



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DIEGO ALEJANDRO SILVA CARRERO

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DAS FOLHAS DE *Nicandra
physalodes* Gaertn (SOLANACEAE)**

FORTALEZA 2016

DIEGO ALEJANDRO SILVA CARRERO

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DAS FOLHAS DE *Nicandra
physalodes* Gaertn (SOLANACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador (a): Profa. Dra Otilia Deusdênia Loiola Pessoa

Fortaleza

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C311p Carrero, Diego Alejandro Silva Carrero.
Prospecção química e farmacológica das folhas de *Nicandra physalodes* Gaertn (solanaceae) / Diego Alejandro Silva Carrero Carrero. – 2017.
157 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Otilia Deusdênia Lóiola Pessoa.
1. *Nicandra physalodes*. 2. solanaceae. 3. vitanolido. 4. anel D aromático. I. Título.

CDD 540

DIEGO ALEJANDRO SILVA CARRERO

PROSPECÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DAS FOLHAS DE *Nicandra physalodes* Gaertn (SOLANACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 16 / 12 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Prof. Dr. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Prof. Dr. Kirley Marques Canuto
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

*Dedico este trabajo a mi novia,
amiga y compañera de camino
Karen Villarreal.*

AGRADECIMIENTOS

De manera elocuente, quiero agradecerle infinitamente a mi orientadora Dr. Otilia Deusdênia Loíola Pessoa, en primer lugar por aceptar el reto, seguido de su apoyo incondicional, junto a su inigualable manera de formar personas, con sabiduría, respeto, confianza pero sobre todo con amor por la profesión.

De otro modo, quiero agradecer a dos grandes colegas, compañeros y profesionales de la química, Karine Oliveira y Pedro Jatai, no solo por su valiosa contribución en este trabajo, sino también por su amistad incondicional en mi corto paso por el Brasil, igualmente quiero agradecerle a la Dra. Luciana Gregorio, por el apoyo y colaboración en la finalización de este trabajo

A los profesores Dr. Edson Teixeira, Dr. Mayron Vasconcelos, y Dra Gilvandete Pinheiros cada uno junto a su gran equipo de trabajo, por su disponibilidad en los diversos test realizados con los compuestos aislados en este trabajo.

A todos y cada uno de los que hicieron parte de LAFIPLAM I y II desde mi propia llegada, hasta el día de hoy, no me queda más que agradecer su inigualable amistad, sus buenas conversaciones, y su gran disposición en todo lo que necesite.

Un agradecimiento a mis profesores, y formadores de la Universidad Distrital Francisco José de caldas en Colombia, en especial a mis tutores Javier Andrés Matulevich Peláez y Beatriz Ofelia Devia Castillo.

Quiero agradecer a mis compatriotas y amigos, que hicieron más llevadera esta estadía fuera de casa, especialmente a David Arévalo. Astrid Guerrero y Natalia González, y claro está, a todos los integrantes del grupo del café.

A mi familia, en especial a mis dos queridas mamás, Gloria y Sixta y a mis hermanos Jhon Silva y Gustavo Silva, sin ellos nada de esto habría sido posible.

A los profesores miembros de este jurado de sustentación, a la UFC, Capes, y a la OEA este último por realizar el convenio para la obtención de esta beca.

Finalmente un agradecimiento muy especial a todos y cada uno de los habitantes nacionales del Brasil, que con sus contribuciones permitieron mi formación académica.

RESUMO

Neste trabalho é descrito o isolamento e caracterização de nove compostos isolados dos extratos diclorometano e acetato de etila, obtidos das folhas de *Nicandra physalodes*. O estudo foi iniciado com a preparação dos extratos, seguido de sucessivos fracionamentos cromatográficos clássicos como: cromatografia em coluna aberta utilizando sílica gel, gel de dextrana Sephadex LH-20, cartucho C-18 (SPE), além de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os compostos isolados foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas como RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensional, além de técnicas espectrométricas como IV e EMAR-ESI. No total foram isolados nove vitanolidos que são derivados do esqueleto ergostano, sendo quatro pertencentes ao grupo II, denominados **Np1**, **Np2**, **Np7** e **Np9** (vitanolidos com esqueleto base modificado) e cinco pertencentes ao grupo I, denominados **Np3**, **Np4**, **Np5**, **Np6** e **Np8** (vitanolidos com esqueleto base não modificado). De acordo com pesquisas realizadas na literatura e mediante comparação com dados de RMN de ^1H e ^{13}C , os compostos nic-10 (**Np1**), nicandrenona (**Np2**), nic-7 (**Np3**), nic-2 (**Np4**) e nicafisalina B (**Np5**), já haviam sido relatados na espécie, enquanto os compostos denominados como 15-oxo-nicafisalina B (**Np6**), 6β - 7α -dihidróxi-nicandrenona-10, (**Np7**), 24β - 25α -dihidróxi-nicandrenona-2, (**Np8**) e 17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10 (**Np9**), estão sendo relatados pela primeira vez. Foram realizados ensaios antimicrobiano, antifúngico e larvicida com os compostos isolados em maiores quantidades, porém os resultados foram negativos, ou fracamente ativos.

Palavras-chave: *Nicandra physalodes*. Solanaceae. Vitanolido. Anel D aromático.

ABSTRAC

This work describes the isolation and characterization of nine compounds isolated from dichloromethane and ethyl acetate from leaves of *Nicandra physalodes*. The study was initiated with extract preparations, followed by successive classic chromatographic fractionations as: chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 gel and C18 cartridge solid phase extraction (SPE), as well as high-performance liquid chromatography (HPLC). The isolated compounds were analyzed by spectroscopic techniques ^1H and ^{13}C NMR, one and two-dimensional, and spectrometric techniques as IR and HR-ESI-MS. In total were isolated nine withanolides which are derivatives from ergostane skeleton, being four belonging to group II, named as **Np1**, **Np2**, **Np7** and **Np9** (withanolides with the basic skeleton modified) and five belonging to group I, named as **Np3**, **Np4**, **Np5**, **Np6** and **Np8** (withanolides with the basic skeleton unmodified). According with a literature survey compounds nic-10 (**Np1**), nicandrenone (**Np2**), nic-7 (**Np3**), nic-2 (**Np4**) and nicaphysaline B (**Np5**) were previously reported to this species, but compounds 15 oxo-nicaphysaline B (**Np6**), 6β - 7α dihydroxy-nicandrenone-10, (**Np7**), 24β - 25α dihydroxy-nicandrenone-2 (**Np8**), and 17-(1-methylpropan-2-one)-nicandrenone-10 (**Np9**) are being reported for the first time in the literature. Biological assays (antimicrobial, antifungal and larvicidal) were performed for the main compounds; however, the results were either negative or weakly active.

Keywords: *Nicandra physalodes*. Solanaceae. Withanolide. Aromatic D ring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Formula molecular da morfina (1) e da digitoxina (2)	23
Figura 2-Formula molecular da fisangulida B (3)	23
Figura 3-Flores de quatro gêneros de importância econômica da família Solanaceae: <i>Solanum tuberosum</i> (A), <i>Brunfelsia pauciflora</i> (B), <i>Lycopersicon esculentum</i> (C), <i>Nicotiana tabacum</i> (D)	27
Figura 4-Características morfológicas de <i>N. physalodes</i>	28
Figura 5- <i>N. physalodes</i> em seu hábitat natural (folhas, flores e frutos) Guaraciaba do norte. S. 04° 15241, W 40° 49179	29
Figura 6- Distribuição de <i>N. physalodes</i> em pontos amarelos sobre o mapa	29
Figura 7- Rota da biossíntese dos compostos tipo vitanolido.....	34
Figura 8- Continuação biossíntese dos compostos tipo vitanolido.....	35
Figura 9-Esqueleto base do 24-metileno-colesterol (4).....	36
Figura 10-Rota de funcionalização do 24-metileno-colesterol.....	37
Figura 11-Classificação dos vitanolidos em tipo A e tipo B	37
Figura 12-Esqueletos-base de vitanolidos tipo A pertencentes aos grupos I e II	38
Figura 13- Vitanolidos isolados de <i>Acnistus arborescens</i> com atividade citotóxica.....	41
Figura 14- Vitanolido isolado de <i>Physalis peruviana</i> com atividade citotóxica	42
Figura 15- Diagrama de barras, numero de publicações para <i>N. physalodes</i> V.s. anos de publicação.....	43
Figura 16- Exemplos de compostos minoritários isolados de <i>N. physalodes</i>	44
Figura 17-Alguns compostos adicionais isolados da espécie <i>N. physalodes</i>	45
Figura 18- Dados de RMN de ¹³ C da vitanicandrina (50 MHz, CDCl ₃).....	46
Figura 19- Dados de RMN de ¹³ C da nicandrenona-metil-éter (50 MHz, CDCl ₃)	46
Figura 20- Dados de RMN de ¹³ C da 26,(S)-nicandrenona-metil-éter (125 MHz, DCI ₃)	47
Figura 21- Dados de RMN de ¹³ C da nicandrenona (nic-1) (125 MHz, CDCl ₃)	47
Figura 22- Dados de RMN de ¹³ C da nicandrenona-7 (125 MHz, CDCl ₃).....	47
Figura 23- Dados de RMN de ¹³ C da nicafigalina E (125 MHz, CDCl ₃).....	48
Figura 24- Dados de RMN de ¹³ C da nicafigalina A (125 MHz, CDCl ₃).....	48
Figura 25- Dados de RMN de ¹³ C da nicafigalina B (125 MHz, CDCl ₃).....	48
Figura 26- Dados de RMN de ¹³ C da nicafigalina C (125 MHz, CDCl ₃).....	49
Figura 27- Dados de RMN de ¹³ C da nicafigalina D (125 MHz, CDCl ₃).....	49

Figura 28-Compostos isolados da espécie <i>N. jonh-tyleriana</i>	50
Figura 29-Cromatograma do composto correspondente ao pico 4 (P4, $t_R = 12,699$ min) 230-400 nm.....	60
Figura 30-Fluxograma da metodologia de isolamento dos compostos Np1 a Np8 presentes no extrato Diclorometano proveniente das folhas de <i>N.physalodes</i>	63
Figura 31-Fluxograma da metodologia de isolamento do composto Np9 presente no extrato Acetato de etila proveniente das folhas de <i>N.physalodes</i>	64
Figura 32-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY de Np2	67
Figura 33-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC no anel A e B de Np2	68
Figura 34-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np2	68
Figura 35-Correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY e RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np2	69
Figura 36-Fórmula estrutural de Np2, relatada como nicandrenona por (KUN; BO; KAI, 2012).....	69
Figura 37-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY de Np1	72
Figura 38-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC no anel A e B de Np1	73
Figura 39-Fórmula estrutural de Np1, (Nic-10) (BEGLEY, <i>et al.</i> , 1976a).....	73
Figura 40-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY de Np3	76
Figura 41-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC no anel A e B de Np3	77
Figura 42-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC no anel C e D de Np3	77
Figura 43-Correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY e RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np3	78
Figura 44-Fórmula estrutural de Nic-7 (KUN, BO, KAI, 2012).....	78
Figura 45-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY de Np4	81

Figura 46-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np4	82
Figura 47-Fórmula estrutural de Np4 (Nic-2) (BATES; MOREHEAD, 1974)	82
Figura 48-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np5	85
Figura 49-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np5	86
Figura 50-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY - Fórmula estrutural da nicafisalina B em 3D utilizando ChemSketch.....	87
Figura 51-Fórmula estrutural de Np5 (nicafisalina B) (SHINGU, YAHARA, NOHARA, 1994).....	87
Figura 52-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np6	90
Figura 53-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np6	90
Figura 54-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np6	91
Figura 55-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np6	91
Figura 56-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY - Fórmula estrutural do composto Np6 em 3D utilizando ChemSketch.....	92
Figura 57-Fórmula estrutural do composto denominado 15-oxo-nicafisalina B (a) em comparação com a nicafisalina B (b).	92
Figura 58-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np7	95
Figura 59-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np7	95
Figura 60-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np7	96
Figura 61-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY - Fórmula estrutural do composto Np7 em 3D utilizando ChemSketch.....	96
Figura 62-Fórmula estrutural do composto denominado 6 β ,7 α -dihidroxi-nicandrenona-10 (a) em comparação com a Np1 (Nic-10) (b).....	97
Figura 63-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np8 ...	100
Figura 64-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np8	100

Figura 65-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np8	101
Figura 66-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np8	101
Figura 67-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY - Fórmula estrutural do composto Np8 em 3D utilizando ChemSketch.....	102
Figura 68-Fórmula estrutural do composto denominado 24 α -25 β -dihidroxi-nicandrenona-2 (a) em comparação com o composto denominado Np4 (Nic-2) (b) ...	102
Figura 69-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np9 (a) e (b)	105
Figura 70-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np9 ^(a)	105
Figura 71-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np9	106
Figura 72-Fórmula estrutural do composto denominado 17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10 ^(a) e ^(b) (a) em comparação com o composto denominado Np1 (Nic-10) (b)	107
Figura 73-Estruturas dos compostos isolados do extrato DCM e AcOEt das folhas da espécie <i>N. physalodes</i>	109
Figura 74-Diagrama de barras para os resultados referentes às atividades antibacterianas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>	112
Figura 75-Diagrama de barras para os resultados referentes às atividades antibacterianas com <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	113
Figura 76-Diagrama de barras para os resultados da avaliação antifúngica contra <i>Candida albicans</i> dos compostos: nic-1, nic-10, nic-2, nic-7, nicafigalina B, Np6, Np7 e Np8.	114
Figura 77-Diagrama de barras para os resultados da avaliação antifúngica contra <i>Candida tropicalis</i> dos compostos: nic-1, nic-10, nic-2, nic-7, nicafigalina B, Np6, Np7 e Np8.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Lista dos principais gêneros da família Solanaceae com o número aproximado de espécies	26
Tabela 2-Frações provenientes da partição Líquido-Líquido do extrato em acetona das folhas da espécie <i>N. physalodes</i>	56
Tabela 3-Sub-frações obtidas a partir da CC da fração denominada NpAcDCM.....	57
Tabela 4- Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-E.....	59
Tabela 5-Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-E.....	61
Tabela 6-Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcAcOEt.	62
Tabela 7-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75 MHz) de Np2 comparados com os dados descritos na literatura para nicandrenona (KUN, BO, KAI, 2012).	70
Tabela 8-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75 MHz) de Np1 comparados com os dados descritos para nicandrenona (KUN, BO, KAI, 2012)	74
Tabela 9-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75 MHz) de Np3 comparados com os dados descritos na literatura para Nic-7 (KUN; BO; KAI, 2012).	79
Tabela 10-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75MHz) de Np4 comparados com os dados descritos para Nic-2 (BATES; MOREHEAD, 1974) (GOTTLIEB; KIRSON, 1981)	83
Tabela 11-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75MHz) de Np5 comparados com os dados descritos para nicafigalina B (SHINGU, YAHARA, NOHARA, 1994).....	88
Tabela 12-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) de Np6 (15-oxo-nicafigalina B) comparados com os dados descritos para nicafigalina B (SHINGU, YAHARA, NOHARA, 1994).....	93
Tabela 13-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) de Np7 (6 β ,7 α -dihidroxi-nicandrenona 10), Comparados com os dados relatados para nicandrenona-10 isolado por (SILVA, 2016).....	98
Tabela 14-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) do composto NP8 (24 α -25 β -dihidroxi-nicandrenona-2), Comparados com a nic-2 isolada por (SILVA, <i>et al.</i> ,2016).....	103

Tabela 15-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) de Np9 (17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10)^(a) e ^(b), Comparados com a nic-10 (KUN, BO, KAI, 2012). 108

ANEXOS

Anexo 1- Espectro na região do infravermelho (IV) do composto Np2	123
Anexo 2- Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np2	123
Anexo 3- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [MeOD, 75,4 MHz] de Np2.....	124
Anexo 4- Espectro de DEPT 135° [MeOD, 75,4 MHz] de Np2.....	124
Anexo 5- Espectro de RMN de ^1H [MeOD, 300 MHz] de Np2.....	125
Anexo 6- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np2	125
Anexo 7- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np2	126
Anexo 8- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np1	127
Anexo 9- Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np1	127
Anexo 10- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np1.....	128
Anexo 11- Espectro de DEPT 135° [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np1	129
Anexo 12- Espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np1	129
Anexo 13- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np1	130
Anexo 14- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np1	130
Anexo 15- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np3	131
Anexo 16- Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np3	131
Anexo 17- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np3.....	132
Anexo 18- Espectro de DEPT 135° [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np3	132
Anexo 19- Espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np3	133
Anexo 20- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np3	134
Anexo 21- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np3	134
Anexo 22- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np4	135
Anexo 23- Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np4	135
Anexo 24- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np4.....	136
Anexo 25- Espectro de DEPT 135° [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np4	137
Anexo 26- Espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np4	137
Anexo 27- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np4	138
Anexo 28- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np4	138
Anexo 29- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np5	139
Anexo 30- Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np5	139
Anexo 31- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np5.....	140

Anexo 32- Espectro J-mod [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np5	140
Anexo 33- Espectro de RMN de ¹ H [Piridina- <i>d</i> ₅ , 300 MHz] de Np5	141
Anexo 34- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de Np5	141
Anexo 35- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de Np5	142
Anexo 36- Espectro de RMM- 2D ¹ H- ¹ H-NOESY de Np5	142
Anexo 37- Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np6.....	143
Anexo 38- Espectro de RMN de ¹³ C-BB [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np6.....	143
Anexo 39- Espectro J-mod [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np6	144
Anexo 40- Espectro de RMN de ¹ H [Piridina- <i>d</i> ₅ , 300 MHz] de Np6	144
Anexo 41- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de Np6	145
Anexo 42- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de Np6	145
Anexo 43- Espectro de RMM- 2D ¹ H- ¹ H-NOESY de Np6	146
Anexo 44- Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np7	147
Anexo 45- Espectro de RMN de ¹³ C-BB [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np7.....	147
Anexo 46- Espectro DEPT-135° [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np7.....	148
Anexo 47- Espectro de RMN de ¹ H [Piridina- <i>d</i> ₅ , 500 MHz] de Np7	148
Anexo 48- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de Np7	149
Anexo 49- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de Np7	149
Anexo 50- Espectro de RMM- 2D ¹ H- ¹ H-NOESY de Np7	150
Anexo 51- Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np8.....	150
Anexo 52- Espectro de RMN de ¹³ C-BB [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np8.....	151
Anexo 53- Espectro J-mod [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np8	151
Anexo 54- Espectro de RMN de ¹ H [Piridina- <i>d</i> ₅ , 300 MHz] de Np8	152
Anexo 55- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de Np8	152
Anexo 56- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de Np8	152
Anexo 57- Espectro de RMM- 2D ¹ H- ¹ H-NOESY de Np8	153
Anexo 58- Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np9.....	154
Anexo 59- Espectro de RMN de ¹³ C-BB [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np9.....	154
Anexo 60- Espectro DEPT 135° [Piridina- <i>d</i> ₅ , 75,4 MHz] de Np9.....	155
Anexo 61- Espectro de RMN de ¹ H [Piridina- <i>d</i> ₅ , 500 MHz] de Np9	155
Anexo 62- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹ H-COSY de Np9	156
Anexo 63- Espectro de RMN 2D ¹ H, ¹³ C-HMBC de Np9	156
Anexo 64- Expansão do espectro de RMN 1D 1H de Np9.....	157
Anexo 65- Expansão do espectro de RMN BB 13C de Np9.....	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

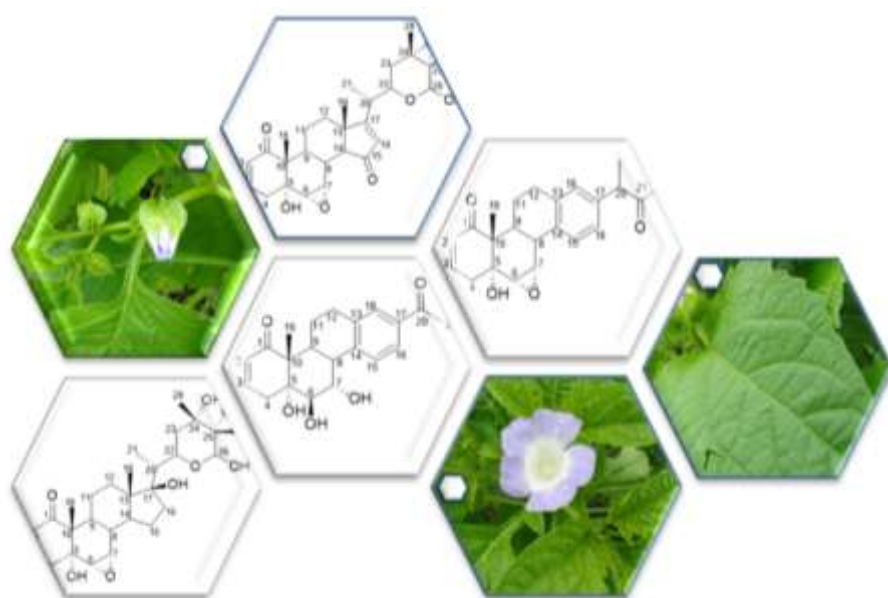
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EMAR-ESI	Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
MeOD	Metanol deuterado
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
p.f.	Ponto de fusão
Pyr	Piridina deuterada
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono- 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	26
2.1	A família Solanaceae.....	26
2.2	O gênero Nicandra.....	27
2.3	Considerações sobre <i>N.physalodes</i>	28
3	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	32
3.1	Vitanolidos	32
3.2	Biossíntese dos compostos tipo vitanolido.....	33
3.3	Classificação dos vitanolidos.....	37
3.3.1	<i>Vitanolidos tipo A</i>	38
3.4	Generalidades espectroscópicas dos compostos tipo Vitanolido.....	39
3.4.1	<i>Vitanolidos: Ultra violeta (UV) e infra vermelho (IV)</i>	39
3.4.2	<i>Vitanolidos: Espectrometria de massas</i>	39
3.4.3	<i>Vitanolidos: RMN de prótio 1H</i>	40
3.5	Atividades relatadas para os compostos tipo vitanolido.....	40
3.6	Metabólitos secundários isolados do gênero Nicandra.....	43
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.1	Aspectos Gerais.....	52
4.2	Métodos cromatográficos.....	52
4.2.1	<i>Cromatografia de exclusão molecular</i>	52
4.2.2	<i>Cromatografia em camada delgada</i>	52
4.2.3	<i>Cromatografia em coluna gravitacional</i>	52
4.2.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	53
4.3	Métodos espectrométricos.....	53
4.3.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i>	53
4.3.2	<i>Espectrometria de massa de alta resolução (EMAR)</i>	53
4.3.3	<i>Espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótio (RMN 1H) e de carbono-13 (RMN 13C)</i>	54
4.4	Métodos físicos de análise.....	55
4.4.1	<i>Determinação da rotação óptica</i>	55
4.4.2	<i>Determinação do ponto de fusão</i>	55
4.5	Estudo fitoquímico das folhas da espécie <i>Nicandra physalodes</i>	55

4.5.1	<i>Coleta e identificação do material vegetal.....</i>	55
4.5.2	<i>Obtenção do extrato em acetona das folhas da espécie N. physalodes G.....</i>	56
4.5.3	<i>Partição líquido-líquido do extrato denominado NpAc.....</i>	56
4.6	<i>Isolamento dos constituintes químicos da fração NpAcDCM obtidos do extrato de N. physalodes.....</i>	57
4.6.1	<i>Cromatografia de adsorção seletiva da fração denominada NpAcDCM das folhas de N. physalodes.....</i>	57
4.6.2	<i>Cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-A e isolamento do composto Np1.....</i>	57
4.6.3	<i>Purificação da fração denominada NpAcDCM-B e isolamento do composto Np2.....</i>	58
4.6.4	<i>Cristalização e recristalização da fração denominada NpAcDCM-C: Isolamento dos compostos Np3 e Np4.....</i>	58
4.6.5	<i>Cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-F e isolamento do composto Np5.....</i>	59
4.6.6	<i>Cromatografia em cartucho C-18 e CLAE da fração denominada NpAcDCM-F.3.I.3.A e isolamento do composto Np6.....</i>	60
4.6.7	<i>Cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-(E) e isolamento do composto Np7.....</i>	61
4.6.8	<i>Cromatografia em cartucho C-18 da fração denominada NpAcDCM-E.3 e isolamento do composto Np8.....</i>	61
4.7	<i>Isolamento dos constituintes químicos do extracto NpAcAcOEt de N. physalodes.....</i>	62
4.7.1	<i>Cromatografia de adsorção seletiva da fração denominada NpAcAcOEt das folhas de N. physalodes.....</i>	62
4.7.2	<i>Cromatografia “flash” da fração denominada NpAcAcOEt-(E) e isolamento do composto Np9.....</i>	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1	<i>Determinação estrutural.....</i>	66
5.1.1	<i>Determinação estrutural de Np2.....</i>	66
5.1.2	<i>Determinação estrutural de Np1.....</i>	71
5.1.3	<i>Determinação estrutural de Np3.....</i>	75
5.1.4	<i>Determinação estrutural de Np4.....</i>	80

5.1.5	<i>Determinação estrutural de Np5</i>	84
5.1.6	<i>Determinação estrutural de Np6</i>	89
5.1.7	<i>Determinação estrutural de Np7</i>	94
5.1.8	<i>Determinação estrutural de Np8</i>	99
5.1.9	<i>Determinação estrutural de Np9</i>	104
6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	111
6.1	Metodologia da Avaliação da atividade antibacteriana.....	111
6.1.1	<i>Resultados da avaliação antibacteriana dos compostos nic-1, nic-10, nic-2, nic-7 e nicafigalina B</i>	112
6.2	Avaliação da atividade antifúngica.....	114
6.2.1	<i>Resultados da avaliação antifúngica</i>	114
6.3	Avaliação da atividade larvicida e resultados da atividade.....	116
7	CONCLUSÕES	118
	REFERENCIAS	119
	ANEXOS	123



INTRODUÇÃO

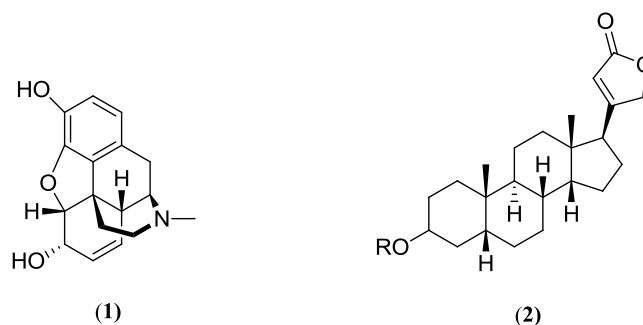
1 INTRODUÇÃO

Entre os anos 2005 e 2007 foram inseridos na indústria dos medicamentos cerca de 20 novos compostos de origem natural, além de mais de 100 compostos, os quais estão sendo analisados como potenciais produtos farmacêuticos e que se encontram em estudos clínicos, Li, Videras (2011 *apud* DHAR, *et al.*, 2015). Na atualidade, uma média de 40-45% dos produtos empregados na medicina ocidental são de origem natural ou derivados deles, e cerca de 30% desses compostos são isolados de plantas (DHAR, *et al.*, 2015).

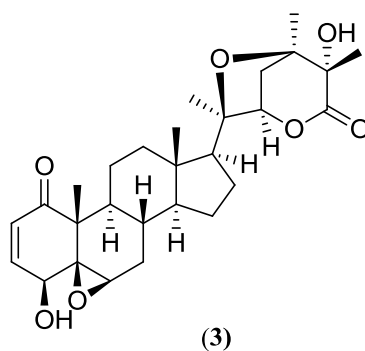
Muitos produtos naturais isolados de plantas são utilizados por seu potencial farmacológico, sendo importante considerar que um composto, para ser aceito como fármaco, tem que passar por diversas etapas, entre as quais se ressalta a investigação e o desenvolvimento. Levam-se cerca de 20 anos de pesquisa, desde o isolamento de um produto natural com atividade farmacológica, até os diversos testes “*in vitro*” e “*in vivo*” e posterior aplicação nas fases clínicas em humanos (MONTANARI, BOLZANI, 2001).

A biodiversidade do Brasil é amplamente reconhecida, segundo a CDB (Convenção da Diversidade Biológica), considera que o território nacional hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade do mundo, sendo considerado como o país com o maior número de espécies endêmicas. De acordo com os dados apresentados pela CDB, o Brasil apresenta aproximadamente 55 mil espécies, muitas das quais poderiam ter potencial farmacológico (BARREIRO, 2009).

Compostos tais como a morfina (**1**), isolados de espécies vegetais no ano de 1804, fomentou a descoberta posterior de outros compostos com atividade, tais como os derivados 4-fenil-piperidínicos, como uma classe nova de compostos com atividade hipnoanalgésica. Outros compostos importantes são os da classe das saponinas esteroidais como a digitoxina (**2**) (glicosídeos cardiotônicos), os quais apresentam uma alta atividade e baixa toxicidade, motivo pelo qual ainda não têm sido substituídos por compostos sintéticos (BARREIRO, 2009).

Figura 1-Formula molecular da morfina (1) e da digitoxina (2)

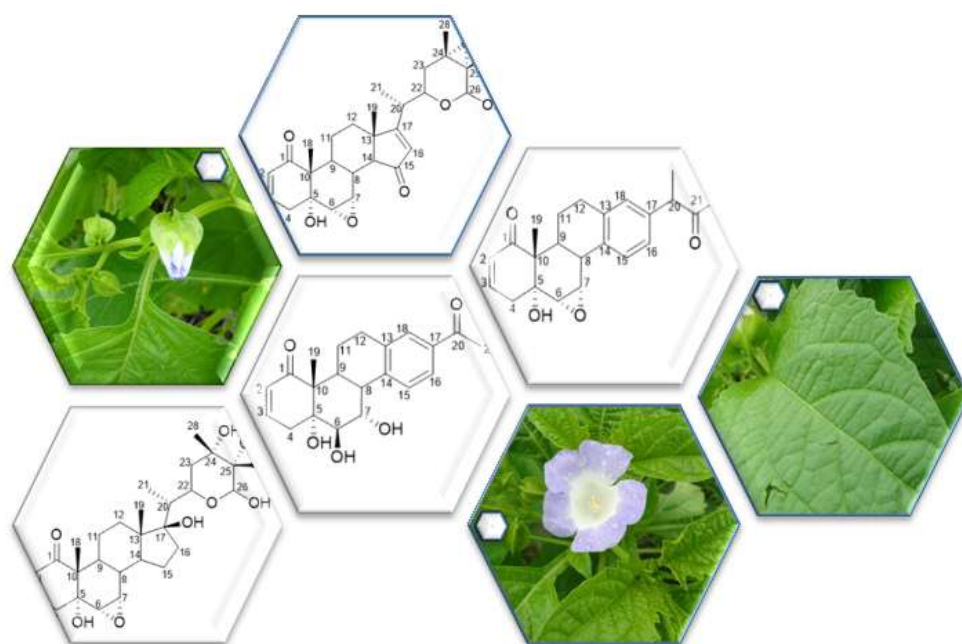
O grupo de compostos denominados vitanolidos, são amplamente investigados devido à importância farmacológica. Algumas atividades importantes relatadas para estes compostos vão desde atividade antitumoral, tripanocida, leishmanicida, antimicrobiana, anti-inflamatória e imunoreguladora, até a regeneração neuronal e reconstrução simpática, também são relatadas atividades interessantes como antifeedant, inseticida e citotóxica (CHEN, HE, QIU, 2011). Segundo Maldonado, *et al* (2015), o composto denominado como fisangulida B (3) isolado da espécie *Physalis angulata* (Solanaceae) foi testado contra linhagens de células humanas cancerígenas, apresentando uma potente atividade.

Figura 2-Formula molecular da fisangulida B (3)

Estes compostos (vitanolidos) são amplamente isolados de espécies da família Solanaceae, com ampla variabilidade e diversidade, porém, recentemente também foram isolados vitanolidos das famílias Laminaceae, Taccaceae, Myrtaceae, Fabaceae e Dioscoreaceae (SCHRIMER, MENTZ, GONÇALVES, 2014).

Nicandra physalodes G é uma espécie pertencente à família Solanaceae, a qual durante muito tempo foi considerada como uma espécie monotípica (única no gênero), mas nos anos de 2007 e 2010 foram classificadas duas novas espécies para o gênero *Nicandra* (GUTIERREZ, *et al.*, 2015). *N. physalodes* é amplamente reconhecida nas zonas tropicais dos continentes, e sua utilidade no ocidente torna-se muito limitada, devido geralmente, à associação da espécie com sua capacidade repelente de insetos, o que torna esta planta tóxica e de pouco uso (YANDAV, *et al.*, 2016).

Cerca de 100 publicações têm sido reportadas envolvendo a espécie *N. physalodes*, a qual é conhecida como uma fonte primária de vitanolidos, mas com poucos relatos sobre possíveis atividades. Deste modo, este trabalho tem como finalidade o isolamento dos compostos das folhas de *N. physalodes* coletada na flora nordestina e adicionalmente pretende-se investigar possíveis atividades para os compostos isolados como atividade antibacteriana, antifúngica e larvicida, especialmente para os compostos majoritários.



CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 A família Solanaceae

Solanaceae é uma das famílias mais importantes de arbustos e ervas presentes em capoeiras e vegetações no Brasil e em outras partes da América, tanto central como do sul (NEE, 2007). Esta família é composta por cerca de 100 gêneros e 2700 espécies, concentrando 60% das espécies nos gêneros *Solanum*, *Lycianthes*, *Cestrum*, *Nolana*, *Physalis*, *Lycium*, *Nicotiana* e *Brumfelsia* Tabela 1 (YADAV, *et al.*, 2016). Solanaceae Juss encontra-se organizada em seis subfamílias descritas como: Solanoideae, Cestroideae, Juanolloideae, Salpiglossoideae, Schizanthoideae e Anthocercioideae (D'ARCY, 1972).

Tabela 1-Lista dos principais gêneros da família Solanaceae com o número aproximado de espécies

Gênero	Número aproximado de espécies
<i>Solanum</i>	1330
<i>Lycianthes</i>	200
<i>Cestrum</i>	150
<i>Nolana</i>	89
<i>Physalis</i>	85
<i>Lycium</i>	85
<i>Nicotiana</i>	76
<i>Brumfelsia</i>	45
Número estimado de espécies na família	2700

Fonte: (YANDAV, *et al.*, 2016).

A morfologia da família Solanaceae possui como características folhas alternas ou pareadas, mas nunca diretamente opostas, às vezes encontram-se agrupadas nos ápices dos ramos, simples ou pinatisectas de estípulas ausentes. Suas flores têm diversos tamanhos que vão desde pequenas até grandes, bissexuadas ou às vezes unissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas muito vistosas e de diversidade de cores (Figura 3, p. 27) (NEE, 2007) (OREJUELA, VELEZ, OROZCO, 2013)

As Solanáceas representam uma das famílias mais importantes do ponto de vista econômico, especialmente como fonte alimentícia, como por exemplo, o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e a batata (*Solanum tuberosum*) (NEE, 2007). Na medicina tradicional são muito utilizadas como fonte de psicotrópicos, uma vez que são espécies com altos níveis de alcaloides, como a belladona (*Atropa beladona*) e o estramônio (*Datura stramonium*) (YADAV, *et al.*, 2016).

Figura 3-Flores de quatro gêneros de importância econômica da família Solanaceae: *Solanum tuberosum* (A), *Brunfelsia pauciflora* (B), *Lycopersicon esculentum* (C), *Nicotiana tabacum* (D)



Fonte: (OREJUELA, VELEZ, OROZCO. 2013)

2.2 O gênero *Nicandra*

De acordo com Gutierrez, *et al* (2015) *Nicandra* é um gênero da família Solanaceae, o qual é composto por apenas três espécies, dentro das quais encontra-se *N. physalodes* G, *N. jonh-tyleriana* S e *N. yacheriana* S, as duas últimas sendo classificadas nos anos de 2007 e 2010, respectivamente. Estas espécies são originárias da América do sul, dispersas nas regiões tropicais dos continentes, e são distinguidas pelas diferenças que apresentam em seus frutos e flores.

2.3 Considerações sobre *N. physalodes*

N. physalodes é popularmente conhecida como maçã do peru, joá de capote, bexiga, bucho-de-rã, quintilho, balãozinho, etc, esta espécie é um arbusto de até 1 m de altura, possui flores em forma de sino, de cor violeta, folhas verdes, serrilhadas, que medem de 8 a 25 cm de largura incluindo o pecíolo (NURIT; AGRAM, 2005). Algumas características morfológicas são mostradas na Figura 4, além da espécie em seu hábitat natural (Figura 5, p.29).

Figura 4-Características morfológicas de *N. physalodes*



Fonte: (NEE, 2007)

Figura 5- *N. physalodes* em seu hábitat natural (folhas, flores e frutos) Guaraciaba do norte. S. 04° 15241, W 40° 49179



Coletada por: Edilberto Rocha Silveira.

Um levantamento bibliográfico a cerca desta espécie, levou a considerar que a espécie é bem conhecida e amplamente cultivada com fins ornamental no sul do continente americano e também desde o sul dos Estados Unidos até México, Costa Rica e Antilhas, sendo que a espécie é originaria do Peru. *N. physalodes* é conhecida como planta toxica, sendo seu exsudado usado para matar moscas (NEE, 1986), além, esta distribuída amplamente nas zonas tropicais dos continentes como pode ser observado na Figura 6 a seguir.

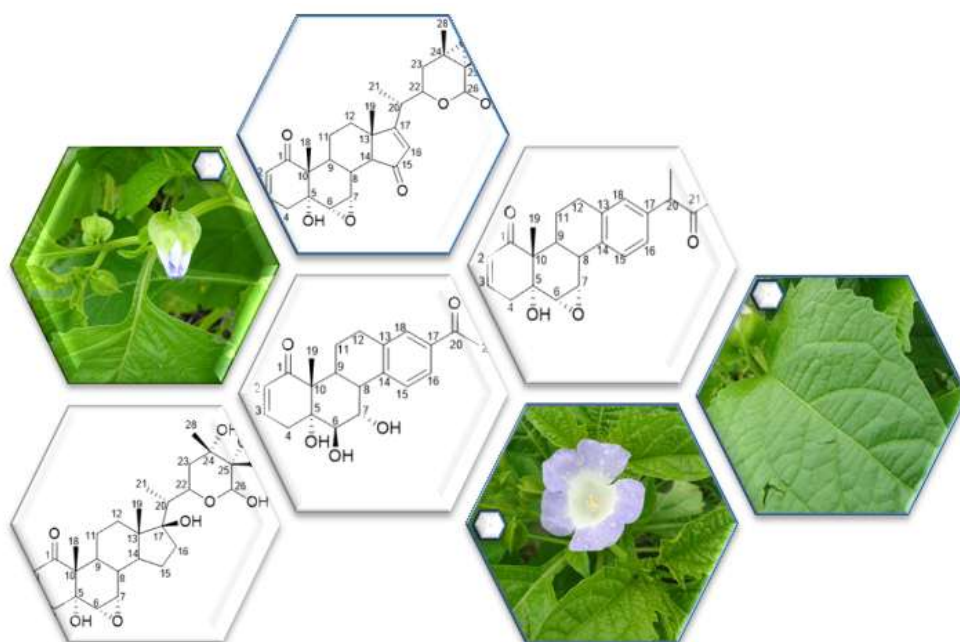
Figura 6- Distribuição de *N. physalodes* em pontos amarelos sobre o mapa



Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) <http://www.gbif.org/species/5341754>.

Um dos primeiros compostos reportados para *N. physalodes*, foi a nicandrenona, a qual apresentou potente atividade repelente para insetos (BEGLEY, *et al.*, 1976). Segundo Sonogo, *et al* (2013) os compostos do tipo vitanolido com anel D aromático são os responsáveis pelas aplicações desta espécie como repelente.

Contrariamente aos usos comuns nos países ocidentais, no oriente *N. physalodes* é empregada como anti-microbiano e anti-inflamatório, analgésico, e no tratamento da midríases e como segundo Chopra (1986 *apud*, MUKUNGU, *et al.*, 2011).



LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Vitanolidos

Os compostos denominados como vitanolidos estão compreendidos dentro dos esteroides naturais C₂₈, derivados do esqueleto ergostano funcionalizados em C-1, C-22 e C-26, além de ter como característica a função cetona em C-1 geralmente, o que leva ter 90% dos vianolidos como 1-oxo-esteroides (CHEN, *et al*; 2011).

Os vitanolidos estão amplamente distribuídos na família Solanaceae, especialmente nos gêneros *Jaborosa*, *Physalis*, *Tubocapsicum* e *Whitania* (ZHANG, TIMMERMANN, 2015). Alali, *et al* (2014) relata mais cinco gêneros: *Lycium*, *Datura*, *Dunalia*, *Acnistus* e *Nicandra* como potenciais espécies para o isolamento deste tipo de compostos.

Segundo Chen, *et al* (2011) no ano de 1965 foi isolado a vitaferina A das folhas de *Withania somnifera* por Lavie, constituindo-se como o primer metabolito secundario tipo vitanolido caracterizado para esta espécie, o numero de vitanolidos como sugere o autor isolados por mais de 45 anos, tem como resultado a divulgação de diversas atividades biológicas e farmacológicas como são antitumoral, antifeedant, citotóxica, immunosupresiva, antimicrobiana e anti-inflamatoria.

Um levantamento bibliográfico feito para os compostos tipo vitanolido no site Science Finder® com a palavra vitanolido no idioma inglês (withanolide), levo à obtenção de 1136 referencias, e no site ScienceDirect® com a mesma palavra foram obtidas 725 publicações, a maioria deles sendo publicações apresentadas em países do continente asiático e muitas outras no continente americano.

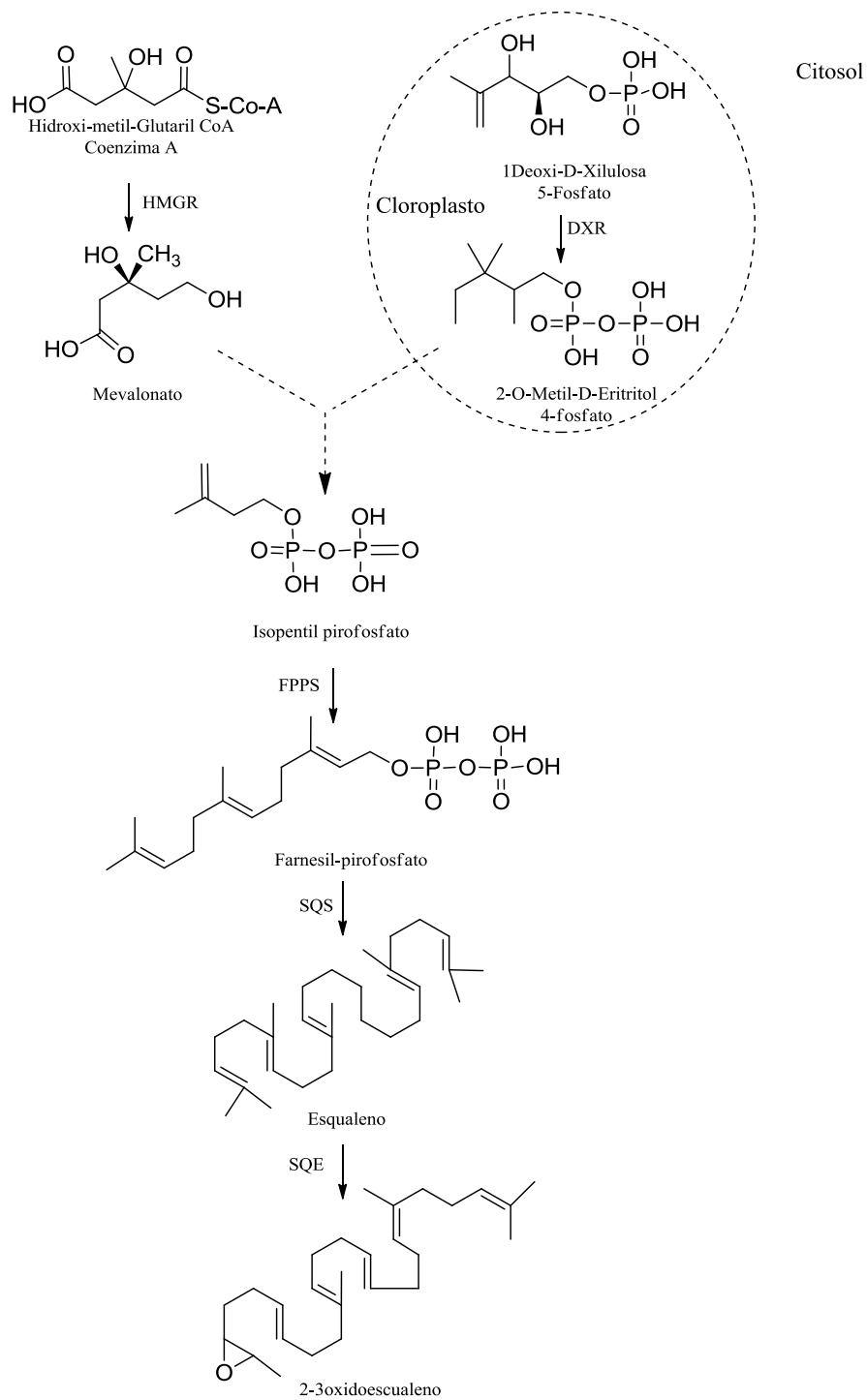
3.2 Biossíntese dos compostos tipo vitanolido

As plantas produzem metabólitos secundários, muitos dos quais são altamente usados na indústria farmacêutica, de alimentos e cosmética. A importância de conhecer sua rota biossintética não só consiste em obter dados de referência para posteriores sínteses, também para a bio-produção e melhoramento dos cultivos com o objetivo de que a planta possa produzir determinado metabólito secundário de interesse (SIVANANDHAN, *et al.*, 2014). No gênero *Nicandra*, por exemplo, tem-se que a concentração dos vitanolidos presentes na folhas corresponde a apenas 0,001-0,5% em peso seco (DHAR, *et al.*, 2015).

Quimicamente, os vitanolidos poderiam estar compreendidos dentro dos compostos do tipo triterpeno (C₃₀), lembrando que os triterpenos estão constituídos por unidades de isopreno IPP (isopentil-pirofosfato) e DMAPP (Dimetil-alil-pirofosfato) produzidos mediante duas rotas, classicamente conhecidas como a rota do ácido mevalônico (MVA) desenvolvida no citosol da célula, e a rota do fosfato de metil-eritritol (MEP) desenvolvida no cloroplasto. Esses triterpenos, de acordo com a rota biossintética, podem apresentar diversas funcionalidades como hormônios, esteroides, esteróis, após complexas reações bioquímicas para a formação do 24-metileno-colesterol (**4**) (Figura 9, p.36) (DHAR, *et al.*, 2015).

