados *N*-metil-*O*-metilisopilina ($\Delta G = -8,9$ kcal/mol) e *O*-metilisopilina ($\Delta G = -9,2$ kcal/mol) apresentaram valores de energia inferiores à referência galantamina ($\Delta G = -9,5$ kcal/mol, RMSD < 2).

Em relação aos alcaloides mais ativos, os tetrahidroprotoberberínicos estefolidina ($\Delta G = -9,6$ kcal/mol) e isocoripalmina ($\Delta G = -9,7$ kcal/mol), abundantes nas folhas de *O. amazonicum*, apresentaram menor atividade em relação aos demais, seguido pelo alcaloide oxoaporfínico lisicamina ($\Delta G = -9,7$ kcal/mol). É importante destacar que embora este representante oxoaporfínico contendo duas metoxilas adjacentes no anel A

tenha apresentado atividade moderada *in silico*, o alcaloide liriodenina ($\Delta G = - 10.9$ kcal/mol, constituído por uma ponte metilenodioxí, apresentou atividade significativa.

Os demais alcaloides aporfinicos apresentaram elevada atividade *in silico*, o que sugere o estabelecimento de interações favoráveis no complexo ligante-*TcAChE*, sendo os alcalóides *N*-metilanonaina (-11,2 kcal/mol) e nornuciferina (-11,0 kcal/mol) os mais ativos. Para o alcaloide *N*-metilanonaina, interações π -cátion foram observadas entre o nitrogênio do anel B e o resíduo Trp84, além de interações π - π do anel D com o resíduo Phe330 (Figura 42B), ambos pertencentes ao sítio aniônico. Em adição, interações de carga atrativa foram observadas entre o nitrogênio e o resíduo Glu199. Já o alcaloide nornuciferina apresentou ligações de hidrogênio com o resíduo His440 (subsítio esterático), π - π entre o anel D e o resíduo Phe330 (subsítio aniônico) e interações atrativas com o resíduo Glu199 (Figura 42C). Interações de carga atrativa têm sido sugeridas para alcaloides derivados isoquinolínicos como relevantes para o aumento da atividade inibitória da AChE, sendo comumente observadas em alcaloides quaternários (LOIZZO et al., 2008).

Baseado nos resultados de *docking* molecular pôde-se perceber o quão importante são as interações π -baseadas entre os alcaloides derivados isoquinolínicos e os resíduos dos subsítios esterático, aniônicos e periféricos da AChE. Com base nos resultados *in silico* obtidos para o alcaloide nornuciferina, um padrão previamente isolado de *O. amazonicum* (LIMA, 2015) foi submetido para os ensaios de ICER a fim avaliar sua atividade *in vitro*.

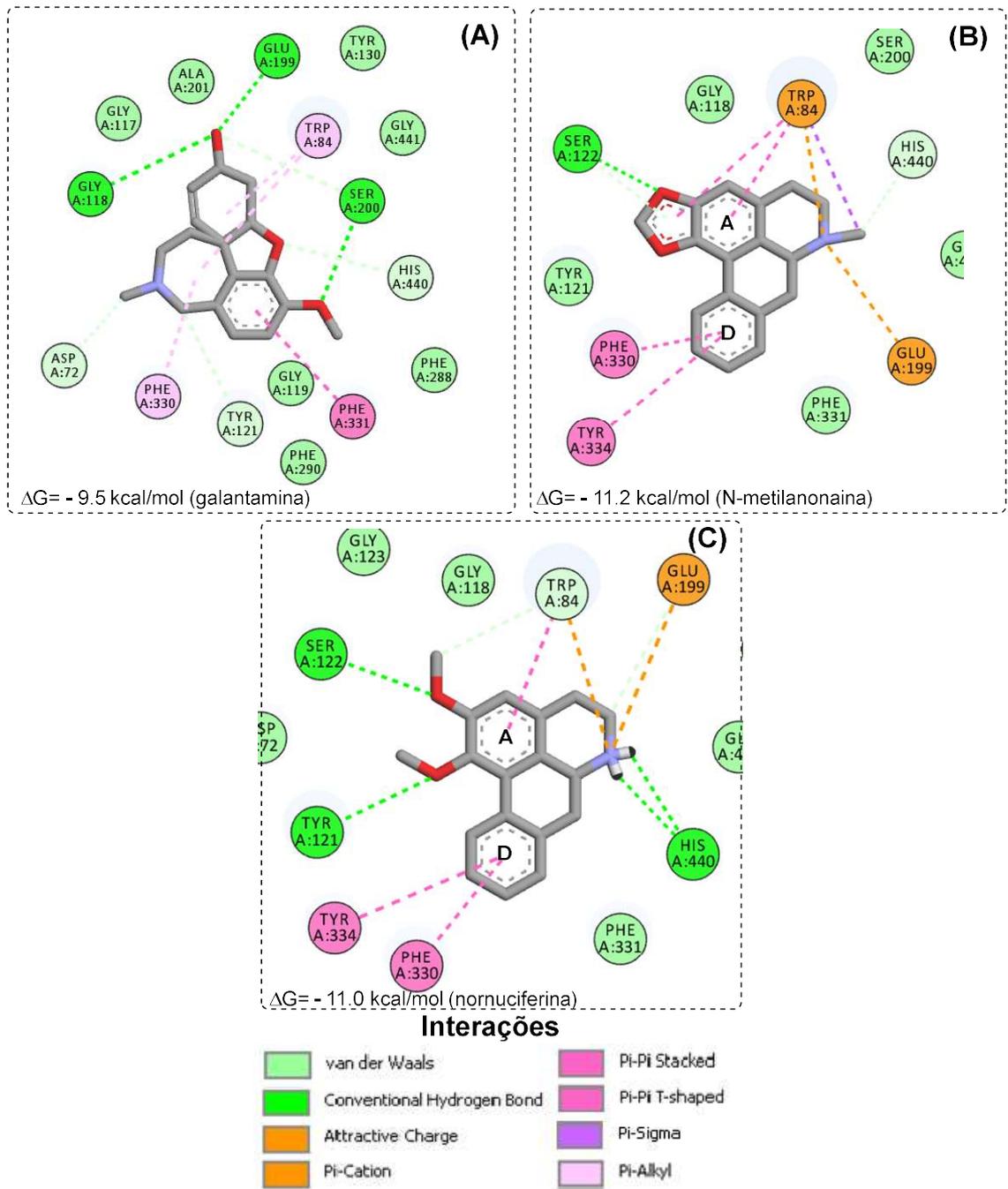


Figura 42. Principais interações observadas para os complexos galantamina-AChE (A), N-metilanonaina-AChE (B), e normuciferina-AChE (C).

Tabela 4. Resultado do *docking* molecular para os alcaloides desreplicados de *O. amazonicum* e *O. periquino*

Compostos	Energias de ligação ^a (kcal/mol)	Configuração
<i>N</i> -Metil- <i>O</i> -metilisopilina (29)	-8,9	(R)
Reticulina (24)	-9,1	(R)
<i>O</i> -Metilisopilina (27)	-9,2	(R)
Norjuzifina (25)	-9,4	(R)
Estefolidina (10)	-9,6	(S)
Isocoripalmina (11)	-9,7	(S)
Lisicamina (38)	-9,7	(R)
<i>N</i> -Metilisopilina (35)	-9,8	(R)
Nuciferina (28)	-10,1	(R)
Isopilina (36)	-10,2	(R)
Anonaina (30)	-10,5	(R)
<i>N</i> -Metilasimilobina (32)	-10,5	(R)
Asimilobina (33)	-10,7	(R)
Norushinsunina (34)	-10,8	(R)
Liriodenina (37)	-10,9	(R)
Nornuciferina (26)	-11,0	(R)
<i>N</i> -Metilanonaina (31)	-11,2	(R)

^a Energias calculadas usando o *software* AutoDockVina para acoplamento molecular entre ligantes e o local ativo da AChE. Galantamina = - 9,5 kcal/mol.

5.2.2 Estudo de *docking* molecular dos derivados benzilados dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina

Embora encontrados valores significativos de energia de ligação para alcaloides aporfínicos, esses se apresentaram como minoritários nas frações alcaloídicas, com isso, apenas a modificação estrutural dos alcaloides estefolidina (10) e isocoripalmina (11), majoritários na fração alcaloídica de *O. amazonicum*, foi investigada. Uma vez que o sítio ativo de *TcAChE* é largamente hidrofóbica e constituída por resíduos aromáticos, um aumento no potencial biológico poderia ser, teoricamente, alcançado pela acomodação de compostos que favorecem interações π - π . Portanto, os produtos previstos através da benzilação desses alcaloides (Figura 43 e 44) foram avaliados por *docking* molecular.

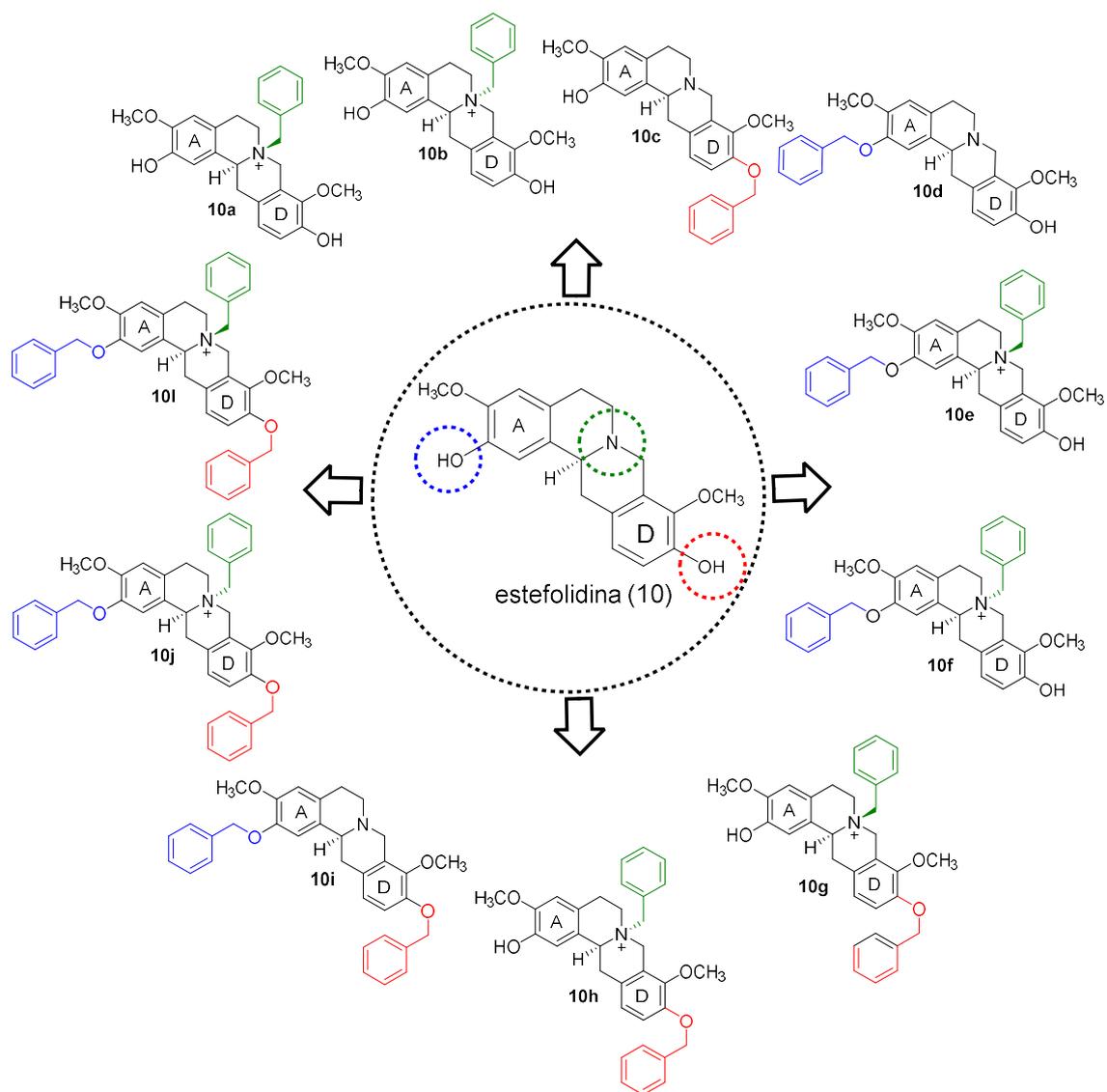


Figura 43. Derivados previstos a partir da benzilação do alcaloide tetrahidroprotoberberínico estefolidina.

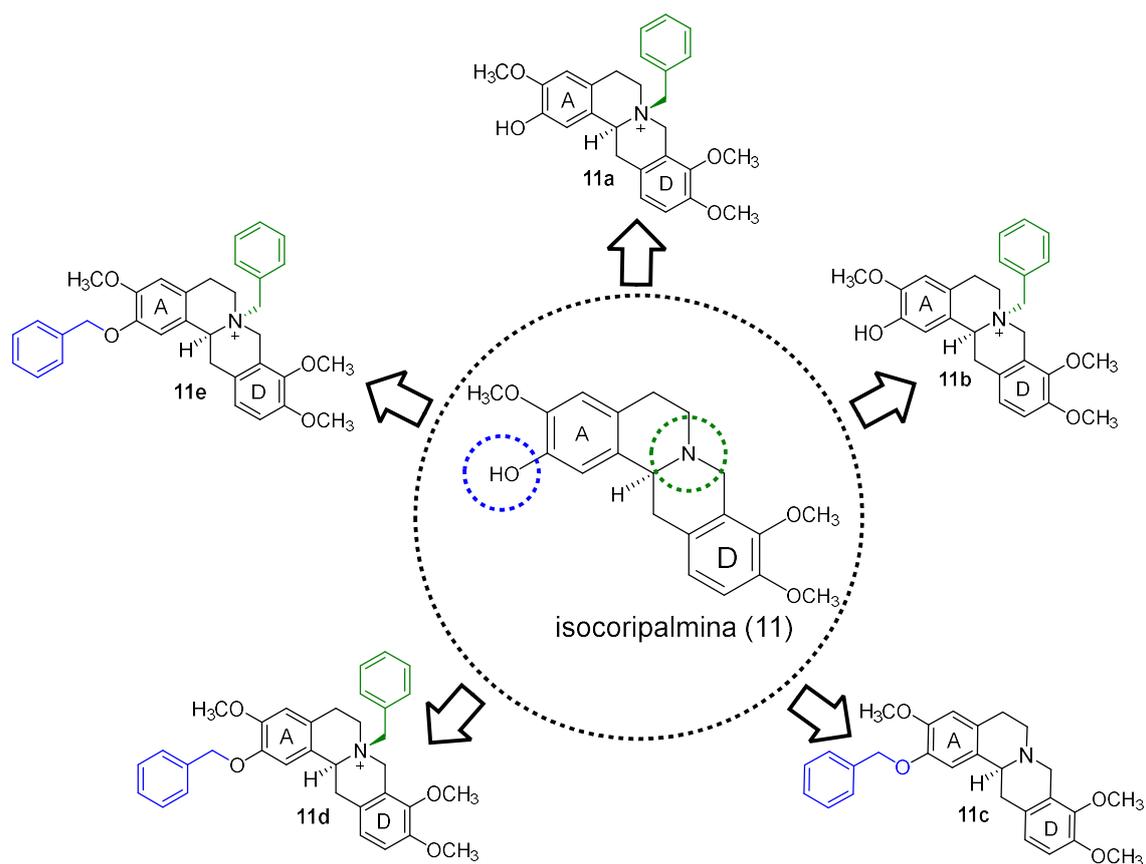


Figura 44. Derivados previstos a partir da benzilação do alcaloide tetrahidroprotoberberínico isocoripalmina.

Na tabela 5 estão listados os resultados do *docking* molecular para os derivados previstos através da benzilação dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina e a enzima AChE (Anexos A31 e A32). Os derivados apresentaram valores de energia que variaram de -10,4 a -12,2 kcal/mol, todos, portanto, mais ativos que seus precursores e a galantamina ($\Delta G = -9,5$ kcal/mol, $RMSD < 2$). Ainda na tabela 5 é possível observar que os produtos *N*-benzilados, portanto alcaloides quaternários, foram os mais promissores quanto ao potencial de inibição. Os derivados *N*-benzilados contendo a configuração R em seu novo estereocentro apresentam melhores atividades quando comparados a seus respectivos enantiômeros S. Dentre os derivados previstos, os mais ativos foram os dibenzilados **10h** ($\Delta G = -12,2$ kcal/mol), **10f** ($\Delta G = -12,1$ kcal/mol), **10g** ($\Delta G = -11,7$ kcal/mol) e o derivado monobenzilado **10b** ($\Delta G = -11,6$ kcal/mol), todos derivados do alcaloide estefolidina (Figura 45).

Tabela 5. Resultado do docking molecular para os derivados previstos através da benzilação dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina.

Compostos	Energias de ligação ^a (kcal/mol)
Estefolidina (10)	-9,6
Isocoripalmina (11)	-9,7
11c	-10,4
10l	-10,6
10a	-10,7
11a	-10,7
11b	-10,8
10d	-10,9
10c	-11,0
11d	-11,1
11e	-11,2
10e	-11,4
10i	-11,4
10j	-11,5
10b	-11,6
10g	-11,7
10f	-12,1
10h	-12,2

^aEnergias calculadas usando o *software* AutoDockVina para acoplamento molecular entre ligantes e o local ativo da AChE. Energia de galantamina calculada: -9,5.

Enquanto a estefolidina apresenta principalmente interações do tipo π entre os anéis aromáticos A e B e resíduos dos subsítios aniônico (Trp84 and Phe330) e periférico (Trp279) (Figura 45A), os derivados benzilados mais ativos apresentam interações variadas, incluindo de carga atrativa, com praticamente todos os subsítios da AChE (Figura 45B-D).

O derivado dibenzilado **10h** ($\Delta G = - 12,2$ kcal/mol), o mais ativo, apresentou como principais interações (Figura 45B) uma ligação de hidrogênio entre o resíduo His440 (subsítio esterático) e a hidroxila do anel A, interações π - π entre os anéis A e B e os resíduos Phe330 (subsítio aniônico), Trp279 (subsítio periférico), Phe331 e Tyr334, além de interações de carga atrativa entre o nitrogênio carregado positivamente e o resíduo Asp72. Já o derivado dibenzilado **10f** ($\Delta G = - 12,1$ kcal/mol), o segundo mais ativo, apresentou como principais interações ligação de hidrogênio entre a hidroxila localizada no anel D e o resíduo Glu199, interações π - π entre o anel A e o resíduo Tyr334, e o grupo benzil da posição 2 e o resíduo Trp279 (subsítio periférico), além de interações

π -cation e de carga atrativa com os resíduos Trp84 (subsítio aniônico) e Asp72, respectivamente.

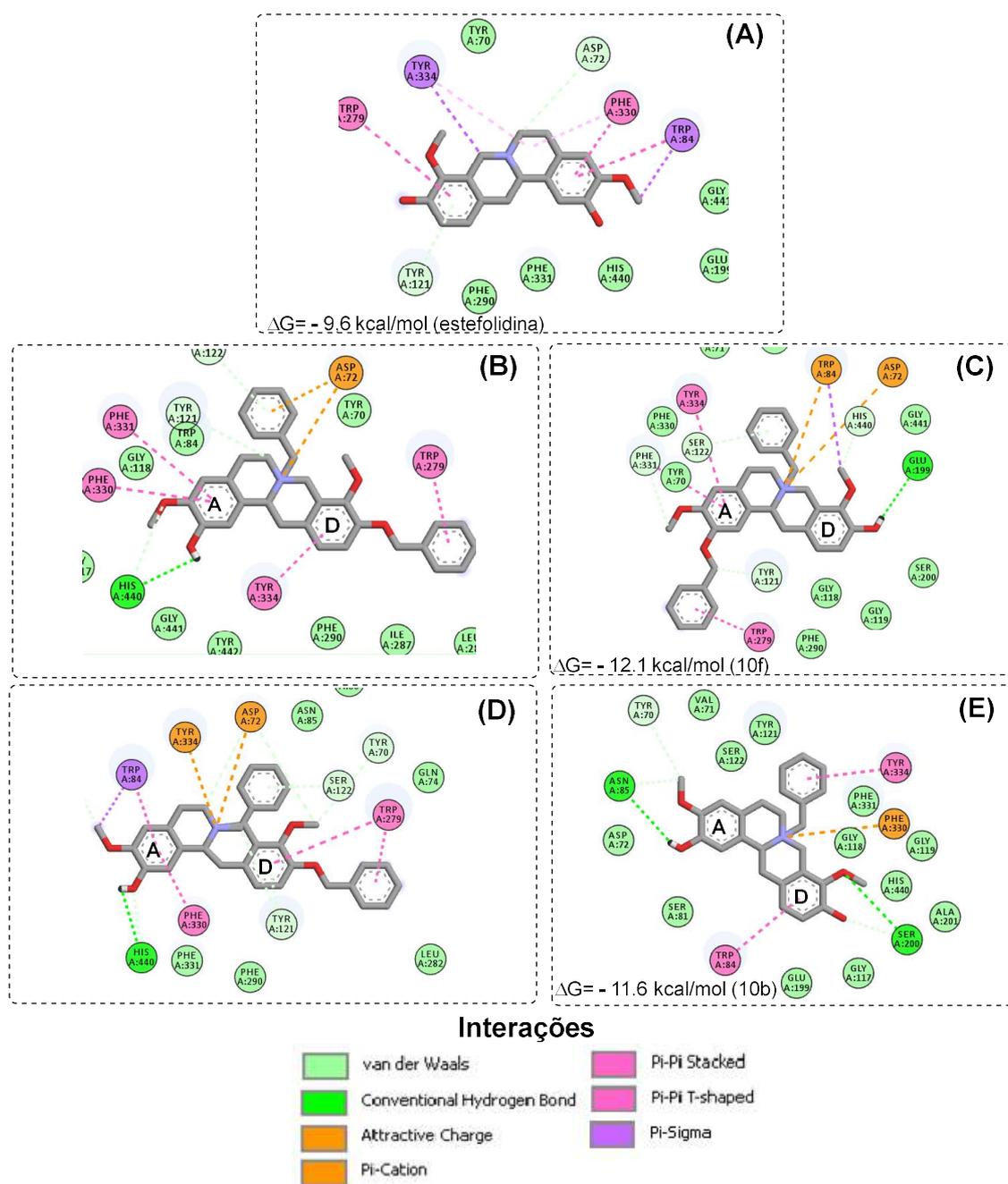


Figura 45. Principais interações observadas para os complexos estefolidina-AChE (A), 10h-AChE (B), 10f-AChE (C), 10g-AChE (D) e 10b-AChE (E).

Por outro lado, o derivado **10g** ($\Delta G = -11,7$ kcal/mol), terceiro mais ativo e epímero do derivado **10h**, ligação de hidrogênio entre a hidroxila do anel A e o resíduo His440 (subsítio esterático), interações do tipo π entre os anéis aromáticos A e D e os resíduos Trp84, Phe330 (ambos pertencentes ao subsítio aniônico) e Trp279 (subsítio periférico), além de interações π -cation e de carga atrativa com os resíduos Trp334 e

Asp72, respectivamente. Por fim, o derivado monobenzilado **10b** ($\Delta G = - 11,6$ kcal/mol) apresentou ligações de hidrogênio entre a metoxila do anel D e o resíduo Ser200 (subsítio esterático) e a hidroxila do anel A e o resíduo Asn85, interações π - π entre o grupo *N*-benzil e o resíduo Tyr334 e o anel D e o resíduo Trp84 (subsítio aniônico), além de interação π -cation entre o nitrogênio e o resíduo Phe330 (subsítio aniônico).

Baseado nos resultados de *docking* molecular pôde-se perceber que interações do tipo π e baseadas em carga podem ser determinantes para o aumento do potencial de inibição dos alcaloides benzilados frente à enzima AChE, além de destacar a potencialidade dos derivados *N*-benzilados, em especial os que detém a configuração R para o novo estereocentro. Portanto, com base nestes resultados uma fração enriquecida com os alcaloides estefolidina e isocoripalmina foi obtida das folhas de *O. amazonicum* e submetida ao procedimento de semissíntese com vista à obtenção do maior número de derivados possíveis, sendo os derivados obtidos submetidos aos ensaios *in vitro* a fim de confirmar as hipóteses levantadas através do ensaio de *docking* molecular.

5.2.3 Confirmação estrutural de estefolidina e isocoripalmina na fração FRAT e avaliação da pureza da amostra

A amostra FRAT (440 mg) apresentou-se como um sólido amarelo. Os espectros de *full scan* (Figura 46), MS/MS (Figura 48) e RMN de ^1H (Figura 47) exibiram sinais consistentes com as estruturas estefolidina e isocoripalmina, o que está de acordo com estudos anteriores em *O. amazonicum* (LIMA, 2015). Por outro lado, a concentração do alcaloide estefolidina e isocoripalmina foi determinada como sendo 89% e 11%, respectivamente, com base na integração dos sinais aromáticos no espectro de RMN de ^1H (Figura 48B). Para avaliar a estereoquímica na posição 13a, foram realizadas análises de rotação óptica nas substâncias previamente isoladas de *O. amazonicum* (LIMA, 2015), apresentando valores de $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ de $-231,69^\circ$ (MeOH, c 0,19) e $-164,14^\circ$ (CHCl₃, c 0,42), para estefolidina e isocoripalmina, respectivamente, estando esses valores de acordo com a configuração 13aS (CUTTER et al., 2002; CHENG & YANG, 2009). Na tabela 6 são apresentados os dados de RMN de ^1H para alcaloide majoritário estefolidina.

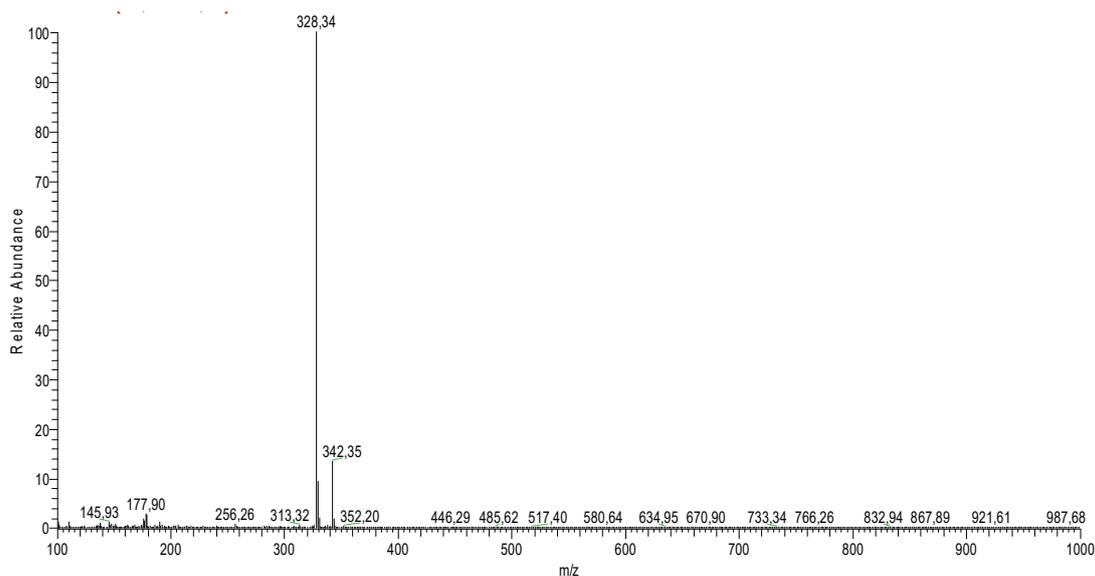


Figura 46. Espectro de *full scan* da amostra FRAT

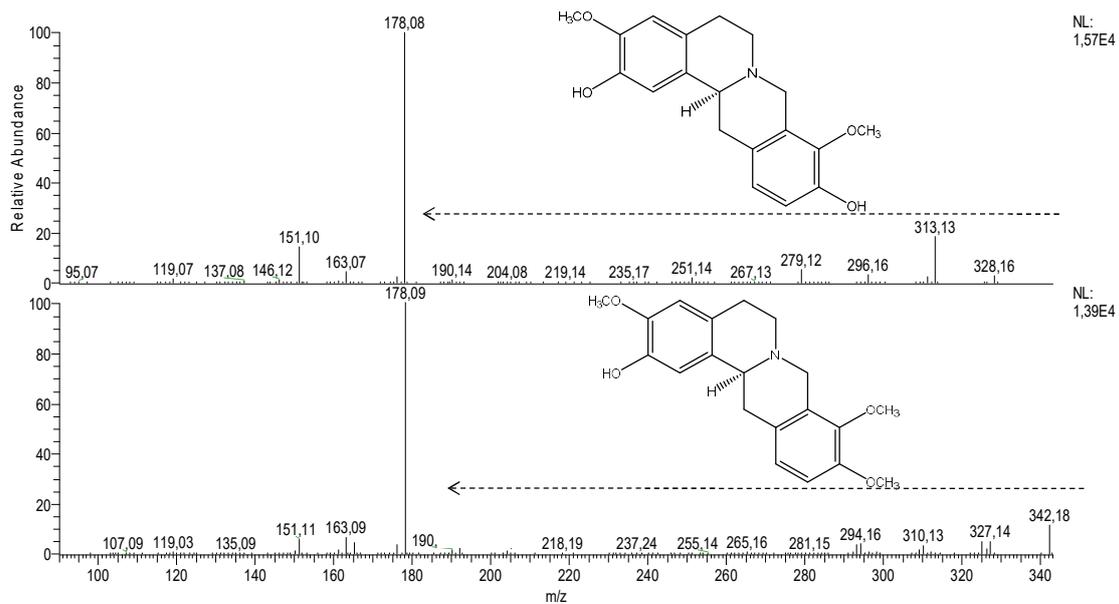


Figura 47. Espectros de MS/MS dos íons de m/z 328 e 342 $[M+H]^+$.

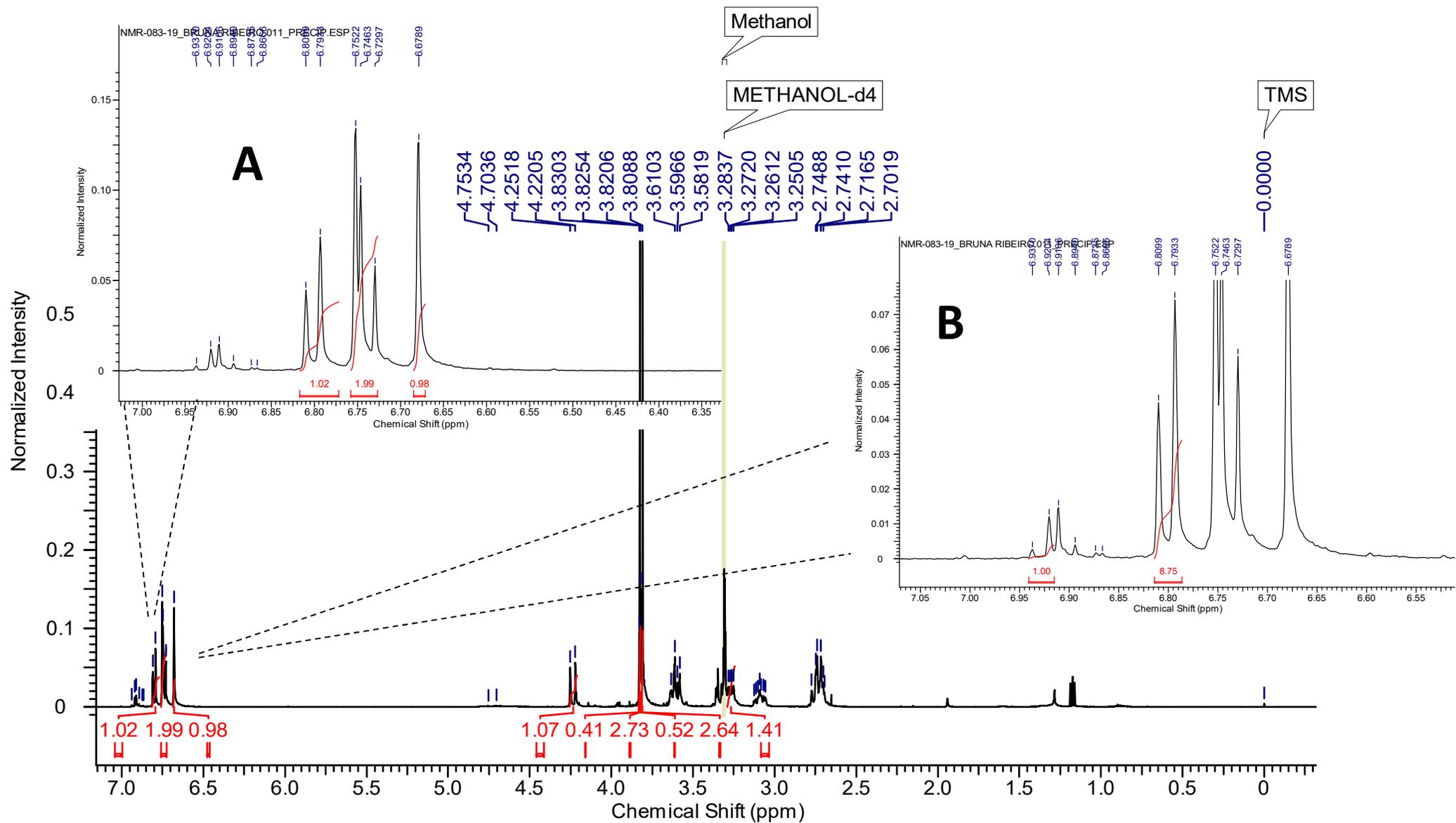


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra FRAT. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e relação da integração dos sinais na mistura (B).

Tabela 6. Dados de RMN ¹H do alcaloide estefolidina

Estefolidina		
Posição	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ H δ (mult., J em Hz) ^b
1	6,75 (s)	6,77 (s)
2	-	-
3	-	-
4	6,67 (s)	6,61(s)
4a	-	-
5	2,72 (m)	2,69 (m)
5	3,08 (m)	3,11 (m)
6	2,67 (m)	2,67 (m)
6	3,22 (m)	3,21 (m)
8	3,59 (m)	3,55 (d, 15,6)
8	4,24 (d, 15,7)	4,20 (d, 15,6)
8a	-	-
9	-	-
10	-	-
11	6,74 (d, 8,5)	6,76 (d, 8,3)
12	6,80 (d, 8,5)	6,80 (d, 8,3)
12a	-	-
13	2,74 (m)	2,78(dd,16,0;11,4)
13	3,30 (m)	3,28 (1H, dd, 16,0; 3,9)
13a	3,25 (dd, 11,5; 4,2)	3,57(dd, 11,4; 3,9)
13b	-	-
3-OCH3	3,82 (s)	3,86 (s)
9-OCH3	3,80 (s)	3,83(s)

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo com COSTA et al., 2015 (¹H em CDCl₃ + gotas de CD₃OD 400 MHz)

5.2.4 Análises dos produtos da benzilação da mistura dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina

5.2.4.1 Análises por ESI-MS/MS de BFA e BFD

O espectro de *full scan* da amostra BFA exibiu um intenso íon de m/z 226 e a presença de um minoritário de m/z 418 (Figura 49). O valor de m/z 418 é coerente com um dos produtos previsto a partir do planejamento semissintético.

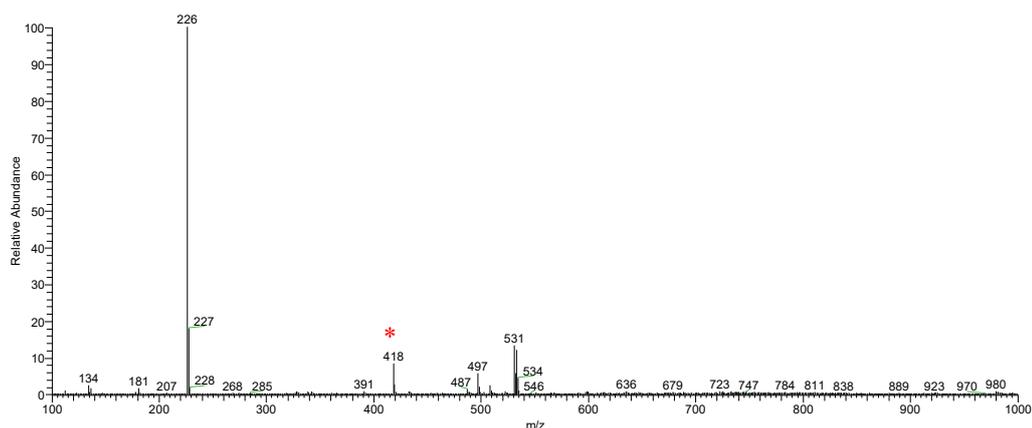


Figura 49 Espectro *full scan* da fração BFA.

O espectro de *full scan* da amostra BFD (Figura 50) exibiu o íon de m/z 226, íons referentes aos alcaloides precursores estefolidina (m/z 328) e isocoripalmina (m/z 342), assim como os íons previstos para os produtos da semissíntese com grupo benzil (m/z 418, 432, 508, 522 e 598), revelando assim que a maior parte dos produtos formados foram solubilizados na fração orgânica e que os alcaloides precursores não foram totalmente consumidos na reação.

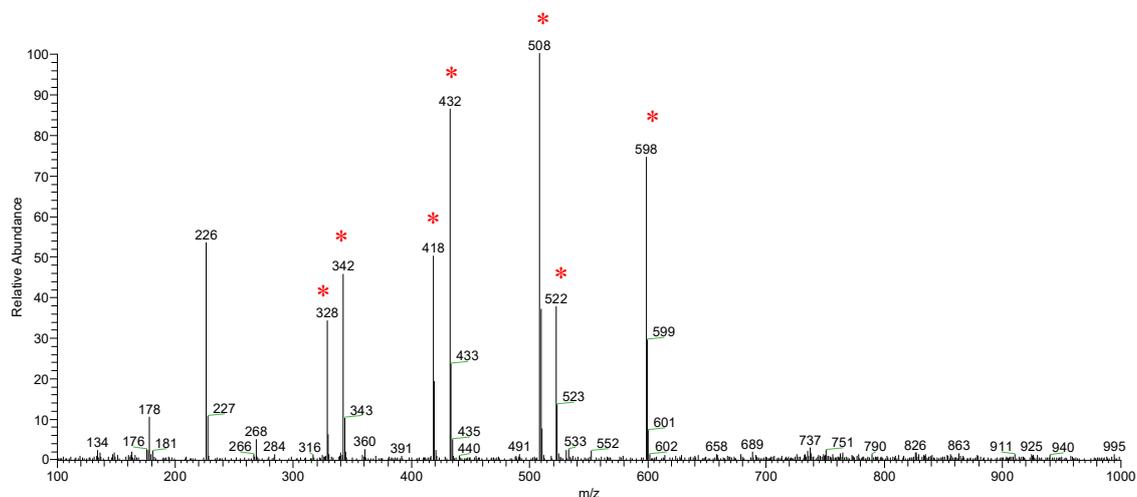


Figura 50. Espectro *full scan* da fração BFD.

5.2.4.2 Análises por HPLC-DAD-APCI-MS das frações BFA e BFD

Uma investigação mais abrangente foi realizada por HPLC-MS nas frações. No cromatograma obtido da amostra BFA (Figura 51A) foi possível observar a presença de um pico majoritário de m/z 226 (T_R 5,84 min) e dois picos minoritários de m/z 418 (T_R 7,81 e 8,62, respectivamente), confirmando os íons reportados no *full scan*.

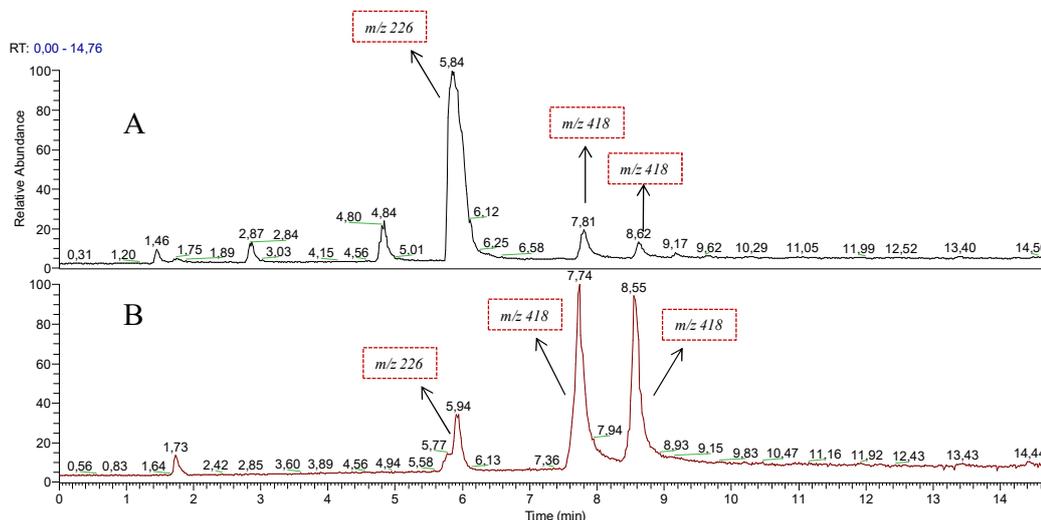


Figura 51. Cromatogramas das amostras BFA (A) e BFA1 (B) obtidas por HPLC-MS.

