

HELENA MANNOCHIO RUSSO

**Avaliação do perfil químico do extrato metanólico de
folhas de *Niedenzuella multiglandulosa* (Malpighiaceae):
isolamento, caracterização e identificação dos
constituintes bioativos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Química

Orientadora: Prof. Dr. Vanderlan da Silva Bolzani

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Ferreira Queiroz

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

R958a Russo, Helena Mannocho
Avaliação do perfil químico do extrato metanólico de folhas de *Niedenzuella multiglandulosa* (Malpighiaceae): isolamento, caracterização e identificação dos constituintes bioativos / Helena Mannocho Russo. – Araraquara : [s.n.], 2018
149 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani

Coorientador: Emerson Ferreira Queiroz

1. Plantas venenosas. 2. Malpighiaceae. 3. Gado. 4. Esteroides. 5. Peixe-zebra. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação do perfil químico do extrato metanólico de folhas de *Niederzuehlla multiglandulosa* (Malpighiaceae): isolamento, caracterização e identificação dos constituintes bioativos"

AUTORA: HELENA MANNOCHIO RUSSO

ORIENTADORA: VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

COORDENADOR: EMERSON FERREIRA QUEIROZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Profª Drª VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Dr. NIVALDO BORALLE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP - Botucatu

Araraquara, 02 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

HELENA MANNOCHIO RUSSO

DADOS PESSOAIS:

Nascimento: 12/03/1992

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo/SP

Filiação: Elisa Mannoquio de Souza Russo e Valter Freire Torres Russo

Profissão: Química

Endereço: Rua Benedito Martins, 270, Chácara Santa Fé, Itapira-SP

E-mail: helenamrusso@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Graduação em Bacharelado em Química

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Período: 2010 – 2015

Mestrado em Química

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 2015 – 2017

Área de Concentração: Química Orgânica

Aperfeiçoamento em Mestrado Sanduíche na Université de Genève, UNIGE, Genebra, Suíça (outubro/2016 – fevereiro/2017).

ESTÁGIOS REALIZADOS:

Atividades Acadêmicas

Realização de estágio de 5 meses (outubro/2016 – fevereiro/2017) no Laboratório de Fitoquímica e Produtos Naturais Bioativos, na Universidade de Genebra, Genebra, sob supervisão do Dr. Emerson Ferreira Queiroz e Prof. Dr. Jean-Luc Wolfender.

Estágio-Docência

- Estágio-Docência na disciplina de Química Orgânica Experimental – Curso de Farmácia

Instituto de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Departamento: Química Orgânica

Orientador: Gustavo Claro Monteiro

Período: março/2016 - julho/2017

Iniciação à pesquisa científica

- Bolsista FAEPEX:

Projeto: Síntese em batelada e em fluxo contínuo da Goniotalamina e nova metodologia para síntese de análogos.

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas

Departamento: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Julio Cezar Pastre

Período: março/2015 – julho/2015

Bolsa: FAEPEX

- Estágio não remunerado:

Projeto: Estudos visando adição de azalactonas a íons de N-acil imínio

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas

Departamento: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Julio Cezar Pastre

Período: julho/2014 – fevereiro/2015

- Estágio não remunerado:

Realização de estágio de 6 meses (janeiro/2013 – junho/2013) no Laboratório de Fitoquímica e Produtos Naturais Bioativos, na Universidade de Genebra, Genebra, sob supervisão do Dr. Emerson Ferreira Queiroz e Prof. Dr. Jean-Luc Wolfender.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIODICOS

Helena Mannocho Russo, Wilhan Donizete Gonçalves Nunes, Vanderlan da Silva Bolzani, Massao Ionashiro, Fávio Junio Caires. "Thermoanalytical and spectroscopic characteristics of young and old leaves powder and methanolic extracts of *Niedenzuella multiglandulosa*". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 132(1), 771-776. DOI: 10.1007/s10973-017-6951-7.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Marília Valli, Helena Mannocho Russo, Vanderlan da Silva Bolzani. “The potential contribution to bioeconomy of the natural products from Brazilian biodiversity”. Aceito para publicação em Anais da Academia Brasileira de Ciências (2017).

Cássio S. Meira, José Maurício dos Santos Filho, Caroline C. Sousa, Pâmela S. Anjos, Jéssica V. Cerqueira, Humberto A. Dias Neto, Rafael G. da Silveira, Helena M. Russo, Jean-Luc Wolfender, Emerson F. Queiroz, Diogo R. M. Moreira, Molena B. P. Soares. “Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents”. Aceito para publicação em Bioorganic & Medicinal Chemistry (2018).

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

Helena M. Russo, Emerson F. Queiroz, Laurance Marcourt, Alexander D. Crawford, Vanderlan S. Bolzani, Jean-Luc Wolfender. “Chemical profile and toxicity study of *Tetrapteryx multiglandulosa* secondary metabolites using *Zebrafish* toxicity model”. Em: 6th Brazilian Conference on Natural Products – BCNP. Apresentação em poster. Realizado de 5 a 8 de novembro de 2017, Vitória/ES, Brasil.

Helena Mannocho Russo, Wilhan Donizete Gonçalves Nunes, Flávio Junior Caires, Massao Ionashiro. “Thermal characterization by TG-DSC of commercial sweeteners formulations and dried leaves of *Stevia Rebaudiana* Bertoni”. Em: 6th Brazilian Conference on Natural Products – BCNP. Apresentação em pôster. Realizado de 5 a 8 de novembro de 2017, Vitória/ES, Brasil.

Russo, H. M., Nunes, W. D. G., Bolzani, V. S., Ionashiro, M. “Thermoanalytical Characteristics of *Tetrapteryx multiglandulosa* young and old leaves’ powder and methanolic extracts by TG-DSC”. Em: VIII Simpósio de Análise Térmica. Apresentação em pôster. Premiação de melhor pôster apresentado. Realizado de 13 a 15 de agosto de 2017, Ponta Grossa/PR, Brasil.

Helena M. Russo, Emerson F. Queiroz, Laurance Marcourt, Alessandra C. Dametto, Karina Fraige, Alexander D. Crawford, Vanderlan S. Bolzani, Jean-Luc Wolfender. “Chemical profile of *Tetrapteryx multiglandulosa*, a plant suspected causing cattle intoxication in Brazil”. Em: 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Apresentação oral na Seção Coordenada de Produtos Naturais. Realizado em 12 de julho de 2017

Helena M. Russo, Emerson F. Queiroz, Laurance Marcourt, Alessandra C. Dametto, Karina Fraige, Alexander D. Crawford, Vanderlan S. Bolzani, Jean-Luc Wolfender. “Chemical profile of *Tetrapteryx multiglandulosa*, a plant suspected causing cattle intoxication in Brazil”. Em: 46th World Chemistry Congress. Apresentação em pôster. Realizado de 9 a 14 de julho de 2017, São Paulo, SP, Brasil.

Participação de 5th Brazilian Conference on Natural Products – BCNP. Realizado de 26 a 29 de outubro de 2015, na cidade de Atibaia, SP, Brasil.

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais Elisa e Valter pelo
exemplo, amor, incentivo e carinho.
A todos que contribuíram direta ou indiretamente para sua
realização.*

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus amados pais, Elisa e Valter, por sempre terem me apoiado e servido de exemplo não só de carreira, mas para a vida. Sem vocês eu não teria conseguido chegar tão longe.

À minha orientadora Profa. Vanderlan por ter me aceitado como aluna de pós-graduação, pela orientação, confiança e por todos os ensinamentos transmitidos durante esses dois anos e meio.

Ao meu co-orientador, Dr. Emerson Ferreira Queiroz (Universidade de Genebra - Suíça), pelo companheirismo, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Jean-Luc Wolfender pela oportunidade de estágio de 5 meses em seu laboratório e pela colaboração duradoura com o grupo de pesquisa NuBBE.

Ao meu querido namorado, Wilhan. Obrigada por todo o companheirismo, paciência, ideias, ajuda, momentos de descontração, amizade... Por ter aparecido na minha vida no meio de toda essa loucura do mestrado e tornado essa experiência ainda melhor.

Agradeço aos meus amigos do IQ, em especial ao grupo de pesquisa da Profa. Vanderlan por toda a ajuda, discussões e pelos momentos de descontração: Marlon, Larissa, Alessandra, Karina, Maria Luiza (uma pena que por pouco tempo!), Suzana, Meri Emili, Suelem, Antonio, Gustavo, João Lucas, Mariana, Jhennifer, Celso, Marília e muitos outros. Agradeço em especial à Dra. Alessandra Cristina Dametto por toda a ajuda desde o momento em que cheguei em Araraquara, e à Dra. Karina Fraige pela ajuda com os ensaios biológicos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Lemos e Prof. Dr. Nilton Marques Carvalho, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, por terem enviado a espécie alvo de meu estudo.

Ao Prof. Dr. Alexander Dettmar Crawford, da Universidade de Luxemburgo, pelos ensaios de toxicidade com *Zebrafish*.

Aos meus amigos da Universidade de Genebra, em especial à Laurance Marcourt, Adlin Afzan, Sylvie Guinchard, Thanise Füller, Thais Montanheiro e Ana Paula Soares. Vocês tornaram a minha estadia em Genebra muito melhor!

A todos os funcionários e professores do IQ e do departamento de Química Orgânica meus agradecimentos pela ajuda, pelo atendimento atencioso e amigo, em especial a secretária Vilma Pestana por toda a ajuda e amizade.

Ao Instituto de Química e à Universidade de Genebra.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia (NuBBE) do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em Araraquara, São Paulo, Brasil e no Laboratoire de Phytochimie et Produits Naturels Bioactifs da Université de Genève em Genebra, Suíça.

RESUMO

A espécie *Tetrapteryx mucronata* (Malpighiaceae), uma das espécies ocasionalmente utilizados na Ayahuasca, despertou há algum tempo o interesse do grupo de pesquisa NuBBE para a realização do estudo químico e avaliação das atividades biológicas devido a sua utilização nos rituais religiosos conhecidos como “Santo Daime”. Este estudo revelou resultados interessantes nos ensaios preliminares voltados para a identificação de potenciais inibidores de acetilcolinesterase, e mostrou que a espécie *T. mucronata* tem alcaloides e compostos fenólicos como principais constituintes químicos. Estes resultados levaram ao estudo de outras espécies de *Tetrapteryx* ainda sem estudo químico, incluindo espécies que pertenciam a esse gênero e recentemente foram reclassificados como *Niedenzuella*, como no caso da *Niedenzuella multiglandulosa*, espécie selecionada para esta pesquisa de mestrado. Esta espécie é conhecida devido aos efeitos tóxicos que causam a morte de rebanhos bovinos, e de outros mamíferos, em geral, causando prejuízos substanciais na balança comercial brasileira. Este trabalho tem como objetivo a busca de compostos tóxicos presentes nas folhas de *Tetrapteryx multiglandulosa*. Essa espécie foi selecionada por serem relatados na literatura surtos de intoxicação do gado (em 2004 e 2005) em áreas altamente infestadas pela planta, causando morte de vacas e aborto de bezerros no estado do Mato Grosso do Sul. Estudos recentes encontrados na literatura indicam a presença de monofluoracetato (MF), uma substância conhecidamente tóxica, nessa espécie, mas ainda não foram realizados estudos fitoquímicos e de toxicidade para esta espécie e nem mesmo para o gênero *Niedenzuella*. A partir de folhas coletadas no próprio estado onde os surtos foram relatados, extratos foram preparados utilizando solventes de diferentes polaridades e enviados para ensaio de toxicidade empregando modelo com *Zebrafish*, cujo resultado mostrou que o extrato metanólico era o único tóxico. O foco do estudo voltou-se para esse extrato, sendo realizado um fracionamento utilizando a técnica de MPLC-UV e, em seguida, uma purificação mais acurada por HPLC em escala preparativa. Foram isoladas 19 substâncias das classes dos alcaloides, flavonoides glicosilados e não glicosilados, compostos glicosilados e 6 esteroides (denominados ecdisteroides), ainda não relatados para esse gênero, incluindo um ecdisteroide inédito (17), que foram identificadas e caracterizadas por UHPLC-TOF-HRMS e NMR. As substâncias isoladas foram identificadas como: trigonelina (1), triptofano (2), 4-hidroxicinamamida (3), ácido (Z)-p-cumárico 4-O-β-D-glicopiranosídeo (4), icarisida F₂ (5), luteoforol (6), ácido (E)-4-hidroxicinâmico (7), ácido (Z)-4-hidroxicinâmico (8), integristerona A (9), epiecdisterona (11), kaempferol triglicosilado (12), ecdisterona (13), isorhamnetina triglicosilada (14), ácido cinâmico (16), multiglandisterona (17), calonisterona (18) e podecdisona B (19). O esteroide majoritário (13) foi testado novamente para toxicidade utilizando modelo de *Zebrafish* e se mostrou tóxico, também um dado inédito para a espécie em estudo. Além disso, as moléculas isoladas são bastante diferentes das já identificadas para os gêneros de *Tetrapteryx*, o que corroboram para a diferenciação dessas espécies em dois gêneros distintos. Análises de NMR ¹⁹F e LC-MS foram realizadas para tentar identificar a presença de MF nos extratos e frações polares, no entanto, não foi possível. Os resultados obtidos corroboram para um maior entendimento de espécies tóxicas para gado presentes no Brasil, e apresentam dados complementares aos publicados recentemente.

Palavras-chave: *Niedenzuella multiglandulosa*. Plantas tóxicas. Gado. Monofluoracetato (MF). Esteroides. *Zebrafish*.

ABSTRACT

Tetrapteryx mucronata (Malpighiaceae) species, one of the species occasionally used in Ayahuasca, has become of interest of NuBBE research group to perform a chemical study for an evaluation of the biological activities due to its use in religious rituals known as "Santo Daime". This study revealed interesting results in preliminary assays aiming to identify acetylcholinesterase potential inhibitors, and that this species has alkaloids and phenolic compounds as its major chemical compounds. These results led our research group to study other species from *Tetrapteryx* genus without further chemical studies, including species that used to belong to this genus and that recently has changed to *Niedenzuella* genus, such as *Niedenzuella multiglandulosa*, the selected species for this master's research. This species is known for causing toxic effects that may cause death in cattle and other mammals in general, causing substantial losses in Brazilian trade balance. The objective of this research is to search for toxic compounds in *Niedenzuella multiglandulosa* leaves. This species was chosen for having reports in the literature of outbreaks of cattle intoxication (in 2004 and 2005) in which the pasture was highly infested with it, causing death of cows and led to abortion of calves in Mato Grosso do Sul state. Recent studies found in the literature indicate the presence of monofluoracetate (MFA), a well-known toxic substance, in this species, but so far there were no phytochemical and toxicity assay study regarding this species, and not even for the genus *Niedenzuella*. From the leaves collected in the same state where there were the outbreaks were reported, extracts were prepared using different polarity solvents and sent to *Zebrafish* toxicity assay, whose result showed that the methanolic extract was the only toxic one. The focus of this study turned to this extract, performing a fractionation using MPLC-UV, and then a more accurate purification using preparative HPLC. 19 substances were isolated such as alkaloids, glycosylated and non-glycosylated flavonoids, glycosylated compounds and 6 steroids (also called ecdysteroids), including a new ecdysteroid (**17**) that were identified and elucidated by UHPLC-TOF-HRMS and NMR. The isolated substances were identified as: trigonelline (**1**), tryptophan (**2**), 4-hydroxycinnamamide (**3**), p-Coumaric acid 4-O- β -D-glucopyranoside (**4**), icariside F₂ (**5**), luteoforol (**6**), (E)-4-Hydroxycinnamic acid (**7**), (Z)-4-Hydroxycinnamic acid (**8**), integristerone A (**9**), epiecdysterone (**11**), kaempferol triglucoside (**12**) ecdysterone (**13**), isorhamnetin triglycoside (**14**), cinnamic acid (**16**), multiglandysterone (**17**), calonysterone (**18**) e Podecdysone B (**19**). The major steroid (**13**) was tested again for toxicity using *Zebrafish* model and showed toxicity, also a new data for the species in study. Additionally, the isolated compounds are quite different from the isolated previously from *Tetrapteryx* genus, which corroborate to the fact that these species belong to different genera. ¹⁹F NMR and LC-MS analysis were performed attempting to identify the presence of MFA in polar extracts and fractions, however it wasn't possible to identify it. The obtained results corroborate to a better understanding of toxic plants to cattle in Brazil, and present data complementary to those recently published.

Key-words: *Niedenzuella multiglandulosa*. Toxic plants. Cattle. Monofluoracetate (MFA). Steroids. *Zebrafish*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estimativa da distribuição geográfica atual da família Malpighiaceae (estrelas vermelhas indicam a localidade de fósseis dessa família. 28
- Figura 2** – Substâncias isoladas da *Tetrapterys mucronata*. 30
- Figura 3** – *Niedenzuella multiglandulosa*: (A e D) Planta florescendo; (B) Folhas e flores; (C) Frutos. 31
- Figura 4** – Estrutura do monofluoracetato (MF). 33
- Figura 5** – Ciclo do ácido cítrico. 34
- Figura 6** – Formação de fluorocitrato a partir de monofluoracetato. 35
- Figura 7** – Desenvolvimento da larva do Zebrafish em 0,2 a 1,75 hpf e 22 a 48 hpf. 38
- Figura 8** – Fluxograma ilustrativo dos processos de extração dos compostos micromoleculares de *Niedenzuella multiglandulosa*. 46
- Figura 9** – Fluxograma ilustrativo das substâncias isoladas por HPLC (escala preparativa) presentes nas frações obtidas por MPLC. 52
- Figura 10** – Fluxograma do procedimento geral seguido no presente trabalho. 53
- Figura 11** – Perfis cromatográficos dos extratos das folhas velhas e jovens de *N. multiglandulosa* obtidos por HPLC-DAD [coluna Phenomenex® C18-Luna (250 x 4,6mm, d.i.; 5 µm); gradiente 5-100 %B em 40 min, MeOH:H₂O (0,1% ác fórmico), vazão = 1mL min⁻¹, (a) clorofórmio (254 nm); (b) acetato de etila (300 nm) e (c) metanol (280 nm). Folhas jovens = Azul; Folhas velhas = vermelho. 56
- Figura 12** – Cromatograma HPLC-DAD obtido para o extrato NM_JM em escala preparativa. As linhas pontilhadas indicam as regiões do cromatograma em que foram coletadas as frações. 57
- Figura 13** – Ampliação dos cromatogramas obtidos por UHPLC-UV-HRMS para as frações obtidas para o extrato NM_JM (280 nm). 58
- Figura 14** – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD-ELSD, coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 µm); gradiente 5 a 100%B em 40 min, sistema de solventes MeOH:H₂O (0,1% ác fórmico), vazão = 1mL min⁻¹ 60
- Figura 15** – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD-ELSD, coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 µm), sistema de solventes MeOH:H₂O (0,1% ác fórmico), vazão = 1 mL min⁻¹, λ = 280 nm. Método: (a) gradiente 5 a 100%B em 40 min; (b) gradiente 5 a 62 %B em 70 min. 61

Figura 16 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos para o extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD, sistema de solventes MeOH:H ₂ O (0,1% ácido fórmico), vazão = 1 mL min ⁻¹ , λ = 280 nm. Método gradiente 5 a 62 %B em 70 min, coluna (a) Zeochem Zeoprep 60 Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 μm); (b) Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 μm).	62
Figura 17 – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD, λ = 280 nm, método descrito na Tabela 4, coluna (a) Zeochem Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 μm); (b) Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 μm).	63
Figura 18 – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD, λ = 280 nm (ampliado), método descrito na Tabela 4, coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 15 μm), temperaturas 24, 30, 35, 40 e 45 °C.	64
Figura 19 – Comparação entre os cromatogramas obtido em escala analítica (a) e em escala preparativa (b) no fracionamento do extrato NM_JM por MPLC-UV (λ = 280 nm).	66
Figura 20 – Cromatograma obtido por UHPLC-UV (Azul: 280 nm; Vermelho: 254 nm) do extrato NM_JM. Os números sobre o cromatograma representam as substâncias isoladas desse extrato.	69
Figura 21 – Estrutura determinada para a substância 17.	71
Figura 22 – Espectro de NMR de ¹ H obtido para a substância 17 (600 MHz – DMSO-d ₆).	73
Figura 23 – Mapa de contorno HSQC obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d ₆).	75
Figura 24 – Mapa de contorno COSY obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d ₆).	76
Figura 25 – Mapa de contorno HMBC obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d ₆).	77
Figura 26 – Espectro de NMR de ¹ H obtido para a substância 17 e atribuição dos sinais: ampliação da região entre 0,5 e 2,6 ppm (600 MHz – DMSO-d ₆).	78
Figura 27 - Espectro de NMR de ¹ H obtido para a substância 17 e atribuição dos sinais: ampliação da região entre 2,3 e 6,0 ppm (600 MHz – DMSO-d ₆).	79
Figura 28 – Mapa de contorno ROESY obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d ₆).	81
Figura 29 – Interações espaciais observadas pelo experimento de ROESY para a substância 17.	82

Figura 30 – Espectro de massas de alta resolução – UHPLC-TOF-HRMS(-) – obtido para a substância 17.....	84
Figura 31 – Espectro de massas de alta resolução – UHPLC-TOF-HRMS(+) – obtido para a substância 17.....	85
Figura 32 – Proposta de formação dos íons presentes em maior abundância da substância 17 obtidos por UHPLC-TOF-HRMS(+).	85
Figura 33 – Estrutura química da substância 12 (Kaempferol triglicosilado)	86
Figura 34 – Espectros de massas obtidos para a substância 12 no modo positivo (acima) e negativo (abaixo).....	86
Figura 35 – Espectros de massas obtidos para a substância 10 no modo positivo (acima) e negativo (abaixo).....	87
Figura 36 – Espectros de massas obtidos para a substância 15 no modo positivo (acima) e negativo (abaixo).....	88
Figura 37 – Espectros de NMR de ¹⁹ F obtidos para os extratos metanólico, extrato aquoso e Fração 3.	89
Figura 38 – Cromatograma de íons totais (TIC) dos extratos aquoso, metanólico e fração 3 e abundância relativa da razão <i>m/z</i> 77.	90
Figura 39 – Espectro de massas de alta resolução obtido para a fração 3.	91
Figura 40 – Estrutura química da substância 1.	100
Figura 41 – Espectro de NMR de ¹ H da substância 1 (600 MHz, DMSO-d ₆).....	101
Figura 42 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 1 (150 MHz, DMSO-d ₆).	102
Figura 43 – Estrutura química da substância 2.	103
Figura 44 – Espectro de NMR de ¹ H da substância 2 (600 MHz, DMSO-d ₆).....	104
Figura 45 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 2 (150 MHz, DMSO-d ₆).	105
Figura 46 – Estrutura química da substância 3.	106
Figura 47 – Espectro de NMR de ¹ H da substância 3 (600 MHz, DMSO-d ₆).	107
Figura 48 – Estrutura química da substância 4.	108
Figura 49 – Espectro de NMR de ¹ H da substância 4 (600 MHz, DMSO-d ₆).....	109
Figura 50 – Espectro de NMR de DEPTQ da a substância 4 (150 MHz, DMSO-d ₆).	110
Figura 51 – Estrutura química da substância 5.	111
Figura 52 – Espectro de NMR de ¹ H da substância 5 (600 MHz, DMSO-d ₆).....	112
Figura 53 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 5 (150 MHz, DMSO-d ₆).	113
Figura 54 – Estrutura química da substância 6.	114

Figura 55 – Espectro de NMR de ^1H da substância 6 (600 MHz – DMSO- d_6).....	115
Figura 56 – Espectro de NMR de ^1H da substância 6 (150 MHz, DMSO- d_6).....	116
Figura 57 – Estrutura química da substância 7.	117
Figura 58 – Espectro de NMR de ^1H da substância 7 (600MHz, DMSO- d_6).....	118
Figura 59 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 7 (600 MHz, DMSO- d_6).	119
Figura 60 – Estrutura química da substância 8.	120
Figura 61 – Espectro de NMR de ^1H da substância 8 (600 MHz, DMSO- d_6).....	121
Figura 62 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 8 (150MHz, DMSO- d_6).	122
Figura 63 – Estrutura química da substância 9.	123
Figura 64 – Espectro de NMR de ^1H da substância 9 (600 MHz – DMSO- d_6).....	125
Figura 65 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 9 (150 MHz – DMSO- d_6).	126
Figura 66 – Estrutura química da substância 11.	127
Figura 67 – Espectro de NMR de ^1H da substância 11 (600 MHz – DMSO- d_6).....	129
Figura 68 – Estrutura química da substância 12.	130
Figura 69 – Espectro de NMR de ^1H da substância 12 (600 MHz – DMSO- d_6).....	131
Figura 70 – Estrutura química da substância 13.	132
Figura 71 – Espectro de NMR de ^1H da substância 13 (600 MHz – DMSO- d_6).....	134
Figura 72 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 13 (150 MHz, DMSO- d_6).	135
Figura 73 – Estrutura química da substância 14.	136
Figura 74 – Espectro de NMR de ^1H da substância 14 (600 MHz – MeOD).....	138
Figura 75 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 14 (150 MHz – MeOD).	139
Figura 76 – Estrutura química da substância 16.	140
Figura 77 – Espectro de NMR de ^1H da substância 16 (600 MHz, DMSO- d_6).....	141
Figura 78 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 16 (150 MHz, DMSO- d_6).	142
Figura 79 – Estrutura química da substância 18.	143
Figura 80 – Espectro de NMR de ^1H da substância 18 (600 MHz – DMSO- d_6).....	145
Figura 81 – Estrutura química da substância 19.	146
Figura 82 – Espectro de NMR de ^1H da substância 19 (600 MHz – DMSO- d_6).....	148
Figura 83 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 19 (150 MHz – DMSO- d_6).	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massas obtidas dos extratos preparados em menor quantidade de <i>N. multiglandulosa</i> .	45
Tabela 2 – Massas obtidas dos extratos preparados em maior quantidade de <i>N. multiglandulosa</i> .	45
Tabela 3 – Tempos de separação e massas obtidas no fracionamento em escala preparativa do extrato NM_JM.	47
Tabela 4 – Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas para a separação das bandas do extrato NM_JM (Fase Móvel MeOH:H ₂ O (0,1% ác fórmico); vazão de 1 mL min ⁻¹ , temperatura ambiente, volume de injeção de 10 µL de solução de concentração 10 mg mL ⁻¹).	48
Tabela 5 – Conversão das condições analíticas para as condições preparativas utilizando o software HPLC Calculator 3.0.	49
Tabela 6 – Método <i>Short Run</i> utilizado em UHPLC nas análises das frações do extrato NM_JM obtidas por MPLC.	50
Tabela 7 – Método <i>Long Run</i> utilizado em UHPLC nas análises das frações do extrato TM_JM obtidas por MPLC.	50
Tabela 8 – Métodos utilizados em HPLC (escala preparativa) para o isolamento das substâncias presentes nas frações indicadas.	51
Tabela 9 – Valores de pressão (bar) registrados em diferentes pontos dos cromatogramas obtidos a partir do método descrito na Tabela 4 em temperaturas variadas (24, 30, 35, 40, 45 °C) e colunas Zeochem Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 µm) e Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 15µm).	65
Tabela 10 – Informações das substâncias isoladas presentes no extrato NM_JM.	67
Tabela 11 – Dados de deslocamentos químicos de NMR (600 MHz, DMSO-d ₆) unidimensionais da substância 17.	72
Tabela 12 – Dados de massas de alta resolução obtidos nos modos positivo e negativo para as substâncias isoladas de <i>N. multiglandulosa</i> .	83
Tabela 13 – Valores de deslocamentos químicos para ¹ H e ¹³ C obtidos para a substância 1 (NMR 600 MHz – DMSO-d ₆).	100
Tabela 14 – Valores de deslocamentos químicos para ¹ H e ¹³ C obtidos para a substância 2 (NMR 600 MHz – DMSO-d ₆).	103

Tabela 15 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 3 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	106
Tabela 16 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 4 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	108
Tabela 17 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 5 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	111
Tabela 18 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 6 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	114
Tabela 19 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 7 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	117
Tabela 20 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 8 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	120
Tabela 21 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 9 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	123
Tabela 22 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 11 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	127
Tabela 23 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 12 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	130
Tabela 24 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 13 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	132
Tabela 25 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 14 (NMR 600 MHz – MeOD).....	136
Tabela 26 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 16 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	140
Tabela 27 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 18 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	143
Tabela 28 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 19 (NMR 600 MHz – DMSO- d_6).....	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
ATP	Trifosfato de adenosina
C18	C18 Octadecilsilano
CHCl ₃	Clorofórmio
CoA	Coenzima A
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dupleto
d.i.	Diâmetro interno
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DEPTQ	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with quaternary carbon detection</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DMT	<i>N,N</i> -dimetiltriptamina
EM	Espectrometria de Massas
H ₂ O	Água
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
hpf	Horas após a fertilização
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos
HRESIMS-TOF	<i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IES	Interface Electrospray
J	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga

MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MF	Monofluoracetato
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PA	Para análise
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Tripleto
UDV	União do Vegetal
UHPLC	<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
δ _C	Deslocamento químico de carbono
δ _H	Deslocamento químico de hidrogênio
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	Química de produtos naturais	26
1.2	Família Malpighiaceae	27
1.3	Ayahuasca e Santo Daime – <i>Banisteriopsis caapi</i> e <i>Tetrapteryx mucronata</i>	28
1.4	Espécie <i>Niedenzuella multiglandulosa</i>	31
1.5	Monofluoracetato (MF) como substância tóxica	33
1.6	Ensaio de toxicidade empregando <i>Zebrafish</i>	36
1.7	Justificativa para o estudo.....	38
2	OBJETIVOS.....	41
3	MATERIAIS	43
3.1	Reagentes e Solventes	43
3.2	Equipamentos utilizados	43
3.3	Material vegetal.....	44
4	METODOLOGIA	45
4.1	Preparo dos extratos de <i>Niedenzuella multiglandulosa</i>	45
4.2	Fracionamento do extrato NM_JM para avaliação de toxicidade em <i>Zebrafish</i>	46
4.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> - HPLC) – Escala analítica.....	47
4.3.1.	Análise dos extratos obtidos em menor quantidade	47
4.3.2.	Análise do perfil químico do extrato NM_JM por HPLC-DAD-ELSD.....	47
4.4	Cromatografia Líquida de Média Pressão (<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> – MPLC)	48
4.4.1.	Conversão das condições cromatográficas em escala analítica para a escala preparativa.....	48
4.4.2.	Fracionamento do extrato NM_JM por MPLC-UV.....	49
4.5	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão (<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i> – UHPLC)	49
4.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> - HPLC) – Escala preparativa.....	50
4.7	Ressonância Magnética Nuclear (NMR).....	51
4.8	Análises das substâncias puras por espectrometria de massas de alta resolução – UHPLC-TOF-HRMS	53

4.9	Determinação da rotação específica.....	53
4.10	Análises de NMR ¹⁹ F e LC-MS.....	53
4.11	Análise das substâncias 10, 12 e 15 por LC-MS/MS.....	54
4.12	Teste de toxicidade utilizando modelo com <i>Zebrafish</i>	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Análise dos extratos obtidos por HPLC-DAD	55
5.2	Ensaio de toxicidade com <i>Zebrafish</i> dos extratos de <i>Niedenzuella multiglandulosa</i>	56
5.3	Fracionamento do extrato NM_JM para avaliação de toxicidade em <i>Zebrafish</i>	57
5.4	Análise e otimização de método do extrato NM_JM por HPLC-DAD-ELSD.....	59
5.5	Otimização da temperatura e pressão para análise do extrato NM_JM por HPLC-DAD para transposição para MPLC.....	63
5.6	Fracionamento do extrato NM_JM por MPLC-UV	65
5.7	Substâncias isoladas do extrato NM_JM	66
1.1.1.	Caracterização das substâncias isoladas por NMR.....	Erro! Indicador não definido.
5.7.1.	Determinação da rotação específica da substância 17	82
5.7.2.	Confirmação das substâncias por UHPLC-TOF-HRMS	83
5.7.3.	Análise por LC-MS/MS das substâncias 10, 12 e 15	85
5.7.3.1.	<i>Substância 12</i>	85
5.7.3.2.	<i>Substância 10</i>	86
5.7.3.3.	<i>Substância 15</i>	87
5.8	Tentativa de identificação de monofluoracetato	88
5.9	Resultado do teste de toxicidade com <i>Zebrafish</i>	91
6	CONCLUSÕES.....	93
7	REFERÊNCIAS.....	94
8	ANEXO	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química de produtos naturais

Os produtos naturais extraídos de plantas sempre exerceram um papel de destaque no processo de descoberta de fármacos, seja como inspiração para a síntese de novas moléculas, seja pelas propriedades farmacológicas das plantas de uso tradicional que resultaram em inovações farmacêuticas valiosas para a saúde humana. Os produtos naturais também são componentes de frutos, legumes, tubérculos e plantas não tóxicas, sendo hoje muito utilizados na alimentação e prevenção de doenças.

As plantas, ao longo da História, têm sido fonte promissora para obtenção de bioprodutos para vários fins, sendo os fármacos os que mais impactaram os produtos naturais pelos benefícios para a medicina, exercendo até hoje um importante papel na melhoria da qualidade de vida da sociedade e trazendo riqueza econômica (CRAGG; NEWMAN, 2013). A Mesopotâmia possui relatos datando de 2600 a.C., com aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas. A medicina egípcia data de aproximadamente 2900 a.C., porém, o documento mais conhecido é o “Ebers Papyrus” (1500 a.C.) que relata mais de 700 drogas, a maioria de origem natural. A medicina tradicional chinesa trata-se da terceira mais antiga do mundo, e acredita-se que uma das primeiras farmacopeias do mundo foi escrita na dinastia Tang (659 d.C), contendo 54 capítulos e 840 descrições de drogas (HUANG, 1999).