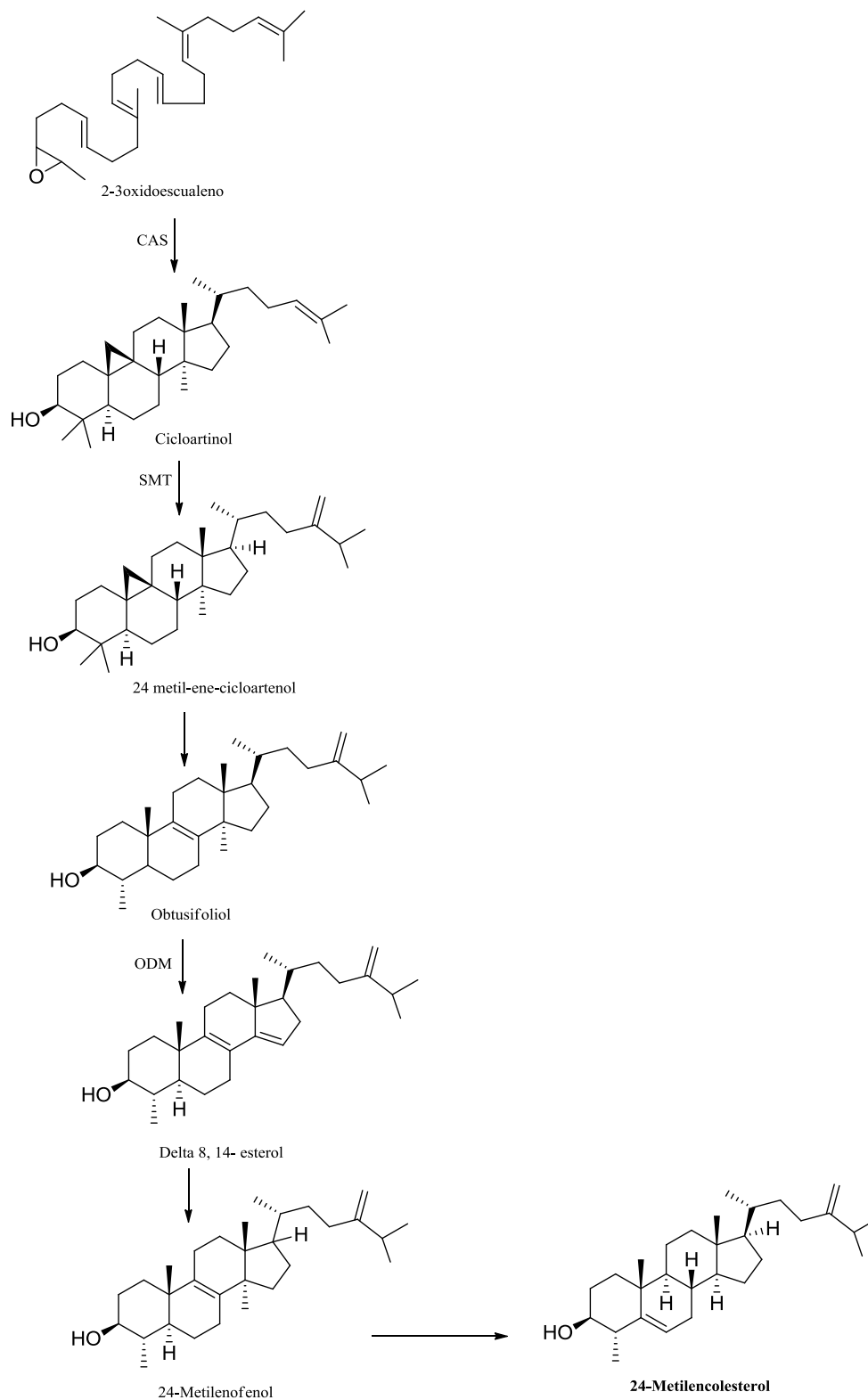
Na rota do MVA, interagem sete enzimas, para a condensação da primeira molécula conhecida como IPP (Isopentil-pirofosfato), lembrando que o primer passo esta baseado na condensação de duas moléculas de Acetil-CoA para a formação de uma unidade de acetoacetil-CoA com ajuda da AcAc-CoA tiolasa proveniente do complexo co-enzimático HMG-CoA (Hidroxi-metilglutaril CoA), a biossíntese do mevalonato além dos passos anteriores envolveu a transferência de elétrons provenientes do (NAD-(P) H) e diversas enzimas catalizadoras, que levam finalmente à transformação do mevalonato em IPP ocorrendo a consequente fosforilação e descarboxilação com a mevalonato quinase como catalizador (Figura 7, p. 34) (Figura 8, p. 35) (DHAR, *et al.*, 2015)

Figura 7- Rota da biossíntese dos compostos tipo vitanolido.



Fonte: (DHAR, *et al.*, 2015)

Figura 8- Continuação biossínteses dos compostos tipo vitanolido.



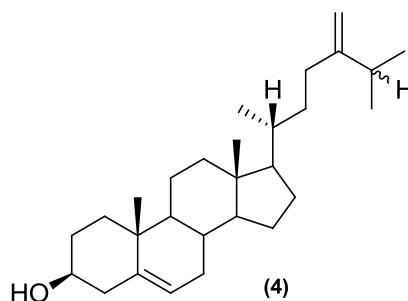
Fonte: (DHAR, *et al.*, 2015) Rota biossintética dos vitanolídeos: DPX, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; FPPS, farnesyldiphosphate synthase; SQS, Squalene synthase; SQE/CPR, Squalene epoxidase/cytochrome P450 reductase; CAS, Cycloartenol synthase; SMT, Sterol methyl transferase; ODM, Obtusifoliol-14-demethylase

A rota do MEP (Fosfato de metileritritol) proveniente do cloroplasto envolve como primer passo a condensação dos precursores piruvato e gliceraldeído 3-fosfato catalisada por 1-deoxi- D-xilulosa 5-fosfato sintase (DSX) em 1-deoxi D-xilulosa 5-fosfato e finalmente com ajuda da DPX reductoisomerasa a formação do MEP, posteriormente através de quatro complexos enzimáticos estamos na presença do composto conhecido como HMBPP (4-Hidroxi, 3-Metilbutan, 2-Enol difosfato) o qual atua como precursor dos compostos IPP e DMAPP. (DHAR, *et al.*, 2015)

Desta forma, os compostos do tipo vitanolido, são conhecidos como derivados do esqueleto ergostano e classificados como esteroides naturais, com características de conter uma cadeia lateral de nove carbonos, a qual cicliza em um anel de seis membros tipo heterociclo, funcionalizado geralmente em C-22 e C-26 (ANJANEYULU, *et al.*, 1998). Segundo Chen *et al.*, (2011), mais de 90% dos vitanolidos relatados tem como característica geral o grupamento cetona no carbono C-1, gerando a divisão dos compostos 1-oxoesteroides.

Um dos primeiros trabalhos tentando observar a biossíntese dos compostos tipo vitanolidos e suas funcionalidades foram feitos por Lockley, *et al* (1975), onde foi estudado a incorporação de substratos radioativos aos vitanolidos de *Withania somnifera*, obtendo como conclusão que o verdadeiro precursor dos vitanolidos é o 24-metileno-colesterol (4), no entanto; o grupo de Levie (1983) sugeriu que este composto é apenas um intermediário, e que a ciclização do C-22 e C-26 e os passos de oxidação posteriores podem levar à formação típica de lactona ou lactol de seis membros, ligado ao carbono C-17 nos vitanolidos.

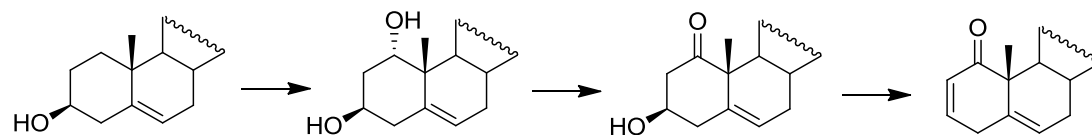
Figura 9-Esqueleto base do 24-metileno-colesterol (4)



Segundo relatado por Levie (1983), a oxidação e posterior desidratação dos principais esqueletos precursores, permite obter as características principais dos vitanolidos, tais como a formação da cetona, após a hidroxilação seletiva no C-1 (lado

menos protegido), com posterior desidratação e formação do 2,5-dien-1-ona, mencionado anteriormente, e finalmente a obtenção do sistema 2-en-1-ona, funcionalizando os anéis A e B (Figura 10).

Figura 10-Rota de funcionalização do 24-metileno-colesterol.

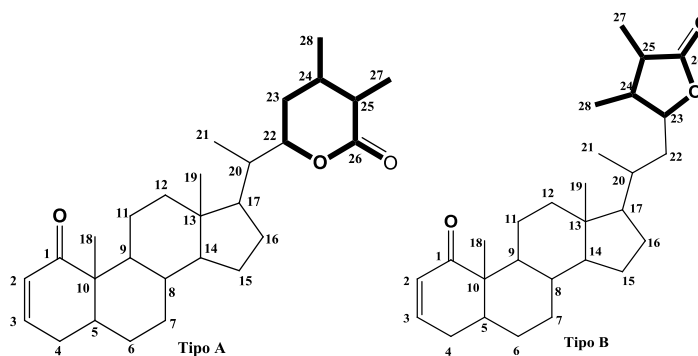


Fonte: (MAIA, 2010).

3.3 Classificação dos vitanolidos

Segundo Chen, *et al* (2011), os vitanolidos são compostos altamente oxigenados (polioxigenados), sub-divididos em dois grupos, de acordo com a cadeia lateral ligada ao carbono C-17: vitanolido tipo A (δ -lactona ou δ -lactol) e vitanolido tipo B (γ -lactona ou γ -lactol), conforme mostrado na Figura 11 a seguir. É importante ressaltar que só existem relatos na literatura de vitanolidos tipo A isolados da espécie *N. physalodes* (GUTIERREZ *et al.*, 2015, SHINKAI; BRUICE, 1972, MUKUNGU *et al.*, 2013 etc).

Figura 11-Classificação dos vitanolidos em tipo A e tipo B



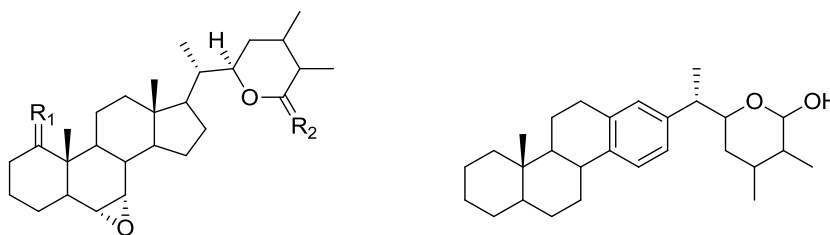
Fonte: CHEN, L., HE, H., QIU, F., 2011. Natural withanolides: an overview. *Nat. Prod. Res.* 28, 705-740

3.3.1 *Vitanolidos tipo A*

Estes vitanolidos encontram-se dividido em dois subgrupos: vitanolidos com esqueleto não modificado (Grupo I) e vitanolidos com esqueleto modificado (Grupo II). Ao grupo I pertencem os vitanolidos $5\beta,6\beta$ -epóxidos, 5-eno, $6\alpha,7\alpha$ epóxidos, $5\alpha,6\alpha$ -epóxidos, e $6\beta,7\beta$ -epóxidos. Dentro do grupo II são comuns as fisalinas, neofisalinas, vitafisalinas, acnistinas/epiacnistinas, vitajardinas, vitametelinas, vitanolidos tipo norbornano, sativolidos, espiranoide- δ -lactonas, $14\alpha,20\alpha$ -epóxidos, subtriflora- δ -lactonas e vitanolidos com anel D aromático (CHEN *et al.*, 2011).

Dentre os vitanolidos tipo A, dois são comumente isolados de *N. physalodes*: os $6\alpha,7\alpha$ -epóxidos com a característica de possuir um sistema A/B 5α -hidroxy-2-en-1-ona e os vitanolidos com anel D aromático, pertencentes aos grupos I e II, respectivamente. Os esqueletos-base desses compostos encontram-se apresentados na Figura 12 abaixo.

Figura 12-Esqueletos-base de vitanolidos tipo A pertencentes aos grupos I e II



Fonte: CHEN,HE, QIU, 2011.

3.4 Generalidades espectroscópicas dos compostos tipo Vitanolido

Segundo o reportado por Yang, *et al* (2016) os compostos tipo vitanolido apresentam generalidades espectroscópicas que permitem sua diferenciação e fácil localização dentro das misturas.

3.4.1 *Vitanolidos: Ultra violeta (UV) e infra vermelho (IV)*

A absorção na região do UV esta em lambdas máximos de 225 nm, características dos sistemas α,β - insaturados sendo estes sistemas cromóforos. Incrementando a conjugação dos elétrons π , em sistemas de baixa energia como $\pi \rightarrow \pi^*$ temos deslocamentos de λ_{\max} entre (224-320 nm) característicos dos vitanolidos com anéis aromáticos.

Na região do Infravermelho, são características as bandas de deformação axial da ligação OH em rangos de 3200-3600, uma outra característica forte e a presença das banda finas de sistemas α, β - insaturados com cetona (1675 cm^{-1}), α, β - insaturados δ -lactona (1710 cm^{-1}) e α, β - insaturados γ lactona em ($1735\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$) (YANG, *et al*; 2016)

3.4.2 *Vitanolidos: Espectrometria de massas*

Segundo Yang, *et al* (2016) são características as clivagens nos carbonos C-20/C-22 dos vitanolidos para a formação do pico em m/z 125 com ionização eletrônica (EM-IE), também foram relatadas clivagens complexas em C₁₋₁₀/C₄₋₅ do anel A, para a formação do pico em m/z 68, e para confirmar o sistema α, β - insaturado δ -lactona com a presença de uma hidroxila e possível observar um pico correspondente a m/z 141 (C₇H₉O₃).

Por métodos de EMAR como ESI-MS ou ESI-QqTOF-MS/MS este ultimo usado como técnica de confirmação pode-se obter informação dos adutos no modo positivo tais como $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ e $[M+Na]^+$, a perda de moléculas de H₂O inequivocamente leva a confirmar a presença de grupos hidroxila nos carbonos C-4, C-5, C-17, C-20 e C-27, além dos grupos epoxidos nas posições C-5, C-6, um exemplo e a utilização de LC/IT-MS o qual gera o espectro de massa dos vitanolidos como diversas perdas de moléculas de H₂O (YANG, *et al*; 2016).

3.4.3 *Vitanolidos: RMN de protio 1H*

No espectro de RMN- 1H para os compostos tipo vitanolido, são característicos os sinais para cinco metilas correspondentes como C-18, C-19, C-21, C-27 e C-28, com deslocamentos que vão desde 0,69 até 2,10 ppm, também é possível observar como característica os hidrogênios olefinicos do sistema α, β - insaturado do anel A, onde de acordo ao solvente usado para a preparação da amostra pode ter deslocamentos entre δ 5,60- 6,00 para o hidrogênio α e entre δ 6,50- 6-90 para o hidrogênio β (YANG, *et al*; 2016).

3.5 Atividades relatadas para os compostos tipo vitanolido.

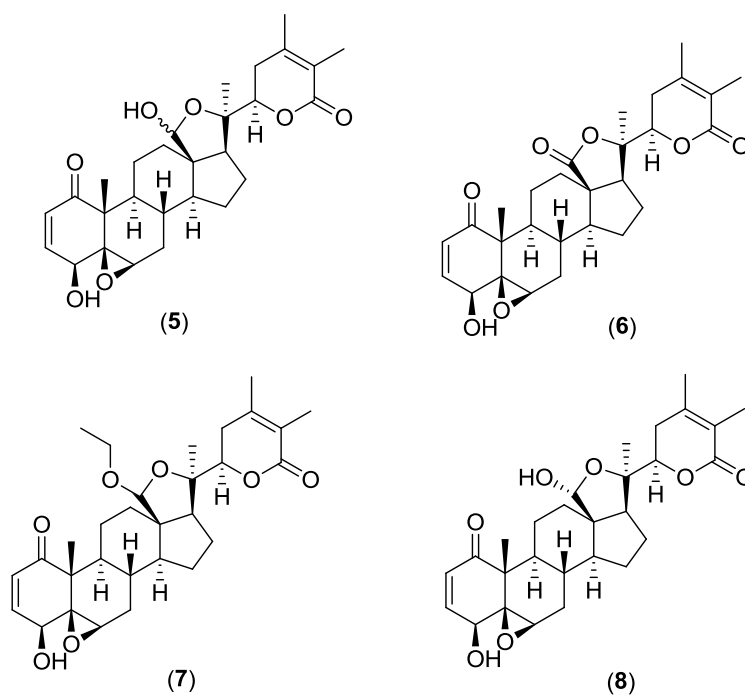
Segundo Chen, *et al* (2011) a medicina tradicional e o uso das medicinas ervais que contem em sua maioria compostos do tipo vitanolido tem uma importância etnofarmacologica, apresentando diversas atividades aqui relatadas.

Muitas das plantas da família Solanaceae têm sido reportadas como potenciais espécies no isolamento de vitanolidos e são utilizadas pela medicina popular no tratamento de diversas doenças e, por exemplo, o caso da *Physalis angulata* usada em vários continentes como anticancerígena, diurética e anti-inflamatória além de imunoreguladora, mais recentemente *P. angulata* foi reportada por Weber C, *et al* (2015) como uma espécie usada como tratamento da malária por comunidades indígenas junto a uma espécie também da família Solanaceae conhecida como jurubeba (*Solanum crinitum* Lam). As propriedades antitumorais dos compostos tipo vitanolido tem sido estudadas por muitos anos, os vitanolidos exibem propriedades citotóxicas e de diferenciação de células, sendo compostos quimiopreventivos no tratamento de câncer (CHEN, *et al.*, 2011).

Diversas publicações têm como objetivo o isolamento dos compostos tipo vitanolido além de sua caracterização, mas também tem muitas pesquisas com o objetivo da procura de atividades biológicas, deste modo, um amplo levantamento bibliográfico permitiu observar um numero importante de artigos publicados com atividades tais como citotóxica, antitumoral, tripanocidal, e antidiurética.

No levantamento bibliográfico feito como a base de dados Science Finder® com a palavra vitanolido (withanolide) foram obtidas 1136 referencias, dentro das quais encontram-se artigos desde o ano 1950 ate o ano 2016, artigos com diversos objetivos e reportando diversas atividades, um dos artigos mais recentes foi relatado por Batista, *et al* (2016) onde apresenta o isolamento dos compostos tipo vitanolidos isolados das folhas da espécie *Acnistus arborescens* cultivada, tendo em conta que muitas outras pesquisas apresentam esta espécie como uma fonte de vitanolidos com potente atividade citotóxica, sendo o caso da vitafisalina F (5), M (6), O (7) e (17S,20R,22R)- 5b,6b:18,20-diepoxi-4b,18-dihidroxi-1-oxovita-24-enolido (8) (Figura 13) (CHATAING, *et al*, 2012) (MINGUZZI; BARATA; CORDELL, 2011)

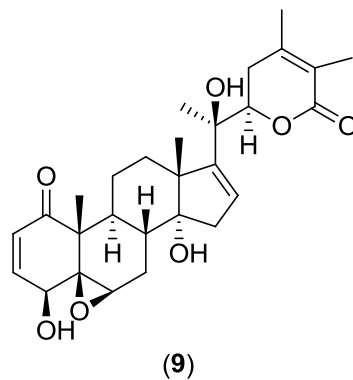
Figura 13- Vitanolidos isolados de *Acnistus arborescens* com atividade citotóxica.



Outros autores relatam esta atividade para compostos similares isolados de espécies da família Solanácea, um dos exemplos mais estudados e *Withania somnifera* com 2600 reportes na base de dados Science Finder®, sendo a maioria deles artigos sobre sua atividade citotóxica, anticancerígena e imunoreguladora (JINUKUTI, GIRI, 2015).

Physalis peruviana é uma espécie amplamente conhecida dentro da família Solanaceae pertencente ao gênero *Physalis* com mais de 120 espécies, recentemente no ano 2009 foram publicados sete novos compostos para esta espécie um deles é a phyperunolide A (9) (Figura 14), o qual apresenta atividade citotóxica importante frente a linhagens de células cancerígenas humanas (YU-HSUAN LAN, *et al.*, 2009)

Figura 14- Vitanolido isolado de *Physalis peruviana* com atividade citotóxica



3.6 Metabólitos secundários isolados do gênero *Nicandra*

Nicandra é um gênero amplamente estudado pela presença de compostos tipo vitanolidos (*withanolides*). Muitas atividades têm sido relatadas para estes compostos, entre os quais, podemos destacar antitumorais, antifeedant, anti-estresse, citotóxica, imunossupressora, antimicrobiana e anti-inflamatória (CHEN, *et al.*, 2011), como já foi mencionado no literal 2.2, o genero *Nicandra* esta composto por três espécies, sendo um dos gêneros mais pequenos da família

Um amplo levantamento bibliográfico para a espécie *N. physalodes* na base de dados Science Finder® com a palavra chave *Nicandra physalodes*, permitiu observar que têm sido reportados artigos desde o ano 1950, iniciando com o exemplar publicado pela revista *Fette und Seifen* com o nome de *Seed oil of Nicandra physalodes*. Até o ano de 2016 foram encontradas 37 publicações (Figura 15) e 25 patentes para *N. physalodes*. Para a espécie *N. john-tyleriana* S foi publicado somente um artigo no ano de 2015, contemplando os metabólitos isolados de folhas da espécie, e finalmente para *N. yacheriana* S não foi encontrado artigos relatando o isolamento de compostos da espécie.

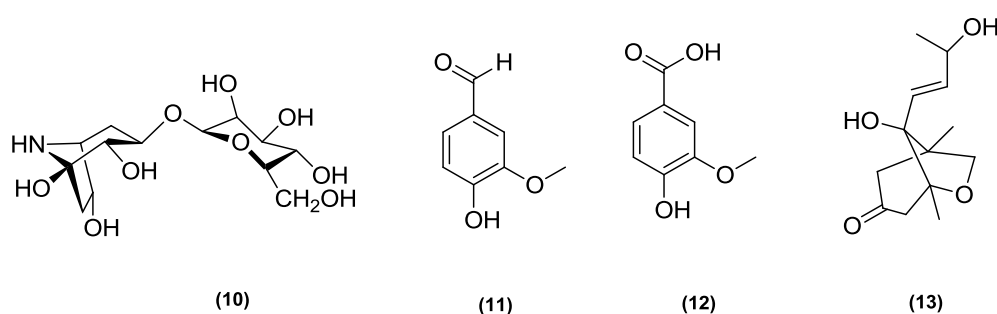
Figura 15- Diagrama de barras, número de publicações para *N. physalodes* V.s. anos de publicação



Fonte: Próprio autor com base no levantamento bibliográfico.

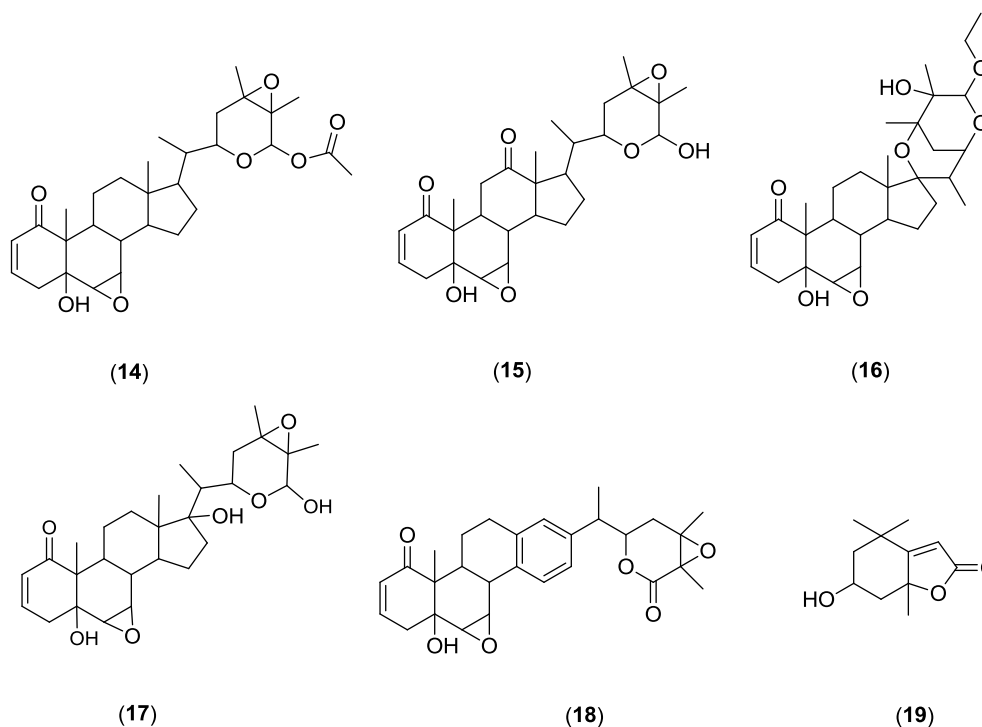
Entre os artigos publicados para *N. physalodes*, pode-se encontrar relatos de compostos do tipo vitanolido classificados como do tipo A (grupo I e grupo II) (CHEN, *et al.*, 2011) reportando-se comumente os 5 α ,6 α -epóxidos e os vitanolidos com anel D aromático. Também têm sido descrita a presença de alcaloides em flores como a calistegina B1 (**10**) e outros compostos minoritários como a vainilina (**11**), ácido vainilínico (**12**) e o drumondol (**13**) (Figura 16) (KUN, BO, KAI, 2012) (GRIFFITHS, *et al.*, 1994).

Figura 16- Exemplos de compostos minoritários isolados de *N. physalodes*



Entre os anos de 1972 e 1991 foram publicados cerca de 20 artigos para a espécie *N. physalodes*, relatando diversos trabalhos, dentre os quais se destacam os de análises estruturais utilizando difração de raios X para os compostos nic-3-acetato (**14**), nic-7 (**15**) e nic-11 etil éter (**16**), análises das rotas biossintéticas dos compostos denominados como vitanolidos com anel D aromático e isolamento de compostos minoritários das folhas da espécie como a nic-2 (**17**), nic-1 lactona (**18**) e nic-15 (Loliolido) (**19**) todos pertencentes à família das denominadas nicandrenonas (BEGLEY, *et al.* 1976_{ab}; BATES, MOREHEAD, 1974; GLOTTER, *et al.*, 1976 e GRIFFITHS, *et al.*, 1994) conforme demonstrado na Figura 17 pag. 45.

Figura 17- Alguns compostos adicionais isolados da espécie *N. physalodes*



Como já foi mencionado, os vitanolidos ocupam boa parte das publicações para *N. physalodes*, podendo-se destacar o trabalho de Mukungu, *et al* (2013), onde foi isolado o composto denominado vitanicandrina (**20**), composto classificado como vitanolido do tipo δ -lactona. Este composto foi testado contra *Saccharomyes cerevisiae* apresentando atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Além de apresentar atividade antibacteriana.

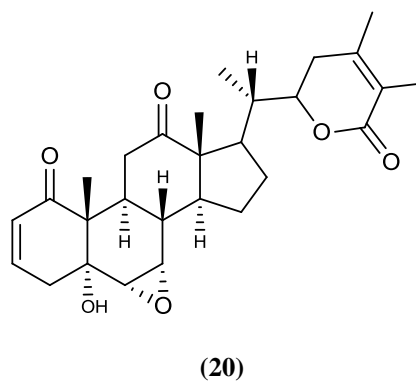
O extrato metanólico das folhas de *N. physalodes* coletada em Kunming (China) forneceu dois vitanolidos inéditos na literatura isolado por Kun, *et al* (2012): denominados como nicandrenona-metil- éter (**21**) e 26,(*S*)-nicandrenona-metil-éter (**22**). Também foram isolados três compostos já conhecidos, a nicandrenona (nic-1) (**23**), nicandrenona-7 (**24**) e nicafisalina E (**25**), sendo que para estes compostos os autores não apresentam atividade farmacológica.

Segundo Shingu, *et al* (1994), o fracionamento do extrato metanólico das folhas, flores e caule de *N. physalodes*, forneceu cinco novos vitanolidos os quais foram denominados como nicafisalina A (**26**), B (**27**), C (**28**), D (**29**) e E.

As figuras (18-27) anteriormente mencionadas e apresentadas em forma de tabela com os dados de RMN de ^{13}C permitem ter uma visão geral dos deslocamentos químicos típicos de vitanolidos isolados para esta espécie, desta forma, por exemplo, se pode comparar mais em frente os deslocamentos típicos encontrados na literatura apresentada a continuação com os dados apresentados experimentalmente para o sistema α,β -conjugado com a carbonila em C1, o sistema do anel epoxido em 6-7 ou as diferentes ligações propostas no carbono C17, além dos carbonos metínicos, metilénicos e metílicos para cada caso.

Figura 18- Dados de RMN de ^{13}C da vitanicandrina (50 MHz, CDCl_3)

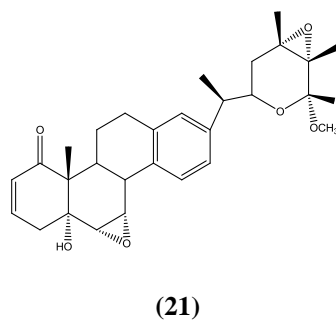
Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	201,7	15	23,8
2	129,0	16	27,3
3	140,2	17	42,8
4	36,8	18	11,6
5	73,4	19	14,9
6	56,4	20	39,9
7	57,1	21	13,7
8	35,7	22	76,6
9	37,8	23	30,1
10	51,6	24	149,8
11	38,5	25	122,0
12	212,6	26	167,3
13	57,8	27	12,7
14	53,3	28	20,8



(MUKUNGU *et al.*, 2013)

Figura 19- Dados de RMN de ^{13}C da nicandrenona-metil-éter (50 MHz, CDCl_3)

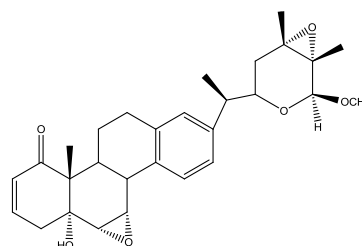
Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	202,9	15	124,0
2	128,9	16	125,6
3	140,1	17	142,5
4	37,1	18	128,7
5	73,0	19	14,3
6	57,0	20	43,9
7	55,9	21	18,4
8	38,7	22	68,9
9	32,0	23	35,5
10	51,9	24	61,4
11	24,6	25	61,5
12	29,7	26	99,3
13	137,1	27	17,2
14	135,2	28	18,6
		OCH₃	55,7



(MUKUNGU *et al.*, 2013)

Figura 20- Dados de RMN de ^{13}C da 26,(S)-nicandrenona-metil-éter (125 MHz, CDCl_3)

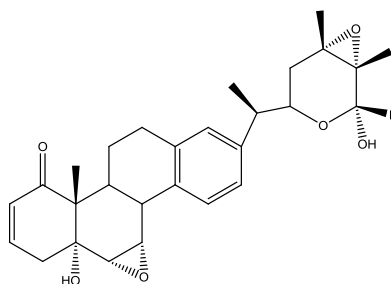
Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	202,3	15	123,6
2	128,2	16	124,7
3	139,8	17	141,3
4	36,4	18	128,1
5	72,7	19	13,6
6	56,3	20	43,5
7	55,7	21	16,3
8	38,1	22	71,7
9	31,2	23	33,2
10	51,1	24	61,9
11	23,9	25	60,8
12	28,9	26	101,0
13	136,2	27	14,2
14	134,7	28	18,5
		OCH₃	55,0



(22)

(KUN, *et al.*, 2012)Figura 21- Dados de RMN de ^{13}C da nicandrenona (nic-1) (125 MHz, CDCl_3)

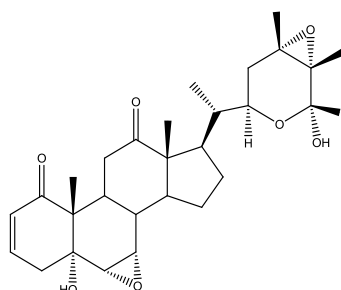
Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	202,6	15	123,7
2	128,5	16	125,0
3	140,0	17	141,1
4	36,5	18	128,2
5	72,5	19	13,7
6	56,5	20	42,7
7	55,2	21	17,0
8	38,2	22	67,1
9	31,8	23	33,4
10	51,3	24	64,1
11	24,6	25	63,1
12	29,0	26	91,2
13	136,6	27	16,3
14	134,9	28	18,4



(23)

(KUN, *et al.*, 2012)Figura 22- Dados de RMN de ^{13}C da nicandrenona-7 (125 MHz, CDCl_3)

Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	201,4	15	23,5
2	128,7	16	26,8
3	139,8	17	42,9
4	36,5	18	14,6
5	73,1	19	11,4
6	56,0	20	39,6
7	56,9	21	12,8
8	35,4	22	65,0
9	37,4	23	29,4
10	51,3	24	65,4
11	38,2	25	63,9
12	212,4	26	91,7
13	57,6	27	16,5
14	52,7	28	18,9

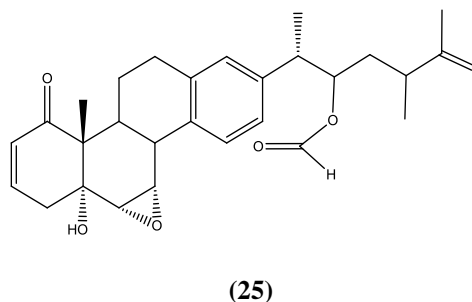


(24)

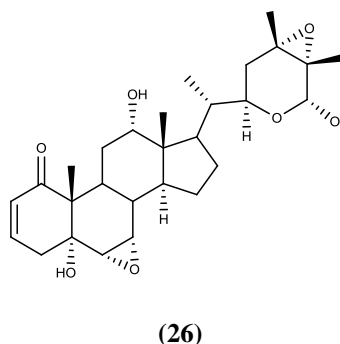
(KUN, *et al.*, 2012)

Figura 23- Dados de RMN de ^{13}C da nicafisalina E (125 MHz, CDCl_3)

Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	202,6	15	124,1
2	128,5	16	125,1
3	140,1	17	140,2
4	36,8	18	128,7
5	72,7	19	13,9
6	56,7	20	43,3
7	55,4	21	17,5
8	38,5	22	75,6
9	31,6	23	34,8
10	51,6	24	42,9
11	24,2	25	211,5
12	29,2	26	28,5
13	137,0	CHO	160,8
14	135,6	28	17,7

(KUN, *et al.*, 2012)Figura 24- Dados de RMN de ^{13}C da nicafisalina A (125 MHz, CDCl_3)

Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	203,4	15	22,9
2	128,9	16	26,3
3	139,9	17	43,2
4	36,7	18	12,5
5	73,3	19	14,6
6	56,0	20	38,6
7	57,0	21	11,4
8	35,9	22	65,2
9	28,6	23	29,5
10	50,5	24	65,3
11	29,7	25	63,8
12	72,5	26	91,8
13	46,9	27	16,6
14	43,6	28	18,9

(SHINGU, *et al.*, 1994)Figura 25- Dados de RMN de ^{13}C da nicafisalina B (125 MHz, CDCl_3)

Posição	δ_c	Posição	δ_c
1	203,9	15	75,8
2	128,1	16	127,7
3	140,1	17	156,5
4	36,3	18	18,3
5	73,1	19	14,4
6	55,8	20	35,9
7	56,4	21	16,2
8	33,5	22	66,3
9	35,4	23	33,6
10	50,8	24	62,9
11	20,9	25	62,8
12	34,4	26	91,9
13	46,7	27	16,0
14	60,1	28	17,9

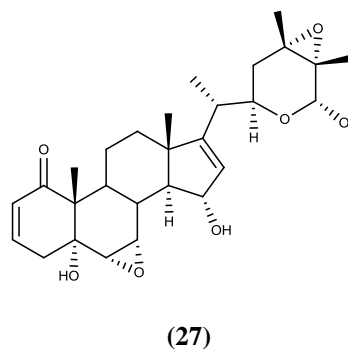
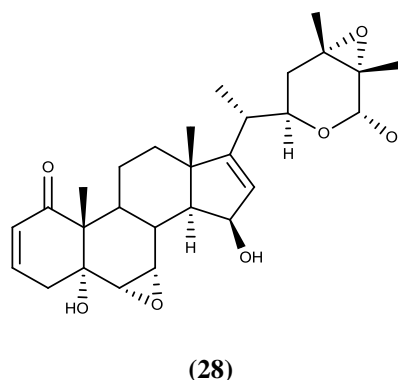
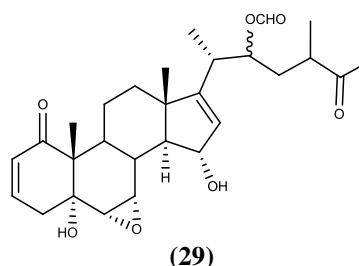
(SHINGU, *et al.*, 1994)

Figura 26- Dados de RMN de ^{13}C da nicafisalina C (125 MHz, CDCl_3)

Posição	δ_{C}	Posição	δ_{C}
1	203,2	15	73,4
2	129,1	16	124,0
3	139,6	17	162,7
4	36,7	18	23,3
5	73,5	19	15,1
6	55,9	20	32,2
7	57,0	21	18,8
8	36,5	22	66,6
9	36,5	23	34,5
10	51,3	24	64,6
11	21,4	25	63,6
12	35,2	26	91,6
13	48,2	27	16,6
14	55,2	28	17,7

(SHINGU, *et al.*, 1994)Figura 27- Dados de RMN de ^{13}C da nicafisalina D (125 MHz, CDCl_3)

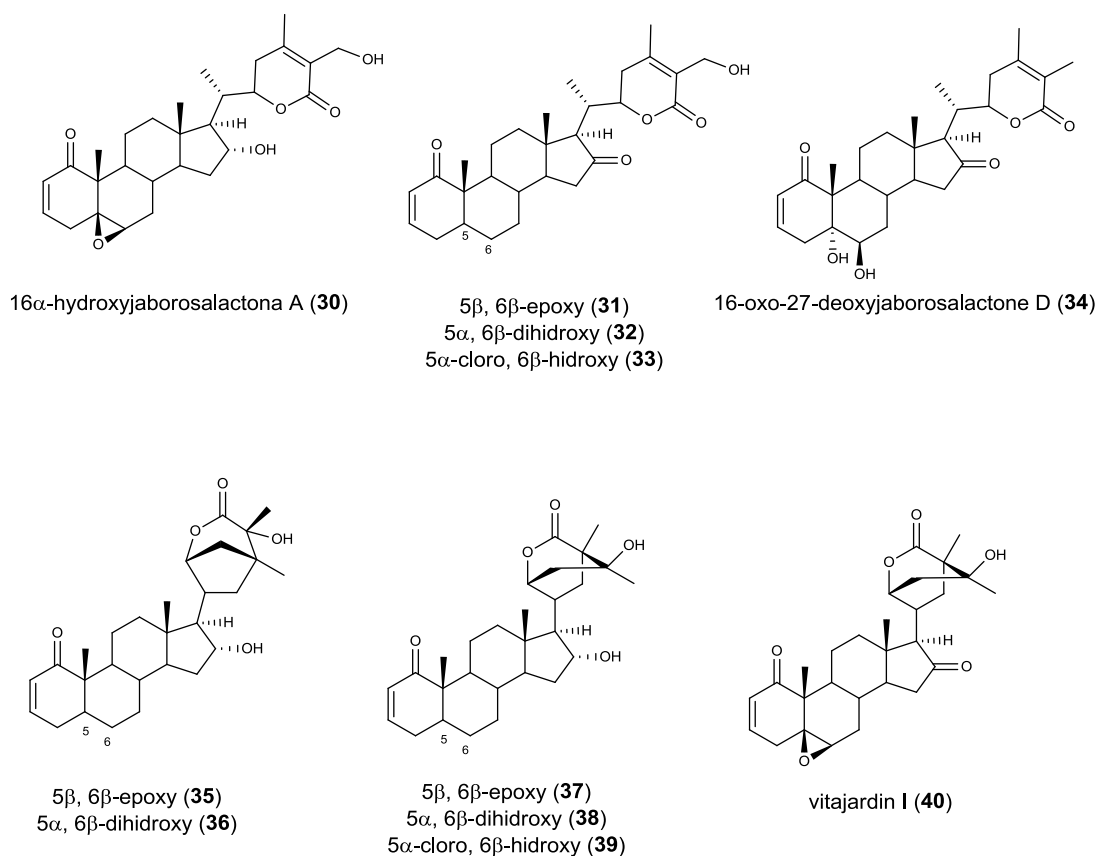
Posição	δ_{C}	Posição	δ_{C}
1	202,9	15	76,8
2	128,8	16	128,8
3	139,6	17	156,6
4	36,7	18	18,9
5	73,4	19	14,9
6	56,7	20	36,2
7	57,5	21	17,0
8	33,9	22	74,6
9	36,1	23	33,6
10	51,0	24	42,9
11	21,3	25	211,3
12	34,5	26	28,8
13	47,4	CHO	160,8
14	61,4	28	17,9

(SHINGU, *et al.*, 1994)

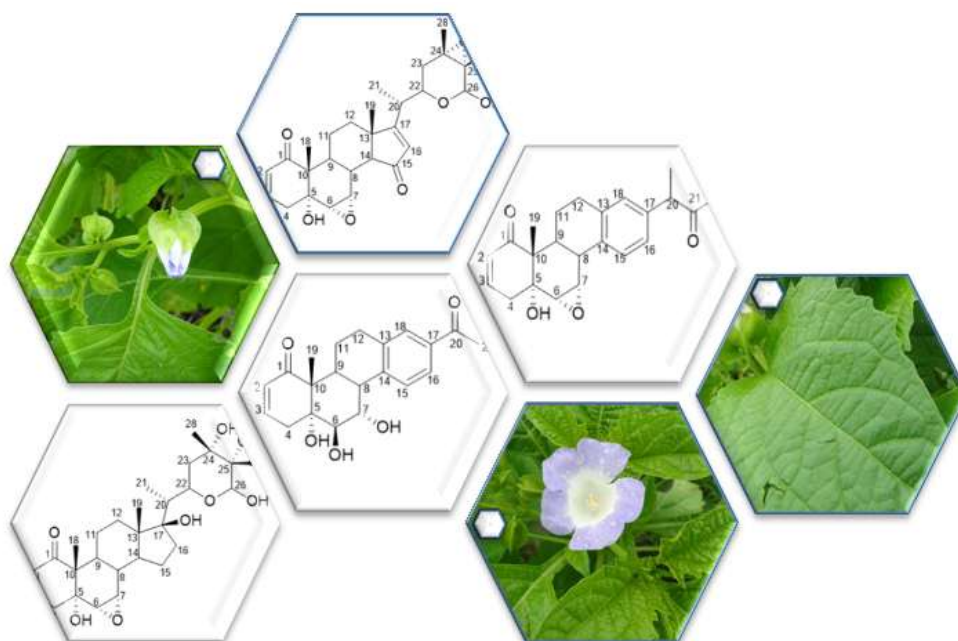
O primeiro vitanolido descrito para *N. physalodes* foi isolado por Nalvandov *et al.*, (1964) e denominado como nicandrenona (Nic-1), o qual apresentou atividade repelente, sendo o responsável por esta atividade da planta toda. Vale ressaltar que no ano de 1972, o composto foi elucidado completamente e seus dados de carbono-13 e prótio foram publicados no *Journal of the American Society Chemical* por Bates & Eckert (1972).

Da espécie *N. john-tyleriana* S foram isolados onze compostos do tipo A, sendo cinco do subgrupo I e sete do subgrupo II, os quais encontram-se apresentados na **Figura 28** a seguir, tendo em conta que todos foram testados contra bactérias do tipo *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Listeria*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* Segundo (GUTIERREZ, *et al.*, 2011). Para *N. yacheriana*, como já mencionado, ainda não foram publicados artigos com o isolamento de metabólitos secundários.

Figura 28-Compostos isolados da espécie *N. john-tyleriana*



Fonte: (GUTIERREZ, *et al.*, 2015).



PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Aspectos Gerais

O estudo químico dos extratos das folhas da espécie *N. physalodes* G, foi realizado utilizando técnicas cromatográficas, como cromatografia de exclusão molecular em gel de dextrana (Sephadex LH-20), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna gravitacional (CC), cromatografia *flash* (CF) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A elucidação estrutural dos compostos isolados foi feita através de métodos espectrométricos e espectroscópicos, tais como, IV, RMN e EMAR.

4.2 Métodos cromatográficos

4.2.1 *Cromatografia de exclusão molecular*

A cromatografia de exclusão molecular foi feita mediante a utilização de gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals.

4.2.2 *Cromatografia em camada delgada*

As análises em cromatografia em camada delgada (CCD) foram feitas em cromatoplasmas com base de alumínio (20 x 20 cm, 1 mm de espessura) Merck, revestidas com sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F254). Os compostos foram visualizados através de aspersão em solução de vanilina/ácido perclórico, seguido por aquecimento em chapa aquecedora, além da detecção utilizando uma câmara de UV-Vis a 254 e 362 nm.

4.2.3 *Cromatografia em coluna gravitacional*

Os fracionamentos em coluna (CC) foram realizados utilizando colunas de vidro empacotadas com sílica gel 60 (70-230 Mesh) para cromatografia gravitacional e (230-400 Mesh) para cromatografia *flash* (CF).

4.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram feitas em um equipamento Shimadzu, com uma bomba ternária (LC20AT), um detector Uv PDA (SPD-M20A) e um forno CTO-20A. As colunas utilizadas foram RP-18 Phenomenex[®], com fluxos de 1 mL/min para coluna analítica (4,6 x 250 mm, 5µm) e 4 mL/min para coluna semi-preparativa (10 x 250 mm, 5µm).

Os solventes utilizados foram todos de grau HPLC (CH₃CN, CH₃OH e H₂O deionizada) após serem filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm Phenomenex[®] e desgaseificados em sonicador da Quimis[®] modelo Q3350 durante 30 min.

4.3 Métodos espectrométricos.

4.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro PERKIN-ELMER[®], modelo Spectrum 100 FT-IR, utilizando UATR (Universal Attenuated Total Reflectance Accessory) do Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC).

4.3.2 Espectrometria de massa de alta resolução (EMAR)

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Shimadzu, modelo LCMS-IT-TOF, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) pertencente ao laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará, sendo os *scans* no modo positivo ou negativo, também foi usado o espectrômetro de massas modelo Waters Acquity UPLC acoplado com um sistema quadrupolo com tempo de voo (TOF) sistema (UPLC/Qtof MSE espectrômetro) em modo positivo, equipamento pertencente ao laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da EMBRAPA.

4.3.3 *Espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C)*

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais, foram obtidos em equipamentos (espectrômetros) da marca Bruker, modelos Avance DRX-500 e DPX-300, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). Foram aplicadas frequências de 500,13 MHz (^1H) e 125,75 MHz (^{13}C), e 300,13 MHz (^1H) e 75,47 MHz (^{13}C).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de prótio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: piridina (δ_{H} 7,2; 7,59 e 8,74), clorofórmio (δ_{H} 7,27) e metanol (δ_{H} 3,31). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: piridina (δ_{C} 123,6, 136,4 e 150,4), clorofórmio (δ_{C} 49,15) e metanol (δ_{C} 49,1).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), q (quarteto), t (tripleto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) de acordo com convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono metilênico), e CH₃ (carbono metílico).

4.4 Métodos físicos de análise

4.4.1 *Determinação da rotação óptica*

As rotações ópticas foram obtidas em um polarímetro digital da marca Jasco® P-2000 do Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste da Universidade Federal do Ceará (LEMANOR-UFC), operando a 589 nm e 20°C e utilizando uma cubeta de 1,0 dm. Todas as amostras foram analisadas na concentração de 1 mg/ml.