Também na análise cromatográfica foi notada a presença do íon de m/z 226, sendo este um provável produto do meio reacional o qual não envolve os alcaloides de interesse. Com intuito de remover este interferente e outros contaminantes, realizou-se um fracionamento em coluna aberta, resultando na amostra codificada como BFA1 (66,4 mg). O cromatograma por HPLC-MS obtido da amostra BFA1 (Figura 51B) permitiu observar uma melhor resposta para os isômeros de m/z 418 e a diminuição da intensidade do pico interferente (m/z 226). O método cromatográfico utilizado em escala analítica foi ajustado para escala semi-preparativa. O fracionamento resultou em 2 frações, sendo estas codificadas como BFA1.1 (14,8 mg) e BFA1.2 (19,6 mg). Ambas as amostras foram submetidas às análises de MS de baixa e alta resolução e RMN 1D e 2D para determinação estrutural.

O cromatograma de íons totais (TIC) (Figura 52A) da amostra BFD foi coerente com os dados obtidos por *full scan*. No cromatograma foi possível observar os íons correspondentes aos produtos da benzilação previstos no planejamento semissintético (m/z 418, 418, 432, 508), assim como seus alcaloides precursores (m/z 328 e 342).

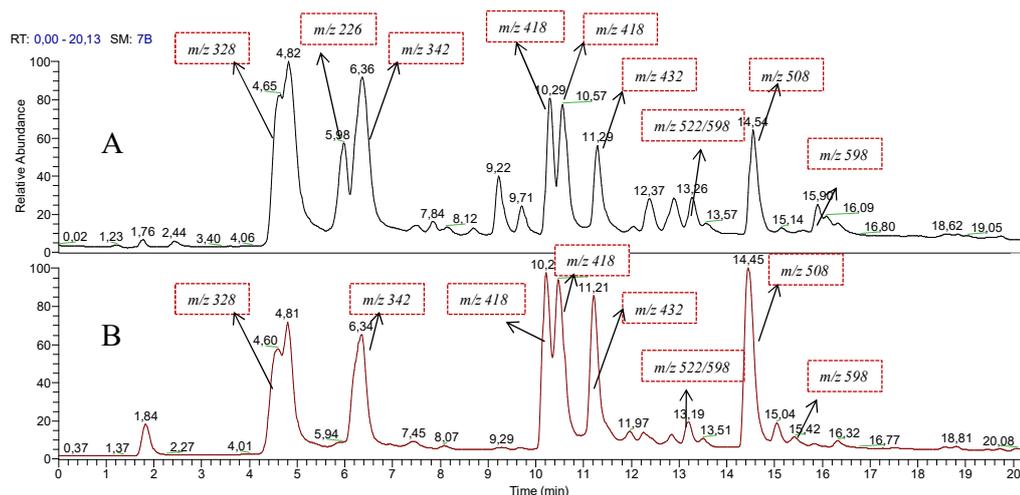


Figura 52. Cromatogramas das amostras BFD (A) e BFD 3 (B) obtidas por HPLC-MS.

Com intuito de remover interferentes e produtos indesejados, realizou-se um fracionamento em coluna aberta, sendo a amostra resultante codificada como BFD 3 (133,1 mg). O cromatograma obtido da amostra BFD 3 através de HPLC-MS (Figura 52B) permitiu observar uma melhor resposta para os produtos benzilados, além da diminuição dos picos indesejados. O método cromatográfico foi escalonado para sistema semi-preparativo e o fracionamento resultou em 12 frações, cujas codificações estão representadas na tabela 7. Após analisadas por espectrometria de massas, as frações codificadas como BFD 3.6 (15,3 mg) BFD 3.7 (13,5 mg), BFD 3.8 (10,3 mg) e BFD 3.11 (18,5 mg) foram submetidas as análises de MS de baixa e alta resolução e RMN 1D e 2D para determinação estrutural.

Tabela 7. Frações obtidas pela análise em CLAE em escala semi-preparativa da amostra BFD 3

Amostra	Massa (mg)
BFD 3.1	12,2
BFD 3.2	10,4
BFD 3.3	16
BFD 3.4	2,8
BFD 3.5	1,4
BFD 3.6	15,3
BFD 3.7	13,5
BFD 3.8	10,3
BFD 3.9	4,1

BFD 3.10 8,5

BFD 3.11 18,5

BFD 3.12 1,2

TOTAL 114,2

5.2.5 Determinação estrutural das substâncias benziladas isoladas das amostras BFA e BFD

5.2.5.1 Determinação estrutural da amostra BFA 1

A amostra codificada como BFA 1.1 (14,8 mg) foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela, com fórmula molecular $C_{26}H_{28}NO_4$, (m/z 418,2011), como determinado por espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS) (Figura 53). A entrada do grupo benzil na estrutura tetrahidroprotoberberínica foi evidenciada através do espectro de MS/MS (Figura 54), onde foram observadas perdas competitivas de 92 e 150 Da. A perda de 92 Da têm sido comumente observada em compostos *N*-benzilados, sendo atribuída à saída do grupo benzil na forma de tolueno ($C_6H_5CH_3$) (KUCK et al., 2011). Já a perda de 150 Da, como descrito anteriormente, é referente à saída do anel D contendo metoxila e hidroxila através de uma reação retro-Diels-Alder (RDA), portanto, corroborando com a proposta de benzilação no anel B (DEMARQUE et al., 2016).

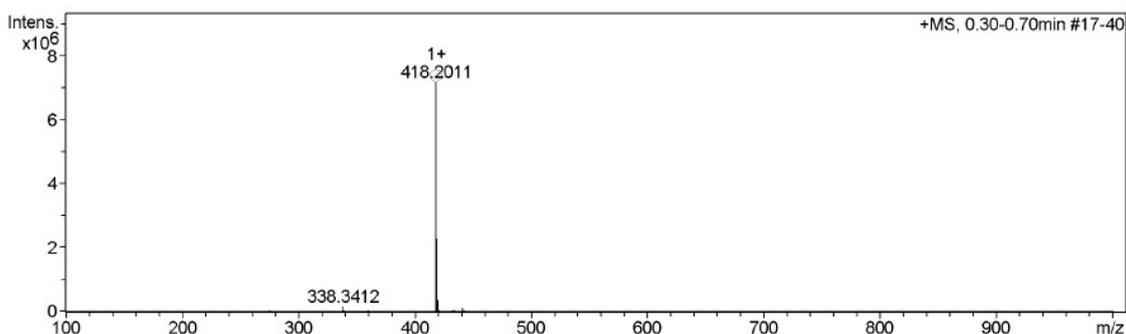


Figura 53. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFA 1.1

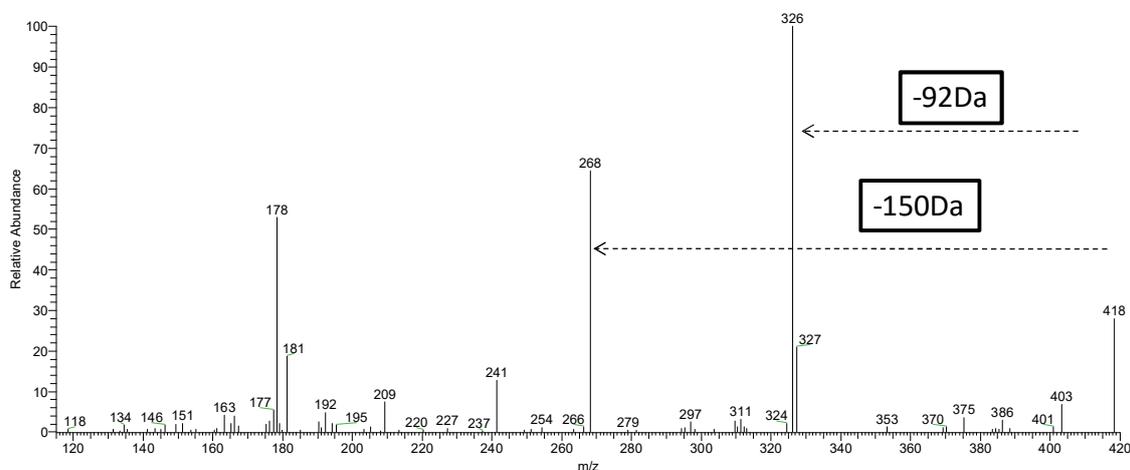


Figura 54. Espectro de MS/MS para o íon de m/z 418[M+H]⁺ da amostra BFA 1.1

No espectro de RMN de ^1H , na região dos aromáticos (Figura 55A), observou-se dupletos típicos em δ 7,12 (1H, d, 8,3 Hz) e 7,03 (1H, d, 8,3 Hz), indicativo da presença de um sistema *orto*-acoplado, bem como simpletos em δ 6,97 (1H, s) e 6,95 (1H, s) característico de alcaloides tetrahidroprotoberberínicos com hidrogênios em posição *para*, e dois sinais metoxílicos em δ 3,93 (3H, s) e δ 3,84 (3H, s) (Figura 55B). A confirmação do padrão de substituição nos anéis aromáticos foi obtida através do experimento HMBC (Figura 56). O hidrogênio em δ 6,95 (H-1) correlacionado a longa distância com carbono em δ 150,1 localizou a metoxila em C-3. Do mesmo modo, o hidrogênio em δ 7,03 (H-11) correlacionado a longa distância com carbono δ 145,2 indicou a presença da outra metoxila em C-9. As correlações dos sinais em δ 6,97 (H-4) e 7,12 (H-12) com os carbonos δ 148,0 e 150,4 definiram as posições dos carbonos ligados às hidroxilas em C-2 e C-10, respectivamente (Figura 56A). Confirmando assim, a similaridade da estrutura com o alcaloide estefolidina.

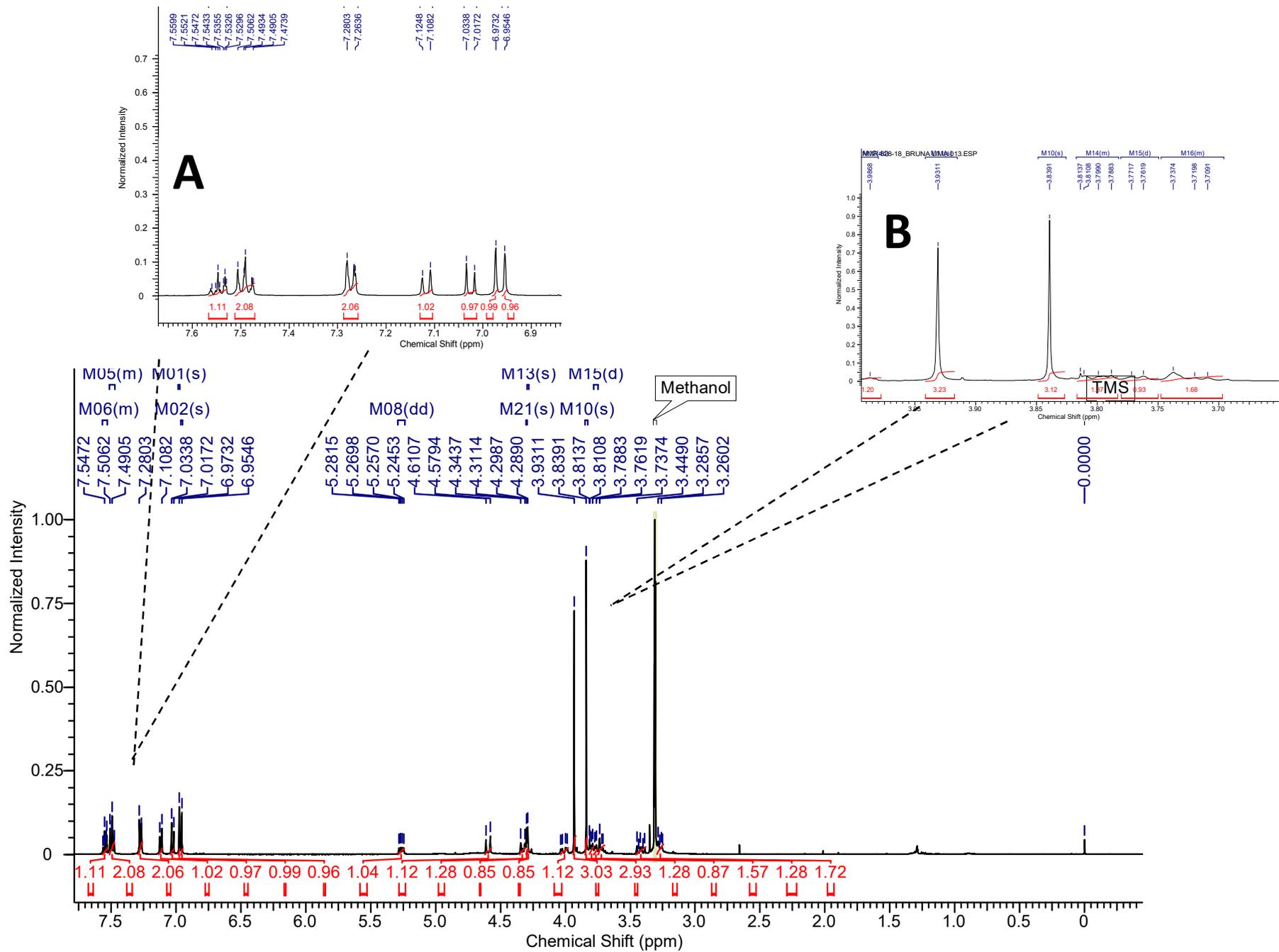


Figura 55 Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFA 1.1. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).

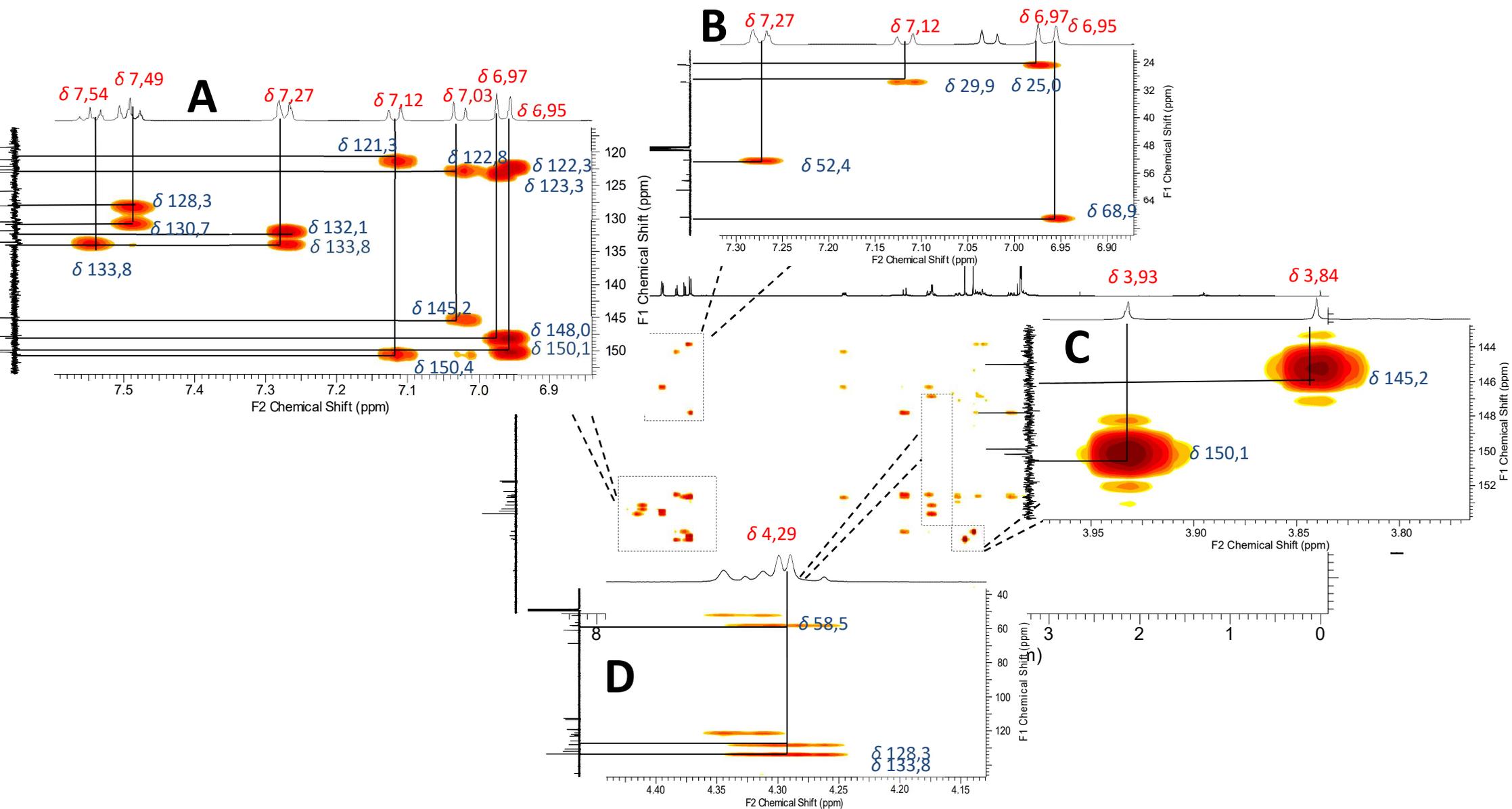


Figura 56. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFA 1.1. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (D).

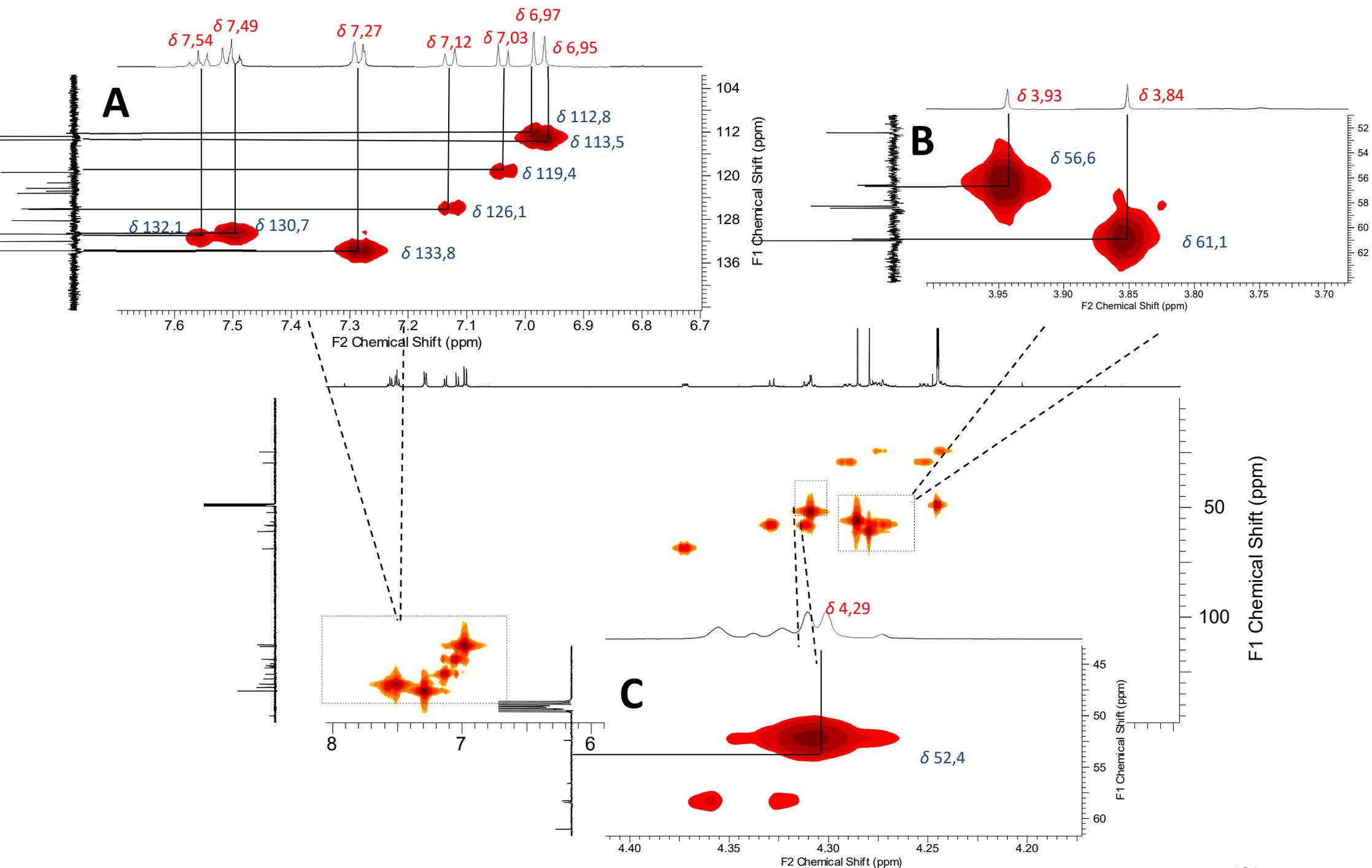


Figura 57. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFA 1.1. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C).

No espectro de RMN de ^1H também foram observados 3 sinais na região dos hidrogênios aromáticos, um em δ 7,54 (1H, m) e dois pares de hidrogênios quimicamente equivalentes em δ 7,27 (2H, m) e 7,49 (2H, m), caracterizando um anel benzênico na estrutura (Figura 55A). No mapa HSQC (Figura 57) foram observadas as correlações dos hidrogênios δ 7,27 (2H, m) e 7,49 (2H, m) com os carbonos em δ 133,8 e 130,7, respectivamente, confirmando tratar-se de um sistema simétrico, correspondendo aos carbonos C-2', C-6', C-5' e C-3', respectivamente (Figura 57A). No mapa de HMBC foi possível observar correlações desses hidrogênios com carbono em δ 132,1, atribuído ao C-4'. Estes dados confirmam o grupo benzil na molécula (Figura 56A).

A posição do grupo benzil foi confirmada através da correlação a longa distância dos hidrogênios metilênicos em δ 4,29 (2H, m) como os átomos de carbonos em δ 58,3 (C-8), 128,3 (C-1') e 133,8 (C-2') (Figura 56D e 58), corroborando com a proposta sugerida por espectrometria de massas.

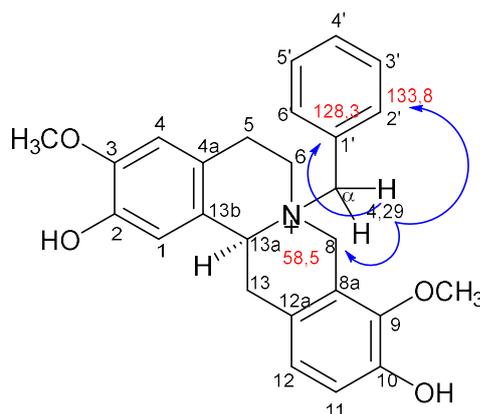


Figura 58. Correlações observadas dos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFA 1.1

A determinação inequívoca da estereoquímica da estrutura foi alcançada através de experimentos de rotação óptica e NOESY. A configuração da posição 13a foi atribuída como S de acordo com a configuração do precursor, sendo observada também uma rotação negativa ($[\alpha]_D^{25} = -33,88^\circ$, MeOH, c 0,072). Através do espectro de NOESY pode-se observar a correlação do hidrogênio metínico em δ 5,26 (C-13 a) com os hidrogênios metilênicos do grupo benzil em δ 4,29, confirmando a configuração R para o novo estereocentro (Figura 59).

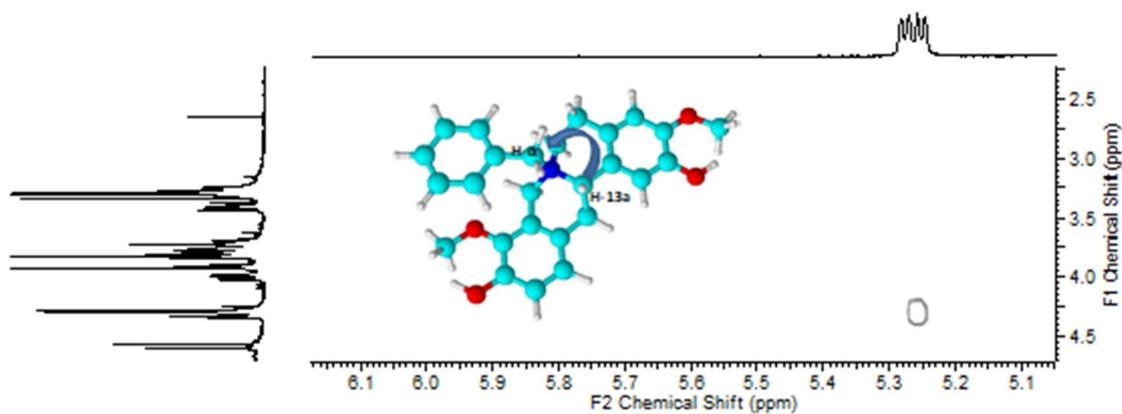


Figura 59. Mapa de NOESY (^1H 500 MHz, CD_3OD) da amostra BFA 1.1

Com base nessas informações foi possível determinar a amostra BFA 1.1 como sendo o alcaloide (-)-(7R,13aS)-7-benzilestefolidina, ainda não relatado na literatura (Figura 60). Na tabela 8 são apresentados os dados completos de RMN de ^1H e ^{13}C , além dos mapas de contorno HSQC e HMBC. Os dados obtidos foram comparados com o do alcaloide precursor estefolidina (COSTA et al., 2015).

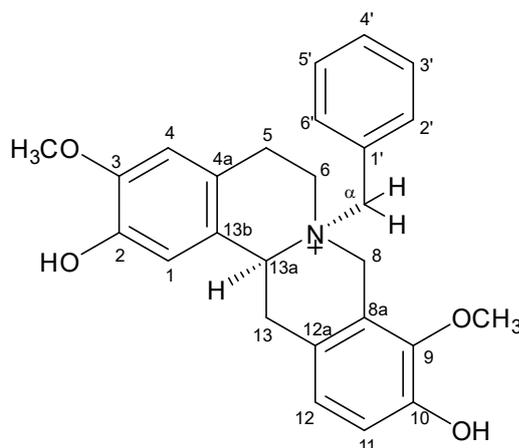


Figura 60. Estrutura do alcaloide (-)-(7R,13aS)-7-benzilestefolidina.

Tabela 8. Dados de RMN ¹H, HSQC e HMBC da amostra BFA 1.1

BFDA 1.1					
Posição	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ Hδ(mult., J em Hz) ^b	¹³ C ^{a,c}	¹³ C ^b	HMBC (¹ H- ¹³ C)
1	6,95 (s, 1H)	6,77 (s, 1H)	113,5	112,0	68,9; 122,3; 150,1
2	-	-	148,0	144,6	
3	-	-	150,1	146,3	
4	6,97 (s, 1H)	6,61 (s, 1H)	112,8	111,4	25,0; 123,2; 148,0
4 ^a	-	-	122,3	125,5	
5	3,27 (m, 1H)	2,69 (m, 1H)	25,0	28,7	122,3
5	3,77 (m, 1H)	3,11 (m, 1H)	25,0	28,7	58,3
6	3,72 (m, 1H)	2,67 (m, 1H)	58,3	52,0	25,0
6	3,80 (m, 1H)	3,21 (m, 1H)	58,3	52,0	25,0; 68,9; 122,3
8	4,33 (m, 1H)	3,55 (d, 1H 15,6)	58,5	54,1	52,4; 121,3
8	4,60 (d, 1H, 15.7)	4,20 (d, 1H 15,6)	58,5	54,1	68,9; 121,3; 145,2
8 ^a	-	-	121,3	127,9	-
9	-	-	145,2	143,8	-
10	-	-	150,4	147,5	-
11	7,03 (d, 1H, 8.3)	6,76 (d, 1H, 8,3)	119,4	115,4	122,8; 145,2
12	7,12 (d, 1H, 8.3)	6,80 (d, 1H, 8,3)	126,1	124,7	29,9; 121,3; 150,4
12 ^a	-	-	122,8	126,4	-
13	3,42 (m, 1H)	2,78 (dd, 1H, 16,0 e 11,4)	29,9	35,8	68,9; 123,2
13	4,01(dd, 1H, 17,9 e 5,6)	3,28 (dd, 1H, 16,0 e 3,9)	29,9	35,8	123,2
13a	5,26 (dd, 1H, 12.2 e 5.9)	3,57 (dd, 1H, 11,4 e 3,9)	68,9	59,6	29,9; 52, 4;123,0
13b	-	-	123,2	129,9	
3-OCH ₃	3,93 (s, 3H)	3,86 (s, 3H)	56,6	56,0	150,1
9-OCH ₃	3,84 (s, 3H)	3,83 (s, 3H)	61,1	60,2	145,2
α'	4,29 (m, 2H)	-	52,4	-	58,5; 128,3; 133,8
1'	-	-	128,3	-	-
2'	7,27 (m, 1H)	-	133,8	-	52,4; 133,8; 132,1
3'	7,49 (m, 1H)	-	130,7	-	128,3; 130,7
4'	7,54 (m, 1H)	-	132,1	-	133,8
5'	7,49 (m, 1H)	-	130,7	-	128,3; 130,7
6'	7,27 (m, 1H)	-	133,8	-	52,4; 133,8; 132,1

^a O experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125,76 MHz para ¹³C em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo com Costa et al., 2015 (¹H em CDCl₃ + gotas de CD₃OD 400 MHz).

^c O espectro de ¹³C está disponível na Figura A33.

5.2.5.2 Determinação estrutural da amostra BFA 1.2

A amostra codificada como BFA 1.2 (19,6 mg) foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela, com fórmula molecular $C_{26}H_{28}NO_4$, (m/z 418,2001), como determinado por HR-MS (Figura 61), sendo, portanto, um isômero do alcaloide (-)-(7S,13aS)-7-benzilestefolidina. Tal evidência foi ratificada com estudos de fragmentação (Figura 62), onde foi observado um perfil similar.

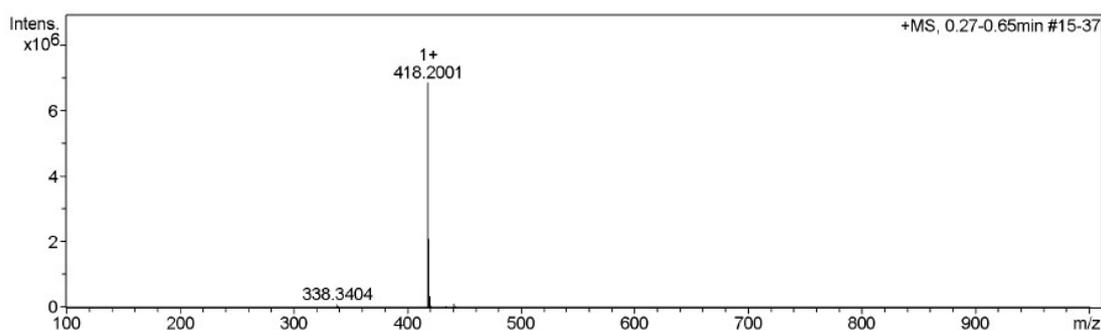


Figura 61. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFA 1.2

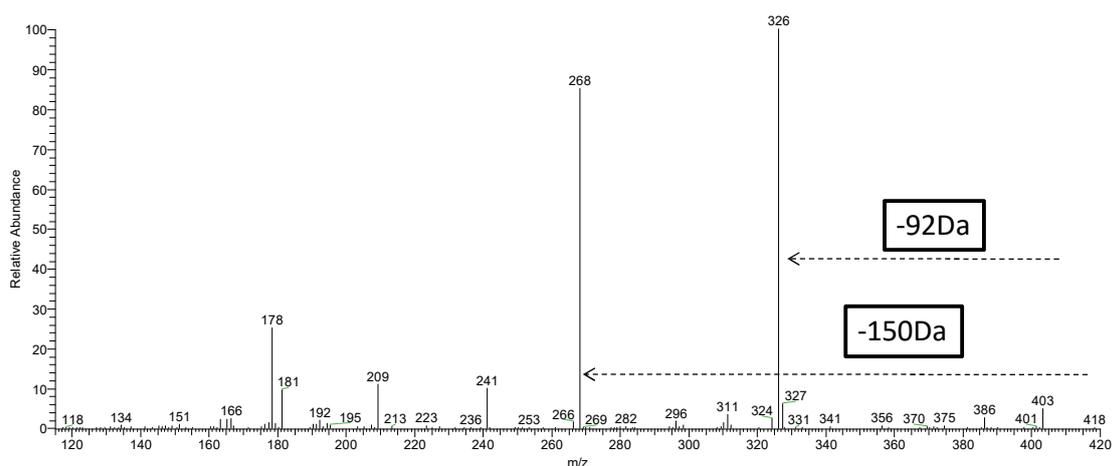


Figura 62. Espectro de MS/MS para o íon de m/z 418 $[M+H]^+$ da amostra BFA 1.2

O espectro de RMN de 1H (Figura 63) apresentou-se semelhante ao da amostra BFA 1.1, como sugerido pelas análises de massas. Foram observados sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,85 (1H, d 8.3 Hz) e 6,80 (1H, d 8.3 Hz) característicos de hidrogênios *orto*-acoplados referente ao anel D da estrutura do alcaloide estefolidina, além da presença dos simpletos em δ 6,96 (1H, s) e 6,78 (1H, s) característicos de hidrogênios na posição *para* em alcaloides tetrahidroprotoberberícos, atribuídos ao anel A. A presença do grupo benzil foi constatada pelos hidrogênios aromáticos em δ 7,57 (1H, m), 7,50 (2H, m) e 7,54 (2H, m) ligados com carbonos em δ 132,3, 134,4, e 130,7,

respectivamente (mapa HSQC) (Figura 64A), o que confirma a simetria do sistema benzênico.

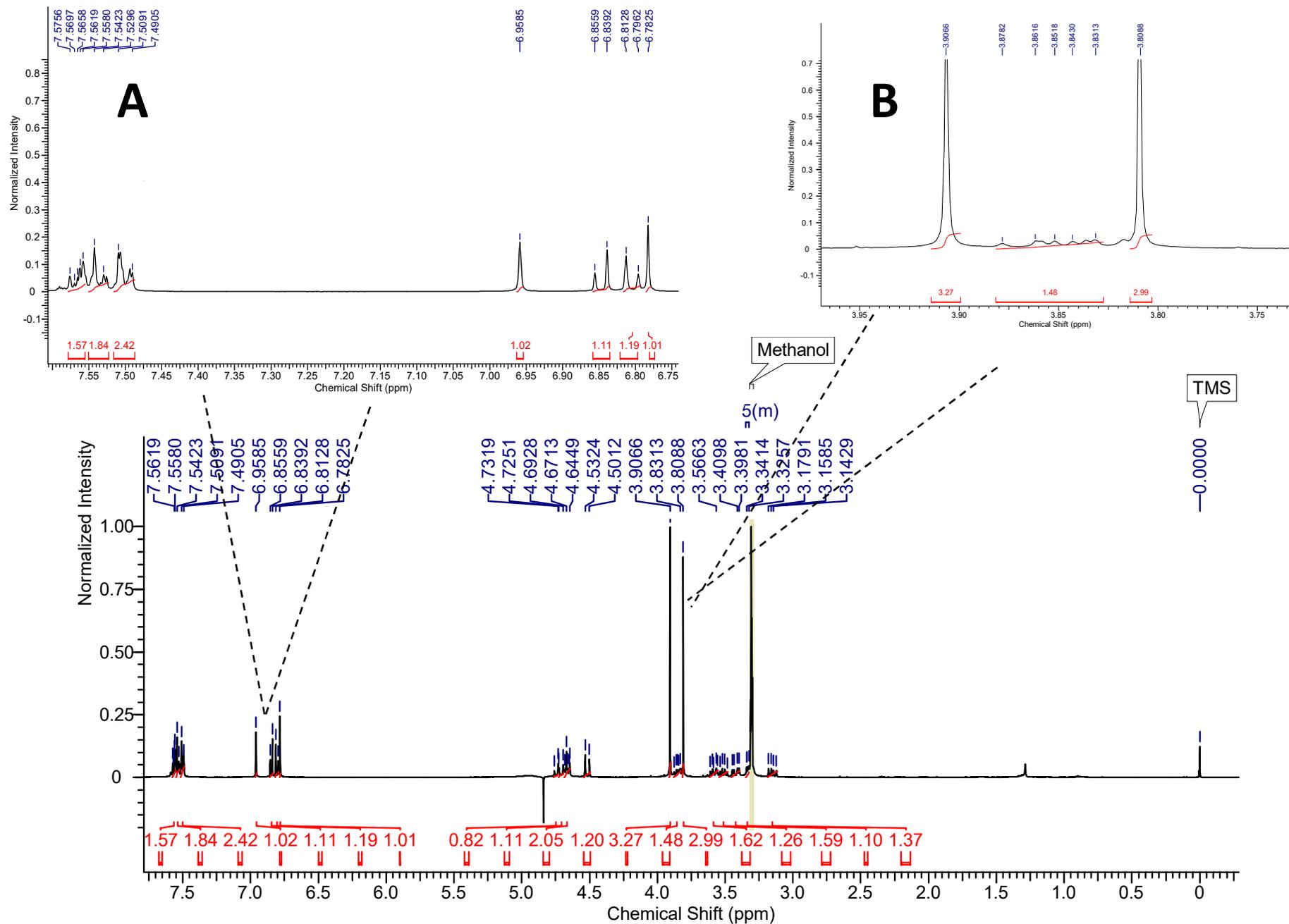


Figura 63. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFA 1.2. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).

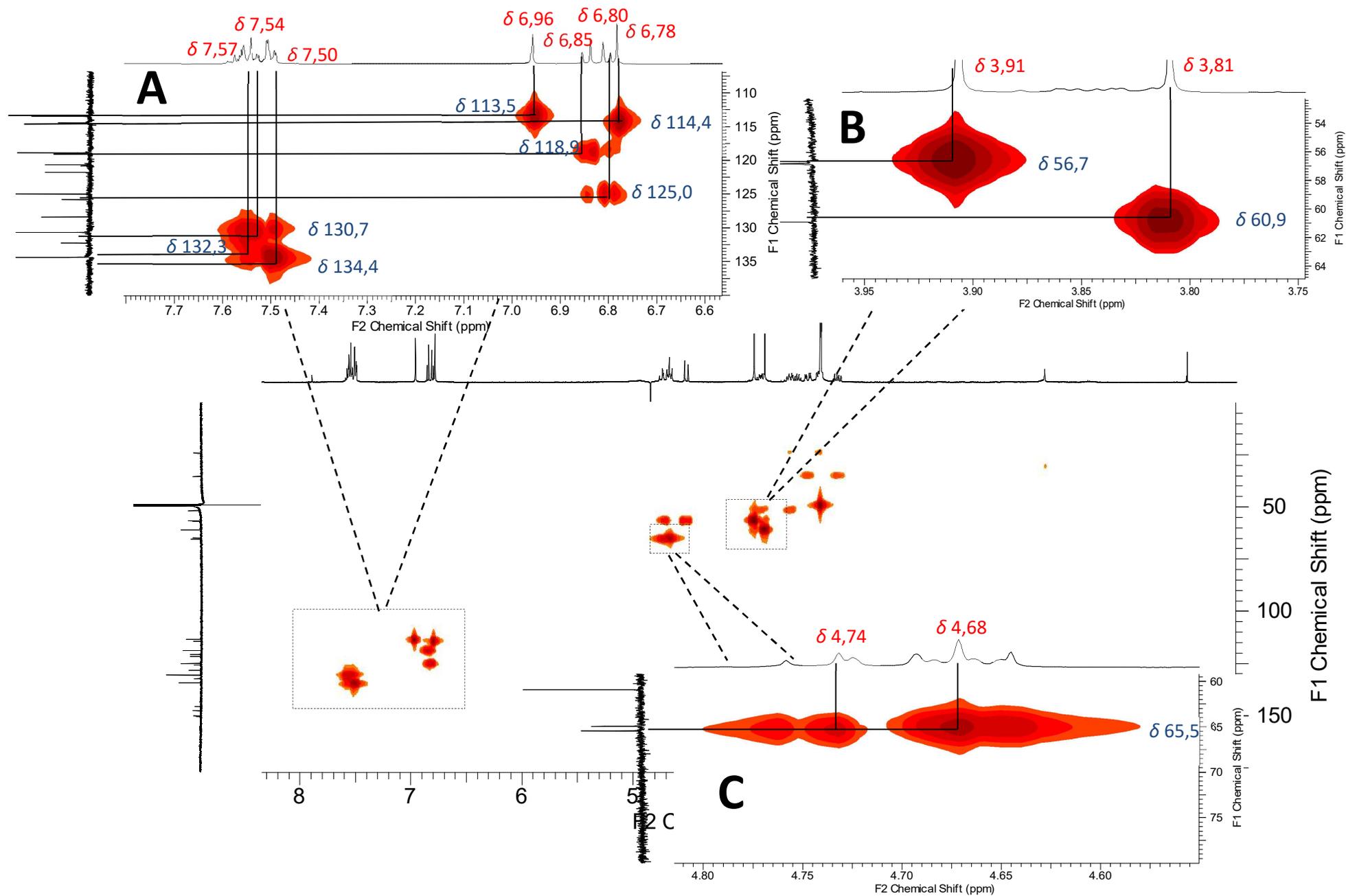


Figura 64. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFA 1.2. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C).