Nas Américas, civilizações pré-colombianas também faziam o uso de plantas para curar ou tratar doenças. Um manuscrito asteca chamado “Pequeno Livro das Ervas Medicinais dos Índios” escrito 1552, traduzido para latim por Juan Badiano e mais comumente conhecido como Códice Badiano, descreve diversas plantas com propriedades medicinais usadas naquela época (ACEVES-AVILA et al., 2003). Mais recentemente, de 1985 a 1995, 60% dos fármacos aprovados como agentes antitumorais e anti-infecciosos também eram de origem natural (CRAGG; NEWMAN, 2013).

É importante salientar que fármacos de origem natural podem ser classificados como produtos naturais originais, produtos semissintéticos (derivados de produtos naturais) ou produtos sintéticos baseados em estruturas naturais (CRAGG;

NEWMAN; SNADER, 1997). Os produtos naturais possuem uma ampla variedade de grupos farmacofóricos e um alto grau de estereoseletividade, constituindo-se uma fonte robusta de características estruturais úteis para estudos farmacológicos. As inúmeras substâncias identificadas nas coleções de produtos naturais são alvos importantes para identificar *hits* e *leads*, mesmo para os mais desafiadores, como interações proteína-proteína (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Depois de um aumento na produção de novos medicamentos no final dos anos 1980 (mais de 60 NCEs – *New chemical entities* - por ano), houve uma desaceleração do setor farmacêutico, e com isto os investimentos no processo de descoberta sofreram um decréscimo acentuado nos anos de 2001 a 2010, com uma média de 23 NCEs por ano. Essa queda pode ser atribuída à falta de interesse nos produtos naturais pelas principais companhias farmacêuticas e maior investimento na química combinatória para a geração de novas bibliotecas moleculares, sobre tipos estruturais já conhecidos, ou seja, fragmentos moleculares ou modificações funcionais em fármacos consagrados. Com essa queda de NCEs, o interesse na “redescoberta de produtos naturais” foi reacendido, bem como a crescente apreciação de novos modelos de produtos naturais na melhora de eficiência na então chamada síntese orientada diversa (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Diante destes dados, países como o Brasil, que detêm grande parte da biodiversidade mundial, poderão beneficiar-se deste patrimônio se esforços forem dirigidos para a pesquisa colaborativa de descoberta de fármacos potenciais desta biodiversidade.

1.2 Família Malpighiaceae

Malpighiaceae é uma família de angiospermas que possui ampla diversidade de formas vegetais como árvores, arbustos, cipós e trepadeiras. São encontradas em regiões tropicais, subtropicais e savanas, principalmente na América do Sul, ao norte do Trópico de Capricórnio, sendo o Brasil o país sul-americano que possui maior representatividade dessa família (ANDERSON, 2004; DAVIS; ANDERSON, 2010).

A família Malpighiaceae é constituída por 77 gêneros e aproximadamente 1300 espécies (DAVIS; ANDERSON, 2010), sendo que a maior parte delas encontra-se no Novo Mundo. Estima-se que 85% das espécies dessa família encontram-se nas Américas, e os outros 15% nas outras regiões tropicais e subtropicais do globo, como

ilustrado na Figura 1. Estudos fitoquímicos das espécies dessa família mostraram que os metabólitos secundários acumulados são das classes dos flavonoides, alcaloides, taninos e terpenoides (QUEIROZ et al., 2014; SANNOMIYA et al., 2005).

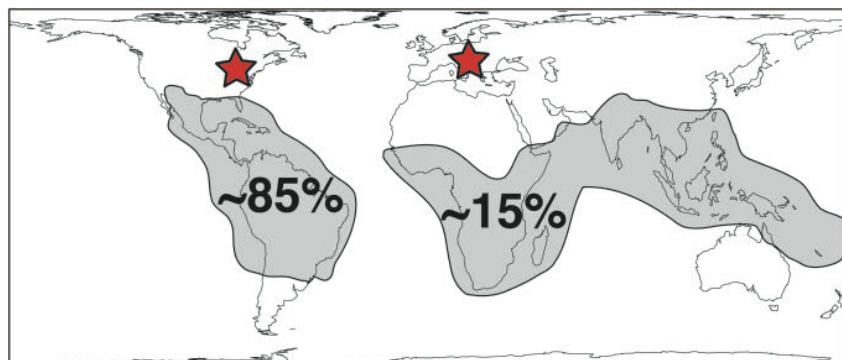


Figura 1 – Estimativa da distribuição geográfica atual da família Malpighiaceae (estrelas vermelhas indicam a localidade de fósseis dessa família).

Fonte: DAVIS et al., 2002

Muitas espécies dessa família possuem atividades biológicas, como antifúngica (*Heteropterys byrsonimifolia*), antidepressiva, ansiolítica (*Heteropterys brachiata*) e algumas podem ser consumidas como fruto (*Malpighia emarginata*). No entanto, algumas espécies desta família são também conhecidas por serem alucinógenas e tóxicas (*Niederzuehlla multiglandulosa*, *Niederzuehlla acutifolia*, *Tetrapteryx mucronata*) (HUERTA-REYES; JUÁREZ; AGUILAR-ROJAS, 2015).

1.3 Ayahuasca e Santo Daime – *Banisteriopsis caapi* e *Tetrapteryx mucronata*

Existem muitas plantas com propriedades alucinógenas utilizadas para o preparo de bebidas ingeridas em rituais indígenas da região Amazônica. Uma das bebidas mais conhecidas desde os tempos pré-colombianos e, provavelmente, desde os primeiros habitantes dessa região, é um chá chamado Ayahuasca (nome quéchua para “cipó das almas”), que até os dias de hoje é um importante elemento da etnomedicina e xamanismo entre os povos indígenas do Peru, Equador e Colômbia. Além do uso indígena, esse chá tem sido utilizado em movimentos religiosos sincréticos do Brasil, como a União do Vegetal (UDV) e o Santo Daime. O consumo é feito durante rituais em grupo, que mais se assemelha à eucaristia cristã do que o uso tradicional indígena (MCKENNA et al., 1998).

A UDV foi um dos principais movimentos a convencer o governo da remoção da Ayahuasca da lista de “drogas” proibidas. Desde 1987 o Brasil permite o uso desse chá em cerimônias de grupos religiosos, o que causou um grande impacto mundial pois foi uma das primeiras vezes que um governo permitiu o uso de psicodélicos em rituais religiosos por cidadãos não-indígenas (MCKENNA et al., 1998).

O preparo da Ayahuasca se dá através da decocção do cipó da *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) e das folhas da *Psychotria viridis* (Rubiaceae). Estudos realizados com a *P. viridis* mostram que sua composição química é rica em alcaloides triptamínicos, dentre eles, a *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) (FREEDLAND; MANSBACH, 1999). O DMT faz parte da lista de substâncias controladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Portaria SVS/MS, número 344/98, devido ao seu efeito alucinógeno. Estudos fitoquímicos realizados com a *B. caapi* mostram que essa espécie acumula, principalmente em seu cipó, alcaloides β -carbolínicos (SAMOYLENKO et al., 2010), sendo que essa classe de substâncias possui relatos na literatura de atividade analgésica (FAROUK et al., 2007), anticâncer (JAHANIANI et al., 2005), antimicrobiana (ARSHAD et al., 2008), entre outras.

Além da *B. caapi*, outras espécies dessa família também podem ser usadas no preparo da Ayahuasca, como a *B. inebrians*, *B. martiniana*, *B. muricata*, *Tetrapteryx methysca* e *Tetrapteryx mucronata* (OTT, 1996). O grupo de pesquisa NuBBE realizou um estudo fitoquímico da *Tetrapteryx mucronata* (QUEIROZ et al., 2014), uma espécie que ainda não havia sido profundamente estudada e é morfológicamente muito similar à *B. caapi*.

O estudo revelou que essa espécie é rica em triptaminas e alcaloides, os quais são responsáveis por alterações graves no sistema nervoso central. Além disso, os principais constituintes relatados presentes nos extratos das folhas são alcaloides, flavonoides e fenantrenos. Vinte e duas substâncias foram isoladas e são apresentadas na Figura 2, sendo seis inéditas (9, 10, 16-17 e 20) e cinco as que apresentaram inibição da acetilcolinesterase (AChE) (1, 5, 6, 9 e 10), uma enzima utilizada para o mapeamento de disfunções cerebrais e um alvo para a descoberta de fármacos para tratamento da doença de Alzheimer (QUEIROZ et al., 2014, 2015).

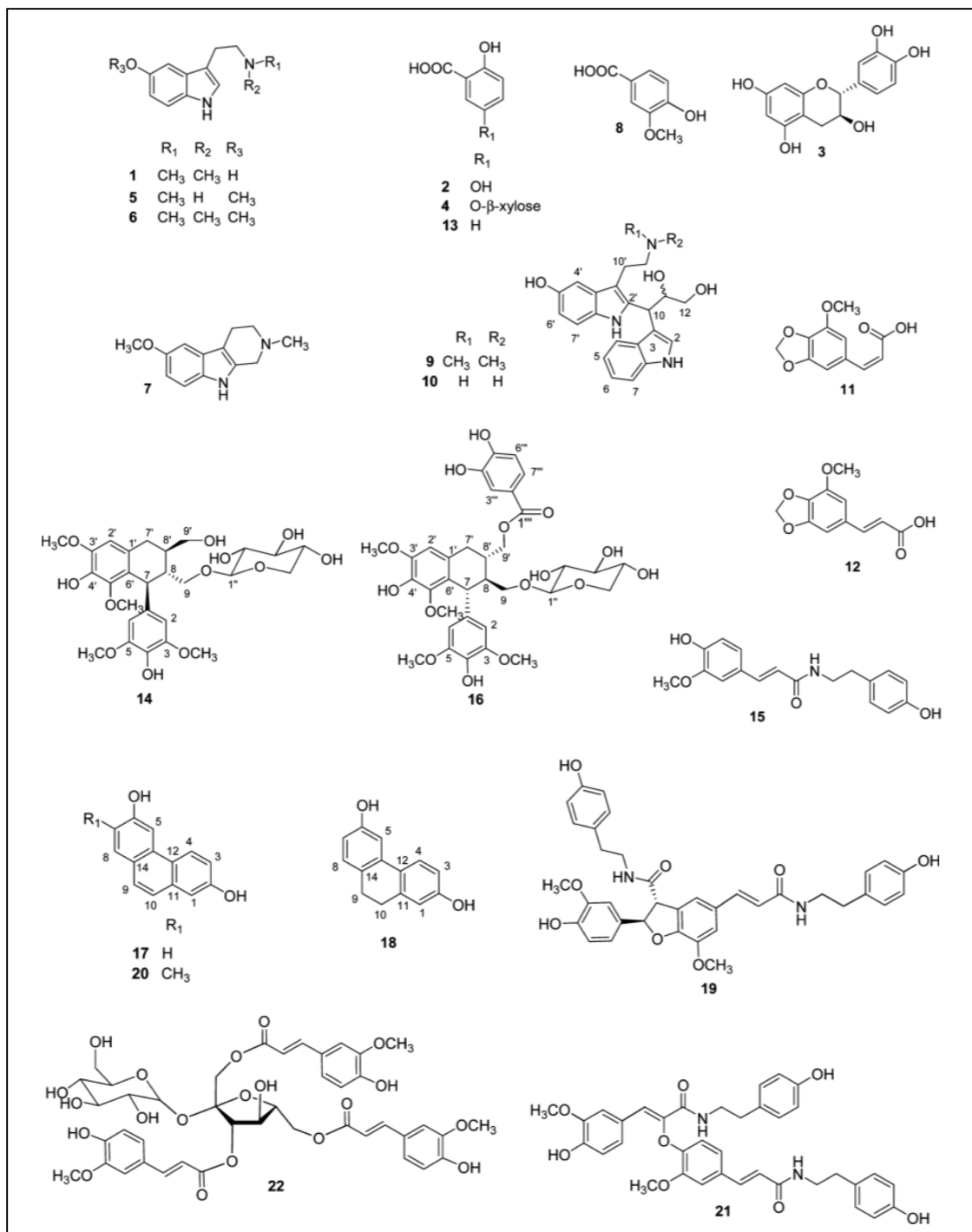


Figura 2 – Substâncias isoladas da *Tetrapterys mucronata*.

Fonte: QUEIROZ et al., 2014

Tendo em vista que esses alcaloides isolados da *T. mucronata* apresentaram dados promissores de inibição da enzima AChE, surgiu o interesse do grupo em aprofundar o estudo em outras espécies de *Tetrapterys*, ou ainda de espécies que anteriormente pertenciam a esse gênero, ainda com pouco estudo químico.

1.4 Espécie *Niedenzuella multiglandulosa*

Recentemente, várias espécies que eram anteriormente consideradas como pertencentes ao gênero *Tetrapteryx* passaram por uma revisão taxonômica e são atualmente consideradas como do gênero *Niedenzuella*, sendo um exemplo a espécie *Niedenzuella multiglandulosa* (ANDERSON, 2006).

O gênero *Niedenzuella*, pertencente à família Malpighiaceae, possui espécies encontradas em todo o Brasil, sendo que já foram relatadas 13 espécies distribuídas, principalmente na Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado (*Niedenzuella* in Flora do Brasil 2020). Por se tratar de um gênero relativamente novo, relatos na literatura a respeito desse gênero são escassos.

A *Niedenzuella multiglandulosa*, popularmente conhecida como “cipó-vermelho” ou “cipó-ferro” (Figura 3), é uma espécie arbustiva ou cipó, encontrada nos estados de Rio de Janeiro, São Paulo e Mato Grosso do Sul (RIET-CORREA et al., 2005). Esta espécie é conhecida por ter alta toxicidade e causar a morte em gado e ovinos, consequentemente, causando perdas econômicas difíceis de serem estimadas (CARVALHO et al., 2009).

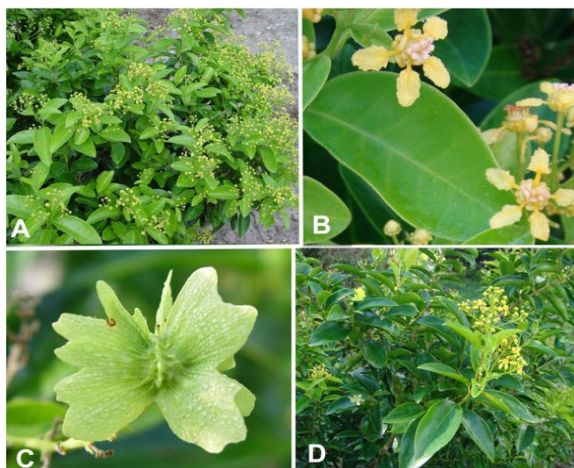


Figura 3 – *Niedenzuella multiglandulosa*: (A e D) Planta florescendo; (B) Folhas e flores; (C) Frutos.

Fonte: Riet-Correa; Medeiros; Schild, 2012.

Existem dois tipos de plantas que causam insuficiência cardíaca em ruminantes: as que causam insuficiência superaguda com morte súbita e as que causam insuficiência crônica. Duas das plantas brasileiras conhecidas pelo segundo tipo são as *N. multiglandulosa* e *N. acutifolia*. Estudos realizados no estado do Mato

Grosso do Sul para a *N. multiglandulosa* (CARVALHO et al., 2006) e nos estados do Rio de Janeiro (CALDAS et al., 2011) e Espírito Santo (CARVALHO et al., 2009) para a *N. acutifolia*, onde ocorreram surtos de intoxicação do gado, revelam que os animais apresentavam sinais clínicos relacionados à insuficiência cardíaca, como veia jugular ingurgitada, pulso venoso positivo, edemas subcutâneos, edema esternal (“peito inchado”) e arritmia cardíaca. Outros sintomas observados foram dificuldade de locomoção, letargia, fraqueza, anorexia, abortos e nascimento de bezerros fracos que morreram com poucos dias de vida.

Em um surto que ocorreu em 2004 no estado do Mato Grosso do Sul, aproximadamente 80% das 290 vacas prenhas que haviam sido introduzidas em um pasto de 60 hectares altamente infestado por *Niederzuehlla multiglandulosa*, abortaram ou pariram bezerros fracos que morreram com apenas alguns dias de vida. A causa da morte dos fetos abortados parece ser a mesma da constatada para os animais adultos, indicando que a substância tóxica pode atravessar a barreira placentária. Essa hipótese é suportada pelo fato de não terem sido encontradas lesões placentárias no gado intoxicado por *Niederzuehlla multiglandulosa* (PEIXOTO et al., 2011).

Uma reprodução experimental da intoxicação causada por essa planta foi realizada em ovinos, na qual o Ovino 1 recebeu uma dose diária de 13,92 g/kg de folhas de *Niederzuehlla multiglandulosa* durante 29 dias (totalizando 20,110 kg) e o Ovino 2 recebeu 7,36 g/kg por 35 dias (totalizando 12,88 kg). Os primeiros sinais de intoxicação, em ambos ovinos, foram relatados após 7 e 4 dias, respectivamente, consistindo em taquicardia e arritmia cardíaca, sendo estes mais acentuados quando em exercício. Nos últimos dias de administração da planta observou-se dificuldade respiratória acentuada, acentuada braquicardia, animais apáticos e permanecendo a maior parte do tempo em repouso, sendo encontrados mortos no 30º e 36º dia, respectivamente (CARVALHO et al., 2006). A necropsia dos animais mostrou que seus corações apresentavam forma globosa com extensas áreas brancas, os pulmões eram pesados e úmidos, havendo espuma branca na traqueia, e os fígados estavam com aspecto de noz moscada na superfície do corte. No útero do Ovino 1 havia um feto edematoso, enquanto no útero do Ovino 2 havia um feto morto (CARVALHO et al., 2006).

Apesar de vários estudos toxicológicos já relacionarem a causa da morte do gado por intoxicação por *Niederzuehlla multiglandulosa* com problemas cardíacos, a

patogênese das lesões cardíacas em animais adultos e em fetos ainda é desconhecida (PEIXOTO et al., 2011). Dessa forma, a identificação das substâncias presentes nas folhas e a determinação da(s) substância(s) responsável(is) pela toxicidade descrita pelos ensaios torna-se interessante para melhor compreensão das causas de morte provocadas por essa espécie e também para identificar quais são as substâncias presentes nestas espécies de Malpighiaceae responsáveis pela ação tóxica.

1.5 Monofluoracetato (MF) como substância tóxica

O monofluoracetato (MF), cuja estrutura é mostrada na Figura 4, foi sintetizado pela primeira vez por cientistas belgas em 1896 e sua patente foi concedida em 1927 em que seu uso se daria para o controle de traças. No entanto, observou-se sua toxicidade em 1934, na época da Segunda Guerra Mundial (1939 – 1945) em que rodenticidas como tálho e estricnina eram escassos e alternativas foram buscadas para essas substâncias. Nessa mesma época, testes realizados nos Estados Unidos, no Centro de Pesquisa de Animais Selvagens, confirmaram que a utilização do MF seria eficiente como controle de roedores e o chamou de Composto 1080, sendo esse o nome popular utilizado até os dias de hoje. Em 1945 o MF começou a ser empregado como rodenticida e, posteriormente, como um controlador de predadores de animais de produção (geralmente ovinos e caprinos), como os coiotes. Décadas depois, o MF foi proibido nos Estados Unidos em 1972 devido às intoxicações acidentais em animais não-alvos e até mesmo em humanos (NOGUEIRA et al., 2011).

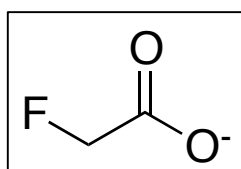


Figura 4 – Estrutura do monofluoracetato (MF).

O Ministério da Saúde do Brasil proibiu, em 1982, a fabricação, comercialização, e uso de MF. Em 1997, pela Portaria número 321 de 28 de julho, a utilização de MF como rodenticida domissanitário foi legalmente proibida, uma vez que cães e gatos são as principais espécies intoxicadas por essa substância, tanto em situações acidentais ou criminosas (NOGUEIRA et al., 2011).

Em 2004 foram confirmados 73 animais mortos no Zoológico de São Paulo, dentre estes: 43 porcos-espinhos, 7 micos-leões-de-caras-douradas, 5 dromedários, 3 chimpanzés, 3 antas, 3 tamanduás-mirins, 1 elefante, 1 orangotango, entre outros (ORTIZ, 2005). O resultado toxicológico foi positivo para MF, e suspeita-se que se tratou de uma ação criminosa, porém nenhum suspeito chegou a ser preso por falta de provas.

O modo de ação do MF foi extensamente estudado e sabe-se que essa substância atua como um bloqueador do ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs), reduzindo a produção de ATP e, conseqüentemente, o metabolismo do animal. O ciclo do ácido cítrico é mostrado na Figura 5.

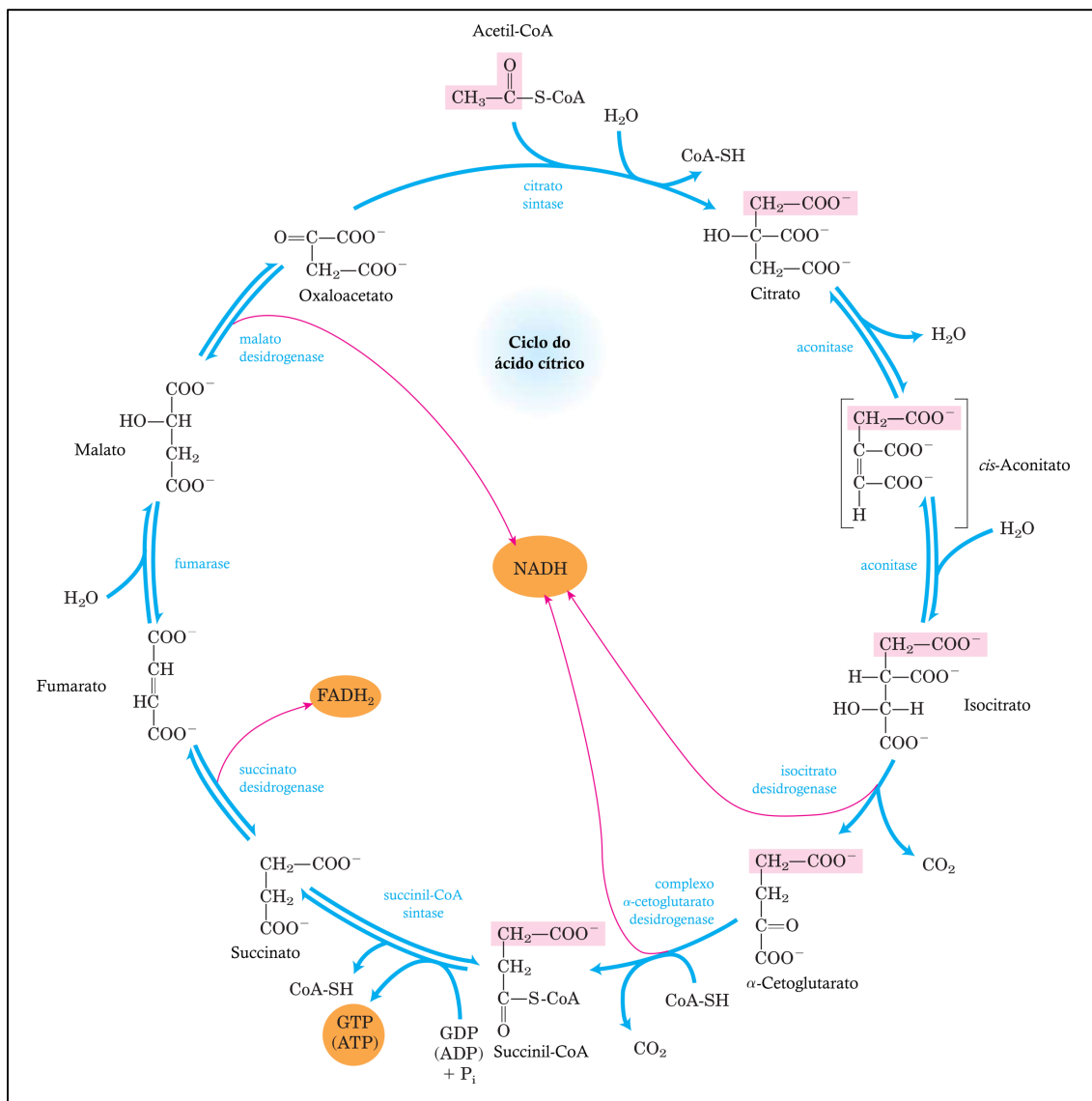


Figura 5 – Ciclo do ácido cítrico.

Fonte: Adaptado de NELSON; COX, 2005

O MF é muito tóxico para mamíferos e insetos devido à sua similaridade com o acetato, que tem uma função fundamental no metabolismo celular (PROUDFOOT; BRADBERRY; VALE, 2006). Essa substância é convertida a fluoroacetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima acetato tioquinase. A fluoroacetil-CoA reage com o oxaloacetato em uma segunda reação catalisada pela enzima citrato sintase para gerar o fluorocitrato, como pode-se observar na Figura 6 (CAMPBELL; FARRELL, SHAWN, 2015; NELSON; COX, 2005).

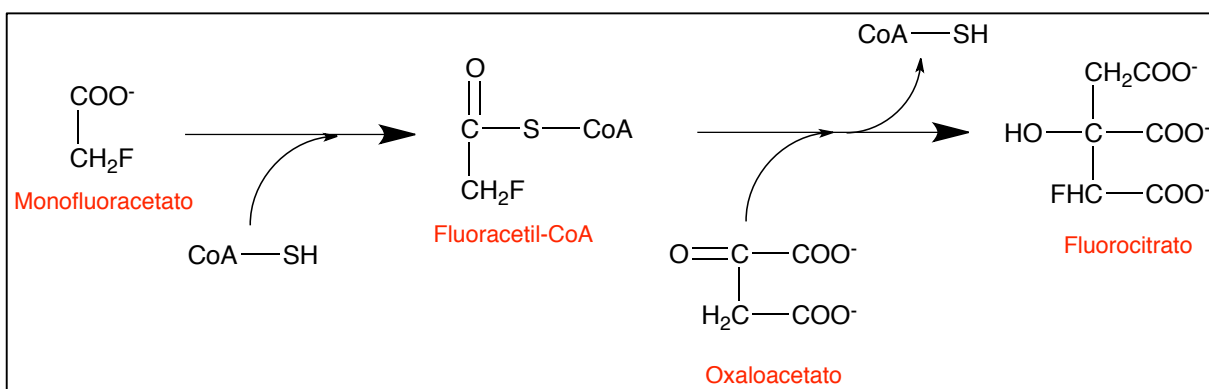


Figura 6 – Formação de fluorocitrato a partir de monofluoroacetato.

Fonte: Adaptado de CAMPBELL; FARRELL, 2015.

O fluorocitrato compete com o citrato pela ligação com o sítio ativo da enzima aconitase, impedindo a conversão de citrato em isocitrato e, conseqüentemente, nas conversões seguintes no ciclo de Krebs, impedindo a formação de NADH e FADH_2 , que gerarão ATP (NOGUEIRA et al., 2011). Além disso, o MF também inativa o transportador de citrato na membrana mitocondrial, aumentando assim a concentração de citrato intracelular. Dessa forma, o citrato passa a competir o sítio ativo de outras enzimas, incluindo uma enzima chave para a regulação do processo de glicólise: a fosfofrutoquinase. O processo de glicólise é então inibido e há o acúmulo de glicose no organismo, levando a um quadro de hiperglicemia (PROUDFOOT; BRADBERRY; VALE, 2006).

Sabe-se que muitas plantas tóxicas distribuídas ao redor do mundo contêm MF, principalmente em países da África, Austrália e América do Sul, e essas espécies são geralmente das famílias Fabaceae, Rubiaceae, Bignoniaceae, Malpighiaceae e Dichapetalaceae (LEE et al., 2014), e são conhecidas por causar “morte súbita” em animais. No Brasil, espécies de que causam morte súbita no gado são, geralmente, dos gêneros *Palicourea* (Rubiaceae), *Arrabidaea* (Bignoniaceae) e *Amorimia*

(Malpighiaceae) e são responsáveis por aproximadamente metade das mortes de gado causadas por plantas tóxicas (LEE et al., 2014; TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002).

Niedenzuella acutifolia, *Niedenzuella multiglandulosa* e *Ateleia glazioviana* também são relatadas por serem tóxicas para o gado, porém foi observado que a intoxicação por essas espécies causa um quadro clínico característico, mais se assemelhando a uma intoxicação crônica do que a uma intoxicação aguda, que levaria à morte súbita do gado. No caso dessas espécies, a morte ocorre dentro de semanas ou até mesmo meses (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002).

Em um estudo recente descrito por Santos-Barbosa e colaboradores (2017) foi possível identificar MF em *N. multiglandulosa* coletada no Jardim Botânico do Missouri (Estados Unidos) através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Porém, dentre 8 amostragens realizadas, MF foi observado somente em uma delas a uma concentração de $1,7 \mu\text{g g}^{-1}$. No entanto, até o momento não foi realizado nenhum estudo fitoquímico envolvendo isolamento e testes de toxicidade dos compostos presentes em *N. multiglandulosa*.

1.6 Ensaio de toxicidade empregando *Zebrafish*

Os modelos de ensaios utilizando mamíferos, como os ratos, vêm sendo utilizados há muito tempo na modelagem de doenças humanas, principalmente devido à homologia entre os genomas de mamíferos e às semelhanças anatômicas, fisiológicas e celulares. No entanto, outros fatores devem ser considerados além da proximidade evolutiva e homologia anatômica ao selecionar um modelo de doença animal. Animais maiores, por exemplo, como ovelhas e ratos podem apresentar fisiologias e tamanhos de órgãos mais parecidos com os dos humanos, facilitando o desenvolvimento de intervenções terapêuticas (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Porém, o alto grau de conservação funcional nos processos biológicos básicos entre mamíferos e invertebrados sugere que doenças resultadas da interrupção de um determinado processo celular podem ser modeladas com precisão a nível genético e molecular em, por exemplo, moscas e larvas. Os ensaios realizados em ratos são muito utilizados, porém dificilmente em uma escala em que seria possível utilizando invertebrados pois requerem maior estrutura e investimento. Dessa forma, tais

abordagens em ratos são limitadas a alguns projetos colaborativos maiores (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Dessa forma, o *Zebrafish* (*Danio rerio*) começou a chamar a atenção de pesquisadores como sendo um modelo de animal vertebrado geneticamente atraente para o desenvolvimento de ensaios. Desde os anos 1930 o *Zebrafish* era utilizado como um modelo clássico de desenvolvimento e embriologia e, com o passar dos anos, passou a ser mais profundamente estudado, sendo possível a observação *in vivo* de eventos celulares biológicos devido à sua clareza óptica. Na década de 1980, o desenvolvimento de técnicas genéticas do *Zebrafish* como clonagem, mutagênese e transgênese sustentou o uso desse pequeno peixe para aplicar a genética de invertebrados para questões de desenvolvimento de vertebrados. Recentemente, o *Zebrafish* vem sendo cada vez mais utilizado como modelo mesmo para diversas doenças humanas. Apesar das diversas diferenças fisiológicas entre peixes e mamíferos, esse peixe apresenta diversas vantagens que tornam o ensaio desse modelo complementar aos ensaios em ratos (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

O *Zebrafish* é, atualmente, um dos melhores modelos de espécies vertebradas no desenvolvimento de ensaios biológicos voltados para toxicidade. Apesar desse peixe não apresentar alguns órgãos presentes nos mamíferos, como pulmão, próstata e glândulas mamárias, seus tecidos e órgãos têm se mostrado homólogos aos mamíferos em nível anatômico, fisiológico e molecular (ESCH et al., 2012).

De modo a se obter informações reais e confiáveis a respeito de ensaios de toxicidade, devem ser feitos ensaios em que haja a exposição de um organismo em todos os estágios de vida, a fim de se estabelecer uma relação entre o seu desenvolvimento nos diferentes estágios de vida e que forneçam informações precisas sobre a ação das substâncias tóxicas. Essa abordagem exige que o ensaio seja feito em um organismo pequeno, robusto, de fácil manutenção, com alta fecundidade e que se desenvolva rapidamente (ESCH et al., 2012).

Em testes de toxicidade, uma grande vantagem do uso do *Zebrafish* é que sua exposição à substância pode se dar por meio de difusão simples, por injeção no saco vitelino, ou circulação, o que facilita o teste de substâncias maiores ou hidrofílicas. No período de 72 h após a fertilização, a larva começa a se alimentar independentemente e os compostos também podem ser administrados de forma oral. Outras vantagens que viabilizam a realização deste ensaio é que o peixe põe grande quantidade de ovos, pequeno tamanho, translucidez durante o desenvolvimento do embrião e da

larva e desenvolvimento rápido do cérebro, coração, fígado rins, intestinos, ossos, músculos e sistemas sensoriais que estão totalmente funcionais apenas 5 dias após a fertilização (KIMMEL et al., 1995). A Figura 7 mostra um esquema do rápido desenvolvimento em horas após a fertilização (hpf) do *Zebrafish*.

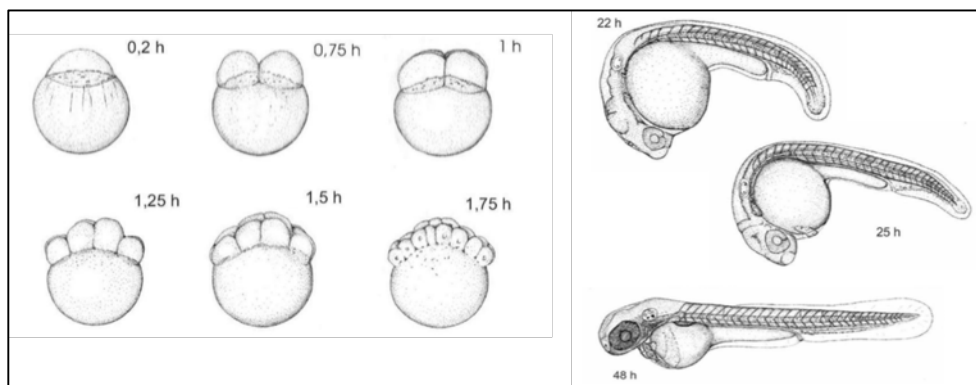


Figura 7 – Desenvolvimento da larva do Zebrafish em 0,2 a 1,75 hpf e 22 a 48 hpf.