4.4.2 *Determinação do ponto de fusão*

Os pontos de fusão medidos para as amostras foram determinados em um equipamento da marca MARCONI® modelo MA381-CE. As medições foram realizadas com uma taxa de aquecimento de 5°C/min.

4.5 Estudo fitoquímico das folhas da espécie *Nicandra physalodes*

4.5.1 *Coleta e identificação do material vegetal*

A coleta do material vegetal foi feita no estado do Ceará, no ano de 2015, a 2 Km da cidade de Guaraciaba do Norte, coordenadas geográficas (S 04° 15'24", W 40° 49'17"). Uma amostra foi enviada ao Herbário Prisco Bezerra para sua determinação taxonômica, a qual foi classificada como *Nicandra physalodes* (L.) Garent e cujo número de exsicata foi 58.047. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

4.5.2 Obtenção do extrato em acetona das folhas da espécie *N. physalodes* G

As folhas de *Nicandra physalodes* (Np) foram secas à temperatura ambiente (32-35 °C) em média, resultando em uma massa de 1215 g as quais foram trituradas e submetidas à maceração a frio com 7 litros de acetona P.A em um recipiente de vidro durante um tempo de 24 horas por duas vezes. A solução extraída foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida a 40 °C, obtendo-se o extrato denominado NpAc (56,58 g).

4.5.3 Partição líquido-líquido do extrato denominado NpAc

O extrato em acetona (56,58 g) foi dissolvido em uma mistura de MeOH/H₂O (6:4) e submetido à partição líquido-líquido com solventes em polaridade crescente, iniciando com n-hexano (900 mL), seguido de diclorometano (600 mL) e finalizando com acetato de etila (600 mL) denominadas NpAcH, NpAcDCM e NpAcAcOEt, respectivamente. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e evaporadas à pressão reduzida. Na Tabela 2 estão descritas as massas das frações obtidas, além da porcentagem de rendimento.

Tabela 2-Frações provenientes da partição Líquido-Líquido do extrato em acetona das folhas da espécie *N. physalodes*

Solvente	Volumes coletados (mL)	Massa (g)	Sigla
n-Hexano	900	31,38	NpAcH
DCM	600	7,3	NpAcDCM
AcOEt	600	1,95	NpAcAcOEt
Total		40,63	
% Rendimento		71,80	

4.6 Isolamento dos constituintes químicos da fração NpAcDCM obtidos do extrato de *N. physalodes*

4.6.1 Cromatografia de adsorção seletiva da fração denominada NpAcDCM das folhas de *N. physalodes*

A fração denominada NpAcDCM (7,30 g) foi fracionada mediante cromatografia gravitacional utilizando 157 g de sílica gel 60 (granulometria entre 70-230 Mesh) e como fase móvel foi utilizada uma mistura de solventes DCM/AcOEt em modo gradiente nas proporções: 9:1, 7:3, 1:1, 3:7, AcOEt 100%, AcOEt-MeOH 8:2, e MeOH 100% obtendo-se, desta forma, sete sub-frações conforme apresentadas na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3-Sub-frações obtidas a partir da CC da fração denominada NpAcDCM

Fração	Eluente	Massa (mg)	Código
1	DCM-AcOEt (9:1)	529,7	NpAcDCM-A
2	DCM-AcOEt (7:3)	3084	NpAcDCM-B
3	DCM-AcOEt (5:5)	682,3	NpAcDCM-C
4	DCM-AcOEt (3:7)	494,1	NpAcDCM-D
5	AcOEt 100%	861,1	NpAcDCM-E
6	AcOEt-MeOH (8:2)	1400	NpAcDCM-F
7	MeOH 100%	157	NpAcDCM-G
Total		7,2 g	
% de rendimento		90	

4.6.2 Cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-A e isolamento do composto Np1

A fração denominada NpAcDCM-A (473,1 mg) foi solubilizada em metanol P.A e acondicionados em uma coluna de 2,5 cm de diâmetro interno, empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 com altura de 38,0 cm. Como fase móvel foi utilizado metanol P.A com um fluxo de 5 gotas por minuto. Foram coletadas 79 frações com um volume de coleta de 2 ml, as quais foram monitoradas por CCD e reunidas em 10 sub-frações de acordo com suas semelhanças.

A fração denominada **NpAcDCM-A.9** apresentou-se como um sólido branco cristalino, o qual foi submetido à lavagens com metanol P.A até a obtenção do sólido

denominado **Np1** (26,3 mg). Este composto foi submetido à análises de RMN de ^1H e ^{13}C além de IV e EMAR.

4.6.3 Purificação da fração denominada NpAcDCM-B e isolamento do composto Np2

A fração NpAcDCM-B (3,08 g) foi monitorada por CCD, onde apresentou um composto majoritário de cor verde escuro. Esta fração foi purificada e recristalizada utilizando como solventes hexano/AcOEt (1:1) e MeOH P.A, até a obtenção de uma resina amarela (2,8 g). A cromatografia em CCD permitiu observar sua pureza considerável, o composto caracterizado foi denominado como **Np2**, realizou-se as análises de RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, além de IV e EMAR.

4.6.4 Cristalização e recristalização da fração denominada NpAcDCM-C: Isolamento dos compostos Np3 e Np4

A fração denominada NpAcDCM-C apresentou-se como um sólido de cor verde com formações cristalinas. Este precipitado foi submetido à lavagens com metanol P.A até a obtenção de um sólido cristalino branco o qual foi denominado **Np3** (13,9 mg). Este composto foi submetido à análises por RMN de ^1H e ^{13}C , além de espectrometria de massas de alta resolução e espectroscopia no infravermelho.

O líquido-mãe foi seco a uma temperatura de 40 °C sob pressão reduzida, obtendo-se um precipitado branco, o qual foi purificado mediante a utilização de Hexano/AcOEt (1:1), além de gotas de MeOH como solventes de lavagem, obtendo-se um sólido cristalino denominado **Np4** (56,2 mg).

4.6.5 Cromatografia de exclusão molecular da fração denominada *NpAcDCM-F* e isolamento do composto *Np5*

A fração *NpAcDCM-F* (1,4 g) foi solubilizada em uma quantidade mínima de MeOH, e posteriormente acondicionados em uma coluna empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 com altura de 28 cm por 2,5 cm de diâmetro interno. A primeira fração foi coletada depois de 100 mL de eluição com metanol, utilizando um fluxo de 5 gotas por minuto. Foram obtidas um total de 70 frações, as quais, após monitoramento por CCD, foram reunidas de acordo com o descrito na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4- Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular da fração denominada *NpAcDCM-E*.

Fração	Frações reunidas	Massa (mg)	Código
1	(1-11)	1,10	<i>NpAcDCM-F.1</i>
2	(12-18)	59,30	<i>NpAcDCM-F.2</i>
3	(19-24)	316,50	<i>NpAcDCM-F.3</i>
4	(25-27)	312,5	<i>NpAcDCM-F.4</i>
5	(28-32)	178,00	<i>NpAcDCM-F.5</i>
6	(33-36)	51,10	<i>NpAcDCM-F.6</i>
7	(37-43)	36,40	<i>NpAcDCM-F.7</i>
8	(44-50)	32,10	<i>NpAcDCM-F.8</i>
9	(51-56)	17,70	<i>NpAcDCM-F.9</i>
10	(57-63)	16,10	<i>NpAcDCM-F.10</i>
11	(64-70)	3,00	<i>NpAcDCM-F.11</i>
Total		1,023 g	
% de rendimento		73,07	

A fração ***NpAcDCM-F.3*** (316,5 mg) foi solubilizada em MeOH e recromatografada mais duas vezes mediante a utilização de gel de dextrana Sephadex LH-20, utilizando-se um fluxo de 5 gotas/min até a obtenção da fração denominada ***NpAcDCM-F.3.I.3***. Esta fração (148,6 mg) foi posteriormente submetida à cromatografia com cartucho C-18 Stata da Phenomenex® de 10 g, obtendo-se por eluição 14 frações, iniciando com H₂O/MeOH 50% e finalizando com 100% metanol, as quais foram posteriormente reunidas em sete grupos (A-G) de acordo com as semelhanças observadas através de CCD.

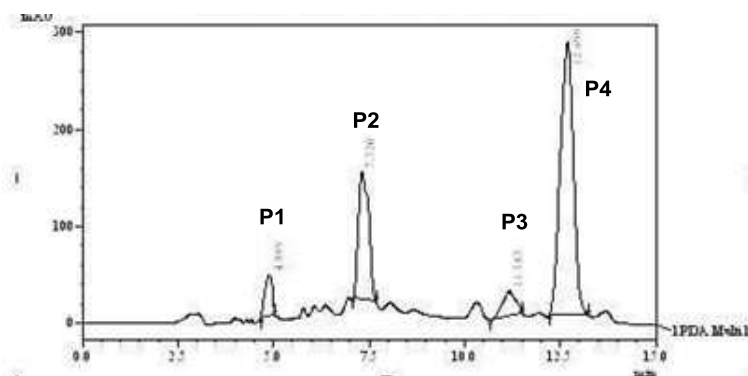
A fração denominada ***NpAcDCM-F.3.I.3.B*** (46,9 mg), foi obtida como um sólido branco de aspecto cristalino com um grau de pureza satisfatório sendo codificado como ***Np5***.

4.6.6 Cromatografia em cartucho C-18 e CLAE da fração denominada NpAcDCM-F.3.I.3.A e isolamento do composto Np6

A fração **NpAcDCM-F.3.I.3.A** (63,1 mg) foi submetida a fracionamento utilizando cartucho C-18 (Stata Phenomenex® de 10 g), iniciando a eluição com H₂O/MeOH 30% e finalizando com 100% metanol obtendo-se 7 frações. A fração denominada **NpAcDCM-F.3.I.3.A.4** (28,3 mg) foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A fração acima mencionada foi submetida a CLAE, após solubilização em CH₃CN (2 mL) e filtração utilizando membrana de nylon de 0,25 µ. Iniciou-se em condições isocráticas utilizando como fase móvel H₂O/CH₃CN (65:35) durante 10 min, gradiente em 5 min até obter uma mistura de solventes H₂O/ CH₃CN (20:80) e finalmente mantendo-se esta condição durante 10 min. A coluna utilizada foi uma semi-preparativa C18 Phenomenex Luna®, com fluxo de 4,2 mL/min, um loop de 200 µ e comprimento de onda utilizado na faixa de 230-400 nm. A análise resultou no isolamento do material correspondente ao pico P4 com $t_R = 12,699$ min (Figura 29) o qual foi denominado como **Np6** (2,9 mg).

Figura 29-Cromatograma do composto correspondente ao pico 4 (P4, $t_R = 12,699$ min) 230-400 nm



4.6.7 *Cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-(E) e isolamento do composto Np7*

A fração denominada NpAcDCM-E (861,1 mg) foi solubilizada em metanol grau P.A e submetida à eluição em uma coluna empacotada com gel de dextrana Sephadex LH-20 com altura de 38,0 cm, e fluxo de 5 gotas por minuto. Foram coletadas 23 frações, as quais foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com suas semelhanças, cujos dados são apresentados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5-Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcDCM-E.

Fração	Frações reunidas	Massa mg	Código
1	(1-9)	29,3	NpAcDCM-E.1
2	(10-12)	184,2	NpAcDCM-E.2
3	(13-17)	402,3	NpAcDCM-E.3
4	(18-22)	39,8	NpAcDCM-E.4
5	(23)	6	NpAcDCM-E.5
Total		661,6	
% Rendimento		76,8	

A fração denominada NpAcDCM-E.4 apresentou um sólido cristalino de cor branco (39,8 mg) denominado como **Np7**.

4.6.8 *Cromatografia em cartucho C-18 da fração denominada NpAcDCM-E.3 e isolamento do composto Np8*

A Fração denominada NpAcDCM-E.3 (402,3 mg) foi solubilizada em CH₃CN grau HPLC e submetidos a cartucho C-18 Stata da Phenomenex® (10 g), o qual foi previamente acondicionado com a fase móvel H₂O/ CH₃CN 30%. A aluição foi iniciada com 30% CH₃CN e finalizada com CH₃CN /THF 10%. A fração denominada NpAcDCM-E.3.B (10,2 mg) apresentou-se como um sólido cristalino.

4.7 Isolamento dos constituintes químicos do extracto NpAcAcOEt de *N. physalodes*.

4.7.1 Cromatografia de adsorção seletiva da fração denominada NpAcAcOEt das folhas de *N. physalodes*

A fração denominada NpAcAeOEt (1,95 g) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando 75 g de sílica gel 60 (granulometria 70-230 Mesh), e usando como fase móvel as misturas DCM/AcOEt em modo gradiente nas proporções 9:1, 7:3, 1:1, 3:7, AcOEt 100%, AcOEt-MeOH 8:2, e MeOH 100%, obtendo-se 154 sub-frações que foram monitoradas utilizando CCD e posteriormente reunidas de acordo com as suas semelhanças em 10 frações, conforme apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6-Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular da fração denominada NpAcAcOEt.

Fração	Frações reunidas	Massa (mg)	Código
1	(1-30)	2,0	NpAcAeOEt.A
2	(31-50)	14,3	NpAcAeOEt.B
3	(51-62)	21,0	NpAcAeOEt.C
4	(63-72)	46,8	NpAcAeOEt.D
5	(72-93)	180,0	NpAcAeOEt.E
6	(94-105)	543,6	NpAcAeOEt.F
7	(106-135)	360,0	NpAcAeOEt.G
8	(136-146)	44,1	NpAcAeOEt.H
9	(147-153)	510,0	NpAcAeOEt.I
10	(154)	133,9	NpAcAeOEt.J
Total		1,85 g	
% rendimento		94,8	

4.7.2 Cromatografia “flash” da fração denominada NpAcAcOEt-(E) e isolamento do composto Np9

A fração NpAcAcOEt-(E) (180,0 mg) foi misturada com 1 g de sílica gel 60 G para cromatografia *flash* (230-400 Mesh) e acondicionados em uma coluna de vidro com mais 5 g de sílica gel. Como solventes de eluição utilizou-se uma mistura de DCM/AcOEt (7:3) coletando-se finalmente 109 frações as quais foram reunidas de acordo com a sua semelhança. A fração denominada NpAcAcOEt-E.4 (8 mg) apresentou-se como um sólido cristalino branco, o qual foi denominado **Np9** e submetido às análises de RMN de hidrogênio e de Carbono 13 além de IV e EMAR.

Figura 30-Fluxograma da metodologia de isolamento dos compostos Np1 a Np8 presentes no extrato Diclorometano proveniente das folhas de *N.physalodes*

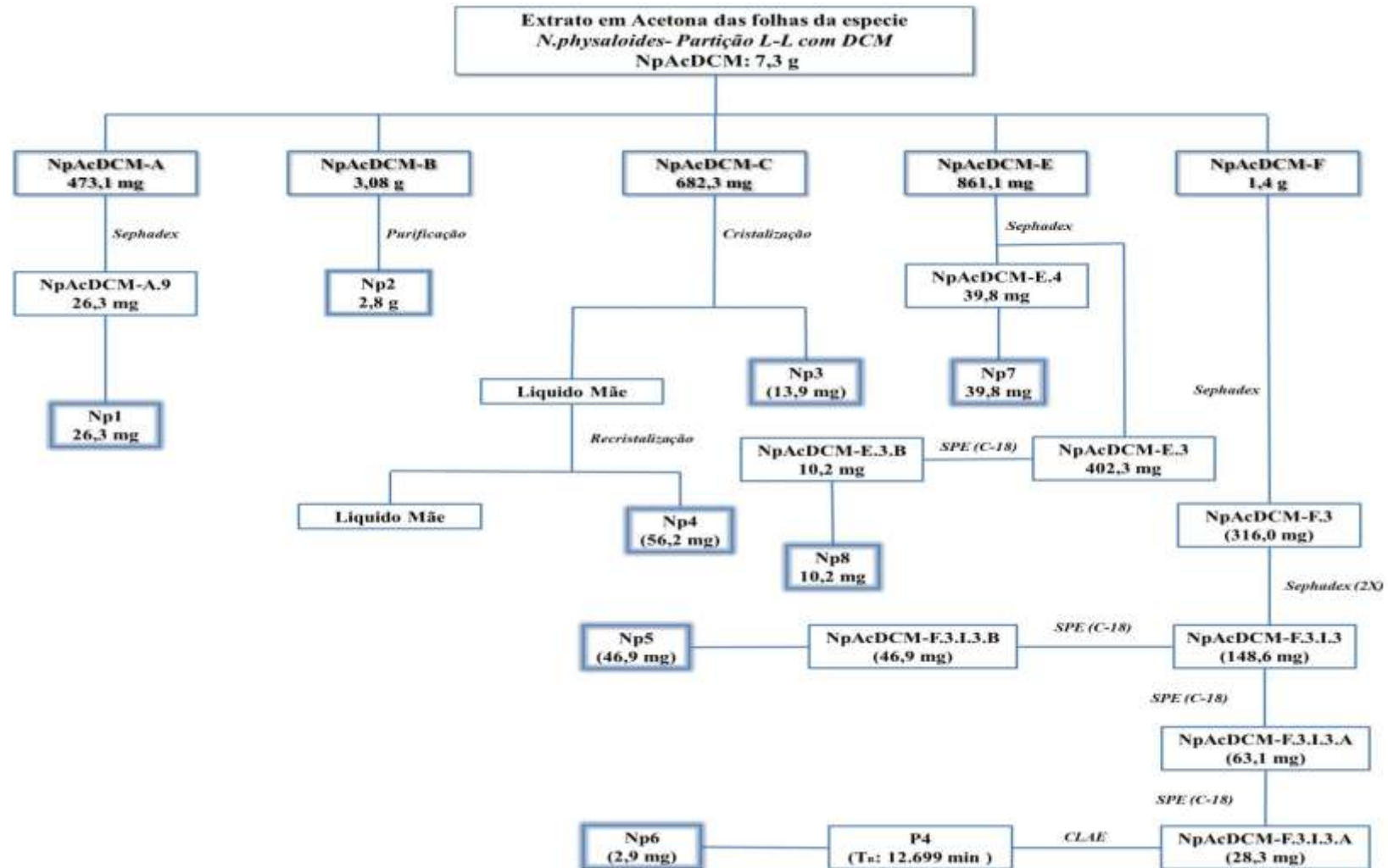
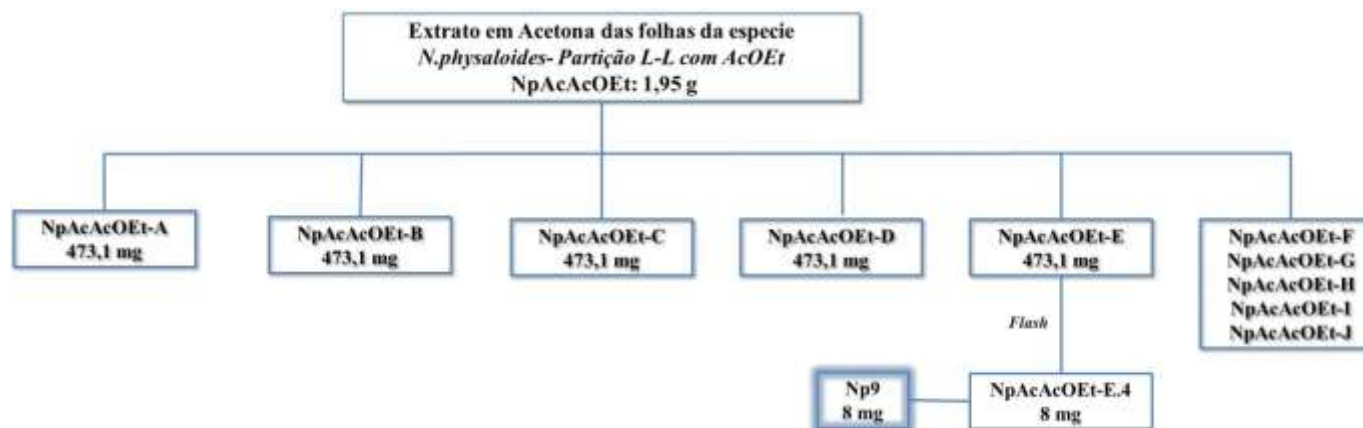
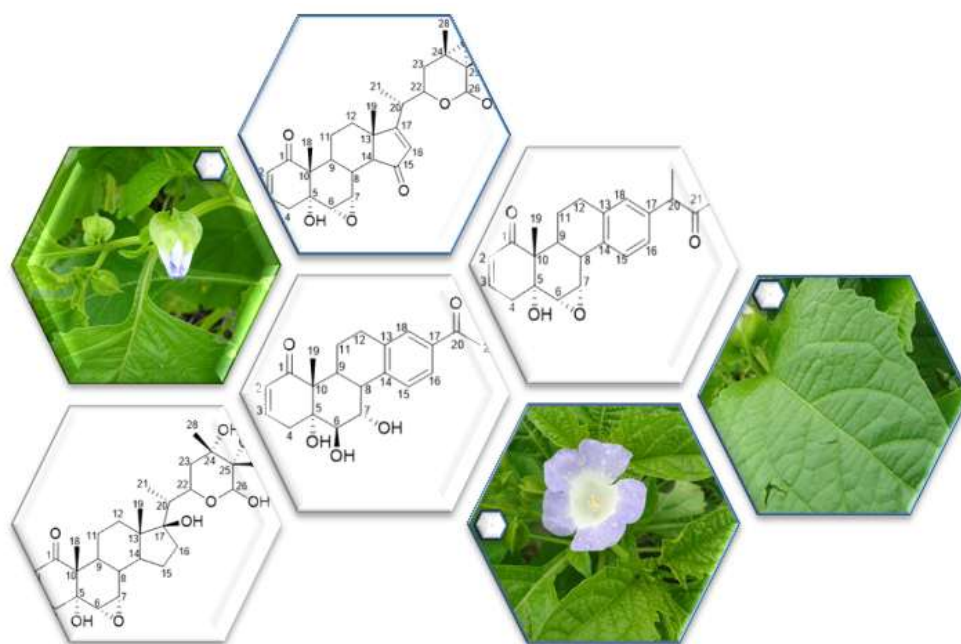


Figura 31-Fluxograma da metodologia de isolamento do composto Np9 presente no extrato Acetato de etila proveniente das folhas de *N.physalodes*





RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação estrutural

O estudo químico do extrato acetona das folhas de espécimes de *N. physalodes* proporcionou o isolamento de nove compostos (Np1 a Np9) todos derivados do ergostano, classificados como vitanolidos.

5.1.1 Determinação estrutural de Np2

A substância denominada Np2 (2,8 g) foi isolada a partir da fração NpAcDCM-(2), proveniente do extrato DCM, após fracionamento cromatográfico conforme a metodologia descrita no item 4.6.3 (p. 55), o composto apresentou-se como uma resina amarela com $[\alpha]_D^{20} + 23,9^\circ$ ($c = 0,1$; CH_2Cl_2).

O espectro na região do infravermelho (IV) (Anexo 1, p. 123) exibiu uma banda em 3455 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação O-H, uma banda característica para carbonila de cetona (C=O) conjugada em 1685 cm^{-1} , duas bandas confirmatórias de deformação angular no plano da ligação O-H em 1420 e 1330 cm^{-1} , além de bandas em 1262 e 1080 cm^{-1} características de deformação axial simétrica no plano do anel epóxido (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2013).

O espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np2 (Anexo 2, p. 123), utilizando fonte de ionização por *electrospray* (ESI) mostrou um pico correspondente ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 489,2097 (calc. m/z : 489,2248; erro: 0,8) permitindo determinar a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_6$, a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 12.

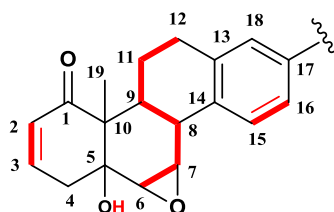
O espectro de RMN de ^{13}C -BB [MeOD, 75,4 MHz] (Anexo 3, p. 124) mostrou 28 linhas espectrais, destacando os sinais para um grupo carbonila em δ_C 205,9, três sinais para carbonos aromáticos com deslocamentos em δ_C 129,6; 126,7 e 125,6, bem como sinais para carbonos olefínicos em δ_C 142,7 e 129,3. Além disso, foi possível observar um sinal em δ_C 92,9 correspondente a carbono acetálico, sinais para carbonos oxigenados em δ_C 74,5; 64,8 e 64,3 e sinais em δ_C 57,8 e 56,2 característicos de um anel epóxido.

De acordo com o espectro DEPT 135° (Anexo 4, p. 124) foi possível determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono, o qual forneceu quatro sinais para carbonos metílicos (δ_C 18,8; 18,1; 17,1 e 14,8), quatro sinais para carbonos metilênicos (δ_C 25,7; 30,6; 35,6 e 38,3) e doze sinais para carbonos metínicos (δ_C 33,2; 40,2; 44,7; 56,2; 57,8; 69,7; 92,9; 125,6; 126,7; 129,3; 129,6 e 142,7). A subtração deste espectro com o espectro de RMN ^{13}C -BB permitiu inferir a presença de oito sinais para carbonos não hidrogenados (δ_C 54,9; 64,9; 64,3; 74,5; 137,2; 138,1; 143,1 e 205,9).

O espectro de RMN de ^1H [MeOD, 300 MHz] (Anexo 5, p. 125) revelou três sinais para hidrogênios aromáticos em δ_H 7,35 (d, $J=7,8$ Hz ; H-15), 7,00 (d, $J=8,0$ H-16) e 6,97 (s, H-18), característicos de um sistema de spin do tipo ABX, e dois sinais em δ_H 6,65 (m, H-3) e 5,79 (dd, $J=2,4$ e 10,0 Hz, H-2) indicando um sistema α,β -conjugado à carbonila típico de vitanolidos. Os sinais em δ_H 4,98 (s, H-26) e 4,00 (m, H-22) demonstram a existência do anel heterocíclico de seis membros na estrutura, além disso foi possível observar a presença dos sinais em δ_H 4,00 (m, H-7) e 3,22 (d, $J=3,9$, H-6), que corroboram a presença do anel epóxido. Também é importante ressaltar a presença de quatro sinais intensos de hidrogênios metílicos em δ_H 1,33 (s, H-19), 1,31 (s, H-28), 1,23 (s, H-27) e 1,21 (d, $J=7,1$, H-21).

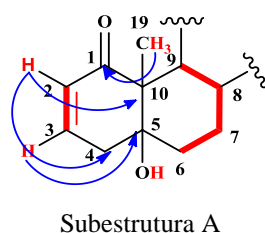
No espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (Anexo 6, p. 125) foram observados os acoplamentos homonucleares entre os sinais em δ_H 5,79 (H-2) com 6,65 (H-3), em δ_H 3,22 (H-6) com 4,00 (H-7), em δ_H 4,00 (H-7) com 3,08 (H-8) e, deste com o sinal em δ_H 1,98 (H-9), assim como do sinal em δ_H 7,35 (H-15) com 7,00 (H-16). Estas correlações foram compatíveis com o esqueleto esteroidal tipo ergostano, o qual tem sua estrutura apresentada na Figura 32 a seguir.

Figura 32-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np2



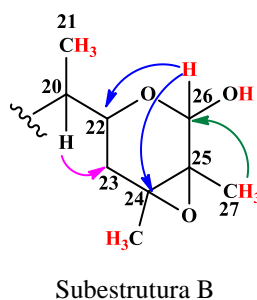
O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Anexo 7, p. 126), mostrou a correlação entre os hidrogênios da metila em δ_{H} 1,23 (CH_3 -19) com o carbono carbonílico em δ_{C} 205,9 (C-1), do hidrogênio em δ_{H} 5,79 (H-2) com o carbono não hidrogenado em δ_{C} 54,9 (C-10) e com 38,35 (C-4), a correlação do hidrogênio em δ_{H} 6,65 (H-3) com o carbono oxigenado não hidrogenado em δ_{C} 74,5 (C-5), justificando os anéis A e B. Essas correlações encontram-se apresentadas na Figura 33 abaixo (subestrutura A).

Figura 33-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC no anel A e B de Np2



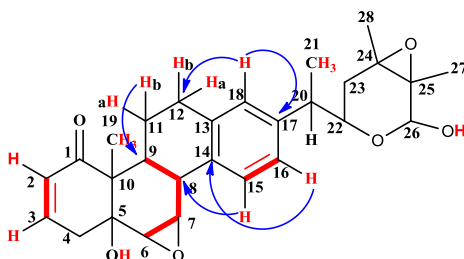
Os vitanolidos tipo A, isolados de espécies de *Nicandra*, *Physalis* e *Salpichroa* apresentam um anel de seis membros (δ -lactol) ligado ao carbono 17, que os caracteriza (CAO, *et al.*, 2013). A presença desse anel foi corroborada pelas correlações entre o sinal do hidrogênio acetálico em δ_{H} 4,98 (H-26) com o carbono em δ_{C} 69,7 (C-22) e 64,3 (C-24), dos hidrogênios da metila em δ_{H} 1,33 (CH_3 -27) com o sinal em δ_{C} 92,9 (C-26) e do hidrogênio em δ_{H} 2,74 (H-20) com o carbono metilênico em δ_{C} 35,6 (C-23), conforme a subestrutura B mostrada na Figura 34 abaixo.

Figura 34-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np2



Outras correlações importantes foram observadas entre o hidrogênio em δ_H 6,97 (H-18) com o carbono em δ_C 30,6 (C-12) e 143,1 (C-17), do hidrogênio em δ_H 7,00 (H-16) com o carbono em δ_C 138,1 (C-14), do hidrogênio em δ_H 7,35 (H-15) com o carbono em δ_C 40,2 (C-8) e do hidrogênio em δ_H 2,86 (H-11b) com o carbono em δ_C 33,2 (C-9). Permitindo definir a estrutura de Np2, conforme mostrado na Figura 35.

Figura 35-Correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY e RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np2



De acordo com os dados apresentados e com as pesquisas realizadas na literatura, pôde-se assumir que Np2 (Figura 36) se trata de um esteroide com esqueleto ergostano da classe vitanolido tipo A com esqueleto-base modificado (subgrupo II), contendo um anel D aromático, comumente isolado de plantas do gênero *Nicandra* (CHEN, *et al.*, 2011). Os dados de RMN de 1H e ^{13}C de Np2 estão de acordo com os dados descritos para nicandrenona (Nic-1) conforme descrito na Tabela 7 (p. 70). Este composto foi relatado por Bates e Eckert (1972) como possuidor de atividade repelente de insetos, composto isolado mais recentemente por Kun, Bo, Kai, (2012).

Figura 36-Fórmula estrutural de Np2, relatada como nicandrenona por (KUN; BO; KAI, 2012).

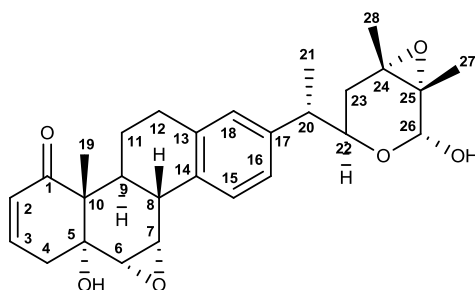


Tabela 7-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75 MHz) de Np2 comparados como os dados descritos na literatura para nicandrenona (KUN, BO, KAI, 2012).

Np2 (MeOD)				Nicandrenona (CDCl ₃)*	
No	δ_{C}	δ_{H}	3J	δ_{C}	δ_{H}
1	205,9	-	CH ₃ -19	202,6	-
2	129,3	5,79 (dd, $J=2,4$; 10,0, 1H)	-	128,5	5,83 (dd, $J= 10,1$; 2,4 Hz, 1H)
3	142,7	6,65 (m, 1H)	-	140,0	6,58 (ddd, $J= 10,1$; 5,0; 2,0 Hz, 1H)
4	38,35	2,86 (m, 1Ha) 2,52 (dd, $J=19,0$; 5,0; 1Hb)	H-2	36,5	2,69 (m, 1H) 2,55 (dd, $J= 18,9$; 5,0 Hz, 1H)
5	74,5	-	H-3	72,5	-
6	57,8	3,22 (d, $J=3,9$; 1H)	-	56,5	3,20 (d, $J= 3,9$ Hz, 1H)
7	56,0	4,00 (m, 1H)	-	55,2	3,98 (m, 1H)
8	40,2	3,08 (d, $J=11$; 1H)	H-15	38,2	3,02 (d, $J= 11,6$ Hz, 1H)
9	33,2	1,98 (m, 1H)	H-11a	31,3	1,88 (td, $J= 11,6$; 3,5 Hz, 1H)
10	54,9	-	H-2	51,3	-
11	25,7	2,86 (m, 1Ha) 1,82 (m, 1Hb)	-	24,0	2,82 (m, 1H) 1,51 (m, 1H)
12	30,6	1,53 (m, 1Ha) 2,86 (m, 1Hb)	H-18	29,0	2,92 (m, 1H) 2,79 (m, 1H)
13	137,2	-	-	136,6	-
14	138,1	-	H-16	134,9	-
15	126,7	7,35 (d, $J=7,9$; 1H)	-	123,7	7,31 (d, $J= 8,1$ Hz, 1H)
16	125,6	7,00 (d, $J=8,0$; 1H)	-	125,0	7,01 (m, 1H)
17	143,1	-	H-18	141,1	-
18	129,6	6,97 (s, 1H)	-	128,2	6,94 (s, 1H)
19	14,8	1,23 (s, 3H)	-	13,7	1,20 (s, 3H)
20	44,7	2,74 (q, 1H)	-	42,7	2,72 (m, 1H)
21	18,1	1,21 (s, 3H)	H-20	17,0	1,2
22	69,7	4,00 (m, 1H)	H-20, H-26	67,1	3,86 (m, 1H)
23	35,6	2,86 (m, 1Ha) 1,53 (m, 1Hb)	H-20	33,4	1,81 (dd, $J= 14,0$; 2,2 Hz, 1H) 1,56 (m, 1H)
24	64,3	-	-	64,1	-
25	64,0	-	-	63,1	-
26	92,9	4,98 (s, 1H)	CH ₃ -27	91,2	4,94 (s, 1H)
27	17,1	1,33 (s, 3H)	-	16,3	1,33 (s, 3H)
28	18,8	1,31 (s, 3H)	-	18,4	1,32 (s, 3H)

* Dados obtidos (500 MHz).

5.1.2 Determinação estrutural de Np1

O composto denominado Np1 (26,3 mg) foi isolado a partir da fração NpAcDCM-1 proveniente do extrato DCM, mediante a metodologia descrita no item 4.6.2, (p. 54). A fração acima foi submetida a fracionamento utilizando gel de dextrana Sephadex LH-20, resultando no isolamento de um sólido branco cristalino com $[\alpha]_D^{20} + 13,9^\circ$ ($c = 0,1$; CH_2Cl_2).

O espectro na região do IV de Np1 (Anexo 8, p. 127) exibiu bandas semelhantes às vistas no IV do composto Np2 (Anexo 1, p. 123) como: uma banda em 3442 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação O-H, uma banda característica de cetona (C=O) conjugada em 1675 cm^{-1} , duas bandas de deformação angular no plano da ligação O-H em 1429 e 1360 cm^{-1} , além de bandas em 1262 e 1080 cm^{-1} características de deformação axial simétrica no plano de anel epóxido (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2013).

O espectro de Massas de alta resolução EMAR-ESI (Anexo 9, p. 127) no modo positivo do composto Np1, permitiu observar um pico correspondente ao composto protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 339,1593 (calc. m/z : 339,1596; erro: 0,8), fornecendo assim a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_4$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual 10.

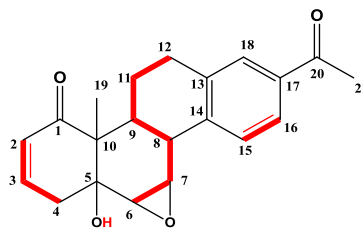
O espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] (Anexo 10, p. 128) apresentou 21 linhas espectrais, muitas das quais semelhantes àquelas observadas para Np2, sendo este, portanto, um vitanolido tipo A. Entre os sinais destaca-se um sinal para carbonila em δ_{C} 204,0, dois sinais para carbonos olefinicos em δ_{C} 129,2 e 141,5, três sinais para carbonos oxigenados em δ_{C} 73,8; 57,4 e 54,6, sendo os dois últimos pertencentes a um anel epóxido. As principais diferenças observadas em relação a Np2 foram a ausência dos sinais correspondentes aos carbonos característicos do anel heterocíclico de seis membros, e a presença de sinais para um grupo acetila (δ_{C} 198,0 e 26,9).

De acordo com o espectro DEPT 135° (Anexo 11, p. 129) foi possível definir o padrão de hidrogenação de cada um dos carbonos, o qual forneceu dois sinais para carbonos metílicos (δ_{C} 14,4 e 26,9), três sinais para carbono metilênicos (δ_{C} 24,7; 29,9 e 38,3) e nove sinais para carbonos metínicos (δ_{C} 32,3; 40,2; 54,6; 57,4; 126,0; 126,2; 129,26; 129,29 e 141,5) A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT, permitiu identificar sete sinais para carbonos não hidrogenados (δ_{C} 52,7; 73,8; 136,2; 138,5; 145,0; 198,0 e 204,0).

Como esperado, o espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np1 (Anexo 12, p. 129) também mostrou-se semelhante ao do composto Np2, onde foram observados três sinais para hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,96 (d, $J = 4,5$ Hz; H-16), 7,76 (s, H-18) e 7,74 (d, $J = 4,5$ Hz; H-15), dois sinais para hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,62 (m, H-3) e 6,07 (dd, $J = 2,0$ e $J = 10,1$ Hz; H-2) típicos de sistemas α,β -insaturados, além de sinais em δ_{H} 4,00 (t, $J = 3$ Hz, H-7) e 3,33 (d, $J = 3$ Hz, H-6) característicos de hidrogênios oximetínicos, bem como, um sinal intenso para hidrogênio metílico em δ_{H} 1,24 (s, H-19). As principais diferenças entre Np2 e Np1 foram a ausência dos sinais relativos aos hidrogênios metilênicos, e acetálicos do anel de seis membros e a presença de um sinal em δ_{H} 2,57 (s, CH_3 -21) para hidrogênios metílicos ligados a carbonila. A análise dos dados de RMN apresentados até então, sugere que Np1 se trata de um composto da classe dos vitanolidos tipo A com o esqueleto-base modificado contendo um anel D aromático, assim como Np2, no entanto, sem a presença da unidade δ -lactol ligada ao carbono C-17.

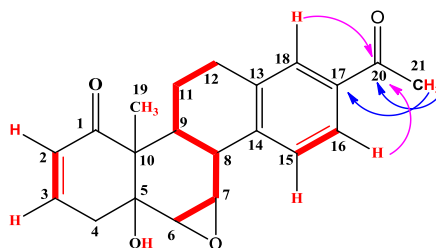
No espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (Anexo 13, p. 130) foram observados os acoplamentos escalares entre os sinais em δ_{H} 6,07 (H-2) com 6,62 (H-3), δ_{H} 6,62 (H-3) com 2,67 (H-4a), também do sinal em δ_{H} 3,33 (H-6) com 4,08 (H-7), δ_{H} 4,08 (H-7) com 3,08 (H-8), δ_{H} 3,08 (H-8) com 2,45 (H-9) e deste com 1,59 (11-b) e, este último com 2,74 (12-a). Além desses, foi possível observar os acoplamentos entre os hidrogênios em δ_{H} 7,96 (H-16) com 7,74 (H-15) de acordo com observado na Figura 37 a seguir.

Figura 37-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np1



As correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Anexo 14, p. 130) permitiram confirmar a presença de um grupo acetil ligado ao carbono C-17. Isto foi possível através dos acoplamentos heteronucleares entre os hidrogênios da metila em δ_{H} 2,57 (CH_3 -21) com os carbonos em δ_{C} 198,0 (C-20) e 136,2 (C-17), e dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,96 (H-16) e 7,76 (H-18) com a carbonila em δ_{C} 198,0 (C-20), cujas correlações estão apresentadas na Figura 38 (p 73).

Figura 38-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC no anel A e B de Np1



De acordo com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 8, p. 74), pôde-se estabelecer que Np1 (Figura 39) se trata de um vitanolido tipo A, do subgrupo II, contendo um anel D aromático na estrutura, com um grupo acetil na posição C-17, levando a considerar a perda total do heterociclo anteriormente observado no composto denominado como nicandrenona (Np2). Segundo Begley *et al.*, (1976_a) este composto foi isolado e reportado como Nic-10. A comparação dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H do composto Np1 foi realizada baseada nos dados relatados para a nicandrenona (Np2) devido à ausência dos artigos originais além da falta de informação resente relatada para o composto mencionado.

Figura 39-Fórmula estrutural de Np1, (Nic-10) (BEGLEY, *et al.*, 1976a)

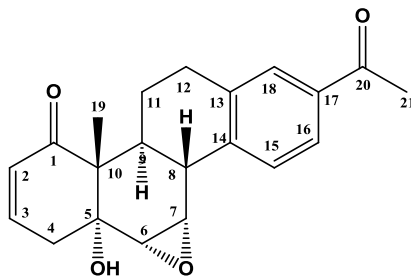


Tabela 8-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75 MHz) de Np1 comparados com os dados descritos para nicandrenona (KUN, BO, KAI, 2012)

Np1 (Piridina- <i>ds</i>)				*Nicandrenona (MeOD)	
No	δ_{C}	δ_{H}	3J	δ_{C}	δ_{H}
1	204,0	-	CH ₃ -19,	202,6	-
2	129,2	6,07 (dd $J=2,0; 10,0$, 1H)	H-4a	128,5	5,83 (dd, $J= 10,1; 2,4$ Hz, 1H)
3	141,5	6,62 (m, 1H)	-	140,0	6,58 (ddd, $J= 10,1; 5,0; 2,0$ Hz, 1H)
4	38,3	2,67 (dd, $J= 4,7; 18$, 1Ha) 2,74 (m, 1Hb)	-	36,5	2,69 (m, 1H) 2,55 (dd, $J= 18,9; 5,0$ Hz, 1H)
5	73,8	-	-	72,5	-
6	57,4	3,33 (d, $J=2,1$ Hz, 1H)	H-8	56,5	3,20 (d, $J= 3,9$ Hz, 1H)
7	54,6	4,08 (s, 1H)	-	55,2	3,98 (m, 1H)
8	40,2	3,08 (m, 2H)	H-15	38,2	3,02 (d, $J= 11,6$ Hz, 1H)
9	32,3	2,45 (td, $J= 3,7; 11,0; 11,0$, 1H)	-	31,3	1,88 (td, $J= 11,6; 3,5$ Hz, 1H)
10	52,7	-	H-6	51,3	-
11	24,7	1,59 (q, 1H) 3,08 (m, 2H)	-	24,0	2,82 (m, 1H) 1,51 (m, 1H)
12	30,0	2,74 (m, 1H) 2,79 (m, 1H)	H-18	29,0	2,92 (m, 1H) 2,79 (m, 1H)
13	145,0	-	H-15	136,6	-
14	138,5	-	H-18	134,9	-
15	126,2	7,74 (m, 2H)	-	123,7	7,31 (d, $J= 8,1$ Hz, 1H)
16	126,0	7,96 (d, $J= 4,5; 1H$)	-	125,0	7,01 (m, 1H)
17	136,2	-	-	141,1	-
18	129,2	7,76 (s, 1H)	-	128,2	6,94 (s, 1H)
19	14,4	1,24 (s, 3H)	-	13,7	1,20 (s, 3H)
20	198,0	-	H-18, H-16	42,7	2,72 (m, 1H)
21	26,9	2,57 (s, 3H)	-	17,0	1,2
22	-	-	-	67,1	3,86 (m, 1H)
23	-	-	-	33,4	1,81 (dd, $J= 14,0; 2,2$ Hz, 1H) 1,56 (m, 1H)
24	-	-	-	64,1	-
25	-	-	-	63,1	-
26	-	-	-	91,2	4,94 (s, 1H)
27	-	-	-	16,3	1,33 (s, 3H)
28	-	-	-	18,4	1,32 (s, 3H)

*Dados obtidos em MeOD em 300 MHz.

5.1.3 Determinação estrutural de Np3

O composto denominado Np3 foi obtido a partir do fracionamento do extrato DCM, onde foi possível a recristalização e purificação da fração denominada NpAcDCM- (3), de acordo com a metodologia utilizada no item 4.6.4 (p. 55). Este composto apresentou-se como um sólido cristalino incoloro com $[\alpha]_D^{20} + 46,4^\circ$ ($c = 0,1$; CH_2Cl_2).

O espectro na região do IV (Anexo 15, p. 131) exibiu uma banda em 3523 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação O-H, duas bandas características de deformação axial da ligação (C=O) de cetona em 1698 e 1680 cm^{-1} , duas bandas de deformação angular no plano da ligação O-H em 1423 e 1392 cm^{-1} , além de bandas em 1262 e 1080 cm^{-1} características de deformação axial simétrica no plano de anel epóxido (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2013).

A análises do composto Np3 por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR-ESI) (Anexo 16, p. 131), utilizando como fonte de ionização *Electro-spray*, no modo positivo forneceu um pico correspondente ao composto protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 487,2712 (calc. m/z : 487,2696; erro: 3.3) levando à fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_7$, a qual apresenta um IDH igual a 10.

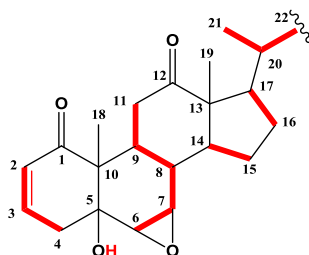
O espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] (Anexo 17, p. 132) mostrou 28 linhas espectrais, entre as quais se destacam sinais em δ_{C} 213,3 e 203,2 para carbonilas, um sinal em δ_{C} 93,1 para carbono acetálico, sinais para carbonos oxigenados em δ_{C} 74,3; 66,6; 63,9 e 63,1 sinais em δ_{C} 56,6 e 56,0 para carbonos característicos de anel epóxido, além de sinais para carbonos metílicos em δ_{C} 11,8; 13,9; 15,1; 17,7 e 19,3.

O espectro DEPT 135° (Anexo 18, p.132) permitiu observar o padrão de hidrogenação dos carbonos, onde foram observados cinco sinais para carbonos metílicos (δ_{C} 11,8; 13,9; 15,2; 17,6 e 19,2), cinco sinais para carbono metilênicos (δ_{C} 24,0; 27,4; 31,0; 38,1 e 39,4) e onze sinais para carbonos metínicos (δ_{C} 36,4; 38,7; 40,6; 43,9; 53,9; 56,0; 56,6; 66,6; 93,1; 129,3 e 141,4) e através da comparação com o espectro de RMN 1D- ^{13}C -BB, foi possível identificar a presença de sete sinais para carbonos não hidrogenados (δ_{C} 52,6; 58,2; 63,1; 63,9; 74,3; 203,2 e 213,3).

O espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] (Anexo 19, p. 133) mostrou sinais para hidrogênios olefinicos em δ_{H} 6,59 (m, H-3) e 6,00 (d, $J= 10,1$ Hz; H-2) típicos do sistema α,β -insaturado, um sinal para hidrogênio acetálico em δ_{H} 5,50 (s, H-26) e um em δ_{H} 4,30 (q, $J = 7,4$ Hz, H-22) para hidrogênio oximetínico, típico do anel de seis membros (δ -lactol) de vitanolidos. Foram observados ainda sinais para hidrogênios oximetínicos característicos de anel epóxido em δ_{H} 3,30 (s, H-7) e 3,16 (d, $J= 3,3$ Hz, H-6) e cinco sinais para hidrogênios metílicos, entre os quais os sinais em δ_{H} 1,28 (s, CH_3 -18), 1,14 (d, $J= 6,7$ Hz; CH_3 -21) e 0,98 (s, CH_3 -19) por estarem presentes no esqueleto-base dos vitanolidos.

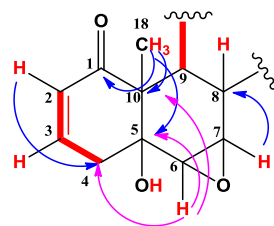
O espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (Anexo 20, p. 134) apresentou correlações entre os sinais em δ_{H} 6,59 (H-3) com 6,00 (H-2) e 2,56 (H-4_{ab}), do sinal em δ_{H} 3,96 (H-9) com 2,57 (H-11_b), e do sinal em δ_{H} 2,05 (H-14) com 1,60 (2H-15), do sinal em δ_{H} 2,20 (2H-16) com 1,50 (H-17), bem como do sinal em δ_{H} 1,14 (CH_3 -21) com 1,70 (H-20), e deste com 4,30 (H-22). A Figura 40 mostra as correlações relatadas anteriormente.

Figura 40-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np3



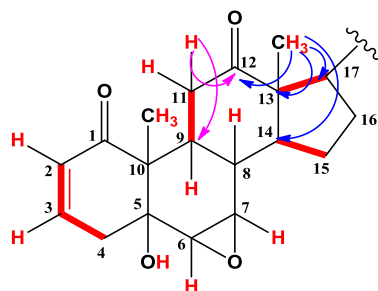
O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Anexo 21, p. 134) mostrou as correlações entre o sinal em δ_{H} 1,28 (CH_3 -18) com os carbonos em δ_{C} 203,2 (C-1), 74,3 (C-5) e 52,6 (C-10), do hidrogênio em δ_{H} 6,00 (H-2) com o carbono em δ_{C} 38,1 (C-4), e dos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,56 (2H-4) com o carbono em δ_{C} 74,3 (C-5). As correlações entre o hidrogênio oximetínico em δ_{H} 3,16 (H-6) com os carbonos C-4, C-5 e C-10, e do hidrogênio em δ_{H} 3,30 (H-7) com o carbono em δ_{C} 36,4 (C-8) corroboram o esqueleto-base para vitanolidos tipo A, de acordo com o descrito por (CHEN *et al*, 2011) apresentando um sistema A/B 5α -hidroxy-2-en-1-one. A Figura 41 (p. 77) a seguir exemplifica as correlações anteriormente citadas.

Figura 41-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC no anel A e B de Np3



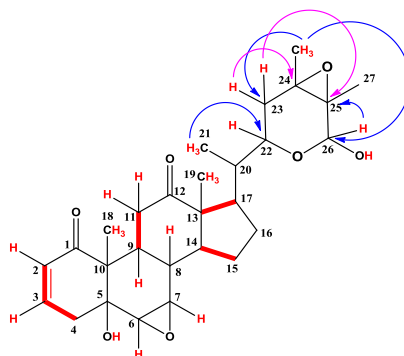
Do mesmo modo, foi possível observar a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 2,68 (H-11a) com o carbono em δ_{C} 38,7 (C-9) e com a carbonila não conjugada em δ_{C} 213,3 (C-12), assim como dos hidrogênios da metila em δ_{H} 0,98 (CH₃-19) com os carbonos em δ_{C} 213,3 (C-12), 58,2 (C-13), 53,9 (C-17) e 43,9 (C-14). A Figura 42 apresentada a seguir mostra as correlações citadas.

Figura 42-Algumas correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC no anel C e D de Np3



O anel tipo δ -lactol foi confirmado através das correlações observadas entre os hidrogênios da metila em δ_{H} 1,14 (CH₃-21) com o carbono em 66,6 (C-22), entre o hidrogênio acetálico em δ_{H} 5,50 (H-26) com o carbono em δ_{C} 63,9 (C-25), também dos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,83 (2H-23) com os carbonos em δ_{C} 66,6 (C-22), 63,9 (C-25) e 63,1 (C-24) e dos hidrogênios da metila em δ_{H} 1,48 (CH₃-28) com os carbonos em δ_{C} 93,1 (C-26) e 31,0 (C-23). As correlações citadas são apresentadas na Figura 43, (p. 78).

Figura 43-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np3



De acordo com pesquisas realizadas na literatura e particularmente segundo CHEN *et al.*, (2011), Np3 se trata de um composto da classe vitanolido tipo A pertencente ao subgrupo I, amplamente conhecido como Nic-7 (Figura 44) (BEGLEY *et al.*, 1976_b; KUN, BO, KAI, 2012), conforme mostram os dados de RMN de ^1H e ^{13}C descritos na Tabela 9 (p. 79).

Figura 44-Fórmula estrutural de Nic-7 (KUN, BO, KAI, 2012)

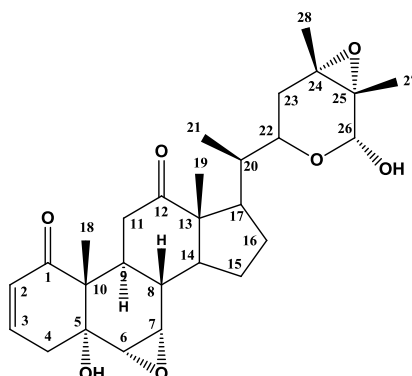


Tabela 9-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75 MHz) de Np3 comparados com os dados descritos na literatura para Nic-7 (KUN; BO; KAI, 2012).

Np3 (Pyr)				*Nic-7 (CDCl ₃)	
No	δ_C	δ_H	3J	δ_C	δ_H
1	203,2	-	H-18	201,4	-
2	129,3	6,00 (d, $J=9,9$ Hz, 1H)	H-4	128,7	5,86
3	141,4	6,59 (m, 1H)	-	139,8	6,62 (dd, $J= 11,5, 4,0$ Hz)
4	38,12	2,56 (dd, $J=5,0; 14,9$;Hz, 2H)	-	36,5	2,70 (d, $J=16$ Hz) 2,58 (dd, $J= 16,0, 4,0$ Hz)
5	74,3	-	-	73,1	-
6	56,6	3,16 (d, $J=3,3$ Hz, 1H)	-	56,0	3,09 (d, $J=4,0$ Hz 1H)
7	56,0	3,30 (s, 1H)	-	56,9	3,40 (m,1H)
8	36,4	2,20 (m, 1H)	-	35,4	2,20 (d, $J=13,0$ Hz, 1H)
9	38,7	3,96 (dd, $J=2,4; 13,0$ Hz,1H)	H-6	37,4	1,98 (m, 1H)
10	52,6	-	H-6	52,3	-
11	39,4	2,75 (d, $J=13,1$ Hz; 1Ha) 2,68 (d, $J=8,7$ Hz; 1Ha)	-	38,2	3,48 (dd, $J=15,1, 4,0,1$ H) 2,52 (d, $J=15,0$ Hz, 1H)
12	213,3	-	-	212,4	-
13	58,2	-	-	57,6	-
14	43,9	2,05 (q, $J=10,9$ Hz; 1H)	H-19	52,7	1,63 (m, 1H)
15	24,02	1,60 (m, 2H)	-	23,5	1,95 (m, 1H) 1,60 (m, 1H)
16	27,4	1,45 (m, 2H)	-	26,8	1,81 (m,1H) 1,47 (m, 1H)
17	53,9	1,50 (m, 1H)	H-19	42,9	2,03 (m, 1H)
18	15,1	1,28 (s,3H)	-	14,6	1,24 (s, 3H)
19	11,8	0,98 (d, $J= 7$ Hz, 3H)	-	11,4	1,08 (s, 3H)
20	40,6	1,70 (m, 1H)	-	39,6	1,60 (m, 1H)
21	13,9	1,14 (s, 3H)	-	12,8	0,87 (d, $J= 8$ Hz, 3H)
22	66,60	4,30 (m, 1H)	CH ₃ -21	65,0	3,74 (s,1H)
23	31,0	1,83 (d, $J= 7$ Hz; 2H)	-	29,4	1,91 (m , 1H) 1,77 (m,1H)
24	63,1	-	-	65,4	-
25	63,9	-	H-23	63,9	-
26	93,1	5,50 (s, 1H)	CH ₃ -28	91,7	5,00 (s 1H)
27	19,2	1,38 (s,3H)	-	16,5	1,43 (s, 3H)
28	17,6	1,48 (s, 3H)	-	18,9	1,43 (s, 3H)

^a Dados obtidos a 100 MHz.

5.1.4 Determinação estrutural de Np4

O composto denominado Np4, um sólido branco cristalino com $[\alpha]_D^{20} + 23,9^\circ$ ($c=0,1$; CH_2Cl_2) foi obtido a partir do líquido-mãe da fração denominada NpAcDCM-(3) proveniente do extrato DCM. Conforme metodologia detalhada no item 4.6.4 (p. 55).

O espectro na região do infravermelho de Np4 (Anexo 22, p. 135) exibiu uma banda característica em 3457 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação O-H, uma banda característica para carbonila conjugada (C=O) em 1692 cm^{-1} , duas bandas confirmatórias de deformação angular no plano da ligação O-H em 1472 e 1387 cm^{-1} , além de bandas em 1259 e 1070 cm^{-1} características de deformação axial simétrica no plano de anel epóxido, e uma banda intensa em 1034 cm^{-1} característica de deformação axial da ligação (C-O) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2013).

Uma análise realizada através de espectrometria de massas de alta resolução EMAR-ESI para o composto Np4 (Anexo 23, p. 135), permitiu observar um pico correspondente ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 511,2664 (calc. m/z : 511,2672; erro: 0,8), fornecendo assim a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{-Na}^+$, e um IDH igual a 9.

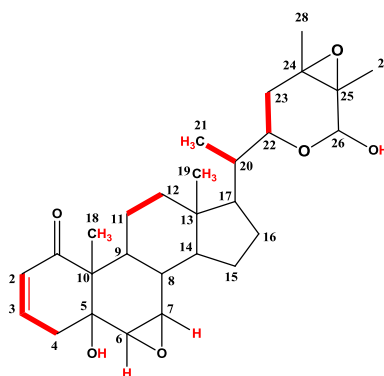
O espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] (Anexo 24, p. 136) exibiu 28 linhas espectrais, e uma análise comparativa entre os espectros de Np4 com Np3 (Anexo 17, p. 132) permitiu verificar semelhanças entre ambos. Foi observado um sinal para carbonila em δ_C em 204,2, dois sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_C 129,6 e 140,9 característico do sistema α,β -insaturado, um sinal em δ_C 92,8 para carbono acetálico, sinais para carbonos oxigenados em δ_C 63,5 e 63,0 típicos da unidade δ -lactol, sinais para carbonos oximetínicos em δ_C 56,3 e 56,8 para epóxido, além de sinais para carbonos metilênicos em δ_C 24,0 e 22,6 correspondentes ao anel D não modificado. As principais diferenças entre Np4 e Np3 foram a ausência do sinal para carbonila não conjugada em δ_C 213,3 e a presença de um sinal adicional para carbono metilênico e para um carbono quaternário em δ_C 85,4 em Np4.

A comparação do DEPT 135° (Anexo 25, p. 137) e o RMN 1D ^{13}C -BB possibilitou determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono, como: cinco sinais para carbonos metílicos (δ_C 14,5; 15,2; 16,4; 17,6 e 19,2), seis sinais para carbono metilênicos (δ_C 22,6; 24,0; 33,5; 34,6; 35,1 e 38,2) e dez sinais para carbonos metínicos (δ_C 36,2; 37,6; 42,1; 47,3; 56,3; 56,8; 67,8; 92,8; 129,6 e 140,9) além de sete sinais para carbonos não hidrogenados (δ_C 49,6; 52,1; 63,0; 63,5; 74,4; 85,4 e 204,2).

O espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np4 (Anexo 26, p. 137) mostrou algumas semelhanças com o do composto Np3, entre as quais podem-se destacar dois sinais para hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,57 (m, H-3) e 6,02 (dd, $J=2; 10$ Hz, H-2) característicos do sistema α,β -insaturado, um sinal em δ_{H} 5,46 (m, H-26) característico de hidrogênio acetálico, três hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 4,68 (m, H-22), 3,30 (s, H-7) e 3,12 (d, $J=3,7$ Hz; H-6), sendo os dois últimos correspondentes aos hidrogênios de um sistema $6\alpha,7\alpha$ epóxido, além de hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,19 (s, CH_3 -19), 1,09 (s, CH_3 -18) e 0,98 (d, $J=7$ Hz; CH_3 -21)

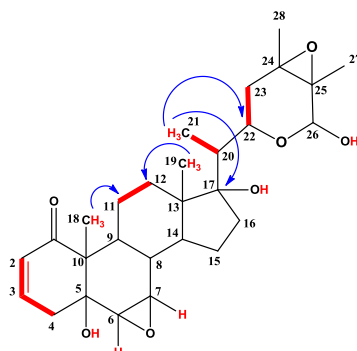
No espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (Anexo 27, p. 138) foi possível observar as correlações entre os sinais em δ_{H} 6,57 (H-3), 6,02 (H-2) e 2,53 (H-4a), dos sinais da metila em δ_{H} 0,98 (CH_3 -21) com 2,07 (H-20), do hidrogênio em δ_{H} 4,68 (H-22) com os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,87 (H-23a) e dos hidrogênios em δ_{H} 2,32 (H-11a) com os hidrogênios em δ_{H} 1,74 (H-12) permitindo corroborar a presença de um sistema saturado nestas posições, as correlações mencionadas são apresentadas na Figura 45 a seguir para melhor ilustrar.

Figura 45-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np4



O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Anexo 28, p. 138) exibiu correlações entre os hidrogênios da metila (CH_3 -18) em δ_{H} 1,09 com o carbono metilênico em δ_{C} 33,5 (C-11), da metila (CH_3 -21) em δ_{H} 0,95 com o carbono em δ_{C} 85,4 (C-17) e 67,8 (C-22) e da metila (CH_3 -19) em δ_{H} 1,19 com os carbonos em δ_{C} 35,1 (C-12), justificando, desta maneira, a perda de uma carbonila na posição C-12 e a presença de um carbono quaternário oxigenado na posição C-17. A Figura 46 (p. 82) apresenta as correlações anteriormente descritas.

Figura 46-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np4



Com estas informações foi possível assegurar que Np4 se trata de um composto vitanolido tipo A (subgrupo I) contendo uma unidade δ -lactol e um sistema A/B 5α -hidroxi-2-en-1-ona, CHEN *et al.*, (2011). Comparações com os dados da literatura (Tabela 10, p. 83) permitiram estabelecer a estrutura de Np4 como sendo o composto denominado Nic-2 Figura 47, anteriormente relatado por Bates e Morehead (1974).

Figura 47-Fórmula estrutural de Np4 (Nic-2) (BATES; MOREHEAD, 1974)

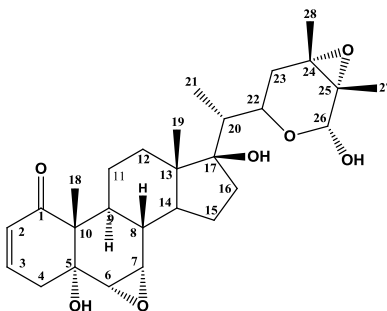


Tabela 10-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75MHz) de Np4 comparados com os dados descritos para Nic-2 (BATES; MOREHEAD, 1974) (GOTTLIEB; KIRSON, 1981)

Np4 (Pyr)				*Nic-2 (CDCl ₃)	
No	δ_C	δ_H	3J	δ_C	δ_H
1	204,2	-	CH ₃ -18	203,5	-
2	129,6	6,02 (dd, $J=10,0$; 2,0 Hz, 1H)	-	128,9	5,8
3	140,9	6,57 (m, 1H)	-	140,3	6,6
4	38,2	2,53 (dd, $J=1,8$; 10,0 Hz, 1H)	H-2	36,9	2,6
5	74,4	-	-	73,7	-
6	56,8	3,12 (d, $J=3,7$ Hz, 1H)	-	56,3	3,3
7	56,3	3,30 (s, 1H)	-	57,0	3,0
8	37,6	2,86 (m, 1H)	-	36,6	-
9	36,2	2,19 (m, 1H)	-	35,4	-
10	52,1	-	-	51,3	-
11	33,5	1,74 (m, 2H)	-	21,9	-
12	35,1	2,32 (m, 2H)	CH ₃ -19	32,1	-
13	49,6	-	-	48,9	-
14	47,3	1,74 (m, 1H)	-	46,3	-
15	22,6	3,17 (m, 2H)	-	23,3	-
16	24,0	1,74 (m, 2H)	-	35,0	-
17	85,4	-	CH ₃ -21	85,6	-
18	16,4	1,09 (s, 3H)	H-11a	15,0	-
19	15,2	1,19 (s, 3H)	-	14,8	-
20	42,1	2,07 (m, 1H)	-	41,2	1,9
21	14,5	0,98 (d, $J=7,0$ Hz, 3H)	-	15,7	1,0
22	67,8	4,68 (m, 1H)	CH ₃ -21	67,5	3,8
23	34,6	1,87 (m, 2H)	CH ₃ -28	33,1	-
24	63,5	-	-	64,0	-
25	63,0	-	-	63,3	-
26	92,8	5,46 (m, 1H)	-	91,8	5,0
27	17,6	1,49 (s, 3H)	-	16,6	1,4
28	19,2	1,32 (s, 3H)	-	18,6	1,4

*Dados obtidos a 100 MHz.

5.1.5 Determinação estrutural de Np5

O composto denominado Np5 foi isolado após sucessivos fracionamentos utilizando gel de dextrana Sephadex LH-20 e cartucho C18 de fase reversa, conforme o procedimento descrito no item 4.6.5 (p. 56). Np5 apresentou-se como um sólido branco de aspecto cristalino com rotação ótica de $[\alpha]_D^{20} + 23,9^\circ$ ($c = 0,1$; CH_2Cl_2).

O espectro de infravermelho de Np5 (Anexo 29, p. 139) exibiu bandas semelhantes às observadas no IV do composto Np4 (Anexo 22, p. 135), podendo-se distinguir bandas tais como 3132 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação O-H, uma banda intensa para carbonila de cetona (C=O) conjugada em 1681 cm^{-1} , além de bandas em 1264 e 1070 cm^{-1} características de deformação axial simétrica no plano do anel epóxido além de uma banda intensa em 1023 cm^{-1} característica de deformação axial da ligação (C-O) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2013).

O espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) (Anexo 30, p. 139), mostrou um pico correspondente ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 509,2542 (calc. m/z : 509,2539; erro: 0,6) permitindo determinar a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7$, a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 10.

O espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] (Anexo 31, p. 140) de Np5 exibiu 28 linhas espectrais, muitas das quais apresentaram deslocamentos químicos semelhantes aos do composto Np4 (Anexo 24, p. 136). Como por exemplo o sinal em δ_{C} 204,1, para carbonila não conjugada, sinais em δ_{C} 140,8 e 129,6 para carbonos olefinicos, um sinal em δ_{C} 92,9 correspondente a um carbono acetálico típico de um sistema δ -lactol, também foram observados sinais para carbonos oxigenados em δ_{C} 74,3; 63,8 e 62,9, além de dois sinais para carbonos oximetínicos característicos do anel epóxido em δ_{C} 57,3 e 56,7. As principais diferenças observadas entre Np5 e Np4 foram a presença de dois sinais em δ_{C} 156,8 e 130,5, indicando uma insaturação adicional, além de um sinal em δ_{C} 77,0 e mais um em δ_{C} 62,0.

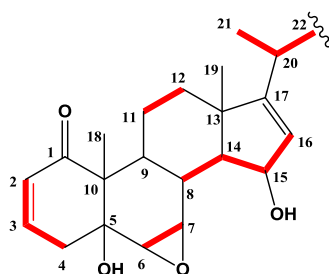
O espectro J-mod (Anexo 32, p. 140) possibilitou definir o padrão de hidrogenação dos carbonos, como cinco sinais para carbonos metílicos (δ_{C} 15,4; 17,2; 16,6; 19,1 e 19,4), quatro sinais para carbonos metilênicos (δ_{C} 21,9; 34,5; 35,5 e 38,0) e doze sinais para carbonos metínicos (δ_{C} 35,2; 36,4; 36,9; 56,7; 57,3; 62,0; 67,5; 77,0; 92,9; 129,6; 130,6 e 140,8). A comparação com o espectro de RMN 1D, ^{13}C -BB permitiu

identificar a presença de sete sinais para carbonos não hidrogenados em (δ_C 47,7; 52,1; 62,9; 63,8; 74,3; 156,8 e 204,1).

Como esperado o espectro de RMN de 1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np5 (Anexo 33, p. 141), apresentou semelhanças com o de Np4, dentre elas, a presença de dois sinais para hidrogênios olefinicos em δ_H 6,55 (m, H-3) e 5,96 (d, $J= 10$ Hz, H-2), característicos de sistemas α,β -insaturados, um sinal em δ_H 5,45 (s, H-26) compatível para um hidrogênio acetálico, três sinais para hidrogênios oximetínicos em δ_H 4,36 (m, H-22), 3,88 (d, $J = 3,2$ Hz, H-6) e 3,11 (m, H-7), além de hidrogênios metílicos em δ_H 1,23 (s, CH₃-18), 1,02 (s, CH₃-19) e 1,08 (d, $J= 7$ Hz, CH₃-21).

No espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY (Anexo 34, p. 141) foi possível observar as correlações entre os sinais em δ_H 6,55 (H-3) com 5,96 (H-2) e 2,48 (H-4), entre o hidrogênio em δ_H 3,88 (H-6) com 3,11 (H-7), entre os sinais em δ_H 2,16 (H-8) com 1,75 (H-14), deste com 4,99 (H-15), de H-15 com δ_H 5,97 (H-16), dos hidrogênios em δ_H 3,11 (H-11) com 1,62 (H-12), e dos hidrogênios metílicos em δ_H 1,08 (CH₃-21) com 2,32 (H-20) e deste com o hidrogênio em δ_H 4,36 (H-22). Os acoplamentos chave encontram-se representados na Figura 48 abaixo.

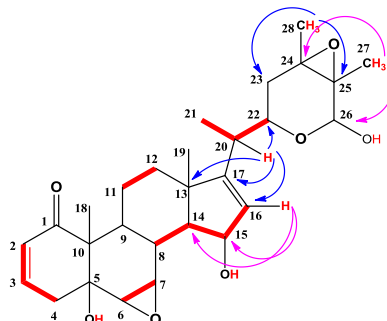
Figura 48-Principais acoplamentos observados no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY de Np5



No espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC (Anexo 35, p.142) foram observadas as correlações entre o hidrogênio em δ_H 2,32 (H-20) com os carbonos em δ_C 156,8 (C-17), 130,6 (C-16), 67,5 (C-22), e 47,7 (C-13), permitindo estabelecer a presença de uma dupla ligação adicional entre C16-C17. A presença de um grupo hidroxila em C-15 foi corroborada pela correlação do hidrogênio em δ_H 5,97 (H-16) com o carbono em δ_C 77,0 (C-15), e, este hidrogênio apresentou ainda correlações com os carbonos em δ_C 62,0 (C-14) e 47,7 (C-13). O anel de seis membros foi confirmado pelas correlações dos hidrogênios da metila em δ_H 1,34 (CH₃-27) com os carbonos em δ_C 62,8 (C-24) e 92,9 (C-26), e dos hidrogênios da metila em δ_H 1,47 (CH₃-28) com os carbonos em δ_C 62,9

(C-25) e 34,5 (C-23). A Figura 49 a seguir mostra as correlações anteriormente apresentadas.

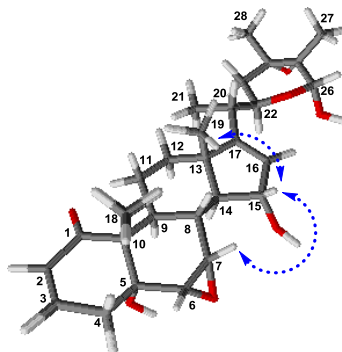
Figura 49-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np5



De acordo com as informações apresentadas, foi possível estabelecer que Np5, se trata de um vitanolido tipo A subgrupo I, contendo um anel tipo δ -lactol ligado ao carbono C-17 e um sistema A/B 5α -hidroxi-2-en-1-ona (CHEN *et al.*, 2011), contendo uma dupla ligação entre as posições C16-C17 e um grupo hidroxila adicional em C-15. Os dados de RMN discutidos foram compatíveis com duas possíveis propostas estruturais, anteriormente descritas por (SHINGU, YAHARA, NOHARA 1994) como as nicafisalinas A e B, onde a diferença encontra-se na orientação da hidroxila em C-15.

Para definir a estrutura de Np5 foi realizado o experimento de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY (Anexo 36, p. 142) a fim de definir a estereoquímica relativa do composto. Foi possível observar os acoplamentos entre os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,02 (CH₃-19) com o hidrogênio em δ_{H} 4,99 (H-15), o que permitiu inferir que estes encontram-se em posição β , e, sendo assim, a hidroxila encontra-se em posição α . Também foi observado o acoplamento do hidrogênio H-15 com o hidrogênio em δ_{H} 3,88 em posição β , o que confirma o anel $6\alpha,7\alpha$ -epóxido. Os acoplamentos dipolares apresentados no espectro NOESY estão representados Figura 50 (p. 87)

Figura 50-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY - Fórmula estrutural da nicafisalina B em 3D utilizando ChemSketch



A análise dos dados apresentados justifica a estrutura do composto *nicafisalina B* (SHINGU, YAHARA, NOHARA, 1994), o qual tem sua estrutura demonstrada na Figura 51 a seguir, e cujos dados de RMN descritos na Tabela 11 (p. 88).

Figura 51-Fórmula estrutural de Np5 (nicafisalina B) (SHINGU, YAHARA, NOHARA, 1994)

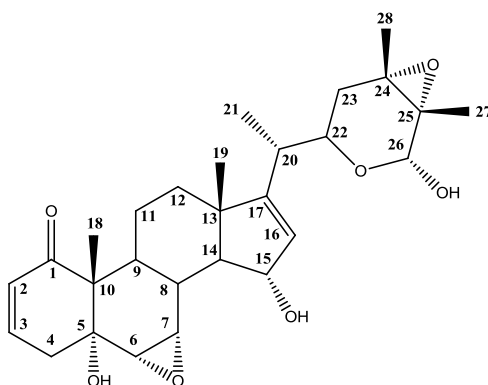


Tabela 11-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz e 75MHz) de Np5 comparados com os dados descritos para nicafisalina B (SHINGU, YAHARA, NOHARA, 1994)

Np5 (Pyr)				*nicafisalina B (CDCl_3)	
No	δ_C	δ_H	3J	δ_C	δ_H
1	204,1	-	CH_3 -18	203,4	-
2	129,6	5,96 (m, 1H)	H-4a	128,9	5,81 (dd, $J= 11,0, 2,4$ Hz, 1H)
3	140,8	6,55 (m, 1H)	-	139,9	6,62 (ddd, $J= 11,0, 5,1, 2,4$ Hz, 1H)
4	38,0	2,48 (dd, $J= 19,0, 4,8$ Hz, 1H) 2,63 (m, 1H)	-	36,4	2,74 (d, $J= 19,0$ Hz 1H) 2,51 (dd, $J= 19,0, 5,1$ Hz, 1H)
5	74,3	-	H-11, CH_3 -18	73,1	-
6	56,7	3,88 (d, $J= 3,2$ Hz, 1H)	-	55,8	3,06 (d, $J= 3,7$ Hz, 1H)
7	57,3	3,11 (m, 1H)	-	56,4	3,63 (m, 1H)
8	36,9	2,16 (m,1)	-	33,5	-
9	36,4	2,16 (m,1)	-	35,4	-
10	52,1	-	H-11	50,8	-
11	21,9	3,11 (m, 2H)	-	20,9	-
12	35,5	1,62 (m, 2H)	-	34,4	-
13	47,7	-	H-16, H- 20	46,7	-
14	62,0	1,75	-	60,1	-
15	77,0	4,99 (m, 1H)	-	75,8	4,62 (d, $J= 9,5$ Hz, 1H)
16	130,6	5,97 (m, 1H)	H-20	127,7	5,47 (m, 1H)
17	156,8	-	-	156,5	-
18	15,4	1,23 (s, 3H)	-	18,3	0,91 (s, 3H)
19	19,11	1,02 (s, 3H)	-	14,4	1,25 (s, 3H)
20	35,2	2,32 (m, 1H)	-	35,9	-
21	17,2	1,08 (d, 6,8 Hz)	-	16,2	1,04 (d, $J= 7,3$ Hz, 3H)
22	67,5	4,36 (m, 1H)	-	66,3	3,87 (m, 1H)
23	34,5	1,94 (m,2H)	CH_3 -27	33,6	-
24	62,8	-	-	62,9	-
25	62,9	-	CH_3 -28	62,8	-
26	92,9	5,45 (s, 1H)	-	91,9	5,02 (s, 1H)
27	19,4	1,34 (s, 3H)	-	16,0	1,40 (s, 3H)
28	17,6	1,47 (s, 3H)	-	17,9	1,41 (s, 3H)

*Dados obtidos a 400 MHz.

5.1.6 Determinação estrutural de Np6

O composto Np6 (2,9 mg) foi obtido de acordo com o procedimento descrito no item 4.6.6 (p. 57) como um sólido branco amorfo de grau de pureza satisfatório, apresentado rotação ótica de $[\alpha]_D^{20} + 37,0^\circ$ ($c = 0,1$; MeOH).

O espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) (Anexo 37, p. 143), mostrou um pico correspondente ao composto protonado $[M+H]^+$ em m/z 485,2527 (calc. m/z : 485,2539; erro:-2,5) permitindo determinar a fórmula molecular $C_{28}H_{37}O_7$, a com (IDH) igual a 10.

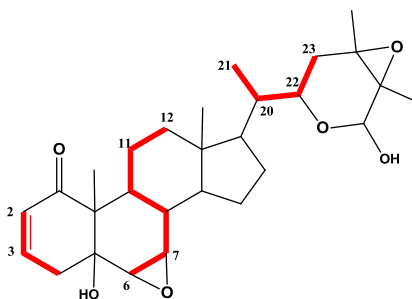
O espectro de RMN de ^{13}C -BB de Np6 [Piridina- d_5 , 125 MHz] (Anexo 38, p. 143) permitiu observar 28 sinais espectrais, entre eles, sinais em δ_C 203,7 e 207,2 para carbonos de carbonila, além de um sinal em δ_C 188,8 e 130,4 para uma dupla ligação. Foram observados sinais característicos de um sistema α,β -conjugado em δ_C 141,4 e 129,0, um sinal em δ_C 92,8 para carbono acetálico, sinais em δ_C 74,3; 63,8 e 62,5 para carbonos não hidrogenados sp^3 oxigenados, além de sinais em δ_C 57,5 e 55,3 para carbonos típicos de um anel epóxido.

O espectro J-mod de Np6 (Anexo 39, p. 144) permitiu deduzir o padrão de hidrogenação dos carbonos, como: cinco sinais para carbonos metílicos (δ_C 14,5; 17,5; 17,7; 18,9 e 25,9), quatro sinais para carbonos metilênicos (δ_C 22,7; 33,3; 35,4 e 38,9) e onze sinais para carbonos metínicos em (δ_C 27,2; 35,1; 37,3; 55,3; 56,2; 57,5; 69,1; 92,8; 129,0; 130,4 e 141,4). A comparação com o espectro de RMN 1D, ^{13}C -BB permitiu deduzir a existência de oito sinais para carbonos não hidrogenados em (δ_C 48,1; 54,5; 62,5; 63,8; 74,3; 188,8; 203,7 e 207,2).

O espectro de RMN de 1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np6 (Anexo 40, p. 144), apresentou sinais para hidrogênios olefinicos em δ_H 6,55 (ddd, $J = 12,4$; 4,8; 2,6 Hz, H-3) e 6,02 (dd, $J = 12,4$; 2,6 Hz, H-2), além de um sinal em δ_H 5,41 (d, $J = 6,1$ Hz, H-26) para um hidrogênio acetálico e mais um sinal em δ_H 4,20 (t, $J = 9,2$ Hz, H-22) para hidrogênio oximetínico, confirmando a existência de um anel heterocíclico de seis membros na estrutura, típico de vitanolidos do grupo A. Também foi possível observar sinais em δ_H 3,61 (s, H-7) e 3,04 (s, H-6) característicos de hidrogênios do anel epóxido.

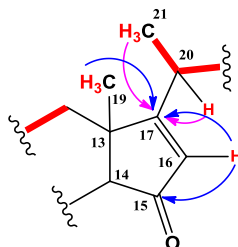
No espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np6 (Anexo 41, p. 145) foi possível observar a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 6,02 (H-2) com o hidrogênio em δ_{H} 6,55 (H-3), do hidrogênio em δ_{H} 3,04 (H-6) com δ_{H} 3,61 (H-7), e, de forma escalar, dos hidrogênios da metila em δ_{H} 0,97 (CH₃-21) com δ_{H} 2,53 (dd, $J= 16,0; 7,2$ Hz, H-20), e deste com o hidrogênio δ_{H} 4,20 (t, $J= 9,2$ Hz, H-22) e finalmente do hidrogênio em δ_{H} 4,20 (H-22) com δ_{H} 1,62 (H_b-23). Também foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 2,25 (H_a-11) com δ_{H} 1,51 (H_b-12), confirmando um esqueleto-base tipo vitanolido sem modificação na estrutura segundo Chen *et al.*, (2011). As correlações anteriormente descritas são apresentadas na Figura 52 abaixo.

Figura 52-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np6



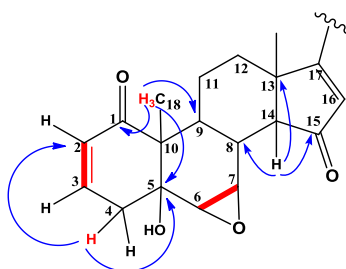
No espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np6 (Anexo 42, p. 145), foi possível observar correlações dos hidrogênios em δ_{H} 2,53 (H-20), 0,97 (CH₃-21) e 1,20 (CH₃-19) com o carbono em δ_{C} 188,8 (C-17), além do hidrogênio em δ_{H} 6,02 (H-16) com este mesmo carbono, confirmando uma dupla ligação adicional nesta posição. O hidrogênio em δ_{H} 6,02 (H-16) apresenta correlação com o carbono em δ_{C} 207,2 (C-15), sinal característico de carbonila conjugada. Uma subestrutura inicial é apresentada na Figura 53 a seguir.

Figura 53-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np6



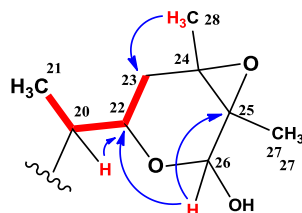
Também foi possível observar os acoplamentos heteronucleares entre o hidrogênio em δ_H 2,53 (H-4_a) com o carbono em δ_C 129,0 (C-2) e com o carbono em δ_C 74,3 (C-5), dos hidrogênios da metila em δ_H 1,20 (CH₃-19) com os carbonos em δ_C 203,7 (C-1), 27,2 (C-9) e (C-5), e do hidrogênio em δ_H 2,33 (H-14) com os carbonos em δ_C 35,1 (C-8), 48,11 (C-13) e 207,2 (C-15). As correlações observadas no espectro HMBC estão ilustradas na Figura 54 abaixo.

Figura 54-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY e RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de Np6



O heterociclo ligado ao carbono C-17 foi corroborado de acordo com os acoplamentos entre o hidrogênio em δ_H 2,53 (H-20) com o carbono em δ_C 69,1 (C-22), dos hidrogênios da metila em δ_H 1,36 (CH₃-28) com o carbono em δ_C 35,4 (C-23). É possível observar ainda a correlação do hidrogênio acetálico em δ_H 5,41 (H-26) com os carbonos C-22 (δ_C 69,1) e C-25 (δ_C 62,5). As correlações anteriormente descritas são apresentadas na Figura 55 a seguir.

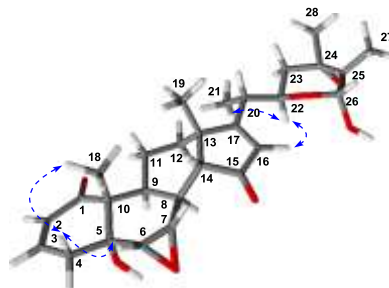
Figura 55-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY e RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de Np6



Para definir a estereoquímica relativa da estrutura de Np6 foi realizado o experimento de RMM- 2D ¹H-¹H-NOESY (Anexo 43, p. 146) onde foi possível observar os acoplamentos à longa distância do hidrogênio em δ_H 4,20 (H-22) com o hidrogênio em δ_H 6,02 (H-16) e com a metila em δ_H 0,97 (CH₃-21), o que permite concluir que se encontram em posição β em relação ao plano da molécula pela posição da metila CH₃-21 de acordo com a rota biossintética já estabelecida. Outras correlações encontradas foram

da metila em δ_H 1,20 (CH₃-18), em posição β , com o hidrogênio em δ_H 2,53 (H-4_a) e deste com o hidrogênio em δ_H 3,04 (H-6), permitindo confirmar a posição α do anel epóxido. Estas correlações encontram-se apresentadas na Figura 56 a seguir.

Figura 56-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ¹H-¹H-NOESY - Fórmula estrutural do composto Np6 em 3D utilizando ChemSketch



Este composto apresenta similaridades com o composto Np5 denominado como nicafisalina B (SHINGU, *et al.*, 1994). A diferença entre ambos é a oxidação da hidroxila no carbono C-15 para um grupamento carbonila, o que levou a denominar este composto como *15-oxo-nicafisalina B*, a comparação entre as estruturas anteriormente mencionadas pode-se observar na Figura 57.

Um levantamento exaustivo da espécie *N. physalodes* sobre os dados de hidrogênio e carbono-13 (Tabela 12, p. 93) do composto anteriormente determinado, permitiu assegurar que o composto está sendo relatado pela primeira vez na literatura. Sua fórmula estrutural e estereoquímica relativa encontram-se apresentadas na Figura 57.

Figura 57-Fórmula estrutural do composto denominado 15-oxo-nicafisalina B (a) em comparação com a nicafisalina B (b).

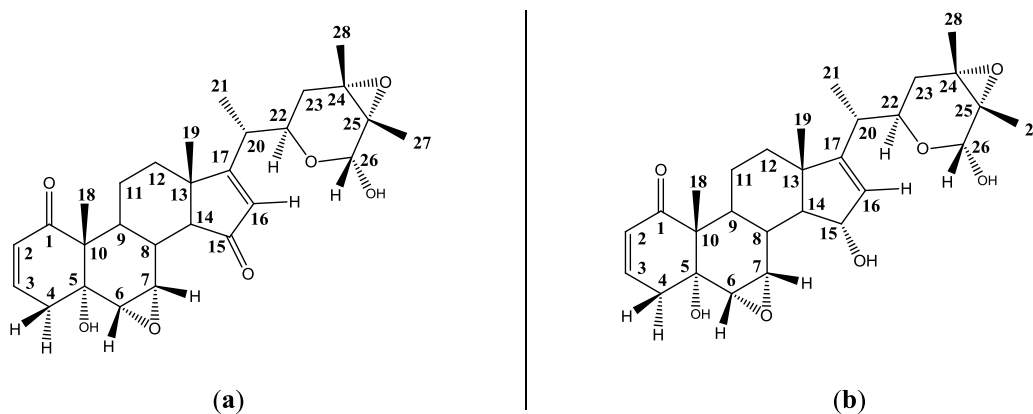


Tabela 12-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) de Np6 (15-oxo-nicafisalina B) comparados com os dados descritos para nicafisalina B (SHINGU, YAHARA, NOHARA, 1994)

Np6 (Pyr)				Nicafisalina B	
No	δ_C	δ_H	3J	δ_C	δ_H
1	203,7	-	CH ₃ -18	203,4	-
2	129,0	6,02 (dd, $J = 12,4, 2,6$ Hz, 1 H)	H-4	128,9	5,81 (dd, $J = 11,0, 2,4$ Hz, 1H)
3	141,4	6,55 (ddd, $J = 12,4, 4,8, 2,6$ Hz 1H)	-	139,9	6,62 (ddd, $J = 11,0, 5,1, 2,4$ Hz, 1H)
4	38,0	2,53 (dd, $J = 16,0, 7,2$ Hz, 2H) 2,68 (m, 1H)	-	36,4	2,74 (d, $J = 19,0$ Hz 1H) 2,51 (dd, $J = 19,0, 5,1$ Hz, 1H)
5	74,3	-	CH ₃ -18, H-4	73,1	-
6	55,3	3,04 (s, 1H)	-	55,8	3,06 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H)
7	57,5	3,61 (s, 1H)	-	56,4	3,63 (m, 1H)
8	27,2	2,33 (br s, 1H)	CH ₃ -18	33,5	-
9	35,1	2,33 (br s, 1H)	-	35,4	-
10	54,5	-	-	50,8	-
11	22,7	2,25 (m, 1H) 1,62 (m, 1H)	-	20,9	-
12	33,3	1,51 (s, 2H)	-	34,4	-
13	48,1	-	-	46,7	-
14	56,2	2,33 (s, 1H)	-	60,1	-
15	207,2	-	H-16, H-14	75,8	4,62 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H)
16	130,4	6,02 (s, 1H)	-	127,7	5,47 (m, 1H)
17	188,8	-	CH ₃ -21, H-16	156,5	-
18	14,5	1,20 (s, 3H)	-	18,3	0,91 (s, 3H)
19	25,9	1,20 (s, 3H)	H-14	14,4	1,25 (s, 3H)
20	37,3	2,53 (dd, $J = 16,0, 7,2$ Hz, 2H)	-	35,9	-
21	17,7	0,97 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H)	-	16,2	1,04 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H)
22	69,1	4,20 (t, 9,2 Hz, 1H)	H-26, CH ₃ -21	66,3	3,87 (m, 1H)
23	35,4	1,97 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H) 1,64 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H)	CH ₃ -23	33,6	-
24	63,8	-	-	62,9	-
25	62,5	-	-	62,8	-
26	92,8	5,41 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H)	-	91,9	5,02 (s, 1H)
27	17,5	1,51 (s, 3H)	-	16,0	1,40 (s, 3H)
28	18,9	1,36 (s, 3H)	-	17,9	1,41 (s, 3H)

5.1.7 Determinação estrutural de Np7

O composto denominado Np7 (39,8 mg), proveniente da fração NpAcDCM-E foi obtido através do procedimento descrito no item 4.6.7 (p.58) como um sólido branco cristalino e rotação ótica de $[\alpha]_D^{20} -105^\circ$ ($c = 0,1$; MeOH).

No espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) (Anexo 44, p. 147), foi possível observar um pico correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 357,1703 (calc. m/z : 357,1702; erro: 0,3) o qual permitiu obter a fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_5$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 10.

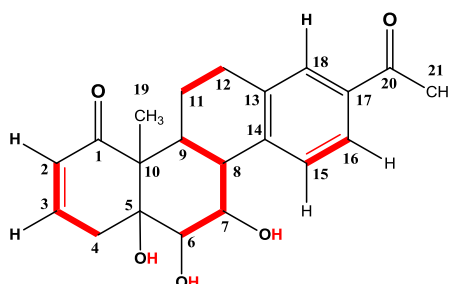
O espectro de RMN de ^{13}C -BB de Np7 [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] (Anexo 45, p. 147) forneceu 21 linhas espectrais entre as quais se destacam um sinal em δ_C 204,0 para carbonila conjugada e mais um sinal em δ_C 197,9 característica de um carbono de carbonila, com efeito, mesomérico. Além destes, foram detectados sinais em δ_C 142,4 e 129,0 característicos de um sistema α,β - conjugado, sinais para carbonos aromáticos em δ_C 145,2; 140,2; 135,8; 130,1; 127,4 e 126,0 sinais para carbonos sp^3 oxigenados não hidrogenados em δ_C 79,5; 75,9 e 73,8, além dos sinais intensos típicos para metilas em δ_C 26,9 e 16,1.

Para observar o padrão de hidrogenação dos carbonos, foi realizado o experimento DEPT 135° para Np7 (Anexo 46, p. 148), fornecendo dois sinais para carbonos metílicos (δ_C 16,1 e 26,9), três sinais para carbonos metilênicos (δ_C 26,2; 31,6 e 36,5) e nove sinais para carbonos metínicos (δ_C 33,4; 40,4; 73,8; 75,9; 126,0; 127,4; 129,0; 130,1 e 142,4). A comparação com o espectro de RMN 1D, ^{13}C -BB permitiu identificar sete sinais para carbonos não hidrogenados (δ_C 54,1; 79,5; 135,8; 140,2; 145,2; 197,9 e 204,9).

O espectro de RMN de 1H [Piridina- d_5 , 500 MHz] de Np7 (Anexo 47, p. 148) apresentou sinais características para hidrogênios aromáticos em δ_H 7,83 (d, $J = 8$ Hz, H-16), 7,80 (s, H-18) e 7,68 (d, $J = 8,1$ Hz, H-15) confirmando um sistema de spin do tipo ABX, sinais em δ_H 6,70 (ddd, $J = 10,0$; 5,1; 3,0 Hz, H-3) e 6,16 (dd, $J = 10,0$ e 2,5 Hz, H-2) característicos de hidrogênios olefínicos do sistema α,β - conjugado à carbonila, hidrogênios em δ_H 5,22 (br s, H-7) e 4,39 (s, H-6) correspondentes aos hidrogênios oximetínicos e sinais para hidrogênios metílicos em δ_H 2,53 (s, CH₃-21) e 1,70 (s, CH₃-19).

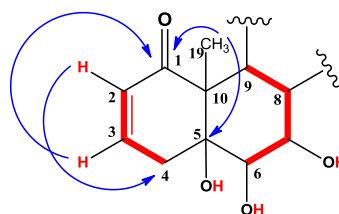
No espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np7 (Anexo 48, p. 149) foi possível observar as correlações entre o hidrogênio em δ_{H} 6,16 (H-2) com 6,70 (H-3) e deste último com o hidrogênio em δ_{H} 3,62 (H-4_a), do hidrogênio em δ_{H} 3,07 (H-11b) com 2,91 (H-12a). Também foi possível observar os acoplamentos dos hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 4,39 (H-6) com 5,22 (H-7) e, de maneira escalar, do hidrogênio H-7 (δ_{H} 5,22) com o hidrogênio H-8 (δ_{H} 3,81) e deste com o hidrogênio H-9 (δ_{H} 3,20) e, ainda, do hidrogênio aromático em δ_{H} 7,68 (H-15) com 7,83 (H-16). As correlações anteriormente descritas encontram-se apresentadas na Figura 58 a seguir.