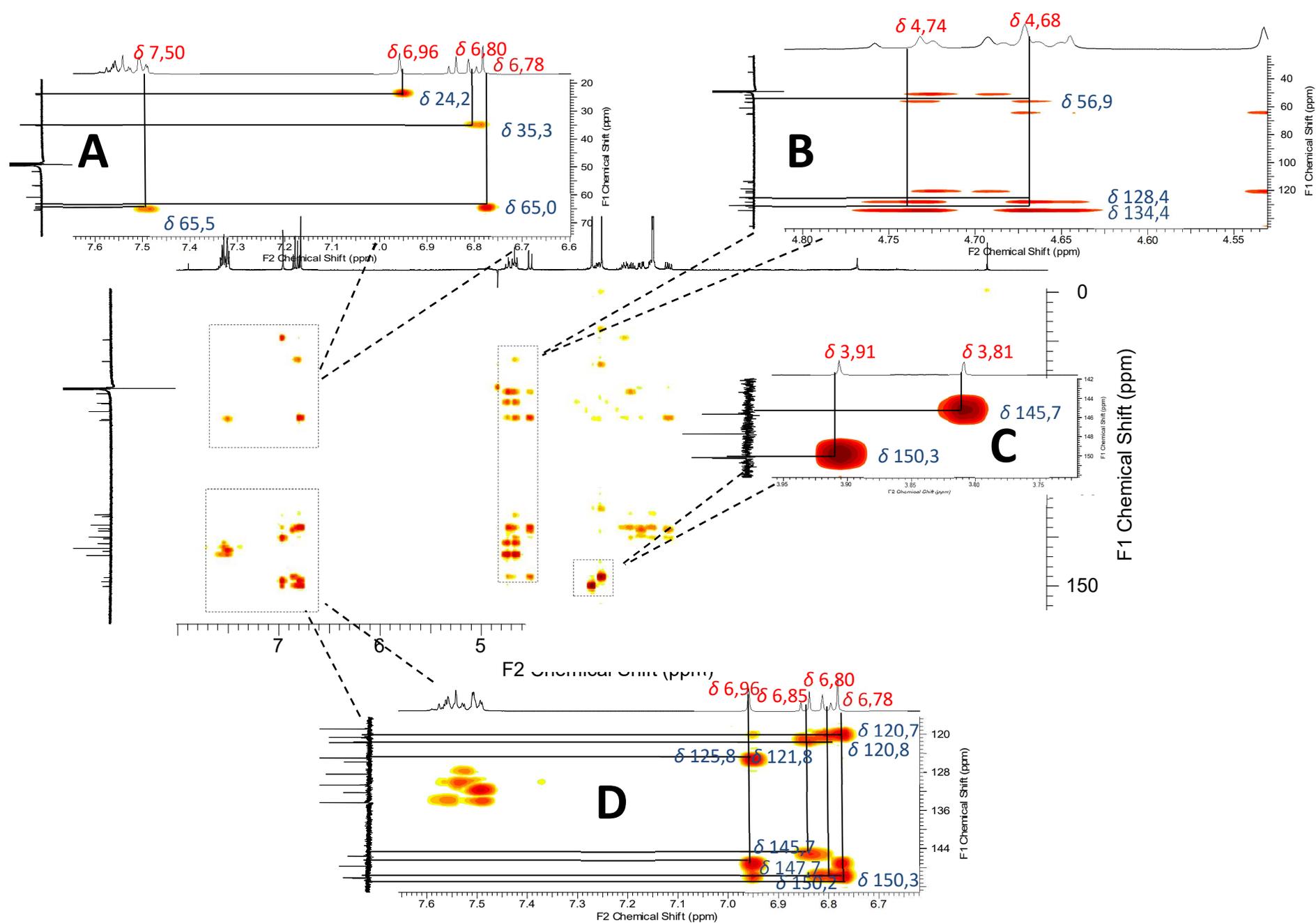


Figura 65. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFA 1.2. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (D).

Ainda nos espectros de RMN de ^1H , mapas HSQC e HBMC (Figura 65C) foram observados dois simpletos característicos de metoxilas em δ 3,91 (3H, s) e 3,81(3H, s) ligados aos carbonos δ 56,7 e 60,9, apresentando correlações J^3 com os carbonos em δ 150,3 (C-3) e 145,7 (C-9), respectivamente. As posições das hidroxilas foram definidas pelas correlações a J^3 dos sinais δ 6,96 (H-4) e 6,80 (H-12) com os carbonos δ 147,7 (C-2) e 150,2 (C-10), respectivamente (Figura 65A). A disposição do grupo benzil na estrutura foi confirmada através da observação dos multipletos em δ 4,68 (1H, m) e 4,74 (1H, m) correlacionado a J^1 com carbono em δ 65,5 (Figura 64C) e J^3 com os carbonos em δ 56,9, 128,4 e 134,4 (Figuras 65D e 66), podendo assim ratificar a presença do grupo benzil no átomo de nitrogênio.

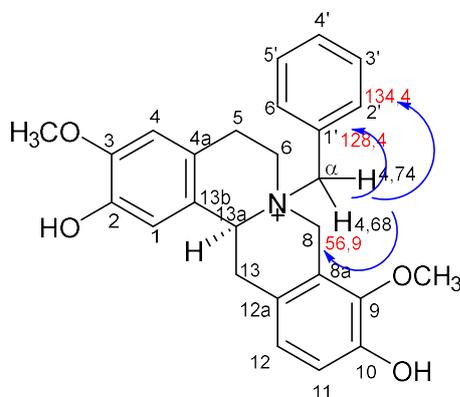


Figura 66. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFA 1.2.

A determinação da estereoquímica da estrutura BFA 1.2 foi alcançada através de experimentos de rotação óptica, NOESY e comparação com a estrutura BFA 1.1 (Figura 67). A configuração da posição 13a foi atribuída como S de acordo com a configuração do precursor, sendo observada também uma rotação negativa ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -35,10^\circ$, MeOH, c 0,082). Através do espectro de NOESY pode-se observar uma única correlação entre o hidrogênio metilênico do grupo benzil em δ 4,68 e o hidrogênio metilênico em δ 3,50 (H-5), sendo esta insuficiente para atribuir a configuração do nitrogênio. Entretanto, baseado na configuração da estrutura BFA 1.1, um epímero da amostra BFA 1.2, a configuração do novo estereocentro foi atribuída como S.

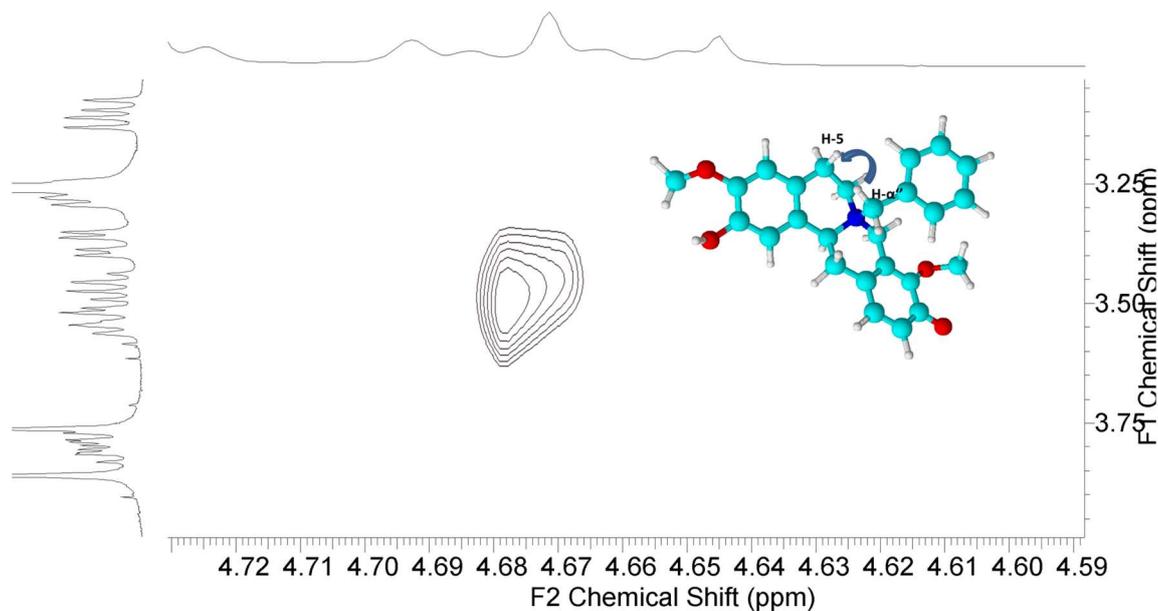


Figura 67. Mapa de NOESY (^1H 500 MHz, CD_3OD) da amostra BFA 1.2

Com base nessas informações foi possível determinar a amostra BFA 1.2 como sendo o alcaloide (-)-(7S,13aS)-7-benzilestefolidina, ainda não relatado na literatura (Figura 68). Na tabela 9 são apresentados os dados completos de RMN de ^1H e ^{13}C , além dos mapas de contorno HSQC e HMBC. Os dados obtidos foram comparados com o do alcaloide precursor estefolidina (COSTA et al., 2015).

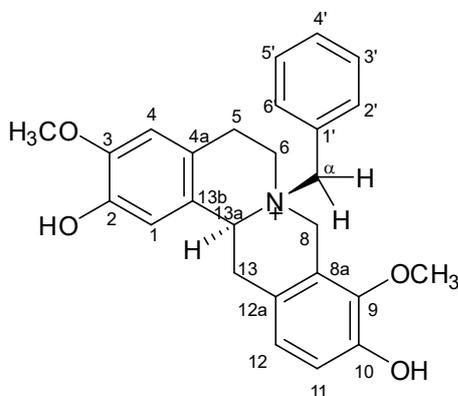


Figura 68. Estrutura do alcaloide (-)-(7S,13aS)-7-benzilestefolidina.

Tabela 9. Dados de RMN ¹H, HSQC e HMBC da amostra BFA 1.2

BFDA 1.2					
Posição	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ Hδ(mult., J em Hz) ^b	¹³ C ^a	¹³ C ^b	HMBC (¹ H- ¹³ C)
1	6,78 (s, 1H)	6,77 (s, 1H)	114,4	112,0	65,0; 120,7; 150,3
2	-	-	147,7	144,6	-
3	-	-	150,3	146,3	-
4	6,96 (s, 1H)	6,61 (s, 1H)	113,5	111,4	24,2; 125,8; 147,7
4a	-	-	120,7	125,5	-
5	3,33 (m, 1H)	2,69 (m, 1H)	24,2	28,7	-
5	3,50 (m, 1H)	3,11 (m, 1H)	24,2	28,7	51,7; 120,7
6	3,57 (m, 1H)	2,67 (m, 1H)	51,7	52,0	24,2
6	3,85 (m, 1H)	3,21 (m, 1H)	51,7	52,0	-
8	4,52 (d, 1H, 15,7)	3,55 (d, 1H 15,6)	56,9	54,1	51,7; 65,0; 120,7;145,7
8	4,71 (d, 1H, 15,7)	4,20 (d, 1H 15,6)	56,9	54,1	51,7; 65,0; 120,7; 121,8; 145,7
8a	-	-	120,8	127,9	-
9	-	-	145,7	143,8	-
10	-	-	150,2	147,5	-
11	6,85 (d, 1H, 8,3)	6,76 (d, 1H, 8,3)	118,9	115,4	121,8; 145,7
12	6,80 (d, 1H, 8,3)	6,80 (d, 1H, 8,3)	125,0	124,7	35,3; 120,8; 150,2
12a	-	-	121,8	126,4	-
13	3,15 (dd, 1H, 18.1 e 10)	2,78 (dd, 1H, 16,0 e 11,4)	35,3	35,8	65,0; 121,8
13	3,42 (dd, 1H, 18.1 e 10)	3,28 (dd, 1H, 16,0 e 3,9)	35,3	35,8	-
13a	4,66 (m, 1H)	3,57(dd, 1H, 11,4 e 3,9)	65,0	59,6	35,3; 114,4; 120,7; 125,8
13b	-	-	125,8	129,9	-
3-OCH3	3,91 (s, 3H)	3,86 (s, 3H)	56,7	56,0	150,3
9-OCH3	3,81(s, 3H)	3,83 (s, 3H)	60,9	60,2	145,7
α'	4,68 (m, 1H) e 4,74 (m, 1H)	-	65,5	-	56,9; 128,4; 134,4
1'	-	-	128,4	-	-
2'	7,50 (m, 1H)	-	134,4	-	65,5; 132,3; 134,4
3'	7,54 (m, 1H)	-	130,7	-	128,4; 130,7
4'	7,57 (m, 1H)	-	132,3	-	134,4
5'	7,54 (m, 1H)	-	130,7	-	-
6'	7,50 (m, 1H)	-	134,4	-	-

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H e 125,76MHz para ¹³C em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo com Costa et al., 2015 (¹H em CDCl₃ + gotas de CD₃OD 400 MHz).

^c O espectro de ¹³C está disponível na Figura A34

5.2.5.3 Determinação estrutural da amostra BFD 3.6

A amostra codificada como BFD 3.6 (15,3 mg) foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela, com fórmula molecular $C_{26}H_{28}NO_4$, (m/z 418,2010), como determinado por HR-MS (Figura 69), sendo portanto um isômero dos alcaloides (-)-(7S,13aS)-7-benzilestefolidina e (-)-(7R,13aS)-7-benzilestefolidina. Porém, quando submetida à fragmentação (Figura 70) apresentou um perfil distinto, visto que a perda inicial observada foi de 91 Da. Tal perda tem sido reportada em compostos *O*-benzilados, sendo a perda de 91 Da referente à saída do grupo benzil na forma radicalar ($C_6H_5CH_2\cdot$) (KUCK et al., 2018).

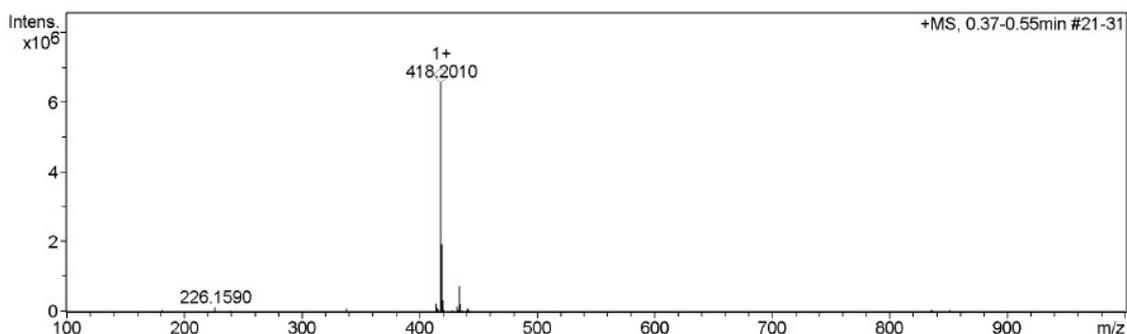


Figura 69. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFD 3.6

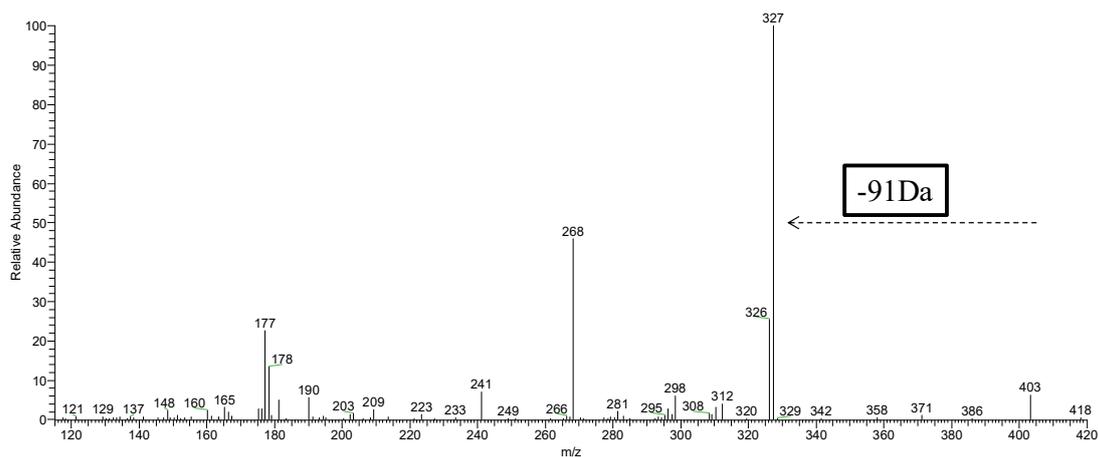


Figura 70. Espectro de MS/MS para o íon m/z 418[M+H]⁺ da amostra BFD3.6

No espectro de RMN de ^1H (Figura 71) foram observados deslocamentos em δ 6,90 (1H, s), 6,75 (1H, s), 6,76 (1H, d, 8,3 Hz) e 6,80 (1H, d, 8,3 Hz) atribuídos, respectivamente, às posições H-1, H-4, H-11 e H-12 da estrutura tetrahidroprotoberberínica (Figura 71A). Ainda no espectro de RMN de ^1H e o mapa HSQC (Figura 72) foram observados os hidrogênios referentes ao grupo benzil em δ 7,44 (2H, m), 7,37 (1H, m) e 7,29 (2H, m) ligados com carbonos em δ 127,6 (C'2 e C'6), 128,9 (C'4) e 129,4 (C'3 e C'5) (Figura 72A). As posições das metoxilas foram verificadas pelas correlações dos hidrogênios δ 3,83 (3H, s) e 3,82 (3H, s) a J^3 com carbonos em δ 150,4 e 145,0, atribuídas assim às posições C3 e C9, respectivamente (Figura 73C). Já os carbonos ligados às hidroxilas foram definidos pelas correlações J^3 do simpleto em δ 6,75 (H-4) e o duplete em δ 6,80 (H-12) com os carbonos em δ 148,1 (C-2) e 149,0 (C-10), respectivamente (Figura 73A)

Os dados RMN de ^1H , HSQC e HMBC apresentaram-se muito similares aos das frações BFA 1.1 e BFA 1.2, exceto pela presença de um simpleto em δ 5,09 (2H, s) que se correlacionou a J^1 com o carbono em δ 72,6 e J^3 com carbonos atribuídos ao anel benzênico em δ 127,6 (C'2 e C'6) 138,7 (C'1) e carbono ligado ao oxigênio em δ 148,2 (C-2), podendo assim constatar a presença do grupo benzil na posição C-2 (Figura 74). A configuração da posição 13a foi atribuída como S de acordo com a configuração do precursor, sendo observada também uma rotação negativa ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -387,60^\circ$, MeOH, c 0,26). Com base nessas informações foi possível determinar a amostra BFD 3.6 como sendo o alcaloide (-)-(S)-2-O-benzilestefolidina (Figuras 75), já reportado na literatura através de uma patente. Devido à ausência dos dados de RMN na literatura, os dados obtidos foram comparados com o do alcaloide precursor estefolidina (COSTA et al., 2015). Na tabela 10 são apresentados os dados completos de RMN de ^1H e ^{13}C e dos mapas de contorno HSQC e HMBC.

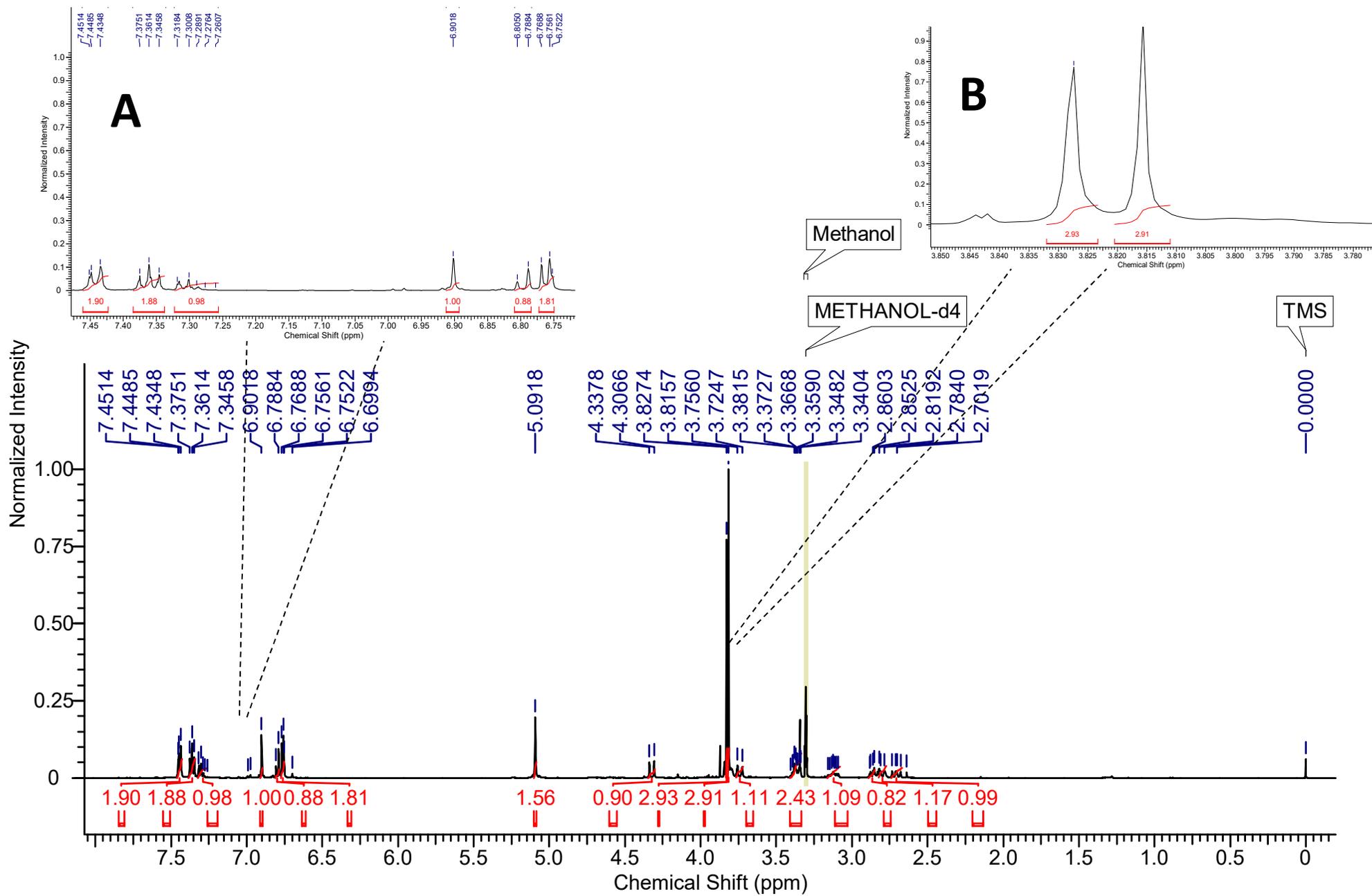


Figura 71. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD3.6. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).

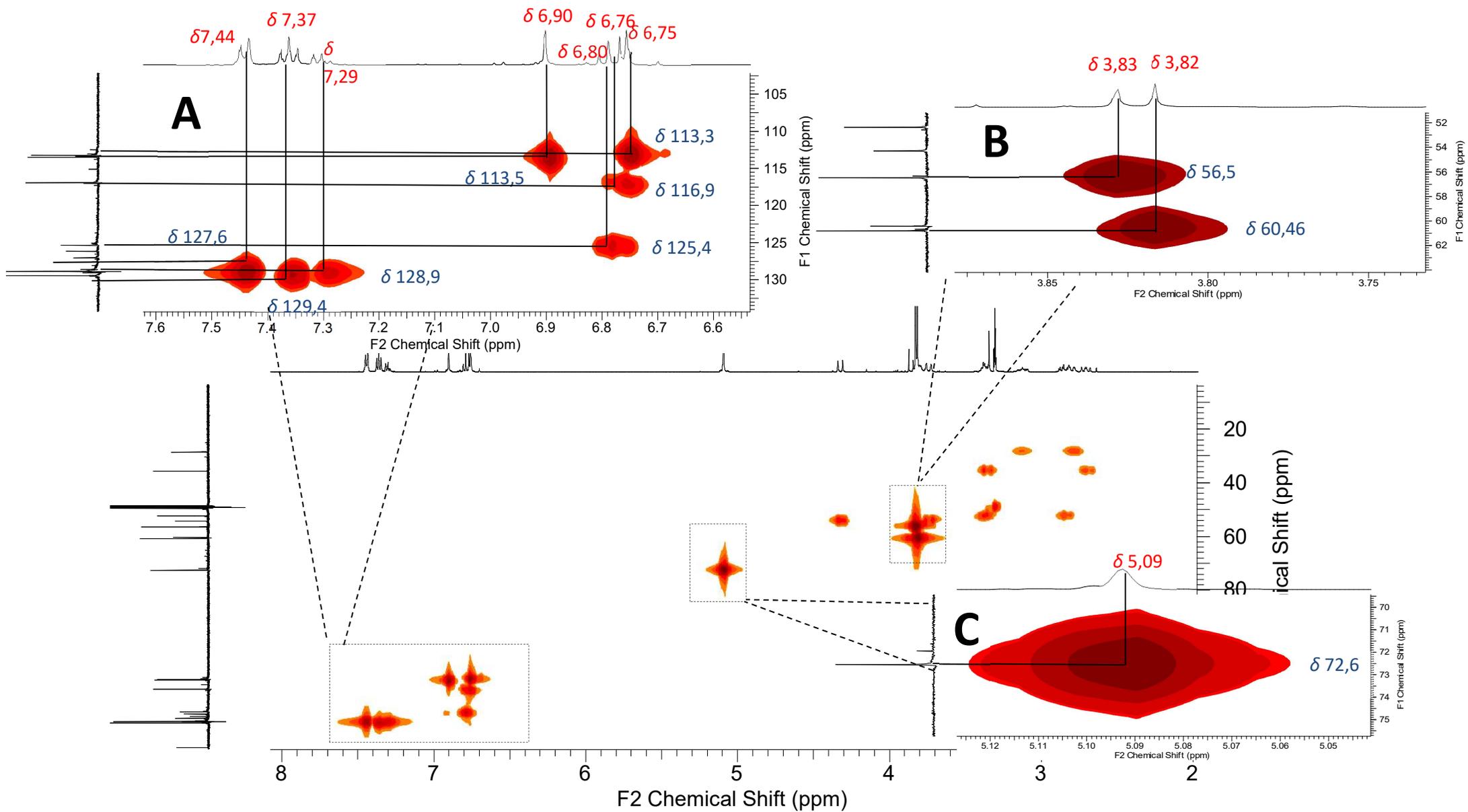


Figura 72. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFA 3.6. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C).

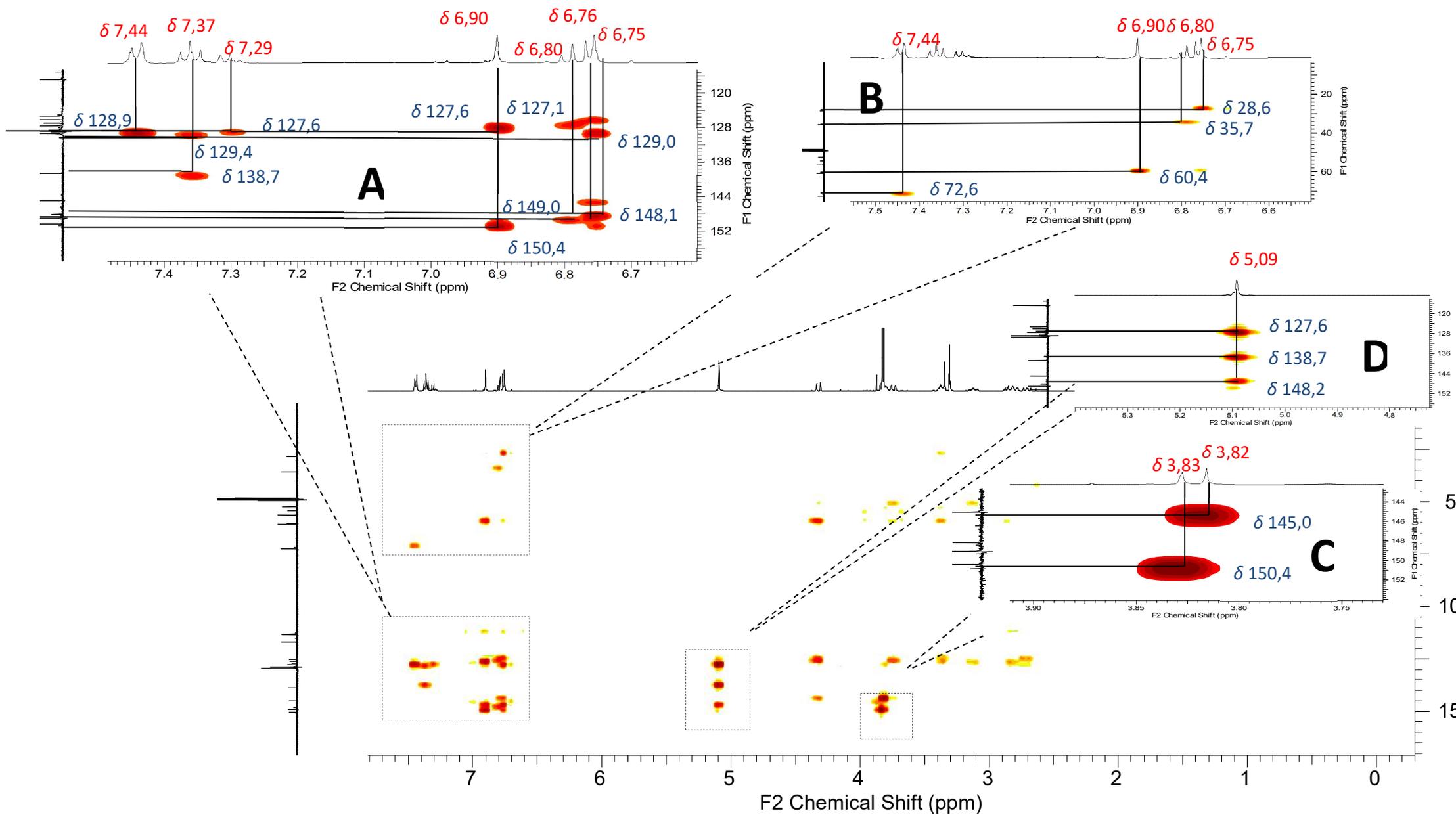


Figura 73. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFA 3.6. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), (B), 17 ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (D).

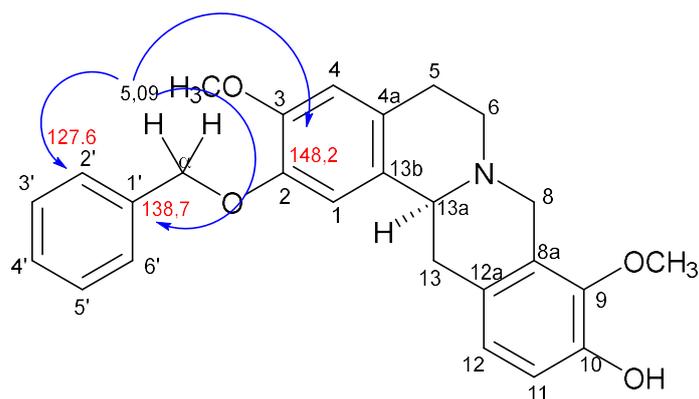


Figura 74. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.6.

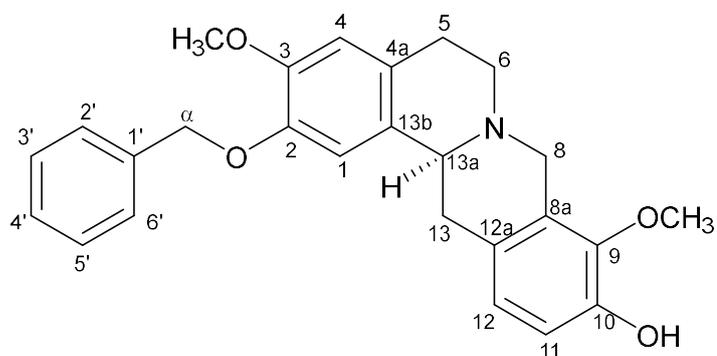


Figura 75. Estrutura do alcaloide (-)-(-)-2-O-benzilestefolidina.

Tabela 10. Dados de RMN ^1H , HSQC e HMBC da amostra BFD 3.6

BFD 3.6					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H}\delta$ (mult., J em Hz) ^b	$^{13}\text{C}^{\text{a,c}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	6,90 (s, 1H)	6,77 (s,1H)	113,5	112,0	60,4; 127,6; 150,4
2	-	-	148,2	144,6	-
3	-	-	150,4	146,3	-
4	6,75 (s, 1H)	6,61(s,1H)	113,3	111,4	28,6; 129,0; 148,2
4a	-	-	127,6	125,5	-
5	2,80 (m, 1H)	2,69 (m, 1H)	28,6	28,7	-
5	3,12 (ddd,1H,16,1 e 11,2 e 5,4 Hz)	3,11 (m, 1H)	28,6	28,7	52,4f; 127,6f
6	2,87 (m, 1H)	2,67 (m, 1H)	52,4	52,0	28,6; 60,4
6	3,37 (m, 1H)	3,21 (m, 1H)	52,4	52,0	-
8	3,74 (d, 1H, 15,6)	3,55 (d, 1H 15,6)	54,3	54,1	52,4; 126,2; 145,0
8	4,4 (d, 1H, 15,6)	4,20 (d, 1H 15,6)	54,3	54,1	60,4; 126,2; 145,0
8a	-	-	127,1	127,9	-
9	-	-	145,0	143,8	-
10	-	-	149,0	147,5	-
11	6,76 (d, 1H, 8,3)	6,76 (d, 1H, 8,3)	116,9	115,4	126,2; 145,0
12	6,80 (d, 1H, 8,3)	6,80 (d, 1H, 8,3)	125,4	124,7	35,7; 127,1; 149,0
12a	-	-	126,2	126,4	-
13	2,71 (dd, 1H16,1 e 11,4)	2,78 (dd, 1H, 16,0 e 11,4)	35,7	35,8	60,4f; 126,1f
13	3,37 (m, 1H)	3,28 (dd, 1H, 16,0 e 3,9)	35,7	35,8	-

13a	3,37 (m, 1H)	3,57 (dd, 1H, 11,4 e 3,9)	60,4	59,6	-
13b			129,1	129,9	
3-OCH₃	3,83 (s, 3H)	3,86 (s, 3H)	56,5	56,0	150,4
9-OCH₃	3,82 (s, 3H)	3,83 (s, 3H)	60,4	60,2	145,0
α'	5,09 (s, 2H)	-	72,6	-	127,6; 138,7; 148,2
1'	-	-	138,7	-	-
2'	7,44 (m, 1H)	-	127,6	-	72,6; 128,9
3'	7,37 (m, 1H)	-	129,4	-	129,4; 138,7
4'	7,29 (m, 1H)	-	128,9	-	127,6
5'	7,37 (m, 1H)	-	129,4	-	129,4; 138,7
6'	7,44 (m, 1H)	-	127,6	-	72,6; 128,9

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H e 125,76MHz para ¹³C em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo com Costa et al., 2015 (¹H em CDCl₃ + gotas de CD₃OD 400 MHz).

^c O espectro de ¹³C está disponível na Figura A35.

5.2.5.4 Determinação estrutural da amostra BFD 3.7

A amostra codificada como BFD 3.7 (13,5 mg) foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela, com fórmula molecular $C_{26}H_{28}NO_4$, (m/z 418, 2009), como determinado por HR-MS (Figura 76), sendo portanto um isômero dos alcaloides previamente determinados. Quando submetido à fragmentação (Figura 77) foi possível observar uma perda de 91 Da, tal como observado para o alcaloide (-)-(S)-2-*O*-benzilestefolidina, sendo portanto atribuída à saída radicalar do grupo benzil ($C_6H_5CH_2$). Também foi possível observar a formação do íon de m/z 178, sugerindo ausência de benzilação no anel A, como previsto pela fragmentação de tetrahidroprotoberberínicos via reação retro-Diels-Alder (RDA) (DEMARQUE et al., 2016).

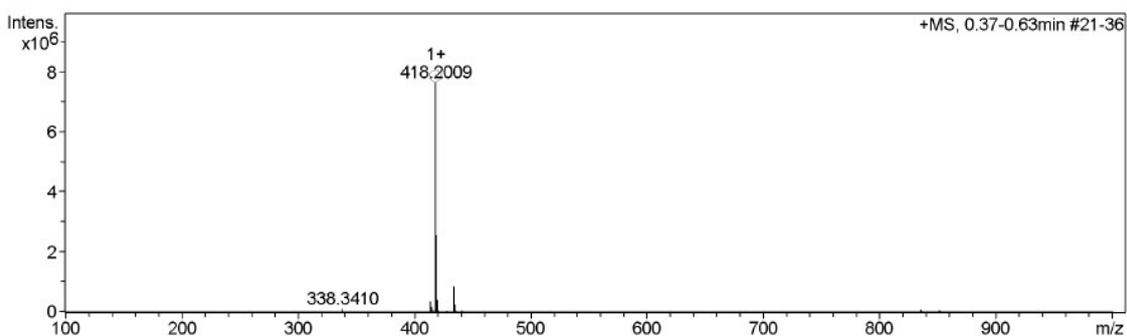


Figura 76. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BF D3.7.

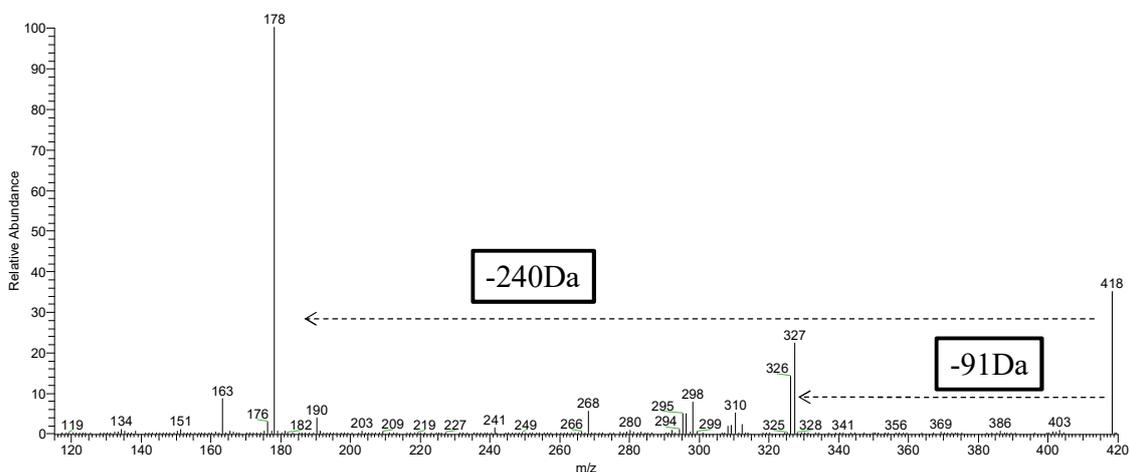


Figura 77. Espectro de MS/MS para o íon m/z 418 $[M+H]^+$ da amostra BFD 3.7.

O espectro RMN de ^1H (Figura 78) apresentou-se muito similar ao de BFD 3.6. Na região dos hidrogênios aromáticos foram observados os sinais em δ 6,75 (1H, s), 6,68 (1H, s), 6,97 (1H, d 8.5 Hz) e 6,90 (1H, d 8.5 Hz) característicos respectivamente de hidrogênios em posição *para* e *orto* acoplados, além da presença dos hidrogênios referentes ao grupo benzil em δ 7,45 (2H, m), 7,30 (1H, m) e 7,37 (2H, m). Através dos espectros de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (Figuras 79 e 80) foi constatado que as metoxilas em δ 3,82 (3H, s) e 3,86 (3H, s) se correlacionavam a J^I com os carbonos em δ 56,5 e 60,8, e J^3 com os carbonos em δ 148,3 e 147,0, atribuídas assim nas posições C-3 e C-9, respectivamente. Já os carbonos ligados com oxigênio foram definidos pelas correlações J^3 dos hidrogênios em δ 6,68 e 6,90 com os carbonos em δ 146,5 (C-2) e 151,0 (C-10), respectivamente. A localização do grupo benzil na estrutura foi constatada pela observação do simpleto em δ 5,08 (2H, s) que se correlacionou a J^I com o carbono em δ 72,1 e J^3 com os carbonos em δ 128,8, 138,8 e 150,9, podendo assim constatar a presença do grupo benzil na posição C-10 (Figura 81).