Fonte: Adaptado de KIMMEL et al., 1995.

É importante destacar que o pequeno tamanho das larvas do *Zebrafish* permite que elas cresçam e se desenvolvam em um único poço de uma placa de microdiluição, possibilitando que este ensaio seja altamente adequado para *screening* utilizando pequenas quantidades de amostra (BARROS et al., 2008), ou seja, são necessárias quantidades de amostra de testes *in vitro*, porém para se realizar testes *in vivo*.

A possibilidade de se testar a toxicidade de uma substância poucas horas após a fertilização do ovo torna esse teste ideal para o acompanhamento do desenvolvimento da larva. No caso da *Niedenzuella multiglandulosa*, em que são relatadas má formações em fetos e aborto, a administração das substâncias isoladas poucas horas após a fertilização seria interessante para que as condições do ensaio sejam as mais similares possíveis às observadas na intoxicação do gado. Para se acompanhar os efeitos que uma substância pode causar ao ovo fecundado, é possível observar se houve a coagulação do ovo, se os somitos não foram formados, se a cauda não se desenvolveu ou se o coração parou de bater (OECD, 2013).

1.7 Justificativa para o estudo

O grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani, do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE),

vem contribuindo há muitos anos na pesquisa de na área de produtos naturais brasileiros, visando avanços na descoberta de substâncias bioativas, protótipos de fármacos e cosméticos, além de um maior entendimento de espécies ainda pouco estudadas.

Aproximadamente 20% da biodiversidade global (VALLI et al., 2013) encontra-se em território nacional, sendo que grande parte dessas espécies são encontradas em importantes biomas brasileiros, como a Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado. Os projetos realizados nos últimos anos no NuBBE resultaram em informações valiosas sobre a química de produtos naturais brasileiros, em que em uma coleção de 1700 extratos, mais de 600 compostos foram isolados e agrupados em uma base de dados (NuBBE Database) (VALLI et al., 2013). Dessas moléculas, várias apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, antimalárica e inibidora da enzima AChE.

A *Banisteriopsis caapi* é uma espécie utilizada no preparo de uma bebida chamada Ayahuasca, um chá utilizado em rituais religiosos tanto indígenas (no Peru, Equador e Colômbia) quanto em movimentos religiosos sincréticos do Brasil, (União do Vegetal e o Santo Daime). Os constituintes micromoleculares presentes na *B. caapi* já são bastante conhecidos e consistem em triptaminas alucinógenas e tóxicas, porém existe outra espécie morfológicamente muito semelhante a *B. caapi*, chamada *Tetrapterys mucronata*, que por engano também pode ser utilizada no preparo desse chá. Os constituintes presentes na *T. mucronata* ainda eram desconhecidos, mas em um estudo realizado no NuBBE foi possível identificar triptaminas ainda mais tóxicas que as presentes na *B. caapi*, além de fenantrenos e flavonoides. Os alcaloides isolados da *T. mucronata* mostraram resultados promissores em ensaios de inibição da enzima AChE, aumentando o interesse do grupo em estudar outras espécies do gênero *Tetrapterys*.

Sabe-se que a *Niederzuehlla multiglandulosa* (anteriormente pertencente ao gênero *Tetrapterys* – *Tetrapterys multiglandulosa*) é uma planta tóxica presente no Brasil e que causa intoxicação crônica no gado. A morte de gado pode ser bastante prejudicial para a economia nacional, uma vez que aproximadamente 20% da economia brasileira é baseada no agronegócio, movendo aproximadamente 1,3 trilhões de reais, e somente a pecuária move em torno de 400 bilhões de reais por ano (Fundeppec-GO). Além disso, em uma média de produção de carne entre os anos de 2000 a 2014, o Brasil aparece na segunda colocação entre os principais produtores

do mundo (FAOSTAT). Tendo em vista esses dados, torna-se necessário um maior entendimento de plantas tóxicas presentes em território brasileiro. Tanto estudos fitoquímicos detalhados quanto ensaios de toxicidade ainda não foram realizados na espécie *Niedenzuella multiglandulosa*, tornando grande o interesse em determinar os constituintes micromoleculares presentes em suas folhas e testá-los quanto à toxicidade.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do projeto proposto consistiu no mapeamento do perfil químico das folhas de *Niedenzuella multiglandulosa* (Malpighiaceae), visando a identificação dos metabólitos secundários responsáveis pela toxicidade atribuída à planta através do ensaio utilizando modelo com *Zebrafish*. Parte do projeto foi desenvolvido em colaboração internacional com a Universidade de Genebra.

Objetivos específicos

As estratégias traçadas para alcançar os objetivos delineados nesse trabalho são listadas a seguir:

- Obtenção dos extratos das folhas jovens e velhas de *Niedenzuella multiglandulosa* (Malpighiaceae) utilizando solventes de diferentes polaridades;
- Análise dos extratos por HPLC acoplada ao detector de Arranjo de Diodos (DAD) e por NMR de 600 MHz;
- Avaliação da toxicidade dos extratos por ensaio com *Zebrafish*;
- Obtenção em grande escala dos extratos tóxicos de folhas jovens de *Niedenzuella multiglandulosa* (Malpighiaceae) utilizando solventes de diferentes polaridades;
- Análise dos extratos obtidos em maior quantidade por HPLC acoplada ao detector de Arranjo de Diodos (DAD) e Espalhamento de Luz (ELSD), por UHPLC-TOF-HRMS e por NMR de 600 MHz.
- Isolamento dos compostos contidos no extrato metanólico (com atividade tóxica) de folhas jovens utilizando Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) e HPLC em escala preparativa;
- Elucidação estrutural dos compostos isolados por NMR 600 MHz e confirmação por UHPLC-TOF-HRMS;
- Avaliação da toxicidade das frações e substâncias isoladas pelo ensaio com *Zebrafish*;

- Tentativa de determinação da presença de monofluoracetato por NMR ^{19}F e LC-MS.

3 MATERIAIS

3.1 Reagentes e Solventes

Os solventes utilizados no processo de extração e separação das substâncias das folhas jovens e velhas foram clorofórmio, hexano, acetato de etila e metanol grau PA, enquanto que os solventes utilizados nas análises por HPLC foram acetonitrila e metanol, grau HPLC da marca Fisher Scientific UK[®] (Loughborough, Reino Unido). Os solventes deuterados (MeOD e DMSO-d₆) utilizados nas análises de RMN foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

3.2 Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados nesse estudo estão listados abaixo.

- Cromatógrafo Líquido Hewlett Packard Series 1100. Bombas: Bin Pump G1312A; Degasser: G1312A; Injetor: ALS G1313A; Forno: Colcom G1316A; Detector: DAD G1315B (Agilent 1100 Series).
- Cromatógrafo Líquido Agilent Technologies Analítico (1260 Infinity). Bombas: 1260 Bin Pump; Autosampler: 1260 ALS; Degasser: 1260 HiP Degasser; Detector UV: 1260 DAD; Detector ELSD: C-650 (Büchi); Forno: 1260 TCC. Agilent Interface 35900E.
- Cromatógrafo Líquido Agilent Technologies Analítico (1200 Series). Bombas: G1311A Quat Pump; Autosampler: G1329A; Degasser: G1379B; Detector UV: G1314B; Forno: G1316A TCC. Acoplado a espectrômetro de massas Quadrupole Agilent 6110.
- Cromatógrafo Preparativo Armen. Spot Prep Liquid Chromatography (Armen Instrument). Degasser: ERC-3415.
- Cromatógrafo Preparativo Shimadzu. Bombas: LC-8A; Degasser: DG660B; Controladora: SCL-10A VP; Detector UV: SPD-10A VP; Injetor: SIL-10A VP.
- Cromatógrafo Preparativo Büchi de Média Pressão. Bombas: Büchi Pump Module C-605; Controladora: Büchi Control Unit C-620; Detector: Büchi UV Photometer C-640; Coletor: Büchi Fraction Collector C-660.

- Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Pressão. AcQuity™ Ultra Performance Waters, acoplado a Espectrômetro de Massas Waters. Micromass – LCT Premier Time-of-flight (TOF) equipado com Electrospray.
- Espectrômetro de Massas de alta resolução Bruker Maxis Impact, ESI-QqTOF. Injeção por infusão direta.
- Rotaevaporador. Buchi R-114; Vacuum Pump V-300; Interface I-300; Recirculation Chiller F-314.
- Polarímetro Perkin Elmer 341-LC;
- Espectrômetro Bruker Avance III HD 600 (14,1 T); Sonda: QCI 5 mm Cryoprobe; Samplejet automatizado com trocador de amostras.

3.3 Material vegetal

As folhas da *Niedenzuella multiglandulosa* foram coletadas na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo Prof. Ricardo Lemos e Prof. Nilton Carvalho. A exsicata está arquivada no Herbário HMS da Embrapa Gado de Corte de Campo Grande, MS com o número exsicata HMS5206. As folhas foram secas à sombra e posteriormente em estufa a uma temperatura de 50 °C por 72 horas. Em seguida foram trituradas em um moinho e envidas para o IQ UNESP - Araraquara.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparo dos extratos de *Niedenzuella multiglandulosa*

As folhas jovens e velhas secas (50 g de cada) de *N. multiglandulosa* foram submetidas a um processo de extração por maceração (200 mL, 24 h, 3 vezes) utilizando solventes de diferentes polaridades, sendo estes, respectivamente, clorofórmio (0,7% NH₄OH) (ZANOLARI et al., 2005), hexano, acetato de etila e metanol. Os extratos foram secos sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C, totalizando 8 extratos ao final. As massas obtidas para cada um dos extratos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Massas obtidas dos extratos preparados em menor quantidade de *N. multiglandulosa*.

Código*	NM_VC	NM_JC	NM_VH	NM_JH	NM_VA	NM_JA	NM_VM	NM_JM
Massa (g)	1,8514	1,6915	0,1579	0,1212	0,1755	0,2369	2,7804	2,1335
Rendimento (%)	3,7	3,4	0,3	0,2	1,1	0,5	5,6	4,3

*NM = *N. multiglandulosa*; V = folhas velhas; J = folhas jovens; C = Clorofórmio; H = Hexano; A = Acetato de etila; M= metanol

O extrato NM_JM se mostrou tóxico no ensaio com *Zebrafish*, sendo necessário preparar os extratos em maior quantidade das folhas jovens de *Niedenzuella multiglandulosa* para que fosse possível o isolamento dos compostos majoritários. As folhas jovens secas (470 g) de *N. multiglandulosa* foram submetidas a um processo de extração por maceração (1,0 L, 24 h, 3 vezes) utilizando solventes de diferentes polaridades, sendo estes, clorofórmio (0,7% NH₄OH), hexano, acetato de etila, metanol e água. Os extratos foram secos sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C, totalizando 5 extratos. As massas obtidas para cada um dos extratos estão apresentadas na Tabela 2 e um fluxograma do processo de extração é mostrado na Figura 8. Dessa forma, obteve-se um rendimento total de extração das folhas jovens de aproximadamente 17,5%.

Tabela 2 – Massas obtidas dos extratos preparados em maior quantidade de *N. multiglandulosa*.

Código*	NM_JC	NM_JH	NM_JA	NM_JM	NM_JH₂O
Massa (g)	15,7669	1,2015	2,3363	18,9128	43,8696
Rendimento (%)	3,3	0,2	0,5	4,0	9,3

*NM = *N. multiglandulosa*; J = folhas jovens; C = Clorofórmio; H = Hexano; A = Acetato de etila; M= metanol.

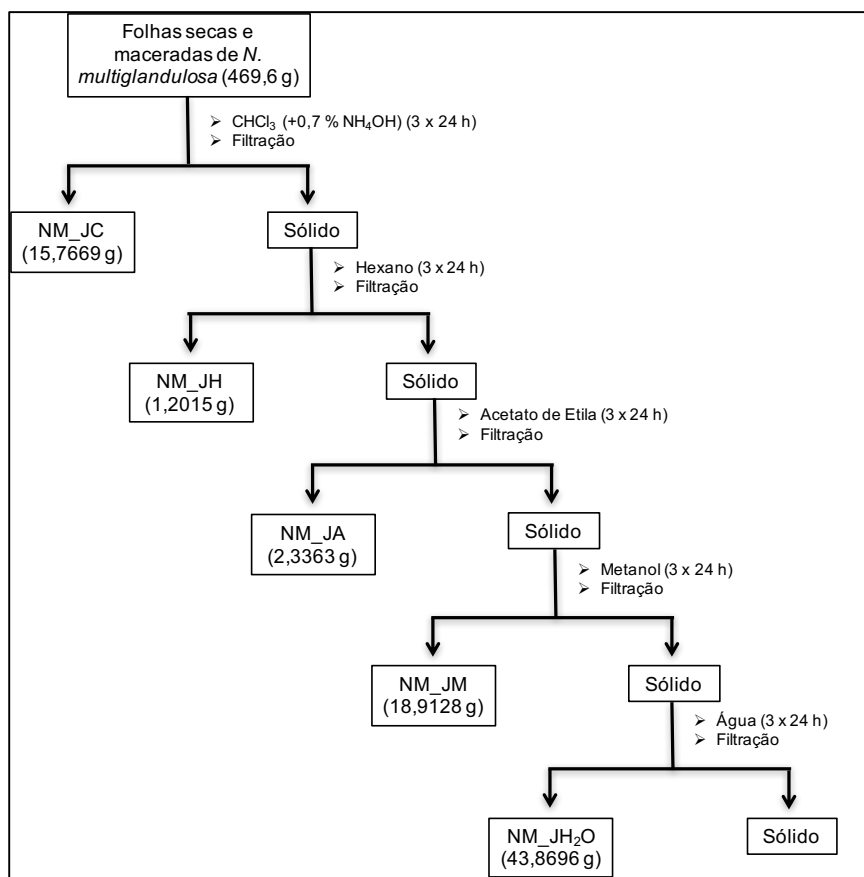


Figura 8 – Fluxograma ilustrativo dos processos de extração dos compostos micromoleculares de *Niedenzuella multiglandulosa*.

4.2 Fracionamento do extrato NM_JM para avaliação de toxicidade em *Zebrafish*

O extrato NM_JM foi fracionado em HPLC em escala preparativa utilizando uma coluna Puriflash C18 (250 x 21,2 mm d.i.; 10 µm), com fase móvel MeOH (0,1% ácido fórmico) e H₂O (0,1% ácido fórmico), temperatura ambiente, vazão de 15 mL min⁻¹, método gradiente 5-100 %B em 60 min e lavagem por 15 min (100%B). Foram feitas 5 injeções de 500 µL de uma solução de concentração 50 mg mL⁻¹, totalizando 125,0 mg de extrato injetados. O fracionamento se fez a cada 10 min e as massas obtidas são apresentadas na Tabela 3. A análise das frações obtidas foi feita por UHPLC, no método descrito na Tabela 7.

Tabela 3 – Tempos de separação e massas obtidas no fracionamento em escala preparativa do extrato NM_JM.

Código	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tempo (min)	0 a 10	10 a 20	20 a 30	30 a 40	40 a 50	50 a 60	60 a 75
Massa (mg)	34,6	4,4	7,4	8,4	2,4	1,4	5,2

4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Pressure Liquid Chromatography* - HPLC) – Escala analítica

4.3.1. Análise dos extratos obtidos em menor quantidade

Os extratos obtidos com os solventes clorofórmio, hexano, acetato de etila e metanol para as folhas jovens e velhas (totalizando 6 extratos) foram submetidos à análise por HPLC-DAD de modo a se obter os perfis cromatográficos das folhas jovens e velhas da *N. multiglandulosa*. A coluna selecionada para a análise foi a Phenomenex® C18-Luna (250 x 4,6mm d.i.; 5 µm), temperatura ambiente com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel escolhida foi uma mistura de MeOH (0,1% ácido fórmico) e H₂O (0,1% ácido fórmico) e o método utilizado foi o gradiente exploratório de 5 a 100% em 40 min. Os espectros de UV-Vis foram registrados na faixa de 200 a 800 nm.

4.3.2. Análise do perfil químico do extrato NM_JM por HPLC-DAD-ELSD

A análise perfil químico do extrato TM_JM por HPLC-DAD-ELSD foi realizada inicialmente empregando o método A (Tabela 4). Em seguida o método foi otimizado para posterior separação em MPLC, sendo seguidos os métodos B, C, D e E mostrados na Tabela 4.

Além disso, foram realizadas corridas em diferentes temperaturas de forno de coluna (24, 30, 35, 40 e 45 °C) de modo a avaliar a pressão do sistema uma vez que o método seria transposto para MPLC, sendo utilizado o método F, também descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas para a separação das bandas do extrato NM_JM (Fase Móvel MeOH:H₂O (0,1% ác fórmico); vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura ambiente, volume de injeção de 10 µL de solução de concentração 10 mg mL⁻¹).

Método	Coluna	Gradiente
A	Puriflash C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 10 µm)	5-100 %B em 40 min
B	Puriflash C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 10 µm)	5-62 %B em 70 min
C	Zeochem Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 µm)	5-62 %B em 70 min
D	Zeochem Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • 5-38 %B em 40 min • 38 %B isocrático em 30 min • 38-62 %B em 20 min • 62-100 %B em 1 min • 100 %B em 10 min
E	Puriflash C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 10 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • 5-38 %B em 40 min • 38 %B isocrático em 30 min • 38-62 %B em 20 min • 62-100 %B em 1 min • 100 %B em 10 min
F	Puriflash C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • 5-38 %B em 40 min • 38 %B isocrático em 30 min • 38-62 %B em 20 min • 62-100 %B em 1 min • 100 %B em 10 min

4.4 Cromatografia Líquida de Média Pressão (*Medium Pressure Liquid Chromatography* – MPLC)

4.4.1. Conversão das condições cromatográficas em escala analítica para a escala preparativa

Após a otimização do método em escala analítica para o extrato NM_JM, este foi convertido para a escala preparativa. Para tal, utilizou-se o software HPLC Calculator 3.0, que estabeleceu as condições detalhadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Conversão das condições analíticas para as condições preparativas (MPLC) utilizando o software HPLC Calculator 3.0 para a amostra NM_JM.

		HPLC-DAD analítico		MPLC-UV preparativo	
Coluna	Altura (mm)	250		460	
	Diâmetro (mm)	4,6		49	
	Partícula (µm)	15-25		15-25	
Vazão (mL min ⁻¹)		1		20	
Dwell Volume (mL)		1		12	
Método		t (min)	%B	t (min)	%B
		0	5	0	5
		40	38	56	5
		70	38	387	38
		90	62	671	38
		91	100	861	62
		101	100	870	100
				965	100

4.4.2. Fracionamento do extrato NM_JM por MPLC-UV

O fracionamento de 7,54 g do extrato NM_JM foi realizado por MPLC, utilizando uma coluna de dimensões 460 x 49 mm d.i. empacotada com Zeoprep C18, 15-25 µm, aquecida à temperatura de 40 °C e com vazão de 20 mL min⁻¹. O extrato foi injetado por meio de uma coluna de injeção (*dry load*), contendo a amostra preparada por dispersão em fase sólida numa proporção de 1:5:1 (extrato NM_JM : Zeoprep C18 (40-63 µm) : areia). O sistema de solventes escolhido foi de MeOH (0,1% Ácido Fórmico) e H₂O (0,1% ácido fórmico). O fracionamento durou aproximadamente 16 horas e resultou em 79 frações de 250 mL. Todas as frações coletadas foram analisadas por UHPLC-DAD-ELSD e as frações 3, 10 e 44 apresentaram espectros de RMN 600 MHz em que foi possível a identificação das moléculas presentes, identificadas como substâncias **1**, **2** e **16**, respectivamente.

4.5 Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography* – UHPLC)

De forma a verificar a pureza das frações obtidas na separação por MPLC (3.3.2), estas foram analisadas por UHPLC-DAD-ELSD e por UHPLC-DAD-HRMS. Foi utilizada a coluna a Acquity BEH C18 (50 x 1 mm d.i.; 1,7 µm), operada a 40 °C, volume de injeção de 1 µL e o sistema de solventes escolhido foi ACN (0,1% ácido

fórmico) e H₂O (0,1% ácido fórmico). O método utilizado (*Short Run*) está detalhado na Tabela 6.

Tabela 6 – Método *Short Run* utilizado em UHPLC nas análises das frações do extrato NM_JM obtidas por MPLC (coluna a Acquity BEH C18 (50 x 1 mm d.i.; 1,7 µm), 40 °C).

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	% A		% B	
		[Água (0,1% ácido fórmico)]	[ACN (0,1% ácido fórmico)]	[Água (0,1% ácido fórmico)]	[ACN (0,1% ácido fórmico)]
0,0	0,3	95	5	95	5
4,0	0,3	5	95	5	95
4,8	0,3	5	95	5	95
4,9	0,3	95	5	95	5
6,0	0,3	95	5	95	5

Além disso, com o propósito de obter melhor resolução das bandas cromatográficas e aumentar a pureza das frações obtidas posteriormente por HPLC preparativo, foi otimizado outro método utilizando uma coluna Acquity BEH C18 (150 x 2,1 mm d.i.; 1,7 µm), a 40 °C, volume de injeção de 2 µL e o mesmo sistema de solventes (Método *Long Run* - Tabela 7), o qual foi empregado nas frações obtidas do fracionamento do extrato NM_JM em escala preparativa para avaliação de toxicidade (Seção 3.2) e nos casos em que as frações obtidas por MPLC (seção 3.4) revelaram bandas impuras quando analisadas pelo método descrito na Tabela 6.

Tabela 7 – Método *Long Run* utilizado em UHPLC nas análises das frações do extrato TM_JM obtidas por MPLC (coluna a Acquity BEH C18 (50 x 1 mm d.i.; 1,7 µm), 40 °C).

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	% A		% B	
		(Água + 0,1% ácido fórmico)	(ACN + 0,1% ácido fórmico)	(Água + 0,1% ácido fórmico)	(ACN + 0,1% ácido fórmico)
0,0	0,46	95	5	95	5
30,0	0,46	5	95	95	5
40,0	0,46	5	95	95	5
40,2	0,46	95	5	95	5
50,0	0,46	95	5	95	5

4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Pressure Liquid Chromatography* - HPLC) – Escala preparativa

As análises por UHPLC relevaram que as frações 17 e 18 obtidas pelo fracionamento em MPLC apresentaram cromatogramas praticamente iguais, sendo possível reuni-las, o mesmo ocorrendo para as frações 52 a 57. Os resultados das análises para as frações 17-18, 20, 34, 31, 35, 36, 52-57 e 76 demonstraram que as

mesmas eram constituídas de misturas de compostos e deveriam ser novamente submetidas à purificação por HPLC em escala preparativa. Para cada fração foi otimizado o método de separação dos compostos presentes. Os métodos utilizados estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Métodos utilizados em HPLC (escala preparativa) para o isolamento das substâncias presentes nas frações indicadas.

Condição	Fração	Coluna	Gradiente (λ)	Solvente	Vazão (mL min ⁻¹)
G	17-18	XBridge™ C18 (150 x 19 mm d.i., 5 μ m)	Isocrático 7 %B em 40 min (280 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: ACN (0,1% ác. fórmico)	10
H	20	XBridge™ C18 (150 x 19 mm d.i., 5 μ m)	Isocrático 8 %B em 60 min (210 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: ACN (0,1% ác. fórmico)	10
I	24	XBridge™ C18 (150 x 19 mm d.i., 5 μ m)	Isocrático 12 %B em 45 min (280 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: ACN (0,1% ác. fórmico)	10
J	31	XBridge™ C18 (150 x 19 mm d.i., 5 μ m)	Gradiente 5-35 %B em 40 min (254 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: ACN (0,1% ác. fórmico)	10
K	33	XBridge™ C18 (150 x 19 mm d.i., 5 μ m)	• 5-12 %B em 15 min • 12 %B isocrático em 60 min (254 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: ACN (0,1% ác. fórmico)	10
L	35	Puriflash C18 (250 x 21,2 mm d.i.; 10 μ m)	Isocrático 37 %B em 60 min (280 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: MeOH (0,1% ác. fórmico)	15
M	36	XBridge™ C18 (150 x 19 mm d.i., 5 μ m)	Isocrático 32 %B em 60 min (280 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: MeOH (0,1% ác. fórmico)	10
N	52-57	XBridge™ C18 (150 x 19 mm d.i., 5 μ m)	Isocrático 16 %B em 80 min (254 nm)	A: H ₂ O (0,1% ác. fórmico) B: ACN (0,1% ác. fórmico)	10

A Figura 9 mostra em forma de fluxograma o procedimento experimental empregado para o isolamento das substâncias presentes nas frações obtidas por MPLC. O fluxograma do procedimento geral seguido nesse trabalho pode ser encontrado na

4.7 Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

As substâncias isoladas no fracionamento por MPLC e por separação por HPLC em escala preparativa foram enviadas para análise por RMN utilizando DMSO-d₆ ou MeOD (equipamento Bruker Avance III HD 600 MHz - 14,1 T).

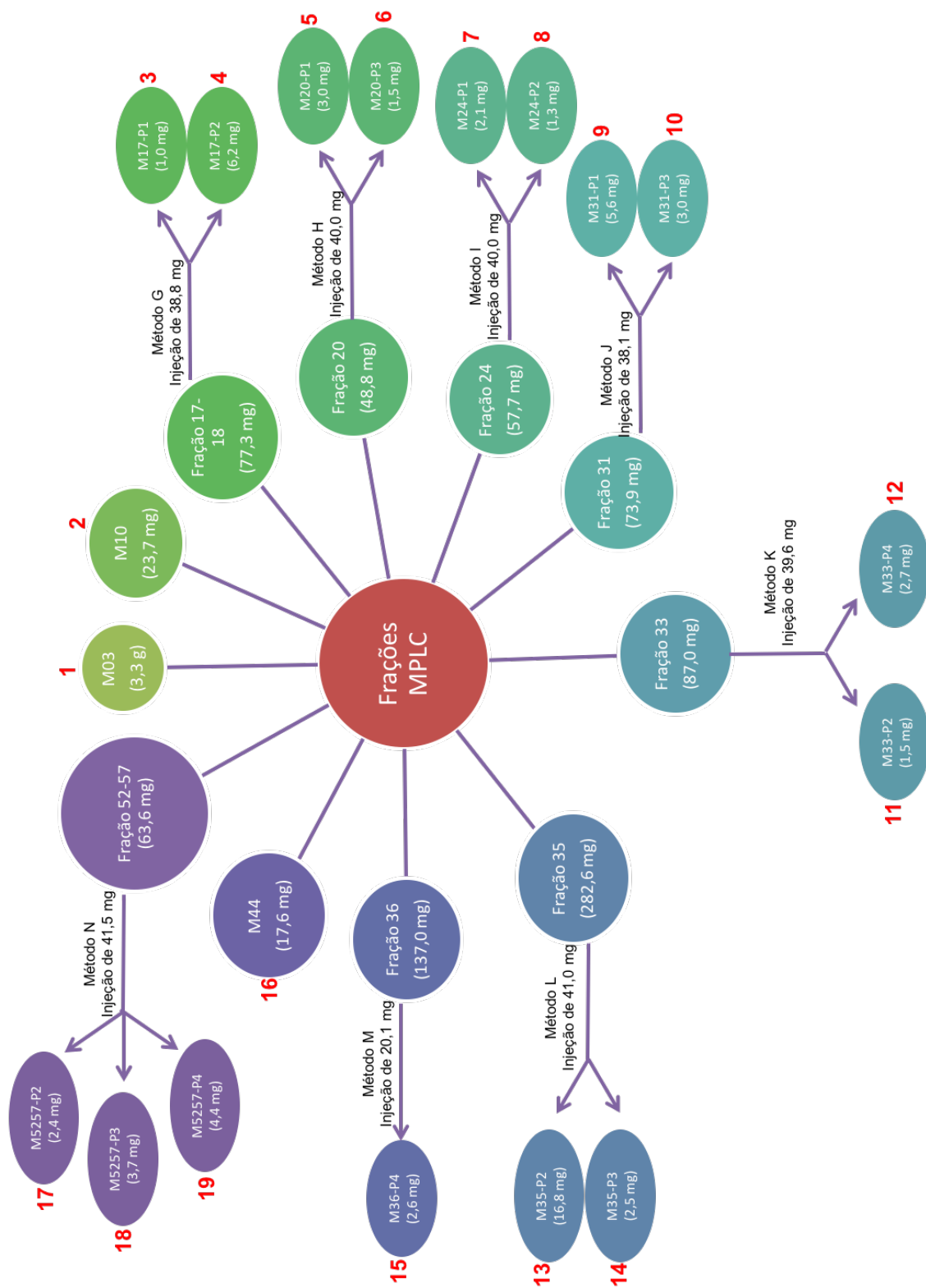


Figura 9 – Fluxograma ilustrativo das substâncias isoladas por HPLC (escala preparativa) presentes nas frações obtidas por MPLC.

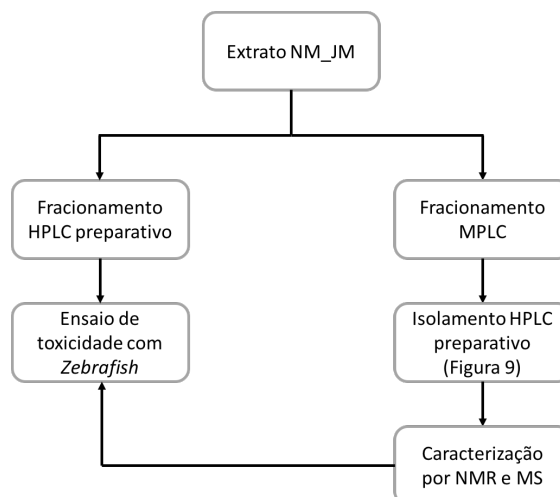


Figura 10 – Fluxograma do procedimento geral seguido no presente trabalho.

4.8 Análises das substâncias puras por espectrometria de massas de alta resolução – UHPLC-TOF-HRMS

As substâncias isoladas foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução de modo a se obter o erro em ppm quando comparado à massa molecular teórica, bem como para confirmar as propostas das moléculas elucidadas por NMR. Para tal, foi utilizado um UHPLC acoplado a um espectrômetro de massas com um analisador de tempo de voo (TOF).

4.9 Determinação da rotação específica

A molécula inédita elucidada foi submetida a um experimento de rotação específica. As medidas de rotação óptica específica $[\alpha]_D^{26}$ foram obtidas em quadruplicata utilizando um polarímetro Perkin Elmer 341-LC, em 589 nm (lâmpada de sódio) a 37 °C e cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm. A amostra foi pesada e solubilizada em 1 mL de metanol, obtendo uma concentração final de 1 mg mL⁻¹.

4.10 Análises de NMR ¹⁹F e LC-MS

De modo a tentar identificar a presença de monofluoracetato nos extratos mais polares (metanólico e aquoso) e na fração mais polar do extrato metanólico, foram realizadas análises de NMR ¹⁹F para visualizar o sinal esperado para essa molécula e de LC-MS de modo a observar a abundância do íon com razão *m/z* de 77.

4.11 Análise das substâncias 10, 12 e 15 por LC-MS/MS

As amostras que não foram elucidadas completamente por NMR devido à baixa resolução, foram analisadas por LC-MS/MS de modo a se obterem as fragmentações que auxiliariam na identificação das substâncias.

4.12 Teste de toxicidade utilizando modelo com *Zebrafish*

Os extratos das folhas de *N. multiglandulosa* (8 no total) foram dissolvidos em DMSO suficiente para preparar uma solução estoque com concentração de 20 mg mL⁻¹, e então diluídos em solução de Danieau (1,5 mM HEPES, pH 7,6, 17,4 mmol L⁻¹ NaCl, 0,21 mmol L⁻¹ KCl, 0,12 mmol L⁻¹ MgSO₄ e 0,18 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂) de modo a se obter soluções de concentrações finais de 200, 100 e 50 µg mL⁻¹. Larvas do *Zebrafish* da estirpe AB, 48 horas após a fertilização (hpf) e imediatamente após a eclosão, foram imersas nas soluções de extratos preparados na solução de Danieau, ou contendo 1% de DMSO para controle negativo. As larvas foram incubadas por 24 horas até atingir 72 hpf e então avaliadas para sinais de toxicidade, e classificadas com base na morte, dismorfologia, defeitos de circulação e defeitos locomotores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos extratos obtidos por HPLC-DAD

Os perfis cromatográficos dos extratos clorofórmio (0,7% NH₄OH), acetato de etila e metanol foram avaliados por HPLC-DAD utilizando-se um gradiente exploratório (5-100 %B em 40 min), sendo possível observar diferenças significativas entre eles. Inicialmente foram observados os perfis cromatográficos em diferentes comprimentos de onda, sendo que os mais indicados para a análise dos extratos foram de 254 nm para os extratos clorofórmio (0,7% NH₄OH), 300 nm para os extratos acetato de etila e de 280 nm para os extratos metanólicos. A Figura 11 mostra a comparação dos cromatogramas dos extratos de folhas jovens e velhas obtidos nos comprimentos de onda citados.