Figura 58-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np7



Finalmente, no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np7 (Anexo 49, p. 149) foi possível observar as correlações à longa distância entre o hidrogênio em δ_{H} 6,70 (H-3) com o carbono em δ_{C} 204,9 (C-1), do hidrogênio em δ_{H} 6,16 (H-2) com o carbono em δ_{C} 36,5 (C-4), dos hidrogênios da metila em δ_{H} 1,70 (CH₃-19) com os carbonos em δ_{C} 204,9 (C-1), 79,5 (C-5) e 33,4 (C-9) confirmando o sistema A/B *5 α -hidroxi-2-en-1-ona* descrito por Chen, *et al.*, (2011) Figura 59 abaixo.

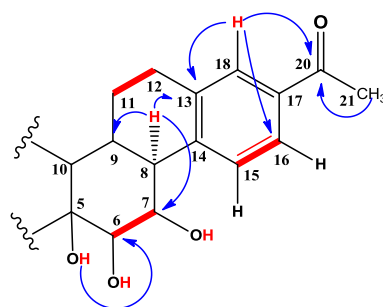
Figura 59-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY e RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np7



A abertura do anel epóxido foi confirmada pelos acoplamentos do hidrogênio em δ_{H} 3,81 (H-8) com o carbono em δ_{C} 73,8 (C-7), e do hidrogênio da hidroxila em δ_{H} 6,64 (OH-5) com o carbono em δ_{C} 75,9 (C-6). O hidrogênio H-8 também apresenta correlação com os carbonos em δ_{C} 33,4 (C-9), 145,2 (C-13). Foi possível observar os acoplamentos entre o hidrogênio aromático em δ_{H} 7,80 (H-18) com os carbonos em δ_{C} 197,9 (C-20),

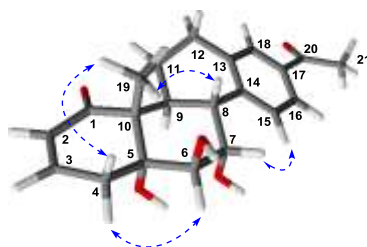
148,2 (C-13) e 126,0 (C-16) e, finalmente, a presença da carbonila altamente conjugada foi confirmada pela correlação dos hidrogênios da metila em δ_H 2,83 (CH₃-21) com o carbono em δ_C 197,9 (C-20), as correlações anteriormente descritas são apresentadas na Figura 60 a seguir.

Figura 60-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY e RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de Np7



A estereoquímica relativa do composto Np7, foi determinada realizando o experimento de RMM- 2D ¹H-¹H-NOESY (Anexo 50, p. 150) sendo possível observar a correlação entre os hidrogênios da metila em δ_H 1,70 (CH₃-19) com o hidrogênio em δ_H 3,81 (H-8) o qual indica uma posição β da metila e do hidrogênio em relação ao plano do ciclohexano, além de corroborar as posições α e β para os hidrogênios diastereotópicos H-4_b e H-4_a respectivamente, com o acoplamento entre a metila (CH₃-19) em posição beta com o hidrogênio em δ_H 3,62 (H-4_a) e entre o hidrogênio em δ_H 4,39 (H-6) em posição alfa com o hidrogênio em δ_H 2,59 (H-4_b), colocando em posição beta a hidroxila ligada ao carbono C-6, a Figura 61 a seguir apresenta o descrito anteriormente.

Figura 61-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ¹H-¹H-NOESY - Fórmula estrutural do composto Np7 em 3D utilizando ChemSketch



Evidentemente o composto Np7, apresenta semelhanças com o composto isolado neste trabalho denominado como Np1 (Nic-10), porém Np7 apresenta uma abertura do anel epóxido entre as posições C6-C7 do anel B, permitindo então denominar o composto como *6 β ,7 α -dihidroxicandrenona-10*, uma comparação feita entre as estruturas anteriormente mencionadas (Figura 62), permite evidenciar mas facilmente o descrito.

Um levantamento bibliográfico minuciosamente realizado permitiu comprovar que o composto elucidado está sendo relatado pela primeira vez na literatura. A fórmula estrutural com sua estereoquímica relativa está apresentada na (Figura 62) junto aos dados de RMN de ^1H e ^{13}C que estão apresentados na Tabela 13 (p. 98).

Figura 62-Fórmula estrutural do composto denominado *6 β ,7 α -dihidroxi-nicandrenona-10* (a) em comparação com a Np1 (Nic-10) (b).

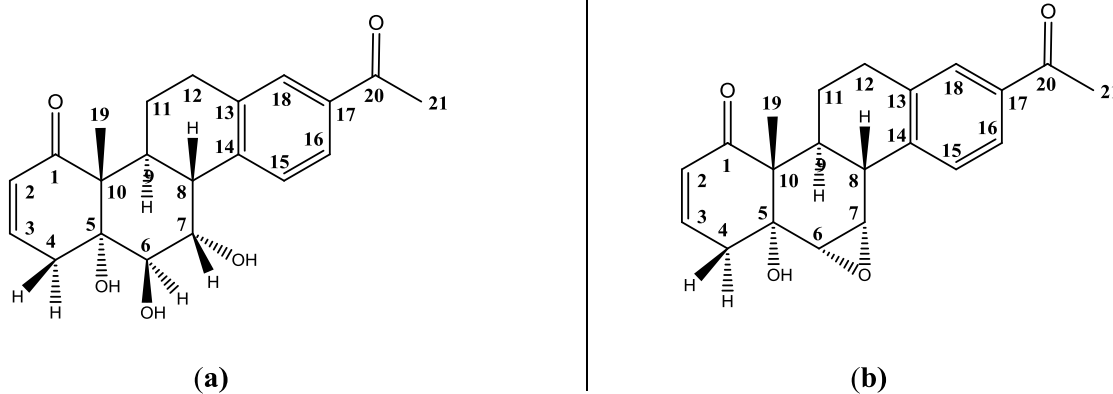


Tabela 13-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) de Np7 (6 β ,7 α -dihidroxi-nicandrenona 10), Comparados com os dados relatados para nicandrenona-10 isolado por (SILVA, 2016)

Np7 (Pyr)				*nic-10	
No	δ_C	δ_H	3J	δ_C	δ_H
1	204,9	-	CH ₃ -19	204,0	-
2	129,0	6,16 (dd, $J= 10,0, 2,5$ Hz, 1H)	-	129,2	6,07 (dd $J=2,0; 10,0$, 1H)
3	142,4	6,70 (ddd, $J= 10,0, 5,1, 3,0$ Hz, 1H)	H-4	141,5	6,62 (m, 1H)
4	36,5	3,62 (d, $J= 18,75$ Hz, 1H) 2,59 (d, $J= 19,0, 5,1$ Hz, 1H)		38,3	2,67 (dd, $J= 4,7; 18$, 1Ha) 2,74 (m, 1Hb)
5	79,5	-	H-7	73,8	-
6	75,9	4,39 (s, 1H)	H-7	57,4	3,33 (d, $J=2,1$ Hz, 1H)
7	73,8	5,22 (br s, 1H)	-	54,6	4,08 (s,1H)
8	40,4	3,81 (d, $J= 11,85$ Hz, 1H)	-	40,2	3,08 (m,2H)
9	33,4	3,20 (td, $J= 12,2, 1,5$ Hz, 1H)	H-7, H-8	32,3	2,45 (td, $J= 3,7; 11,0;11,0$, 1H)
10	54,1	-	-	52,7	-
11	26,2	3,07 (m, 2H) 1,56 (qd, $J=12,0, 4,0$ Hz, 1H)	-	24,7	1,59 (q,1H) 3,08 (m,2H)
12	31,6	3,18 (td, $J= 16,0, 5,1$, 1H) 2,91 (m, 2H)	-	30,0	2,74(m, 1H) 2,79 (m,1H)
13	145,2	-	H-8, H-18	145,0	-
14	140,2	-	-	138,5	-
15	127,4	7,68 (d, $J= 8,10$ Hz, 1H)	-	126,2	7,74 (m,2H)
16	126,0	7,83 (dd, $J= 8,0, 1,6$ Hz, 1H)	H-18	126,0	7,96 (d, $J= 4,5; 1H$)
17	135,8	-	-	136,2	-
18	130,1	7,80 (d, $J= 1,6$ Hz, 1H)	-	129,2	7,76 (s, 1H)
19	16,1	1,70 (s, 3H)	-	14,4	1,24 (s,3H)
20	197,9	-	H-18, CH ₃ -21	198,0	-
21	26,9	2,53	-	26,9	2,57 (s,3H)

5.1.8 Determinação estrutural de Np8

O composto Np8 (10,2 mg), proveniente da fração NpAcDCM-E.3, foi isolado de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.8 (p. 58), como um sólido branco de aspecto cristalino e rotação ótica $[\alpha]_D^{20} - 4,76^\circ$ ($c = 0,1$; CHCl_3).

O espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np8 (Anexo 51, p. 150), permitiu observar um pico correspondente à molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 487,2695 (calc. m/z : 487,2696; erro: -0,2), o que permitindo deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_8$ junto com um IDH igual a 8.

Uma comparação inicial do espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np8 (Anexo 52, p. 151) com o do composto Np4 denominado como Nic-2 (Anexo 24, p. 136), permitiu observar semelhanças entre os espectros. Destacam-se um sinal para carbono carbonílico em δ_{C} 204,4, sinais características de sistema α,β -conjugado em δ_{C} 141,0 e 129,5 dupla ligação comumente observada, além dos sinais para carbonos oximetínicos em δ_{C} 56,8 e 55,9 e um sinal para carbono sp^3 oxigenado em δ_{C} 74,0, todos característicos do sistema *5- α -hidroxi-2-ene-1-ona* descrito por Chen, *et al* (2011). Também foi possível observar um sinal para carbono acetálico em δ_{C} 93,7 e um sinal para carbono oximetínico em δ_{C} 70,9, sinais característicos do heterociclo típico de vitanolidos tipo A, além de um sinal em δ_{C} 86,8 presente também na estrutura de Nic-2. Como principais diferenças pode-se observar dois sinais para carbonos oxigenados não hidrogenados em δ_{C} 74,5 e 74,4.

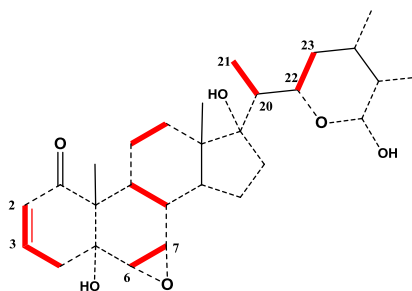
O espectro de J-mod de Np8 (Anexo 53, p. 151) permitiu observar o padrão de hidrogenação presente, apresentando: cinco sinais para carbonos metílicos (δ_{C} 15,2; 16,6; 18,5; 18,7 e 24,0), seis sinais para carbonos metilênicos (δ_{C} 22,6; 22,8; 31,3; 33,1; 33,5 e 38,2) e dez sinais para carbonos metínicos (δ_{C} 35,8; 36,0; 37,7; 45,4; 55,9; 56,8; 70,9; 93,8; 129,5 e 141,0). Comparando o espectro J-mod com o espectro de RMN 1D, ^{13}C -BB se logro identificar a presença de sete sinais para carbonos não hidrogenados em (δ_{C} 49,6; 52,0; 74,0; 74,4; 74,5; 86,8 e 204,7).

No espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np8 (Anexo 54, p. 152) foi possível observar sinais característicos de compostos tipo vitanolido, tais como um sinal em δ_{H} 6,58 (ddd, $J = 10,0$; 4,9; 1,9 Hz, H-3) e 6,06 (dd, $J = 10,2$; 1,6 Hz, H-2) para hidrogênios olefinicos, um sinal para hidrogênio acetálico em δ_{H} 5,16 (s, H-26) e outro

em δ_H 4,08 (t, $J= 4,6$ Hz, H-22) para hidrogênio oximetínico, característico de um heterociclo de seis membros, além de sinais em δ_H 3,27 (t, $J= 2,3$ Hz, H-6) e 3,13 (d, $J= 3,7$ Hz, H-7) pra hidrogênios oximetínicos característicos de anel epóxido.

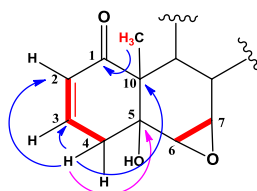
O espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY de Np8 (Anexo 55, p. 152) demonstrou correlações entre os sinais em δ_H 6,06 (H-2) com o hidrogênio em δ_H 6,58 (H-3), e deste com δ_H 2,57 (H-4), do hidrogênio em δ_H 3,27 (H-6) com o hidrogênio em δ_H 3,23 (H-7), também dos hidrogênios da metila em δ_H 1,03 (CH₃-21) com 2,21 (H-20) e do hidrogênio oximetínico em δ_H 4,08 (H-22) com o hidrogênio em δ_H 2,74 (H-23a). Outros acoplamentos observados foram entre o hidrogênio em δ_H 1,75 (H-9) com 2,03 (H-8) e do hidrogênio em δ_H 1,39 (H-12a) com 1,75 (H-11b). Todas as correlações anteriormente mencionadas são apresentadas na Figura 63 a seguir.

Figura 63-Correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY de Np8



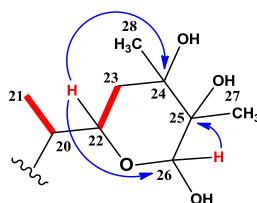
No espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np8 (Anexo 56, p. 152) foi possível observar muitas das correlações observadas no espectro do composto Np4 (Anexo 28, p. 138), ressaltando o acoplamento entre o hidrogênio em δ_H 2,57 (H-4a) com os carbonos em δ_C 141,0 (C-3), 125,5 (C-2), 74,0 (C-5) e 52,8 (C-10) e dos hidrogênios da metila em δ_H 1,23 (CH₃-18) com o carbono em δ_C 204,4 (C-1), o que confirmam o sistema *5- α -hidroxi-2-eno-1-ona* descrito por Chen *et al* (2011) (Figura 64).

Figura 64-Correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY e RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np8



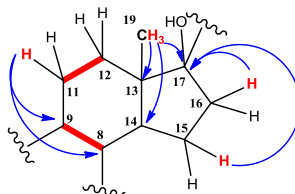
O anel heterocíclico de seis membros foi corroborado pelos acoplamentos observados entre o hidrogênio em δ_H 4,08 (H-22) com o carbono em δ_C 74,5 (C-24) e 93,7 (C-26) e do hidrogênio em δ_H 5,16 (H-26) com δ_C 74,4 (C-25) comprovando a abertura do anel epóxido nesta posição (Figura 65).

Figura 65-Correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY e RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np8



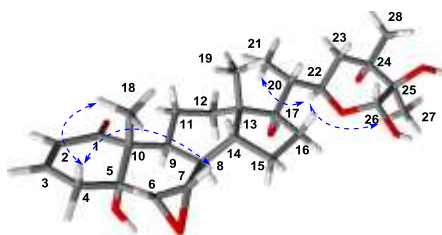
Outros acoplamentos importantes observados foram entre o hidrogênio em δ_H 3,13 (H-16) com o carbono em δ_C 86,8 (C-17), dos hidrogênios da metila em δ_H 1,03 (CH₃-19) com os carbonos em δ_C 49,6 (C-13), 45,5 (C-14) e C-17 e do hidrogênio em δ_H 2,74 (H-11) com os carbonos em δ_C 36,0 (C-8) e 35,8 (C-9), observando estas correlações na Figura 66 a seguir

Figura 66-Correlações observadas no espectro de RMN 2D 1H , 1H -COSY e RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC de Np8



O espectro de RMM-2D 1H - 1H -NOESY de Np8 (Anexo 57, p. 153) permitiu determinar a estereoquímica relativa do composto através da correlação do hidrogênio em δ_H 4,08 (H-22) com os hidrogênios da metila em δ_H 1,62 (CH₃-27) e, da mesma forma, com os hidrogênios da metila em 1,03 (CH₃-21) permitindo determinar que todos se encontram na posição α em relação ao plano da molécula. Também foi possível observar os acoplamentos à longa distância dos hidrogênios da metila em δ_H 1,23 (CH₃-18) em posição β , com o hidrogênio em 2,57 (H-4a) e deste com o hidrogênio em δ_H 3,13 (H-7) também em posição β , corroborando a posição $6\alpha,7\alpha$ -epóxi do vitanolido. Os acoplamentos anteriormente mencionados são apresentados na Figura 67 (p. 102).

Figura 67-Acoplamentos dipolares de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY - Fórmula estrutural do composto Np8 em 3D utilizando ChemSketch



O composto Np8, como já foi mencionado anteriormente, apresentou similaridades com o composto Nic-2 isolado por Bates & Morehead (1974) e também reportado neste trabalho. Como principal diferença observou-se a abertura do anel epóxido entre as posições C24-C25 do heterociclo de seis membros ligado ao carbono C-17. Devido a este fato, o composto foi denominado como *24 β -25 α -dihidroxi-nicandrenona-2*. A comparação das estruturas dos compostos mencionados pode-se observar na Figura 68 a seguir além da estereoquímica relativa do composto, e os dados de RMN de ^{13}C e ^1H (Tabela 14, p.103).

Figura 68-Fórmula estrutural do composto denominado *24 α -25 β -dihidroxi-nicandrenona-2* (a) em comparação com o composto denominado Np4 (Nic-2) (b)

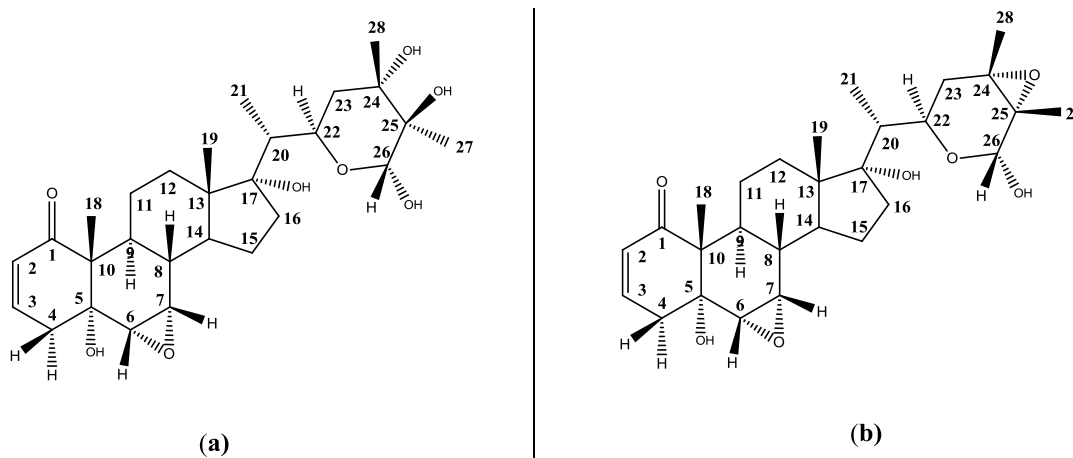


Tabela 14-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) do composto NP8 (24 α -25 β -dihidroxi-nicandrenona-2), Comparados com a nic-2 isolada por (SILVA, *et al.*,2016)

Np8 (Pyr)				*nic-2	
No	δ_C	δ_H	3J	δ_C	δ_H
1	204,4	-	CH ₃ -18-	204,2	-
2	129,5	6,06 (dd, $J= 10,2; 1,6$ Hz, 1H)	H-4	129,6	6,02 (dd, $J=10,0; 2,0$ Hz, 1H)
3	141,0	6,58 (ddd, $J= 10,0; 4,9; 1,9$ Hz, 1H)	H-4	140,9	6,57 (m, 1H)
4	38,2	2,64 (d, $J= 16,5$ Hz, 2H)	-	38,2	2,53 (dd, $J=1,8; 10,0$ Hz, 1H)
5	74,0	-	CH ₃ -18, H-7, H-4	74,4	-
6	55,9	3,27 (t, $J= 2,3$ Hz, 1H)	-	56,8	3,12 (d, $J=3,7$ Hz, 1H)
7	56,8	3,13 (d, $J= 3,7$ Hz, 3H)	-	56,3	3,30 (s, 1H)
8	36,0	2,03 (m, 4H)	-	37,6	2,86 (m, 1H)
9	35,8	1,75 (m, 1H)	-	36,2	2,19 (m, 1H)
10	52,08	-	CH ₃ -18, H-4	52,1	-
11	31,3	2,74 (dd, $J= 13,2; 6,6$ Hz, 2H)	H-12 _b	33,5	1,74 (m, 2H)
12	33,1	2,21 (m, 1H) 1,39 (m, 1H)	-	35,1	2,32 (m, 2H)
13	49,6	-	CH ₃ -19	49,6	-
14	45,5	1,36 (m, 2H)	CH ₃ -19	47,3	1,74 (m, 1H)
15	22,6	1,46 (m, 3H) 1,34 (m, 2H)	-	22,6	3,17 (m, 2H)
16	22,8	3,13 (m, 1H) 1,55 (m, 1H)	-	24,0	1,74 (m, 2H)
17	86,8	-	H-22	85,4	-
18	15,2	1,23 (s, 3H)	-	16,4	1,09 (s, 3H)
19	18,5	1,03 (s, 6H)	-	15,2	1,19 (s, 3H)
20	37,7	2,21 (m, 1H)	H-15	42,1	2,07 (m, 1H)
21	16,6	1,03 (s, 6H)	-	14,5	0,98 (d, $J= 7,0$ Hz, 3H)
22	70,9	4,08 (t, $J= 4,6$ Hz, 1H)	H-23, CH ₃ -21	67,8	4,68 (m, 1H)
23	33,5	2,03 (m, 4H)	-	34,6	1,87 (m, 2H)
24	74,5	-	-	63,5	-
25	74,4	-	-	63,0	-
26	93,7	5,16 (s, 1H)	H-22	92,8	5,46 (m, 1H)
27	18,7	1,62 (s, 3H)	-	17,6	1,49 (s, 3H)
28	24,06	1,40 (s, 3H)	-	19,2	1,32 (s, 3H)

5.1.9 Determinação estrutural de Np9

O composto denominado Np9 (1,8 mg), obtido segundo o procedimento descrito no item 4.7.2 (p. 59), apresentou-se como um sólido branco de aparência amorfa, seu baixo rendimento priorizou as análises por EMAR e RMN .

Do modo anteriormente mencionado, a análises por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR-ESI) do composto Np9 (Anexo 58, p. 154) permitiu observar um pico correspondente ao aduto $[M+H]^+$ em m/z 367,1916 (calc. m/z 367,1909; erro:1,9), o que levou a obter a fórmula molecular $C_{23}H_{27}O_4$ correspondente ao composto protonado, com um IDH igual a 11.

O espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] (Anexo 59, p. 154), comparado com o espectro do composto Np1 denominado como Nic-10, (Anexo 10, p. 128) permitiu observar algumas semelhanças, tais como um carbono de carbonila conjugada em δ_C 204,0, carbonos característicos de um sistema α,β - conjugado em δ_C 141,5 e 129,4, além de sinais para carbonos aromáticos em δ_C 139,6, 138,7, 138,6, 128,9, 126,4 e 125,8. Uma expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB na região dos aromáticos permitiu observar a presença de quatro linhas espectrais perto uma da outra, diferenciando então os carbonos C16 (δ_C 125,84^a e 125,78^b) e C-18 (δ_C 128,97^a e 128,91^b), sinais que permitem ser atribuídas para uma possível mistura epimerica. Sinais em δ_C 57,5 e 55,01 característicos de anel epóxido e, finalmente, sinais para carbonos metílicos em 28,8 e 14,5. As principais diferenças detectadas foram um carbono metílico em δ_C 18,1 e um sinal em δ_C 208,6 para carbonila altamente desblindada.

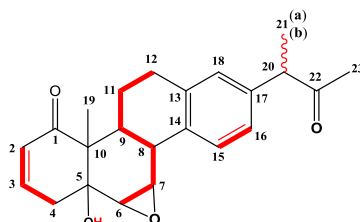
O espectro de DEPT 135° de Np9 (Anexo 60, p. 155) e a comparação com o espectro de RMN 1D, ^{13}C -BB permitiu observar o padrão de hidrogenação dos carbonos como: três sinais para carbonos metílicos (δ_C 14,5; 18,11 e 28,8), três sinais para carbonos metilênicos (δ_C 25,0; 30,1 e 38,4) dez sinais para carbonos metínicos (δ_C 32,7; 39,9; 53,7; 55,0; 57,5; 125,8; 126,4; 128,9; 129,4 e 141,5) e sete sinais para carbonos não hidrogenados em (δ_C 52,7; 74,0; 138,3; 138,7; 139,6; 204,0 e 208,6.), corroborando o total de carbonos respeito à fórmula molecular fornecida pelas análises de EMAR.

O espectro de RMN de 1H [Piridina- d_5 , 500 MHz] de Np9 (Anexo 61, p. 155) apresentou deslocamentos químicos semelhantes aos do composto denominado Nic-10 (Anexo 12, p. 129), dentre os quais podemos destacar os sinais para hidrogênios aromáticos em δ_H 7,64 (d, $J= 7,9$ Hz, H-16), 7,16 (d, $J= 7,9$ Hz, H-15) e 7,02 (s, H-18), sinais para hidrogênios olefinicos em δ_H 6,61 (ddd, $J= 10,0$; 4,9; 2,0 Hz, H-2) e 6,06 (dd,

$J= 10,0; 2,4$ Hz, H-3) e sinais para hidrogênios metílicos em δ_H 1,22 (s, CH₃-19) e mais um em δ_H 2,09 (s, CH₃-23), estes últimos ligados a carbono ligado a carbono de carbonila. Como principais diferenças pôde-se observar de acordo com a expansão do espectro de hidrogênio (Anexo 64, p.157) (Anexo 65, p.157) um sinal em δ_H 1,46 (d, $J= 6,9$ Hz, CH₃-21^a) e 1,45 (d, $J= 6,9$ Hz, CH₃-21^b) correspondentes com duas metilas às quais correspondem com a presença de duas espécies químicas em uma mistura epimerica, também foi possível observar um sinal em δ_H 3,80 (q, $J= 6,9$, H-20).

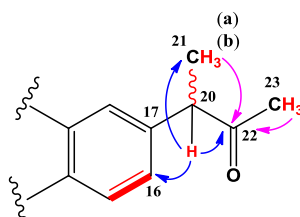
No espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY de Np9 (Anexo 62, p. 156) foi possível observar os acoplamentos homonucleares entre os hidrogênios em δ_H 6,06 (H-2) com 6,61 (H-3), de forma escalar, entre o hidrogênio em δ_H 3,30 (H-6) com 4,06 (H-7), deste com o hidrogênio em δ_H 3,07 (H-8), do hidrogênio H-8 com o hidrogênio em δ_H 2,45 (H-9) e, deste último com o hidrogênio em δ_H 1,55 (H-11_a). Finalmente, do hidrogênio H-11_a com 2,73 (H-12), dos hidrogênios aromáticos em δ_H 7,16 (H-15) com 7,64 (H-16), além de um acoplamento importante entre os hidrogênios da metila em δ_H 1,46 (CH₃-21^a) com o hidrogênio em δ_H 3,80 (H-20) e de δ_H 1,45 (CH₃-21^b) com este ultimo hidrogênio. As correlações anteriormente mencionadas são apresentadas na Figura 69 a seguir.

Figura 69-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY de Np9 (a) e (b)



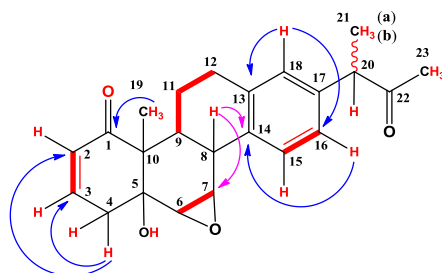
Com ajuda do espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de Np9 (Anexo 63, p. 156) se corroboro a presença de uma metila adicional, através da correlação entre os hidrogênios em δ_H 1,46 (CH₃-21^a) com o carbono da carbonila em δ_C 208,6 (C-22), além do hidrogênio em δ_H 3,80 (H-20) com os carbonos em δ_C 125,84a (C-16), 18,1 (C-21) e (C-22). Também foi possível observar o acoplamento dos hidrogênios da metila em δ_H 2,09 (CH₃-23) com o carbono C-22 confirmando uma cadeia aberta de três carbonos ligado ao carbono C-17. As correlações são apresentadas na Figura 70 abaixo.

Figura 70-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY e RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de Np9^(a)



Outras correlações observadas foram entre o hidrogênio aromático em δ_H 7,02 (H-18) com os carbonos em δ_C 138,3 (C-13) e 126,4 (C-16), do hidrogênio em δ_H 7,64 (H-16) com o carbono em δ_C 139,6 (C-14), corroborando a estrutura de um vitanolido com anel D aromático segundo a classificação dada por (CHEN, *et al.*, 2011). Os hidrogênios da metila em δ_H 1,22 (CH₃-19) correlacionam-se com o carbono em δ_C 204,0 (C-1), o hidrogênio em δ_H 2,63 (H-4_b) com os carbonos em δ_C 141,5 (C-3) e 129,4 (C-2), o que permitiu confirmar as características de um sistema A/B 5 α -hidroxi-2-en-1-ona, e finalmente, o hidrogênio em δ_H 3,07 (H-8) mostra correlações com os carbonos em δ_C 55,01 (C-7) e 139,6 (C-14), isto pode ser observado na Figura 71 a seguir.

Figura 71-Correlações observadas no espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY e RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de Np9



Finalmente as expansões mencionadas anteriormente (Anexo 64, p.157) e (Anexo 65, p.157) permitirem confirmar a presença de uma mistura epimerica, apresentando valores de deslocamento quase similares, mas não idênticos no caso dos carbonos C18 e C16 e dos hidrogênios da metila CH₃-21, com valores diferentes que são atribuíveis com estereoquímica oposta no caso da chamada mistura epimerica, vale ressaltar que o composto Np9 apresenta como principal diferença o acréscimo de dois carbonos na estrutura por comparação com a Nic-10, representados por um carbono metínico e um metílico, confirmando o radical 17-(1-metil-propan-2-ona), a comparação das estruturas anteriormente mencionadas pode-se observar na Figura 72 (p. 107).

Um cuidadoso levantamento bibliográfico realizado para o composto Np9 **(a)** e **(b)**, determinou que se trata de uma mistura epimerica com diferença na estereoquímica da metila CH₃-21, mas por motivos de quantidade e de material disponível não foi possível corroborar por meio de NOESY, porém trata-se de compostos inéditos na literatura para a espécie *N. physalodes*, o quais foram denominados como 17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10 **(a)** e 17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10 **(b)**. A seguir são apresentadas suas estruturas moleculares (Figura 72, p. 107) e dados de RMN de ¹³C e ¹H (Tabela 15, p.108).

Figura 72-Fórmula estrutural do composto denominado 17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10^(a) e ^(b) **(a)** em comparação com o composto denominado Np1 (Nic-10) **(b)**

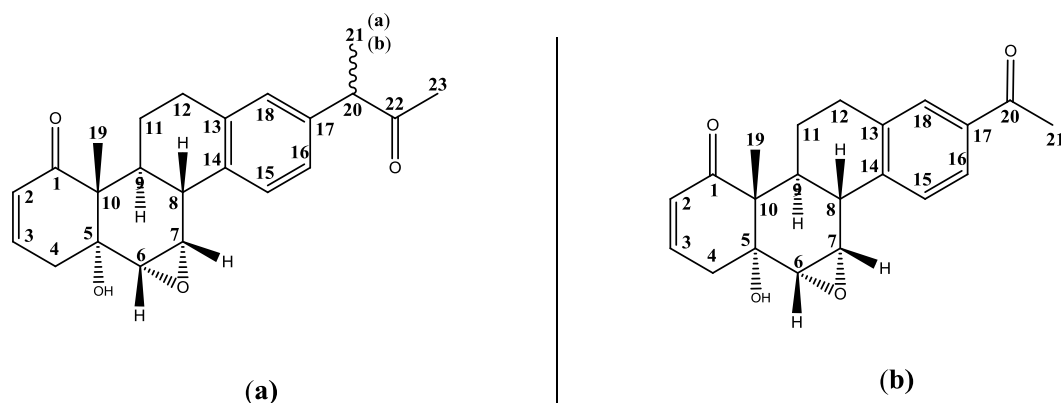
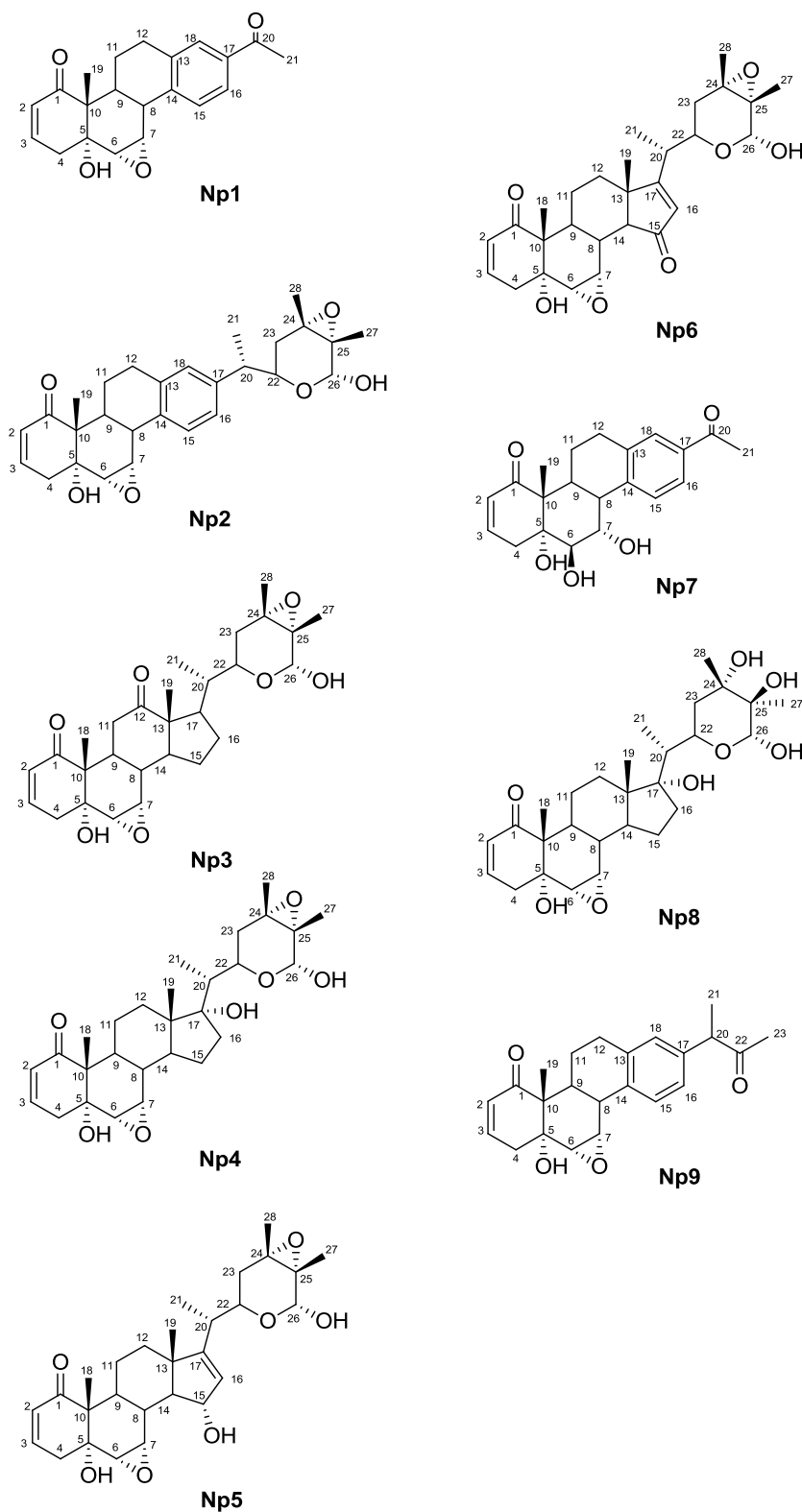
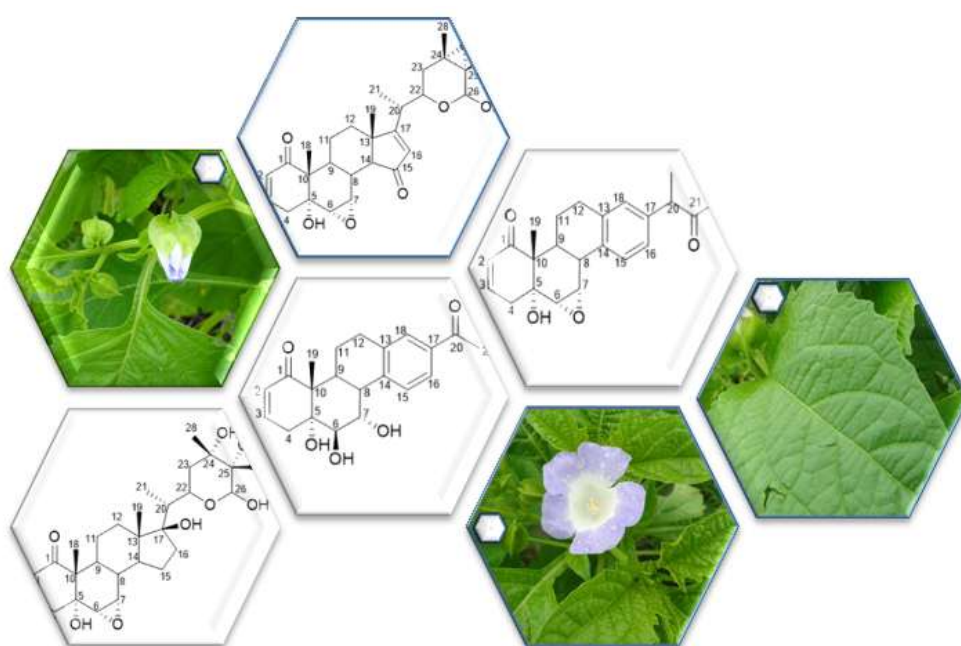


Tabela 15-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) de Np9 (17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10) ^(a) e ^(b), Comparados com a nic-10 (KUN, BO, KAI, 2012)

Np9 (Pyr)				*nic-10	
No	δ_C	δ_H	3J	δ_C	δ_H
1	204,0	-	H-2, H-3, CH ₃ -19	204,0	-
2	129,4	6,06 (dd, $J= 10,0; 2,4$ Hz, 1H)	-	129,2	6,07 (dd $J=2,0; 10,0$, 1H)
3	141,5	6,61 (m, 1H)	-	141,5	6,62 (m, 1H)
4	38,45	2,73 (m, 1H) 2,63 (dd, $J= 18,7; 5,0$ Hz, 1H)	-	38,3	2,67 (dd, $J= 4,7; 18$, 1Ha) 2,74 (m, 1Hb)
5	74,0	-	-	73,8	-
6	57,5	3,30 (d, 3,7 Hz, 1H)	-	57,4	3,33 (d, $J=2,1$ Hz, 1H)
7	55,0	4,06 (m, 1H)	-	54,6	4,08 (s,1H)
8	39,9	3,07 (d, 11,4 Hz, 1H)	-	40,2	3,08 (m,2H)
9	32,7	2,45 (td, $J= 15,2; 15,2; 3,2$ Hz, 1H)	-	32,3	2,45 (td, $J= 3,7; 11,0; 11,0$, 1H)
10	52,7	-	-	52,7	-
11	25,0	1,55 (m, 1H) 3,12 (m, 1H)	-	24,7	1,59 (q,1H) 3,08 (m,2H)
12	30,1	2,73 (m, 2H)	-	30,0	2,74(m, 1H) 2,79 (m,1H)
13	138,3	-	H-18, H-15	145,0	-
14	139,6	-	H-16, H-8	138,5	-
15	126,4	7,64 (d, $J= 7,9$ Hz, 1H)	-	126,2	7,74 (m,2H)
16	125,84 a 125,78 b	7,16 (d, $J= 7,9$ Hz, 1H)	H-20, H-18	126,0	7,96 (d, $J= 4,5; 1H$)
17	138,7	-	-	136,2	-
18	128,97 a 128,91 b	7,02 (s, 1H)	-	129,2	7,76 (s, 1H)
19	14,5	1,22 (s, 3H)	-	14,4	1,24 (s,3H)
20	53,7	3,80 (q, $J= 6,9$ Hz, H-20)	-	198,0	-
21	18,1	1,46 (d, $J= 6,9$ Hz, 3H) a 1,45 (d, $J= 6,9$ Hz, 3H) b	-	26,9	2,57 (s,3H)
22	208,6	-	CH ₃ -23, CH ₃ -21, H-20	-	-
23	28,8	2,09 (s, 3H)	-	-	-

Figura 73-Estruturas dos compostos isolados do extrato DCM e AcOEt das folhas da espécie *N. physalodes*



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica foram feitos por a equipe de microbiologia pertencente ao laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal de Ceara (UFC), por parte do professor Dr. Edson Teixeira, e Dr. Mayron Vasconcelos.

Por outra parte, os ensaios da atividade larvicida, foram realizados no Departamento de farmácia da Universidade Federal do Ceara (UFC), por parte da equipe da professora Dra Gilvandete Pinheiros.

6.1 Metodologia da Avaliação da atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana, foram testadas quatro bactérias de diferentes espécies, duas Gram-positivas e duas Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginos* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12128) com cinco dos compostos isolados das folhas da espécie *N. physalodes*, usando o método de densidade ótica (OD), registrando a 620 nm (OD₆₂₀) e usando um leitor automático Elisa (Synergy TM HT Multi-Detection Microtiter Reader), calculando a concentração mínima inibitória (CMI). (VASCONCELOS, *et al.*, 2014)

Amostras: Os compostos nic-1, nic-10, nic-2, nic-7 e nicafigalina B, foram solubilizados em NB com 4% de DMSO, e testadas com uma faixa de concentração de 3,9 ate 250 µg/mL

6.1.1 Resultados da avaliação antibacteriana dos compostos nic-1, nic-10, nic-2, nic-7 e nicafisalina B.

Na Figura 74 a seguir e na Figura 75 (p. 113) podem-se observar os resultados da atividade antibacteriana para os compostos mencionados, os resultados, estão por encima do controle pelo que não se constituem como compostos que apresentem esta atividade.