A configuração da posição 13a foi atribuída como S de acordo com a configuração do precursor, sendo observada também uma rotação negativa ($[\alpha]_D^{25} = -146,02^\circ$, MeOH, c 0,42). Com base nessas informações foi possível determinar a amostra BFD 3.7 como sendo o alcaloide (-)-(S)-10-O-benzilestefolidina (Figuras 82), ainda não relatado na literatura. Na tabela 11 são apresentados os dados completos de RMN de ^1H e ^{13}C e dos mapas de contorno HSQC e HMBC. Os dados obtidos foram comparados com o do alcaloide precursor estefolidina (COSTA et al., 2015).

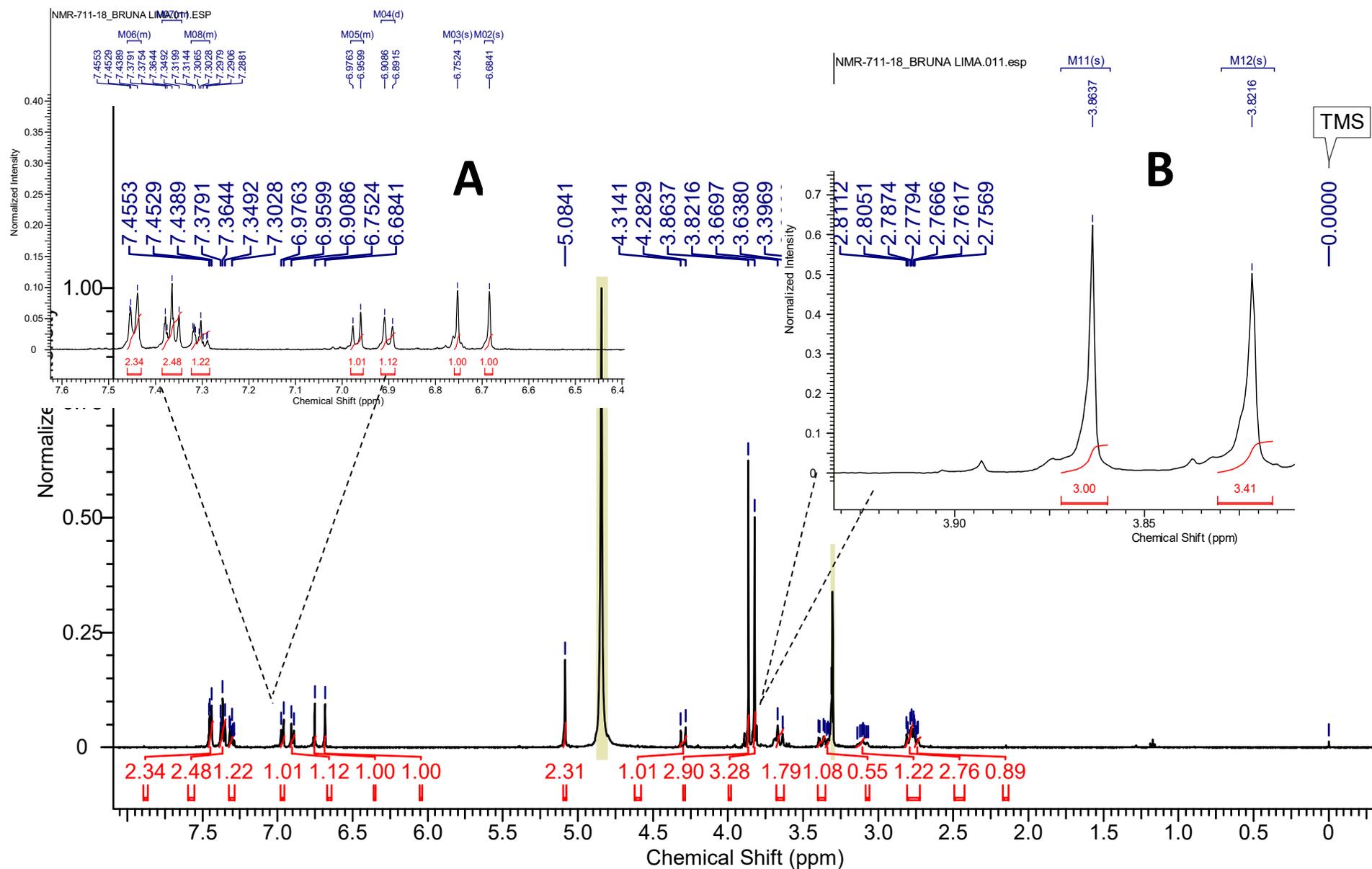


Figura 78. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.7. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).

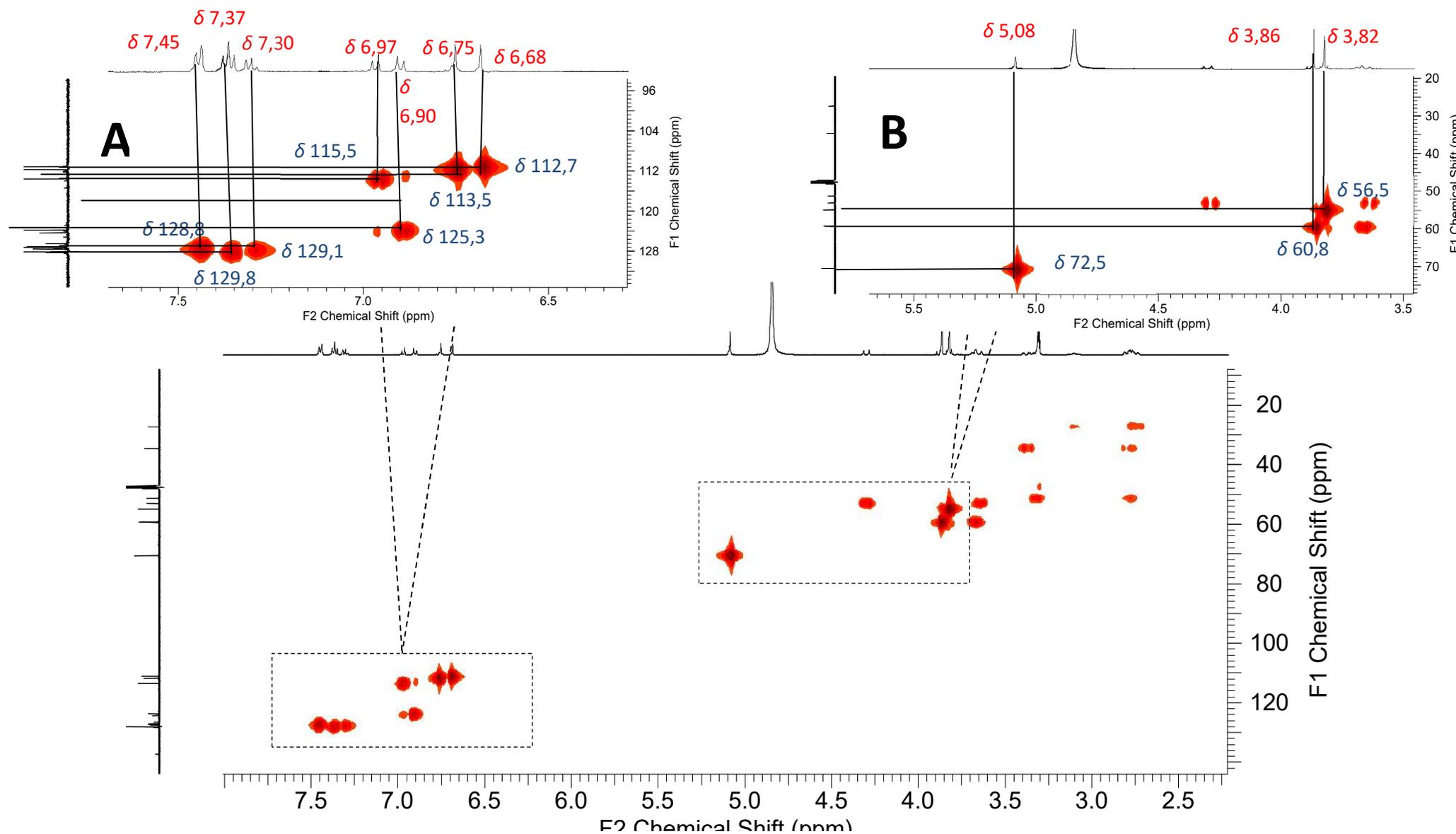


Figura 79. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFD 3.7. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos e dos hidrogênios metilênicos (B).

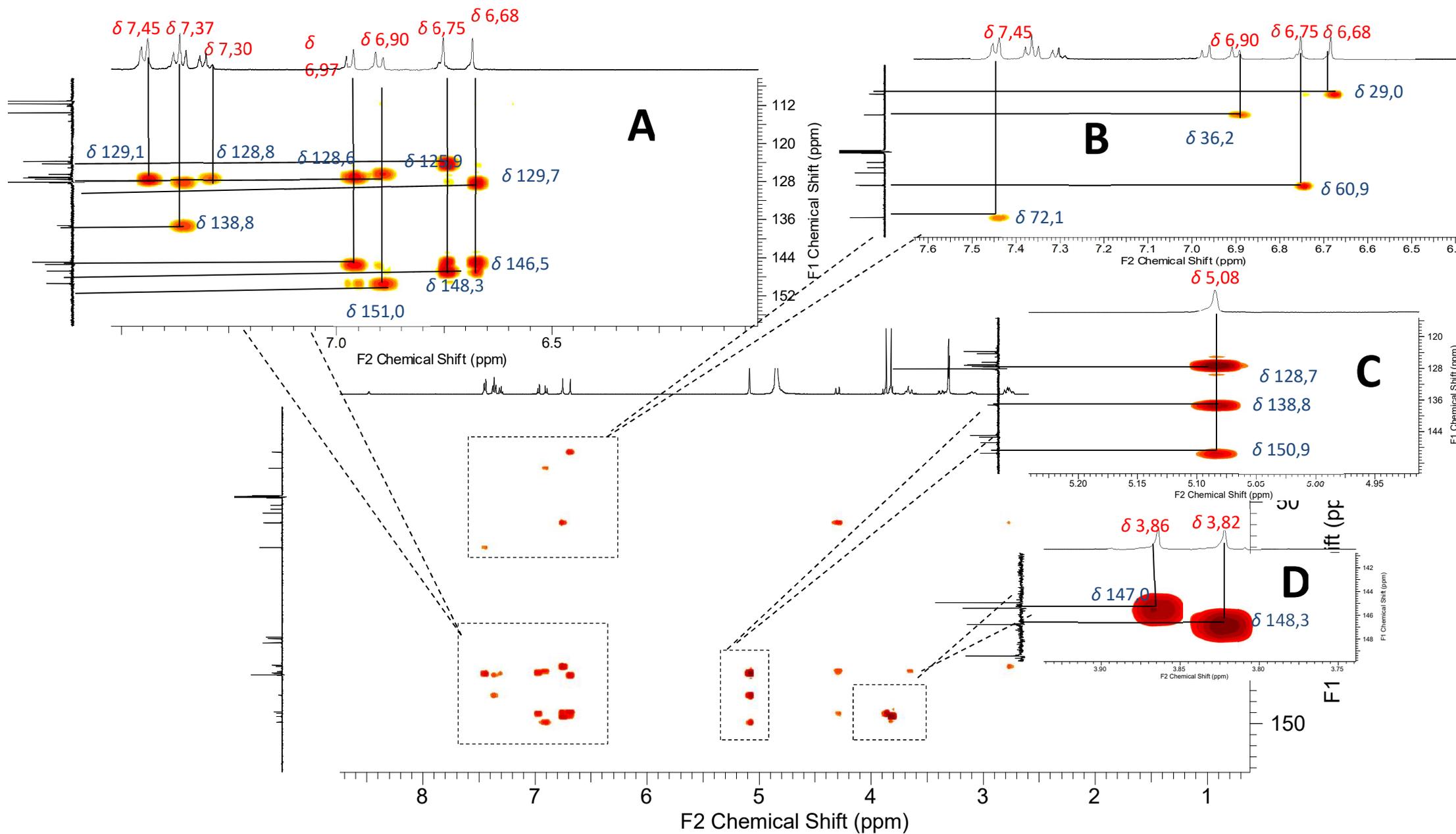


Figura 80. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFD 3.7. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (D).

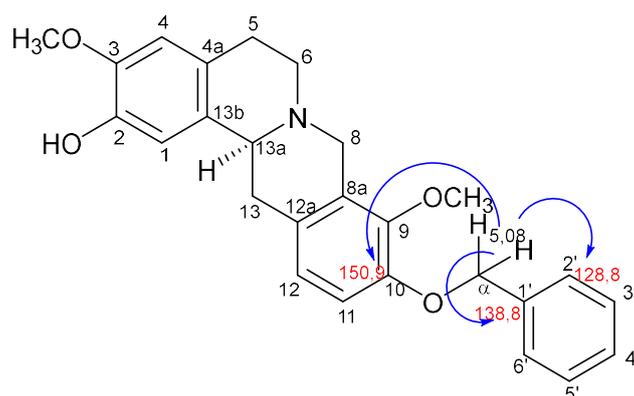


Figura 81. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.7.

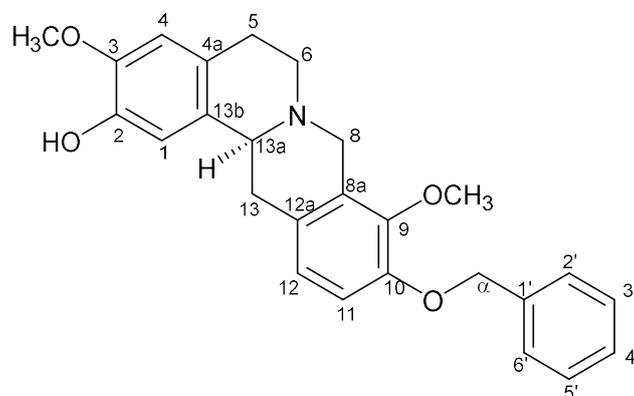


Figura 82. Estrutura do alcaloide (-)-(S)-10-O-benzilestefolidina.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H , HSQC e HMBC da amostra BFD 3.7.

BFD 3.7					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H}\delta$ (mult., J em Hz) ^b	$^{13}\text{C}^{\text{a,c}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	6,75(s, 1H)	6,77 (s, 1H)	113,3	112,0	60,9; 125,9; 148,3
2	-	-	146,5	144,6	-
3	-	-	148,3	146,3	-
4	6,68 (s, 1H)	6,61(s, 1H)	112,7	111,4	29,0; 129,7; 146,5
4a	-	-	125,9	125,5	-
5	2,74 (m, 1H)	2,69 (m, 1H)	29,0	28,7	112,7; 125,9
5	3,10 (m, 1H)	3,11 (m, 1H)	29,0	28,7	52,9; 125,9
6	2,79 (m, 1H)	2,67 (m, 1H)	52,9	52,0	-
6	3,34 (m, 1H)	3,21 (m, 1H)	52,9	52,0	29,0
8	3,65 (m, 1H)	3,55 (d, 1H 15,6)	54,7	54,1	-
8	4,3 (d, 1H, 15,6)	4,20 (d, 1H 15,6)	54,7	54,1	60,9; 128,0; 147,0
8a	-	-	128,0	127,9	-
9	-	-	147,0	143,8	-
10	-	-	151,0	147,5	-
11	6,97 (d, 1H, 8,5)	6,76 (d, 1H, 8,3)	115,1	115,4	128,6; 147,0
12	6,90 (d, 1H, 8,5)	6,80 (d, 1H, 8,3)	125,3	124,7	36,2; 128,0; 151,0
12a	-	-	128,6	126,4	-
13	2,79 (m, 1H)	2,78 (dd, 1H, 16,0 e 11,4)	36,2	35,8	60,9
13	3,38 (dd, 1H, 16,3 e 4,1)	3,28 (dd, 1H, 16,0 e 3,9)	36,2	35,8	60,9; 125,3; 128,6

13a	3,65(m, 1H)	3,57(dd, 1H, 11,4 e 3,9)	60,9	59,6	52,9
13b	-	-	129,7	129,9	
3-OCH3	3,82 (s, 3H)	3,86 (s, 3H)	56,5	56,0	148,3
9-OCH3	3,86 (s, 3H)	3,83 (s, 3H)	60,8	60,2	147,0
α'	5,08 (s, 2H)	-	72,1	-	128,8; 138,8; 150,9
1'	-	-	138,8	-	-
2'	7,45 (m, 1H)	-	128,8	-	72,1; 129,1
3'	7,37 (m, 1H)	-	129,8	-	129,8; 138,8
4'	7,30 (m, 1H)	-	129,1	-	128,8
5'	7,37 (m, 1H)	-	129,8	-	129,8; 138,8
6'	7,45 (m, 1H)	-	128,8	-	72,1; 129,1

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H e 125,76MHz para ¹³C em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo com Costa et al., 2015 (¹H em CDCl₃ + gotas de CD₃OD 400 MHz).

^c O espectro de ¹³C está disponível na Figura A36

5.2.5.5 Determinação estrutural da amostra BFD 3.8

A amostra codificada como BFD 3.8 (10,3 mg) foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela, com fórmula molecular $C_{27}H_{30}NO_4$, (m/z 432,2160), como determinado por HR-MS (Figura 83). O íon base foi submetido à análise de MS/MS (Figura 84), sendo observada a perda de 91 Da. Essa mesma perda foi anteriormente observada para as amostras BFD 3.6 e BFD 3.7, derivadas do alcaloide estefolidina. Foi possível propor, pela diferença de massa observada entre estas substâncias, que amostra BFD 3.8 seja derivada do alcaloide isocoripalmina.

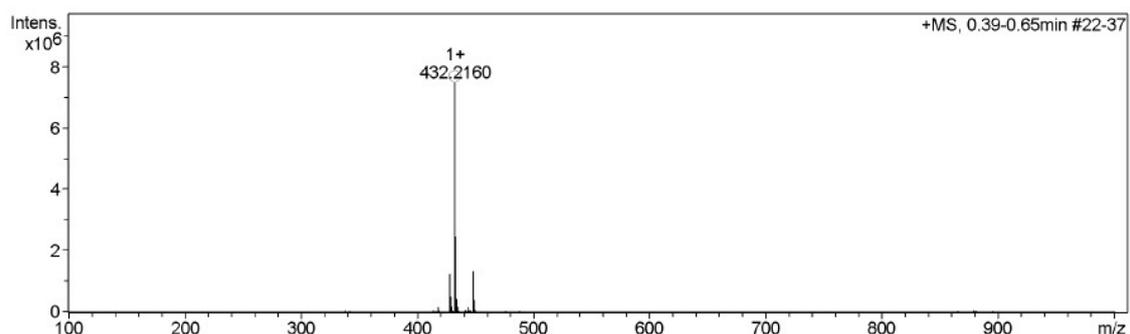


Figura 83. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFD 3.8.

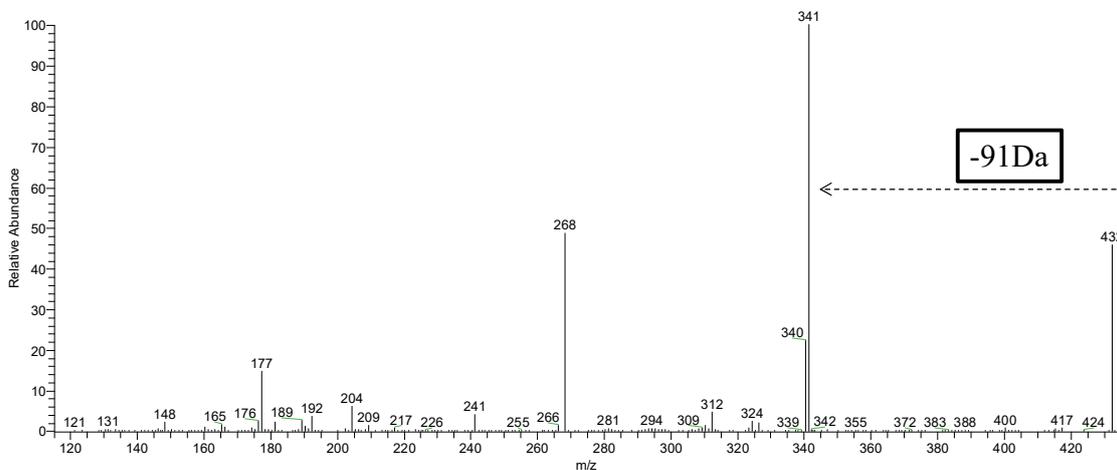


Figura 84. Espectro de MS/MS para o íon m/z 432 $[M+H]^+$ na amostra BFD 3.8.

No espectro RMN de 1H na região dos aromáticos (Figura 85) observou-se três sinais em δ 6,92 (1H, s), 6,73 (1H, s) e 6,90 (2H, m). Através dos espectros de RMN de 1H , HSQC e HMBC foi constatado que as três metoxilas, em δ 3,82 (3H, s), 3,81 (3H, s) e 3,82 (3H, s) se correlacionavam a J^1 com os carbonos em δ 56,6, 60,7 e 56,6, e J^3 com os carbonos em δ 150,3(C-3), 145,4(C-9) e 151,9 (C-10), respectivamente (Figuras 86 e 87), reforçando a similaridade com o alcaloide isocoripalmina.

Nos espectros de RMN de ^1H e HSQC verificou-se também a presença dos hidrogênios em δ 7,45 (2H, m), 7,36 (2H, m) e 7,30 (1H, m) que se correlacionavam a J^I com os carbonos em δ 129,1, 129,5 e 129,2, respectivamente, característicos da presença do grupo benzil na estrutura. A localização do grupo benzil foi atribuída pelas correlações dos hidrogênios metilênicos em δ 5,09 (2H, s) a J^I com o carbono em δ 72,7, e J^B com o carbono em δ 148,1 (C-2), podendo assim atribuir a posição do benzil em C-2 (Figura 88). A configuração da posição 13a foi atribuída como S de acordo com a configuração do precursor, sendo observada também uma rotação negativa ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -165,55^\circ$, CHCl_3 , c 0,36). Com base nessas informações foi possível determinar a amostra BFD 3.8 como sendo o alcaloide (-)-(S)-2-*O*-benzilisocoripalmina (Figuras 89), anteriormente reportado na literatura (TANI et al., 1970). Como não foi possível acessar os dados dessa substância, os dados obtidos foram comparados com o do alcaloide precursor isocoripalmina (CUTTER et al., 2002). Na tabela 12 são apresentados os dados completos de RMN de ^1H e ^{13}C e dos mapas de contorno HSQC e HMBC.

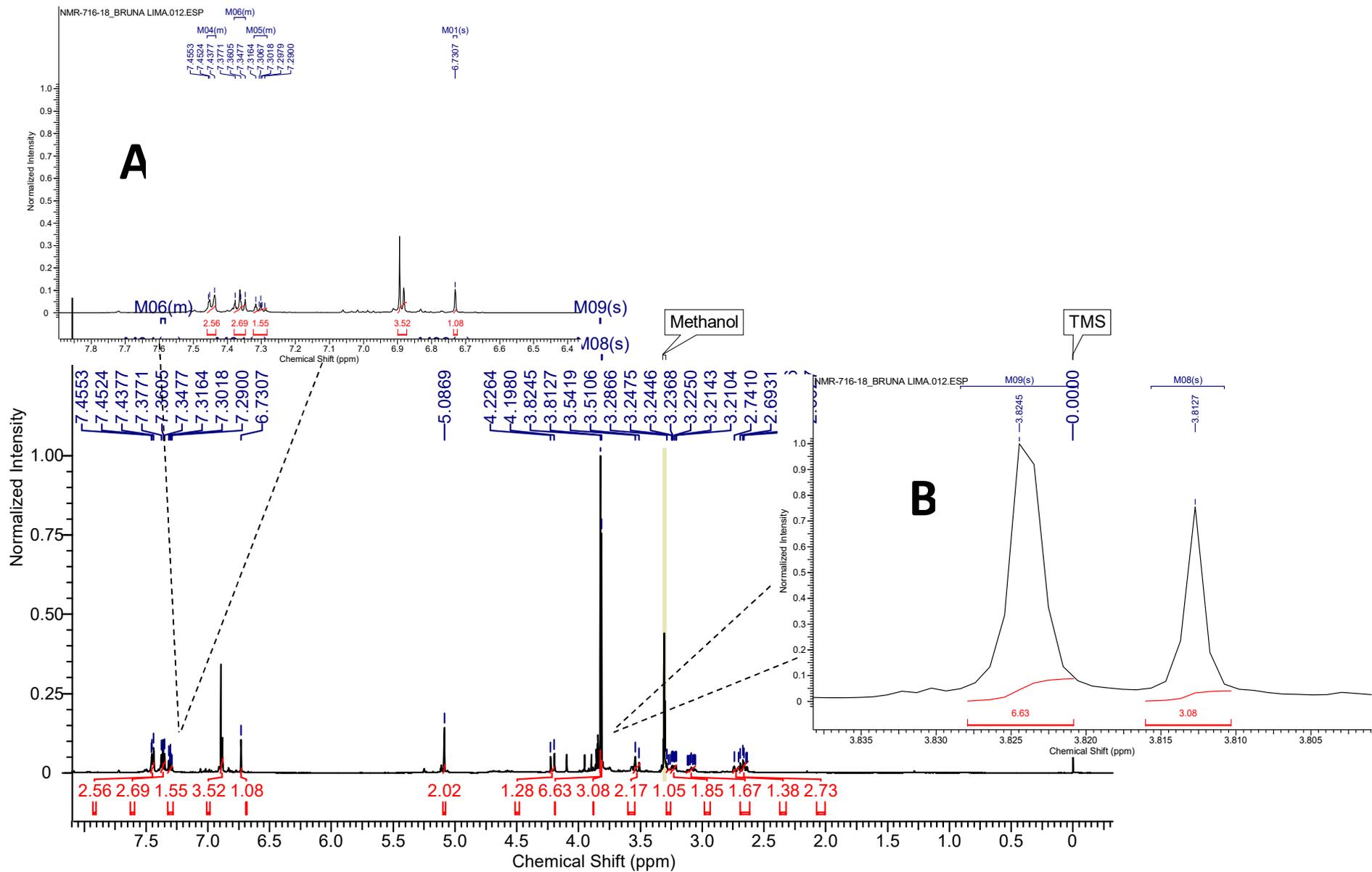


Figura 85. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.8. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).

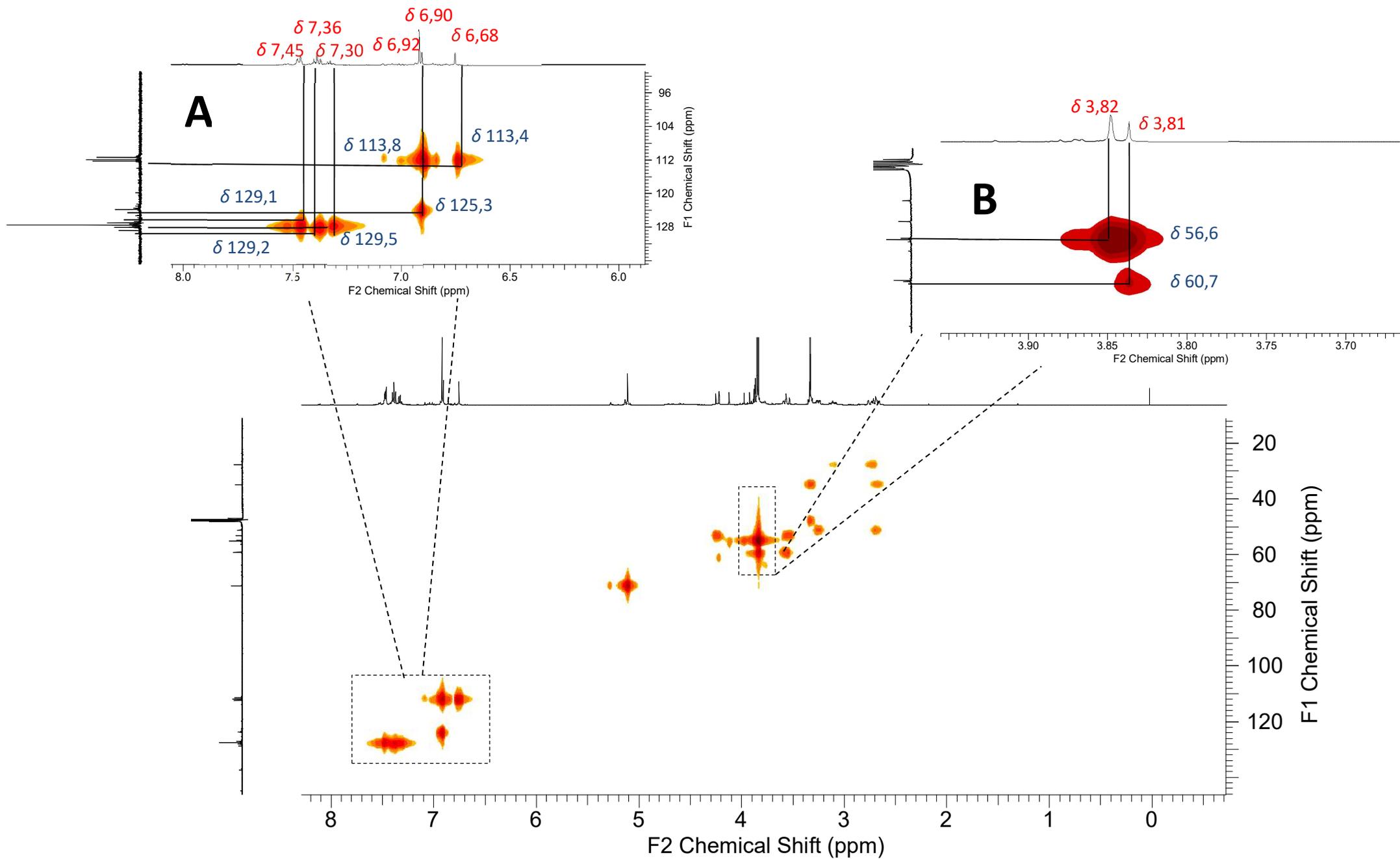


Figura 86. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.8. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B).

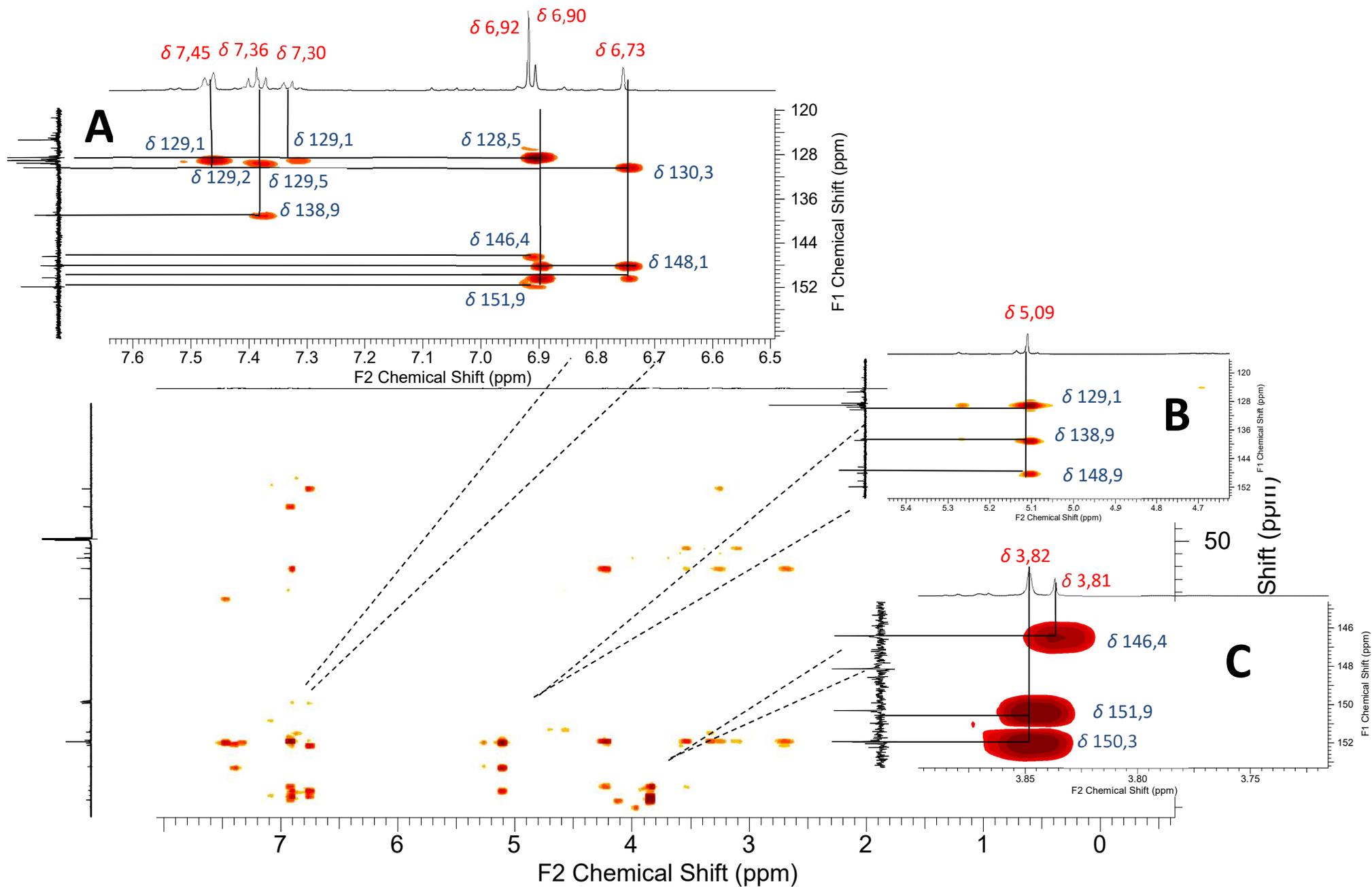


Figura 87. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFD 3.8. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A) e (B), ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (C).

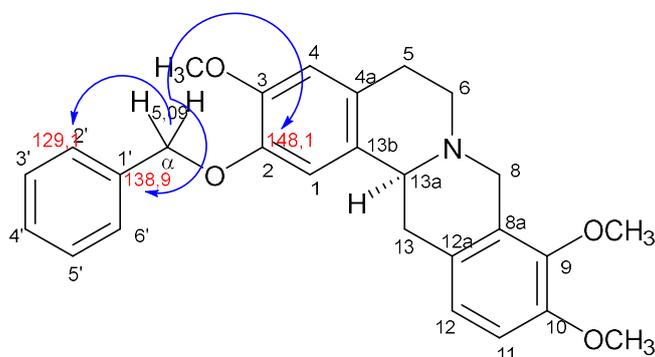


Figura 88. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.8.

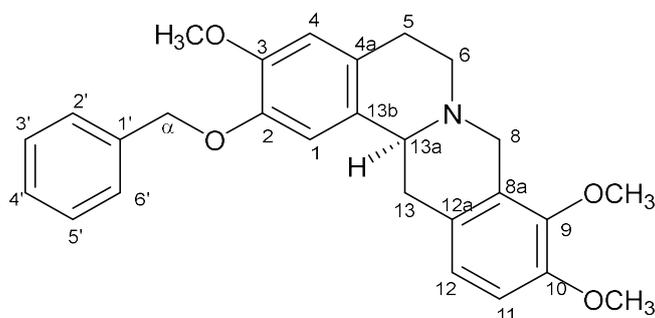


Figura 89. Estrutura do alcaloide (-)-(-)-2-O-benziliscoripalmina

Tabela 12. Dados de RMN ^1H , HSQC e HMBC da amostra BFD 3.8

BFD 3.8					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	$^{13}\text{C}^{\text{a,c}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	6,92 (s, 1H)	6,71 (s, 1H)	113,8	114,3	60,8; 150,4
2	-	-	148,1	145,3	-
3	-	-	150,4	145,9	-
4	6,73 (s, 1H)	6,68 (s, 1H)	113,4	111,3	29,3; 130,3; 148,1
4 ^a	-	-	128,7	124,0	-
5	2,72 (m, 1H)	2,70 (m, 1H)	29,3	29,0	128,7
5	3,09 (m, 1H)	3,07 (m, 1H)	29,3	29,0	-
6	2,66 (m, 1H)	2,59 (m, 1H)	52,7	51,5	128,7
6	3,23 (m, 1H)	3,07 (m, 1H)	52,7	51,5	-
8	4,20 (d, 16,1, 1H)	4,24 (d, 15,9 1H)	54,8	54,0	60,8; 128,4; 146,4
8	3,53 (m, 1H)	3,53 (d, 15,9 1H)	54,8	54,0	128,4; 146,4
8 ^a	-	-	128,4	124,3	-
9	-	-	146,4	144,2	-
10	-	-	151,9	150,4	-
11	6,90 (m, 1H)	6,87 (d, 8,4, 1H)	113,8	108,1	128,5; 146,4
12	6,90 (m, 1H)	6,78 (d, 8,4, 1H)	125,3	123,7	36,7; 151,9
12 ^a	-	-	128,5	128,7	-
13	3,27 (m, 1H)	3,53 (m, 1H)	36,5	36,5	60,8; 128,5
13	2,66 (m, 1H)	2,81 (dd, 15,9 e 11,4, 1H)	36,5	36,5	-
13 ^a	3,53 (m, 1H)	3,26 (m, 1H)	60,7	59,4	52,7

13b	-	-	130,0	129,4	-
3-OCH3	3,82 (s, 3H)	3,87 (s, 3H)	56,6	56,0	150,3
9-OCH3	3,81 (s, 3H)	3,90(s, 3H)	60,7	60,1	146,4
10-OCH3	3,82 (s, 3H)	3,87 (s, 3H)	56,6	56,9	151,9
α'	5,09 (s, 2H)	-	72,7	-	129,1; 138,9; 148,1
1'	-	-	138,9	-	-
2'	7,45 (m, 1H)	-	129,1	-	72,2; 129,2
3'	7,36 (m, 1H)	-	129,5	-	129,5; 138,9
4'	7,30 (m, 1H)	-	129,2	-	129,1
5'	7,36 (m, 1H)	-	129,5	-	129,5; 138,9
6'	7,45 (m, 1H)	-	129,1	-	72,2; 129,2

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H e 125,76MHz para ¹³C em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo com Cutter et al., 2002 (¹H em CDCl₃; 400 MHz).

^c O espectro de ¹³C está disponível na Figura A32.

5.2.5.6 Determinação estrutural da amostra BFD 3.11

A amostra codificada como BFD 3.11 (18,5 mg) foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela, com fórmula molecular $C_{33}H_{34}NO_4$, (m/z 508,2473), como determinado por HR-MS (Figura 90). Através da fragmentação (Figura 91), o mesmo apresentou perdas competitivas de 91 e 240 Da. A mesma perda de 91 Da foi observada nas frações BFD 3.6, BFD 3.7 e BFD 3.8, podendo ser atribuída a saída na forma radicalar do grupo benzil em compostos *O*-benzilados (KUCK et al., 2018). Pela diferença de massa, pode-se sugerir a presença de um derivado do alcaloide estefolidina contendo 2 grupos benzil em sua estrutura.