A análise do perfil cromatográfico dos extratos clorofórmio (0,7% NH₄OH) (Figura 11a) mostrou que, basicamente, existem apenas duas bandas majoritárias de média polaridade que coeluem. Já a análise do perfil cromatográfico dos extratos acetato de etila (Figura 11b) mostrou que este apresenta bandas bem resolvidas em regiões de média e baixa polaridade. Por último, a análise dos perfis cromatográficos dos extratos metanólicos (Figura 11c) indica claramente a presença de substâncias mais polares, baixa resolução cromatográfica, bandas alargadas e desvio na linha base. Estes fatores são indicativos da presença de taninos, sendo que a concentração de taninos em folhas velhas é maior. Este dado é condizente com o esperado, uma vez que os taninos são geralmente responsáveis pela defesa da planta contra raios UV, entre outros (BRILLOUET et al., 2013).

A comparação entre os perfis cromatográficos obtidos para as folhas velhas e jovens não mostrou diferença significativa, sendo que a principal diferença está nas concentrações relativas das substâncias.

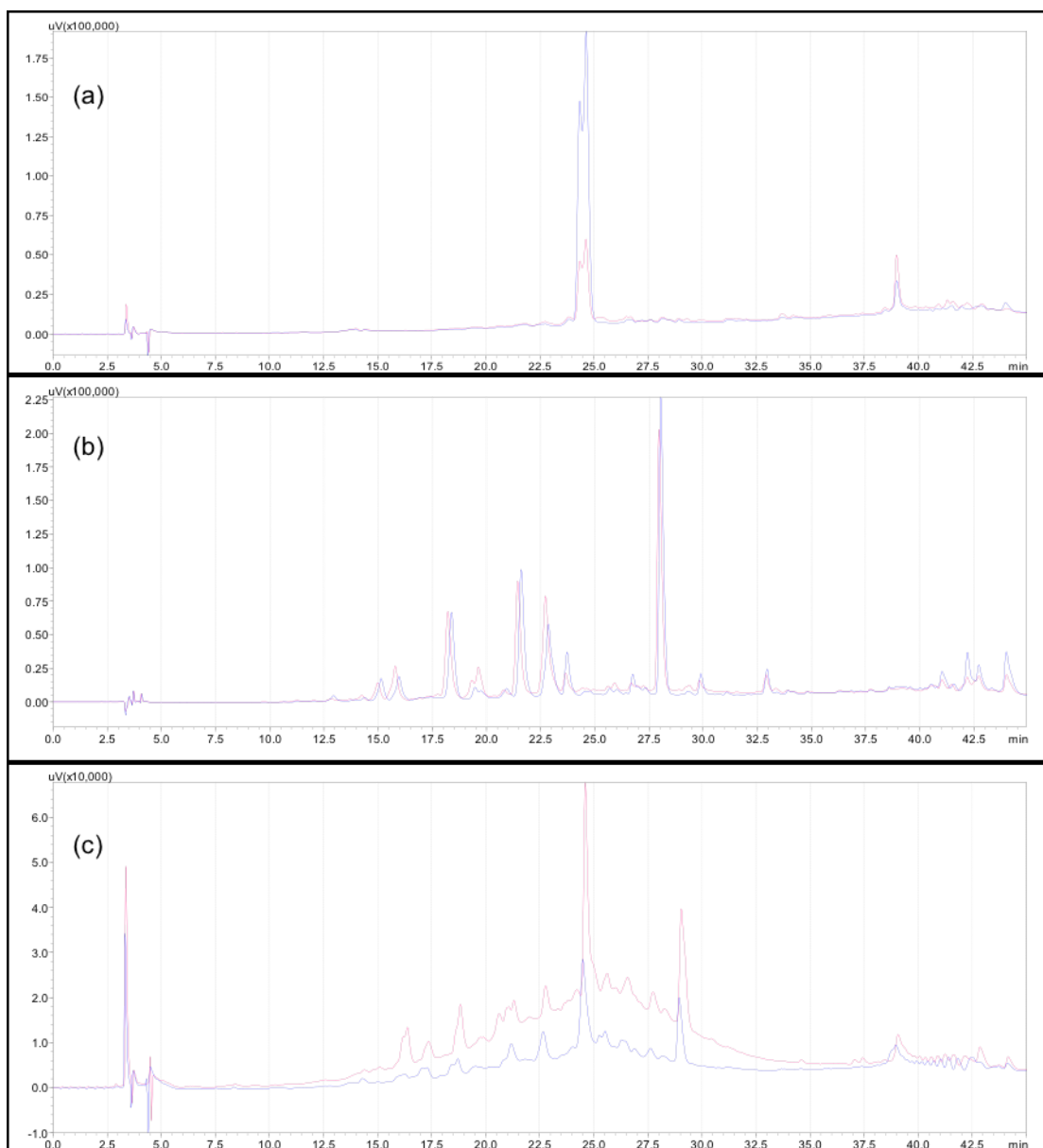


Figura 11 – Perfis cromatográficos dos extratos das folhas velhas e jovens de *N. multiglandulosa* obtidos por HPLC-DAD [coluna Phenomenex[®] C18-Luna (250 x 4,6mm, d.i.; 5 μ m); gradiente 5-100 %B em 40 min, MeOH:H₂O (0,1% ácido fórmico), vazão = 1mL min⁻¹, (a) clorofórmio (254 nm); (b) acetato de etila (300 nm) e (c) metanol (280 nm). Folhas jovens = Azul; Folhas velhas = vermelho.

5.2 Ensaio de toxicidade com *Zebrafish* dos extratos de *Niedenzuella multiglandulosa*

Os 8 extratos obtidos em menor quantidade (partindo de 50 g de folha) foram enviados para a Universidade de Luxemburgo (*Luxembourg Centre for Systems Biomedicine* – LCSB, realizado por Alexander D. Crawford) para teste de toxicidade utilizando *Zebrafish*. O único que se mostrou tóxico foi o extrato metanólico de folhas

jovens, em que larvas com 3 dias de vida apresentaram problemas no sistema circulatório e algumas estavam mortas após 24 horas de incubação em solução de concentração $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo esse extrato classificado como embriotóxico.

Esse dado é condizente com o esperado, uma vez que com base em dados da literatura sabe-se que as folhas jovens da *Niedenzuella multiglandulosa* são mais tóxicas do que as folhas velhas (PEIXOTO et al., 2011), sendo que o extrato NM_VM não se mostrou tóxico.

Dessa forma, o foco do trabalho se voltou para o extrato NM_JM. Para tal, foi necessário o preparo de maior quantidade de extrato (partindo de 470 g de folhas jovens) para que fosse possível o isolamento das substâncias presentes nas folhas.

5.3 Fracionamento do extrato NM_JM para avaliação de toxicidade em *Zebrafish*

Uma vez que o extrato NM_JM foi determinado como o único tóxico obtido das folhas de *N. multiglandulosa*, foi realizado um fracionamento do extrato utilizando HPLC em escala preparativa e as frações foram enviadas novamente para teste de toxicidade com *Zebrafish*. O cromatograma obtido para essa separação é mostrado na Figura 12. Cada fração foi analisada por UHPLC-UV-HRMS e os cromatogramas obtidos em 280 nm para cada fração comparado ao extrato são mostrados na Figura 13. O método usado nessas análises por UHPLC é descrito na Tabela 7. A Figura 13 apresenta uma ampliação dos cromatogramas até 15 minutos, uma vez que nenhuma banda foi detectada após esse tempo.

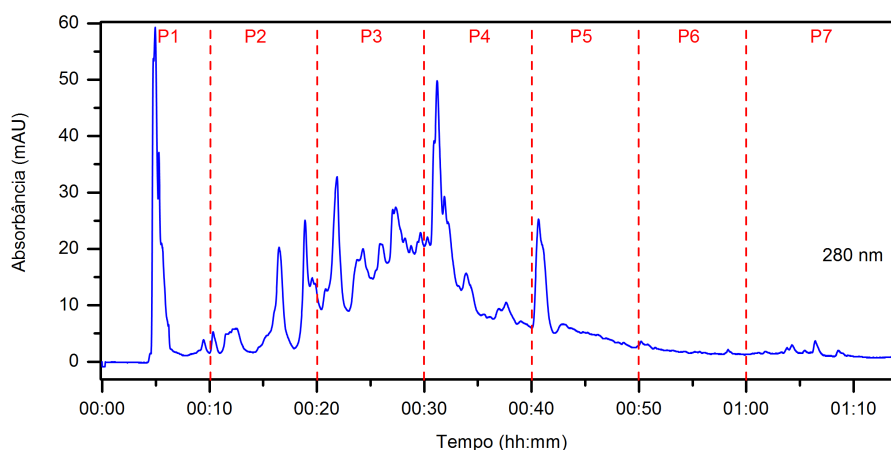


Figura 12 – Cromatograma HPLC-DAD obtido para o extrato NM_JM em escala preparativa. As linhas pontilhadas indicam as regiões do cromatograma em que foram coletadas as frações.

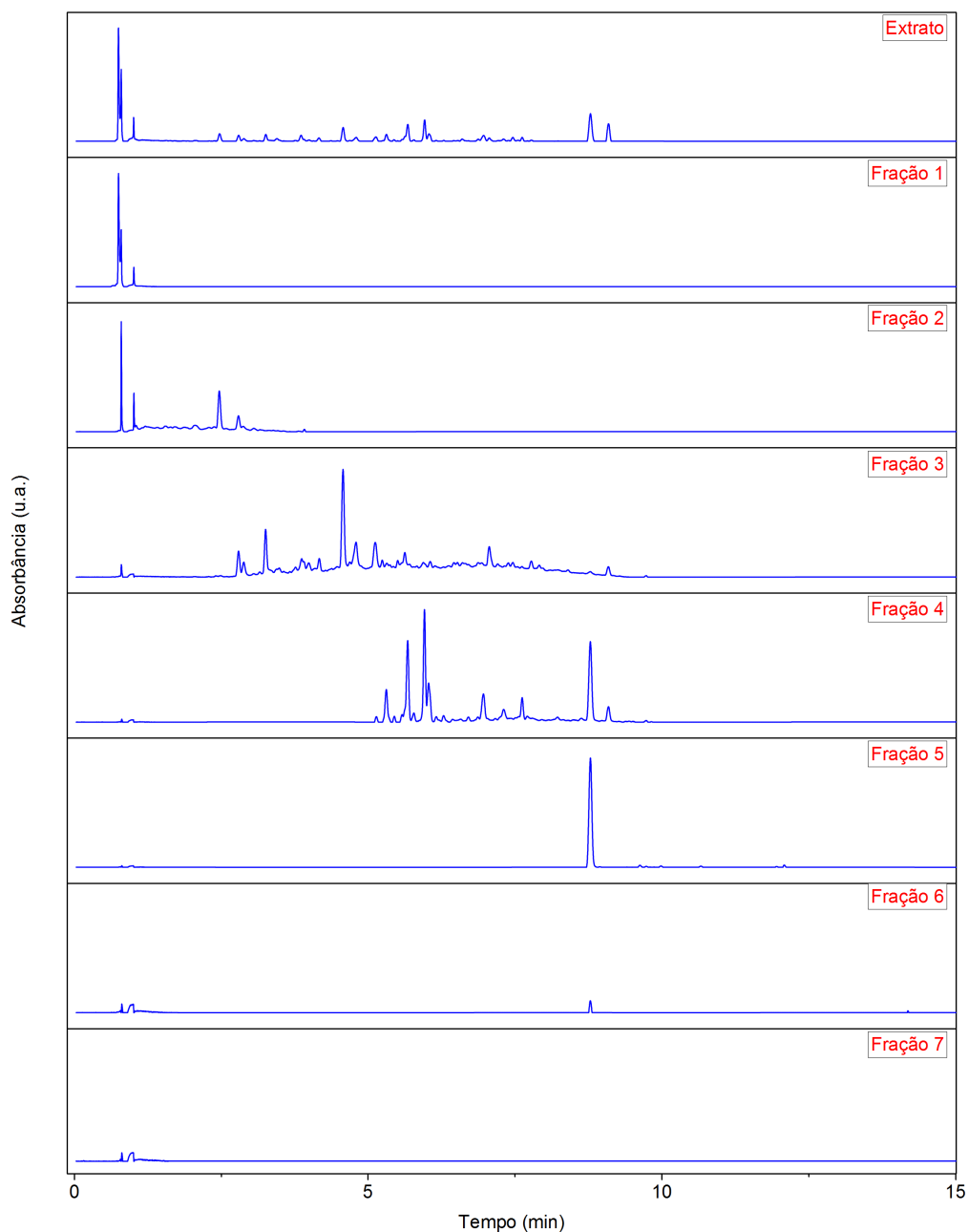


Figura 13 – Ampliação dos cromatogramas obtidos por UHPLC-UV-HRMS para as frações obtidas para o extrato NM_JM (280 nm).

Analisando a Figura 13, pode-se dizer que com o fracionamento foi possível separar o cromatograma em regiões de diferentes polaridades, sendo que nas frações 6 e 7 praticamente não foram observadas bandas que absorvem no UV em nenhum comprimento de onda. Porém, os espectros de massas no modo negativo mostram picos mais apolares nessas frações.

Outra observação importante dessa etapa do trabalho foi que a massa total injetada para o fracionamento em HPLC em escala preparativa foi de 125 mg de

extrato NM_JM, porém somente 63,8 mg foram coletados, resultando em uma recuperação de somente 51% da massa que foi injetada. Essa perda de massa pode ser explicada pela possível retenção de compostos fenólicos na coluna pelos grupos silanois livres presentes.

As frações 1 a 7 foram enviadas para Luxemburgo (*Luxembourg Centre for Systems Biomedicine* – LCSB) para teste de toxicidade em *Zebrafish*. Uma vez que o objetivo do trabalho consistia também no estudo fitoquímico das folhas de *N. multiglandulosa*, enquanto aguardava-se o resultado do teste, foi realizada uma otimização e separação das substâncias por MPLC e HPLC em escala preparativa, conforme descrito nas próximas seções.

5.4 Análise e otimização de método do extrato NM_JM por HPLC-DAD-ELSD

A análise preliminar do extrato NM_JM por HPLC-DAD-ELSD utilizando a condição A (Tabela 4, pág.48) mostrou que o detector UV no comprimento de onda de 280 nm é o mais adequado para se obter o perfil cromatográfico com o maior número de substâncias presentes no extrato. Já o perfil cromatográfico obtido utilizando o detector ELSD mostrou que as substâncias em maior quantidade no extrato encontram-se próximas ao tempo morto (substâncias muito polares) e em aproximadamente 24 min (Figura 14).

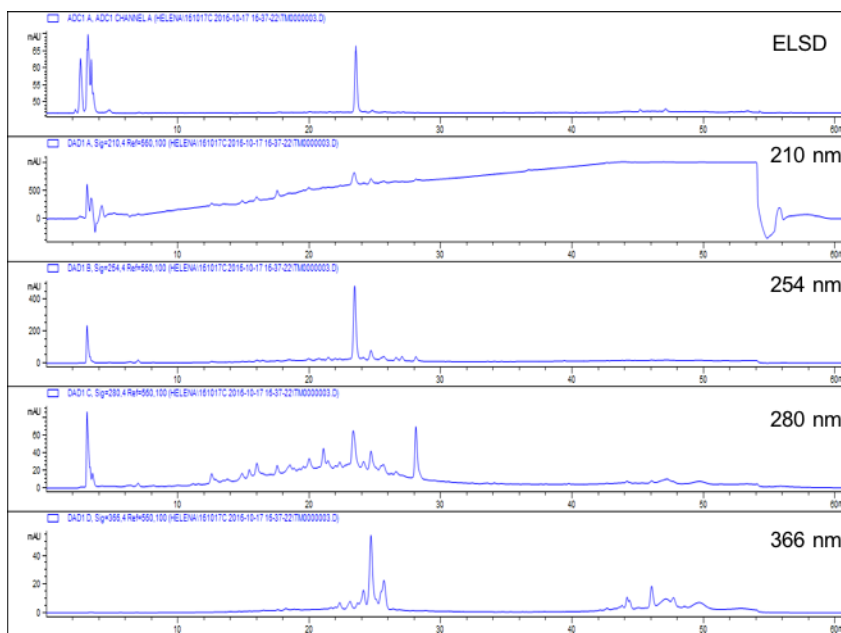


Figura 14 – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD-ELSD, coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 µm); gradiente 5 a 100%B em 40 min, sistema de solventes MeOH:H₂O (0,1% ácido fórmico), vazão = 1mL min⁻¹.

Após ser escolhido o comprimento de onda de 280 nm, a próxima etapa da otimização consistiu em se obter uma boa separação das bandas para a realização do isolamento por MPLC. Dessa forma, o extrato foi analisado utilizando-se a condição B (Tabela 4, pág. 48). A comparação dos cromatogramas utilizando os métodos 5 a 100 %B em 40 min (método A, Figura 15a) e 5 a 62 % B em 70 min (método B, Figura 15b) mostrou uma melhor separação e resolução das bandas neste último. É importante ressaltar que a banda em aproximadamente 24 minutos presente na condição A se dividiu em quatro na condição B, mostrando uma melhora significativa na seletividade do método, e que o desvio na linha base do cromatograma (“morro”) presente no cromatograma obtido pela condição A (devido à presença de taninos) fica bem mais disperso na condição B, sendo este o método selecionado para as próximas análises.

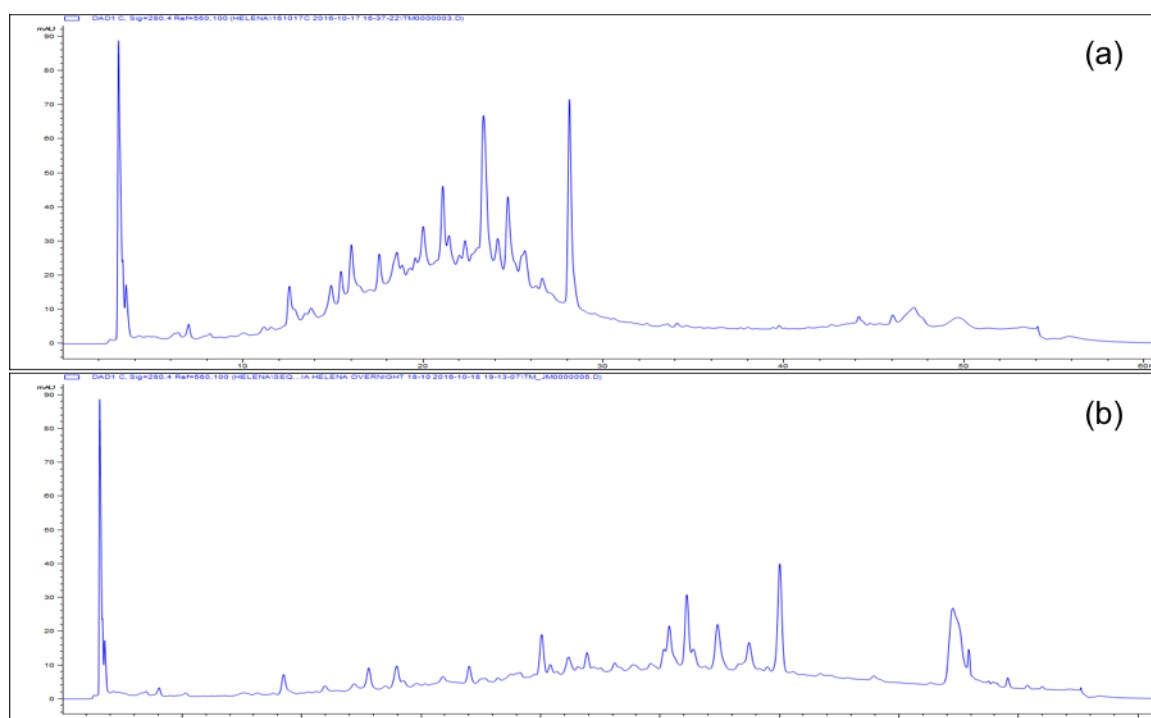


Figura 15 – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD-ELSD, coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 μ m), sistema de solventes MeOH:H₂O (0,1% ác fórmico), vazão = 1 mL min⁻¹, λ = 280 nm. Método: (a) gradiente 5 a 100%B em 40 min; (b) gradiente 5 a 62 %B em 70 min.

No entanto, uma vez que a coluna utilizada para a separação das substâncias por MPLC possui tamanho de partícula de 15-25 μ m, a condição B foi modificada para a condição C, sendo que a diferença entre estes dois métodos consiste apenas na mudança da coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 μ m) para a coluna Zeochem Zeoprep 60 Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 μ m). Como era de se esperar, devido ao maior tamanho e à irregularidade das partículas da coluna Zeoprep, a resolução do cromatograma (Figura 16a) foi muito prejudicada quando comparada à resolução do cromatograma com a coluna Puriflash (Figura 16b), mas ainda foi possível observar a separação das bandas.

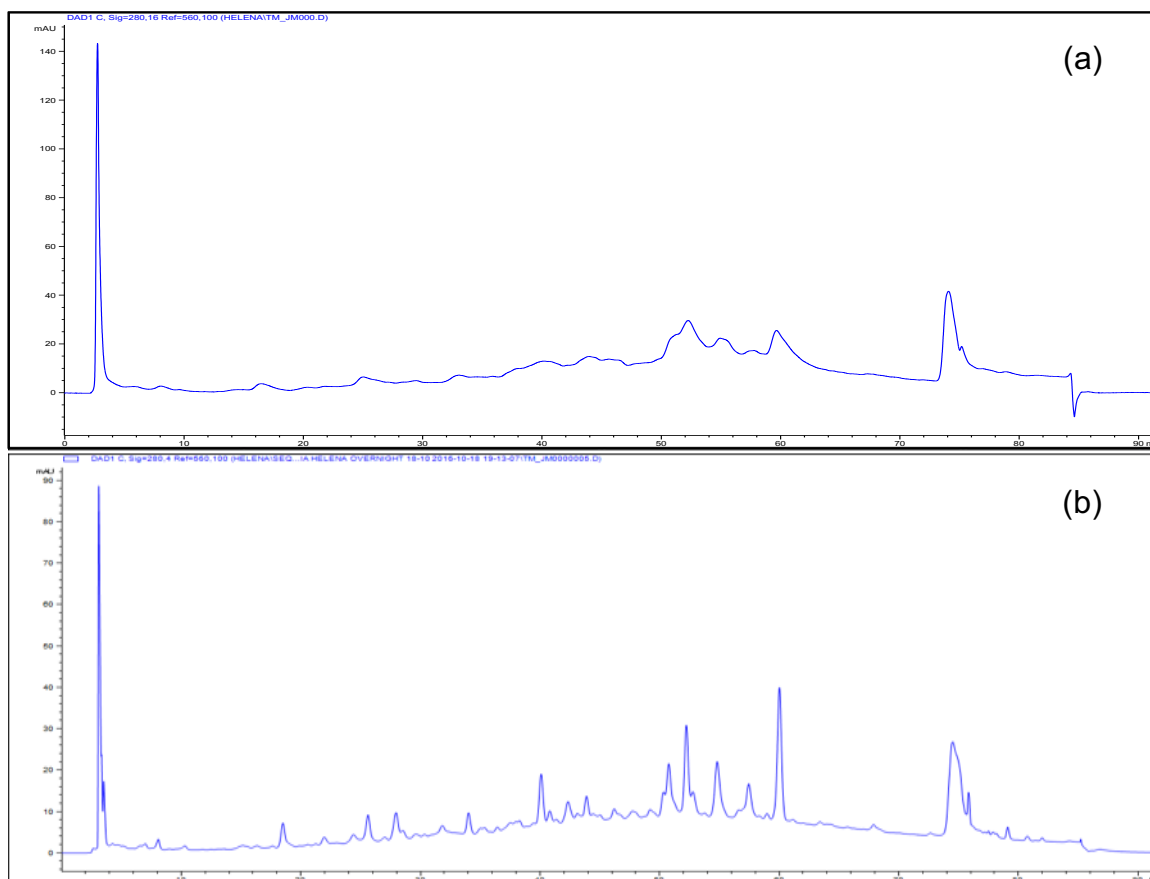


Figura 16 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos para o extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD, sistema de solventes MeOH:H₂O (0,1% ác fórmico), vazão = 1 mL min⁻¹, λ = 280 nm. Método gradiente 5 a 62 %B em 70 min, coluna (a) Zeochem Zeoprep 60 Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 µm); (b) Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 µm).

A análise do perfil cromatográfico da Figura 16a mostra que as bandas entre 50 e 60 min do cromatograma ainda não apresentavam uma boa separação. Dessa forma, foi realizada outra análise empregando a condição D (Tabela 4, pág. 48), sendo que esta condição possui um platô isocrático nessa região (Figura 17a). Para se ter uma melhor visualização das bandas presentes nessa condição, foi realizada uma corrida utilizando a condição E (mesmo gradiente do método D) para comparação com a Figura 17a, no qual utilizou-se novamente a coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 µm) (Figura 17b).

Portanto, uma vez que a separação das bandas se tornou satisfatória, o gradiente escolhido para o fracionamento por MPLC foi o utilizado no método D/E.

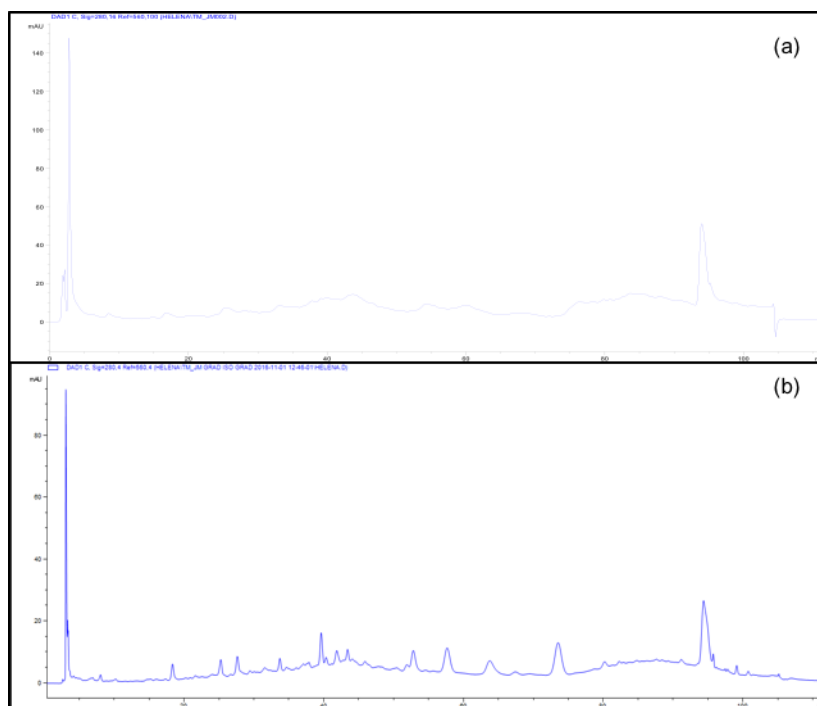


Figura 17 – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD, $\lambda = 280$ nm, método descrito na Tabela 4, coluna (a) Zeochem Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 μm); (b) Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 10 μm).

5.5 Otimização da temperatura e pressão para análise do extrato NM_JM por HPLC-DAD para transposição para MPLC

Uma vez que a separação em MPLC ocorre em média pressão, uma série de cuidados devem ser tomados de modo a controlar a pressão no equipamento, que idealmente não deve ultrapassar 20 bar. Um deles seria efetuar a separação em uma temperatura mais elevada uma vez que, com o aumento da temperatura, a viscosidade do solvente diminui, reduzindo a pressão no sistema. A fim de avaliar a melhor temperatura para o fracionamento, foram realizadas injeções em diferentes temperaturas de forno de coluna (24, 30, 35, 40 e 45 °C) empregando-se a condição F (Tabela 4, pág. 48), sendo os cromatogramas obtidos mostrados na Figura 18. De modo geral, em temperaturas mais elevadas, os compostos apresentaram tempos de retenção menores e uma melhor resolução quando comparados com a corrida a 24 °C (temperatura ambiente) e que não houve decomposição de nenhum constituinte. A corrida a 40 °C se mostrou a mais adequada uma vez que a 45 °C a separação das bandas próximas a 55 minutos foi comprometida.

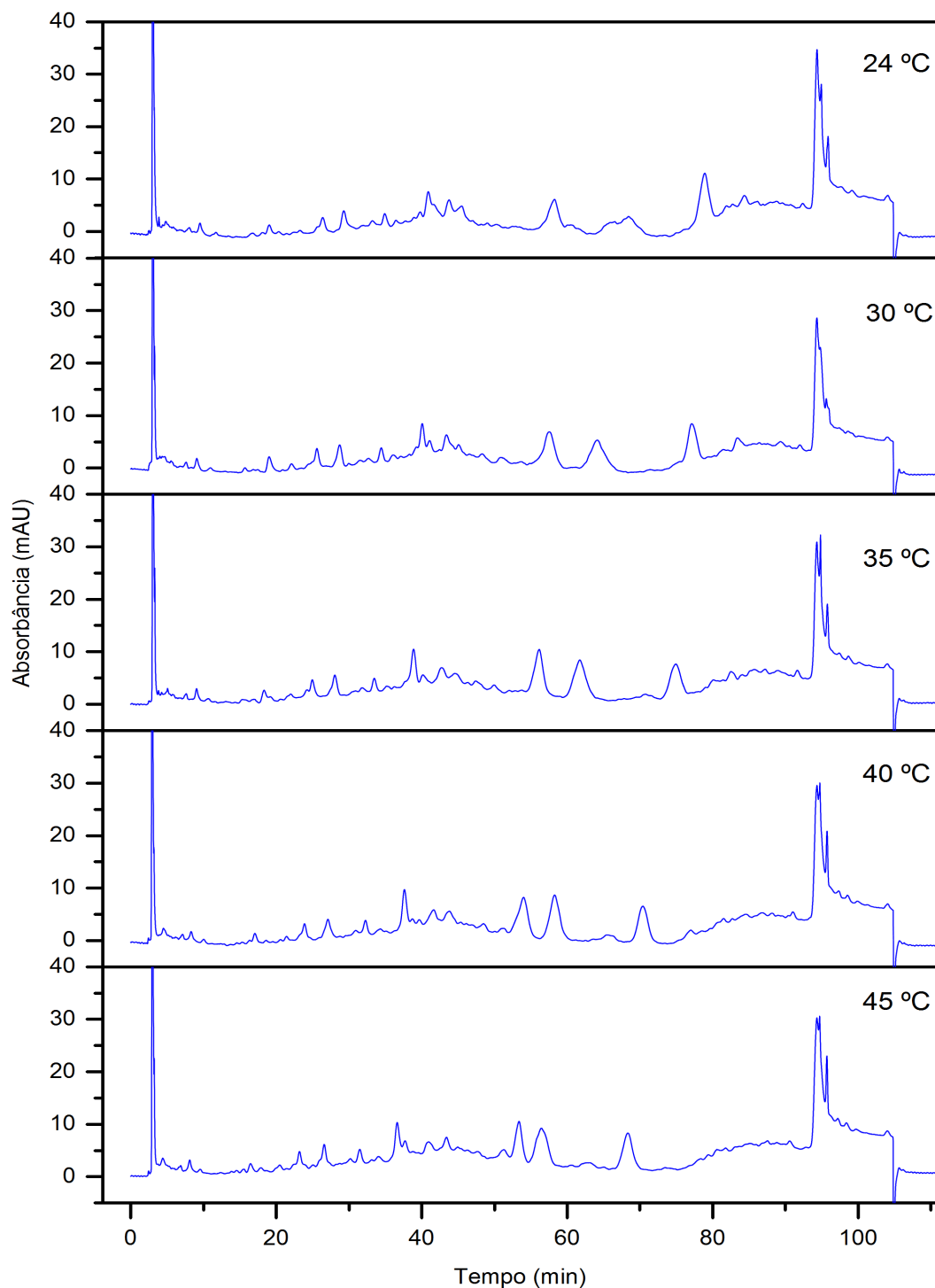


Figura 18 – Perfil cromatográfico do extrato NM_JM obtido por HPLC-DAD, $\lambda = 280$ nm (ampliado), método descrito na Tabela 4, coluna Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 15 μ m), temperaturas 24, 30, 35, 40 e 45 °C.

Para avaliar a pressão do sistema em função da temperatura da coluna, foram registrados valores de pressão em diferentes proporções de solvente B (5, 50 e 100 %B) nas temperaturas avaliadas (Tabela 9). Também foram realizadas injeções a 24

°C e a 40 °C utilizando a coluna Zeochem Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 µm) (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores de pressão (bar) registrados em diferentes pontos dos cromatogramas obtidos a partir do método descrito na Tabela 4 em temperaturas variadas (24, 30, 35, 40, 45 °C) e colunas Zeochem Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 µm) e Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 15 µm).

Coluna	Temperatura (°C)	Pressão 5 %B (bar)	Pressão 50 %B (bar)	Pressão 100 %B (bar)
Puriflash C18 (250 x 4,6mm, d.i.; 15 µm)	24	39	61	25
	30	38	58	24
	35	36	57	24
	40	36	55	23
	45	35	54	23
Zeoprep 60Å C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 15-25 µm)	24	29	46	19
	40	27	43	19

Observando os valores de pressão mostrados na Tabela 9, pode-se afirmar que, como esperado, a pressão do sistema diminui com o aumento da temperatura. Além disso, a pressão na coluna Zeoprep é menor quando comparada à Puriflash, justamente por se tratar de uma coluna de tamanho de partícula irregular e maior. Trabalhar com colunas que resultam em corridas com pressões menores é de suma importância para manter a pressão do sistema do MPLC abaixo do máximo permitido.

Apesar da máxima pressão no MPLC ser de 20 bar, a pressão registrada em proporção de 50 %B na coluna Zeoprep na corrida em HPLC é de 43 bar para a temperatura de 40 °C, mesmo ambas as colunas tendo tamanho de partícula de 15-25 µm. Essa diferença se dá devido ao empacotamento das colunas serem realizados de formas distintas, e também devido aos diâmetros das colunas serem diferentes.