Figura 74-Diagrama de barras para os resultados referentes às atividades antibacterianas com *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*

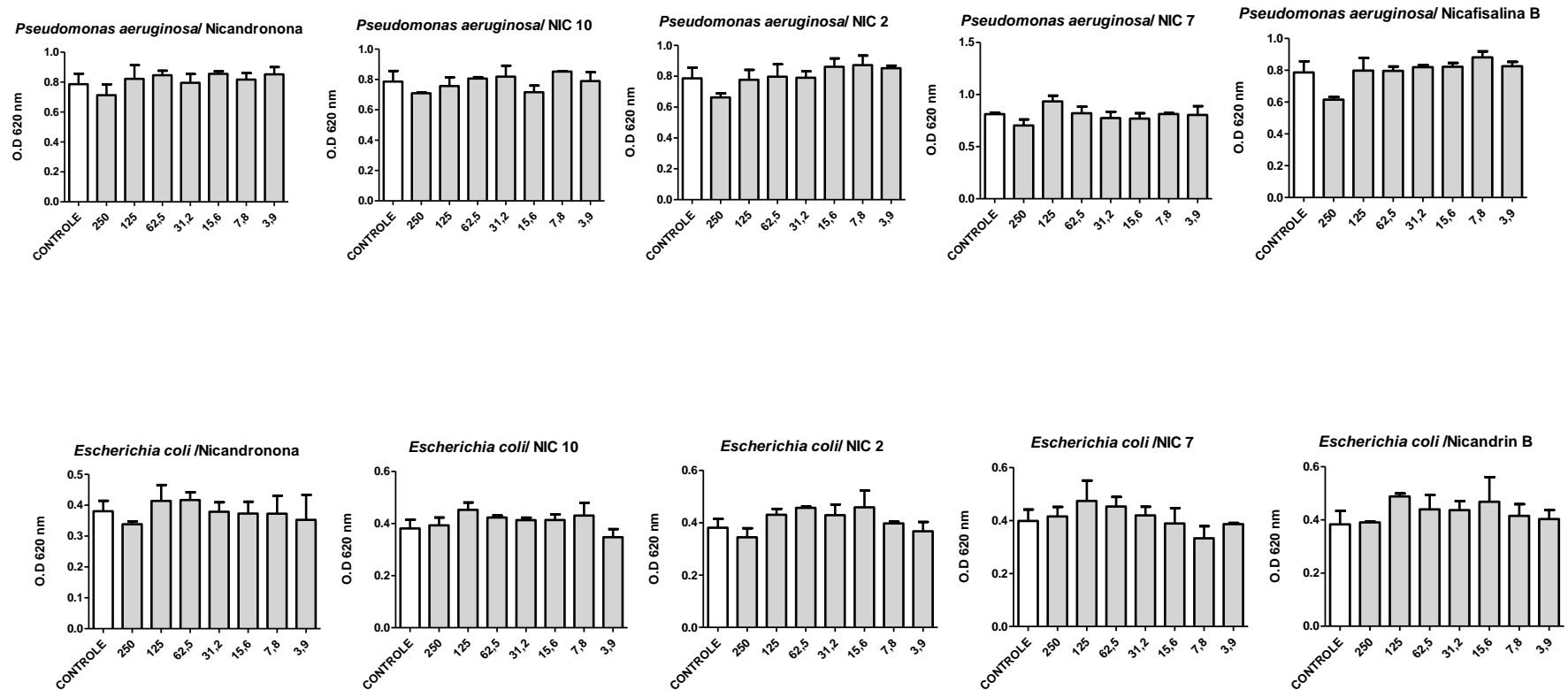


Figura 75-Diagrama de barras para os resultados referentes às atividades antibacterianas com *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*

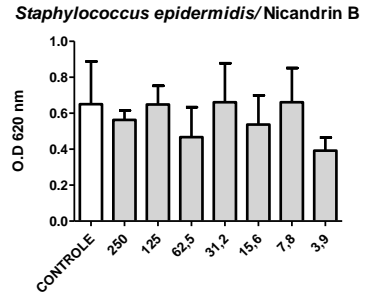
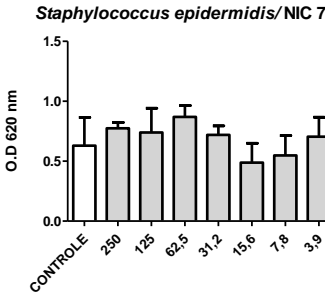
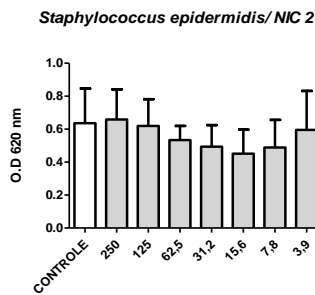
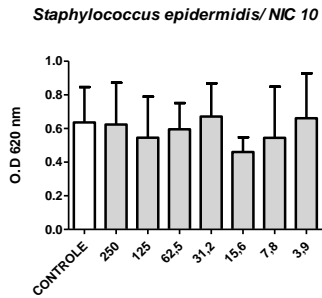
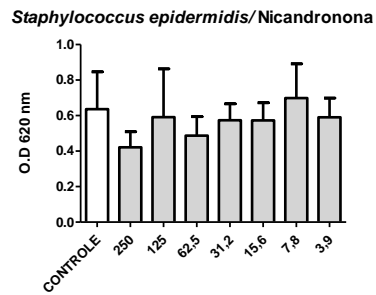
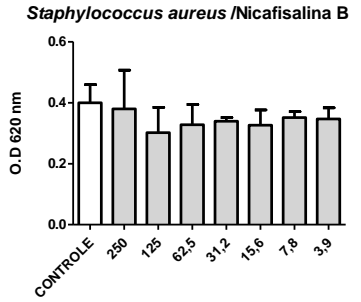
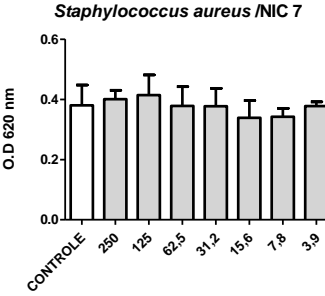
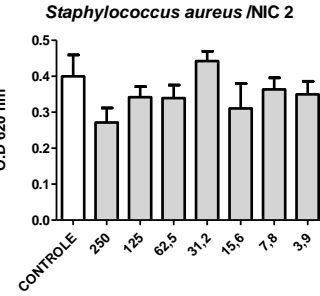
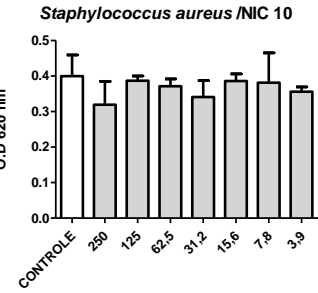
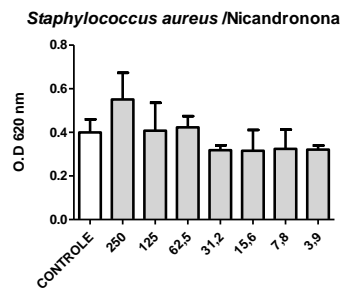
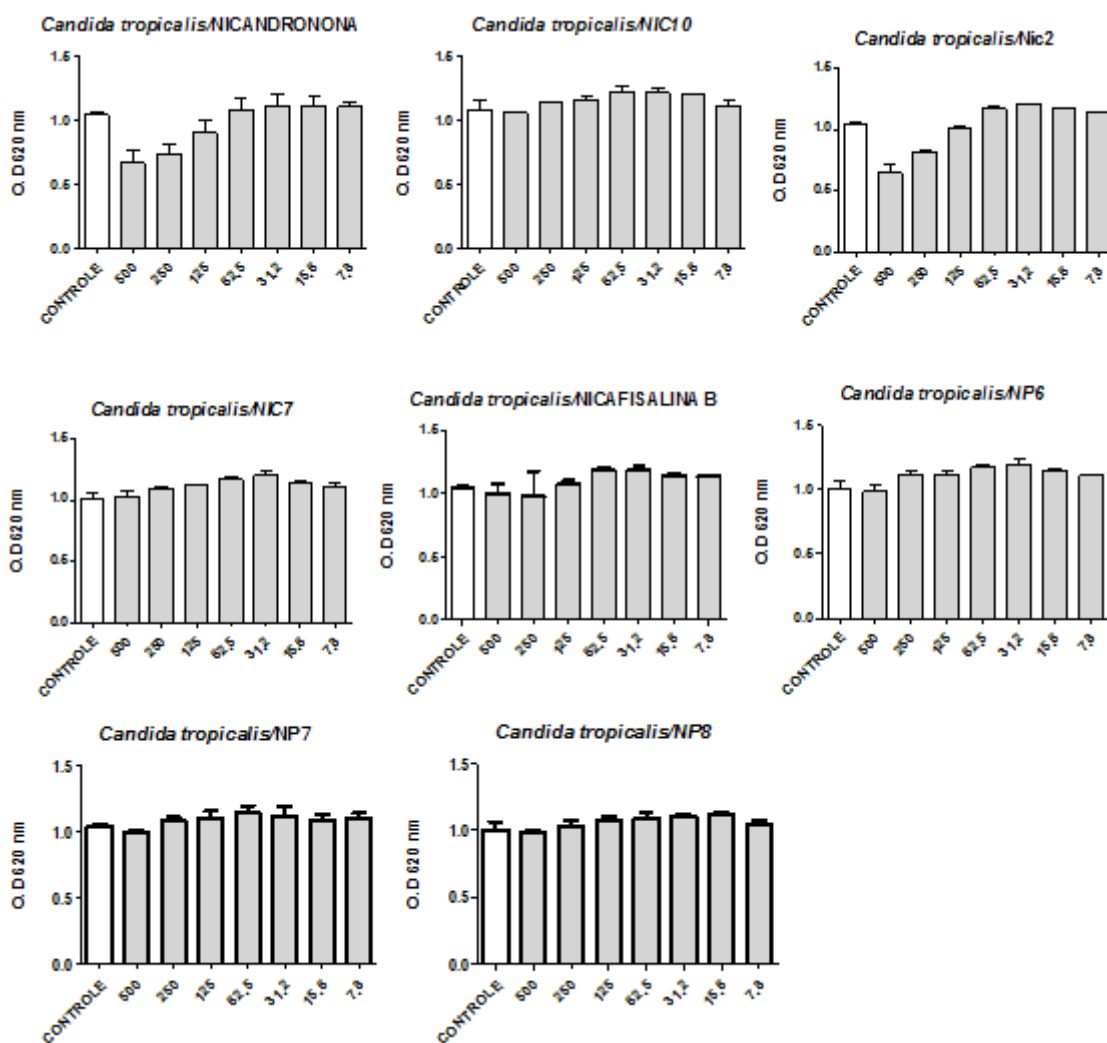


Figura 77-Diagrama de barras para os resultados da avaliação antifúngica contra *Candida tropicalis* dos compostos: nic-1, nic-10, nic-2, nic-7, nicaafisalina B, Np6, Np7 e Np8.



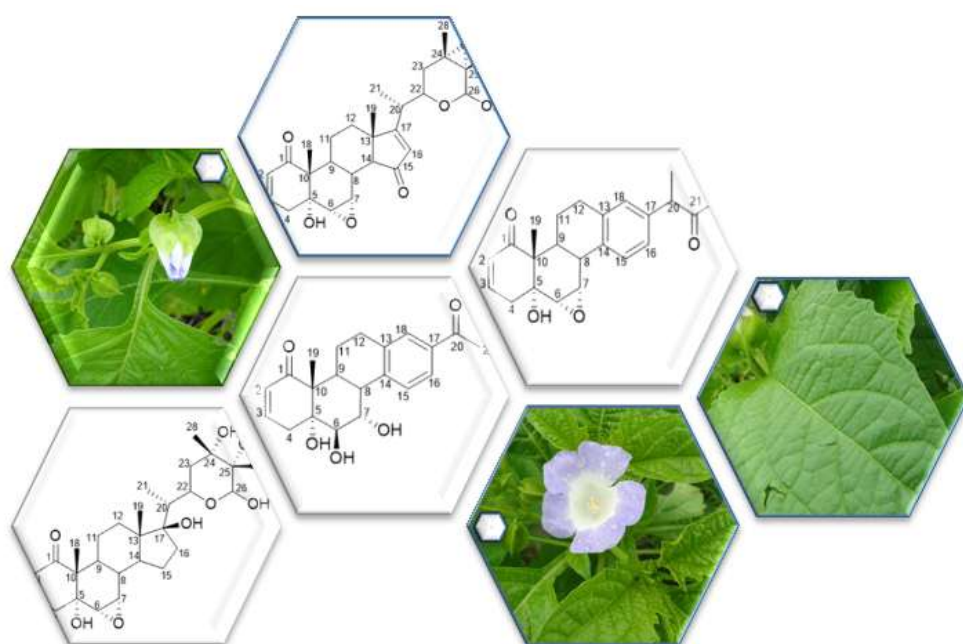
Nas gráficas anteriormente apresentadas, se pode observar evidentemente a baixa eficácia e pouca atividade dos compostos isolados das folhas de *Nicandra physalodes* contras os quatros espécies de bactérias e as duas leveduras, contrário aos resultados esperados, nenhum composto conseguiu superar os resultados comparados com o controle, composto antifúngico e antibacteriano comercial

6.3 Avaliação da atividade larvicida e resultados da atividade

Os ensaios foram feitos com larvas de *Aedes aegypti* em terceiro estágio para cada linhagem, com o auxílio da pipeta de Pasteur foram separadas e distribuídas em recipientes contendo 20 mL das soluções diluídas por um período de 24h. Logo após esse período foram feitas as contagens das larvas que morreram. Os testes foram feitos em triplicata (FURTADO, *et al.*, 2005) (FIGUEREIDO, 2014) (OLIVEIRA, *et al.*, 2002).

Os ensaios foram feitos para dois dos compostos isolados em maior quantidade das folhas da espécie *N. physalodes*, tendo em conta que cada ensaio foi feito por triplicata, desta forma os resultados foram analisados para os compostos nicandrenona (Nic-1) e 6 β ,7 α -dihidroxi-nicandrenona 10

Para a nicandrenona (Nic-1), encontrou-se que a concentração letal 50 (CL₅₀) foi de 256.621 ppm, no entanto os resultados para o composto 6 β ,7 α -dihidroxicandrenona-10, não apresentou atividade larvicida alguma.



CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Mediante a utilização de técnicas cromatográficas, foram isolados e caracterizados nove compostos da classe dos vitanolidos da fração DCM e AcOEt da espécie *Nicandra physalodes* G. As substâncias foram obtidas em quantidade considerável e com satisfatório grau de pureza, o que possibilitou a prospecção química e farmacológica dos compostos.

Do total dos compostos, quatro foram elucidados e determinados como compostos reportados pela primeira vez na literatura, denominados como 15-oxo-nicafisalina B, 6 β -7 α -dihidróxi-nicandrenona-10, 24 β -25 α -dihidróxi-nicandrenona-2, e 17-(1-metilpropan-2-ona)-nicandrenona-10 (**a**) e (**b**), estes últimos compostos presentes como uma mistura epimerica em proporção de 1:1.

A atividade larvicida do composto denominados como nicandrenona (Nic-1) composto maioritário apresento atividade larvicida moderada contra o vector *Aedes aegypti* no tecer estagio de crescimento, por o contrario o composto denominado como 6 β -7 α -dihidróxi-nicandrenona-10 (Np7), não apresento atividade contra o mesmo vector estando por baixo dos testes controle.

Os resultados apresentados, assim como os dados descritos na literatura, apontam a espécie *Nicandra physalodes* como uma prolífica fonte de compostos do tipo vitanolidos, os quais são bioproduzidos especialmente nas folhas.

Finalmente todos os resultados contribuem ao conhecimento químico e farmacológico da espécie *N. physalodes*, assim como a procura de novas atividades devido a seus baixos resultados respeito nos testes realizados, por tanto recomendasse comprovar a atividade citotóxica devido aos crescentes repostes para estes tipos de compostos.

REFERENCIAS

ANJANEYULU, RAO, LEQUESNE. Withanolides, Biological active natural steroidal lactones: A review. **Studies in Natural Products Chemistry**. Boston, v. 20, p. 135-260, 1998.

ALALI, Feras.; AMRINE, Chiraz.; EL-ELIMAT, Tamam.; ALKOFABI, Ahmad.; TAWAHA, Khaled.; GHARAIBAD, Mohamam.; SWANSON, Steven.; FALKINHAM, Joseph.; CABEZA, Marisa.; SANCHEZ, Araceli.; FIGUEROA, Mario.; OBERLIES, Nicholas. Bioactive withanolides from *Whitania obtusifolia*. **Phytochemistry Letters**. Irbid-Jordan, v.9, p. 96-101, 2014.

BATES, Robert.; ECKERT. Nicandrenone, an insecticidal plant steroids derivative with ring D aromatic. **Journal of the American Chemical Society**. California, v. 94, p. 8258-8260, 1972.

BATES, Robert.; MOREHEAD, Steven. Structure of Nic-2, A major steroidal constituent o the insect repellent plant *Nicandra physalodes*. **Journal Chemistry Society**. Washington, p. 125-126, 1974.

BATISTA, Pedro.; DE LIMA, Karisia.; PINTO, Francisco.; TAVARES, Juliane.; UCHOA, Daniel.; COSTA-LOTUFO, Leticia.; ROCHA, Danilo.; SILVEIRA, Edilberto.; BEZERRA, Aantonio.; CANUTO, Kirley.; PESSOA, Otilia. Withanolides from leaves of cultivated *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**. Fortaleza, v, 130, p. 321-327, 2016.

BARREIRO, Eliezer. Biosiversidade: Fonte potencial para a descoberta de farmacos. **Quimica Nova**. São paulo, v. 32, p. 679-688, 2009.

BEGLEY, Michael.; CROMBIE, Leslie.; HAM, Peter.; WHITING, Donald. A new class of natural steroids, with ring D aromatic, from *Nicandra physalodes* (Solanaceae)-X-Ray analysis of Nic-10 and structures of Nic-1 (Nicandrenone)-12 and -17. **Journal Chemistry Society, Perkin trans I**. Nottingham, v. 1, p. 304-308, 1976_a.

BEGLEY, Michael.; CROMBIE, Leslie.; HAM, Peter.; WHITING, Donald. Structures of three oxygenated 24-methyl-steroids (Nic-3, -7, and -1 I) from the insect repellent plant *Nicandra physalodes* (Solanaceae): X-Ray analysis of Nic-3 acetate and Nic-11 ethyl ether. **Journal Chemistry Society, Perkin trans I**, Nottingham, v. 5, p. 296-304, 1976_b.

CAO, Cong-Mei.; ZHANG, Huaping.; GALLAGHER, Robert.; DAY, Victor.; KINDSCHER, Kelly.; GROGAN, Patrick.; COHEN, Mark.; TIMMERMANN, Barbara. Withanolides from *Physalis hispida*. **Journal of Natural Products**. Kansas, v. 77, n. 3, p. 631-639, 2013.

CHEN, Li-Xia.; HE, Hao.; QIU, Feng. 2011. Natural withanolides: an overview. **Nat. Prod.** Shenyang, Res. 28, 705-740.

CHATAING, Bernardo.; USUBILLAGA, Alfredo.; PEREZ, Cesar.; MENDEZ, Ramón. Citotoxic activity of Acnistus upon human cancer cells. **Pharmacologyonline**. Zulia, v. 3, p. 139-149, 2012.

D'ARCY, William Gerald. Solanaceae II typification of subdivisions of Solanum. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. Missouri, v. 59, p. 262-278, 1972.

DHAR, Niha.; RAZDAN, Summer.; BHAT, Wajid.; VISHWAKARMA, Ram.; LATTOO, Surrinder. A decade of molecular understanding of withanolides biosynthesis and *In vitro* studies in *Withania somnifera* (L.) Dunal: Prospects and perspectives for pathway engineering. **Frontiers in Plant Science**. Jammu Tawi, v. 6, p 1031, 2015.

FIGUEREIDO, Pablo. Estudo químico e atividade larvívica do óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* L. **Dissertação de mestrado**. Fortaleza, UFC, 2014.

FOGLIO, Mary Ann.; QUEIROGA, Carmen Lucia.; OLIVEIRA, Ilza Maria.; FERREIRA, Rodney Alexandre. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**. Campinas, v. 1, 2006.

FURTADO, Roselayne.; LIMA, Maria.; ANDRADE, Manoel.; BEZERRA, Jose.; SILVA, Maria. Atividade larvívica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Public Health**. Fortaleza, v.35, p. 843-847, 2005.

GLOTTER, KIRSON, ABRHAM, KRINSKY. Nic-1 Lactona, a minor steroidal constituent of *Nicandra physalodes* (Solanaceae). **Phytochemistry**. Jerusalem, v. 15, p. 1317-1318, 1976.

GOTTLIEB, Hugo.; KIRSON. ¹³C NMR Spectroscopy of the Withanolides and Other Highly Oxygenate C₂₈ Steroids. **Organic Magnetic Resonance**. Kansas, v. 16, p.20-25, 1981.

GRIFFITHS, Rhodri.; WATSON, Alison.; KIZU, Haruhisa.; ASANO, Naoki.; SHARP, Hazel.; JONES, George.; WORMALD, Mark.; FLEET, George.; NASH, Robert. The isolations from *Nicandra physalodes* and identification of the 3-o-β-D-glucopiranosido of 1α,2β,3α,6α-tetrahydroxy-nor-tropane (Calistegina B1). **Tetrahedron Letters**. Aberystwyth, v.37, n.18, p. 3207-3208, 1996.

GUTIERREZ, Fatima.; REYES, Guadalupe.; AUDISIO, Marcela.; URIBURU, Maria.; LEIVA, Segundo.; BARBOZA, Gloria.; NICOTRA, Viviana. Withanolides with antibacterial activity from *Nicandra jonh-tyleriana*. **Journal of Natural Products**. Cordoba, v. 78, p. 250-257, 2015.

JINUKUTI, Mary.; GIRI, Archana. Anticancer activity of acetone and methanol extracts of *Terminalia chebula* Retz and *Withania somnifera* (Linn.) Dunal on HeLa cell line. **Annals of Phytomedicine**. Telangana, v. 4, p. 88-92, 2015.

KUN, Yi.; BO, Li.; KAI, Lu. New withanolides from *Nicandra physalodes* (Solanaceae). **Plant diversity and Resources**. Kunming v. 34, n. 1, p. 101-106, 2012.

LAVIE, GLOTTER, SHVO. Constituents of *Whitania somnifera* A. **Journal Organic Chemistry**. Rehovoth, v. 30, p. 1774-1778, 1965.

LAN, Yu-Hsuan.; CHANG, Fang-Rong.; PAN, Mei-Jung.; WU, Chin-Chung.; WU, Shu-Jing.; CHEN, Su-Li.; AN WANG, Shyh-Shy.; WU, Ming-Jung.; WU, Yang-Chang. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. **Food Chemistry**. Kaohsiung, v. 116, p. 462-469, 2009.

LOCKLEY, William.; REES, Huw.; GOODWIN, Trevor. Biosynthesis of steroidal withanolides in *Whithania somnifera*. **Phytochemistry**. Liverpool, v. 15, p. 937-939, 1975.

MAIA, Ana Isabel. Prospecção química de *Acnistus arborescens* (L) Schltldl visando a caracterização de vitaesteroides através de Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas. **Teses de Doutorado**. Universidade Federal de Ceara. Fortaleza, p. 43-44, 2010.

MALDONADO, Emma.; HURTADO, Norma.; PEREZ-CASTORENA, Ana.; MARTINEZ, Mahinda. Citotoxyc 20,24-epoxywythanolides from *Physalis angulata*. **Steroid**. Coyoacán, v. 104, p. 72-78, 2015.

MONTANARI, Carlos Alberto.; BOLZANI, Vanderlan. Planejamento racional de farmacos baseado em produtos naturais. **Quimica nova**. São Paulo, v. 24, p. 105-111, 2001.

MINGUZZI, Sandro.; BARATA, Lauro.; CORDELL, Geoffrey. Citotoxic derivatives of withanolides isolated from leaves of *Acnistus arborescens*. **Quimica Nova**. Mato Grosso, v. 34, p 237-241, 2011.

MUKUNGU, ABUGA, MUNGAI, BOSIRE, KARUMI. Isolation an structural elucidation of compounds from the non-alkaloidal extract of *Nicandra physalodes* and the antimicrobial activity of Withanicandrin. **East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences**. Nairobi, v. 16, p. 49-53, 2013.

NEE, Michael. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Solanaceae. **Rodriguesia**. Rio de Janeiro, v. 58, n. 3, p. 695-702, 2007.

NURIT, AGRA. Estudo farmacobotanico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Paraíba, v.15, n. 4, p. 344-351, 2005.

OLIVEIRA, Mailcar.; LEMOS, Telma.; MATTOS, Marcos.; SEGUNDO, Taciana; SANTIAGO, Gilvandete.; BRAZ-FILHO, Raimundo. New enamines derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Fortaleza, v. 74, p. 211-221, 2002.

OREJUELA, Andres.; VELEZ, Jorge Mario.; OROZCO, Clara Ines. *Gêneros de Solanaceae da Colômbia*. Instituto de Ciências Naturais Universidade Nacional da Colômbia. **Science & Education, The fiel museum, Chicago**. Chicago, v. 1, p. 1-16, 2013.

SIVANANDHAN, Ganeshan; SELVARAJ, Natesan; GANAPATHI, Andy; MANICKAVASAGAM, Markandan. Enhanced Biosynthesis of Withanolides by Elicitation and Precursor Feeding in Cell Suspension Culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in Shake-Flask Culture and Bioreactor. **PLOS ONE**. Indiana, v.9, p.1-11, 2014.

SHINGU, Kazuchi.; YAHARA, Shoji.; NOHARA, Toshihiro. Five new Ergostane-Related compounds from *Nicandra physalodes*. **Chemistry pharmaceutical Bull.** Kumamoto, v.42, n. 2, p. 318-321, 1994.

SONEGO, Juan.; CIRIGLIANO, Adriana.; CABRERA, Gabriela.; BURTON, Gerardo.; VALEIRO, Adriana. Synthesis and antifungal activity of C-21 steroids with an aromatic D ring. **Steroids**. Buenos Aires, v. 78, p. 644-650, 2013.

VASCONCELOS, Mayron.; ARRUDA, Francisco.; SANTOS, Hécio.; RODRIGUES, Adriano.; BANDEIRA, Paulo.; ALBUQUERQUE, Maria.; CAVADA, Benildo.; TEIXEIRA, Edson.; HENRIQUES, Mariana.; PEREIRA, Maria. Effect of a casbane diterpene isolated from *Croton nepetaefolius* on the prevention and control of biofilms formed by bacteria and Candida species. **Industrial Crops and Products**. Fortaleza, v. 61, p. 499-509, 2014.

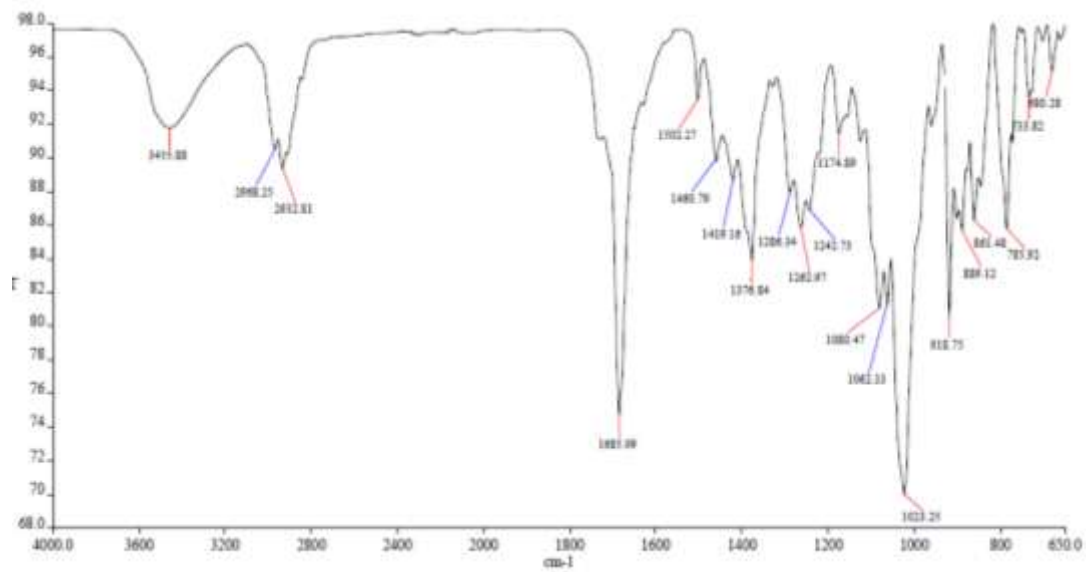
VIEGAS Claudio.; DA SILVA, Vanderlan. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**. São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WEBER, Carolina.; LOPES, Moises.; MING, Lin Chau.; ODONNE, Guillaume.; FERREIRA, Valdely. Antimalarial plants used by undigenous people of the Upper Rio Negro in Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. Rio Negro, v. 178, p. 188-198, 2016.

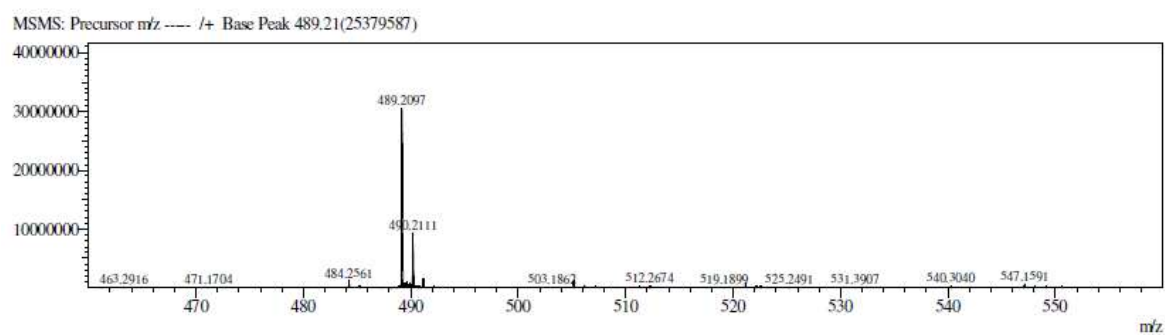
YADAV, RATHI, PEDNEKAR, REWACHANDANI. A detailed review on Solanaceae family. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**. India, v. 3, n. 1, p. 369-378, 2016.

ANEXOS

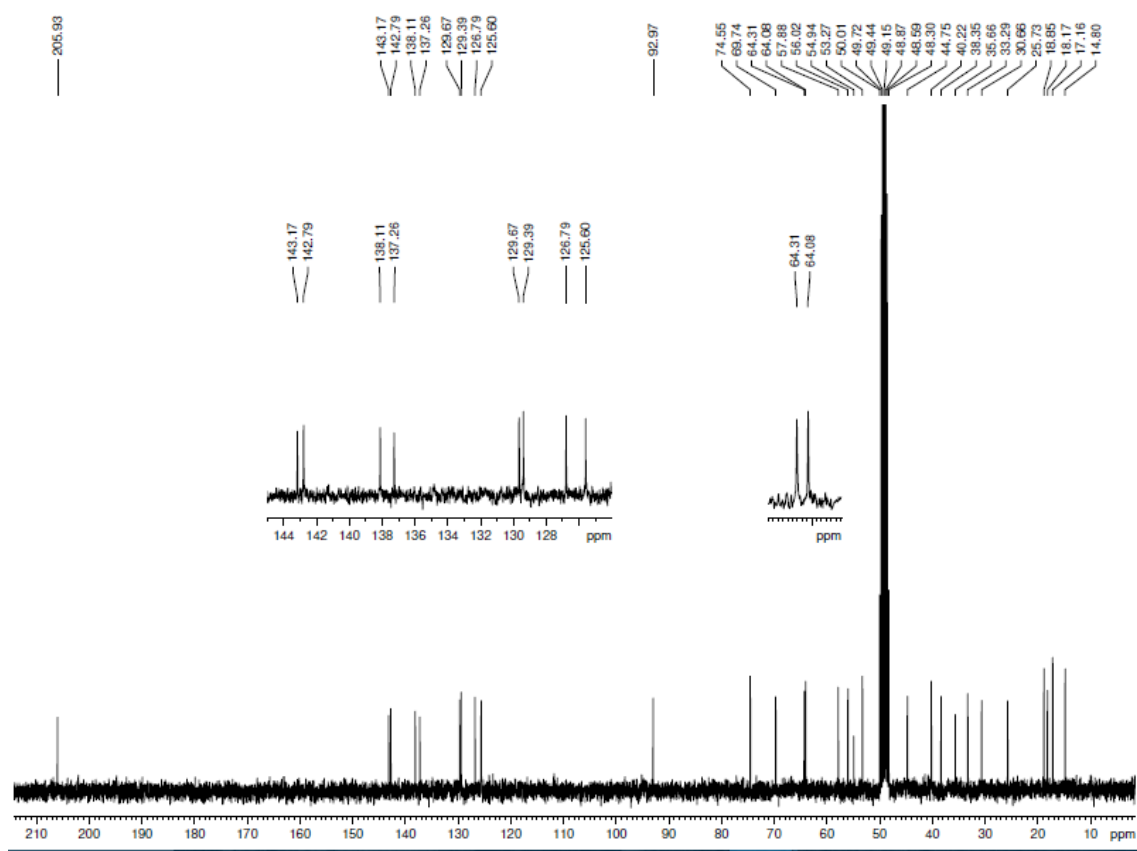
Anexo 1- Espectro na região do infravermelho (IV) do composto Np2



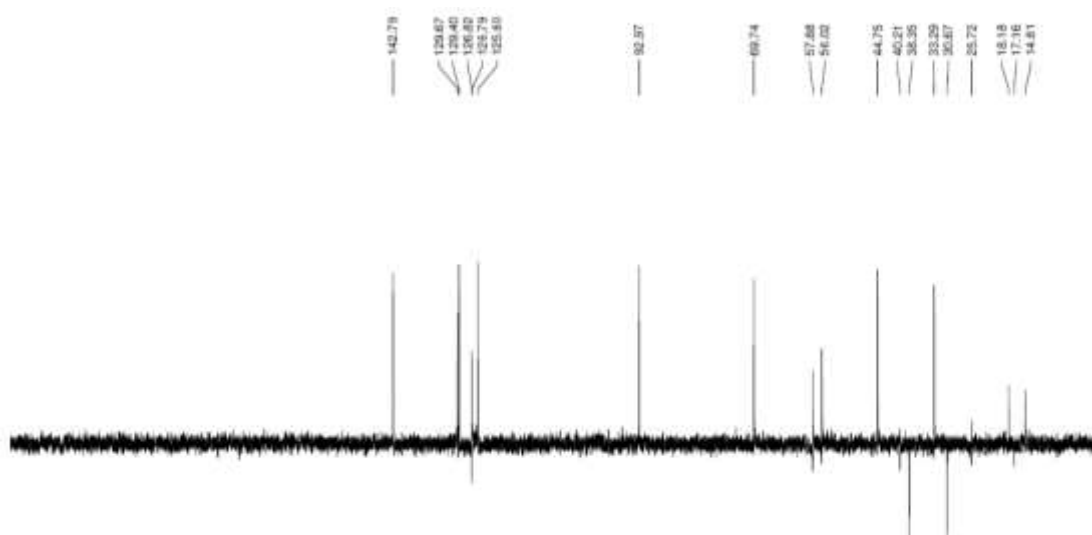
Anexo 2- Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np2

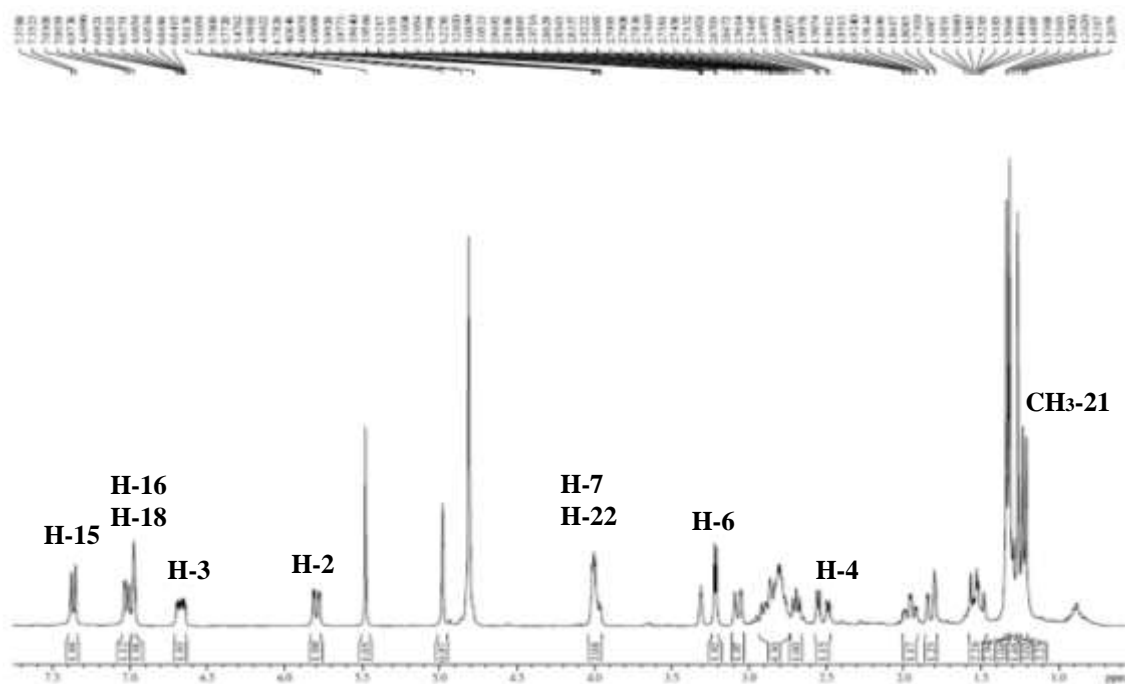
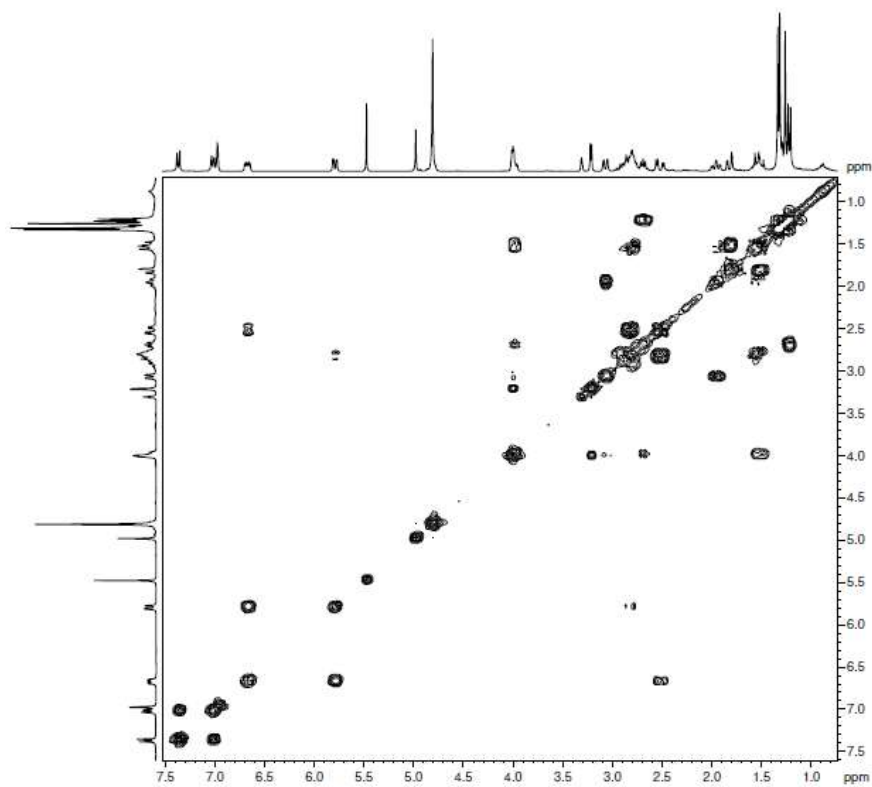


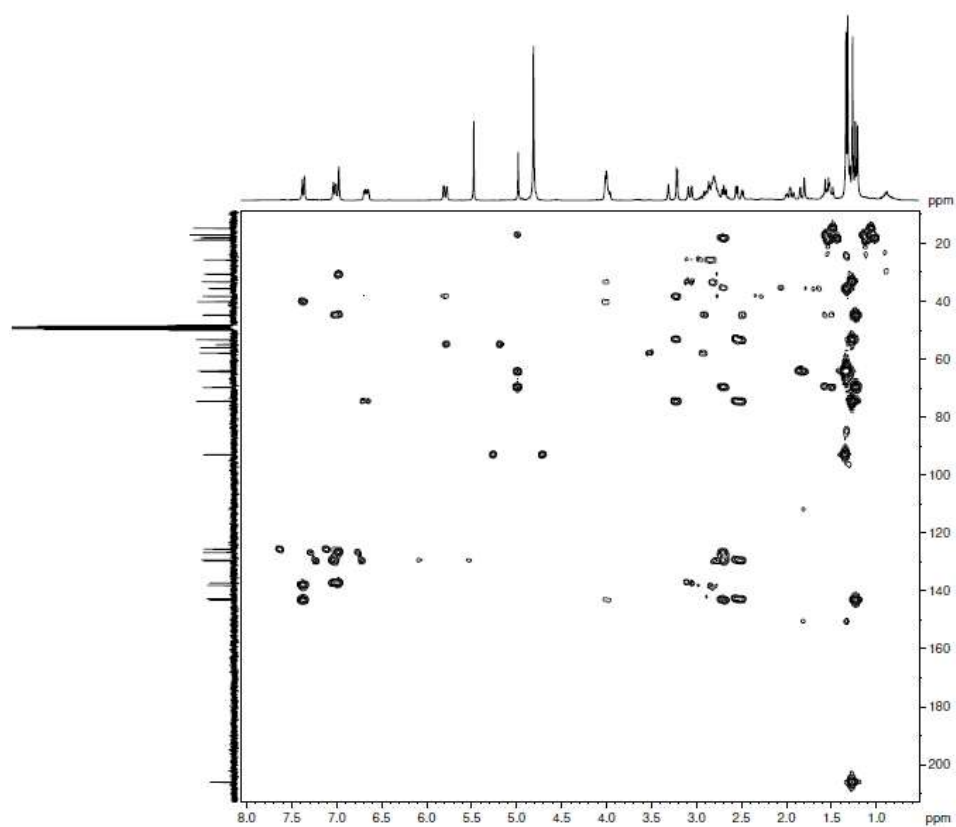
Anexo 3- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [MeOD, 75,4 MHz] de Np2.

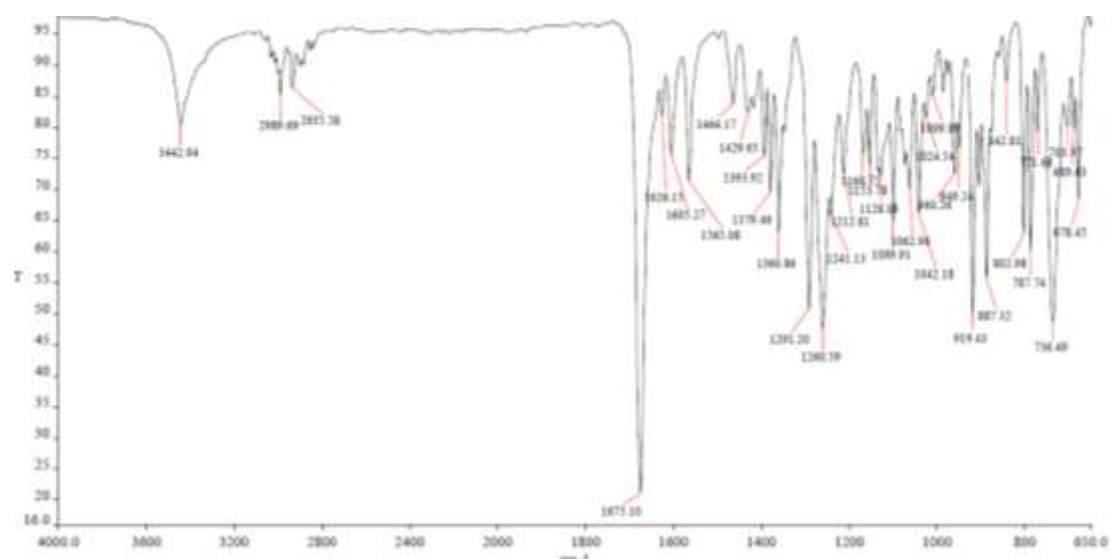
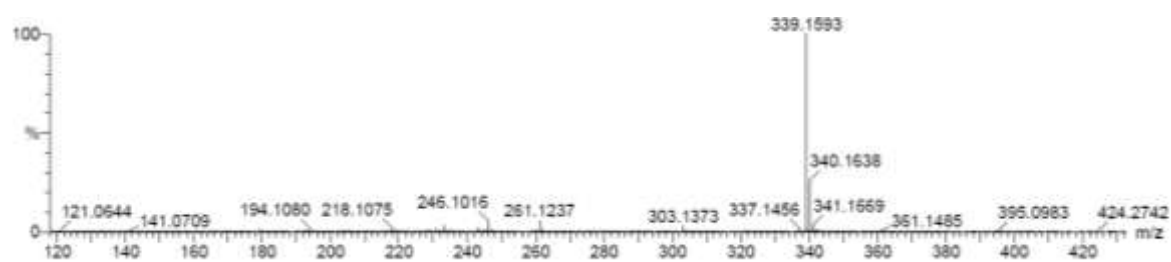


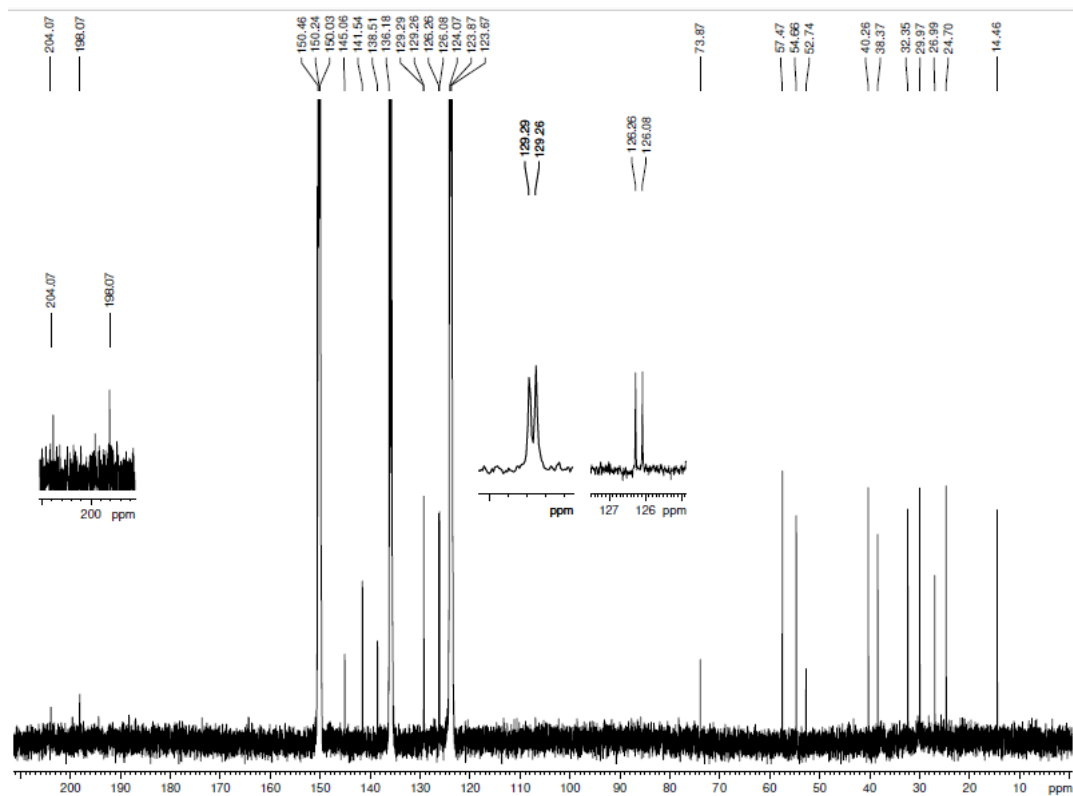
Anexo 4- Espectro de DEPT 135° [MeOD, 75,4 MHz] de Np2

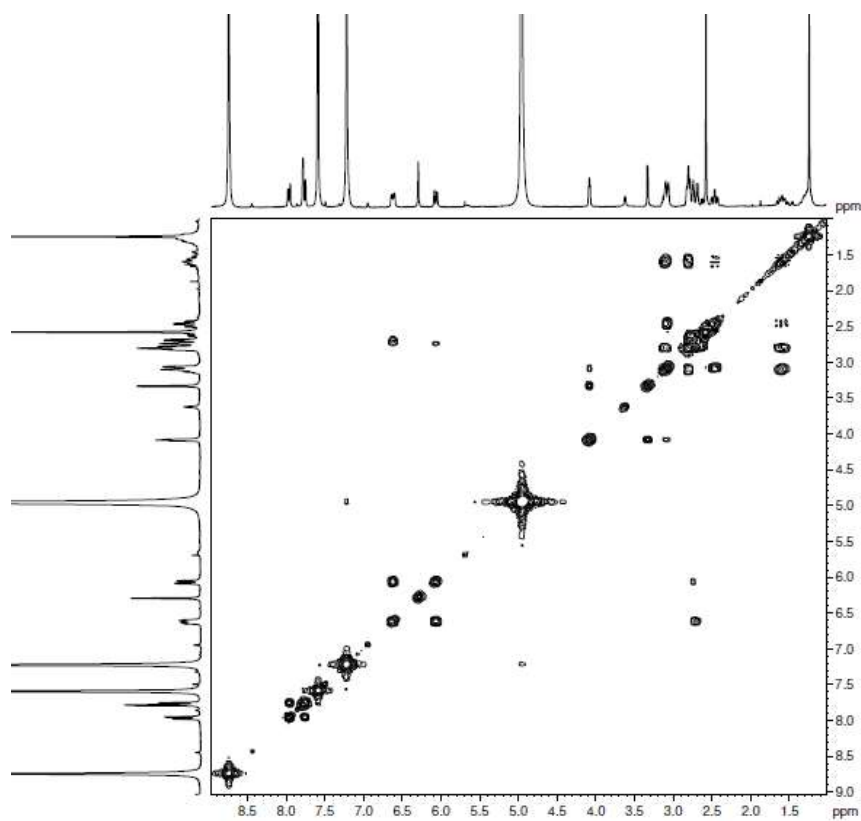
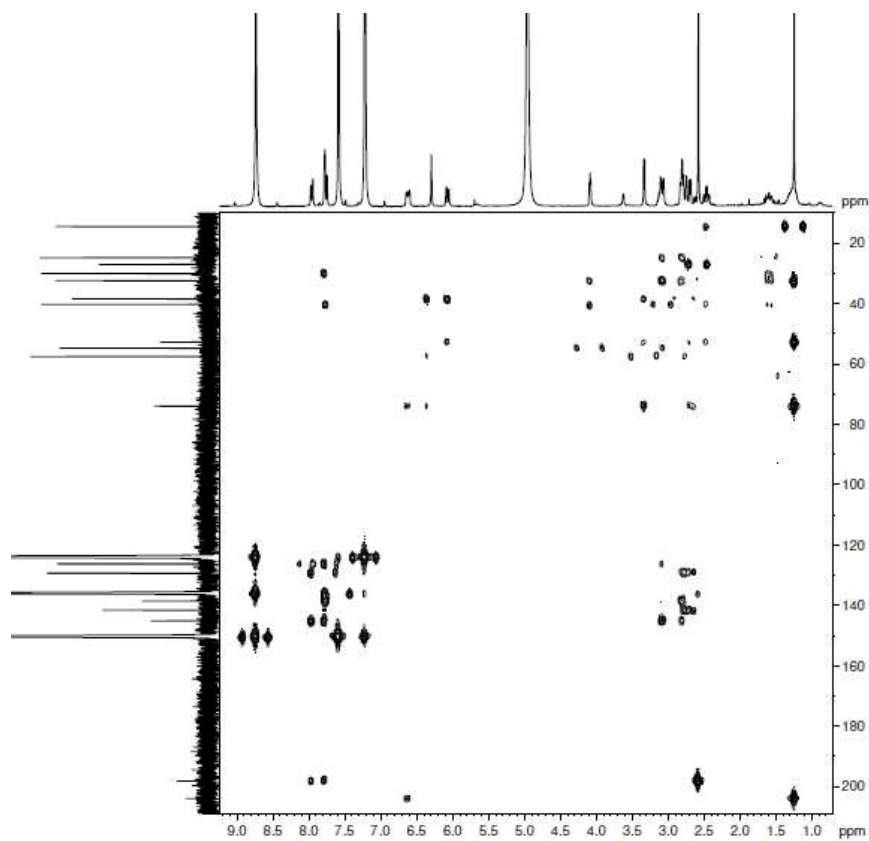