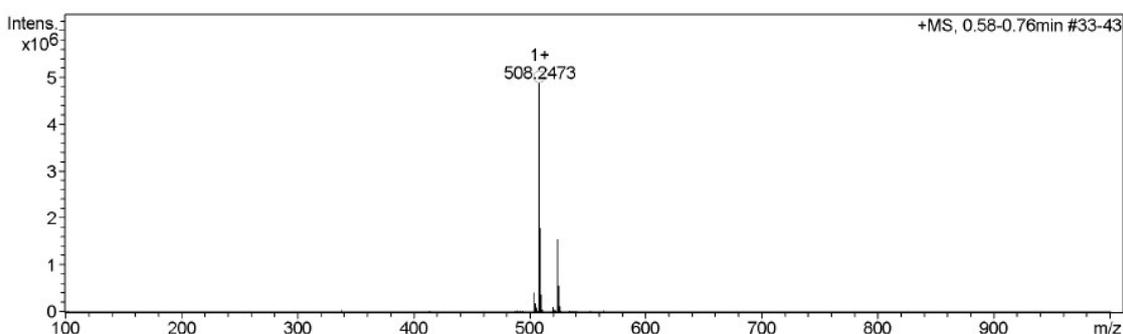


Figura 90. Espectro de massas de alta resolução (HR-MS) da amostra BFD3.11

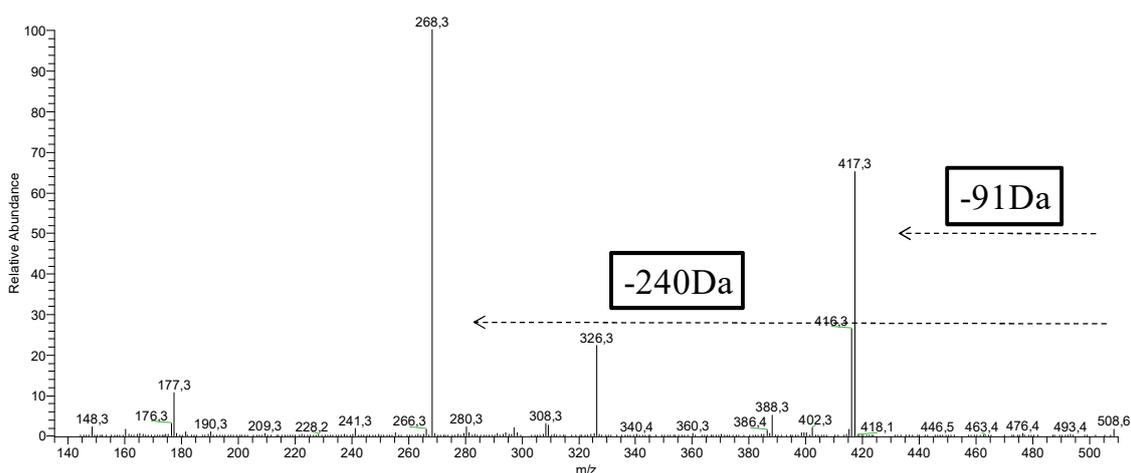


Figura 91. Espectro de MS/MS para o íon m/z 508 $[M+H]^+$ da amostra BFD 3.11.

Assim como nos demais frações analisadas no espectro de RMN de ^1H (Figura 92) foram observados na região de hidrogênios aromáticos sinais característicos dos sistemas com hidrogênios na posição *para* e *orto* acoplados em δ 6,86 (1H, s), 6,71 (1H, s), 6,92 (1H, d 8.2 Hz) e 6,85(1H, d 8.2 Hz), respectivamente. Através dos espectros de RMN de ^1H , HSQC e HMBC foi constatada a existência de duas metoxilas em δ H 3,82 (3H, s) e 3,86 (3H, s) que se correlacionaram a J^I com os carbonos em δ 56,5 e 60,6, e J^3 com os carbonos em δ 150,1 e 146,8, atribuídas assim às posições C-3 e C-9, respectivamente (Figura 93 e 94), corroborando com os dados observados para estefolidina.

Ainda no espectro de RMN de ^1H foram observados 3 multipletos na região dos hidrogênios aromáticos em δ 7,30 (2H), δ 7,44 (4H) e 7,36 (4H). No mapa de HSQC (Figura 93) foram observadas as correlações dos hidrogênios em δ 7,44 (4H, m) e 7,36 (4H, m) com os carbonos em δ 128,6 e 129,0, respectivamente, sendo estes característico de um sistema simétrico, confirmando assim a existência de 2 grupos benzil na molécula. As suas posições foram determinadas pelas correlações dos simpletos em δ 5,08 (2H, s) e 5,02 (2H, s), correlacionados a J^I com o carbono em δ 71,9 e J^3 com os carbonos em δ 147,9 (C-2) e 150,6 (C-10), respectivamente, podendo assim atribuir a presença do grupo benzil nas posições C-2 e C-10 da estrutura tetrahidroprotoberberínica (Figura 95).

A configuração da posição 13a foi atribuída como S de acordo com a configuração do precursor, sendo observada também uma rotação negativa ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -96,15^\circ$, MeOH, c 0,32). Com base nessas informações foi possível determinar a amostra BFD 3.11 como sendo o alcaloide (-)-(S)-*O*, *O*-dibenzilestefolidina (Figura 96), já relatado na literatura (CHENG & YANG, 2009). Como não foi possível acessar os dados dessa substância, os dados obtidos foram comparados com o do alcaloide precursor estefolidina (COSTA et al., 2015). Na tabela 13 são apresentados os dados completos de RMN de ^1H e ^{13}C e dos mapas de contorno HSQC e HMBC.

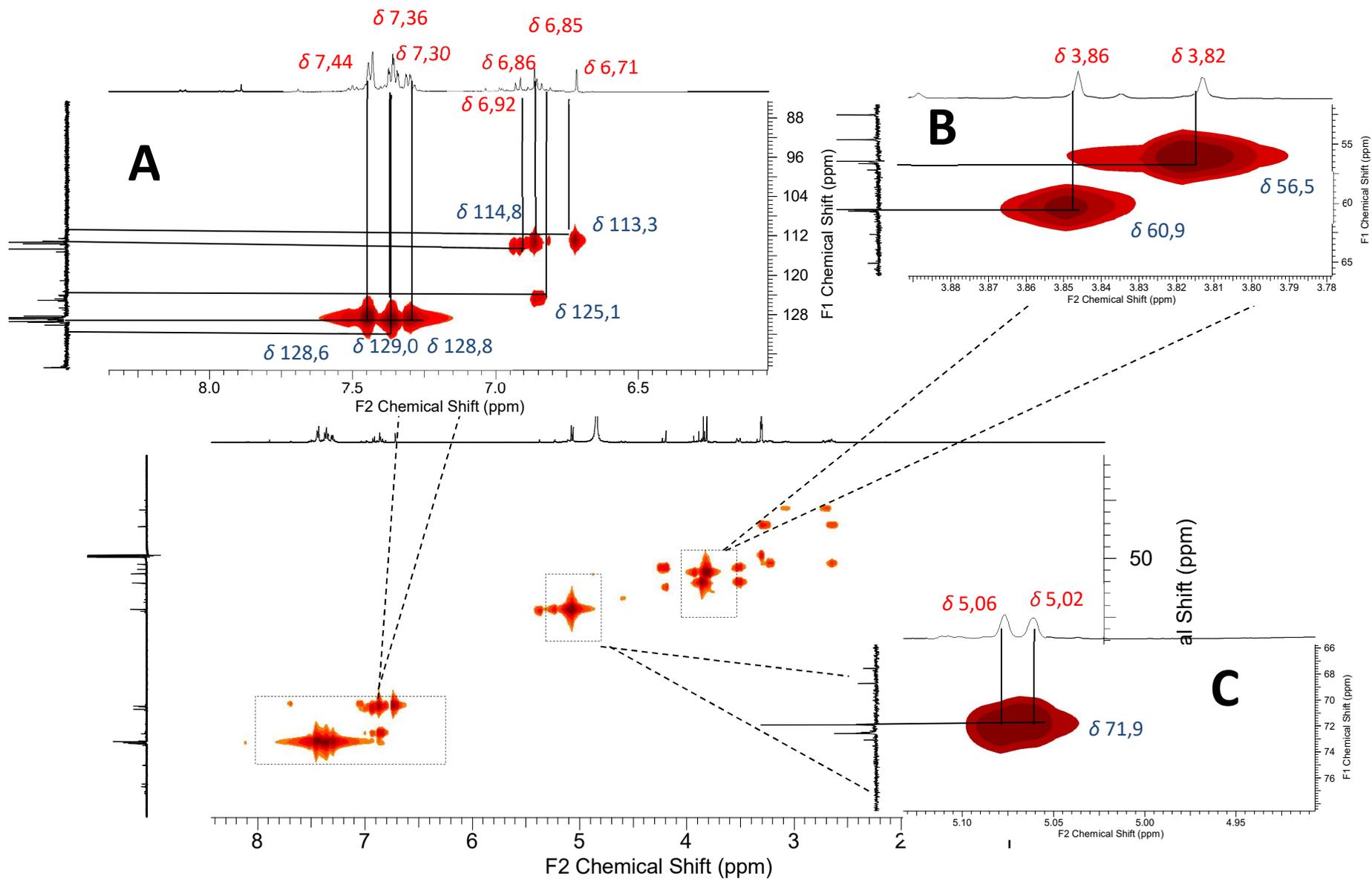


Figura 93. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, CD_3OD) da amostra BFD 3.11 Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos (B) e ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (C). 137

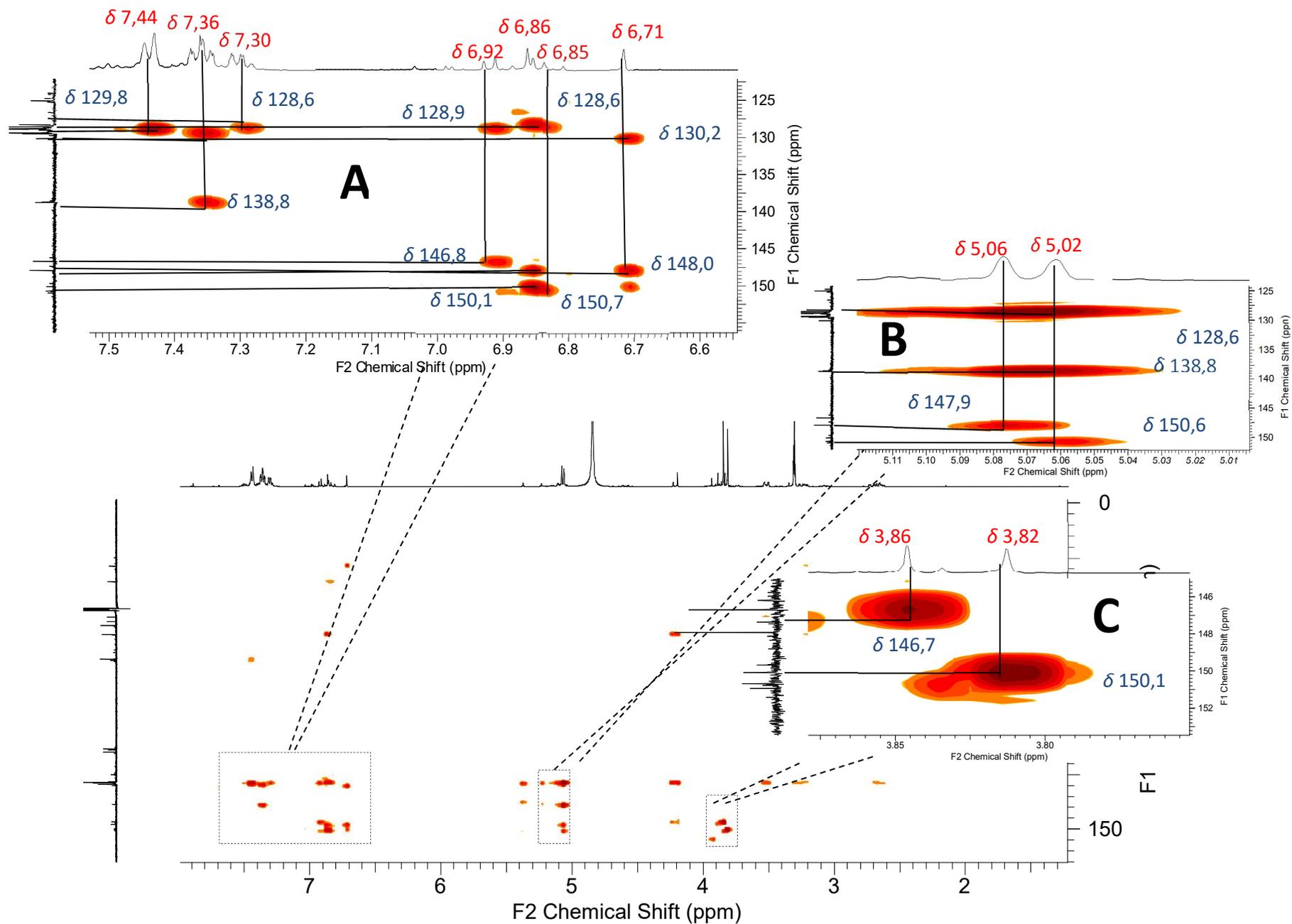


Figura 94. Mapa de contorno HMBC (500 MHz, CD₃OD) da amostra BFD 3.11. Ampliação da região da região dos hidrogênios aromáticos (A), ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (B) e ampliação da região dos metoxílicos (C).

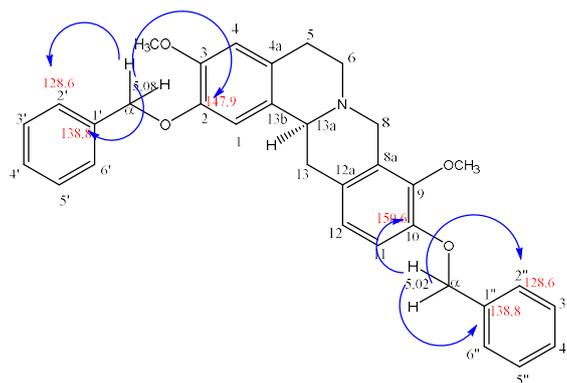


Figura 95. Correlações observadas pelos hidrogênios metilênicos do grupo benzil para amostra BFD 3.11

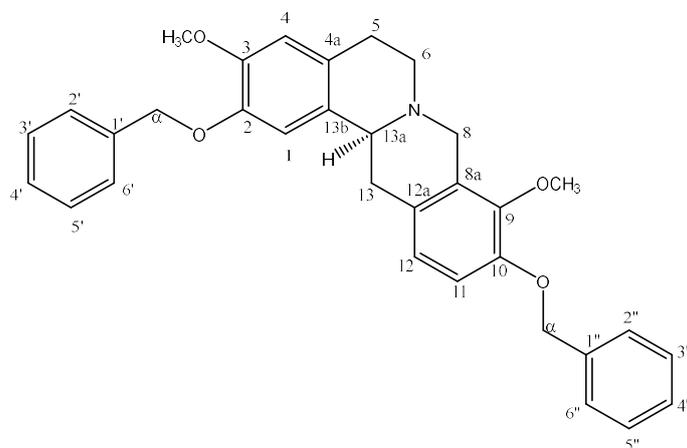


Figura 96. Estrutura do alcaloide (-)-(-S)-O,O-dibenzilestefolidina.

Tabela 13 Dados de RMN ¹H, HSQC e HMBC da amostra BFD 3.11

BFD 3.11					
Posição	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ Hδ(mult., J em Hz) ^b	¹³ C ^{a,c}	¹³ C ^b	HMBC (¹ H- ¹³ C)
1	6,86 (s, 1H)	6,77 (s, 1H)	113,6	112,0	60,6; 128,3; 150,1
2	-	-	148,0	144,6	-
3	-	-	150,1	146,3	-
4	6,71 (s, 1H)	6,61 (s, 1H)	113,3	111,4	29,1; 130,2; 148,0
4a	-	-	128,3	125,5	-
5	2,71 (m, 1H)	2,69 (m, 1H)	29,1	28,7	128,3
5	3,08 (m, 1H)	3,11 (m, 1H)	29,1	28,7	128,3
6	2,65 (m, 1H)	2,67 (m, 1H)	52,5	52,0	-
6	3,21 (m, 1H)	3,21 (m, 1H)	52,5	52,0	-
8	3,52 (m, 1H)	3,55 (d, 1H 15,6)	54,7	54,1	60,7; 128,6; 146,8
8	4,21 (d, 1H, 16,1)	4,20 (d, 1H 15,6)	54,7	54,1	60,7; 128,6; 146,8
8a	-	-	128,6	127,9	-
9	-	-	146,8	143,8	-
10	-	-	150,7	147,5	-
11	6,92 (d, 1H, 8,2)	6,76 (d, 1H, 8,3)	114,8	115,4	128,9; 146,8
12	6,85 (d, 1H, 8,2)	6,80 (d, 1H, 8,3)	125,1	124,7	36,3; 128,6; 150,7
12a	-	-	128,9	126,4	-
13	2,65 (m, 1H)	2,78 (dd, 1H, 16,0 e 11,4)	36,3	35,8	128,6
13	3,25 (m, 1H)	3,28 (dd, 1H, 16,0 e 3,9)	36,3	35,8	128,6
13a	3,52 (m, 1H)	3,57 (dd, 1H, 11,4 e 3,9)	60,7	59,6	52,5
13b	-	-	130,2	129,9	-

3-OCH₃	3,82 (s, 3H)	3,86 (s, 3H)	56,5	56,0	150,1
9-OCH₃	3,86 (s, 3H)	3,83 (s, 3H)	60,6	60,2	146,8
α'	5,08 (s, 2H)	-	71,9	-	147,9; 138,8; 128,6
α''	5,02 (s, 2H)	-	71,9	-	150,6; 138,8; 128,6
1'	-	-	138,8	-	-
1''	-	-	138,8	-	-
2'	7,44 (m, 1H)	-	128,6	-	71,9;128,8
2''	7,44 (m, 1H)	-	128,6	-	71,9;128,8
3'	7,36 (m, 1H)	-	129,0	-	138,8
3''	7,36 (m, 1H)	-	129,0	-	138,8
4'	7,30 (m, 1H)	-	128,8	-	128,6
4''	7,30 (m, 1H)	-	128,8	-	128,6
5'	7,36 (m, 1H)	-	129,0	-	138,8
5''	7,36 (m, 1H)	-	129,0	-	138,8
6'	7,44 (m, 1H)	-	128,6	-	71,9;128,8
6''	7,44 (m, 1H)	-	128,6	-	71,9;128,8

^a O experimento foi realizado a 500MHz para ¹H e 125,76MHz para ¹³C em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno.

^b Dados da literatura de acordo com Costa et al., 2015 (¹H em CDCl₃ + gotas de CD₃OD 400 MHz)

^c O espectro de ¹³C está disponível na Figura A38.

5.2.6 Avaliação *in vitro* do potencial de inibição frente a AChE

5.2.6.1 Estudo cinético usando o ICER-*eel*AChE

A imobilização pode alterar a conformação tridimensional da proteína por conta da formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte (SILVA et al., 2013), por isso é importante realizar estudos cinéticos para confirmar a manutenção tridimensional, a especificidade e a manutenção da atividade catalítica. Os estudos cinéticos permitem avaliar, portanto, a manutenção dessas propriedades catalíticas da enzima imobilizada no capilar (ICER-AChE), bem como a afinidade pelo substrato (ACh). A constante de Michaelis-Menten (K_m) é a concentração necessária de substrato para se obter a metade da velocidade máxima na catálise (COPELAND, 2013), e pode ser utilizada para determinar a afinidade da enzima pelo substrato e estimar possíveis modificações estruturais. Na figura 97 está ilustrado a curva de Michaelis-Menten e o valor de K_m ($48,1 \pm 7,0 \mu\text{M}$), o qual foi utilizado para determinar as condições ótimas em termos de concentração de ACh para os estudos de inibição.

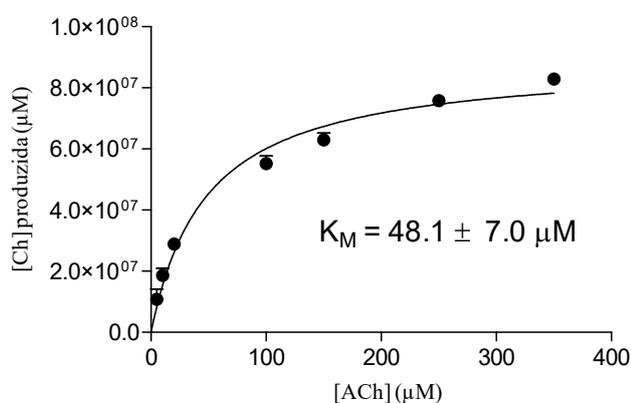


Figura 97. Hiperbólica de Michaelis-Menten para produção de Ch com a variação ACh no sistema ICER-*eel*AChE

5.2.6.2 Ensaio de inibição pontual no ICER-AChE

A atividade do ICER-AChE foi monitorada através do cromatograma do íon extraído de m/z 104 (referente à Ch), visto que Ch é um produto da hidrólise enzimática do substrato ACh de m/z 146. O ensaio ICER-*eel*AChE no sistema LC-MS mostrou-se adequado para medir ambos os íons (Figura 98).

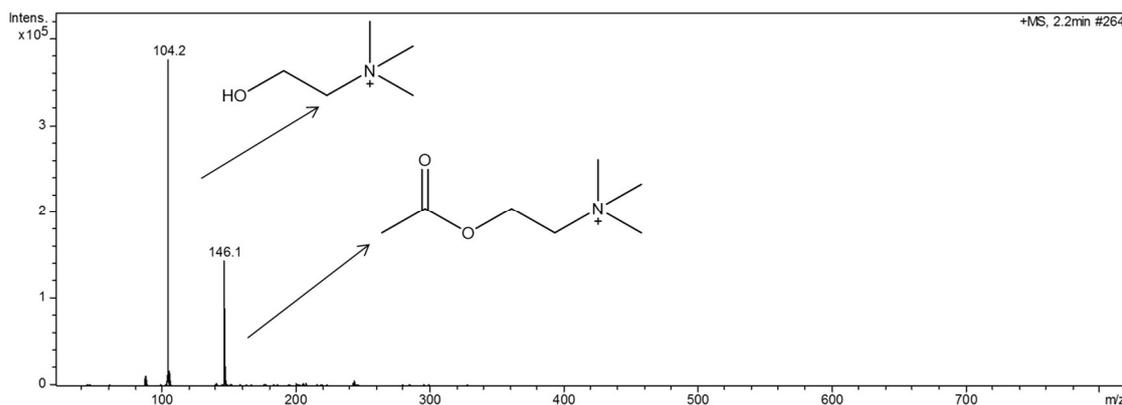


Figura 98. Espectro obtido pelo sistema LC-MS com ICER-*eel*AChE após a injeção de 70 μ M de ACh, gerando os íons de m/z 146 (ACh) e de m/z 104 (Ch).

A triagem para identificação de inibidores de acetilcolinesterase foi baseada em três análises: i) atividade controle na ausência de inibidor, ii) atividade na presença de 100 μ M de inibidor e iii) atividade controle na ausência do inibidor (após o inibidor), como representado no cromatograma da Figura 99. O ensaio ICER-*eel*AChE com a galantamina (inibidor de referência) demonstra que a interação enzima-inibidor é reversível, visto que atividade enzimática é retomada após a injeção do inibidor. O resultado obtido corrobora com dados da literatura, já que a galantamina é reconhecida como inibidor reversível competitivo (COLOVIC et al., 2013).

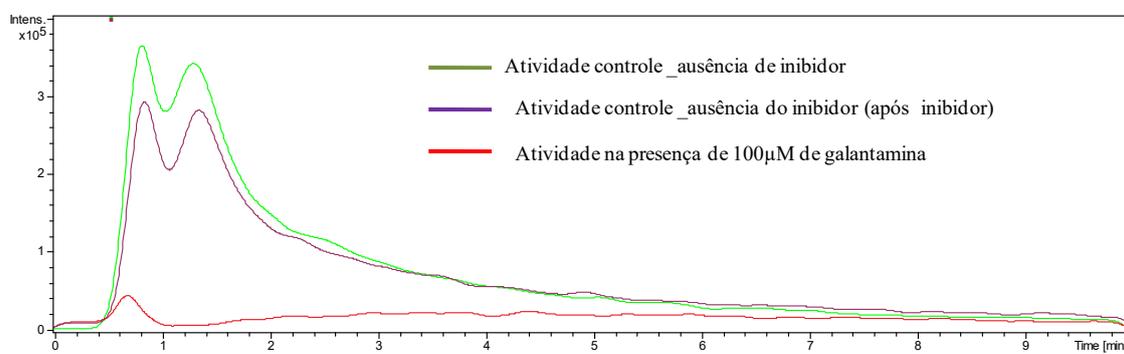


Figura 99. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença do inibidor de referência galantamina (100 μ M).

Posteriormente o sistema ICER-*eel*AChE foi utilizado para avaliar o potencial inibitório dos alcaloides isolados benzilados, seus precursores (estefolidina e isocoripalmina) e o alcaloide aporfínico normuciferina, visto que este demonstrou uma das melhores energias observadas no estudo de *docking* molecular. Na tabela 14 estão dispostos os novos códigos, juntamente com suas energias (Kcal/mol) de interação com enzima AChE obtidas por *docking* molecular.

É bem aceito que estudos de *docking* sejam realizados com *TcAChE* devido à disponibilidade de sua estrutura cristalina e ao conhecimento estabelecido das interações de ligantes para esta enzima (HOUGHTON et al., 2006; MOHAMED & RAO, 2010; GUPTA et al., 2011). No caso de ensaios de inibição, o uso de *ee/AChE* também é bem aceito como um substituto para a *AChE* humana (MOHAMED & RAO, 2010; GUPTA et al., 2011; VANZOLINI et al., 2013a). Além disso, ambas as enzimas conservam as sequências primárias nos resíduos ativos (GUPTA et al., 2011).

Tabela 14. Relação dos candidatos a inibidores testados

Substâncias	Código	Energia de ligação (kcal/mol)
Estefolidina	AM01	-9,6
Isocoripalmina	AM02	-9,9
(-)-(7R,13aS)-7-benzilestefolidina	AM03	-11,6
(-)-(7S,13aS)-7-benzilestefolidina	AM04	-10,7
(-)-(S)-2-O-benzilestefolidina	AM05	-10,9
(-)-(S)-10-O-benzilestefolidina	AM06	-11,0
(-)-(S)-O-benzilisocoripalmina	AM07	-10,4
(-)-(S)-O,O-dibenzilestefolidina	AM08	-11,4
Nornuciferina	AM09	-11,0

A atividade inibitória foi avaliada sob as mesmas condições que a galantamina, sendo possível observar em todas as amostras a retomada da atividade enzimática (Anexos A39-A47). Na figura 100 estão representados os resultados de inibição. As substâncias testadas apresentaram percentual de inibição entre 35,22 a 90,49%. Os alcaloides estefolidina (AM01) e isocoripalmina (AM02) exibiram porcentagens moderadas, 40,24 e 44,28% respectivamente. A modesta porcentagem de inibição para alcaloides tetrahidroprotoberberínicos tem sido reportada na literatura (WANG et al.,

2018). Os alcaloides benzilados apresentaram melhores porcentagens de inibição (exceção AM05) que seus precursores, com destaque para os compostos *N*-substituídos. Resultados semelhantes foram observados para um derivado *N*-substituído da estefolidina através do método colorimétrico de Ellman (INGKANINAN et al., 2006). O alcaloide nornuciferina também evidenciou uma significativa inibição. Os resultados obtidos corroboram com dados de *docking* molecular. Reforçando assim, a relevância do uso de ferramentas computacionais no planejamento de novos inibidores (IRWIN & SHOICHE, 2016).

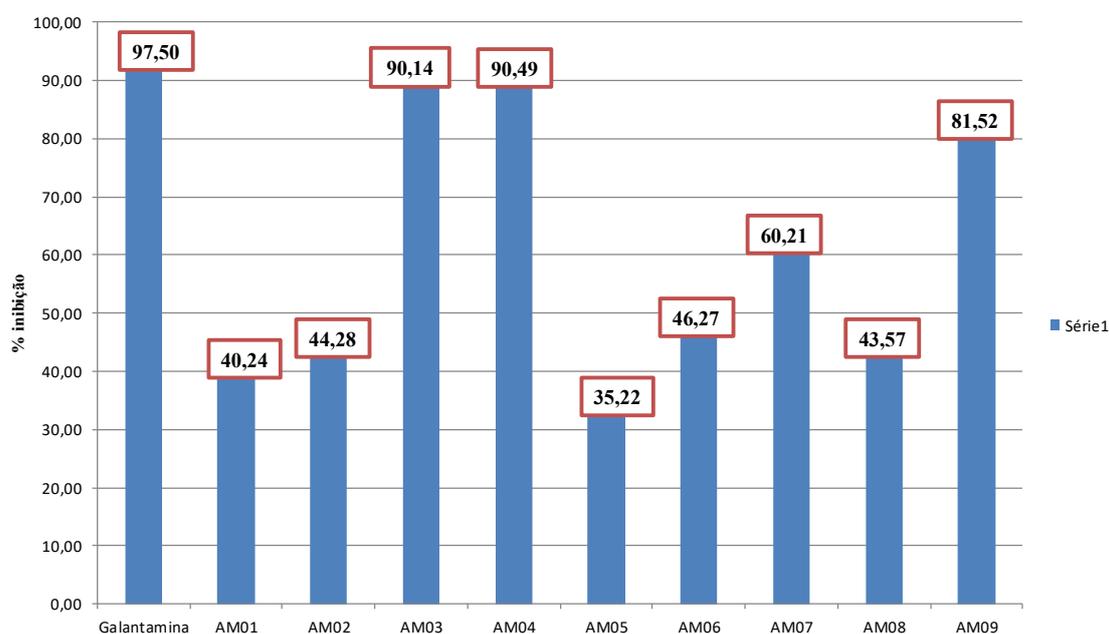


Figura 100. Resultado da triagem de novos inibidores utilizando o sistema ICER-eelAChE. A galantamina um reconhecido inibidor de AChE, foi utilizada como referência.

5.2.6.3 Capacidade inibitória (IC₅₀)

As amostras que apresentaram % de inibição maior que 90% foram selecionados para ensaios de determinação de IC₅₀. O valor de IC₅₀ determinado para o controle positivo (galantamina) foi de $17,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$, sendo próximo com dados relatados em ensaios anteriores com ICER (VANZOLINI et al., 2013a). As curvas de dose-resposta das amostras AM03 e AM04 estão representadas na Figura 101. Os valores de IC₅₀ obtidos para AM03 e AM04 foram de $40,6 \pm 1 \mu\text{M}$ e $51,9 \pm 1 \mu\text{M}$ respectivamente, sendo estes valores próximos do controle positivo, calculado sob as mesmas condições. Em relação ao aumento da atividade observado para os compostos AM03 e AM04 isso está de acordo com um estudo publicado anteriormente (LOIZZO et al., 2008), realizado com estefolidina (IC₅₀ > 100 μM), *N*-metil-estefolidina (IC₅₀ = 31,30 μM) e estefarina (IC₅₀

= 14,10 μM), em que mostrou-se que a estefolidina tem significativamente menos atividade que seus derivados quaternários. Isso sugere que uma carga positiva na porção de nitrogênio pode influenciar a atividade inibidora da AChE.

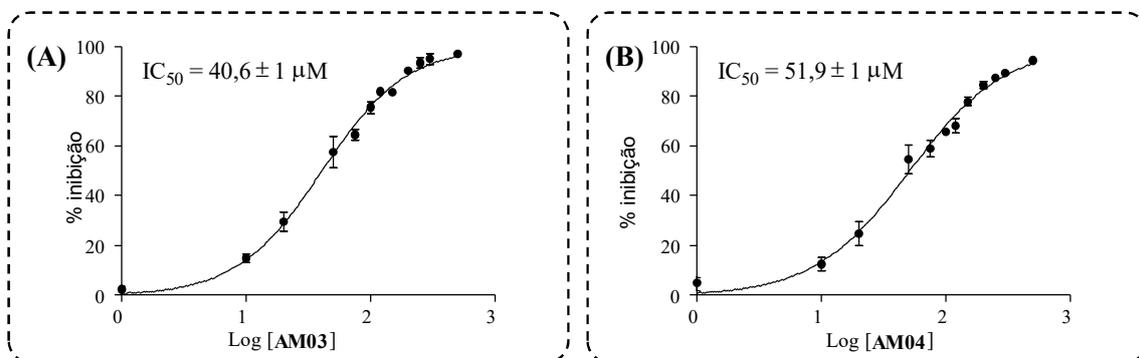


Figura 101. Determinação da capacidade inibitória (IC_{50}) das amostras (A) AM03 e (B) AM04 frente à *ee*lAChE no ICER.

5.2.6.4 Determinação da constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação no ICER-AChE

O mecanismo de inibição e o K_i foram determinados para os compostos AM03 e AM04, ambos os inibidores AM03 ($K_i = 11,6 \mu\text{M}$) e AM04 ($K_i = 4,7 \mu\text{M}$) reduziram substancialmente a velocidade da reação enzimática e não promoveram alteração no valor de K_M , o que ilustra um comportamento característico dos inibidores não competitivos, como observado nos gráficos de duplos recíproco (Figura 102).

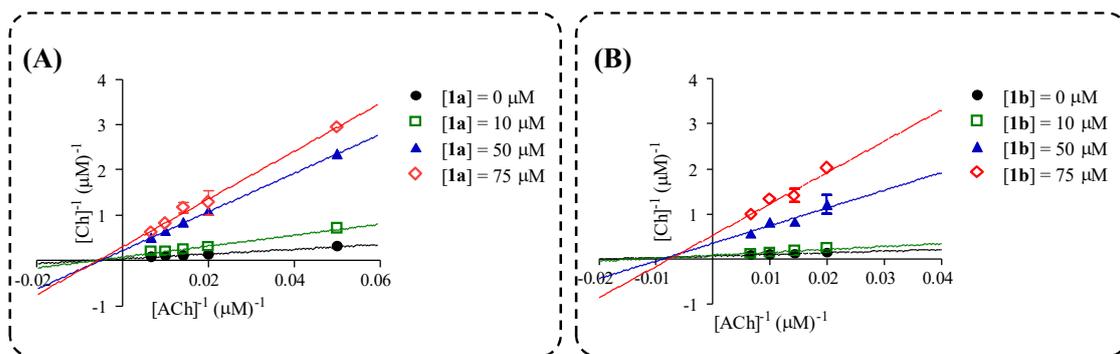


Figura 102. Gráficos de duplos recíproco das amostras (A) AM03 e (B) AM04

A avaliação da modalidade de inibição é uma avaliação relevante nos estágios iniciais dos programas de descoberta de medicamentos, uma vez que o modo de interação pode ser afetado dependendo do contexto fisiológico aos quais a enzima está exposta. Como um exemplo, inibidores competitivos se ligam exclusivamente a forma de enzima livre, enquanto inibidores não competitivos ou do tipo misto se ligam com alguma afinidade a ambas as formas, a enzima livre e o complexo enzima-substrato. Assim, a

modalidade de inibição não competitiva pode ser uma vantagem significativa *in vivo* quando o contexto fisiológico expõe a enzima a altas concentrações de substrato. Embora a vantagem clínica da inibição não competitiva seja reconhecida, atualmente dentre os medicamentos que atuam como inibidores enzimáticos, a maior parte em uso clínico são inibidores competitivos. Isso pode estar relacionado as abordagens históricas para descoberta de medicamentos que foram focadas em inibidores direcionados ao sítio ativo inibidores (COPELAND, 2016). Aqui, apresentamos dois análogos do benzil da estefolidina que atuam através do mecanismo não competitivo. Os diferentes mecanismos entre os compostos AM03, AM04 e a galantamina podem ser atribuídas às interações π - π com Trp84 e Phe330, as quais foram observadas apenas para os dois derivados de estefolidina com maior potência inibidora. Esses resultados destacam a importância da interação π - π para os ligantes e, portanto, podem ser utilizados para projetar AChEIs não competitivos, que exploram as vantagens clínicas dessa modalidade de inibição.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A abordagem integrativa baseada na análise do perfil alcaloídico por LS-MS, seguido por uma desreplicação robusta por HPLC-DAD-MS/MS, mostrou-se uma estratégia útil para desreplicação de alcaloides isoquinolínicos. Essa abordagem permitiu a identificação provisoriamente de 17 alcaloides entre as espécies *O. amazonicum* e *O. periquino*, sendo reportados pela primeira vez no gênero os alcaloides nuciferina, *N*-metil-*O*-metilisopilina, *N*-metilanonaina, *N*-metilasimilobina, *N*-metilisopilina, isopilina, norushinsunina, liriodenina, lisicamina e reticulina. Já os alcaloides estefolidina, reticulina, nornuciferina e anonaina foram reportados pela primeira vez nas folhas de *O. periquino*. Estes dados reforçam o significado quimiotaxonômico dos alcaloides isoquinolínicos para a família Annonaceae, em particularmente para os gêneros *Onychopetalum*, *Bocageopsis* e *Unonopsis*.

A análise de *docking* molecular das substâncias desreplicadas nas espécies de *Onychopetalum* sugeriu atividade satisfatória para alcaloides aporfínicos e moderada para os alcaloides tetrahidroprotoberberínicos, no entanto, os derivados tetrahidroprotoberberínicos benzilados foram descritos como altamente ativos. O aumento no potencial de inibição foi observado para os derivados *N*-benzil quando comparados com os precursores, o que foi corroborado pelos biológicos *in vitro*. Além disso, os resultados biológicos mostraram que os derivados *N*-benzil são mais ativos que os *O*-benzil, em especial os de configuração R, o que sugere que o nitrogênio quaternário desempenha um papel fundamental na inibição da AChE. Em adição, as interações ligante-proteína observadas para os alcaloides ativos podem servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer.

O planejamento semissintético a partir dos alcaloides estefolidina e isocoripalmina possibilitou a obtenção dos derivados benziltetrahidroprotoberberínicos, (-)-(7S,13aS) -7- benzilestefolidina, (-)-(7R,13aS) -7- benzilestefolidina, (-)-(S),-2-*O*-benzilestefolidina, (-)-(S),-10-*O*- benzilestefolidina, (-)-(S)-2-*O*-isocoripalmina e (-)-(S),-*O*-*O*- benzilestefolidina, sendo os alcaloides (-)-(7S,13aS) -7- benzilestefolidina, (-)-(7R,13aS)-7-benzilestefolidina,(-)-(S),-10-*O*-benzilestefolidina descritos pela primeira vez na literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.; GMUNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders-a survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 363-381, 2007.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p.114-140, 2007.

ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, p.504-540, 1999.

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B. S.; E, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing Ms into the “real world”. *Analytical and Bionalytical Chemistry*, v. 398, p. 265-294, 2010.

ALMEIDA, M. E. L.; BRAZ, R.; BULLOW, M. V.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, G. S. Onychine, an alkaloid from *Onychopetalum amazonicum*. **Phytochemistry**, v.15, p.1186-1187, 1976.

ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer’s disease. **Archives of Pharmacal Research** , v. 36, 375-399, 2013.

ATANASOVA, M.; STAVRAKOV, G.; PHILIPOVA, I.; ZHELEVA, D., YORDANOV, N.; DOYTCHINOVA, I. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, p. 5382-5389, 2015.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: Uma enzima de interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v.8, p.1818-1834, 2016.

BARTOLUCCI, C.; PEROLA, E.; PIGLER, C.; FELS, G.; LAMBA, D. Tree-dimensional structure of a complexo f galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase

from *Torpedo California*: implications for the desing of new anti-Alzheimer drus. **Proteins**, v. 42, p. 182-191, 2001.

BEECH, E.; RIVERS, M.; OLDFIELD, S.; SMITH, P.P. Global tree search-the first complete global database of tree species and country distributions. **Journal of Sustainable Forestry**, Doi 10.1080/10549811.2017.1310049, 2017.

BELE, M. Y.; FOCHO, D. A.; EGBE, E. A.; CHUYONG, B. G. Ethnobotanical survey of the uses of Annonaceae around mount Cameroon. **African Journal of Plant Science**, v.5, p.237-247, 2011.

BENAMAR, H.; TOMASSINI, L.; VENDITTI, A.; MAROUF, A.; BENNACEUR, M.; SERAFNI, M.; NICOLETTI, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of pyrrolizidine alkaloids from *Echiumconfusum* coincoy. **Natural Product Research**. DOI: 10.1080/14786419.2016.1242000, 2016.

BERMÚDEZ-LUGO, J.A.; ROSALES-HERNÁNDEZ, M. C.; DEEB, O.; TRUJILLO-FERRARA, J.; CORREA-BASURTO, J. In silico methods to assist drug developers in acetylcholinesterase inhibitor desing. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p. 1122-1136, 2011.

BESSA, C. D. P. B.; ANDRADE, J. P.; OLIVEIRA, R. S.; DOMINGOS E.; SANTOS, H. ROMÃO, W.; BASTIDA, J.; BORGES, W. Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambiente mass spectrometry (PS-MS and LS-MS). **Journal of the Brasilian Chemical Society**, v.28, p.819-830, 2017.

BOHNEN, N.; GROTHE, M.; RAY, N. J.; MULLER, M. L. T. M.; TEIPEL, S. T. Recent advances in cholinergic imaging and cognitive decline-revisiting the cholinergic hypothesis of dementia. **Current Geriatrics Reports**, v.7, p.1–11, 2018.

BRATUS, R. T. On neurodegenerative diseases, models and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation follwing the cholinergic hypothesis. **Experimental Neurology**, v. 163, p.495–529, 2000.

BROOKMEYER, R.; JOHNSON, E.; ZIEGLER-GRAHAM, K.; ARRIGHI, H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v.3, p.186-191, 2007.

BUENO, N. R.; CASTILHO, O. R.; COSTA, R. B.; POTT, A.; POTT, V.; SCHEIDT, G. N.; BATISTA, M. S. Medicinal plants used by the kaiowá and guarani indigenous populations in the caarapó reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, p.39-44, 2005.