5.6 Fracionamento do extrato NM_JM por MPLC-UV

A injeção do extrato NM_JM foi realizada por *dry load* em uma coluna de injeção, ou seja, foi realizada uma dispersão em fase sólida da amostra em C18 (granulometria 40-63 µm) e areia. A amostra deve ser preparada em areia (inerte) e C18 em maior granulometria que a contida na coluna (15-25 µm) para não elevar a pressão no sistema. Dessa forma, foi preparada uma amostra numa proporção de 1:5:1 (extrato NM_JM: Zeoprep C18 (40-63 µm) : areia), e um total de 7,54 g de extrato

foi injetado. A comparação do cromatograma obtido para a separação em MPLC com o cromatograma obtido em escala analítica a 40 °C (Figura 18) é mostrado na Figura 19, e observou-se que a transposição do método foi realizada com sucesso.

Todas as frações coletadas na separação por MPLC foram analisadas por UHPLC-DAD-ELSD de modo a monitorar a pureza destas. As que aparentavam estar mais puras foram enviadas para análise em RMN 600 MHz (substâncias 1, 2 e 16). As que ainda se apresentaram impuras foram selecionadas para uma separação mais acurada no HPLC em escala preparativa, como mostrado na Figura 9 (pág. 52).

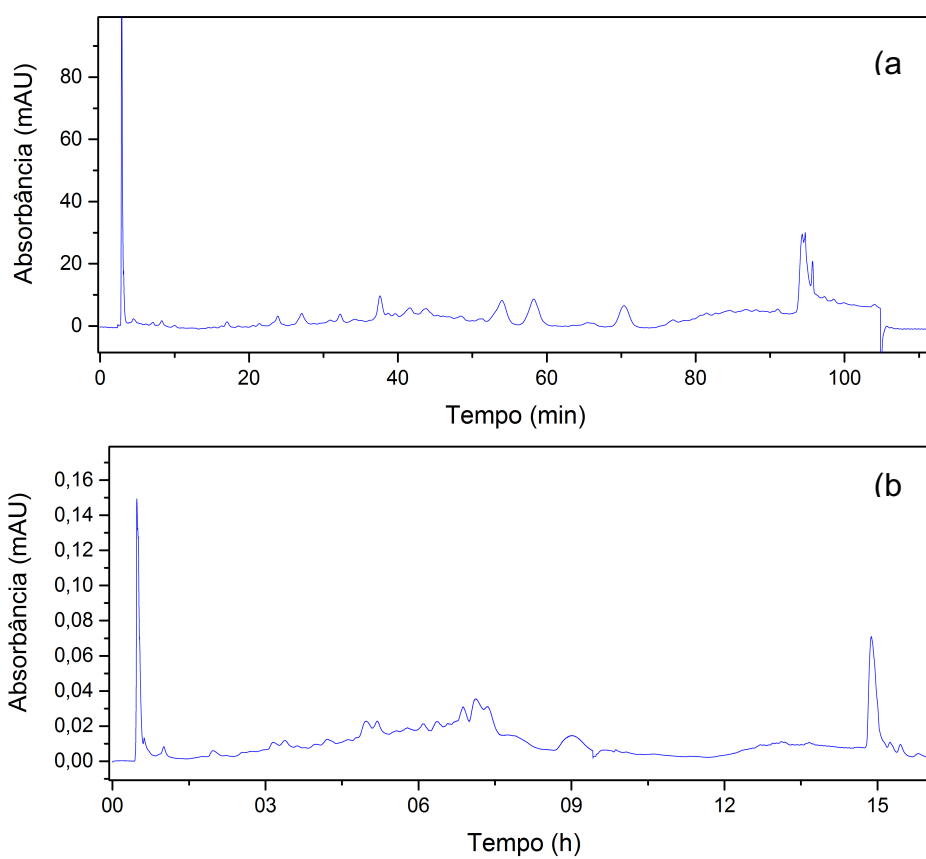


Figura 19 – Comparação entre os cromatogramas obtido em escala analítica (a) e em escala preparativa (b) no fracionamento do extrato NM_JM por MPLC-UV ($\lambda = 280$ nm).

5.7 Substâncias isoladas do extrato NM_JM

As substâncias foram isoladas conforme descrito na Figura 9 (pág. 52) e enviadas para análise em RMN 600 MHz e UHPLC-TOF-HRMS, sendo assim possível realizar a elucidação estrutural das substâncias presentes no extrato NM_JM, como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Informações das substâncias isoladas presentes no extrato NM_JM.

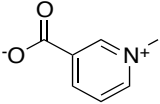
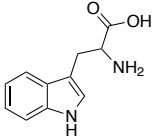
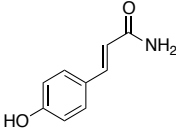
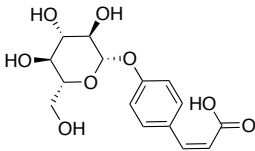
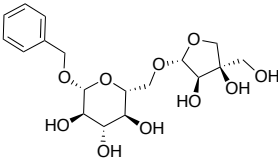
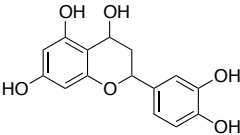
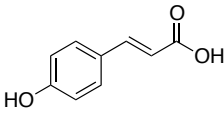
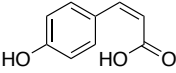
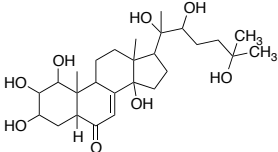
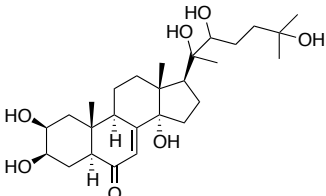
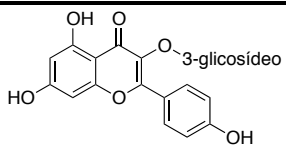
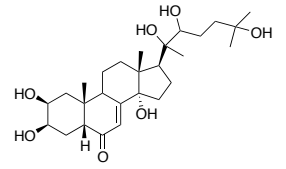
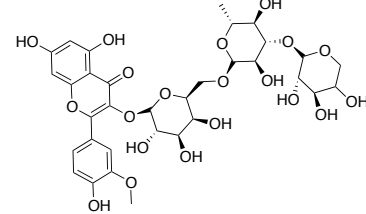
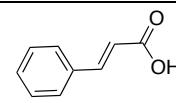
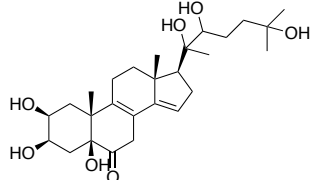
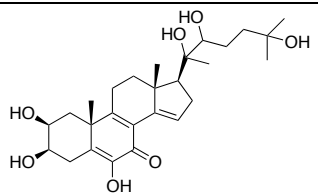
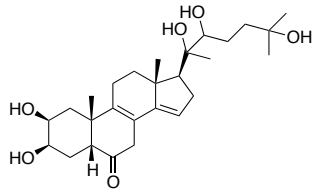
Substância	Estrutura	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Fórmula Molecular	Nome	Referência
1		137,0477	C ₇ H ₇ NO ₂	Terigonelina	(MARCHESINI et al., 2009)
2		204,0899	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano	(MALTA et al., 2009)
3		163,0633	C ₉ H ₉ NO ₂	4-Hidroxicinamamida	(KIM; KIM; LEE, 2014)
4		326,1002	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	Ácido (Z)-p-cumárico 4-O-β-D-glicopiranosídeo	(WU et al., 2003)
5		402,1526	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	Icarisida F ₂	(BAI et al., 2015)
6		290,0790	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Luteoforol	(DE SOUZA et al., 2008)
7		164,0473	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido (E)-4-Hidroxicinâmico	(SALUM; ROBLES; ERRA-BALSELLS, 2010)
8		164,0473	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido (Z)-4-Hidroxicinâmico	(SALUM; ROBLES; ERRA-BALSELLS, 2010)
9		496,3036	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	Integristerona A	(KUMPUN et al., 2007)
10	X	851,24	X	X	X
11		480,3087	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	Epiecdisterona	(VOKÁČ; BUDĚŠÍNSKÝ; HARMATHA, 2002)

Tabela 10 – Informações das substâncias isoladas presentes no extrato NM_JM (continuação).

Substância	Estrutura	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Fórmula Molecular	Nome	Referência
12		726,2098	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	Kaempferol triglicosilado	X
13		480,3087	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	Ecdisterona	(VOKÁČ et al., 1998)
14		756,2113	C ₃₃ H ₁₄ O ₂₀	Isorhamnetina triglicosilada	(BEN SALAH et al., 2002)
15	X	708,18	X	X	X
16		148,0524	C ₉ H ₈ O ₂	Ácido Cinâmico	(WANG et al., 2003)
17		478,2931	C ₂₇ H ₄₂ O ₇	Inédita "Multiglandisterona"	X
18		476,2774	C ₂₇ H ₄₀ O ₇	Calonisterona	(CSÁBI et al., 2015)
19		462,2981	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	Podecdisona B	(ODINOKOV et al., 2003)

A Figura 20 mostra o cromatograma obtido para a análise do extrato em UHPLC-UV-TOF no método descrito na Tabela 7 e a identificação de cada substância isolada no cromatograma.

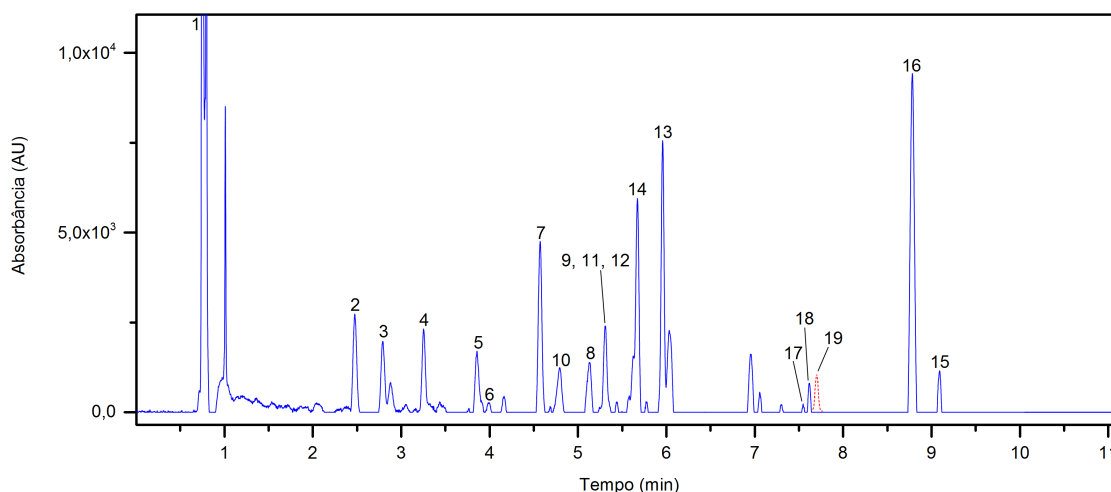


Figura 20 – Cromatograma obtido por UHPLC-UV (Azul: 280 nm; Vermelho: 254 nm) do extrato NM_JM. Os números sobre o cromatograma representam as substâncias isoladas desse extrato.

A Figura 20 é ilustrada como uma ampliação do cromatograma na escala de absorvância mostrada, uma vez que as bandas mais polares, que eluem próximas do tempo morto, são muito mais intensas que as outras. Novamente, após 11 minutos não houve a eluição de nenhuma outra banda. A substância 19 não absorve no UV no comprimento de onda selecionado (280 nm), mas sim em 254 nm. Foi possível isolá-la pois a separação em escala preparativa da fração M5257 mostrou que, para os compostos 17, 18 e 19, o comprimento de onda mais adequado para acompanhar as bandas seria de 254 nm.

Nessa análise não foi obtido o desvio na linha base como observado no cromatograma da Figura 15a. Isso deve-se ao fato de que a coluna utilizada no HPLC era uma C18 comum, enquanto a utilizada nas análises em UHPLC é uma coluna de sílica híbrida (coluna BEH – *ethylene bridged hybrid*). Nessa coluna, existem pontes de etileno inseridas na estrutura da fase estacionária e apresenta uma boa separação em uma faixa de pH maior (1 a 12).

Dessa forma, foi possível isolar com sucesso a maioria das substâncias presentes no extrato NM_JM, sendo que algumas não foram passíveis de isolamento devido a pouca massa disponível nas frações obtidas por MPLC. Outra informação valiosa é que todas as substâncias isoladas estava inicialmente presente no extrato analisado, logo, não foi isolado nenhum produto de degradação.

Comparando as estruturas das moléculas isoladas (Tabela 10) com as previamente identificadas pelo grupo de pesquisa NuBBE para a *Tetrapterys*

mucronata (Figura 2), observa-se que, de fato, os tipos estruturais são bastante diferentes. Uma vez que a *N. multiglandulosa* anteriormente pertencia ao gênero *Tetrapteryx*, esperava-se que poderiam haver moléculas similares às isoladas da *T. mucronata*. Foram isolados diversos alcaloides tóxicos da espécie *T. mucronata*, o que não foi identificado na *N. multiglandulosa*, corroborando para o fato de que elas são de gêneros diferentes, e que suas toxicidades são dadas por diferentes tipos de moléculas e mecanismos de ação.

5.7.1. Caracterização das substâncias isoladas por NMR.

As substâncias isoladas foram analisadas por experimentos de NMR de modo a determinar suas estruturas. Os espectros de ^1H e DEPTQ (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with retention of Quaternary nuclei* – grupos CH e CH_3 apresentam sinais em uma fase enquanto que os carbonos CH_2 e quaternários apresentam sinais na fase oposta) das moléculas conhecidas, bem como suas tabelas indicando os deslocamentos químicos de cada átomo são mostrados em Anexo. Três dessas substâncias (10, 12 e 15) não puderam ser completamente identificadas por NMR devido à baixa massa obtida, então foram analisados por LC-MS/MS.

Dentre as substâncias isoladas, uma foi determinada como inédita (substância 17). Essa molécula trata-se de um ecdisteroide, cuja estrutura é mostrada na Figura 21. Essa estrutura é inédita pois ainda não haviam sido relatados ecdisteroides com a substituição de uma hidroxila em C-5. A Tabela 11 apresenta os sinais de deslocamento químico de hidrogênios e carbonos observados para essa substância. O espectro de hidrogênio obtido é mostrado na Figura 22 (pág. 73).

No espectro de hidrogênio, observam-se sinais largos entre 4,0 e 4,8 ppm, correspondendo às hidroxilas presentes na molécula. Os 5 simpletos presentes entre 0,7 e 1,15 ppm correspondem às metilas presentes na molécula, sendo que as mais desblindadas (1,11, 1,06 e 1,04 ppm) correspondem, respectivamente, ao H_{21} , H_{26} e H_{27} , uma vez que estas encontram-se a duas ligações de hidroxilas. Já as mais blindadas (0,96 e 0,84 ppm) são as que estão ligadas diretamente ao esqueleto esteroidal (H_{18} e H_{19} , respectivamente).

Os sinais na região entre, aproximadamente, 1,25 a 2,5 ppm correspondem aos hidrogênios do esqueleto esteroidal, sendo possível observar o desdobramento dos

sinais em diferentes multipletos, muitas vezes sobrepostos, dificultando a sua atribuição, sendo necessários experimentos de HSQC e HMBC para sua identificação mais precisa. Esses sinais são desdobrados pois o esqueleto esteroidal é fixo, logo, os hidrogênios axiais e equatoriais possuem constantes de acoplamento diferentes.

Adicionalmente, observa-se que há um sinal largo em 5,40 ppm correspondente ao H₁₅ (ligado a um carbono sp²) que acopla com os hidrogênios H₁₆ que podem adquirir posições pseudoaxiais ou pseudoequatoriais. Dessa forma, esse sinal em 5,40 ppm seria, teoricamente, um duplete de dupletos que se coalesceu em um sinal largo, se assemelhando a um tripleto.

Os hidrogênios H₂ e H₃ correspondem, respectivamente, aos sinais em 3,10 e 3,80 ppm, sendo que o H₃ é mais desblindado por estar mais próximo à hidroxila ligada a C₅. Foi possível detectar o sinal em 3,10 ppm (mesmo com o sinal da água presente no DMSO sobreposto) por espectro de HSQC (Figura 23). O espectro HSQC revela informações sobre ligações C-H diretas, além de mostrar carbonos CH₂ em fases opostas aos CH e CH₃ (nesse caso, CH e CH₃ correspondem aos mapas de contorno azuis e os CH₂ aos mapas de contorno em vermelho).

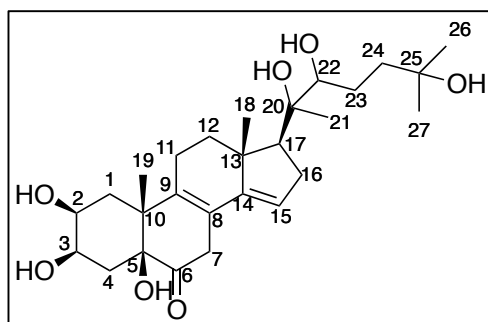


Figura 21 – Estrutura determinada para a substância 17.

Tabela 11 – Dados de deslocamentos químicos de NMR (14,1 T, DMSO-d₆) unidimensionais da substância 17.

Posição	δ_H^a (600 MHz) (m ^b ; J ^c)	δ_C (150 MHz) (ppm) ^d
1	$\alpha \rightarrow 1,73$ (t; 12,4) $\beta \rightarrow 1,63$ (m)	34,0
2	3,10 (m)	67,8
3	3,80 (sl)	68,3
4	$\alpha \rightarrow 1,60$ (m) $\beta \rightarrow 1,98$ (dd; 14,2; 2,9)	35,3
5	X	79,9
6	X	208,6
7	$\alpha \rightarrow 2,69$ (d; 20,0) $\beta \rightarrow 3,42$ (sobreposto)	39,2
8	X	121,1
9	X	136,9
10	X	48,3
11	2,27 – 2,21 (m)	22,2
12	$\alpha \rightarrow 1,48$ (m) $\beta \rightarrow 2,14$ (d; 11,7)	36,4
13	X	45,4
14	X	147,8
15	5,40 (sl)	119,3
16	$\alpha \rightarrow 2,56$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 2,04$ (ddd; 16,3; 7,3; 3,3)	30,3
17	1,89 (dd; 10,3, 8,0)	55,8
18	0,96 (s)	17,9
19	0,84 (s)	23,6
20	X	75,1
21	1,11 (s)	20,1
22	3,16 (sobreposto)	76,5
23	1,44 (m) 1,12 (sobreposto)	26,0
24	1,67 (dd; 12,3; 5,0) 1,23 (m)	41,4
25	X	68,6
26	1,06 (s)	30,0
27	1,04 (s)	29,0

^a Deslocamentos químicos em ppm (δ).

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

^d Valores atribuídos por experimentos de HMBC e HSQC.

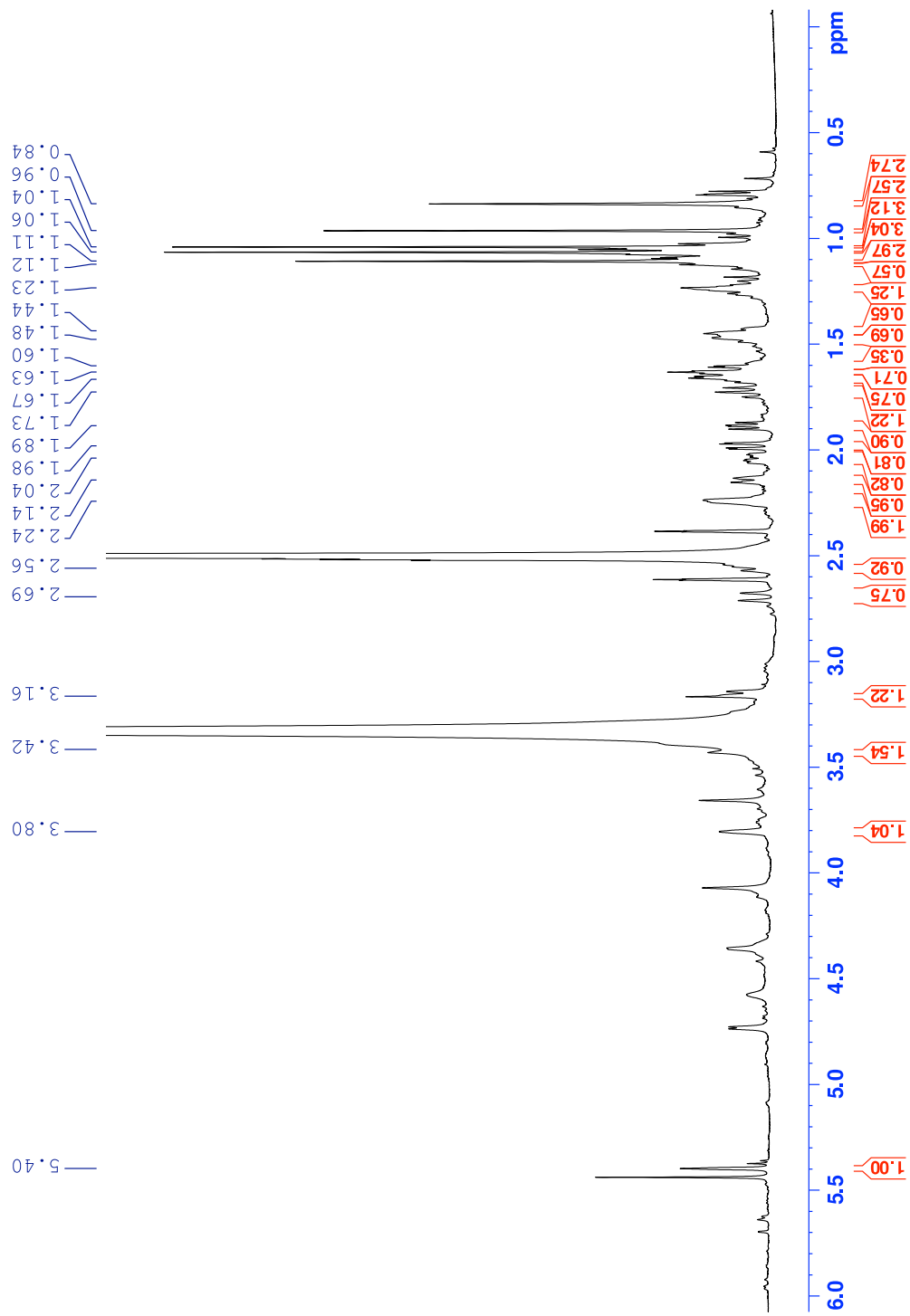


Figura 22 – Espectro de NMR de ^1H obtido para a substância 17 (600 MHz – DMSO-d_6).

O sinal presente em 3,16 ppm corresponde ao H₂₂, se assemelhando a um duplete pois interage com H₂₃. Os hidrogênios H₇ são determinados como α (2,69 ppm) e β (3,42 ppm). O hidrogênio em posição pseudoequatorial (β) está com parte do sinal sobreposto pelo da água, enquanto que o H₇ em posição pseudoaxial (α) revela um duplete com grande constante de acoplamento, sugerindo que há acoplamento entre ambos os hidrogênios H₇.

Os hidrogênios H₁₆ também podem ser classificados como pseudoequatorial e pseudoaxial. Dessa forma, o H₁₆- α apresenta um multiplete com o sinal do solvente DMSO-d₆ sobreposto, já o H₁₆- β apresenta um duplo duplo duplete (ddd) em 2,04 ppm, uma vez que esse hidrogênio interage com o H₁₅, H₁₆ (posição pseudoequatorial) e H₁₇, todos em ambientes químicos diferentes, fazendo com que o sinal seja desdobrado. O H₁₇ apresenta um duplo duplete em 1,89 ppm (dd), confirmando a interação com os H₁₆ em posição pseudoequatorial e pseudoaxial.

O multiplete presente em 2,14 ppm se assemelha a um duplete de dupletos, referente ao H₁₂- β em posição pseudoequatorial, em que há a interação entre este e os hidrogênios H₁₁ (α e β). O sinal de H₁₂- α encontra-se como um multiplete em 1,48 ppm. O sinal referente aos hidrogênios H₁₁- α e H₁₁- β encontram-se muito próximos, entre 2,27 – 2,21 ppm, uma vez que no espectro de HSQC só foi possível observar uma sinal no deslocamento químico referente ao carbono C₁₁.

Em 1,98 ppm observa-se um duplo duplete referente ao H₄- β , indicando que está acoplado com H₂ e com H₄- α , em ambientes químicos diferentes. O H₄- α é encontrado como um multiplete em 1,60 ppm. O hidrogênio H₁- α é apresentado como um tripleto com deslocamento de 1,73 ppm uma vez que interage com H₁- α e com H₂, e H₁- β é encontrado como um multiplete em 1,63 ppm.

Os sinais em 1,66 e 1,23 ppm correspondem aos hidrogênios H₂₄, e os sinais em 1,44 e 1,12 ppm aos H₂₃. Os hidrogênios H₂₄ tem deslocamento químico maior do que H₂₃ pois estão a duas ligações de um carbono quaternário.

As atribuições foram confirmadas por experimento de COSY e HMBC, mostrados na Figura 24 e Figura 25, respectivamente. Os sinais de carbono atribuídos indiretamente são mostrados na Tabela 11. As ampliações das regiões de maior complexidade no espectro de NMR ¹H entre 0,5 a 2,6 ppm e entre 2,3 a 6,0 ppm são ilustradas com as respectivas atribuições dos hidrogênios da molécula 17 na Figura 26 e Figura 27, respectivamente.

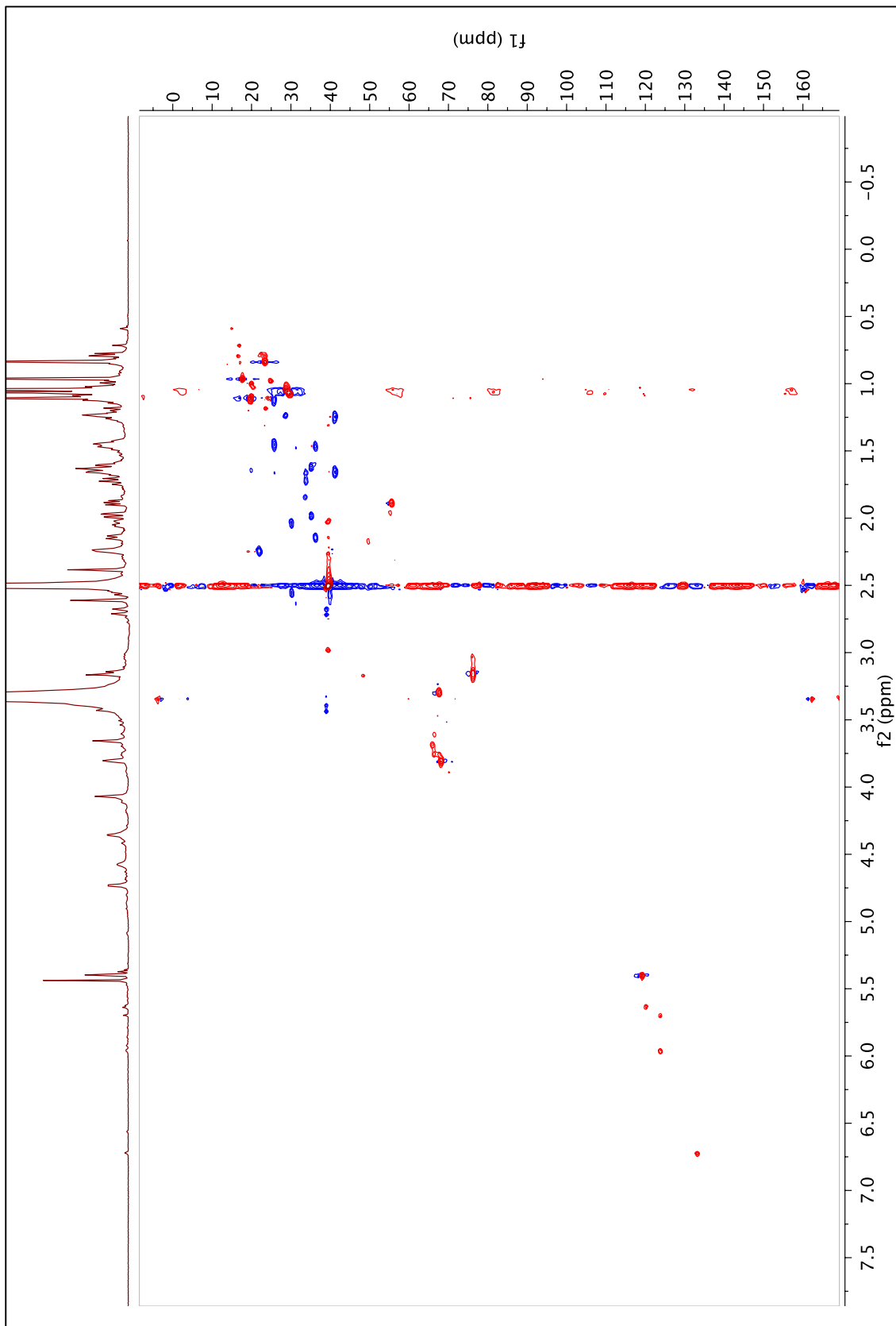


Figura 23 – Mapa de contorno HSQC obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d₆).

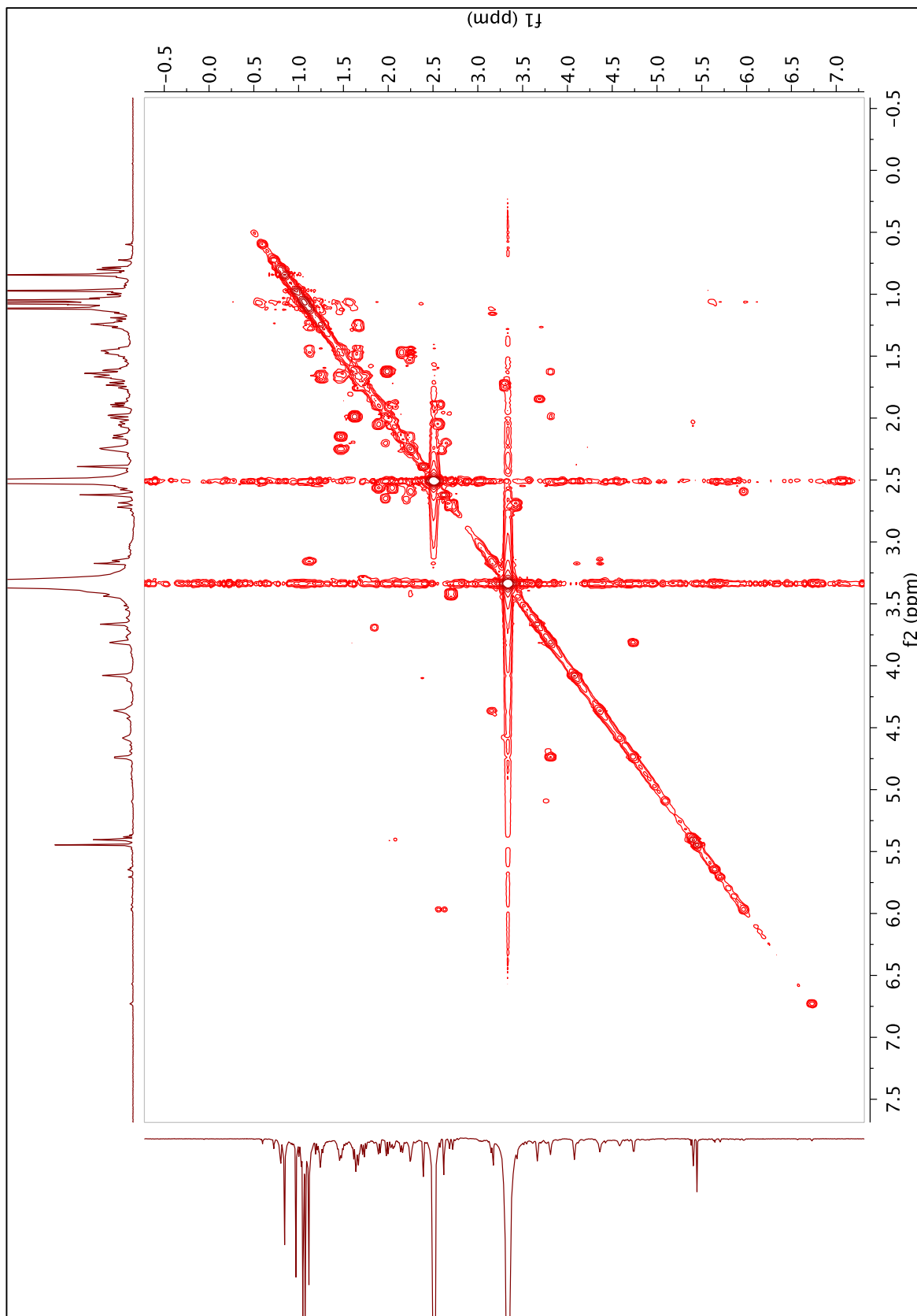


Figura 24 – Mapa de contorno COSY obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d₆).