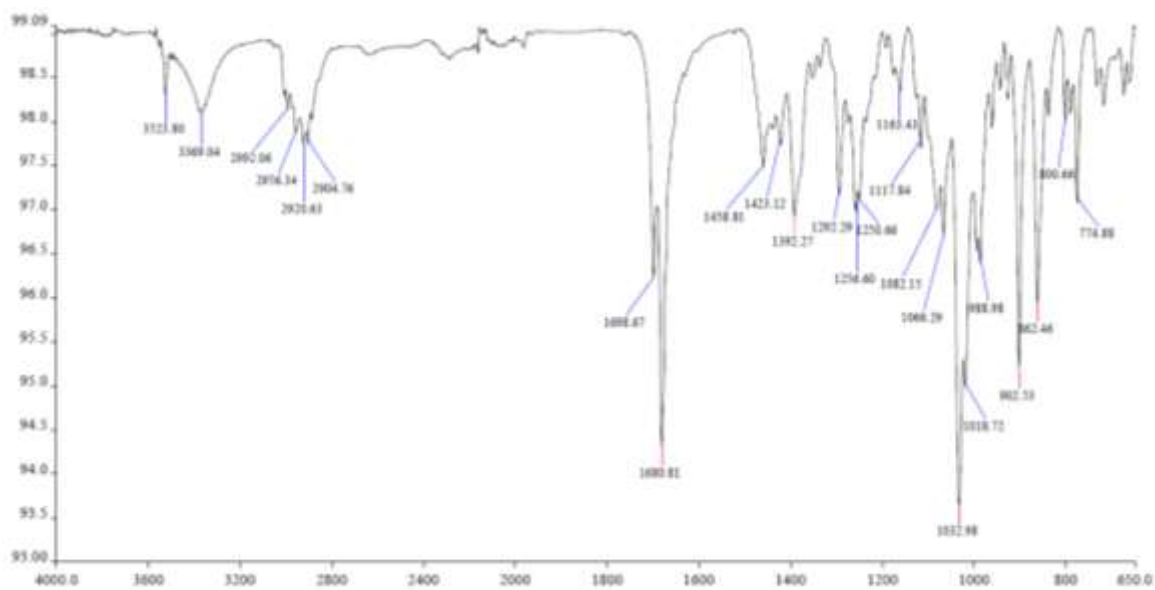
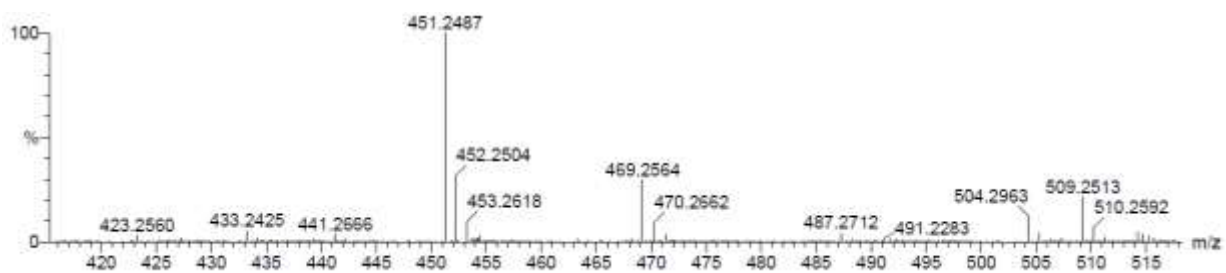
Anexo 5- Espectro de RMN de ^1H [MeOD, 300 MHz] de Np2**Anexo 6-** Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np2

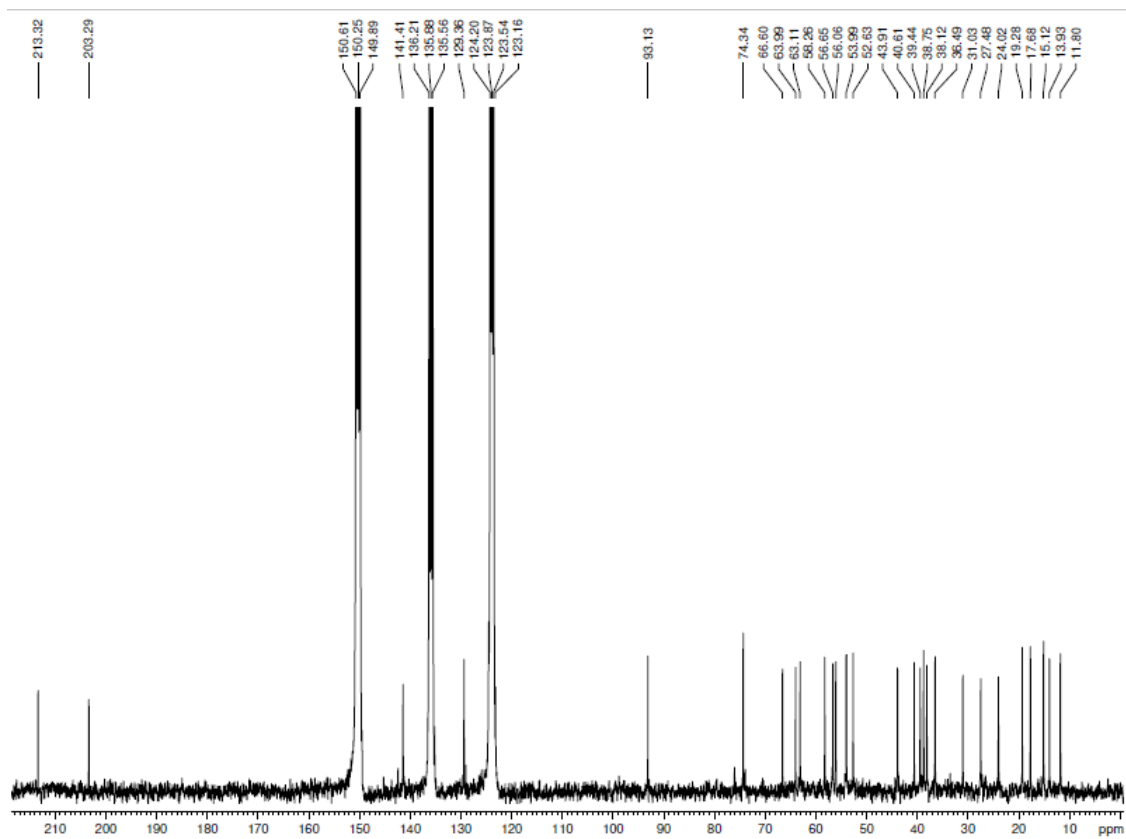
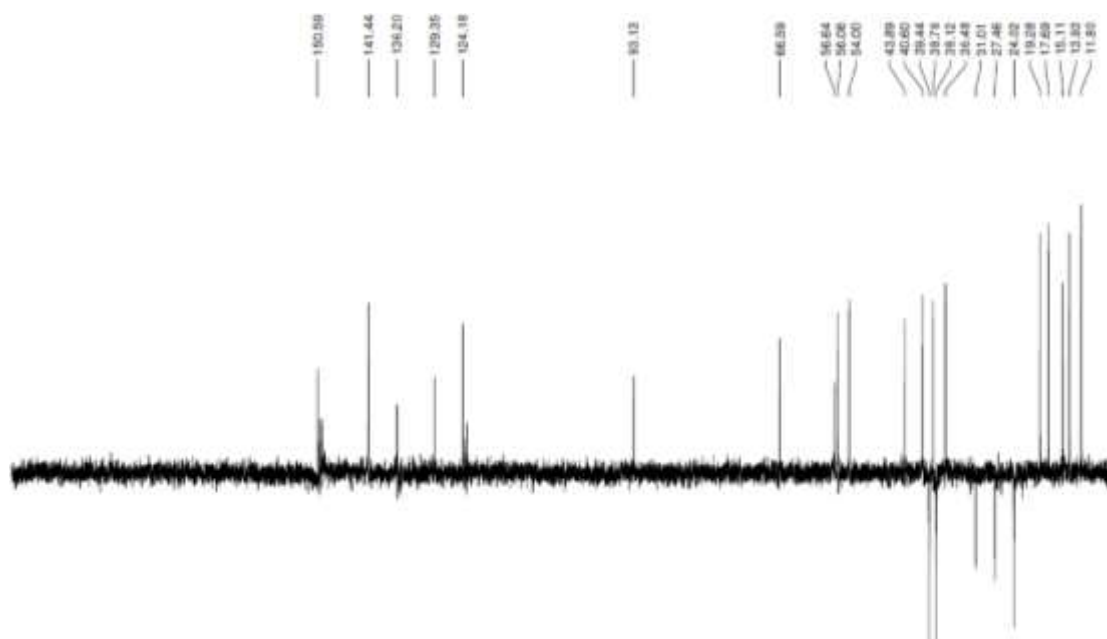
Anexo 7- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np2

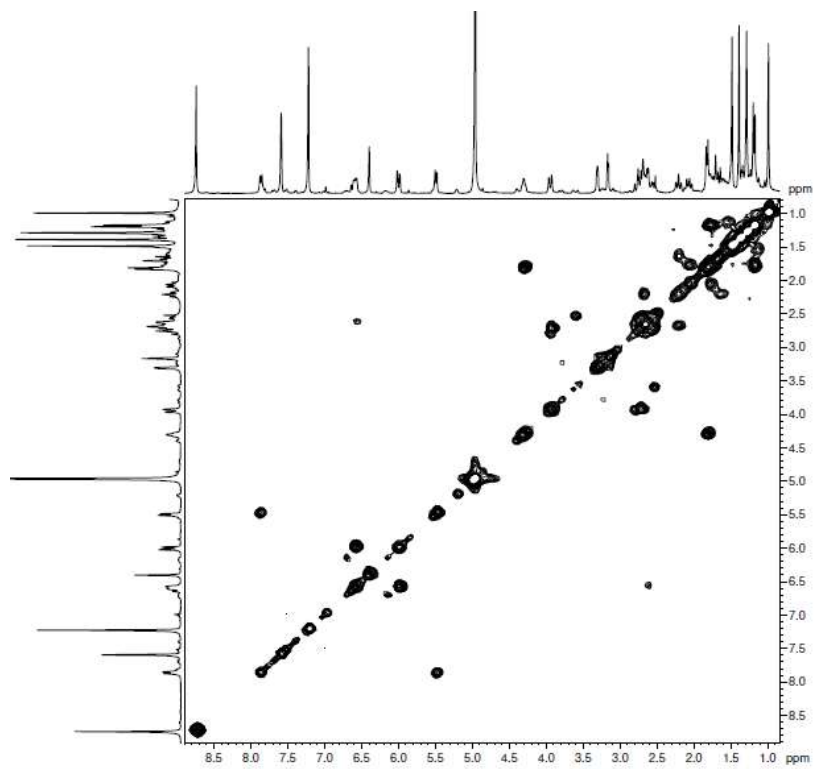
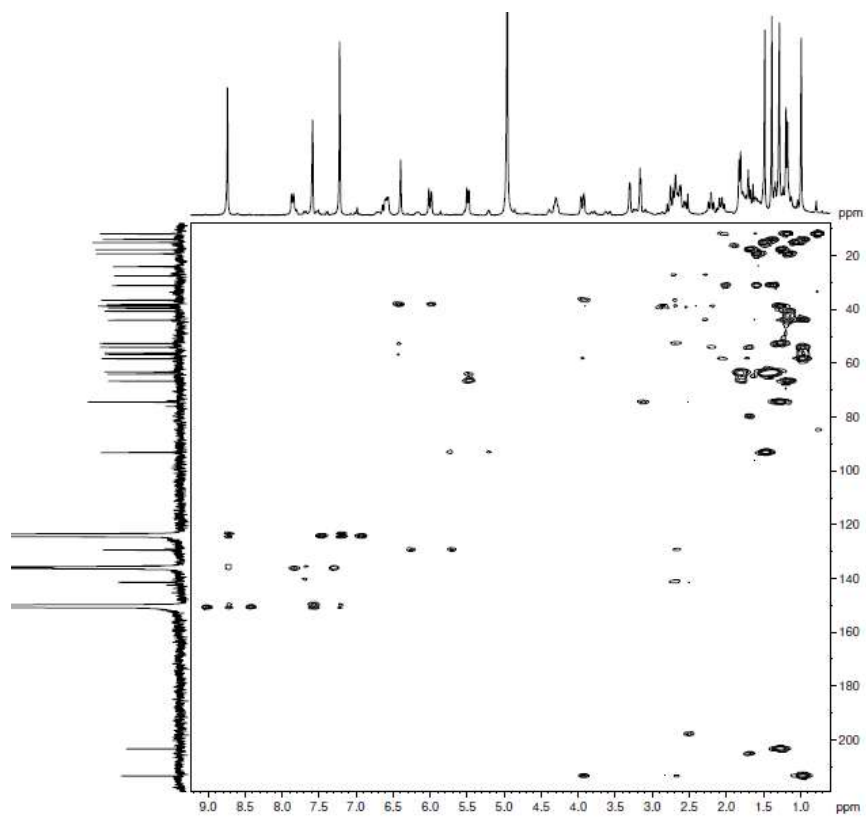
Anexo 8- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np1**Anexo 9-** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np1

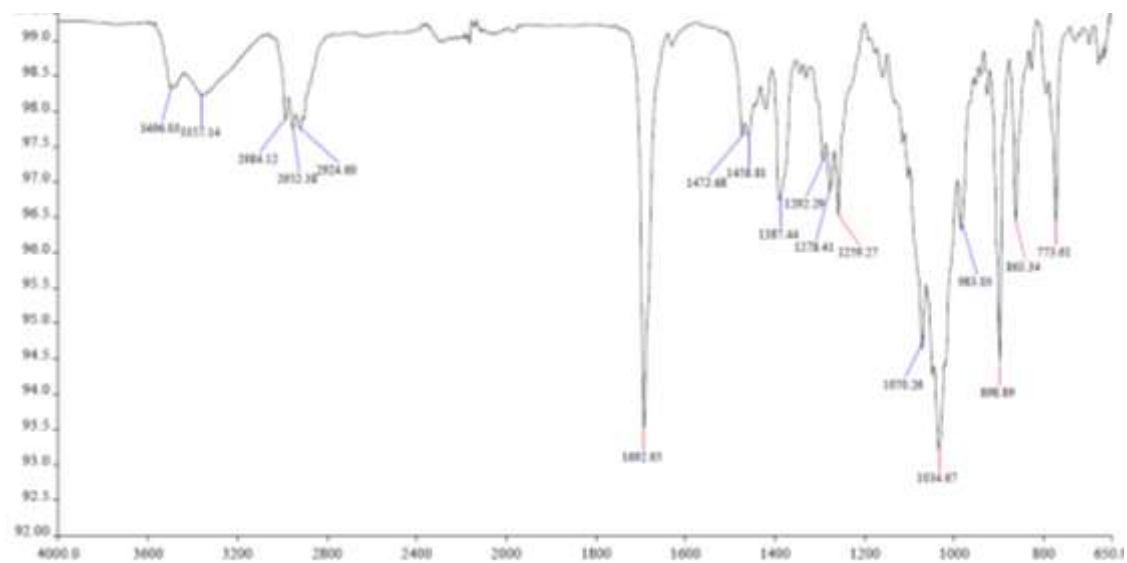
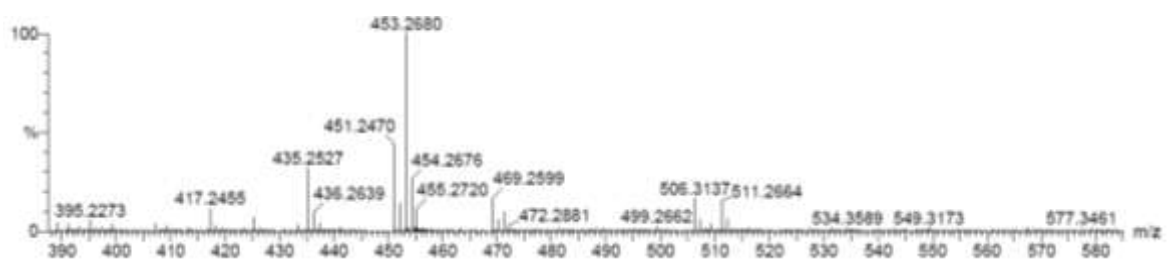
Anexo 10- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np1

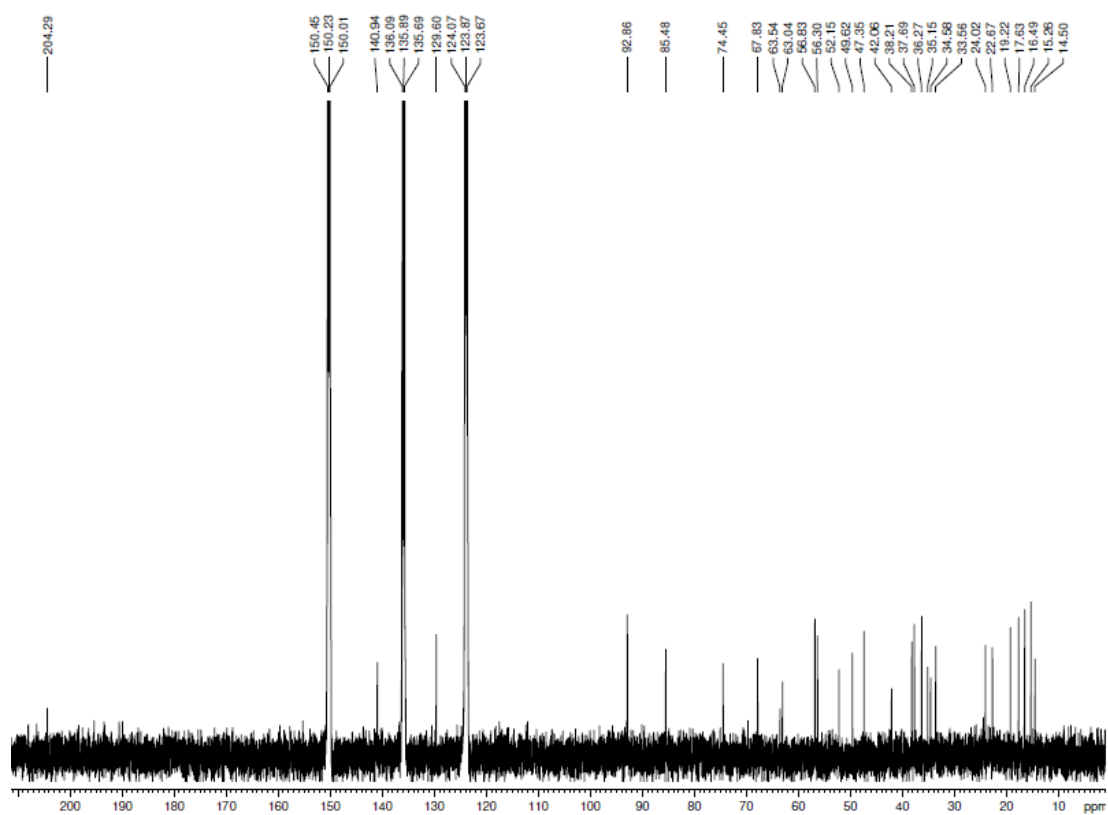
Anexo 13- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np1**Anexo 14-** Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np1

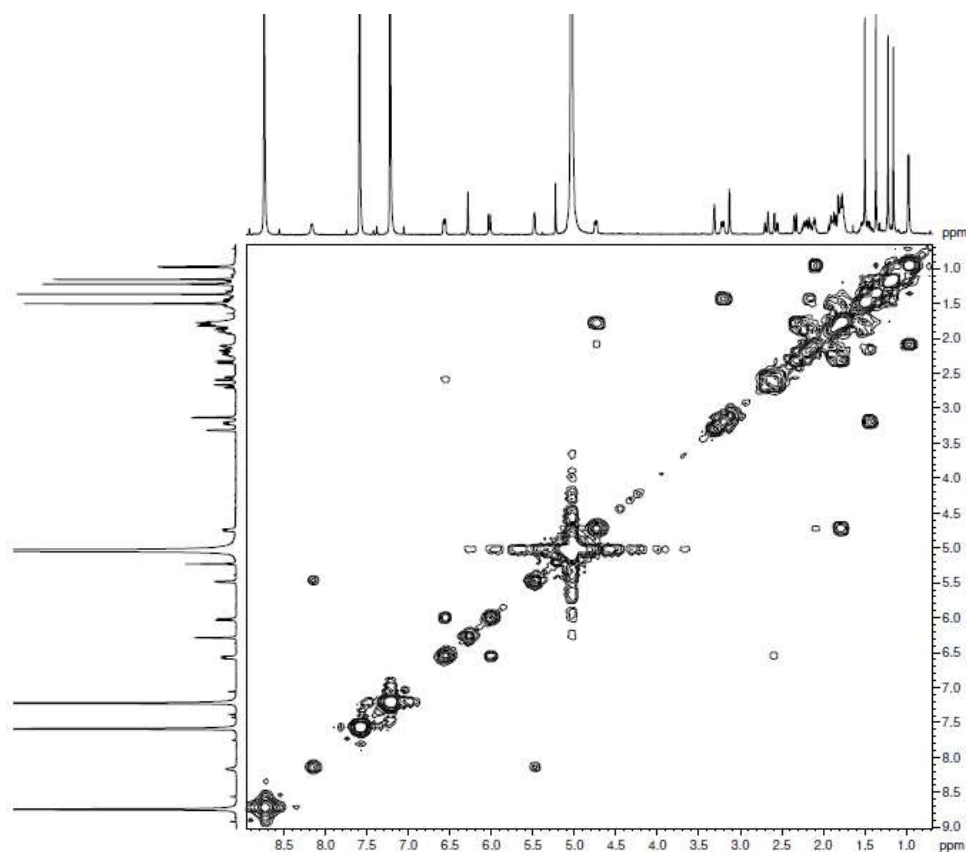
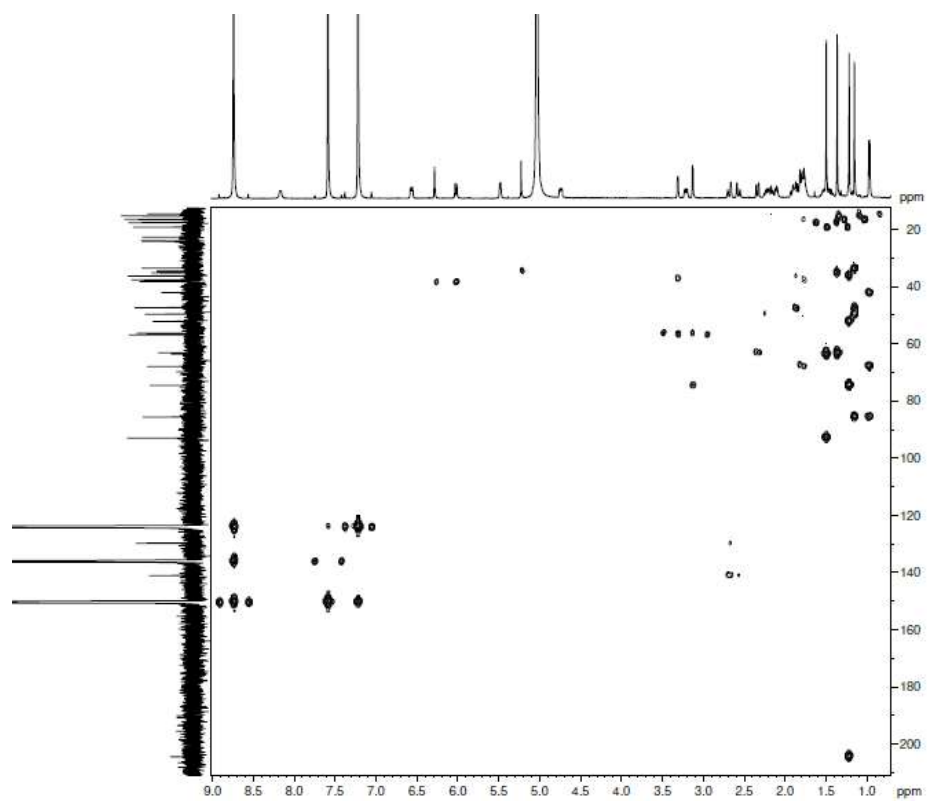
Anexo 15- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np3**Anexo 16-** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np3

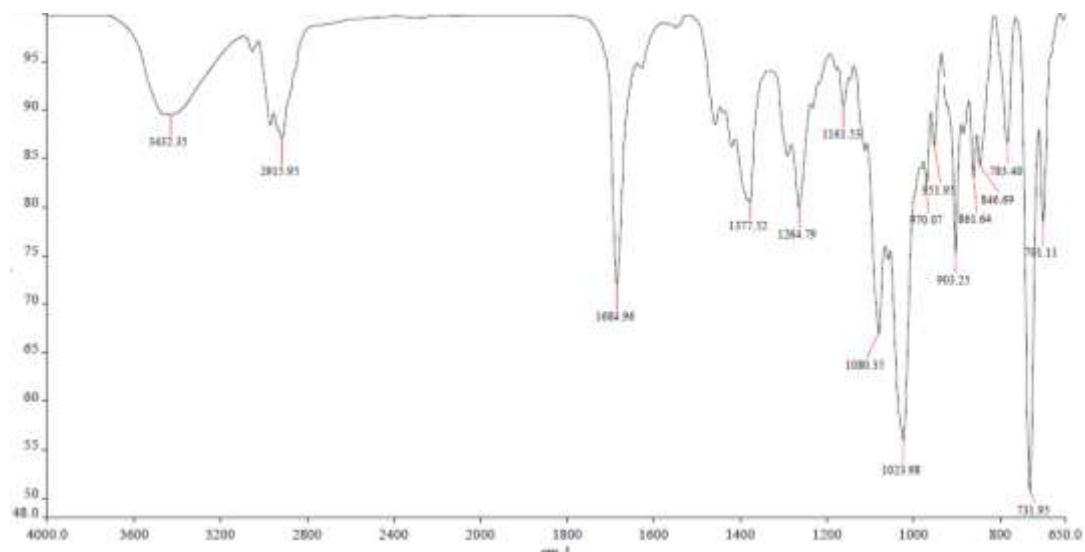
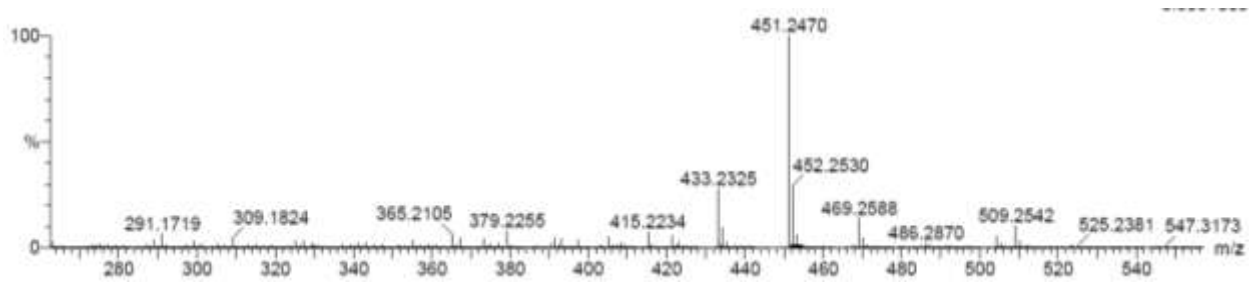
Anexo 17- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np3Anexo 18- Espectro de DEPT 135° [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np3

Anexo 20- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np3**Anexo 21-** Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np3

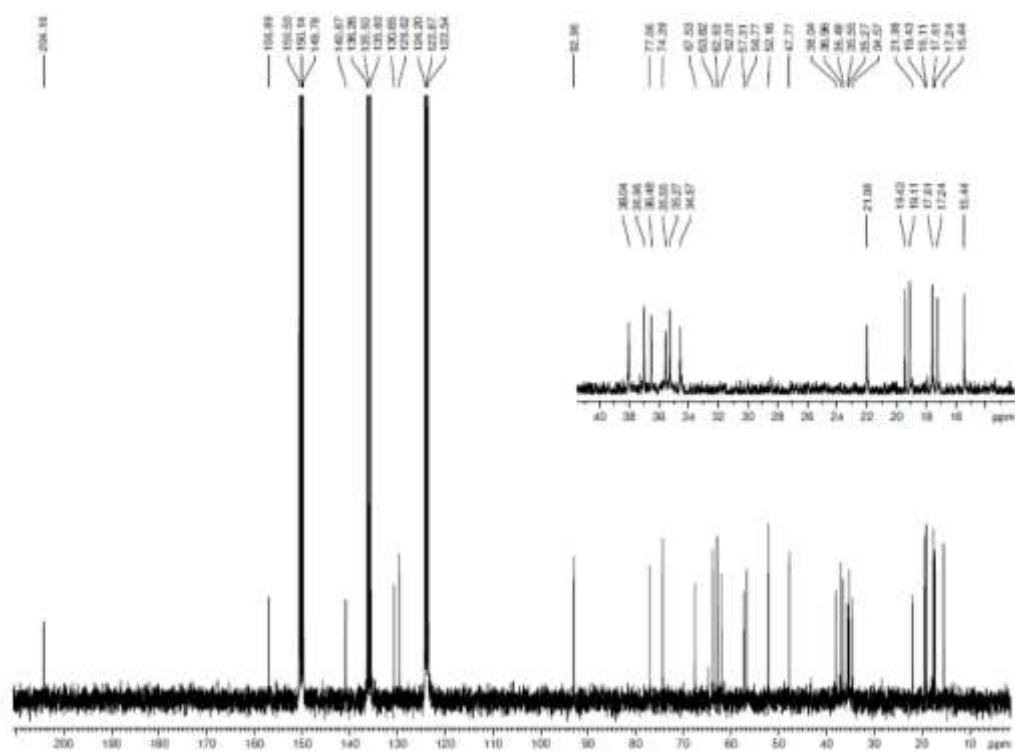
Anexo 22- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np4**Anexo 23-** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) de Np4

Anexo 24- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina-*d*₅, 75,4 MHz] de Np4

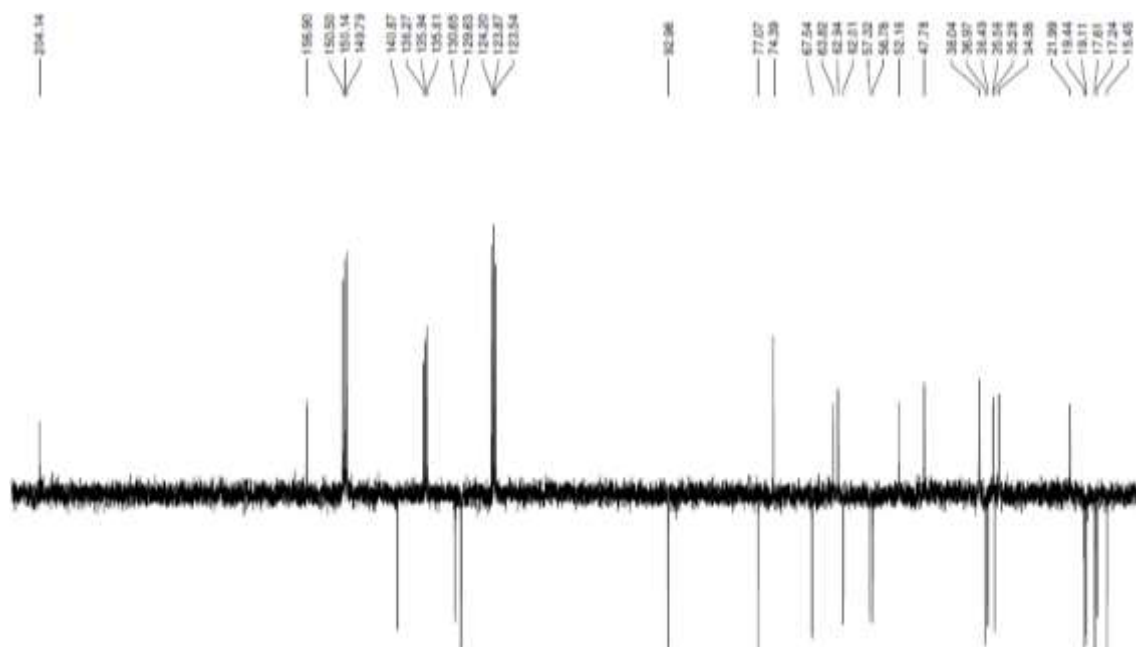
Anexo 27- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np4**Anexo 28-** Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np4

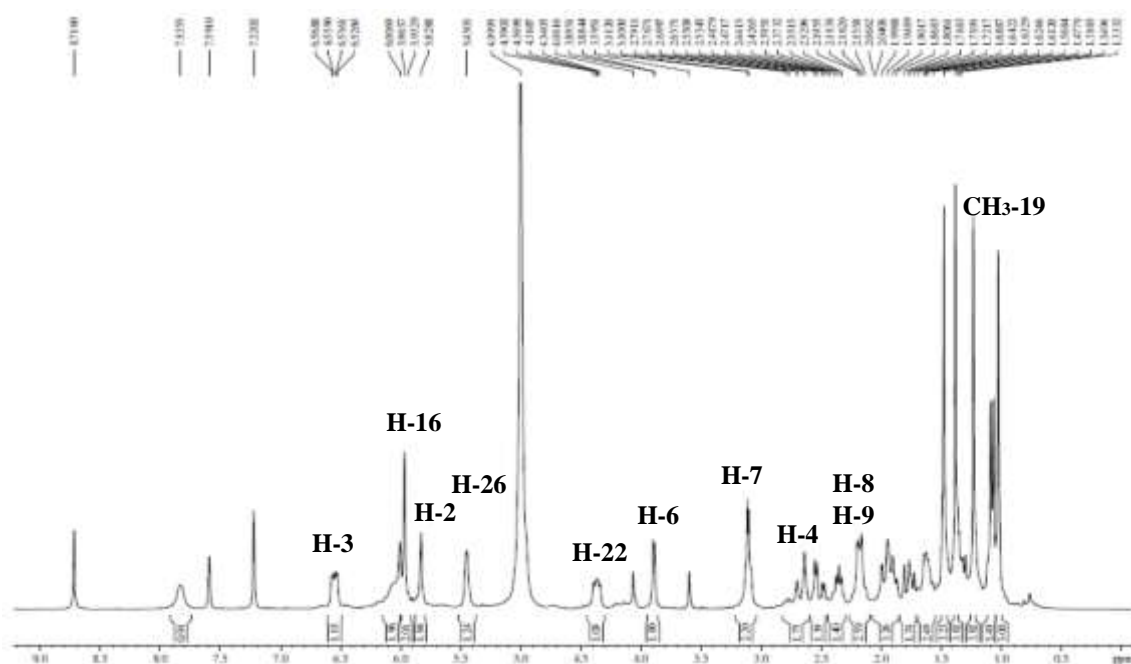
Anexo 29- Espectro na região do infravermelho (IV) de Np5**Anexo 30-** Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np5

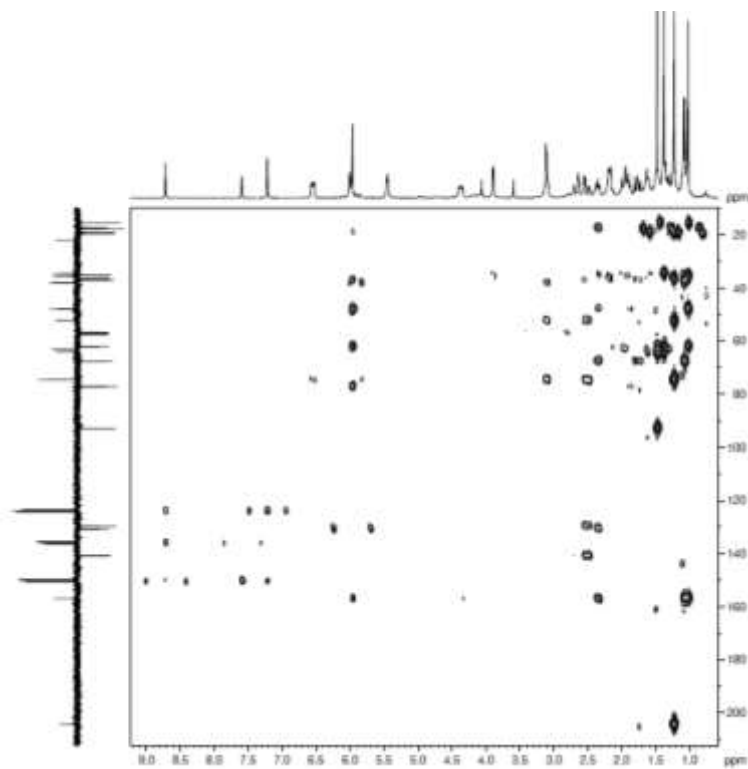
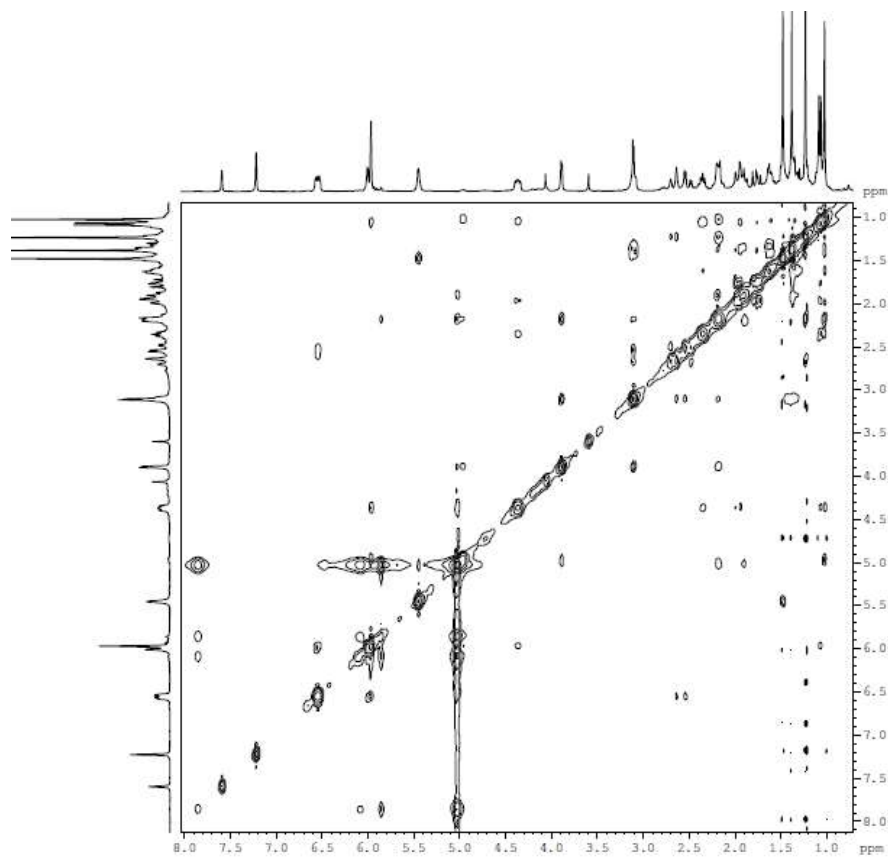
Anexo 31- Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np5

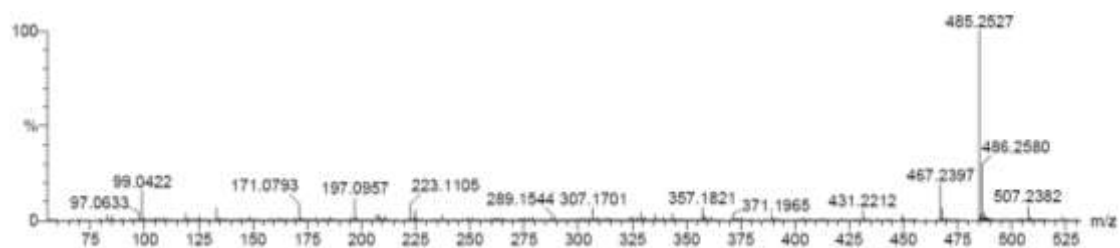
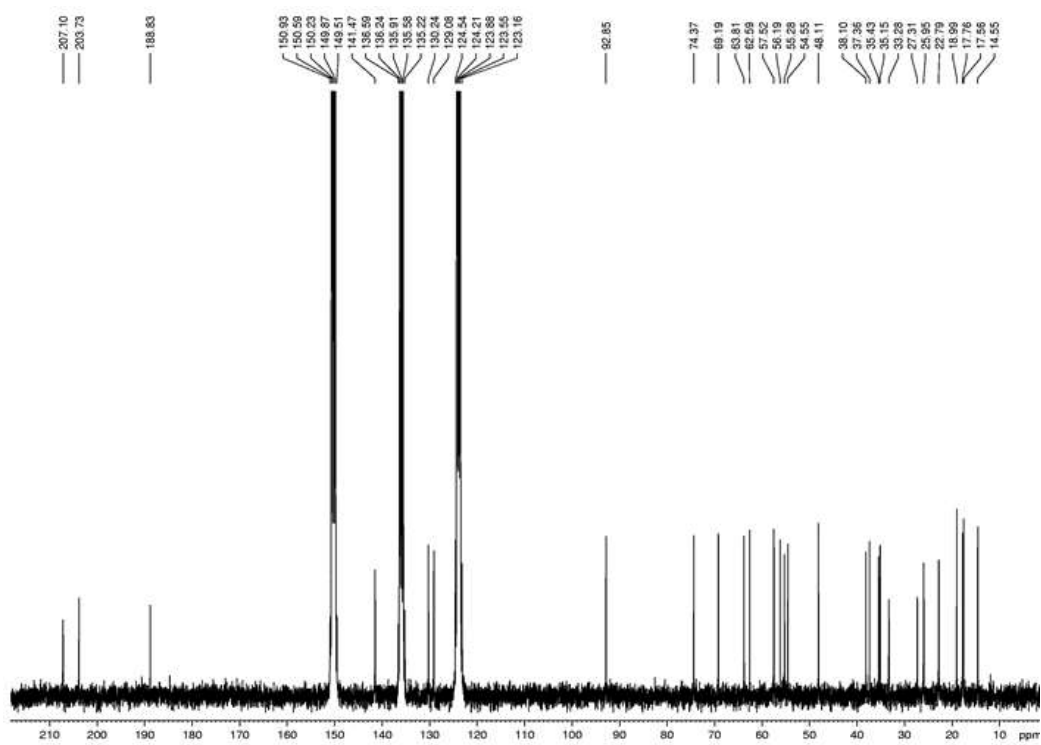


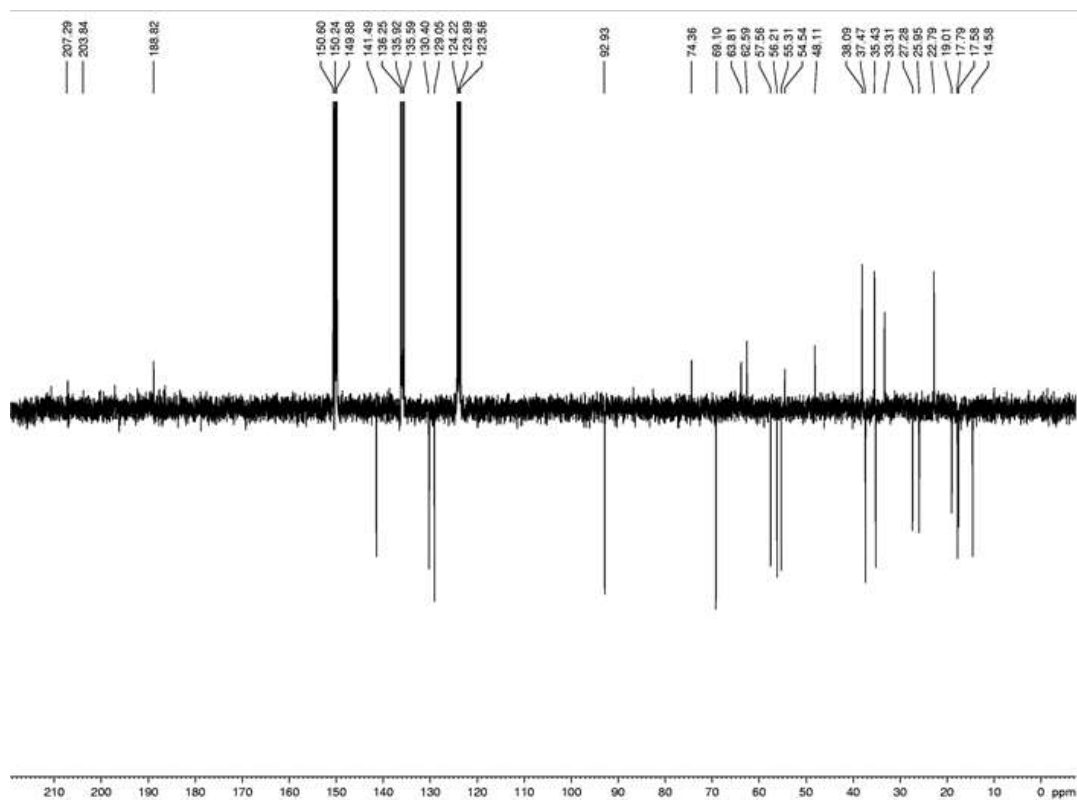
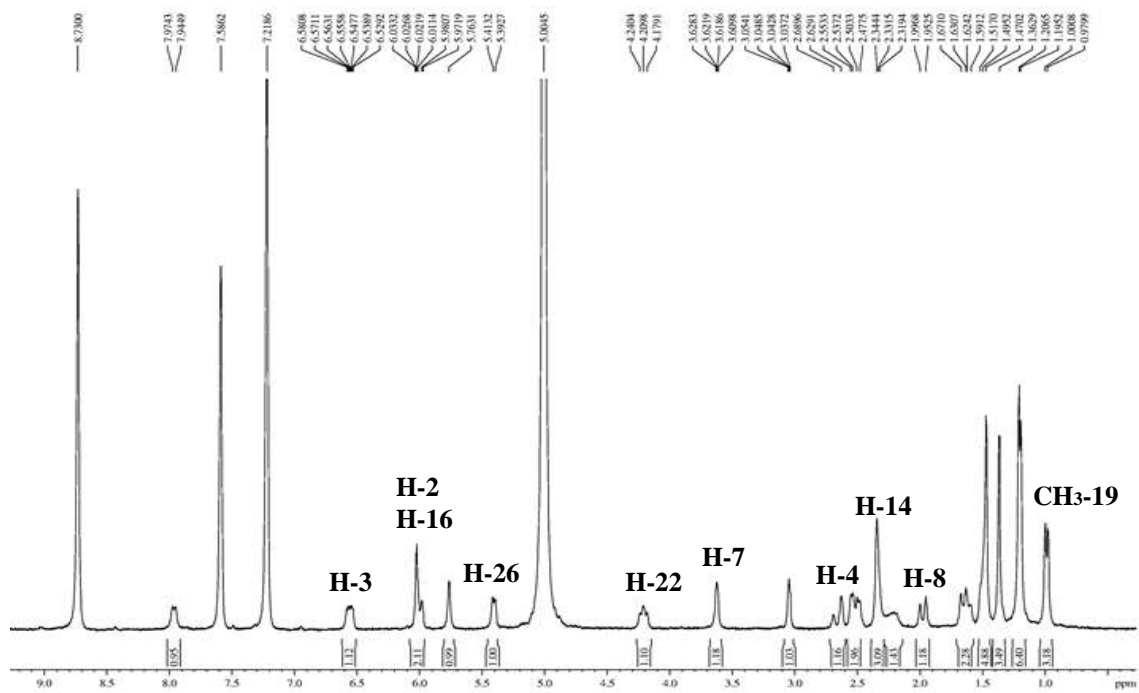
Anexo 32- Espectro J-mod [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np5