CAMPOS, F. R.; BATISTA, R. L.; BATISTA, C. L.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; SANTOS, A. G.; PINHEIRO, M. L. B. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p.804-806, 2008.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v.32, p.175-187, 2009.

CASS, Q. B. **Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier editora Ltda, v.1, 2015.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p. 5-40, 2012.

CHENG, J. J.; YANG, Y. S. Enantioselective Total Synthesis of (-)-(S)-Stepholidine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 9225-9228, 2009.

CHEMAXON; **MarvinSketch 17.1.2.0**; ChemAxon, Budapest, 2017.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p.315-335, 2013.

COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**: John Wiley & Sons, Inc. DOI:10.1002/9781118540398, 2013.

COSTA, E. V.; DA CRUZ, P. E. O.; LOURENÇO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporhinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, v.27, p. 1002-1006, 2013.

COSTA, E. V.; SAMPAIO, M. F. C.; SALVADOR, M. J.; NEPEL, A.; BARISON, A. Chemical constituents from the stem bark of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Química Nova**, v.38, p.769-776, 2015.

COSTA, E. V.; SOARES, L. N.; PINHEIRO, M. L. B.; MAIA, B. H. L. N. S.; MARQUES, M. F. A.; BARISON, A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SOUSA, R. L.; GALVERNA, R. S.; HEERDT, G. MORGON, N.; ACHO, L. D. R.; LIMA, E. S.; SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F. Guaianolide sesquiterpene lactones and aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria friesiana*. **Phytochemistry**, v.145, p.18-25, 2018.

CUTTER, P. S.; MILLER, R. B.; SCHORE, N. E. Synthesis of protoberberines using a silyl-directed pictet-spengler cyclization. **Tetrahedron**, v.58, p1471-1478, 2002.

DANDAN, R. H.; BRUNTON, L.L. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman**. Porto Alegre: AMGH, 2015.

DAS, S.; LASKAR, M. A.; SARKER, S. D.; CHOUDHURY, M. D.; CHOUDHURY, P. R.; MITRA, A.; JAMIL, S.; LATHIFF, S. M. A.; ABDULLAH, S, A.; BASAR, N.; NAHARC, L.; TALUKDAR, AD. Prediction of anti-Alzheimer's activity of flavonoids targeting acetylcholinesterase in silico. **Phytochemical Analysis**, v. 28, p 324-331, 2017.

DARVESH, S.; WALSH, R.; KUMAR, R.; CAINES, A.; ROBERTS, S.; MAGEE, D.; ROCKWOOD, K.; MARTIN, E. Inhibition of human cholinesterases by drug used to treat Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v.17, p.117-126, 2003.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: na important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v.33, p.432-455, 2016.

DETTMER, K.; ARONOV, P.A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 51-78, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester, New York: John Wiley, v.3, p.187, 311, 346, 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica**. ed. UNESP, São Paulo, 2002.

DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, V 16.1.0, AccelrysInc, San Diego, CA, 2016.

DONEV, R.; KOLEV, M.; MILLET, B.; THOME, J. Neuronal death in Alzheimer's disease and therapeutic opportunities. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, p.4329-4348, 2009.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: from 3D structures to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, p.10-22, 2010.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p.88-95, 1961.

FARIAS, JOSIANNY FEITOSA. Maturação e determinação do ponto de colheita de envira-caju (*Onychopetalum periquino*). 2009. 41f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2009.

FECHINE, I.M.; LIMA, M.A.; NAVARROM V.R.; CUNHA, E.V.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alacloides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.17-19, 2002.

FERREIRA, G.; GIMENEZ, J. I.; CORSATO, J. M.; DALANHOL, S. J.; DA SILVA, M. A. P. Fisiologia da germinação e dormência de sementes de Annonaceae In: ALMEIDA, J. R. G. S.; JÚNIOR, R. G. O.; OLIVEIRA, A. P (Org.). **Annonaceae; tópicos selecionados**, Curitiba, p.33-62, 2015.

FOURNIER, G.; LEOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p.131-142, 1999.

GAJALAKSHMI, S.; DIVYA, R.; DEEPIKA, V. D; MYTHILI, S.; SATHIAVELU, A. Pharmacological activities of *Annona squamosa*: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.10, p. 24-29, 2011.

GAUTHIER, S. Advances on the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. **Canadian Medical Association Journal**, v.166, p.616-623, 2002.

GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adhesion & Migration**, v.3, p.88-93, 2009.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p.185-224, 1989.

GUPTA, S.; FALLARERO, A.; JARVINEN, P.; KARLSSON, D.; JOHNSON, M. S.; VUORELA, P. M.; MOHAN, G. Discovery of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors identified by pharmacophore modeling and sequential virtual screening techniques. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, p.1105-1112.

HALLDORSOTTIR, E. S.; JAROSZEWSKI, J. W.; OLAFSDOTTIR, E. S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. Alpestre. **Phytochemistry**, v.71, p.149-157, 2010.

HANGEL, J. M.; FACCHINI, P. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. **Plant and Cell Physiology**, v.54, p.647-672, 2013.

HERRMANN, N.; CHAU, S. A.; KIRCANSKI, I.; LANCTOT, K. L. Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: **A systematic review. Drugs**, v.75, p.2031-2065, 2011.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: Principles and applications**. 3 ed. Chichester: Wiley, 2007. 502 p.

HÖGENAUER, K., BAUMANN, K., ENZ, A., AND MULZER, J. Synthesis and acetylcholinesterase inhibition of 5-desamino huperzine A derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 11, p. 2627-2630, 2001.

HOSTALKOVA, A.; MARIKOVA, J.; OPLETAL, L.; KORABENCY, J.; HULCOVA, D.; KUNES, J.; NOVAKOVA, L.; PEREZ, D. I.; JUN, D.; KUCERA, T.; ANDRISANO, V.; SIATKA, T.; CAHLIKOVA, L. Isoquinoline alkaloids from berberis vulgaris as potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Natural Products**, v.82, p.239-248, 2019.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, v 23, p.181-199, 2006.

HU, T.; ZHANG, J. Mass-Spectrometry-based lipidomics. **Journal of Separation Science**, v. 41, p. 351-372, 2018.

INGKANINAN, K.; PHENGA, P.; YUENYONGSAWD, S.; KHORONA, N. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.58, p. 695-670, 2006.

IRWIN, J.; SHOICHET, B. Docking screens for novel ligands conferring new biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p.4103-4120, 2016.

JEONG, E.; LEE, S., YU, S. M.; PARK, N. H.; LEE, H.; YIM, Y.; HWANG, G.; CHEONG, C.; JUNG, J. H.; HONG, JONGKI, H. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.26, p.1661-1674, 2012.

KARIMOVA, E.R.; SPIRIKHIN, L. V.; BALTINA, L.A.; ABDULLIN, M. I. Synthesis and identification of quercetin benzylethers. **Russian Journal of General Chemistry**, v.84, p. 1711-1715, 2014.

KATKAR, K. V.; SUTHAR, A. C.; CHAUHAN, V.S. The chemistry pharmacologic and therapeutic applications of *Polyalthia longifolia*. **Pharmacognosy Reviews**, v.4, p. 62-68, 2010.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug Discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p. 936-949, 2004.

KOKKOTOU, K.; IOANNOU, E.; NOMIKOU, M.; PITTERL, F.; VONAPARTI, A.; SIAPI, E.; ZERVOU, M.; ROUSSIS, V. An integrated approach using UHPLC-PDA-HRMS and 2D HSQC NMR for the metabolic profiling of the red alga *Laurencia*: dereplication and tracing of natural products. **Phytochemistry**, v. 108, p. 208-219, 2014.

KUCK, D.; GRUTZMACHER, H.; BARTH, D.; HEITKAMP, S.; LETZEL, M. The role of ion/neutral complexes in the fragmentation of N-benzyl-(alkylpyridinium). **International Journal of Mass Spectrometry**, v.306, p.159-166, 2011.

KUCK, D.; HEITKAMP, S.; LETZEL, M.; AHMED, I.; KROHN, K. Consecutive loss of two benzyl radicals from the $[M + Na]^+$ adduct ions of pyrogallol tribenzyl ether and its derivatives. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 24, p.23-32, 2018.

LANE, R. M.; KIVIPELTO, M.; GREIG, N. H. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. **Clinical Neuropharmacology**, v.27, p.141-149, 2004.

LAPISH, C. C.; AHN, K. C.; CHAMBERS, A.; ASHBY, D. M.; AHN, S.; PHILLIPS, A. G. Selective effects of D- and L-Govadine in preclinical tests of positive, negative, and cognitive symptoms of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v.39, p.1754-1762, 2014.

LEKANA-DOUKI, J. B.; BONGUI, J. B.; LIABAGUI, S. L. O.; EDOU, S. E. Z.; ZATRA, R.; BISVIGOU, U.; DRUILHE, P.; LEBIBI, J.; NDOUO, F. S. T.; KOMBILA, M. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of nine plants traditionally used in Gabon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.1103-1108, 2011.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783-2813, 1982.

LI, S.; WANG, Y.; QIL, S.; ZHANG, Y.; DENG, G.; DING, W.; MA, C.; LIN, Q.; GUAN, H.; LIU, W.; CHENG, X.; WANG, C. Analogous β -carboline alkaloids harmaline and harmine ameliorate scopolamine-induced cognition dysfunction by attenuating acetylcholinesterase activity, oxidative stress, and inflammation in Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v.9, p.1-16, 2018.

LIMA, B. R. Estudo fitoquímico de *Onychopetalum amazonicum* R.E.Fr (Annonaceae). **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2015.

LIMA, B. R.; SILVA, F. M. A.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; JÚNIOR, R. P.; HERNANDEZ, A. J.; SALVADOR, M. J.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemical composition and of the essential oils of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. **Natural Product Research**, v.30, p2356-2359, 2016.

LIMA, J. M. Ensaio enzimático *on-line* baseado em enzimas imobilizadas e cromatografia zonal para identificação e caracterização de inibidores da enzima

Nucleosídeo Difosfato Quinase B. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

LIN, L.; YU, Q.; YAN, X.; HANG, W.; ZHENG, J.; XING, J.; HUANGA, B. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. **Analyst**, v.135, p.2970-2978, 2010.

LIU, J.; WANG, H.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.83, p.7608-7613, 2011.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; MENICHINI, F. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1209-1228, 2008.

LOPEZ-MARTIN, J.; ANAM, E.M.; BOIRAM H.; SANZ, M. J.; BLAZQUEZ, M. A.Chromone and phenanthrene alkaloids from *Dennettia tripetala*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.50, p.1613-1615, 2002.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum* and *Unonopsis* (Annonaceae). **Blumea**, v.52, p. 413-554, 2007.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H, 2015. *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim botânica do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>> Acesso em: 12 Março de 2019.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v.54, p.709-716, 2000.

MALEBO, H. M.; WENZLER, T.; CAL, M.; SWALEH, S. M.; OMOLO, M. O.; HASSANALI, A.; SÉQUIN, U.; HAUSSINGER, D.; DALSGAARD, P.; HAMBURGER, M.; BRUN, R.; NDIEGE, I. O. Anti-protozoal activity of aporphine and protoberberine alkaloids from *Annickia kummeriae* (Engl. & Diels) Setten & Maas (Annonaceae). **Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p.2-10, 2013.

MANTOANI, S. P.; CHIERRITO, T. P. C.; VILELA, A. F. L.; CARDOSO, C. L.; MARTINEZ, A.; CARVALHO, I. Novel triazole-quinoline derivatives as selective dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. **Molecules**, v.21, p.1-12, 2016.

MANUSZAK, M.; HARDING, W.; GADHIYA, S.; RANALDI, R. (-)-Stepholidine reduces cue-induced reinstatement of cocaine seeking and cocaine self-administration in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v.189, p.49-54, 2018.

MARSHALL, D. D.; LEI, S.; WORLEY, B.; HUANG, Y.; GARCIA-GARCIA, A.; FRANCO, R.; DODDS, E. D.; POWERS, R. Combining DI-ESI-MS and NMR datasets for metabolic profiling. **Metabolomics**, v. 11, p. 391-402, 2015.

MARTÍNEZ-JARQUÍN, S.; WINKLER, R. Low-temperature plasma (LTP) jets for mass spectrometry (MS): Ion processes, instrumental set-ups, and application examples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 89, p. 133-145, 2017.

MOHAMED, T.; RAO, P. P. Design, synthesis and evaluation of 2,4-disubstituted pyrimidines as cholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.3606-3609, 2010.

MONGE, M. E.; HARRIS, G. A.; DWIVEDI, P.; FERNÁNDEZ, F. M. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2269-2308, 2013.

MORAES, M. C.; VANZOLINI, K. L.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. New trends in LC protein ligand screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.87, p. 155-166, 2014.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M.F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v.30, p.2785-2791, 2009.

MORRIS, M.; KNUDSEN, G. M.; MAEDAL, S.; TRINIDAD, J. C.; IOANOVICIUS, A.; BURLINGAME, A. L.; MUCKE, L. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. **Nature Neuroscience**, v.18, p. 1183-1189, 2015.

MULLER, T.; COOKS, R. G. Differential rapid screening of phytochemicals by leaf spray mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v.35, p.919-924, 2014.

MURRAY, A. P.; FARAONI, M. B.; CASTRO, M. J.; ALZA, N. P.; CAVALLARO, V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology*, v. 11, 388-413, 2013.

NASCIMENTO, E. C. M.; OLIVA, M.; SWIDEREK, K.; MARTINS, J. B. L.; ANDRES, J. Binding analysis of some classical acetylcholinesterase inhibitors: insights for a rational desing using free energy perturbation method calculations with QM/MM MD simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v.57, p.958-976, 2017.

NG, Y. P.; OR, T. C.T.; IP, N. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. *Neurochemistry International*, v. 89, p.260-270, 2015.

NOVY, J.W Medicinal plants of the eastern region of Madagascar. *Journal of Ethnopharmacology*, v.55, p.119-126, 1997.

PAGLIOSA, L.B.; MONTEIRO,S.C., SILVA, K. B.; ANDRADE, J. P.; DUTILH, J.; BATISTA, J.; CAMMAROTA, M.; ZUANAZZI, J. A.S. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, v.17, p.698-701, 2010.

PATTERSON, C. The world Alzheimer Report 2018; *Alzheimer's Disease International*: London. p. 1 - 48, 2018.

PAZ, W. H. P.; OLIBEIRA, R. N.; HEERDT, G.; ANGOLINI, C. F.F.; MEDEIROS, L. S.; SILVA, V. R. S.; SANTOS, L. S.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P.; MORGON, N. H.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, F. M. A.; COSTA, E. V.; KOOLEN, H. F. Structure-based molecular networking for the target discovery of oxahomoaporphine and 8-oxohomoaporphine alkaloids from *Duguetia surinamensis*. *Journal Natural Products*. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00287, 2019.

PBMH. Normas de classificação programa brasileiro para a modernização da horticultura, v.1, São Paulo: PBMH, v.11, 2013.

PÉREZ-VICTORIA, I.; MARTÍN, J., REYES, F. Combined LC/UV/MS and NMR strategies for the dereplication of marine natural products. **Planta Medica**, v. 82, p. 857-871, 2016.

PIERRI, C. L.; PARISI, G.; PORCELLI, V. Computational approaches for protein function prediction: A combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1804, p.1695-1712, 2010.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, v.30, p.19-34, 2009.

PRINCE, M.; COMAS - HERRERA, A.; KNAPP, M.; GUERCHET, M.; KARAGIANNIDOU, M. *The World Alzheimer Report 2016*; Alzheimer's Disease International (ADI): London, v.1, p.1-131, 2016.

QIAN, W.; LU, W.; SUN, H.; LI, Z.; ZHU, L.; ZHAO, R.; ZHANG, L.; ZHOU, S.; ZHOU, Y.; JIANG, H.; ZHEN, X.; LIU, H. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel tetrahydroprotoberberine derivatives: selective inhibitors of dopamine D1 receptor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p.4862-4871, 2012.

RHEE, I.K.; VAN RIJN, R.M.; VERPOORTE, R. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.14, p.127-131, 2003.

RIBEIRO, J. E. L. S.; MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M.; WEBBER, A. Annonaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Eds.). **Flora da reserva ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**, INPA, Manaus-Amazonas, p. 121-135, 1999.

RODRIGUES, A. C. B. C.; BOMFIM, L. M.; NEVES, S. P.; MENEZES, L. R. A.; DIAS, R. B.; SOARES, M. B. P.; PRATA, A. P. N.; ROCHA, C. A. G.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Medica**, v.81, p. 798-803, 2015.

RODRIGUES, C. M. S. C.; DUTRA, L. M.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; ALMEIDA, J. R. G. S. Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Annona leptopetala* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 69, p. 222-225, 2016.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v.422, p.198-204, 2003.

SANGSTER, A. W.; STUART, K. L. Ultraviolet spectra of alkaloids. **Chemical Reviews**, v.65, p.69-130, 1965.

SANTOS, J. O.; PEREIRA, G. R.; BRANDÃO, G. C.; BORGATI, T. F.; ARANTES, L. M.; PAULA, R. C. Synthesis, *in vitro* antimalarial activity and *in silico* studies of hybrid kauranoid 1,2,3-triazoles derived from naturally occurring diterpenes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, 551-565, 2016.

SANTOS, L. S.; SILVA, V. R.; SILVA, V. R.; MENEZES, L. R. A.; SOARES, M. B. P.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Xylopine induces oxidative stress and causes G2/M phase triggering caspase-mediated apoptosis by p53-independent pathway in HCT116. **Cells. Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/7126872>, 2017.

SANTOS, M. F.; FONTES, J. E. N.; DUTRA, L. M.; BOMFIM, L. M.; COSTA, C. O. D.; MORAES, V. R. S.; BARISON, A.; SOARES, M. B. P.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. KOOLEN, H. H. F.; BEZERRA, D. P.; COSTA, E. V. Alkaloids from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae) and their cytotoxicities. **Química Nova**, v.41, p.884-890, 2018.

SCHMIDT, J.; RAITH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. Analysis of benzyloisoquinoline - type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. **European Journal of Mass Spectrometry**, v.11, p. 325 - 333, 2005.

SHANGGUAN, Y.; HE, Y.; KANG, Y.; WANG, Y.; YANG, P.; GUO, J.; HUANG, J. Structural characterization of alkaloids in leaves and roots of *Stephania kwangsiensis* by LC-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 29, p.101-111, 2018.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v.5, p.203-302, 2005.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae **Química Nova**, v.30, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae) **Química Nova**, v.32, p.1566-1570, 2009.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; LIMA, J. P. S.; SANTOS, D. M. F.; JARDIM, I. S.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from amazonian *Unonopsis* species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22, p. 1368-1371, 2012a.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Desrepliação de alcaloides aporfínicos e oxaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v.35, p.944-947, 2012b.

SILVA, J. I.; MORAES, M. C.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CASS, Q. B.; CARDOSO, C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.73, p.44-52, 2013.

SILVA, F. M. A.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; BARISON, A.; VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; FERREIRA, A. G.; PINHEIRO, M. L. B. Phytochemical Study of the Alkaloidal Fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. Guided by Electrospray Ionisation Ion-trap Tandem Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 25, p. 45-49, 2014.

SILVA, F. M. A.; LIMA, B. R.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; CORREA, W. R.; SALVADOR, M. J.; SOUZA, A. Q. L.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Polycarpol in *Unonopsis*, *Bocageopsis* and *Onychopetalum* amazonian species: cheyosystematical implications and antimicrobial evaluation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.25, p.11-15, 2015.

SILVA, F. M. A.; LIMA, B. R.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; SOUZA, A. Q. L.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.

Chemotaxonomy of the amazonian unonopsis species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-EM and chemometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.27, p.599-604, 2016.

SILVA, F.M.A.;ALMEIDA, R. A.; HEERDT, G.; SOUSA, I. L.; SILVA-FILHO, F.A.; ALENCAR, D. C.; COSTA, E. V.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; MORGON, N.H.; KOOLEN, H. H. F. Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and ab initio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.418, p.30-36, 2017.

SILVA, F.M.A.; SILVA-FILHO, F. A.; SOUZA, C. A. S.; MACIEL, J. B.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; KOOLEN, H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Isoquinoline-derived alkaloids from leaves of *Unonopsis stipitata* Diels (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.79, p.69-71, 2018a.

SILVA, F.M.A.; SILVA-FILHO, F. A.; SOUZA, C. A. S.; MACIEL, J. B.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; KOOLEN, H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Morphinadienone and other isoquinoline-derived alkaloids from the trunk bark of *Unonopsis floribunda* Diels (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.79, p.12-14, 2018b.

SINHA, S.; LIEBERBURG, I. Cellular mechanisms of β _amyloid production and secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 11049-11053, 1999.

SMALL, G. W.; RABINS, P. V.; BARRY, P. P.; BUCKHOLTZ, N. S.; DEKOSKY, S. T.; FERRIS, S. H.; FINKEL, S. I.; GWYTHYER, L. P.; KHACHATURIAN, Z. S.; LEBOWITZ, B. D.; McRAE, T. D.; MORRIS, J. C.; OAKLEY, F.; SCHNEIDER, L. S.; STREIM, J. E.; SUNDERLAND, T.; TERI, L. A.; TUNE, L. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. **Journal of the American Medical Association**, v.278, p.1363-1371, 1997.

SNEHA, M.; DULAY, M.; ZARE, R. N.Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates: analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.418, p.156-161, 2017.

SNYDER, D.; SCHILLING, M. C.; HOCHWENDER, C. G.; KAUFMAN, A. D. Profiling phenolic glycosides in *Populus deltoides* and *Populus grandidentata* by leaf spray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v.7, p. 870-876, 2015.

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; SILVA-FILHO, F. A.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L. Direct infusion ESI-IT-MSⁿ alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma maas* (Annonaceae). **Phytochemical Analysis**, v.26, p. 339-345, 2015.

SOININEN, H.; LIU, Y.; RUECKERT, D.; LOTJONEN, J. Hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. **Neurodegenerative Disease Management**, v.2, p.197-209, 2012.

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. LECLERCQ, J. Q. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v.18, p.523-528, 2004.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v.19, p. 1-32, 2013.

STEWART, J. J. P. **Stewart Computational Chemistry**, Colorado Springs, CO, USA, 2016.

TANI, C.; IMANISHI, I.; NISHIJO, J. Studies on the alkaloids of fumariaceae plants. X. Alkaloids of *Corydalis platycarpa* Makino. **Yakugaku Zasshi**, v. 90, p. 407-411, 1970.

TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p.821-827, 2013.

TORRES, F. C.; GONÇALVES, G. A.; VANZOLINI, K. L.; MERLO, A. A.; GAUER, B.; HOLZSCHUH, M.; ANDRADE, S.; PIEDADE, M.; GARCIA, S. C.; CARVALHO, I.; POSER, G. L.; KAWANO, D. F.; EIFER-LIMA, V. L.; CASS, Q. B. Combining the pharmacophore features of coumarins and 1,4-substituted 1,2,3-triazoles to design new acetylcholinesterase inhibitors: fast and easy generation of 4-methylcoumarins/ 1,2,3-

triazoles conjugates via click chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.27, p.1541-1550, 2016.

TROTT, O.; OLSON, A.J. Software news and update autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, na multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v.31, p.455-461, 2009.

TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T.; TCHOKOUAHA, L. R. Y.; NOGUEM, B.; BAKARNGA-VIA, I. B.; NGUEPI, M. S. D.; NKONGMENECK, B. A.; BOYOM, F.F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four áreas of Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, p.171-180, 2012.

TSAI, S.; LEE, S. Characterization of acetylcholinesterase inhibitory constituents from *Annona glabra* assisted by hplc microfractionation. **Journal of Natural Products**, v.73, p.1632-1635, 2010.

VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C. C.; CORREA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tadem spectrometry: An on-flow tool for ligand screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p.2038-2044, 2013a.

VANZOLINI, K. L.; JIANG, Z.; ZHANG, X.; VIEIRA, L. C. C.; CORREA, A. G.; CARDOSO, C. L.; CASS, Q. B.; MOADDEL, R. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening. **Talanta**, v.116, p.647-652, 2013b.

VANZOLINI, K. L. Biorreatores de acetilcolinesterase: estudos de condições para triagem de ligantes. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, 2013c.

VÁSQUEZ, S. P.F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônia**, v.44, p.457-472, 2014.

VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; SANTOS, E. P.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R. Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.49, p. 152-155, 2013.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v.52, p.609-623, 2003.

VILELA, A. F. L.; SILVA, J. I.; VIEIRA, L. C. C.; BERNASCONI, G. C. R.; CORREA, A. G. A.; CASS, Q. B.; CARDOSO, C. L. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. **Journal Chromatography B**, v.968, p. 87-93, 2014.

VILELA, A. F. L.; SEIDL, C.; LIMA, J. M.; CARDOSO, C. L. Na improved immobilized enzyme reactor-mass spectrometry-based label free assay for butyrylcholinesterase ligand screening. **Analytical Biochemistry**, v. 549, p.53-57, 2018.

WANG, R.; YAN, H.; TANG, X. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from chinese herbal medicine. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.27, p. 1-26, 2006.

WANG, B.; MAI, Y.; LI, Y.; HOU, J.; HUANG, S.; OU, T.; TAN, J.; AN, L.; LI, D.; GU, L.; HUANG, Z. Synthesis and evaluation of novel rutaecarpine derivatives and related alkaloids derivatives as selective acetylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.1415-1423, 2010.

WANG, J.; GU, B. J.; MASTERS, C. L.; WANG, AND Y. J. A systemic view of Alzheimer disease-insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. **Nature Reviews Neurology**, v.13, p.612-623, 2017.

WANG, L.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, T.; KOOL, J.; SOMSEN, G. W.; WANG, Q.; JIANG, Z. Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolith-based immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1563, p.135-143, 2018.

WEI, C.; WANG, S.; YE, J.; HWANG, T.; CHENG, M.; SUNG, P.; CHANG, T. H.; CHEN, J. New anti-inflammatory aporphine and lignan derivatives from the root Wood of *Hernandia nymphaeifolia*. **Molecules**, v.23, p.1-12, 2018.

XING, S.; ZHU, C.; ZHANG, R.; NA, L. Huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: A meta-analysis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. DOI:10.1155/2014/363985, 2014.

YANG, Y.; CHANG, F.; WU, Y. Annosqualine: a novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. **Helvetica Chimica Acta**, v.87, p. 1391-1399, 2004.

YANG, Z.; SONG, Z.; XUE, W.; SHENG, J.; SHU, Z.; SHI, Y.; LIANG, J.; YAO, X. Synthesis and structure-activity relationship of nuciferine derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v.23, p.3178-3186, 2014.

ZAWAWI, N. K. A.; AHMAT, N.; AHMAD, R.; JAAFAR, F. M.; GHANI, N. Oxoaporphine alkaloids and flavonols from *Xylopiya ferruginea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.43, p.7-9, 2012.

ZHAN, Z.; YU, Q.; WANG, Z.; SHAN, W. Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.6185-6187, 2010.

ZHANG, N.; LI, Y.; ZHOU, Y.; HOU, J.; HE, Q.; HU, X.; JIA, Y.; YU, C.; NIE, Z. Rapid detection of polyhydroxylated alkaloids in mulberry using leaf spray mass spectrometry. **Analytical Methods**, v.5, p.2455-2460, 2013.

ZHAO, T.; DING, K.; ZHANG, L.; CHENG, X.; WANG, C.; WANG, Z. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of β -carboline and quinoline alkaloids derivatives from the plants of genus *Peganum*. **Journal of Chemistry**. DOI: [10.1155/2013/717232](https://doi.org/10.1155/2013/717232), 2017.

8. ANEXOS

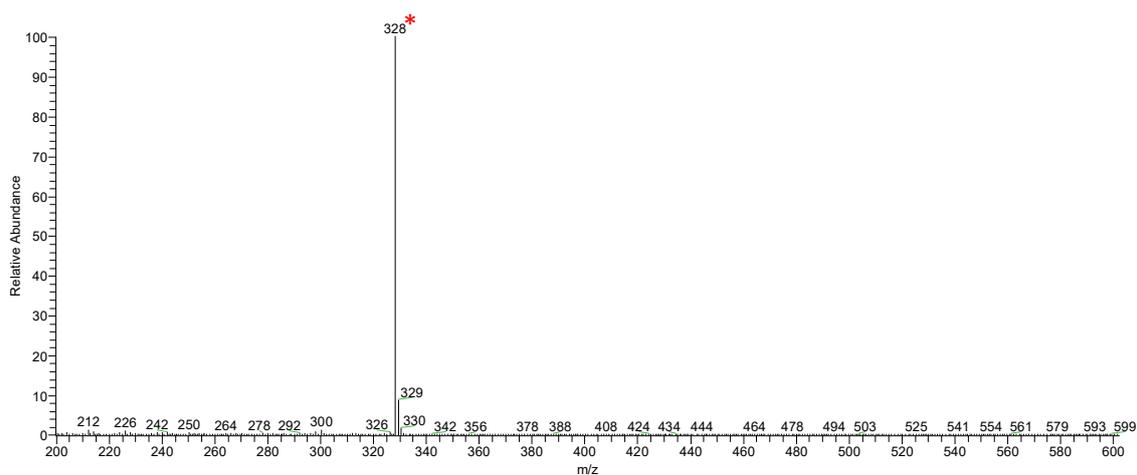


Figura A1. Espectro de massa do pico I. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*

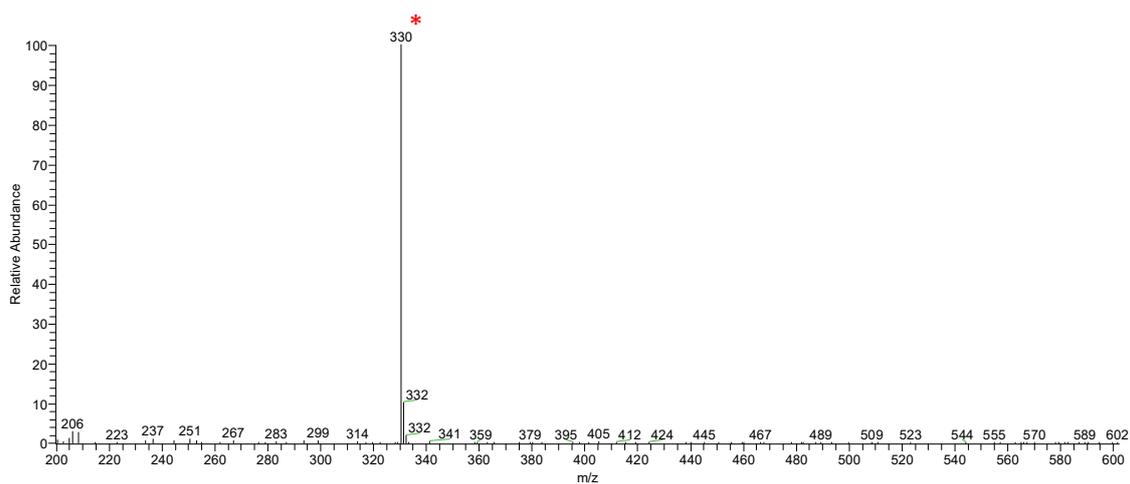


Figura A2. Espectro de massa do pico II. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*

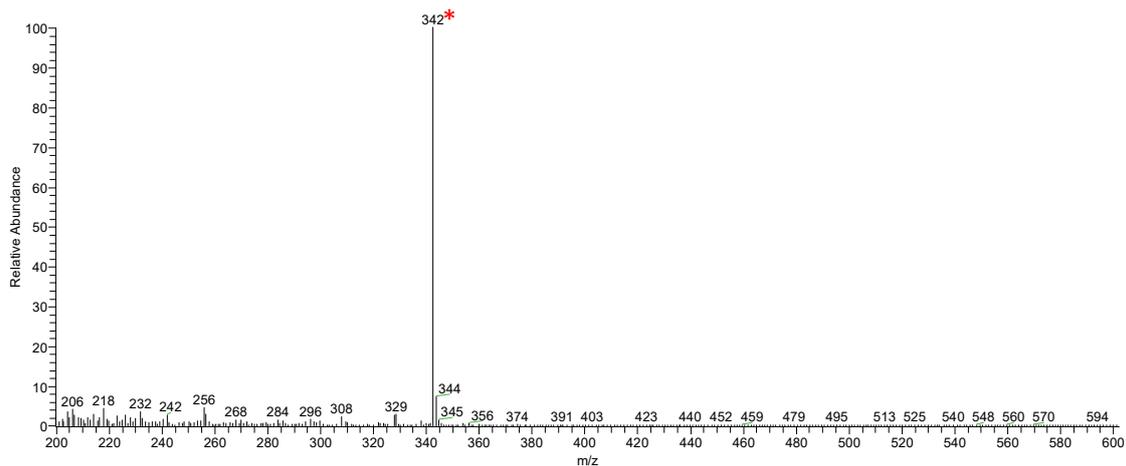


Figura A3. Espectro de massa do pico III. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

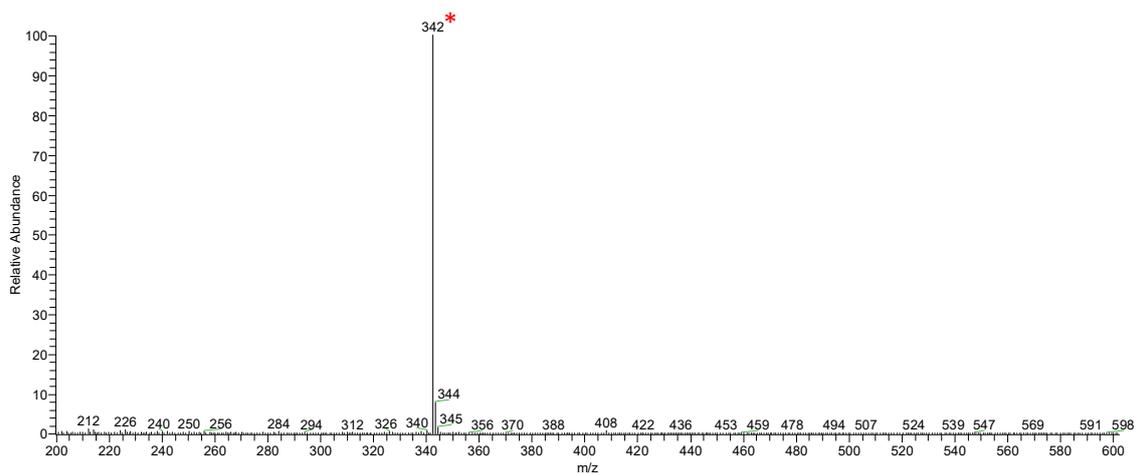


Figura A4. Espectro de massa do pico IV. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

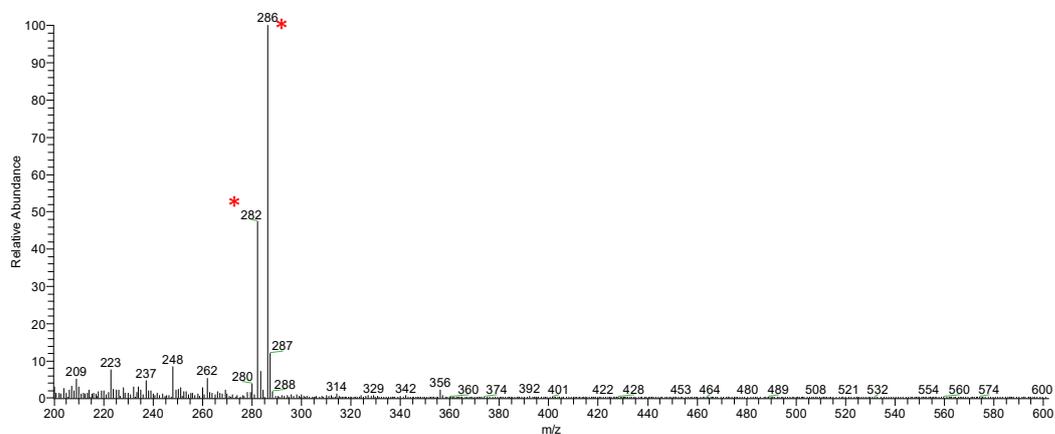


Figura A5. Espectro de massa do pico V. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

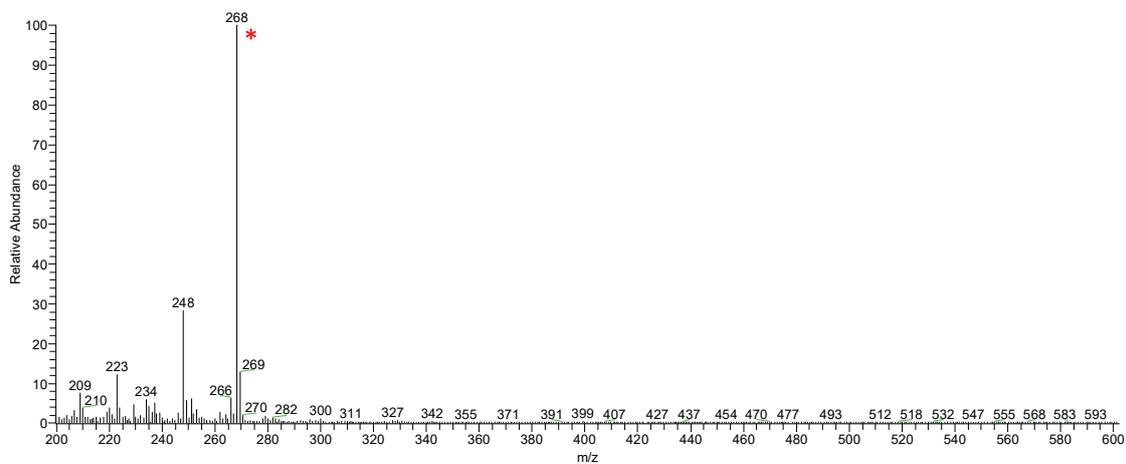


Figura A6 Espectro de massa do pico VI. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

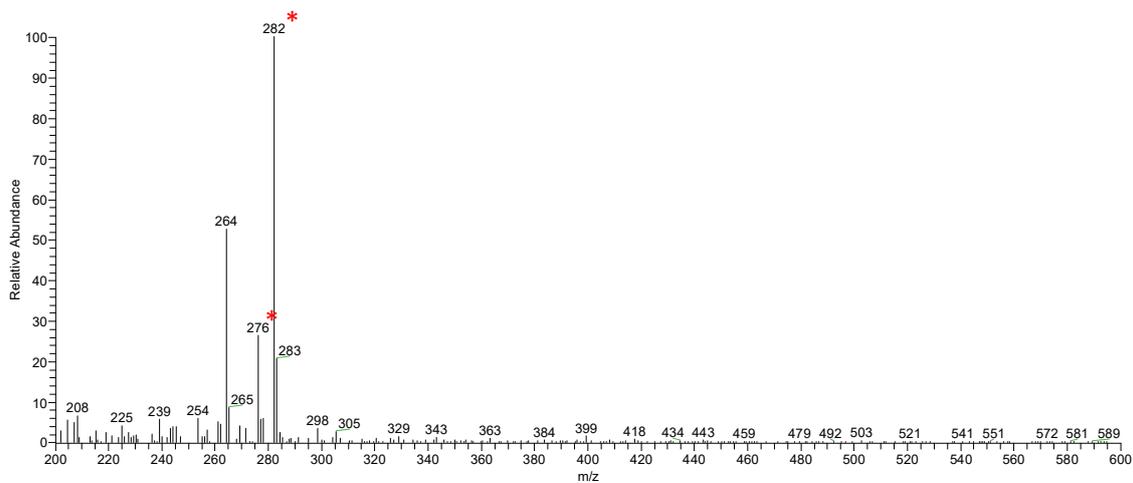


Figura A7. Espectro de massa do pico VII. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

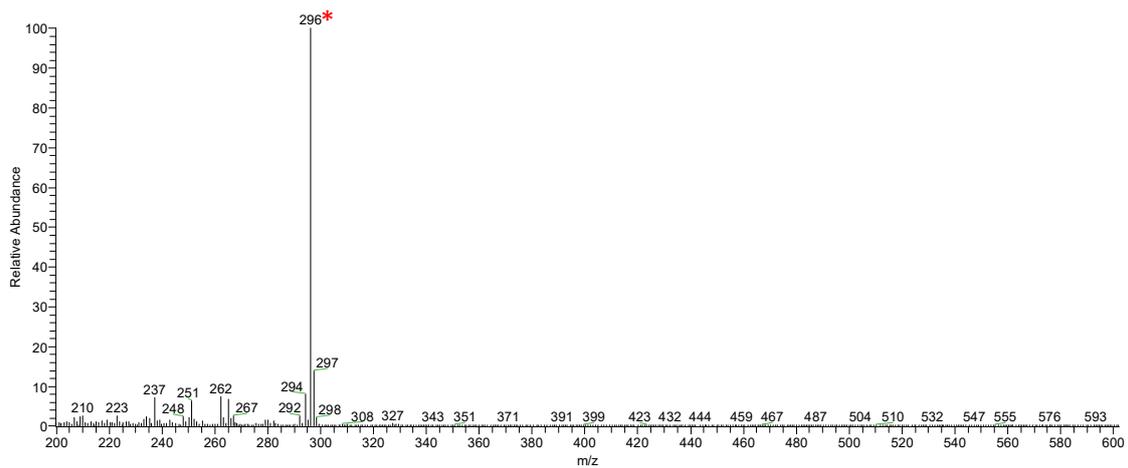


Figura A8. Espectro de massa do pico VIII. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