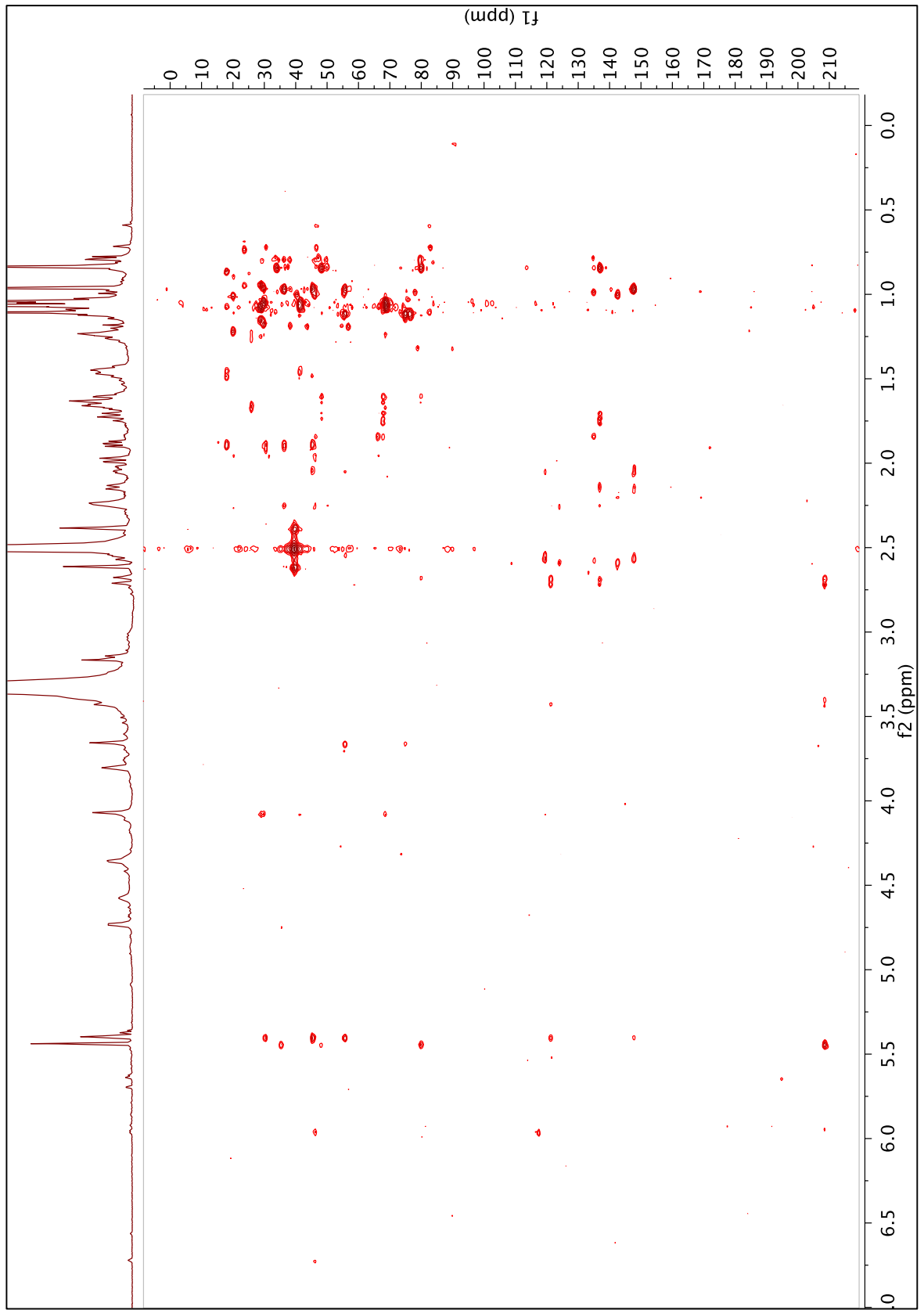


Figura 25 – Mapa de contorno HMBC obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d₆).

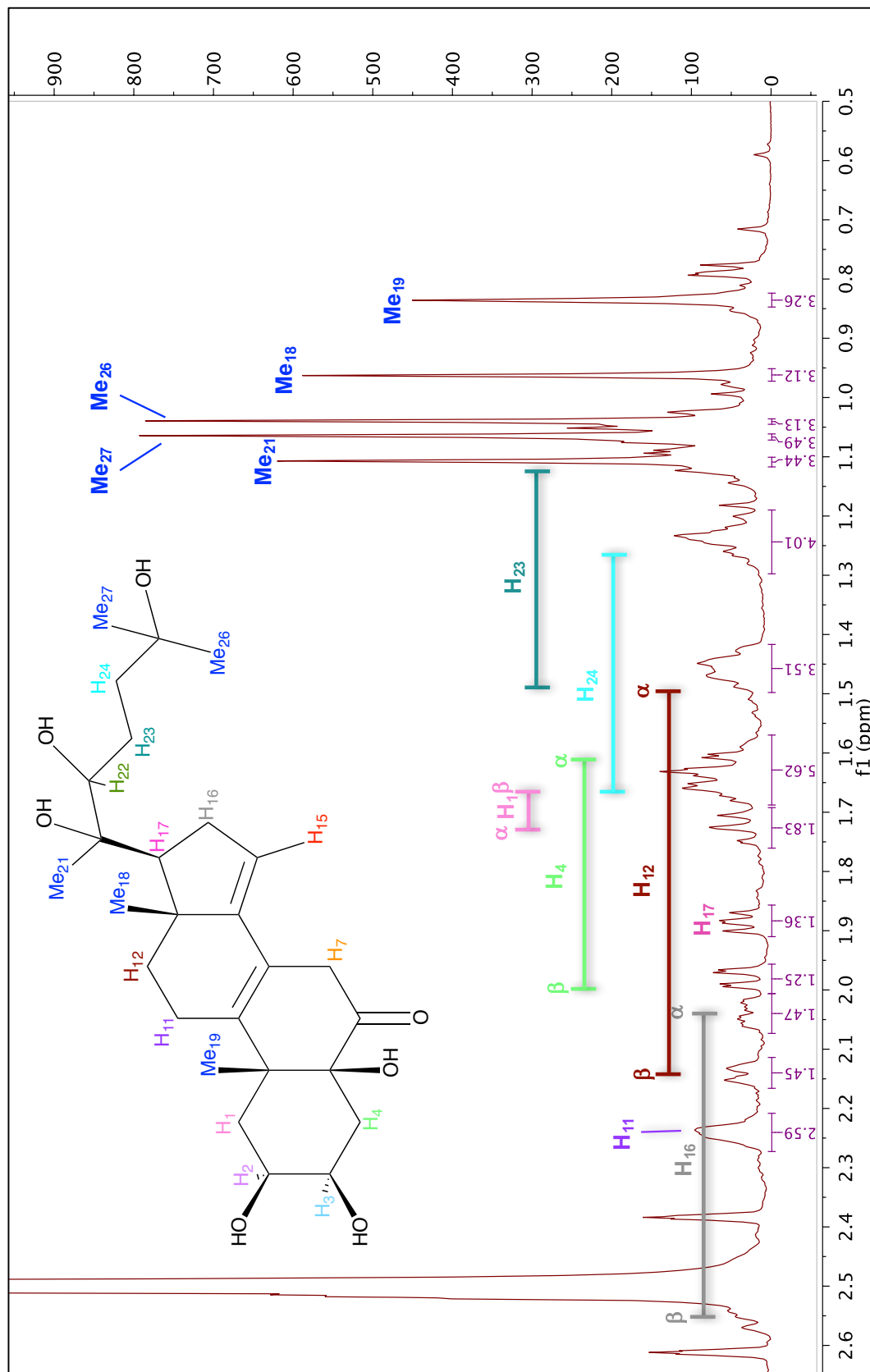


Figura 26 – Espectro de NMR de ^1H obtido para a substância 17 e atribuição dos sinais: ampliação da região entre 0,5 e 2,6 ppm (600 MHz – DMSO-d_6).

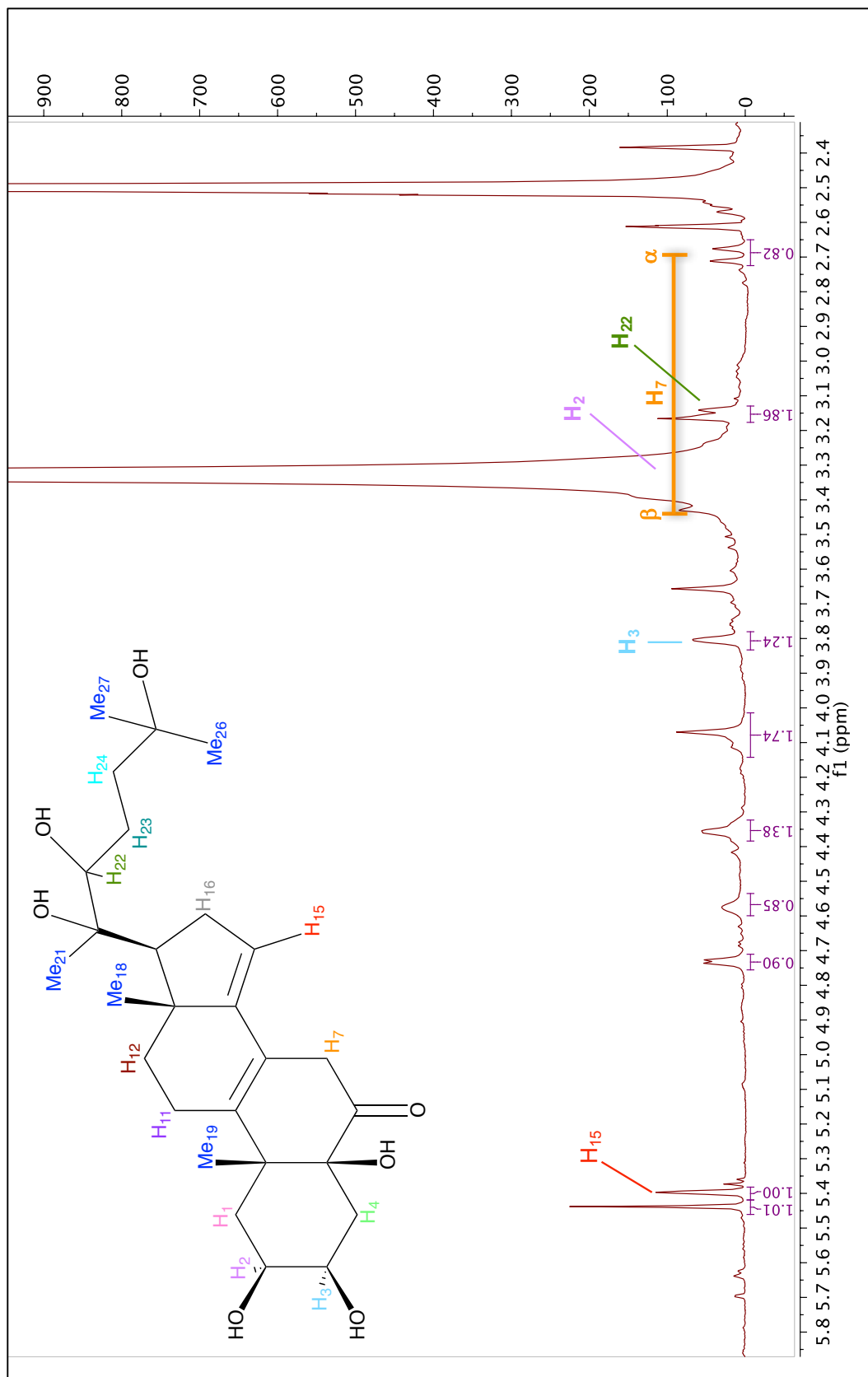


Figura 27 - Espectro de NMR de ^1H obtido para a substância 17 e atribuição dos sinais: ampliação da região entre 2,3 e 6,0 ppm (600 MHz – DMSO-d_6).

Foi possível determinar que a hidroxila em C₅ estava presente (fato que torna a molécula inédita) pelas correlações a 3 ligações (via HMBC) dos hidrogênios metílicos H₁₉ com os carbonos em 34,0 (C₁), 48,3 (C₁₀) e 79,9 (C₅) ppm, este último apresentando um deslocamento químico típico de carbonos ligados e heteroátomos eletronegativos (como o oxigênio). Além disso, outra correlação que corrobora com a presença de uma hidroxila em C₅ é o do hidrogênio H_{1-β} com o mesmo carbono em 79,9 ppm (Figura 25).

Para se obter informações sobre a configuração espacial dos carbonos assimétricos C₂, C₃, C₅, C₁₀, C₁₃ e C₁₇, foi realizado o experimento de ROESY (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*). Através deste experimento, é possível obter informações espaciais da molécula, geralmente com distâncias entre hidrogênios de até 4 Å (PAVIA et al., 2008). Acoplamentos spin-spin (como no caso do experimento de COSY – Figura 24) podem ser utilizados para o estudo de átomos ligados por 2 ou 3 ligações, porém o ROESY, além de detectar acoplamentos spin-spin, pode detectar interações entre hidrogênios separados por ainda mais ligações, contanto que estejam relativamente próximos espacialmente. Isso é possível devido ao efeito NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), em que as interações se dão por acoplamento dipolar entre spins (CLARIDGE, 2016).

O espectro bidimensional de ROESY é mostrado na Figura 28. Pode-se observar uma interação espacial ente H_{1-β} e OH ligada a C₃, sugerindo que ambos estão do mesmo lado no plano. Não é possível observar interação entre H₁₉ e H₄ ou H₂, sugerindo que, assim como na substância 13, a fusão dos anéis A e B do esqueleto esteroidal se dá de forma *cis* (SIMON et al., 2004). A interação entre H_{11-α} e H₂ confirma que ambos estão do mesmo lado do plano, logo, as duas hidroxilas ligadas a C₂ e C₃ também se encontram espacialmente do mesmo lado.

Analisando a Figura 28 também observa-se interação espacial entre H_{12-α} e H₁₇, indicando que ambos estão em posição pseudoaxial. A ausência de interação entre H₁₈ e H₁₇ indica que estes estão em lados opostos do plano. As interações de ROESY descritas para a substância 17 são mostradas na Figura 29. A configuração espacial dos carbonos C₂₀ e C₂₂ não pôde ser determinada por ROESY.

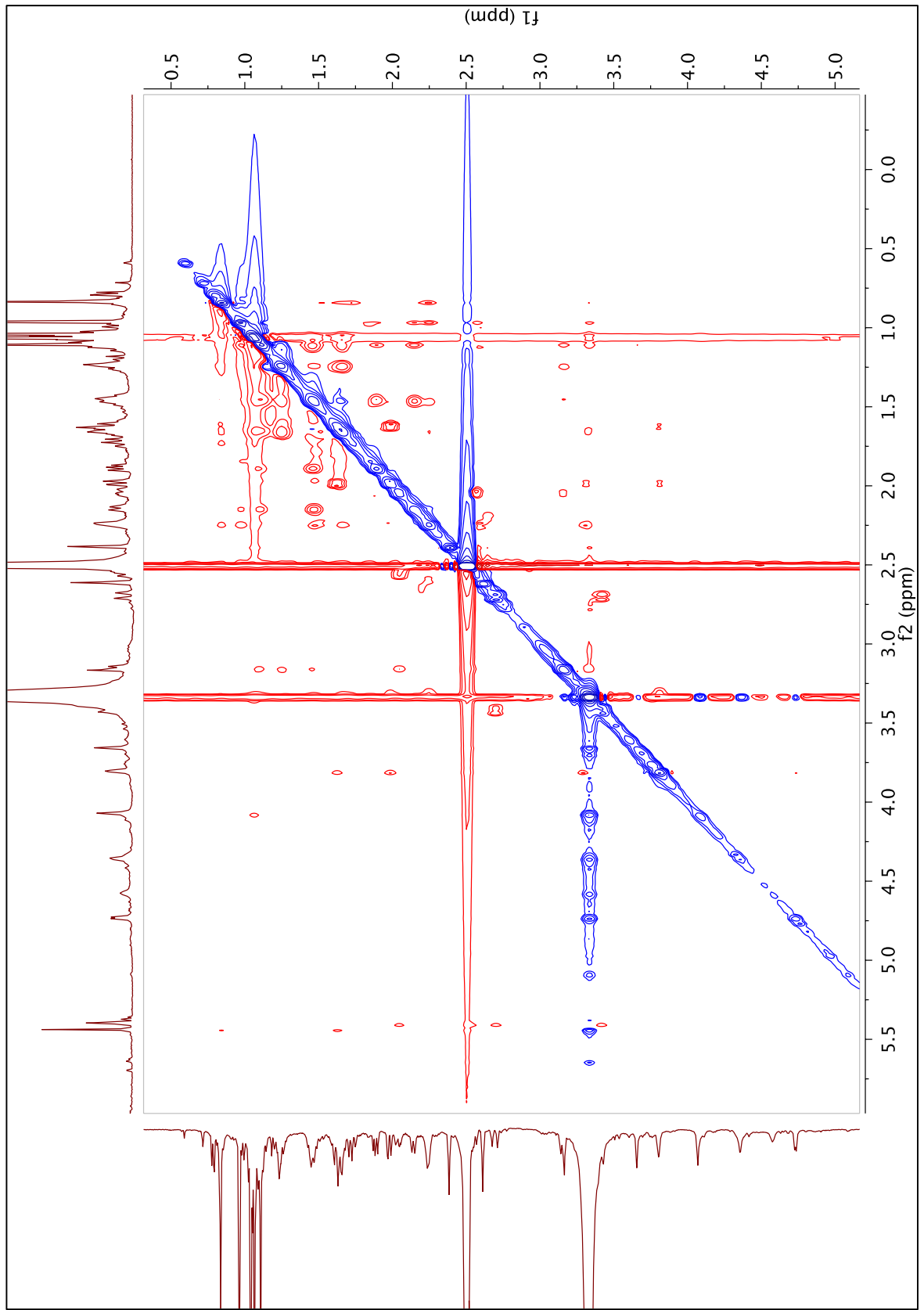


Figura 28 – Mapa de contorno ROESY obtido para a substância 17 (14,1 T – DMSO-d₆).

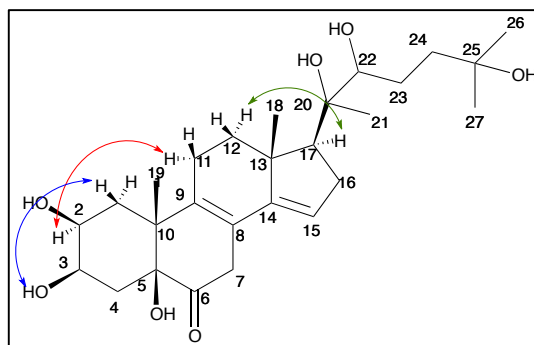


Figura 29 – Interações espaciais observadas pelo experimento de ROESY para a substância 17.

5.7.2. Determinação da rotação específica da substância 17

A rotação específica é o giro de uma molécula medido em graus, compreendida como uma propriedade intrínseca de cada composto que possuem centros assimétricos. Esse é um dado que deve ser levado em consideração para a confirmação de uma molécula e seus centros. Por se tratar de uma molécula inédita, torna-se necessária essa medida para registro. A rotação específica para soluções é calculada conforme Equação 1.

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{C \cdot l} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

α = rotação observada

l = comprimento de caminho óptico

C = concentração em g/mL

T = temperatura

Dessa forma, foi calculada a rotação específica da substância como sendo

$$[\alpha]_{589}^{25} = + 6$$

5.7.3. Confirmação das substâncias por UHPLC-TOF-HRMS

As substâncias puras foram analisadas por espectrômetro de massas de alta resolução, em que foi possível identificar as massas moleculares exatas e calcular o erro em ppm quando comparado à massa exata teórica. As razões m/z obtidas são descritas na Tabela 12.

Tabela 12 – Dados de massas de alta resolução obtidos nos modos positivo e negativo para as substâncias isoladas de *N. multiglandulosa*.

Substância	Fórmula molecular	Massa Exata		Erro (ppm)	HRMS(-)	Erro (ppm)
		Teórica (g mol ⁻¹)	HRMS (+)			
1	C ₇ H ₇ NO ₂	137,0477	138,0553	-1,4	136,0399	0,0
2	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,0899	205,0981	1,5	203,0819	-1,0
3	C ₉ H ₉ NO ₂	163,0633	164,0712	-14,6	162,0550	-3,1
4	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326,1002	349,0897	-0,6	325,0922	-0,3
5	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	402,1526	425,1439	3,5	447,1511	1,8
6	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,0790	291,0865	-1,4	289,0710	-0,7
7	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	165,0549	-1,8	163,0399	2,5
8	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	165,0551	-0,6	163,0404	5,5
9	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	496,3036	497,3116	0,4	541,3035	4,1
10	X	851,24	852,2487	X	850,2396	X
11	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	480,3087	481,3208	8,9	525,3068	0,8
12	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	726,2098	727,2098	1,7	725,1930	0,1
13	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	480,3087	481,3161	-0,8	525,3084	3,8
14	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	756,2113	757,2193	0,3	755,2103	9,0
15	X	709,18	709,19	X	707,17	X
16	C ₉ H ₈ O ₂	148,0524	149,0612	6,0	147,0448	1,4
17	C ₂₇ H ₄₂ O ₇	478,2931	479,3002	-1,5	523,2922	2,9
18	C ₂₇ H ₄₀ O ₇	476,2774	477,2852	0,0	521,2748	0,6
19	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	462,2981	463,3058	-0,4	507,2971	2,6

Os espectros de massas de alta resolução obtidos para a substância inédita (17) no modo negativo e positivo são mostrados na Figura 30 e Figura 31, respectivamente. No modo negativo, observa-se a razão m/z 523,2922 [M+45]⁻ como o pico mais intenso, sendo este atribuído ao aduto formado entre o ácido fórmico e a molécula, representado por [M + HCOO]⁻. Inclusive, como mostrado na Tabela 12,

todos os esteroides isolados apresentam esse aduto como pico majoritário quando analisados no modo negativo, sendo a substância 17 a única que apresentou um íon $[M - H]^-$ com baixa intensidade. Também é possível observar o dímero formado com razão m/z 1001,6016 $[2M + HCOO]^-$.

Já no modo positivo, observa-se a molécula protonada m/z 479,3002 $[M + H]^+$, com os principais picos correspondendo às perdas de água na molécula, representados por m/z 461,2991 $[M - H_2O + H]^+$ e 443,2894 $[M - 2H_2O + H]^+$. Essas perdas ocorrem, muito provavelmente, nos carbonos C_5 e C_3 pois assim será formada uma carbonila α - β - γ - δ insaturada, estabilizando o íon formado, conforme ilustrado na Figura 32.

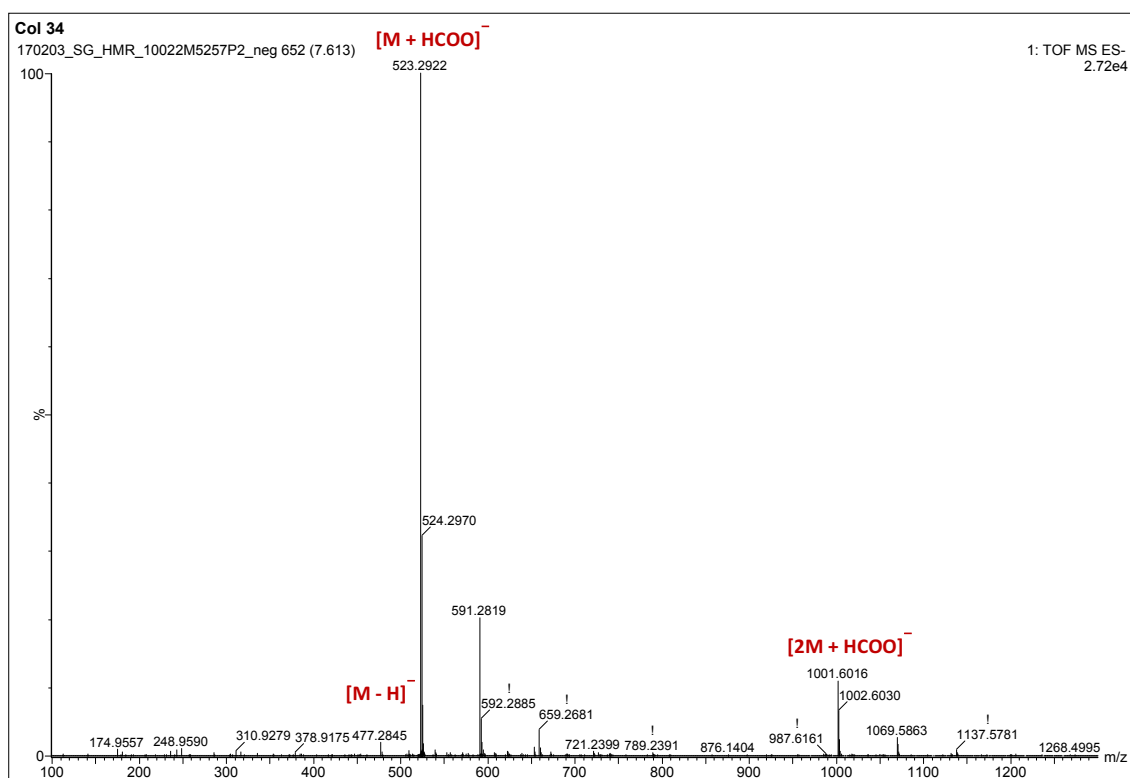


Figura 30 – Espectro de massas de alta resolução – UHPLC-TOF-HRMS(-) – obtido para a substância 17.

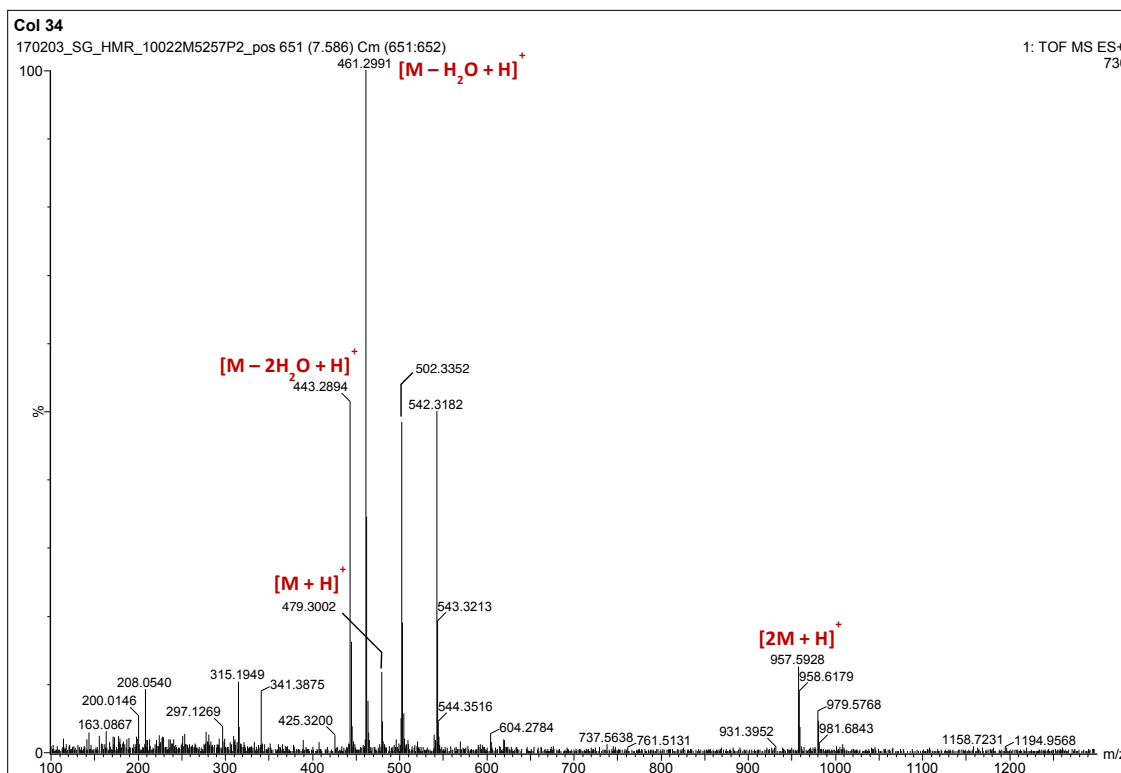


Figura 31 – Espectro de massas de alta resolução – UHPLC-TOF-HRMS(+) – obtido para a substância 17.

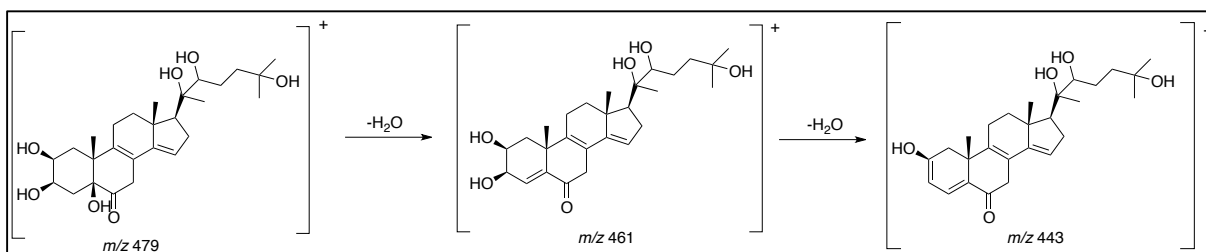


Figura 32 – Proposta de formação dos íons presentes em maior abundância da substância 17 obtidos por UHPLC-TOF-HRMS(+).

5.7.4. Análise por LC-MS/MS das substâncias 10, 12 e 15

5.7.4.1. Substância 12

Nos espectros de NMR da substância 12, é possível atribuir somente os sinais fenólicos, como mostrado em Anexo. Devido à sobreposição dos sinais dos açúcares com o da água presente no DMSO, a caracterização total foi dificultada, no entanto, a suspeita era de que tratava-se do flavonoide Kaempferol triglicosilado (Figura 33) uma vez que foram observados três sinais de hidrogênios relativamente desblindados em 4,26; 4,40 e 5,29 ppm, característicos de hidrogênios carbinólicos.

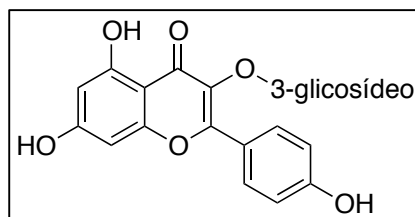


Figura 33 – Estrutura química da substância 12 (Kaempferol triglicosilado)

As análises de LC-MS/MS confirmaram essas suspeitas, uma vez que as razões m/z observadas no modo positivo (463,13) e no modo negativo (285,06) são correspondentes aos fragmentos da porção glicosídica e do flavonoide, respectivamente, sendo que o fragmento no modo positivo é observado como um aduto com sódio. Os espectros de massas são mostrados na Figura 34.

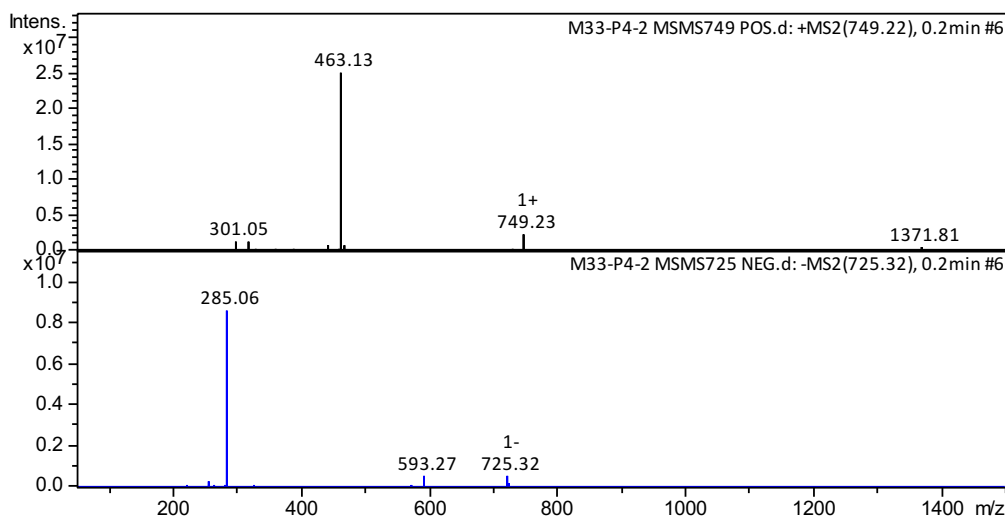


Figura 34 – Espectros de massas obtidos para a substância 12 no modo positivo (acima) e negativo (abaixo).

Sabendo que a porção glicosídica apresenta massa de 441 (modo positivo), pode-se propor que os resíduos de açúcar podem ser de ramnose (m/z 146), glicose ou galactose (m/z 162) e xilose ou apiose (m/z 132), no entanto, diversas podem ser as combinações desses açúcares substituídos no flavonoide.

5.7.4.2. Substância 10

A substância 10 apresentou espectros de NMR com baixa resolução, tanto utilizando DMSO- d_6 ou MeOD, dificultando sua elucidação. Uma vez que se tem

conhecimento da massa de alta resolução tanto no modo positivo quanto negativo, foi realizada análise por LC-MS/MS para se saber as fragmentações obtidas em ambos os modos de ionização. Os espectros de massas obtidos para a substância 10 são mostrados na Figura 35.

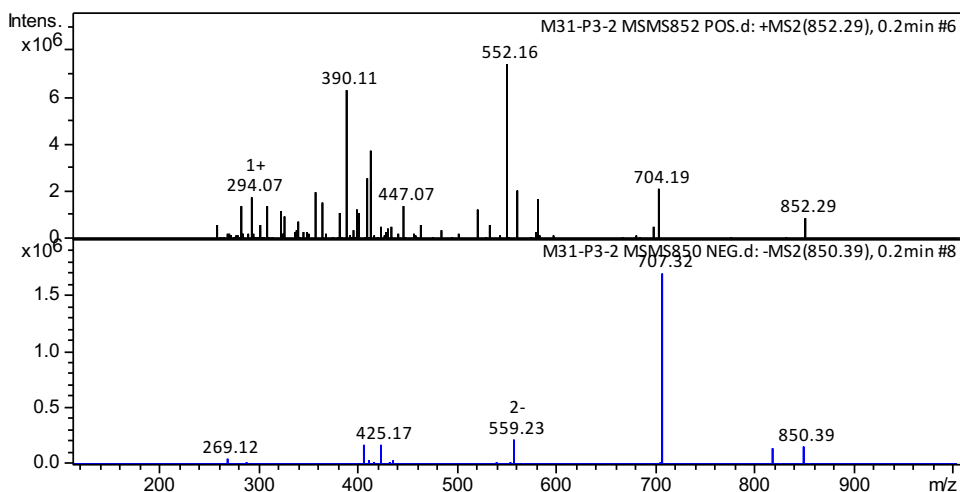


Figura 35 – Espectros de massas obtidos para a substância 10 no modo positivo (acima) e negativo (abaixo).