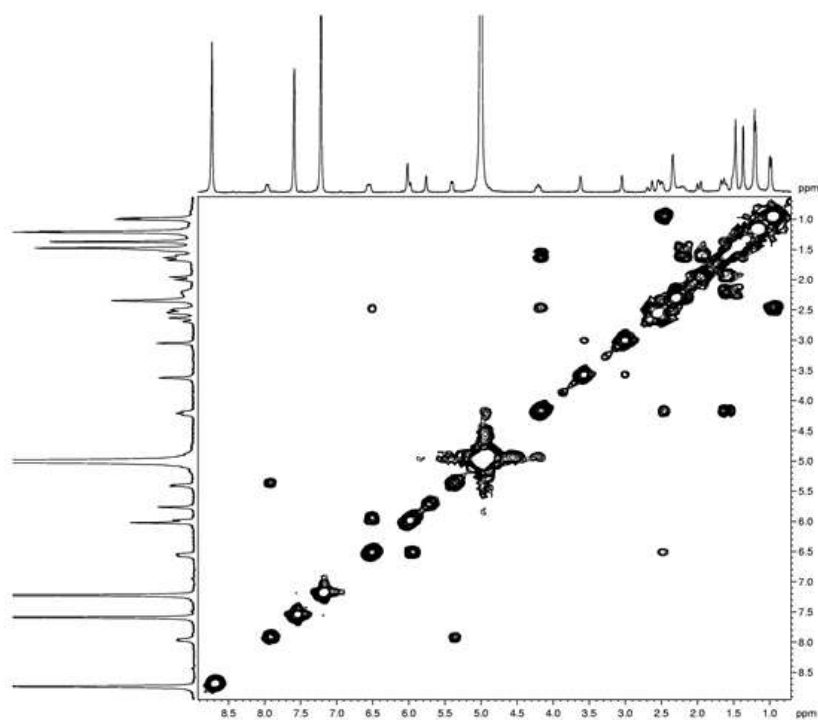
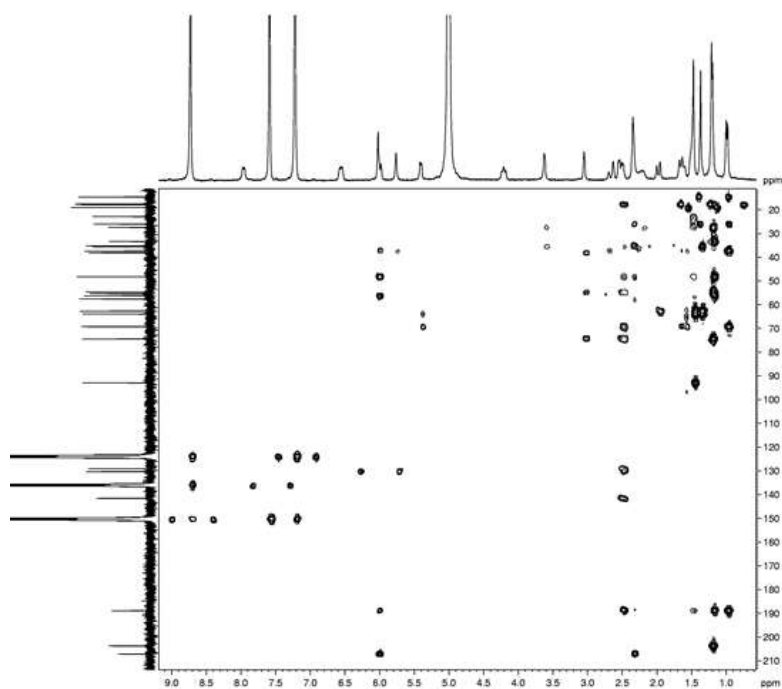


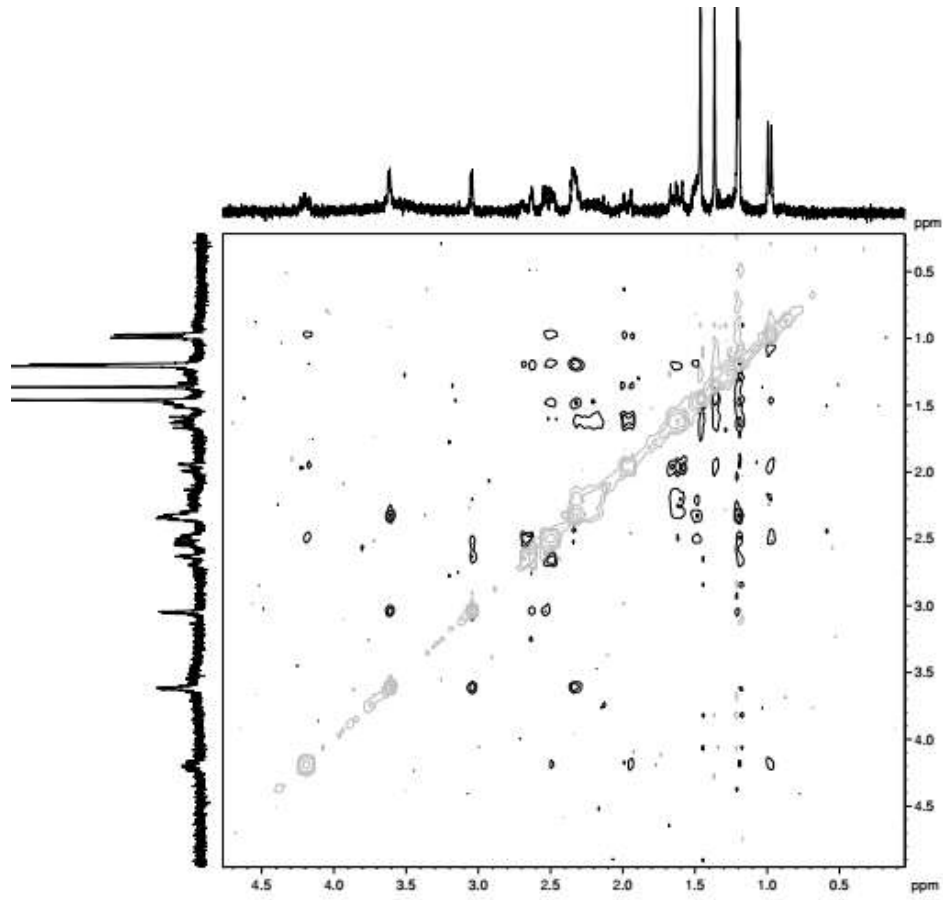
Anexo 33- Espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np5

Anexo 35- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np5**Anexo 36-** Espectro de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY de Np5

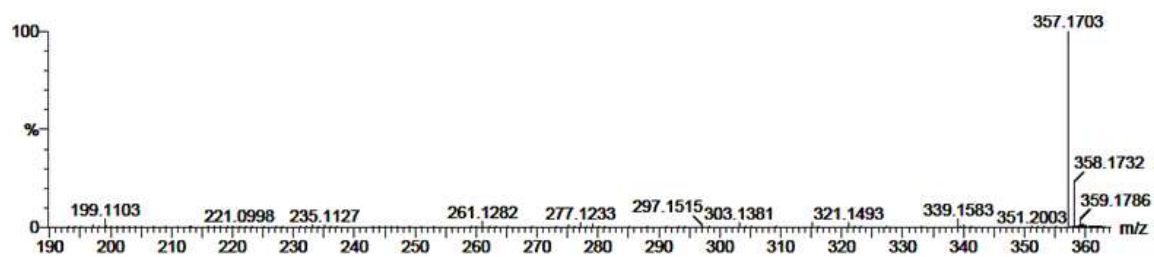
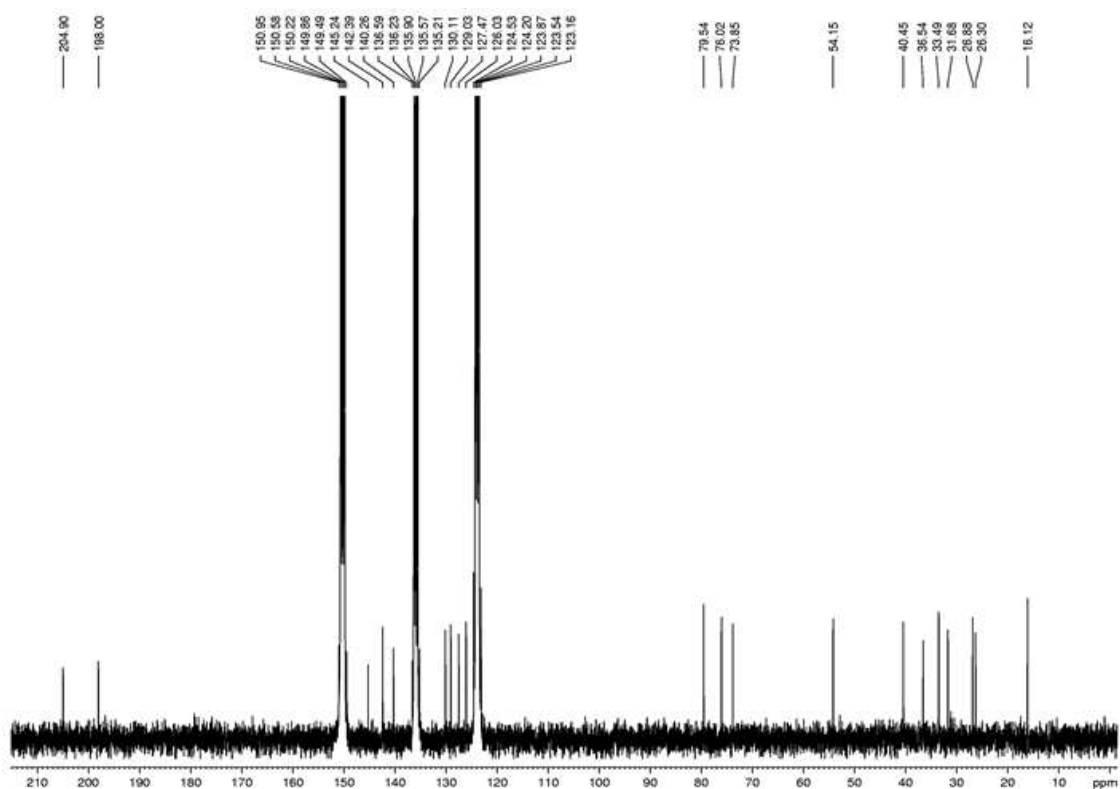
Anexo 37-Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np6**Anexo 38-**Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np6

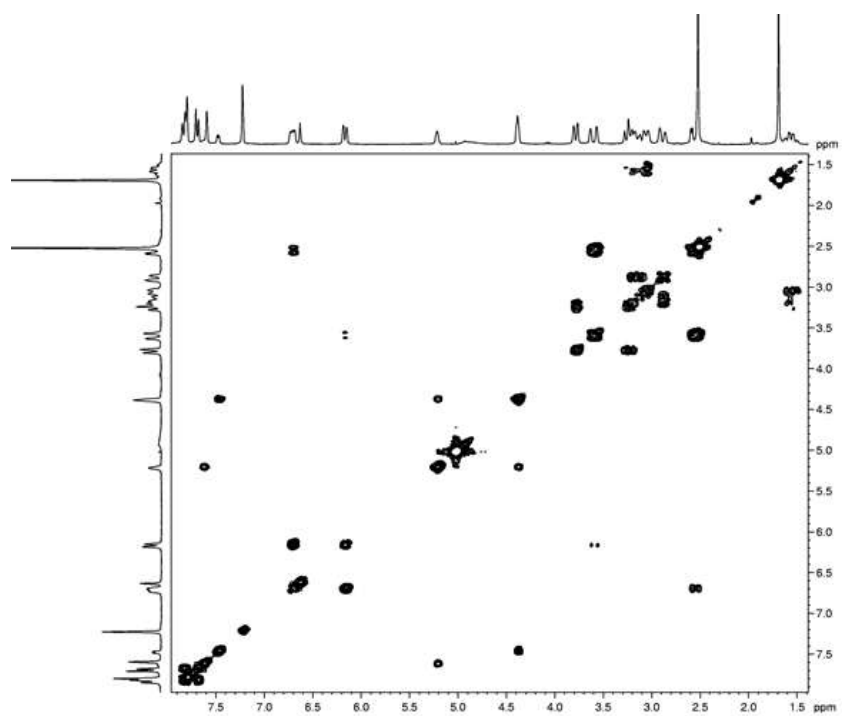
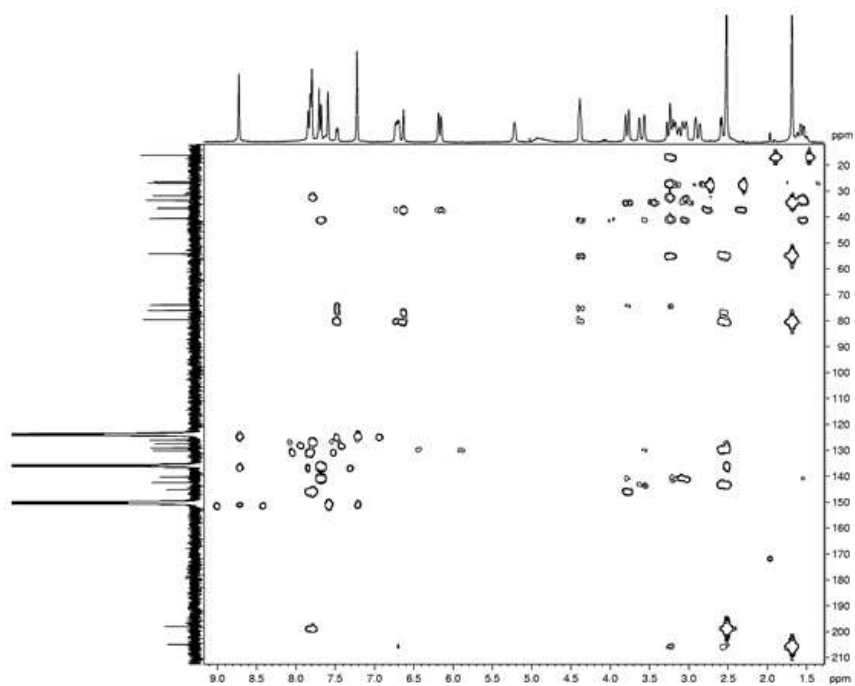
Anexo 39- Espectro J-mod [Piridina-*d*₅, 75,4 MHz] de Np6Anexo 40- Espectro de RMN de ¹H [Piridina-*d*₅, 300 MHz] de Np6

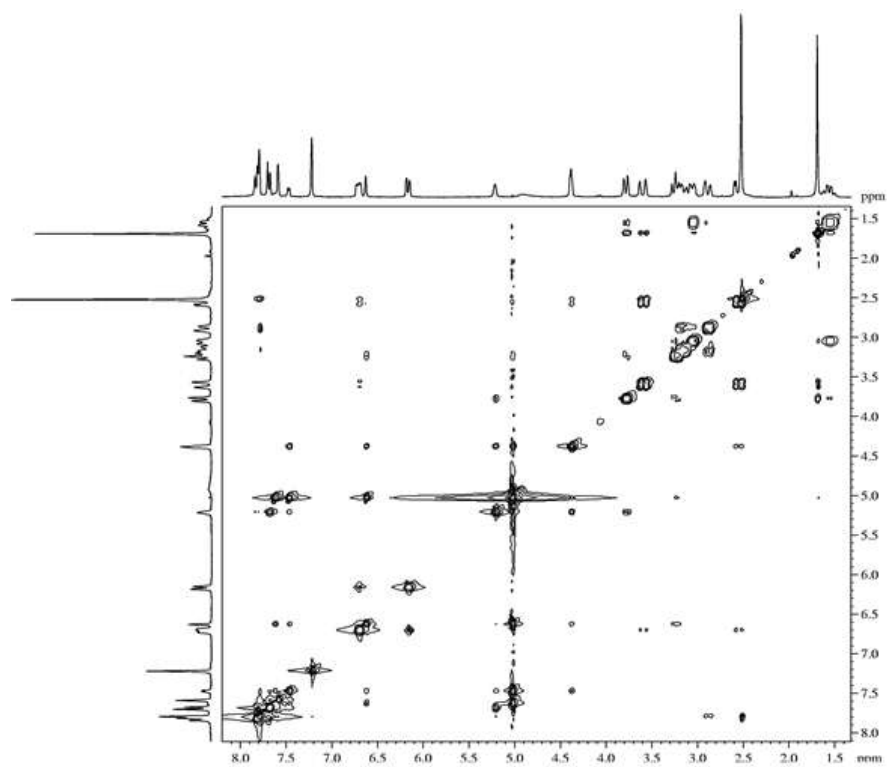
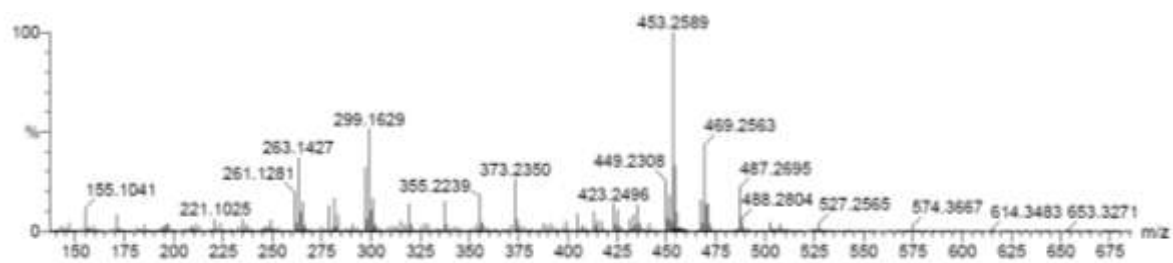
Anexo 41-Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np6**Anexo 42-**Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np6

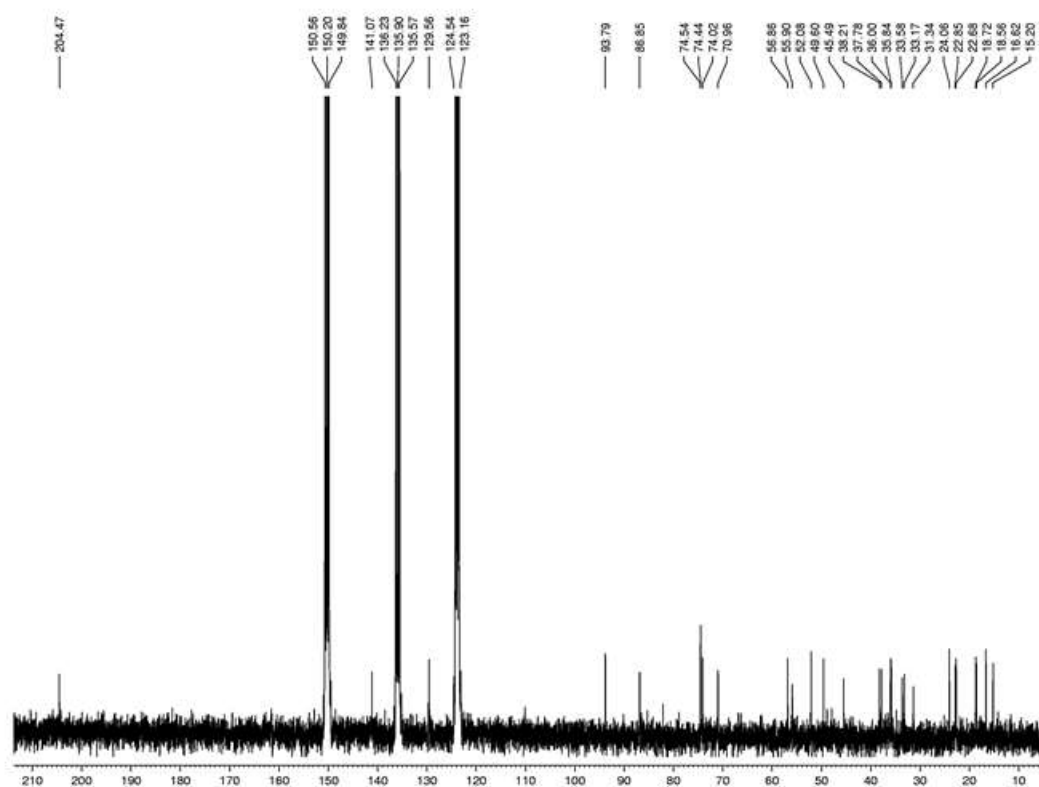
Anexo 43- Espectro de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY de Np6

Anexo 44-Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np7

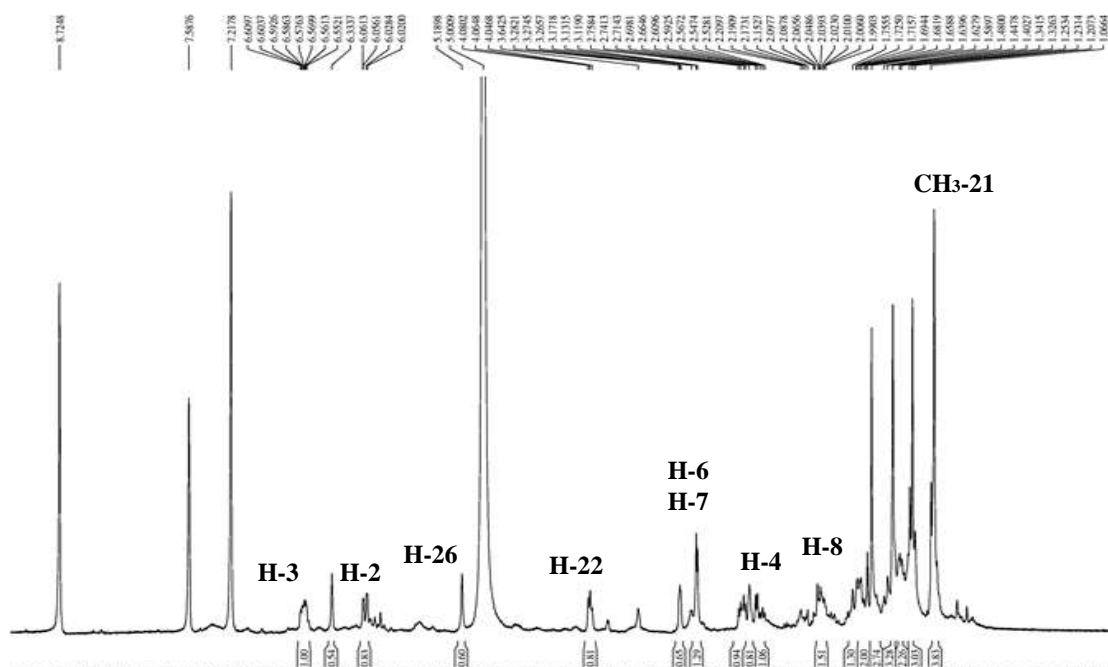
Anexo 45-Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np7

Anexo 48-Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np7**Anexo 49**-Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np7

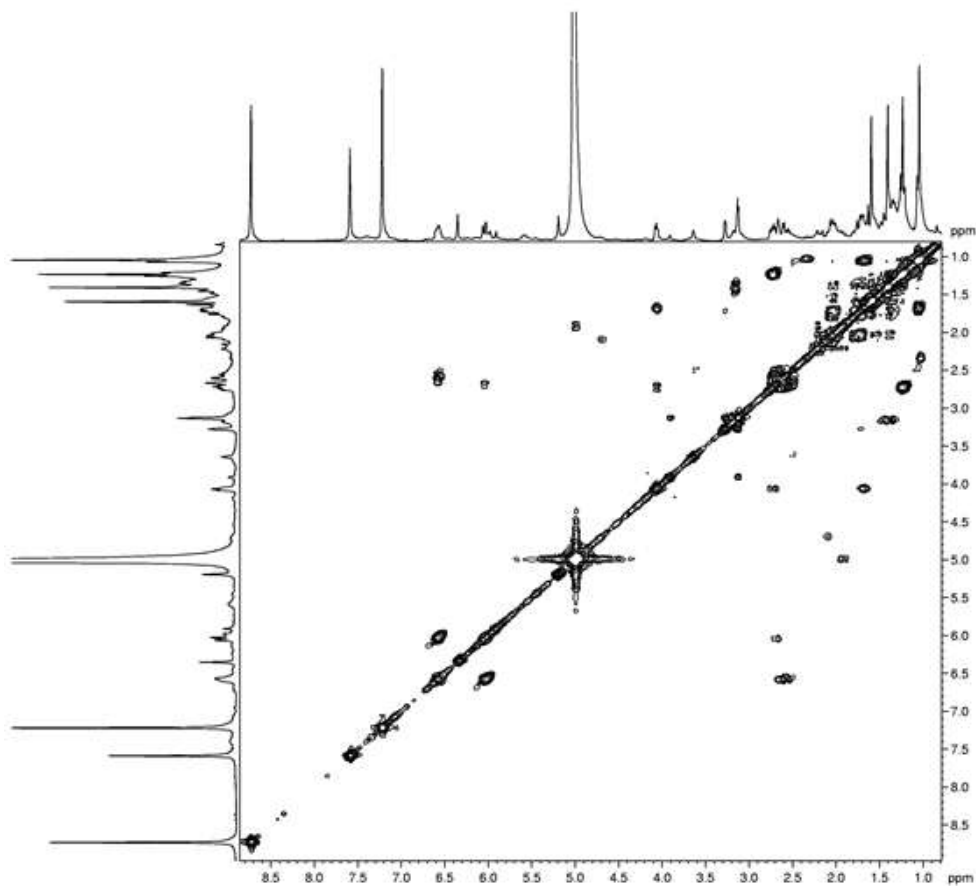
Anexo 50-Espectro de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY de Np7**Anexo 51**-Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np8

Anexo 52-Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np8**Anexo 53-**Espectro J-mod [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np8

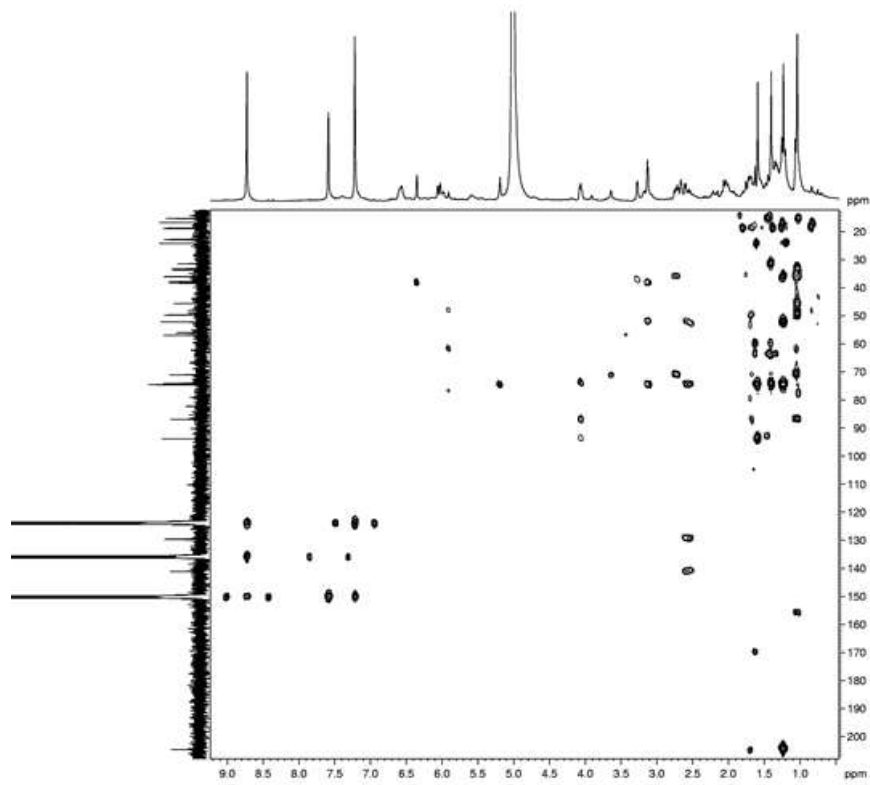
Anexo 54- Espectro de RMN de ^1H [Piridina- d_5 , 300 MHz] de Np8



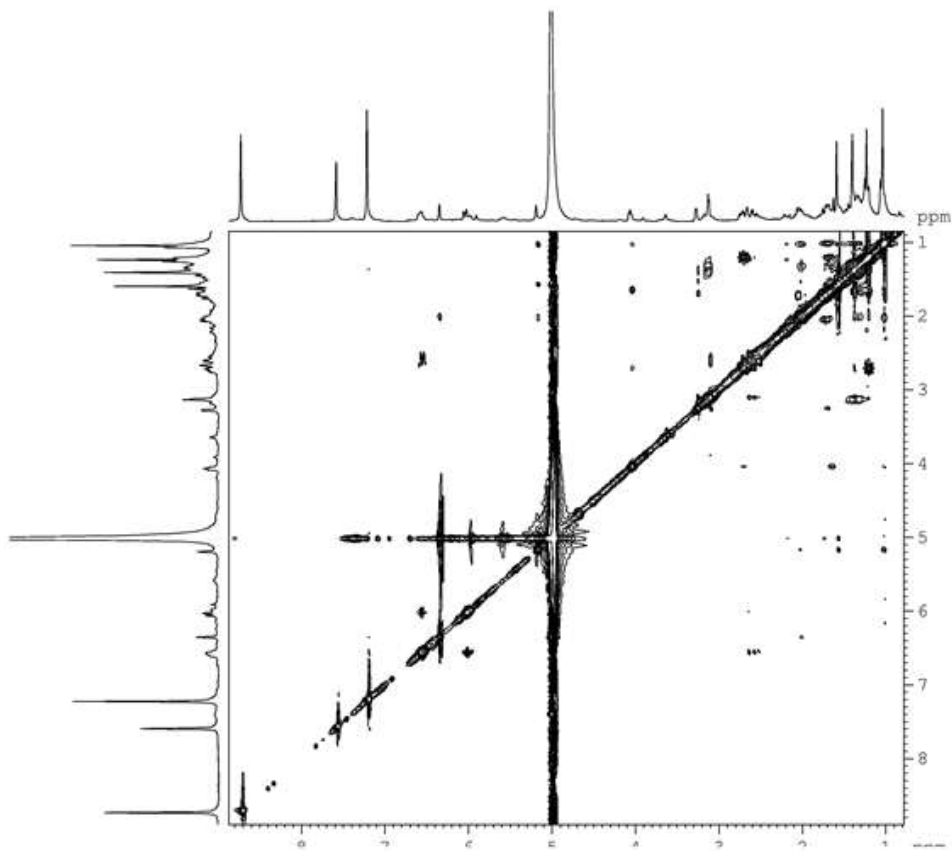
Anexo 55- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np8

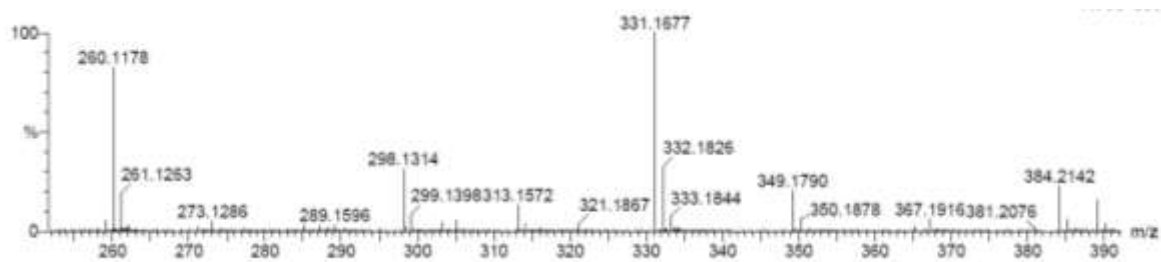
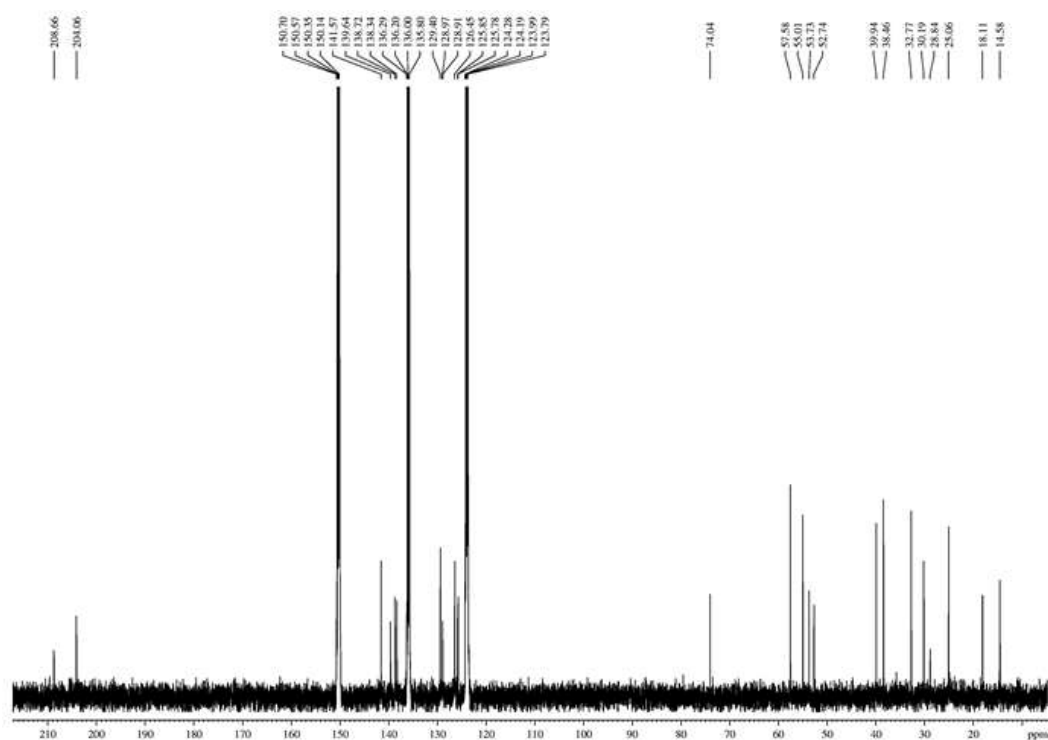


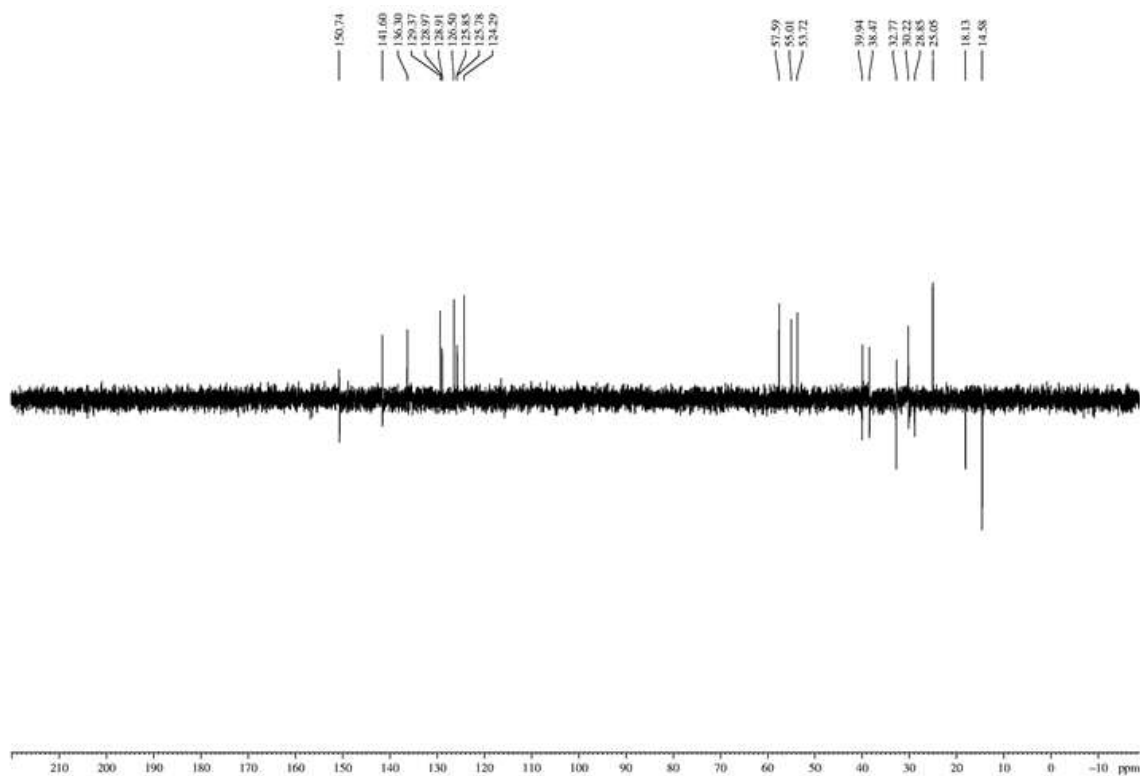
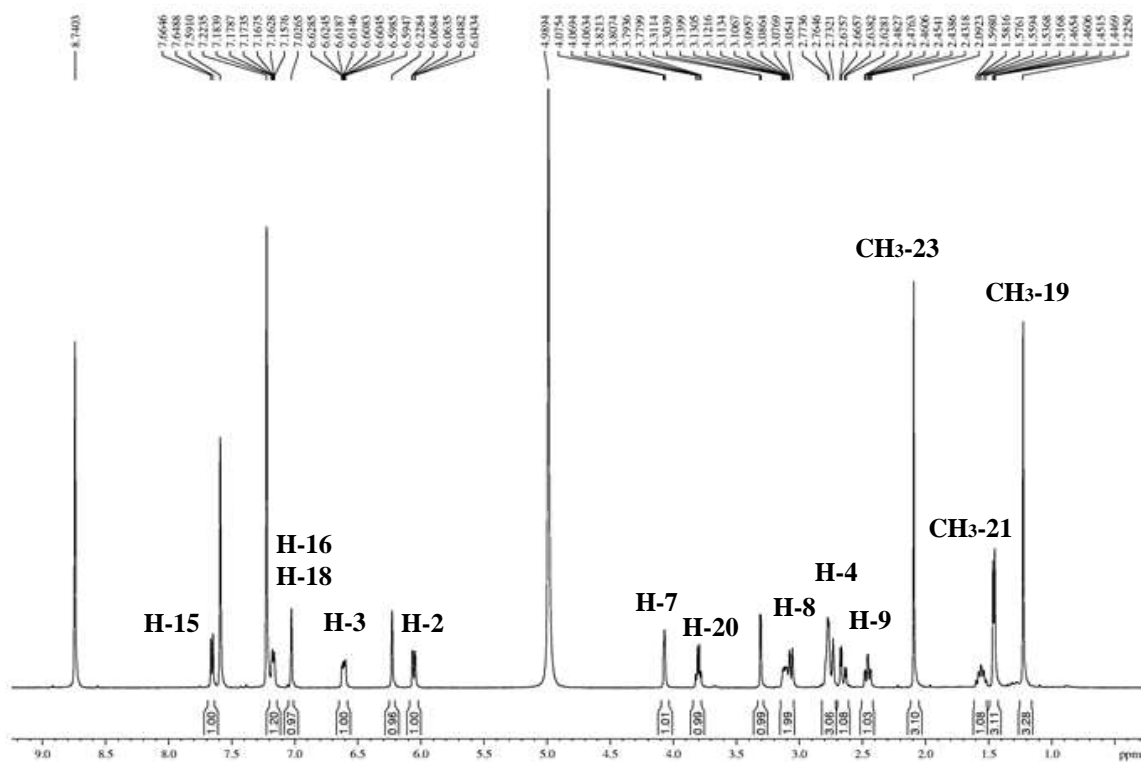
Anexo 56- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np8

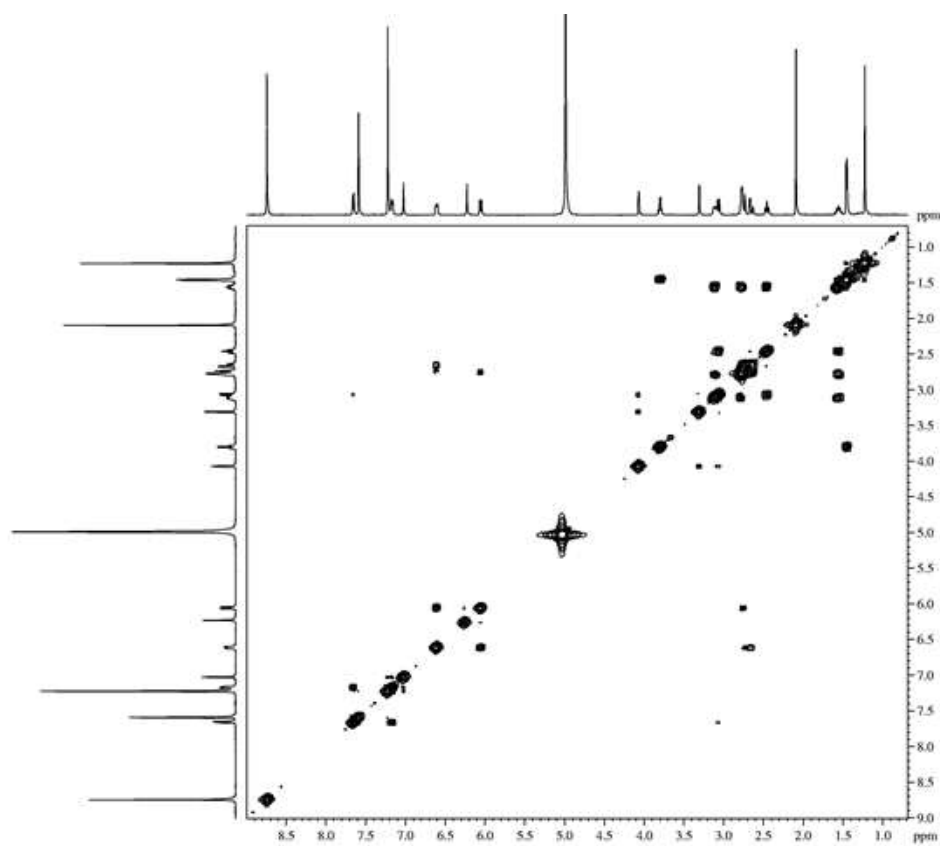
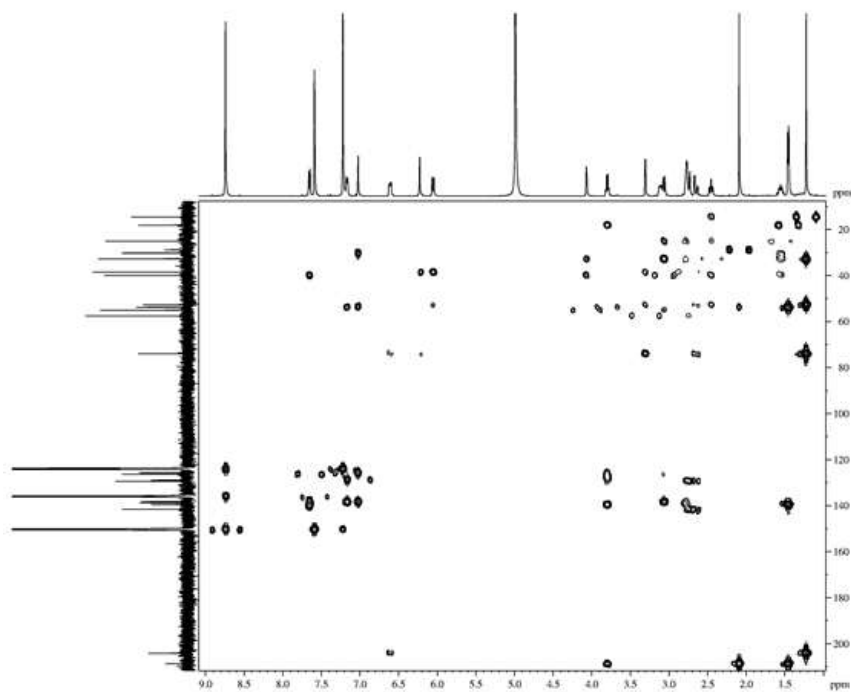


Anexo 57- Espectro de RMM- 2D ^1H - ^1H -NOESY de Np8

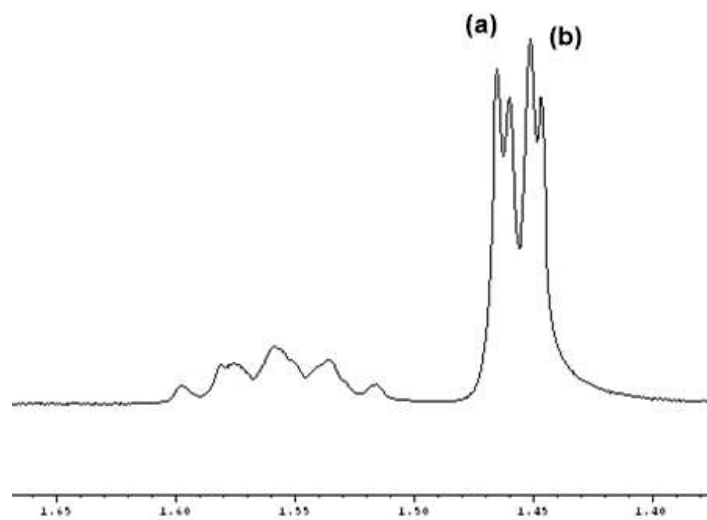


Anexo 58-Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de Np9**Anexo 59**-Espectro de RMN de ^{13}C -BB [Piridina- d_5 , 75,4 MHz] de Np9

Anexo 60- Espectro DEPT 135° [Piridina-*d*₅, 75,4 MHz] de Np9Anexo 61- Espectro de RMN de ¹H [Piridina-*d*₅, 500 MHz] de Np9

Anexo 62- Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de Np9Anexo 63- Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de Np9

Anexo 64- Expansão do espectro de RMN 1D 1H de Np9



Anexo 65- Expansão do espectro de RMN BB 13C de Np9