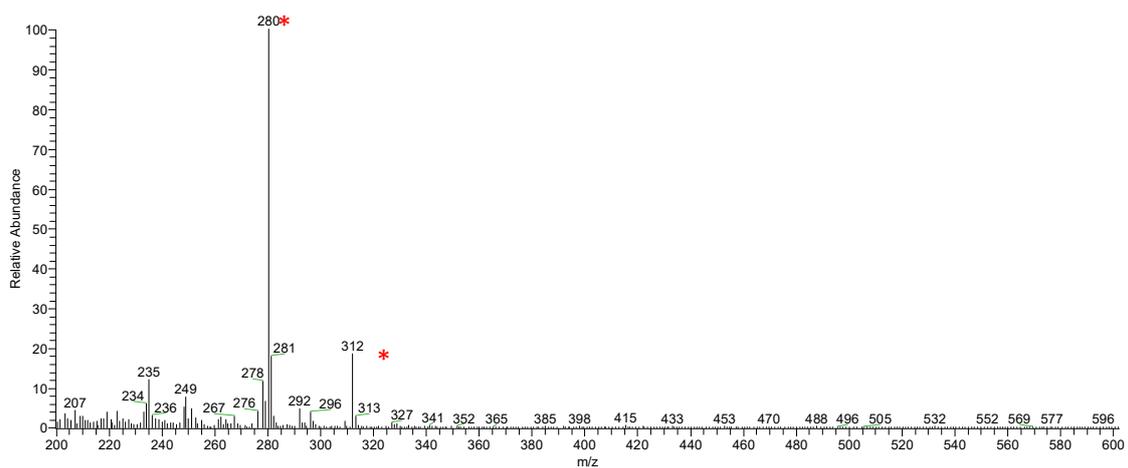


Figura A9. Espectro de massa do pico IX. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

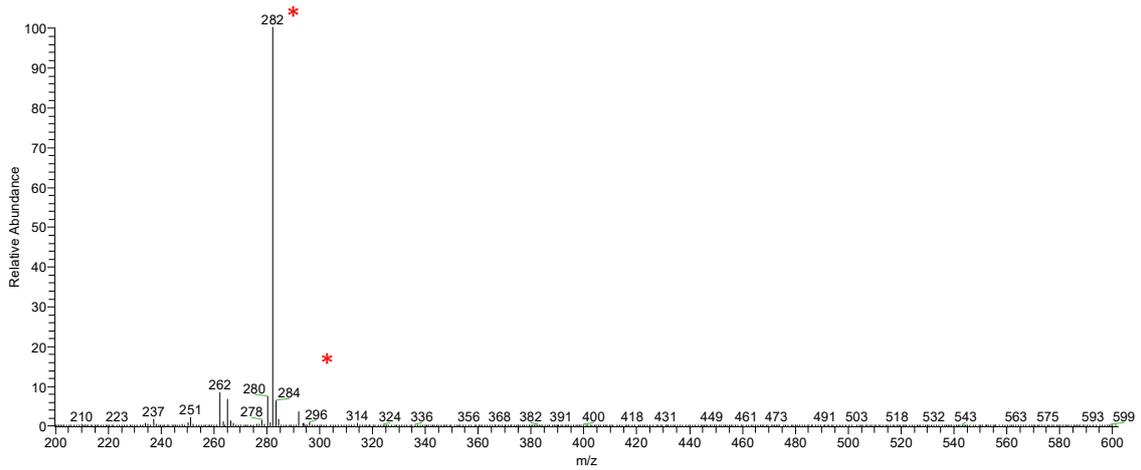


Figura A10. Espectro de massa do pico X. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

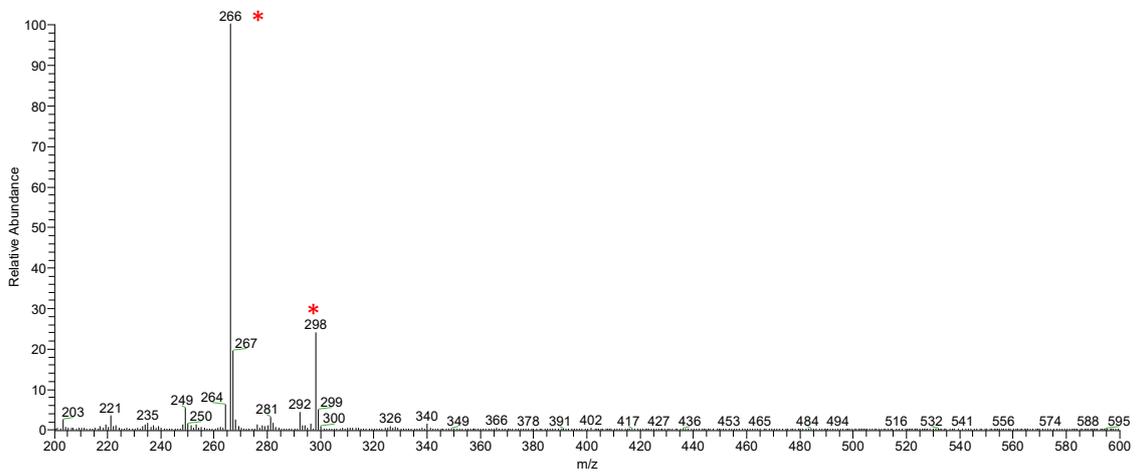


Figura A11. Espectro de massa do pico XI. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

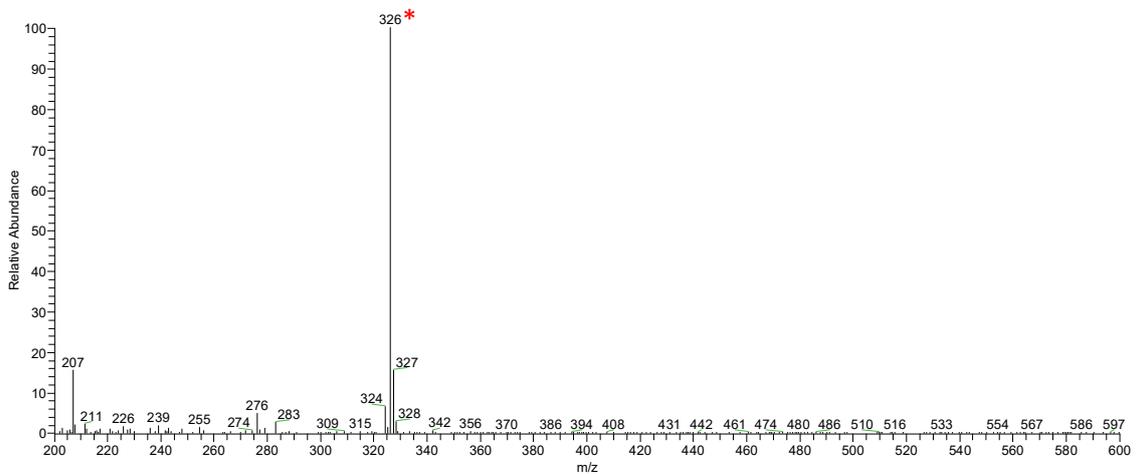


Figura A12. Espectro de massa do pico XII. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

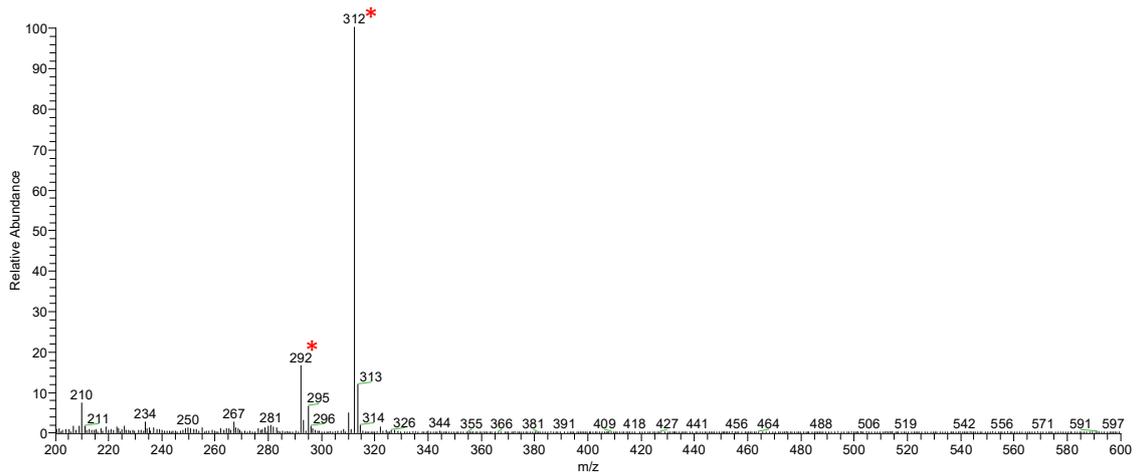


Figura A13. Espectro de massa do pico XIII. O * denota o íon submetido a fragmentação para *O. amazonicum*.

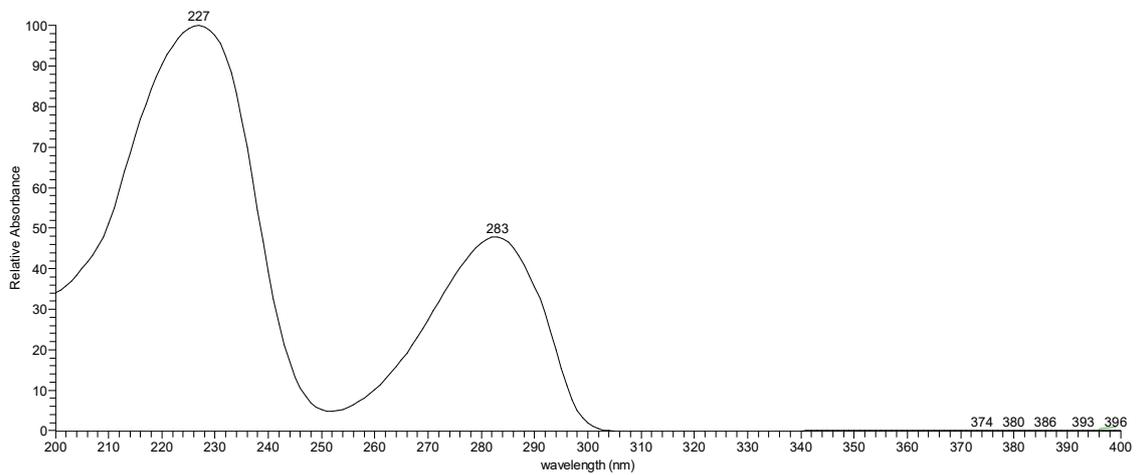


Figura A14. Espectro DAD do pico I para espécie *O. amazonicum*.

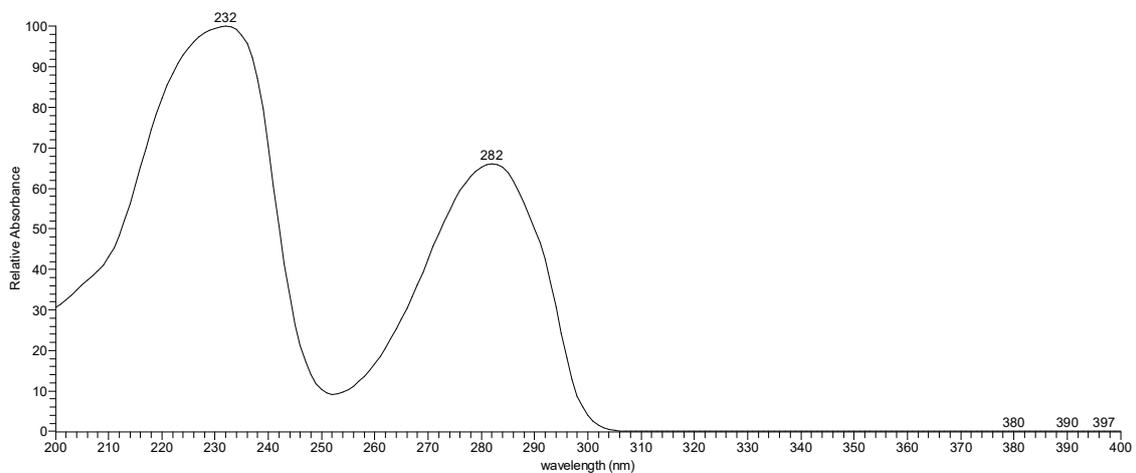


Figura A15. Espectro DAD do pico IV para espécie *O. amazonicum*.

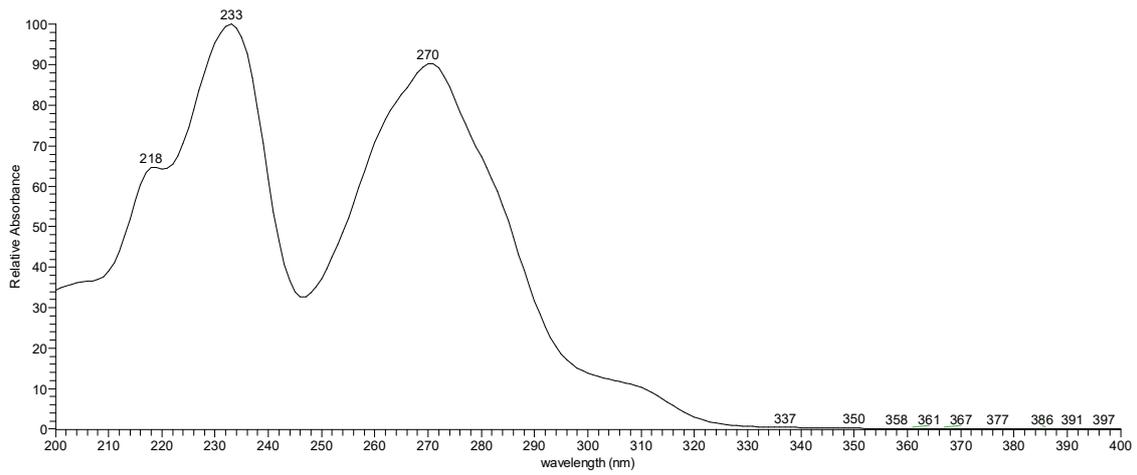


Figura A16. Espectro DAD do pico VIII para espécie *O. amazonicum*.

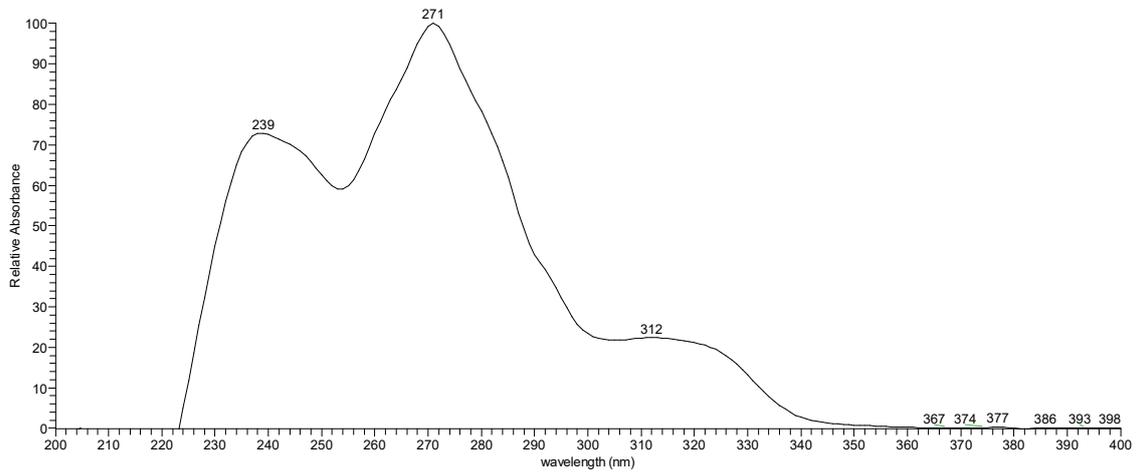


Figura A17. Espectro DAD do pico IX para espécie *O. amazonicum*.

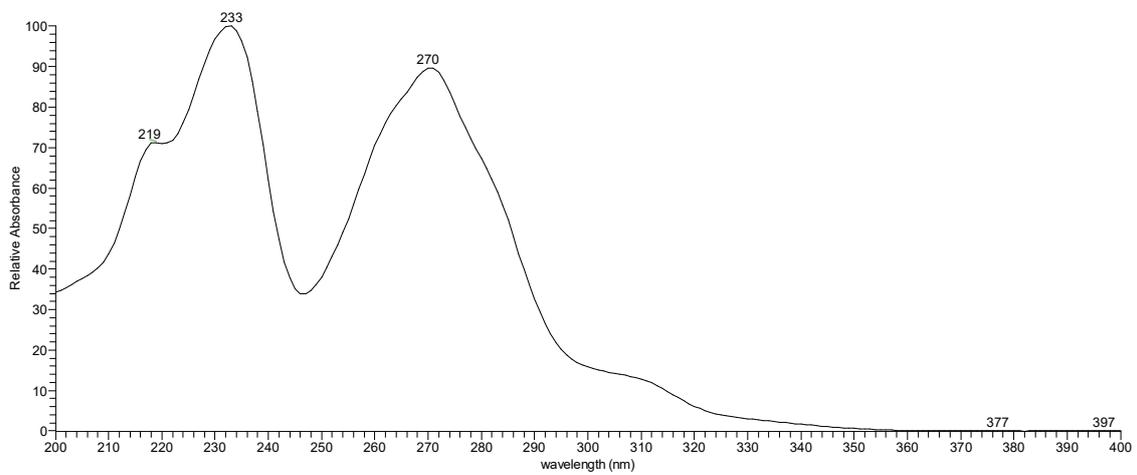


Figura A18. Espectro DAD do pico X para espécie *O. amazonicum*.

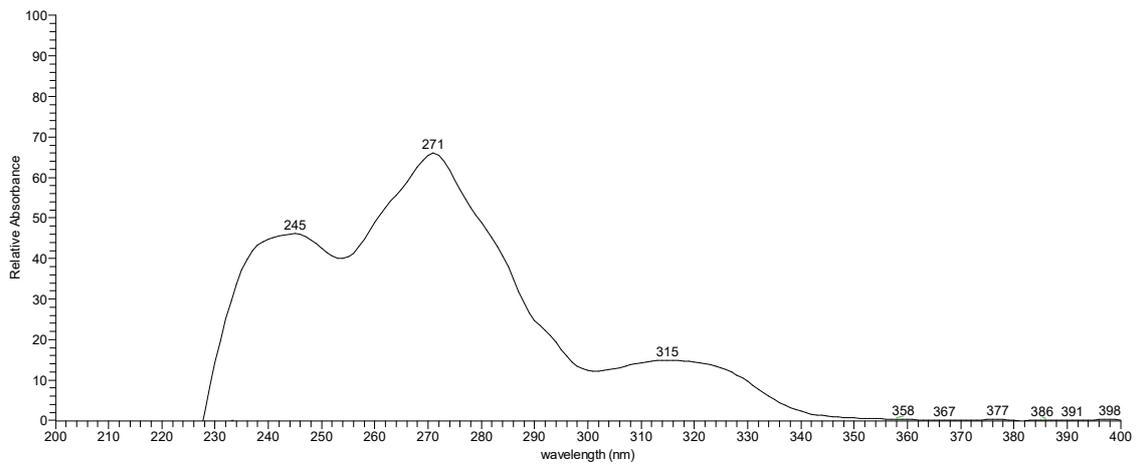


Figura A19. Espectro DAD do pico XI para espécie *O. amazonicum*.

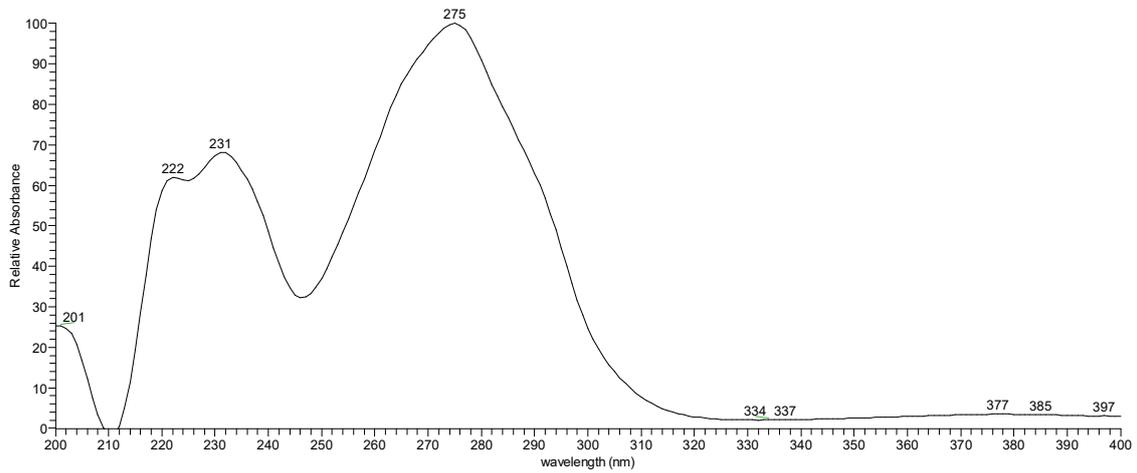


Figura A20. Espectro DAD do pico XII para espécie *O. amazonicum*.

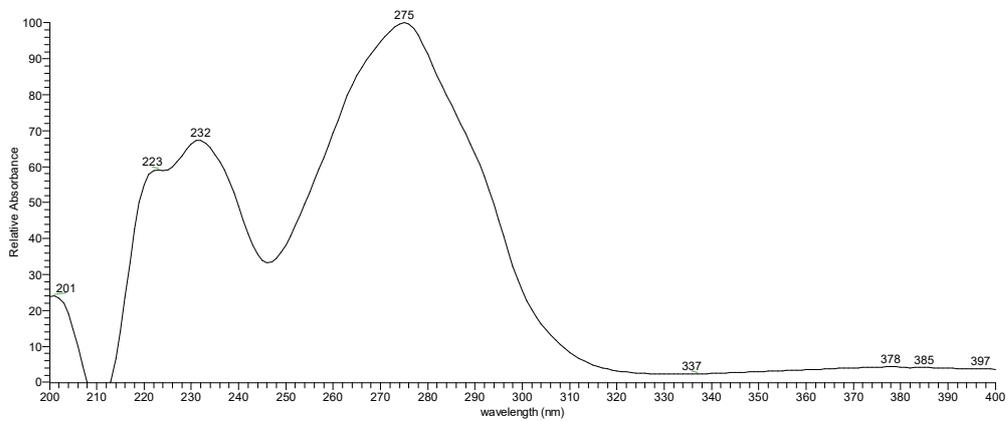


Figura A21. Espectro DAD do pico XIII para espécie *O. amazonicum*

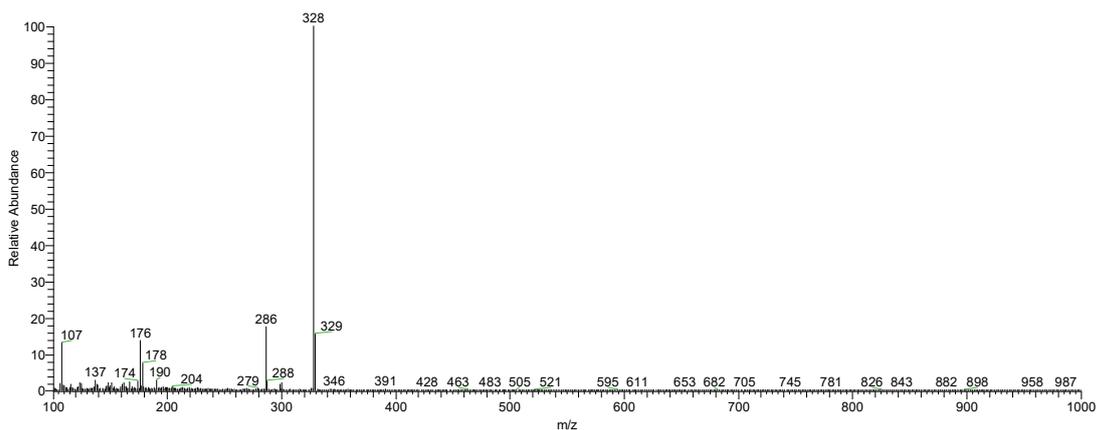


Figura A22. Espectro de massa do pico I para espécie *O. periquino*. O * denota o íon submetido a fragmentação.

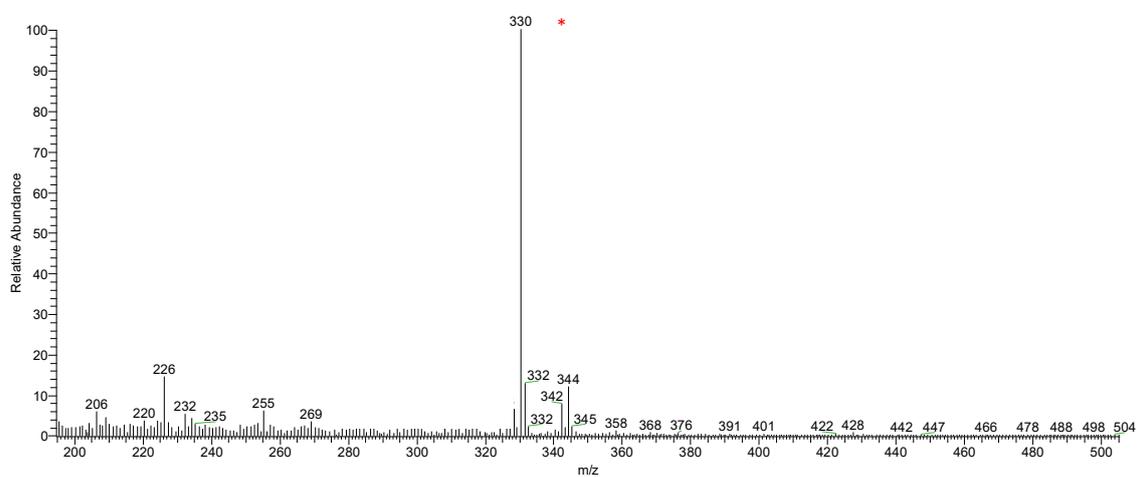


Figura A23. Espectro de massa do pico II para espécie *O. periquino*. O * denota o íon submetido a fragmentação.

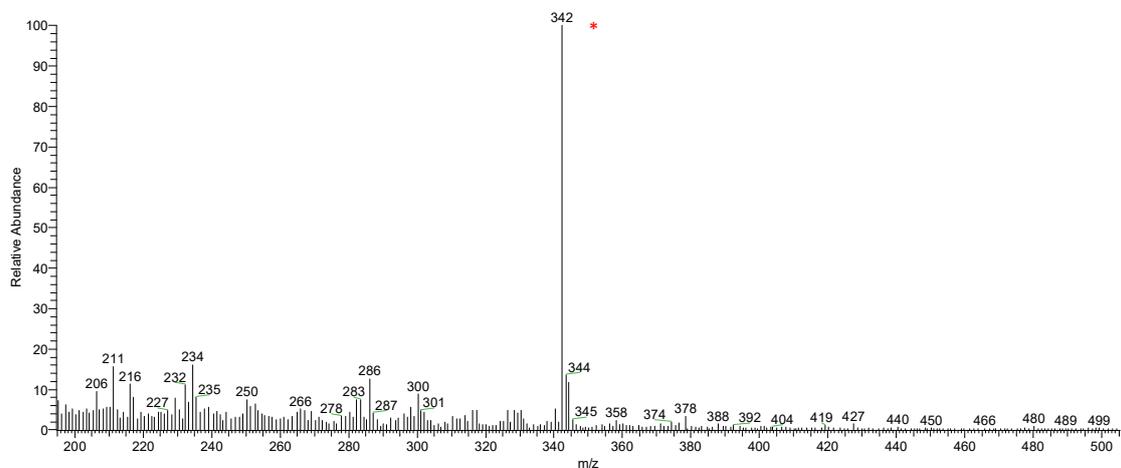


Figura A24. Espectro de massa do pico III para espécie *O. periquino*. O * denota o íon submetido a fragmentação.

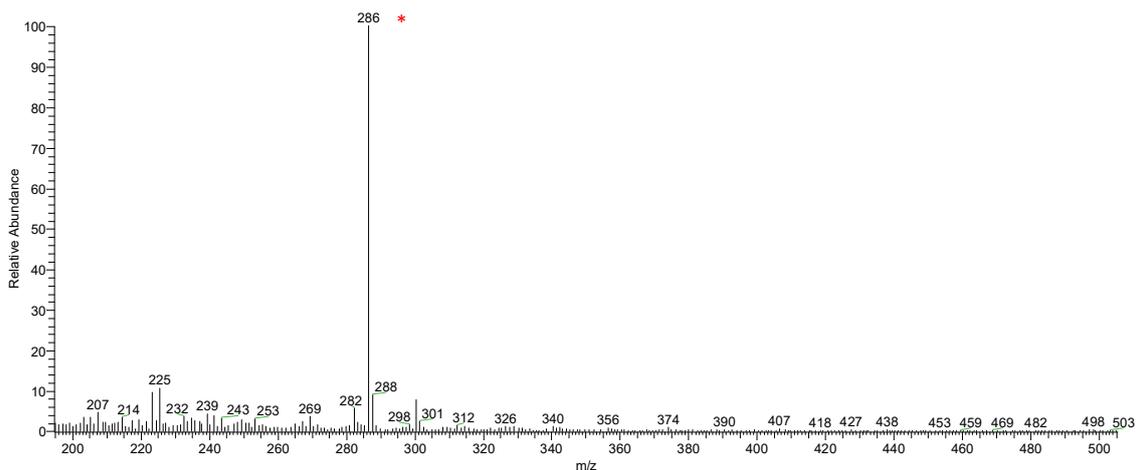


Figura A25. Espectro de massa do pico V para espécie *O. periquino*. O * denota o íon submetido a fragmentação.

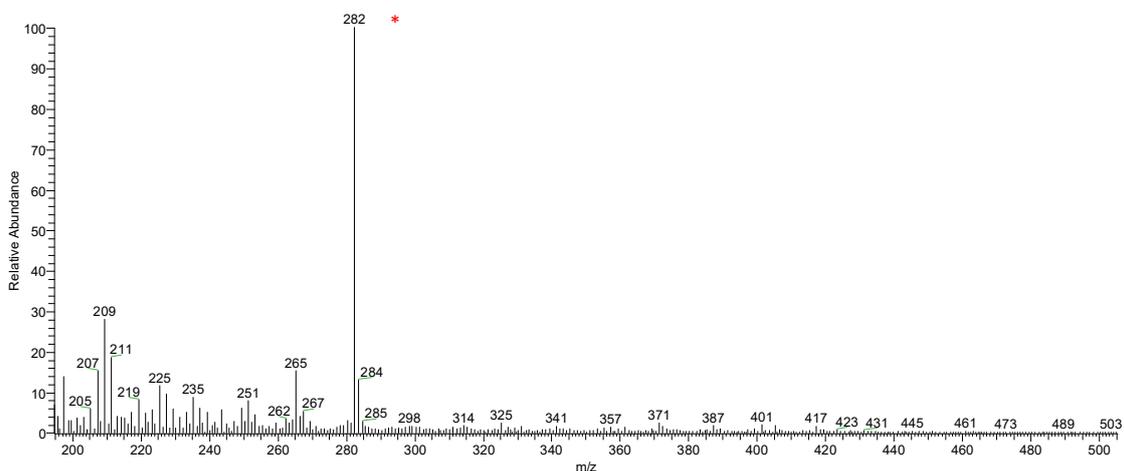


Figura A26. Espectro de massa do pico X para espécie *O. periquino*. O * denota o íon submetido a fragmentação.

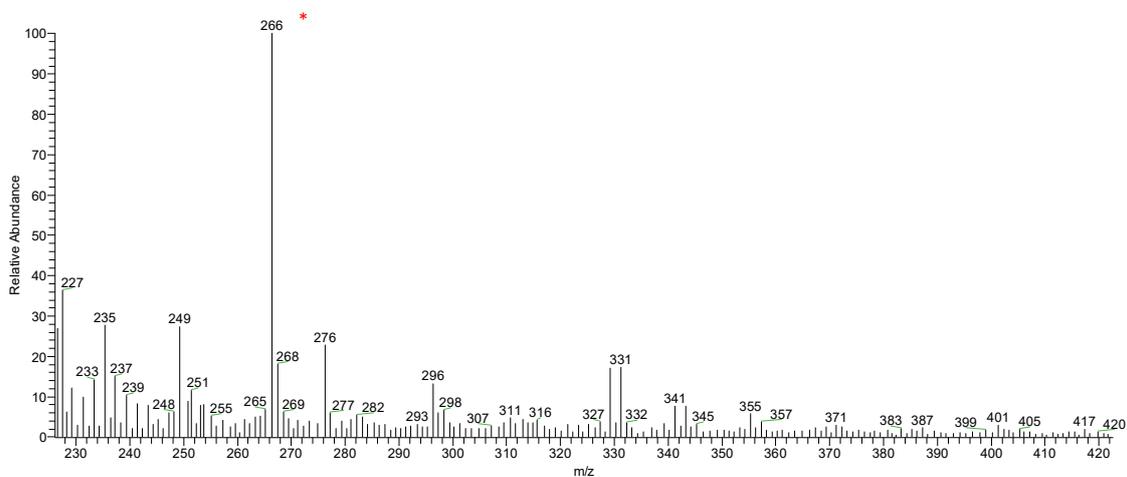
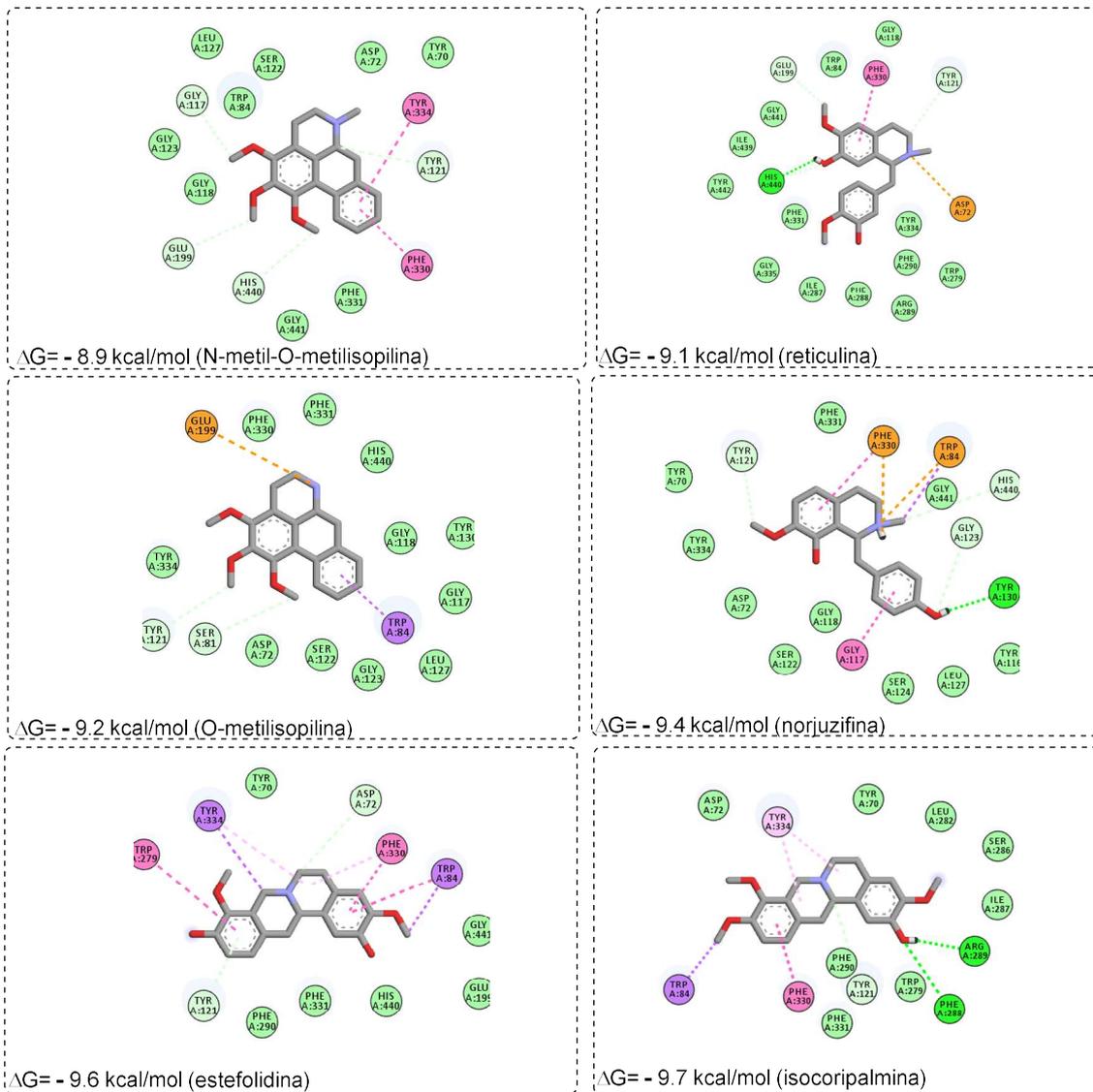


Figura A27. Espectro de massa do pico XI para espécie *O. periquino*. O * denota o íon submetido a fragmentação.



Interações

	van der Waals		Pi-Donor Hydrogen Bond
	Attractive Charge		Pi-Sigma
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Pi Stacked
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Pi T-shaped
	Pi-Cation		

Figura A28. Principais interações observadas para os complexos dos alcaloides desreplcados-AChE.

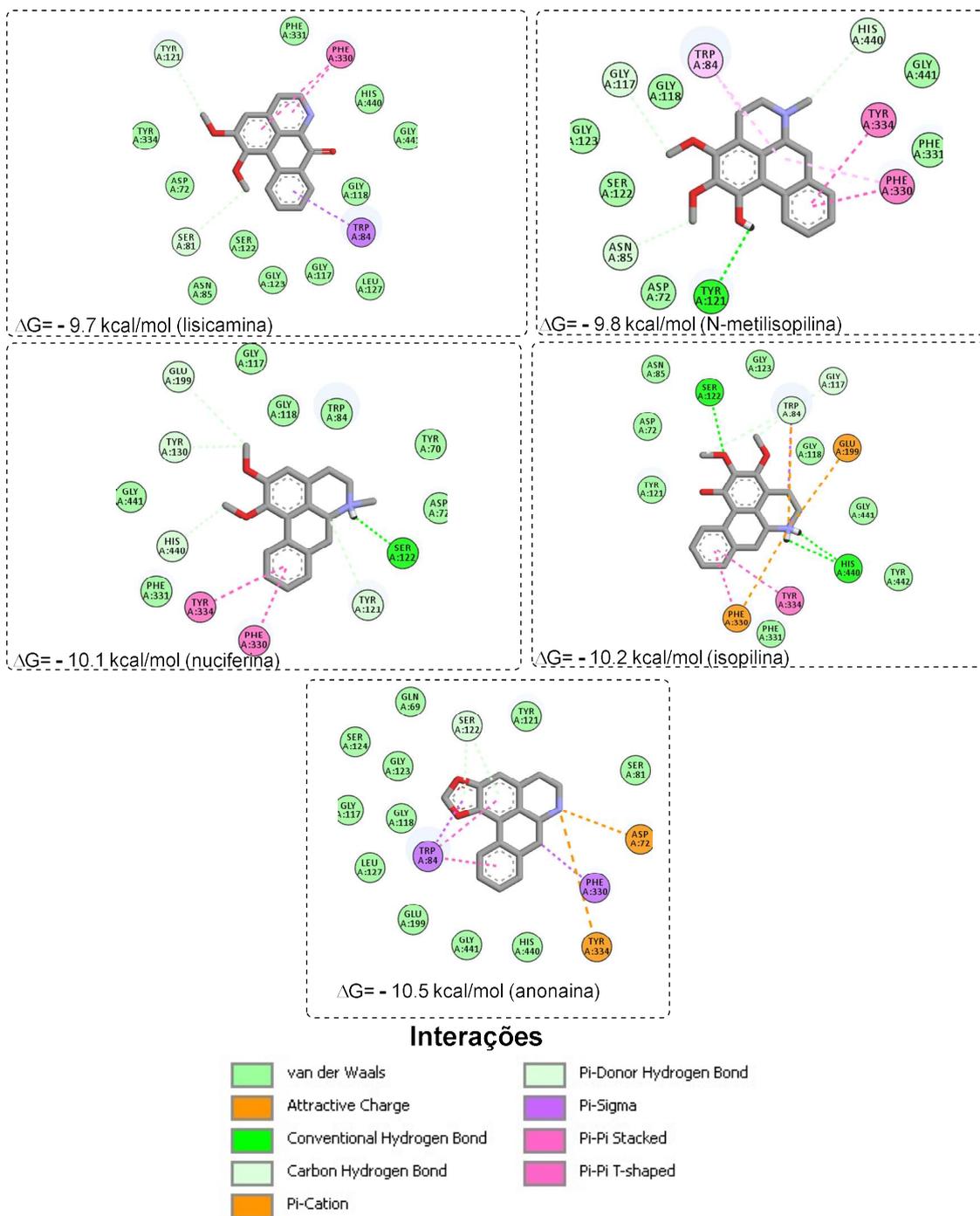


Figura A29. Principais interações observadas para os complexos dos alcaloides desrepligados-AChE.