Esforços foram feitos na tentativa da identificação da substância 10, sendo que existe uma forte evidência de que essa molécula seja nitrogenada pelo fato de a massa molar ser de 851 g/mol. No entanto, não foram encontradas moléculas com esses padrões de fragmentação.

5.7.4.3. Substância 15

Assim como no caso da substância 10, os espectros de NMR se mostraram inconclusivos, logo, foram realizadas análises de LC-MS/MS de modo a se obter o padrão de fragmentação da molécula. Os espectros de massas obtidos para essa substância são mostrados na Figura 36.

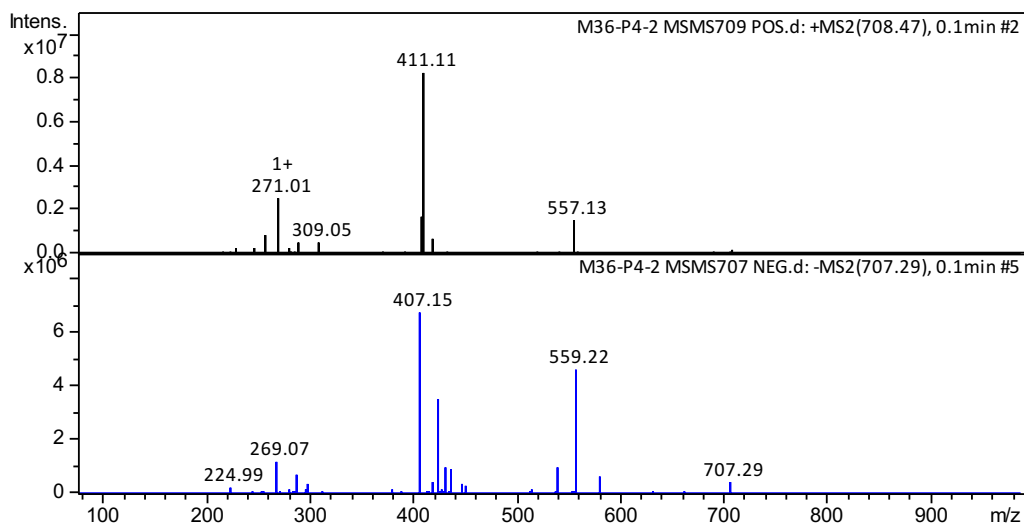


Figura 36 – Espectros de massas obtidos para a substância 15 no modo positivo (acima) e negativo (abaixo).

Esforços foram feitos na tentativa da identificação da substância 15, sendo que a massa molar dessa substância é de 708 g/mol. No entanto, assim como no caso da substância 10, não foram encontrados relatos na literatura desse padrão de fragmentação. Pode-se observar que o íon molecular com m/z 707,29 da substância 15 é um fragmento do íon molecular com m/z 850,39 da substância 10, podendo sugerir que as estruturas são parecidas, com um substituinte adicional presente na substância 10.

5.8 Tentativa de identificação de monofluoracetato

Uma vez que estudos recentes haviam detectado MF em extrato aquoso de folhas de *Niedenzuella multiglandulosa*, esforços foram feitos de modo a tentar identificar essa substância nas frações e extratos mais polares: extrato aquoso e metanólico e fração 3 (majoritária, em que a substância 1 está presente, mas impura).

Uma abordagem consistiu no uso da técnica de NMR ^{19}F , em que o isótopo analisado é o flúor 19 que consiste em uma abundância de aproximadamente 100%. Dessa forma, essa técnica é altamente sensível à presença de flúor na amostra analisada, assim como o hidrogênio (^1H). Uma vez que há o acoplamento de flúor com átomos de hidrogênio, esperava-se observar um tripleto na região de -215 ppm caso essa substância estivesse presente, conforme dados da literatura (BARON et al., 1987; KREBS; KEMMERLING; HABERMEHL, 1994).

A Figura 37 mostra os espectros obtidos de NMR de ^{19}F na região esperada para o sinal do MF e fica claro que não foi detectado o sinal esperado, sendo essa uma forte evidência de que essa substância não está presente nas amostras analisadas.

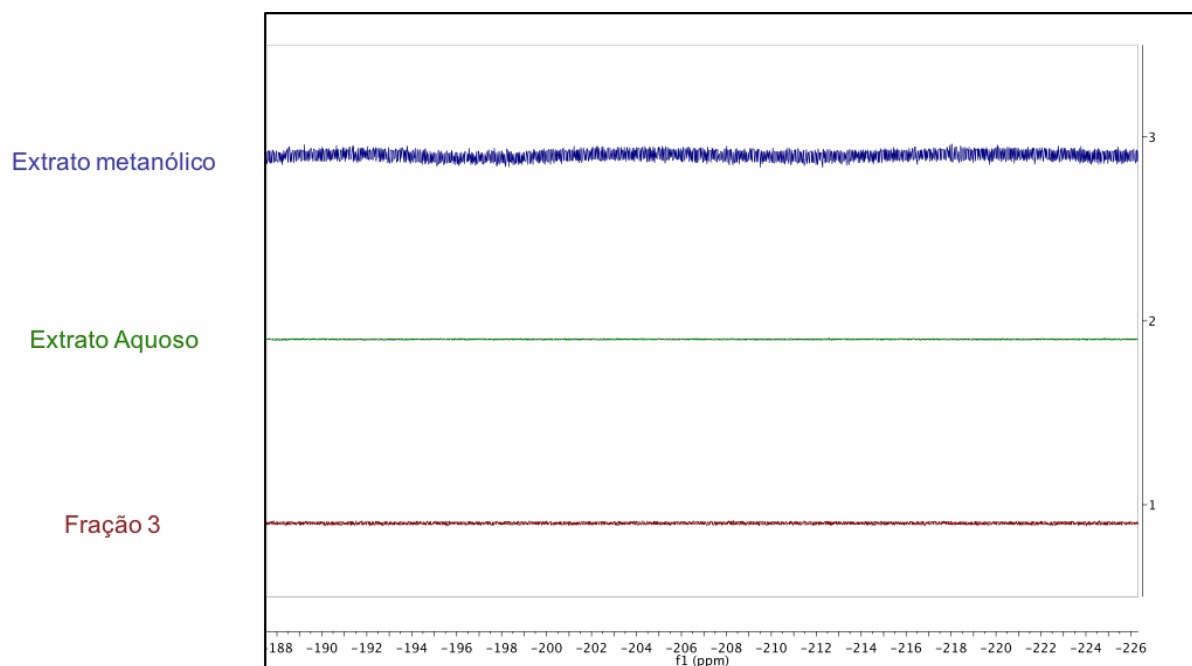


Figura 37 – Espectros de NMR de ^{19}F obtidos para os extratos metanólico, extrato aquoso e Fração 3.

Outra abordagem realizada foi a análise dessas mesmas amostras por LC-MS no modo negativo, de modo que a abundância do íon de m/z 77 foi monitorada. A Figura 38 mostra o cromatograma de íons totais (TIC) obtido para as amostras e em vermelho é mostrada a abundância do íon de m/z 77 para cada uma delas. Observe-se que a abundância do íon em questão é praticamente nula quando comparada aos sinais das outras substâncias, sendo considerado ruído.

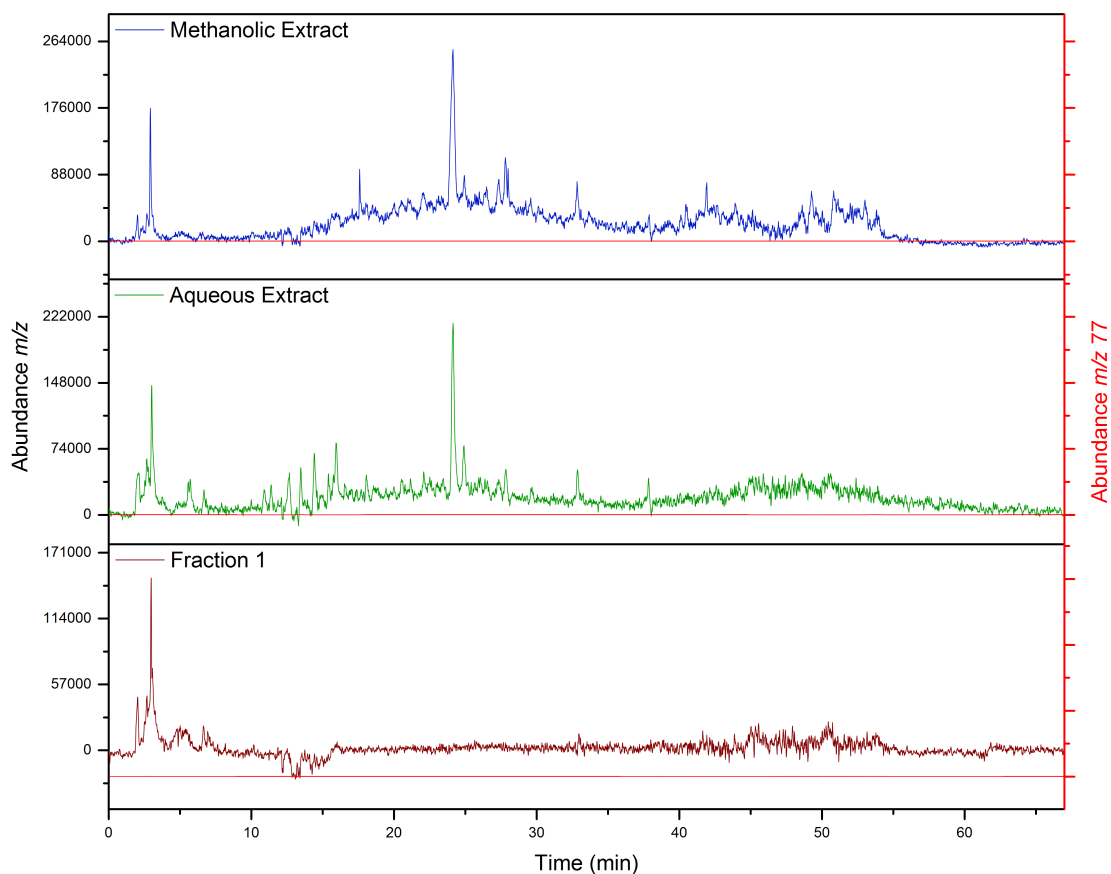


Figura 38 – Cromatograma de íons totais (TIC) dos extratos aquoso, metanólico e fração 3 e abundância relativa da razão m/z 77.

Uma terceira técnica utilizada na tentativa de determinação de MF na fração 3 foi a análise por espectrometria de massas de alta resolução, em que o espectro obtido é mostrado na Figura 39. A massa exata do MF é de 77,0039 ($C_2H_2FO_2$) e nesse caso, foi possível observar o íon de m/z 76,9881. Essa massa corresponde a um erro de -205,2 ppm, considerado muito alto para ser possível atribuir esse íon à presença de MF na amostra.

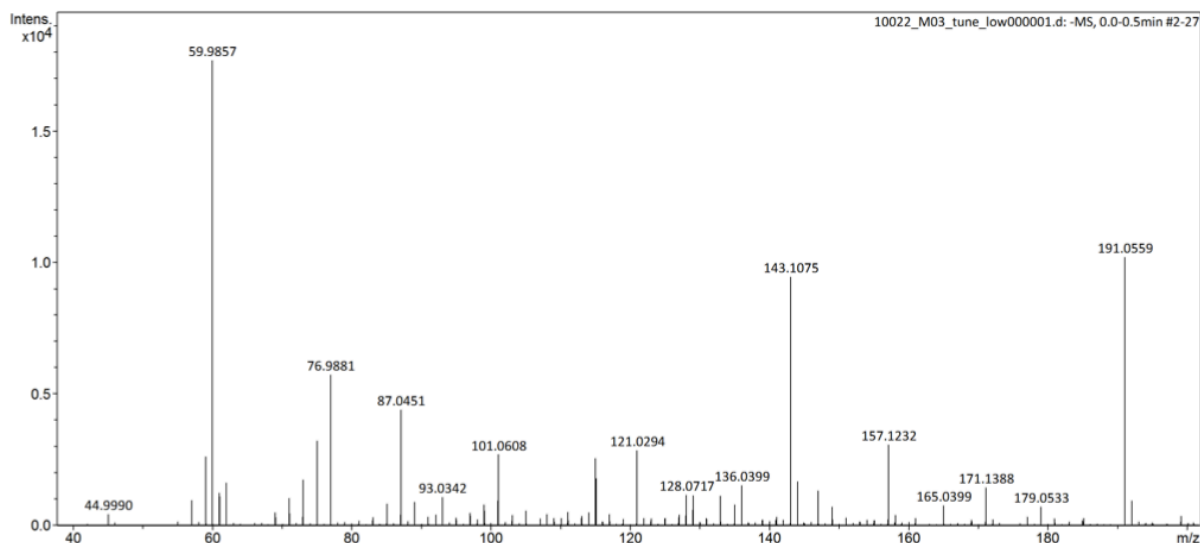


Figura 39 – Espectro de massas de alta resolução obtido para a fração 3.

5.9 Resultado do teste de toxicidade com Zebrafish

Além de enviar novamente o extrato metanólico bruto e as frações obtidas no fracionamento do extrato NM_JM em escala preparativa (Seção 4.2), a substância 13 (esteroide majoritário) pura também foi enviada para teste. O extrato aquoso obtido em maior escala também foi selecionado para o teste de toxicidade, uma vez que o extrato metanólico foi o único a apresentar toxicidade dentre os extratos preparados em menor escala. Desta forma, suspeitou-se de que talvez a toxicidade fosse devida a compostos mais polares presentes nas folhas, e que no extrato aquoso também estariam presentes. A fração 3 (contendo a substância 1 impura) foi igualmente enviada para testes por se tratar de uma fração polar, logo, MF também poderia estar presente nessa fração mesmo que não houvesse nenhuma confirmação pelas análises realizadas (seção 5.8).

O teste mostrou os seguintes resultados:

- O extrato metanólico bruto e as frações P1 a P5 se mostraram embriotóxicas, induzindo dismorfologias à concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após 48 horas de incubação.
- O esteroide majoritário (substância 13) e as frações P6 e P7 se mostraram embriotóxicas, causando a morte das larvas à concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- O extrato aquoso e a fração 3 não mostraram sinais de toxicidade mesmo a 200 µg mL⁻¹.

Esses dados que diferem dos recentemente publicados (SANTOS-BARBOSA et al., 2017), pois tanto o extrato aquoso quanto a fração 3 não apresentaram toxicidade na mais elevada concentração testada (200 µg mL⁻¹). Dessa forma, é improvável que, mesmo que haja uma pequena concentração de MF nas amostras, este seja o composto responsável pela toxicidade da planta. Além disso, essa substância é conhecida por causar morte súbita em gado, e os relatos são de que a *N. multiglandulosa* causa uma intoxicação crônica, levando à morte depois de várias semanas (CARVALHO et al., 2009, 2006).

O esteroide majoritário (**13**) foi tóxico a baixas concentrações, o que sugere que os outros esteroides isolados também poderiam ser tóxicos. Porém, as frações P6 e P7 também foram tóxicas a baixas concentrações, sendo que nessas frações há baixa absorção no UV (Figura 13, pág. 58). É possível observar picos somente nos cromatogramas de íons totais (TIC – *Total Ion Chromatogram*) e, infelizmente, nenhuma das substâncias isoladas encontra-se nessa região.

Os sintomas observados no gado intoxicado por *N. multiglandulosa* consistem, de modo geral, em problemas cardíacos e hepáticos (CARVALHO et al., 2009, 2006). Esses sintomas podem ser causados devido à presença desses esteroides (ROCKHOLD, 1993) nas folhas da planta, uma vez que é amplamente conhecido que esteroides causam problemas similares aos observados nestes estudos.

Os esteroides isolados do extrato NM_JM (substâncias 9, 11, 13, 17, 18, 19) são classificados como ecdisteroides. Neste tipo de substância é observado, tipicamente, uma cadeia alifática conectada ao carbono 17 do esqueleto esteroidal, totalizando 27, 28 ou 29 átomos de carbono. Além disso, essa classe de esteroides apresenta um cromóforo 14 α -hidróxi-7-en-6-ona, fusão *cis* dos anéis A/B (5 β -H) (DINAN, 2001).

Ecdisteroides foram inicialmente encontrados em insetos como um hormônio esteroidal controlador do processo de muda. Posteriormente, esse tipo de esteroide também foi encontrado em espécies de plantas (sendo chamados de fitoecdisteroides) (DINAN, 2001). Essas substâncias são frequentemente detectadas em folhas jovens e órgãos reprodutivos (flores, sementes e anteras), e menos frequentemente em caules e raízes, o que está de acordo com a hipótese de que os

fitoecdisteroides podem servir como proteção contra insetos predadores (TARKOWSKÁ; STRNAD, 2016). Aparentemente, existem poucos estudos utilizando essas substâncias puras, sendo mais comumente estudados os extratos de plantas (KOSAŘ et al., 1997).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos durante a pesquisa, observou-se que somente o extrato metanólico de folhas jovens de *Niedenzuella multiglandulosa* apresentou toxicidade no teste utilizando modelo com *Zebrafish*. Os compostos majoritários presentes nas folhas jovens foram isolados a partir do extrato NM_JM por métodos cromatográficos de alta e média pressão e caracterizados por HRMS e NMR, possibilitando a identificação de 17 substâncias, dentre essas, seis ecdisteroides sendo um inédito (substância 17).

Os resultados dos testes biológicos mostraram que o ecdisteroide majoritário é tóxico a baixas concentrações, um dado muito interessante pois os sintomas observados nos animais intoxicados são consistentes com o uso de esteroides por um longo período. A fração mais polar coletada não apresenta toxicidade mesmo a elevadas concentrações. Além disso, diversas abordagens foram tomadas na tentativa de identificação de Monofluoracetato nos extratos mais polares e na fração mais polar obtida para o extrato metanólico, porém, a presença dessa substância não pôde ser comprovada.

Além disso, o trabalho contribui com dados novos sobre a espécie estudada, uma vez que ainda não existem relatos na literatura de estudos fitoquímicos nem isolamento das substâncias nela presentes. Essas moléculas apresentam estruturas moleculares bastante diferentes das isoladas para *Tetrapterys mucronata*, contribuindo para um melhor entendimento da taxonomia dessas espécies uma vez que anteriormente pertenciam ao mesmo gênero *Tetrapterys* e atualmente algumas espécies foram divididas no gênero *Niedenzuella*.

Dessa forma, pode-se considerar que os dados obtidos são complementares aos publicados recentemente e contribuem para um maior entendimento da intoxicação crônica observada nos surtos do gado no Mato Grosso do Sul.

7 REFERÊNCIAS

- ACEVES-AVILA, F. J. et al. The first descriptions of therapeutic arthrocentesis: A historical note. **Rheumatology**, v. 42, n. 1, p. 180–183, 2003.
- ANDERSON, W. R. Malpighiaceae (Malpighia Family). In: SMITH, N. et al. (Eds.). . **Flowering plants of the neotropics**. [s.l.] Princeton University Press; New York Botanical Garden, 2004. p. 229–232.
- ANDERSON, W. R. Eight Segregates from the Neotropical Genus *Mascagnia* (Malpighiaceae). **Novon**, v. 16, p. 168–204, 2006.
- ARSHAD, N. et al. *Peganum harmala* can minimize *Escherichia coli* infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. **Poultry science**, v. 87, n. 2, p. 240–249, 2008.
- BAI, M. M. et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitory and anti-inflammatory components from the leaves of *eucommia ulmoides* oliver (Duzhong). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 2198–2205, 2015.
- BARON, M. L. et al. Detection and measurement of fluoroacetate in plant extracts by ¹⁹F NMR. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2293–2295, 1987.
- BARROS, T. P. et al. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 7, p. 1400–1413, 2008.
- BEN SALAH, H. et al. Flavonol triglycosides from the leaves of *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 9, p. 1268–1270, 2002.
- BRILLOUET, J. M. et al. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. **Annals of Botany**, v. 112, n. 6, p. 1003–1014, 2013.
- CALDAS, S. A. et al. Aborto em bovinos devido à intoxicação por *Tetrapteryx acutifolia* (Malpighiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 737–746, 2011.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, SHAWN, O. **Biochemistry**. 8th. ed. Stamford, USA: Cengage Learning, 2015.
- CARVALHO, G. D. et al. Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos no estado do Espírito Santo - Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p. 87–98, 2009.
- CARVALHO, N. M. et al. Intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 139–146, 2006.
- CLARIDGE, T. D. W. Correlations through space: The nuclear Overhauser effect. In: **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 3a. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. p. 285–319.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug

leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52–60, 1997.

CSÁBI, J. et al. Oxidized Metabolites of 20-Hydroxyecdysone and Their Activity on Skeletal Muscle Cells: Preparation of a Pair of Desmotropes with Opposite Bioactivities. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 10, p. 2339–2345, 2015.

DAVIS, C. C. et al. Laurasian migration explains Gondwanan disjunctions: Evidence from Malpighiaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 10, p. 6833–6837, 2002.

DAVIS, C. C.; ANDERSON, W. R. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 12, p. 2031–2048, 2010.

DE SOUZA, L. M. et al. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 59–67, 2008.

DINAN, L. Phytoecdysteroids : biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325–339, 2001.

ESCH, C. DE et al. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 6, p. 545–553, 2012.

FAROUK, L. et al. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 449–454, 2007.

FREEDLAND, C. S.; MANSBACH, R. S. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 54, n. 3, p. 183–194, 1999.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HUANG, K. C. **Chang Huang**. 2nd. ed. [s.l.] CRC Press, 1999.

HUERTA-REYES, M.; JUÁREZ, R. M. F.; AGUILAR-ROJAS, A. Heteropterys Genus: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 6, p. 523–531, 2015.

JAHANIANI, F. et al. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1581–1592, 2005.

KIM, C. S.; KIM, K. H.; LEE, K. R. Phytochemical constituents of the leaves of *Hosta longipes*. **Natural Product Sciences**, v. 20, n. 2, p. 86–90, 2014.

- KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics : an official public**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.
- KOSAŘ, K. et al. Embryotoxicity of 20-hydroxyecdysone and polypodine B from *Leuzea carthamoides* DC. **Pharmazie**, v. 52, n. 5, p. 406–407, 1997.
- KREBS, H. C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea Marcgravii* by ¹⁹F-NMR spectroscopy. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 909–913, 1994.
- KUMPUN, S. et al. Stereoselective synthesis and moulting activity of integristerone A and analogues. **Tetrahedron**, v. 63, n. 5, p. 1093–1099, 2007.
- LEE, S. T. et al. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 30, p. 7345–7354, 2014.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353–367, 2007.
- MALTA, L. F. B. et al. Chiral Recognition of 2-Hydroxypropyl- α -cyclodextrin Towards DL-Tryptophan. **Letters in Organic Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 258–263, 2009.
- MARCHESINI, A. M. et al. Chemical Constituents of *Aristolochia giberti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1598–1608, 2009.
- MCKENNA, D. J. et al. The Scientific Investigation of Ayahuasca : A Review of Past and Current Research. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 1, p. 65–76, 1998.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th. ed. [s.l.] Freeman, W. H., 2005.
- NOGUEIRA, V. A. et al. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 823–838, 2011.
- ODINOKOV, V. N. et al. Transformation of 20-hydroxyecdysone acetonides into podedcdysone B. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 952–956, 2003.
- ORTIZ, M. **Comissão externa destinada a acompanhar as investigações sobre o envenenamento de animais ocorrido na Fundação Zoológico de São Paulo (envenenamento no Zoológico de São Paulo)**. Disponível em: <www.camara.gov.br/sileg/integras/292702.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2017.
- OTT, J. **Pharmacotheon: Entheogenic Drugs, Their Plant Sources, and History**. 2nd. ed. Kennewick, WA: Natural Products Co., 1996.
- PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4a. ed. [s.l.] Brooks Cole; 4 edition (March 12, 2008), 2008.
- PEIXOTO, P. V. et al. Chronic Heart Failure and Abortion Caused by *Tetrapteryx* spp. in Cattle in Brazil. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds.). **Poisoning by plants**,

mycotoxins, and related toxins. [s.l.] CAB International: London, 2011. p. 256–263.

PROUDFOOT, A. T.; BRADBERRY, S. M.; VALE, J. A. Sodium Fluoroacetate Poisoning. **Toxicology Review**, v. 25, n. 4, p. 213–219, 2006.

QUEIROZ, M. M. F. et al. Chemical composition of the bark of *Tetrapteryx mucronata* and identification of acetylcholinesterase inhibitory constituents. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 650–656, 2014.

QUEIROZ, M. M. F. et al. LC-MS/MS quantitative determination of *Tetrapteryx mucronata* alkaloids, a plant occasionally used in Ayahuasca preparation. **Phytochemical Analysis**, v. 26, n. 3, p. 183–188, 2015.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; SCHILD, A. L. A review of poisonous plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 245–254, 2012.

RIET-CORREA, G. et al. Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 91–96, 2005.

ROCKHOLD, R. W. Cardiovascular Toxicity of Anabolic Steroids. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 497–520, 1993.

SALUM, M. L.; ROBLES, C. J.; ERRA-BALSELLS, R. Photoisomerization of ionic liquid ammonium cinnamates: One-pot synthesis-isolation of Z-cinnamic acids. **Organic Letters**, v. 12, n. 21, p. 4808–4811, 2010.

SAMOYLENKO, V. et al. Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 357–367, 2010.

SANNOMIYA, M. et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 16, p. 2244–2250, 2005.

SANTOS-BARBOSA, J. M. et al. A Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Detection and Quantitation of Monofluoroacetate in Plants Toxic to Livestock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 1428–1433, 2017.

SIMON, A. et al. A new ecdysteroid with unique 9 β -OH and four other ecdysteroids from *Silene italica* ssp. *nemoralis*. **Steroids**, v. 69, n. 6, p. 389–394, 2004.

TARKOWSKÁ, D.; STRNAD, M. Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones. **Planta**, v. 244, n. 3, p. 545–555, 2016.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1635–1660, 2002.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of

Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.

VOKÁČ, K. et al. New ergostane type ecdysteroids from fungi. Ecdysteroid constituents of mushroom *Paxillus atrotomentosus*. **Tetrahedron**, v. 54, n. 8, p. 1657–1666, 1998.

VOKÁČ, K.; BUDĚŠÍNSKÝ, M.; HARMATHA, J. Minor Ecdysteroid Components of *Leuzea carthamoides*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 67, n. 1, p. 124–139, 2002.

WANG, Y. et al. Sesquiterpenes and other constituents from *Cacalia deltophylla*. **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 596–598, 2003.

WU, J. et al. New Aliphatic Alcohol and (Z)-4-Coumaric Acid Glycosides from *Acanthus ilicifolius*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 10, p. 1201–1203, 2003.

ZANOLARI, B. et al. Methylpyrrole tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 8, p. 1153–1158, 2005.

8 ANEXO

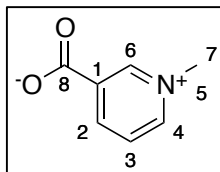


Figura 40 – Estrutura química da substância 1.

Tabela 13 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 1 (NMR 14,1 T– DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	X	140,3
2	8,73 (d; 7,4)	143,9
3	8,00 (t; 7,4)	126,6
4	8,85 (bs)	144,5
5	X	X
6	9,19 (s)	146,0
7	4,35 (s)	47,5
8	x	161,8

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

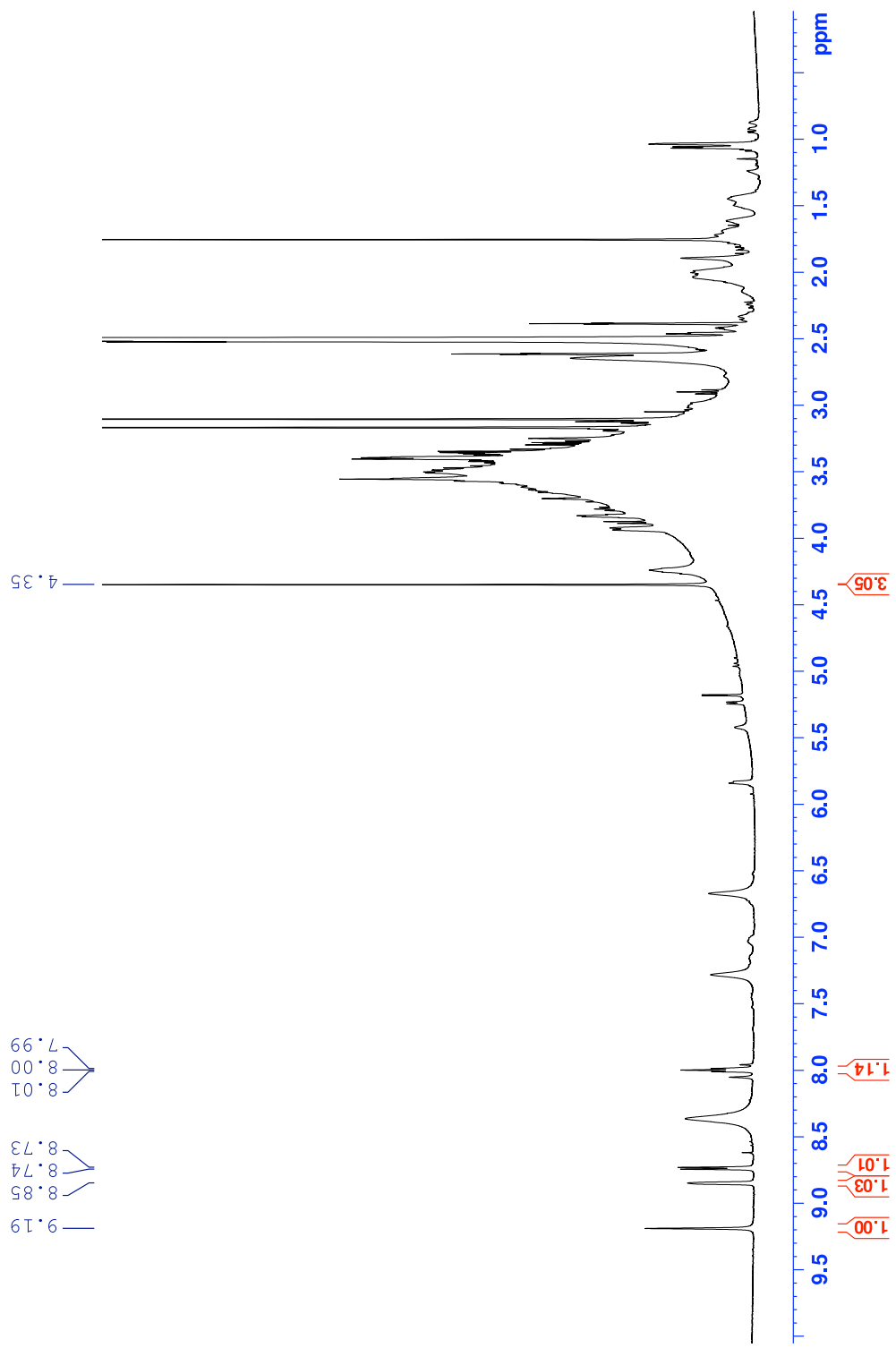


Figura 41 – Espectro de NMR de ^1H da substância 1 (600 MHz, DMSO-d_6).

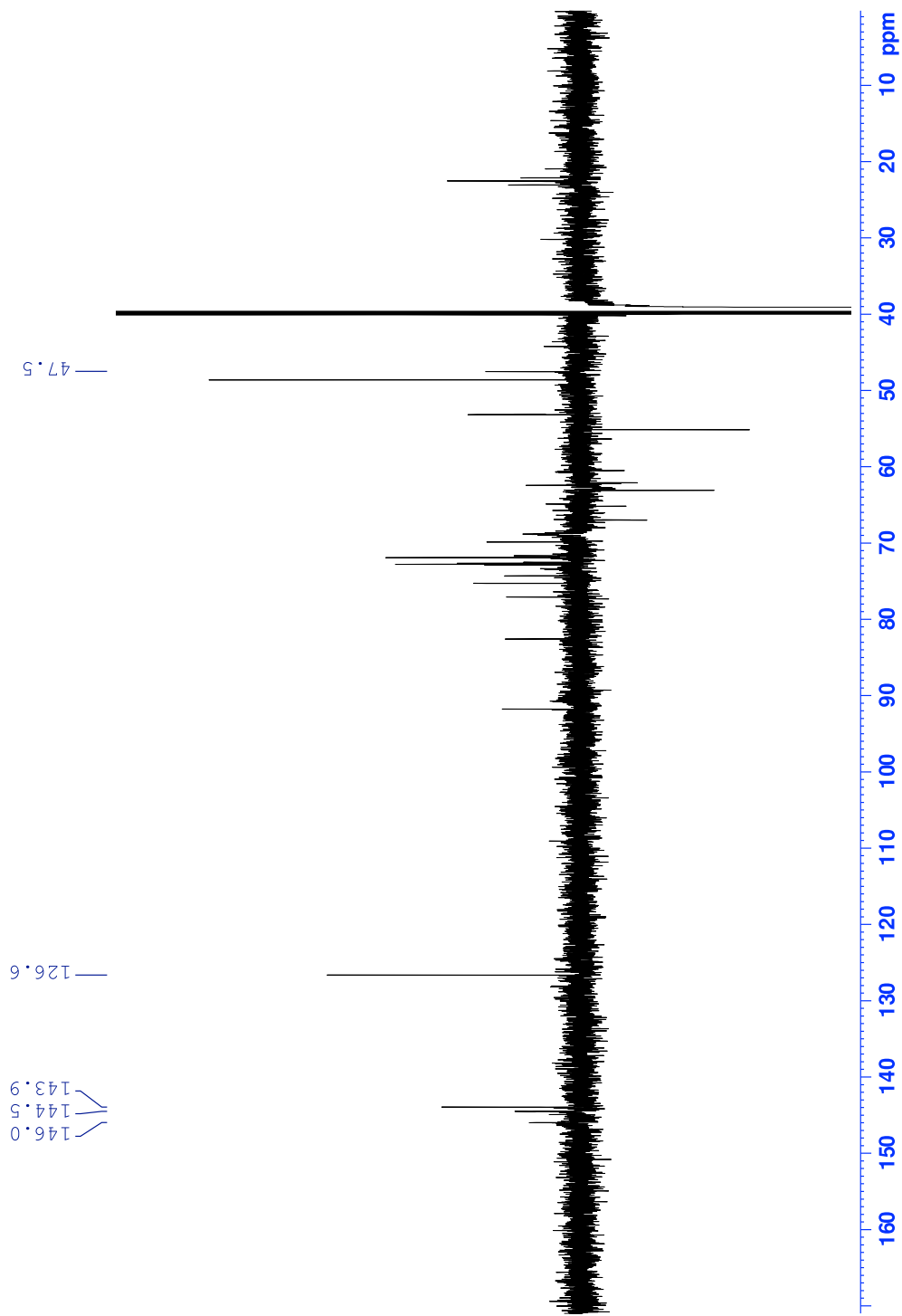


Figura 42 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 1 (150 MHz, DMSO-d₆).