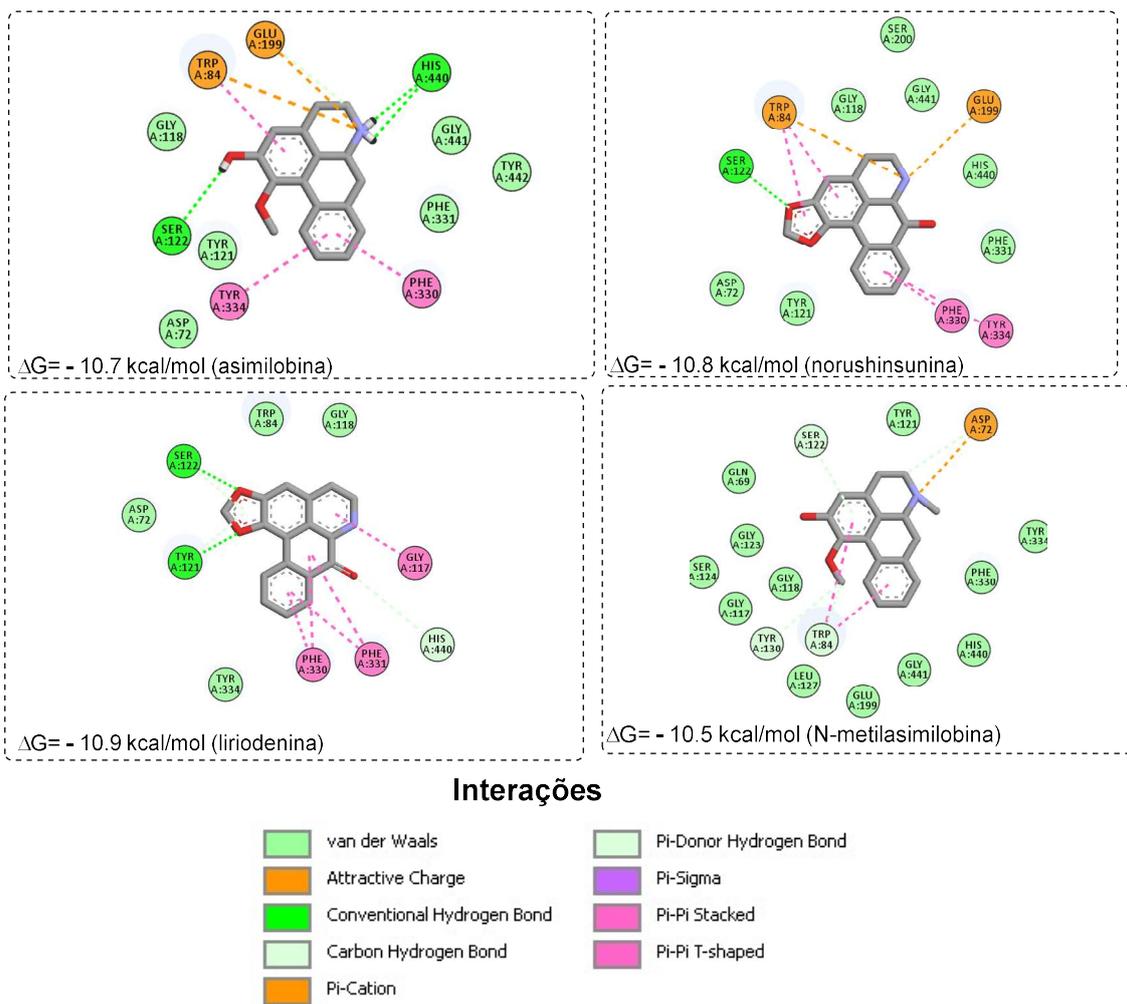


Figura A30. Principais interações observadas para os complexos dos alcaloides desreplificados-AChE.

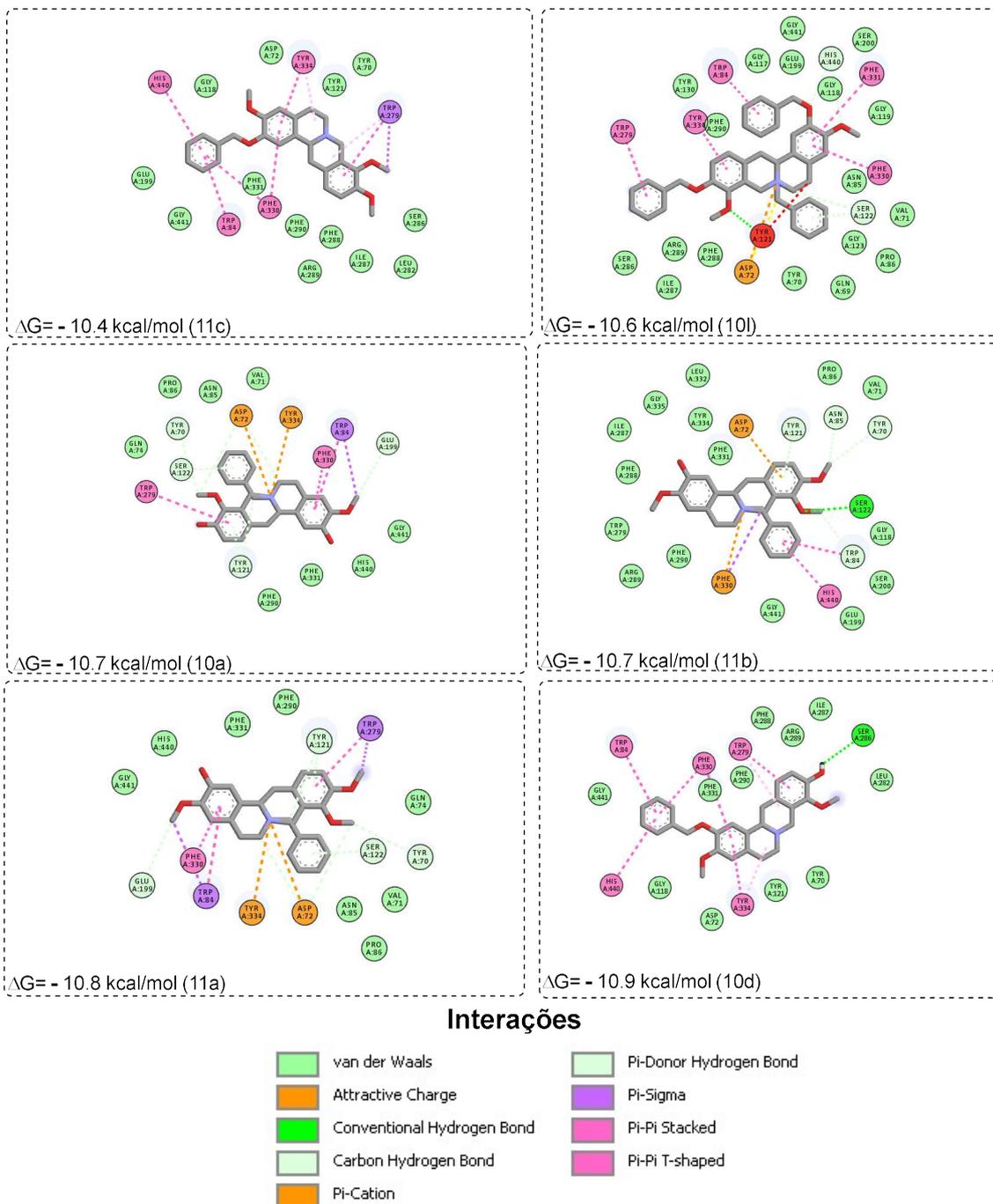


Figura A31. Principais interações observadas para os complexos dos alcaloides benzilados-AChE.

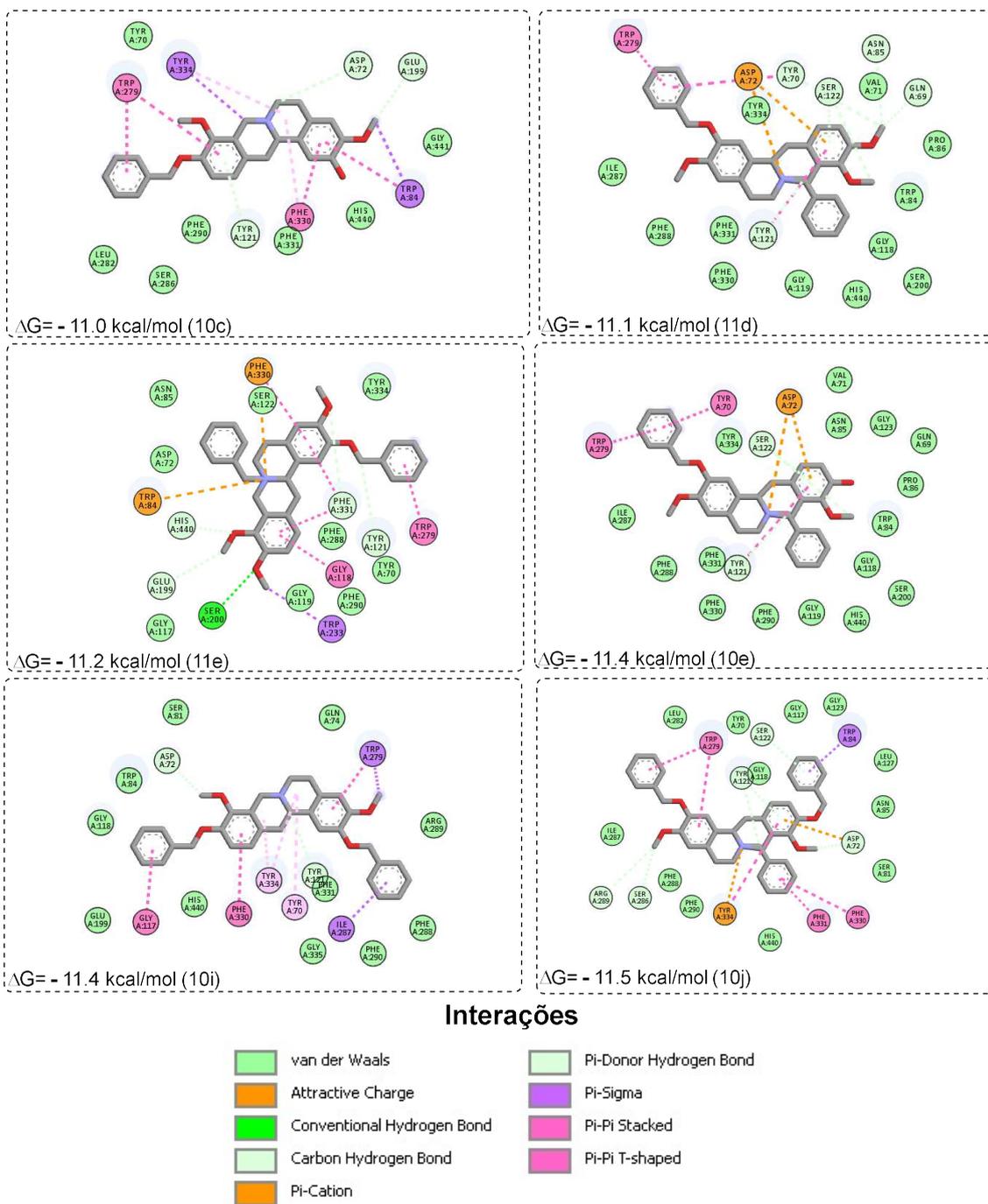


Figura A32. Principais interações observadas para os complexos dos alcaloides benzilados-AChE.

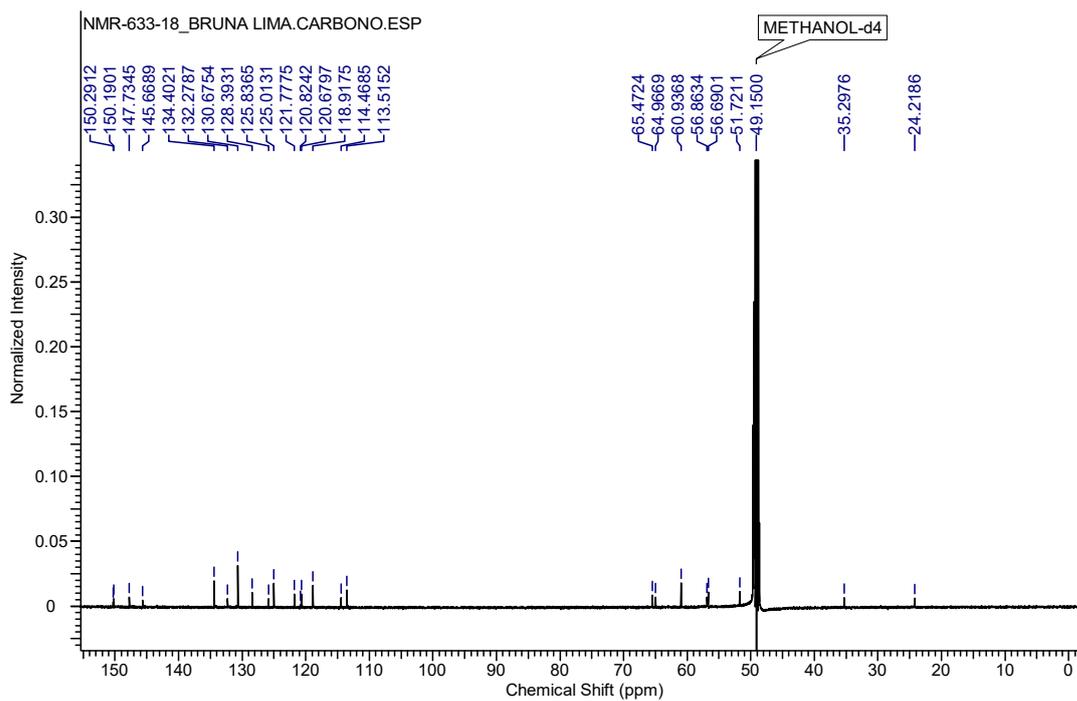


Figura A33. O espectro de RMN de ^{13}C (125,76MHz, CD_3OD) de BFA1.1

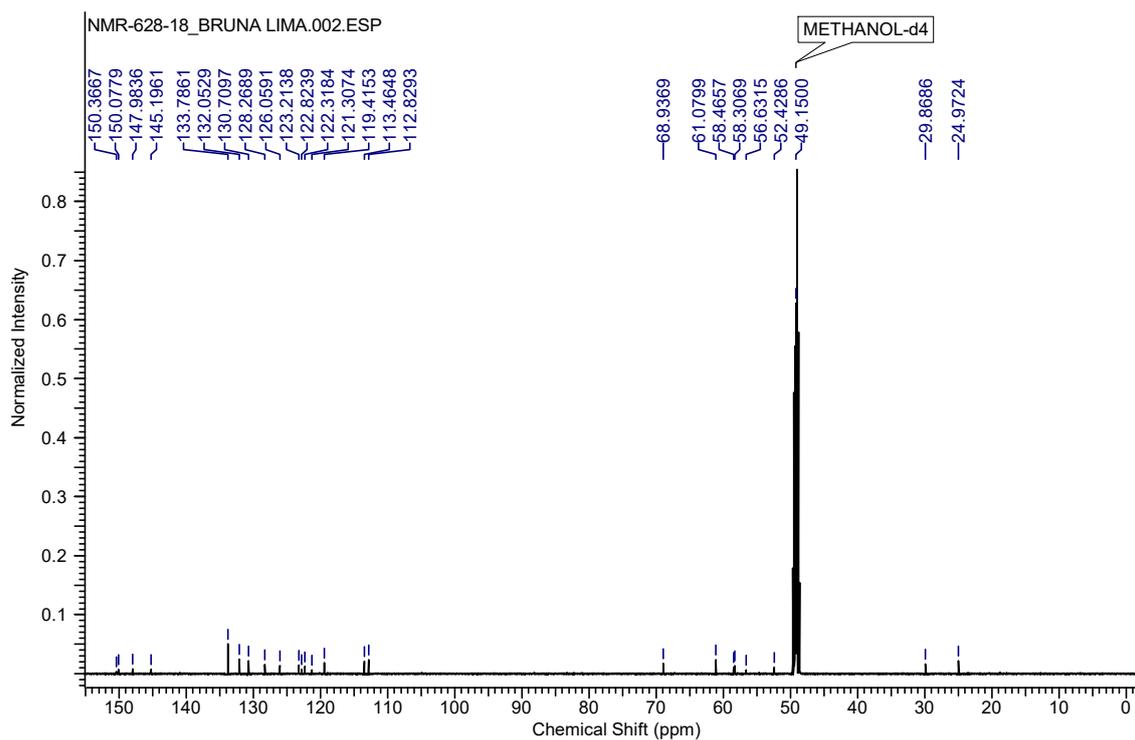


Figura A34. O espectro de RMN de ^{13}C (125,76MHz, CD_3OD) de BFA1.2

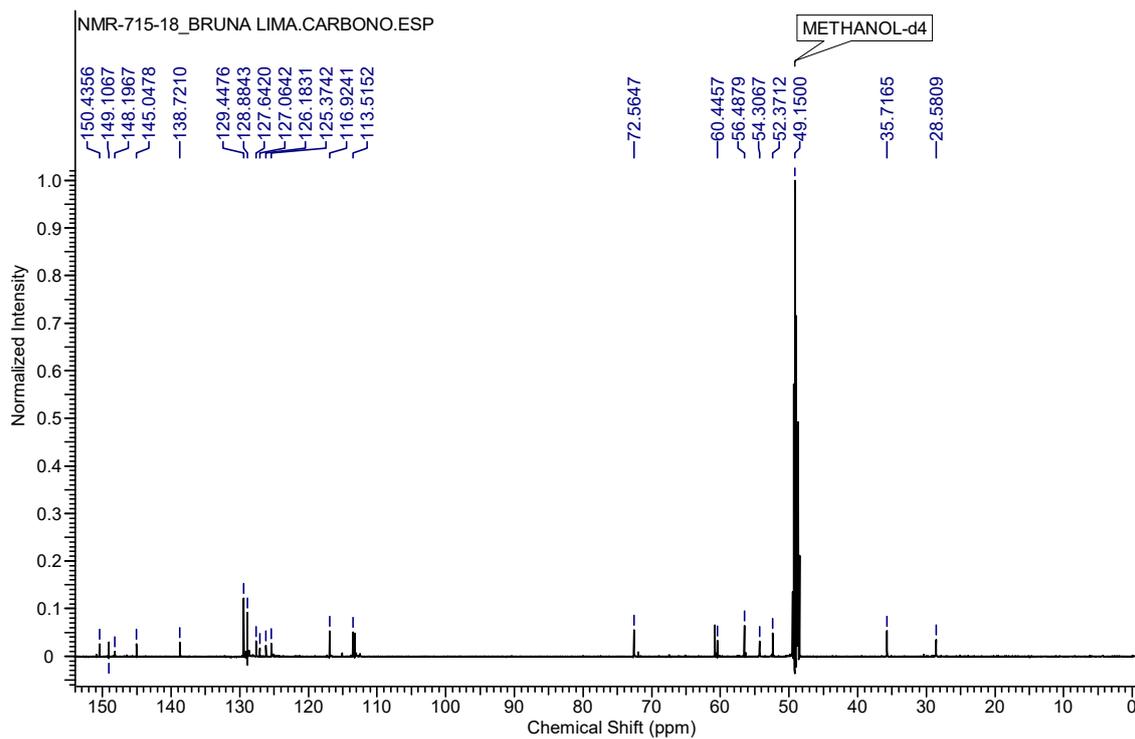


Figura A35. O espectro de RMN de ^{13}C (125,76MHz, CD_3OD) de BFD 3.6

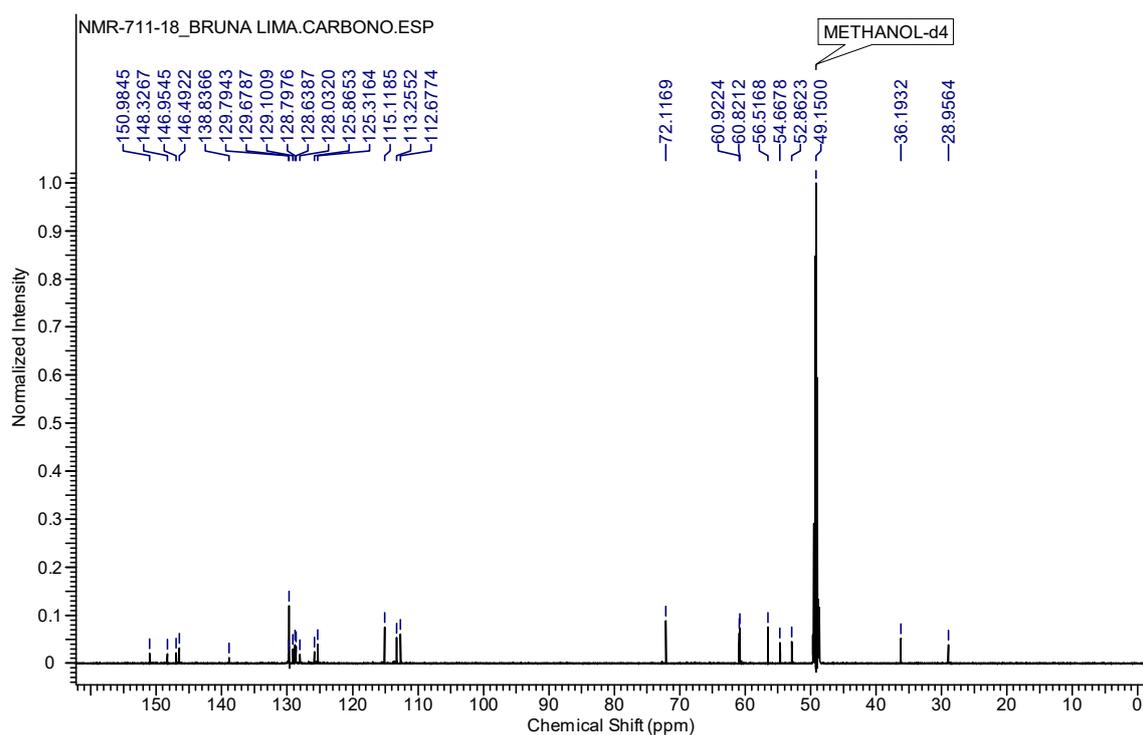


Figura A36. O espectro de RMN de ^{13}C (125,76 MHz, CD_3OD) de BFD 3.7

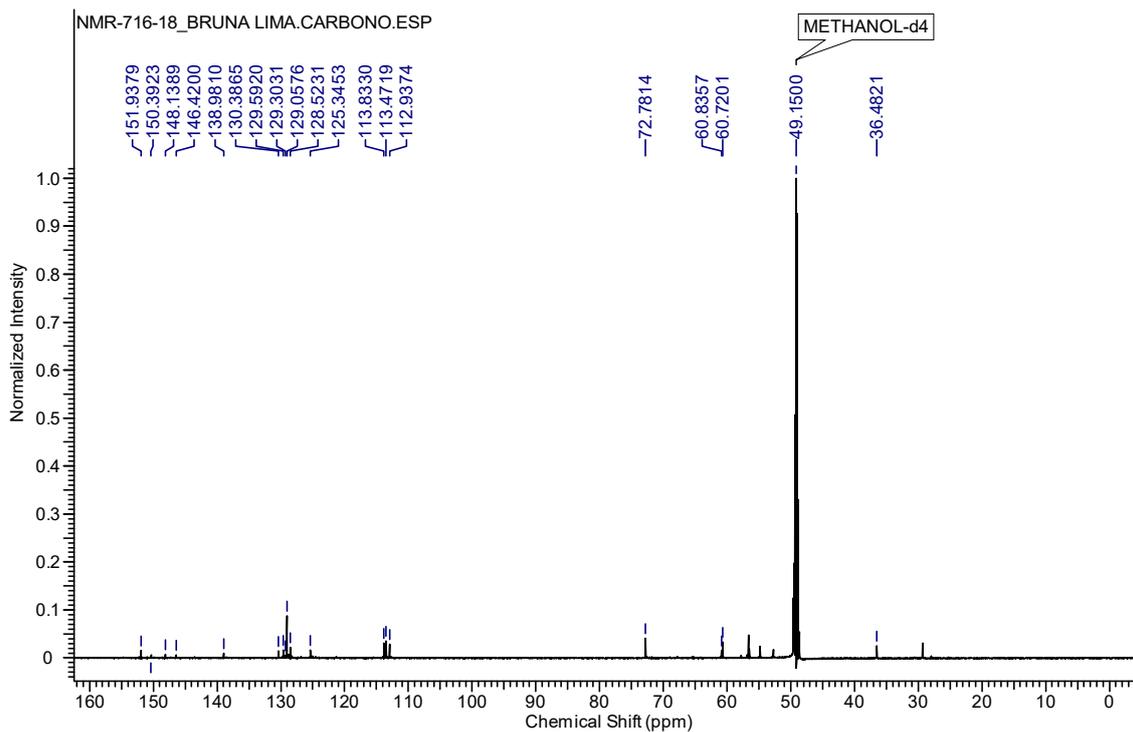


Figura A37. O espectro de RMN de ^{13}C (125,76 MHz, CD_3OD) de BFD 3.8

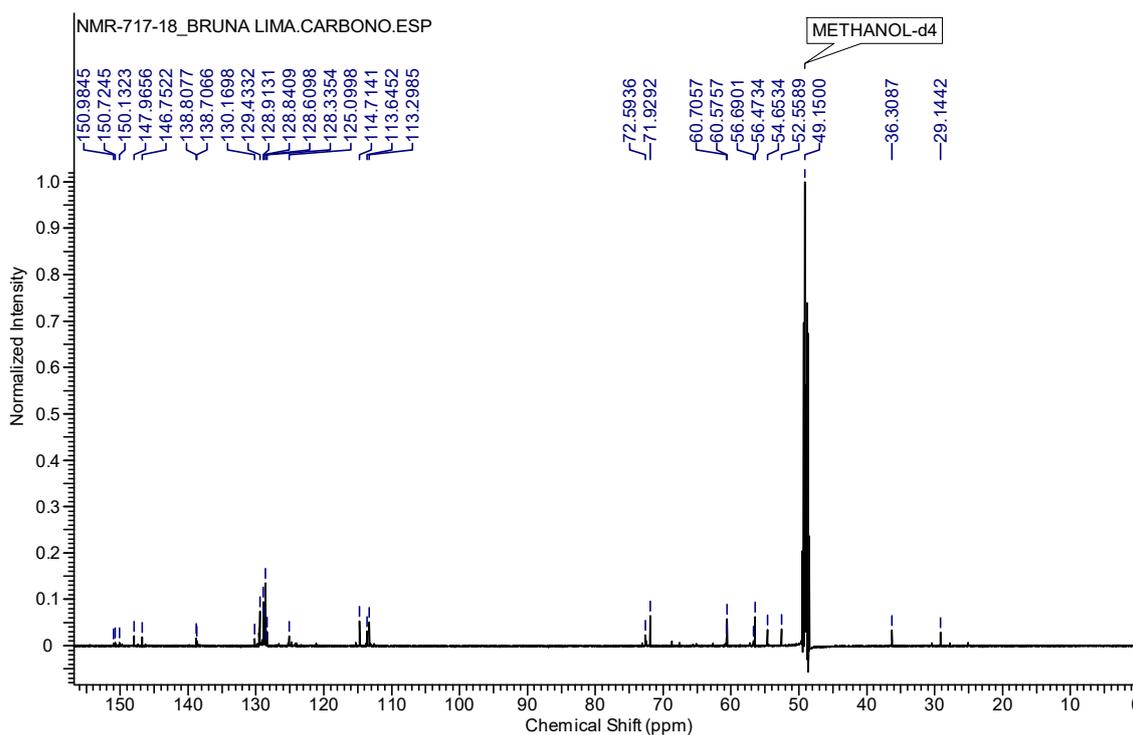


Figura A38. O espectro de RMN de ^{13}C (125,76MHz, CD_3OD) de BFD 3.11

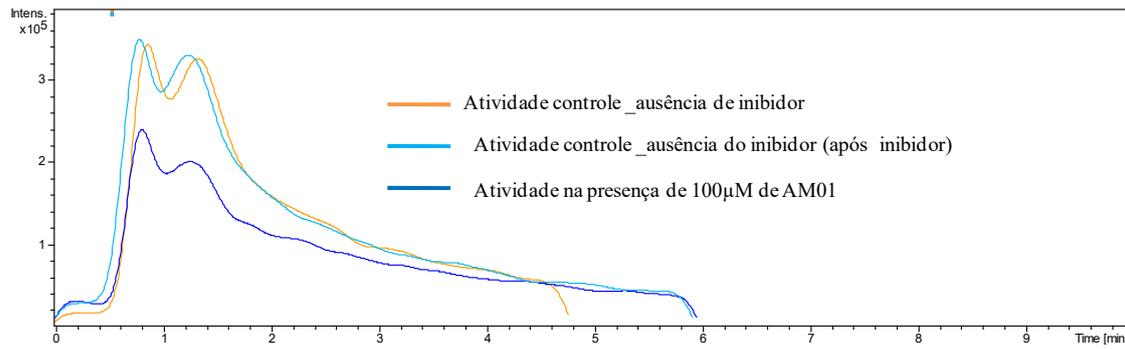


Figura A39. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM01 (100 μ M).

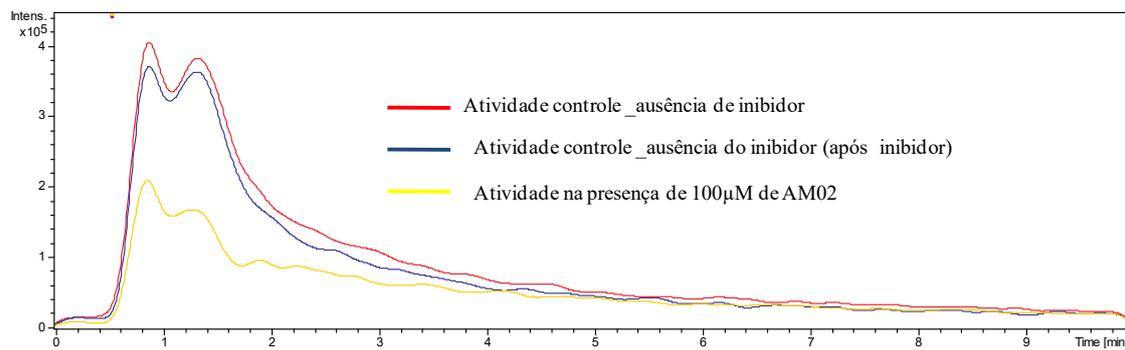


Figura A40. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM02 (100 μ M).

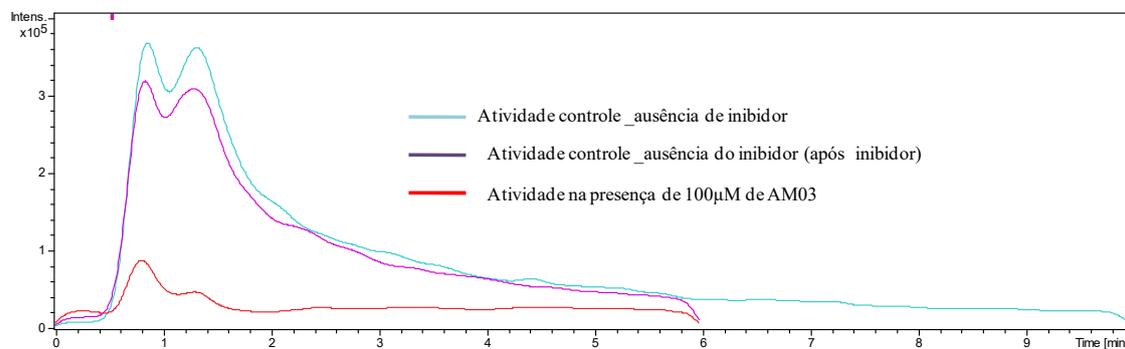


Figura A41. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM03 (100 μ M).

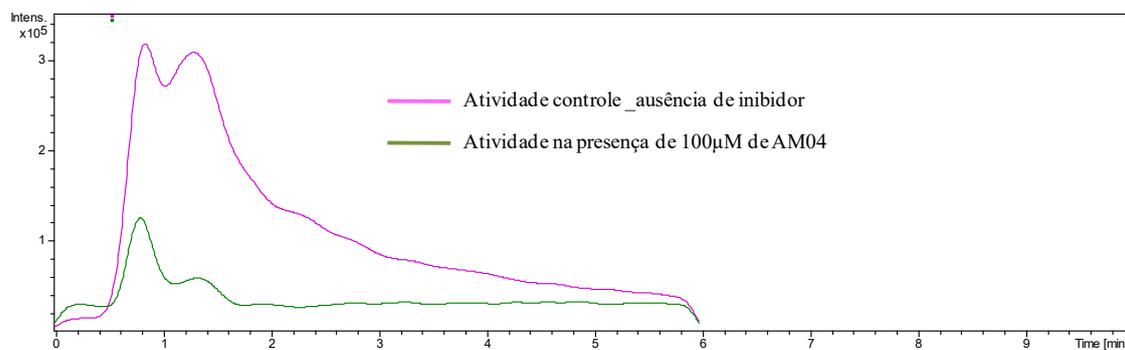


Figura A42. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM04 (100 μ M).

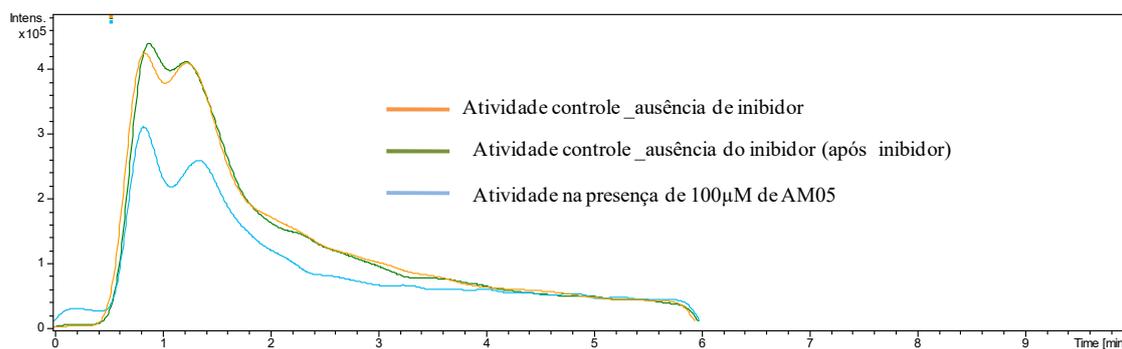


Figura A43. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM05 (100 μ M).

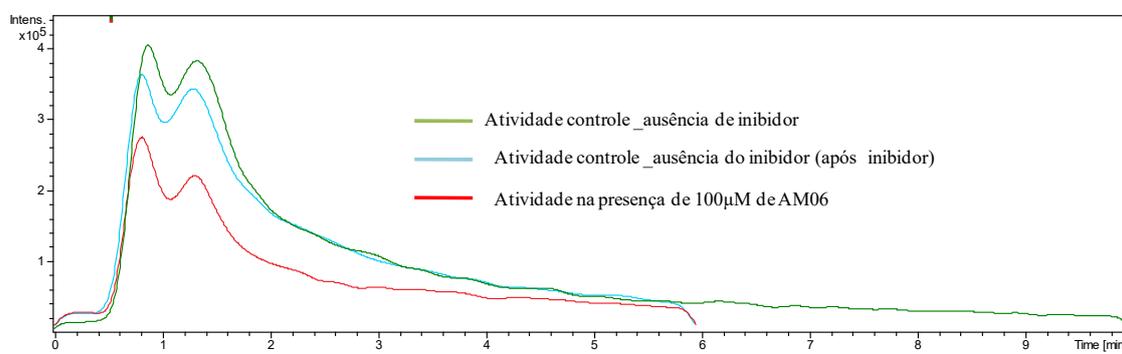


Figura A44. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM06 (100 μ M).

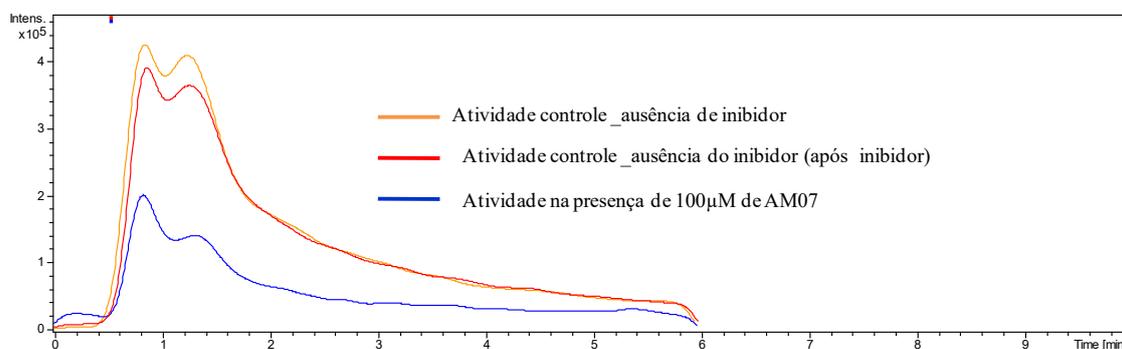


Figura A45. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM07 (100 μ M).

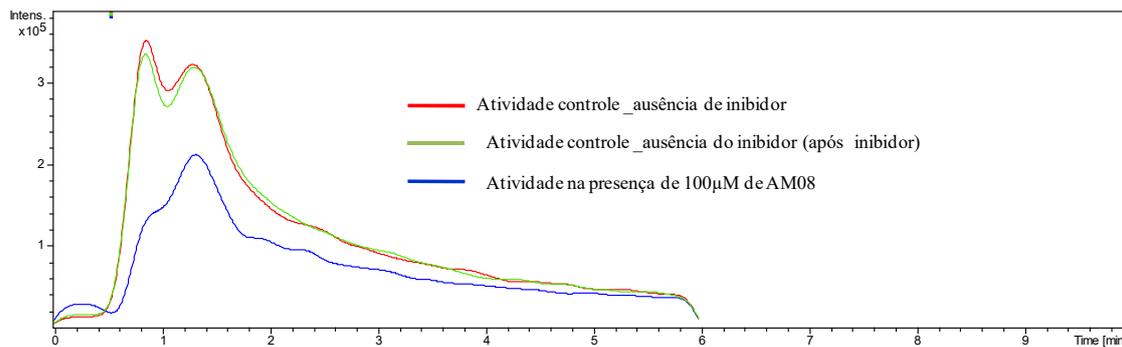


Figura A46. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM08 (100 μ M).

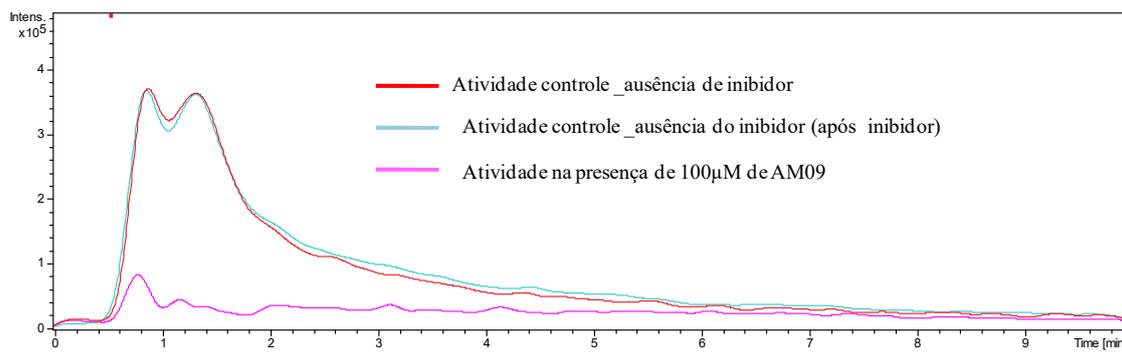


Figura A47. Sobreposições dos cromatogramas correspondentes a Ch produzida pela injeção de 70 μ M de ACh com ausência e presença AM09 (100 μ M).