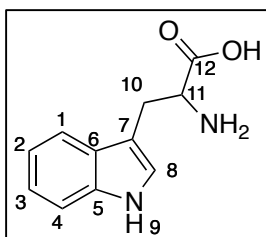


Figura 43 – Estrutura química da substância 2.

Tabela 14 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 2 (14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	7,55 (d; 7,9)	118,4
2	6,98 (t; 7,4)	118,3
3	7,06 (t; 7,4)	120,9
4	7,34 (d; 8,1)	111,3
5	X	136,3
6	X	127,2
7	X	109,6
8	7,19 (s)	124,0
9	10,89 (s)	X
10	2,95 (m) 3,30 (m)	27,2
11	3,44 (m)	54,7

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

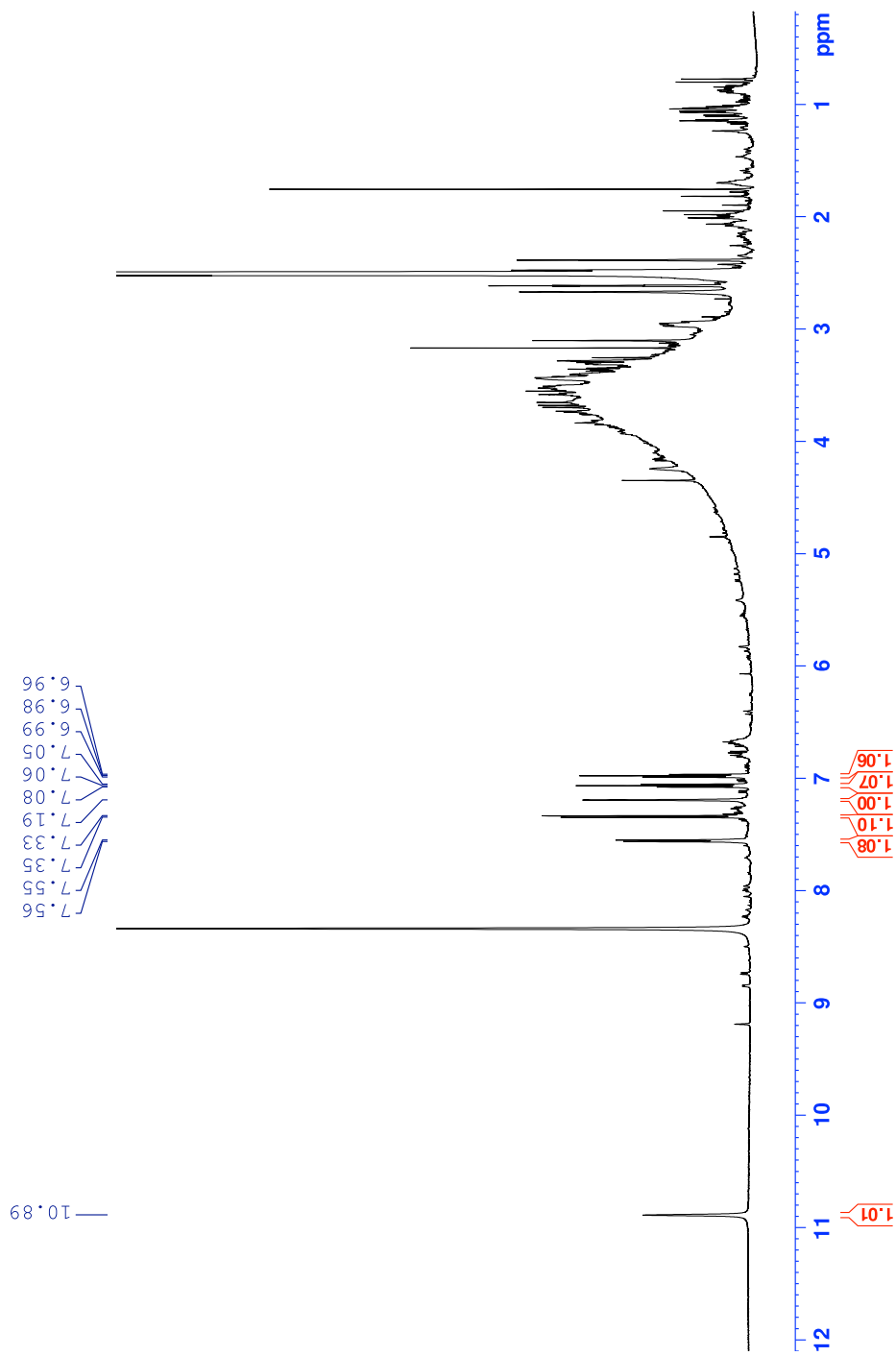


Figura 44 – Espectro de NMR de ^1H da substância 2 (600 MHz, DMSO-d_6).

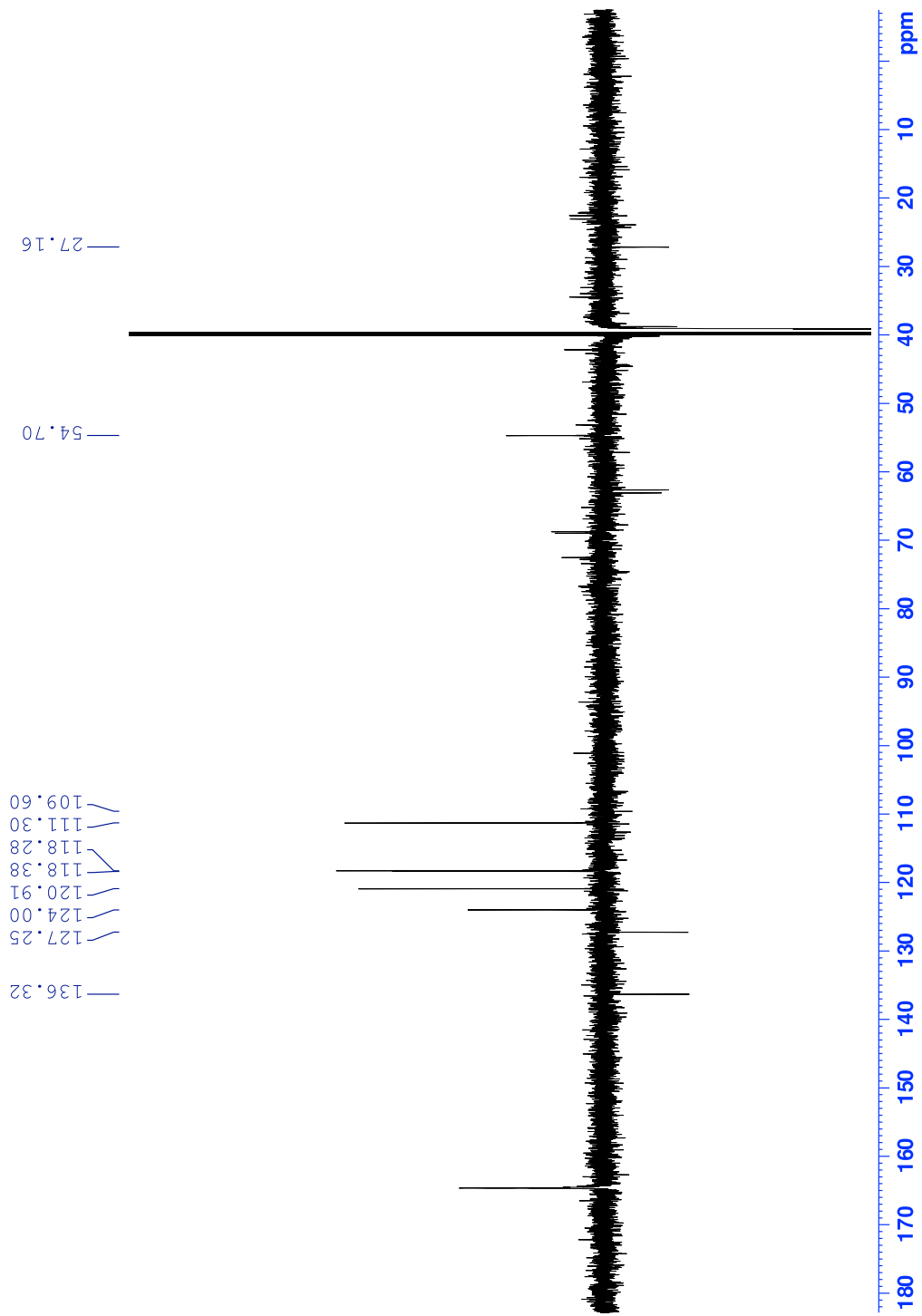


Figura 45 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 2 (150 MHz, DMSO-d₆).

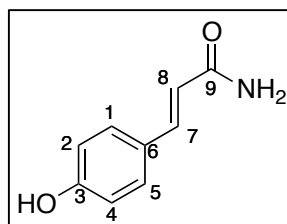


Figura 46 – Estrutura química da substância 3.

Tabela 15 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 3 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m ^b ; J ^c)	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	7,38 (d; 8,7)	129,2
2	6,78 (d; 8,7)	115,6
3	X	158,7
4	6,78 (d; 8,7)	115,6
5	7,38 (d; 8,7)	129,2
6	X	125,7
7	7,30 (d; 15,8)	139,2
8	6,38 (d; 15,8)	118,6
9	X	167,0

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

^d Valores atribuídos por experimentos de HMBC e HSQC.

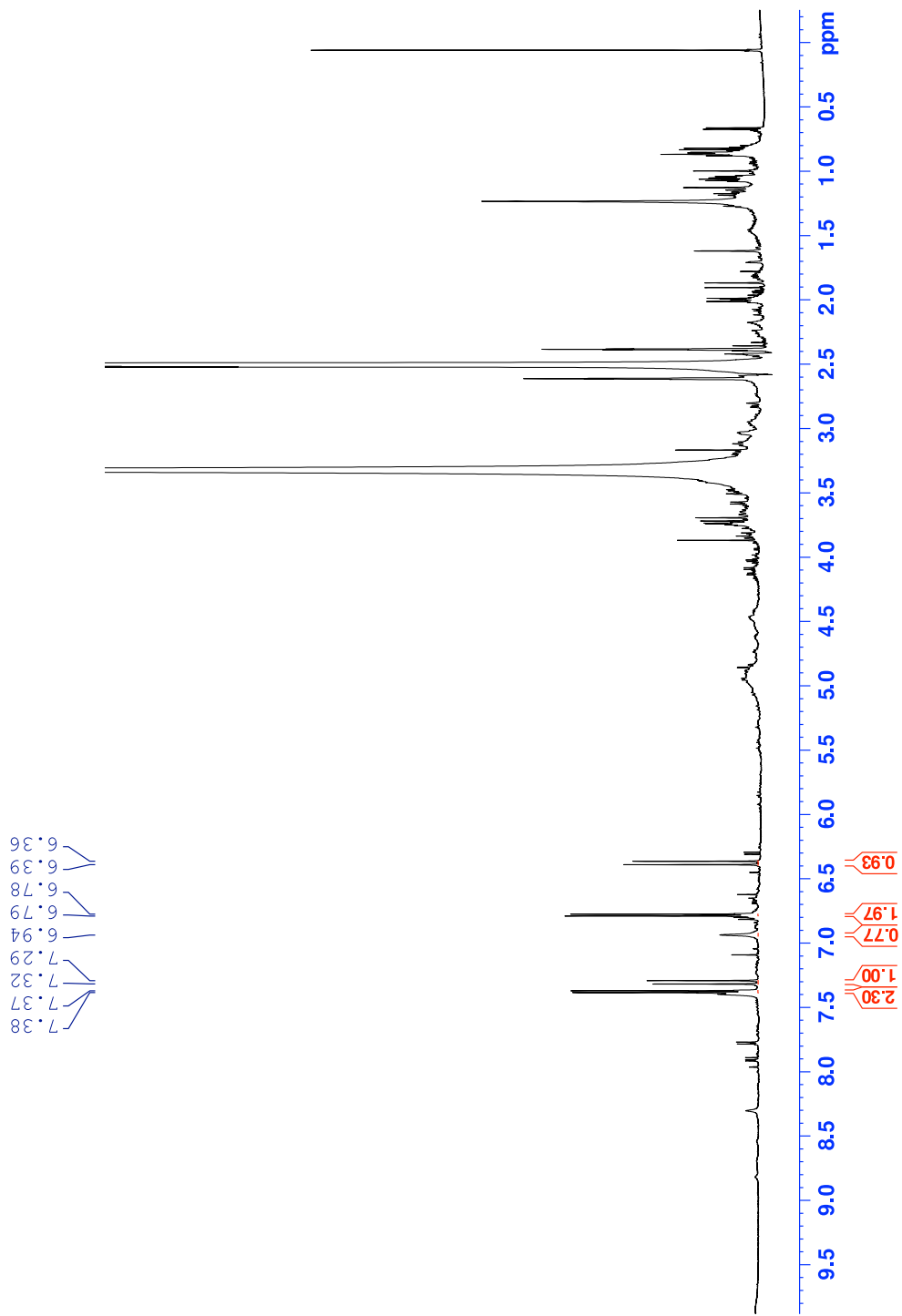


Figura 47 – Espectro de NMR de ^1H da substância 3 (600 MHz, DMSO-d_6).

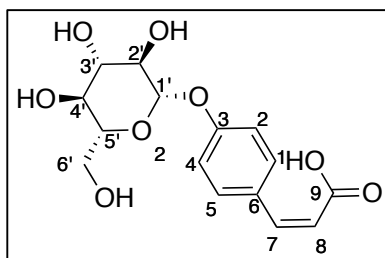


Figura 48 – Estrutura química da substância 4.

Tabela 16 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 4 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	7,66 (d; 8,8)	131,2
2	6,98 (d; 8,8)	115,5
3	X	157,5
4	6,98 (d; 8,8)	115,5
5	7,66 (d; 8,8)	131,2
6	X	129,0
7	6,62 (d; 12,9)	114,9
8	5,82 (d; 12,9)	121,6
9	X	168,4
1'	4,89 (d; 7,6)	100,1
2'	3,23 (t; 8,0)	73,2
3'	3,27 (t; 8,7)	76,6
4'	3,16 (t; 9,2)	69,7
5'	3,33 (m)	77,1
6'	3,68 (dd; 11,9; 2,0)	60,6
	3,46 (dd; 11,8; 5,6)	

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

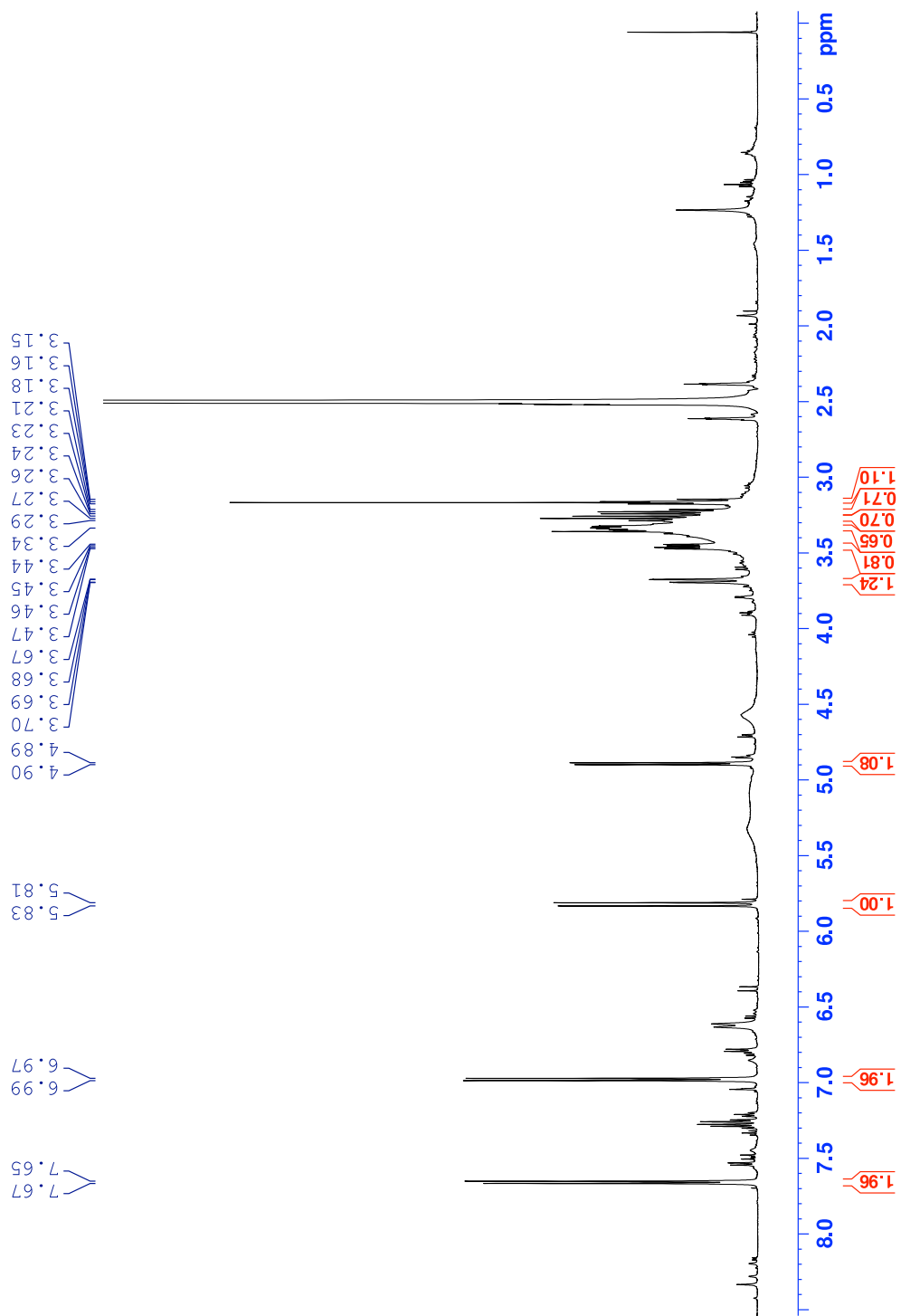


Figura 49 – Espectro de NMR de ^1H da substância 4 (600 MHz, DMSO-d_6).

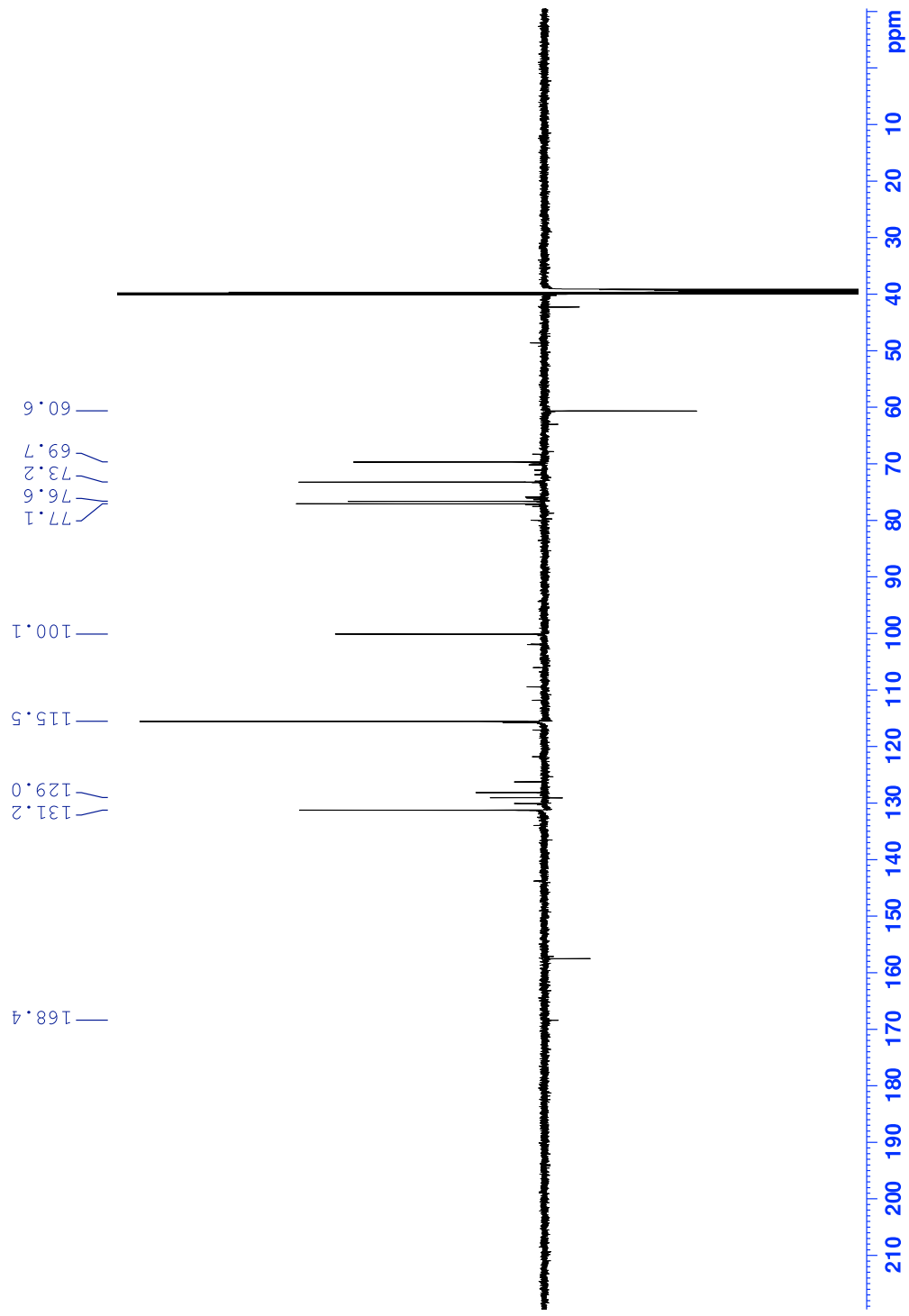


Figura 50 – Espectro de NMR de DEPTQ da a substância 4 (150 MHz, DMSO-d₆).

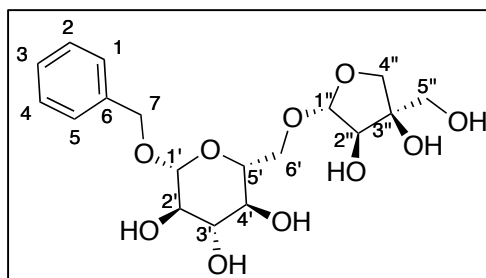


Figura 51 – Estrutura química da substância 5.

Tabela 17 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 5 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	7,40 (omm,7,3; 1,3)	127,8
2	7,34 (oom, 7,2; 1,3)	128,1
3	7,28 (oomm, 7,2; 1,3)	127,4
4	7,34 (oom, 7,2; 1,3)	128,1
5	7,40 (omm,7,3; 1,3)	127,8
6	X	137,9
7	4,78 (d; 12,2) 4,57 (d; 12,2)	69,5
1'	4,21 (d; 7,7)	101,9
2'	3,04 (sobreposto)	73,4
3'	3,13 (t; 8,9)	76,6
4'	3,00 (sobreposto)	70,3
5'	3,27 (td; 8,5; 1,9)	75,7
6'	3,89 (s) 3,45 (dd; 11,0; 7,0)	67,7
1''	4,91 (d; 3,0)	109,3
2''	3,80 (s)	75,9
3''	X	78,8
4''	3,87 (s) 3,60 (d; 9,3)	73,2
5''	3,40 – 3,35 (m)	63,1

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

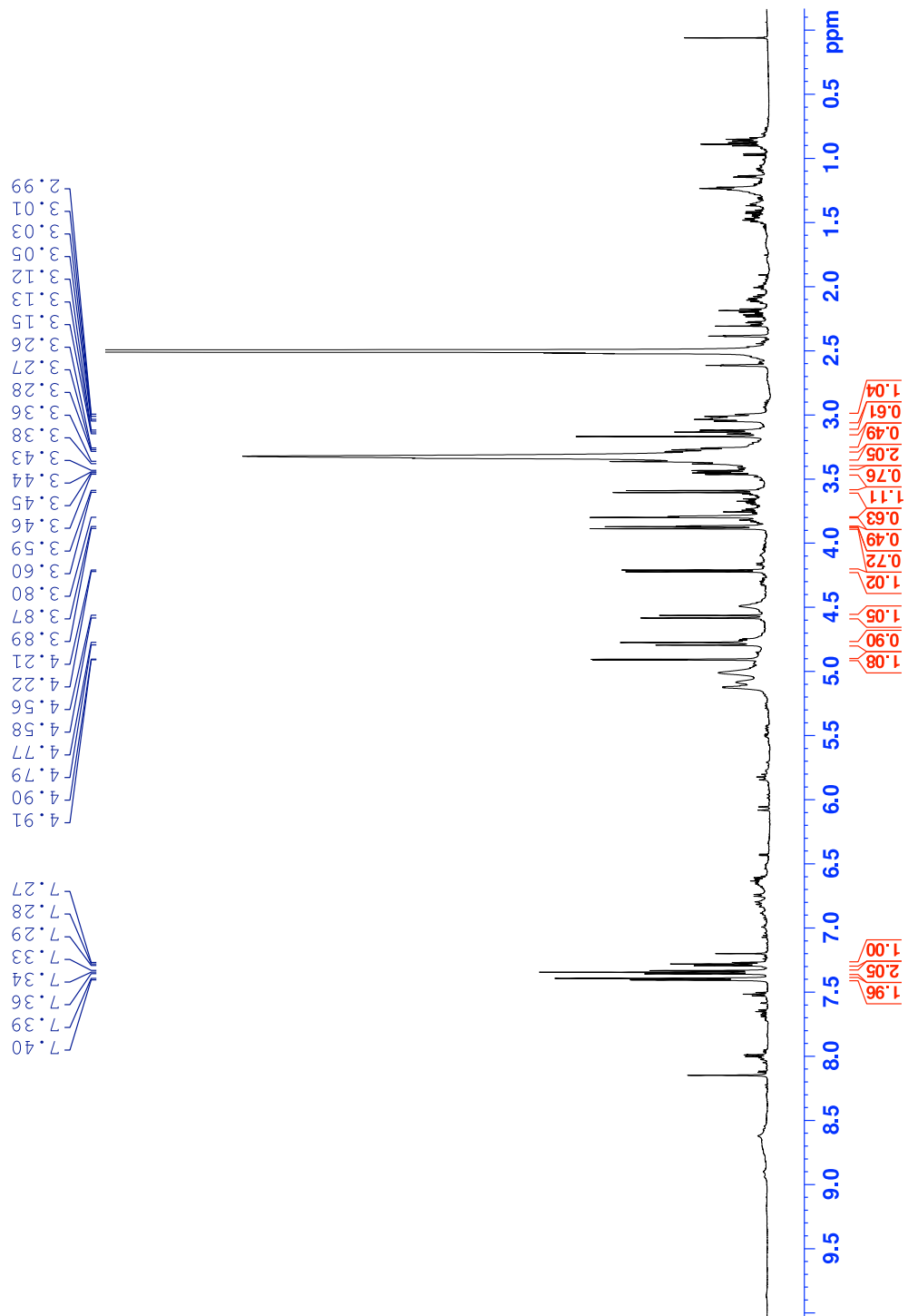


Figura 52 – Espectro de NMR de ^1H da substância 5 (600 MHz, DMSO-d_6).

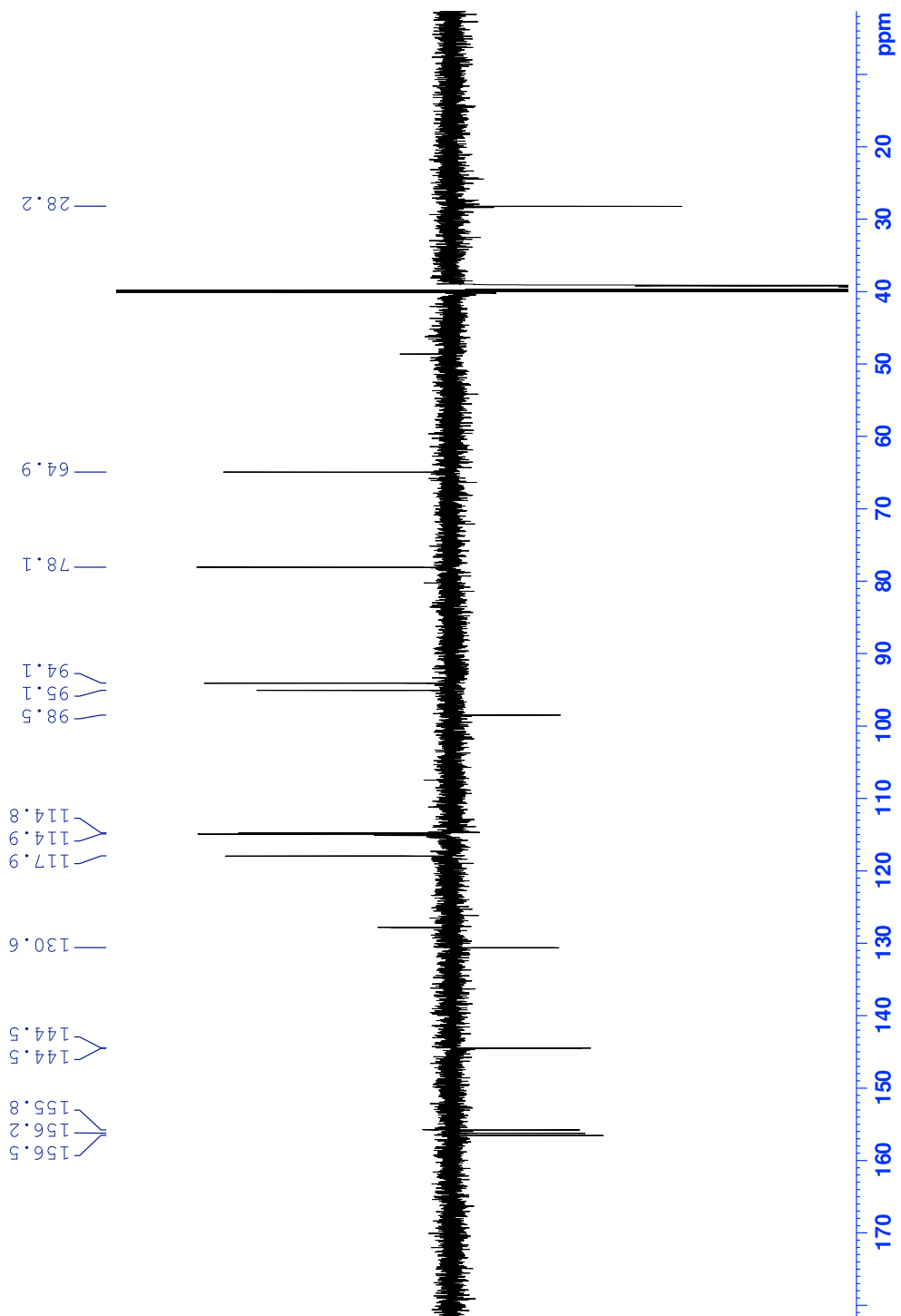


Figura 53 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 5 (150 MHz, DMSO-d₆).

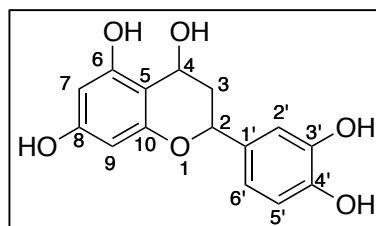


Figura 54 – Estrutura química da substância 6.

Tabela 18 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 6 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	X	X
2	4,73 (s)	78,1
3	2,67 (dd; 16,3; 4,5) 2,46 (sobrepuesto; 3,5)	28,2
4	4,00 (m)	64,9
5	X	98,5
6	X	156,5
7	5,88 (d; 2,3)	95,1
8	X	156,2
9	5,71 (d; 2,3)	94,1
10	X	155,8
1'	X	130,6
2'	6,88 (d; 1,5)	114,9
3'	X	144,4
4'	X	144,5
5'	6,66 (sl)	114,8
6'	6,65 (d; 1,5)	117,9

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

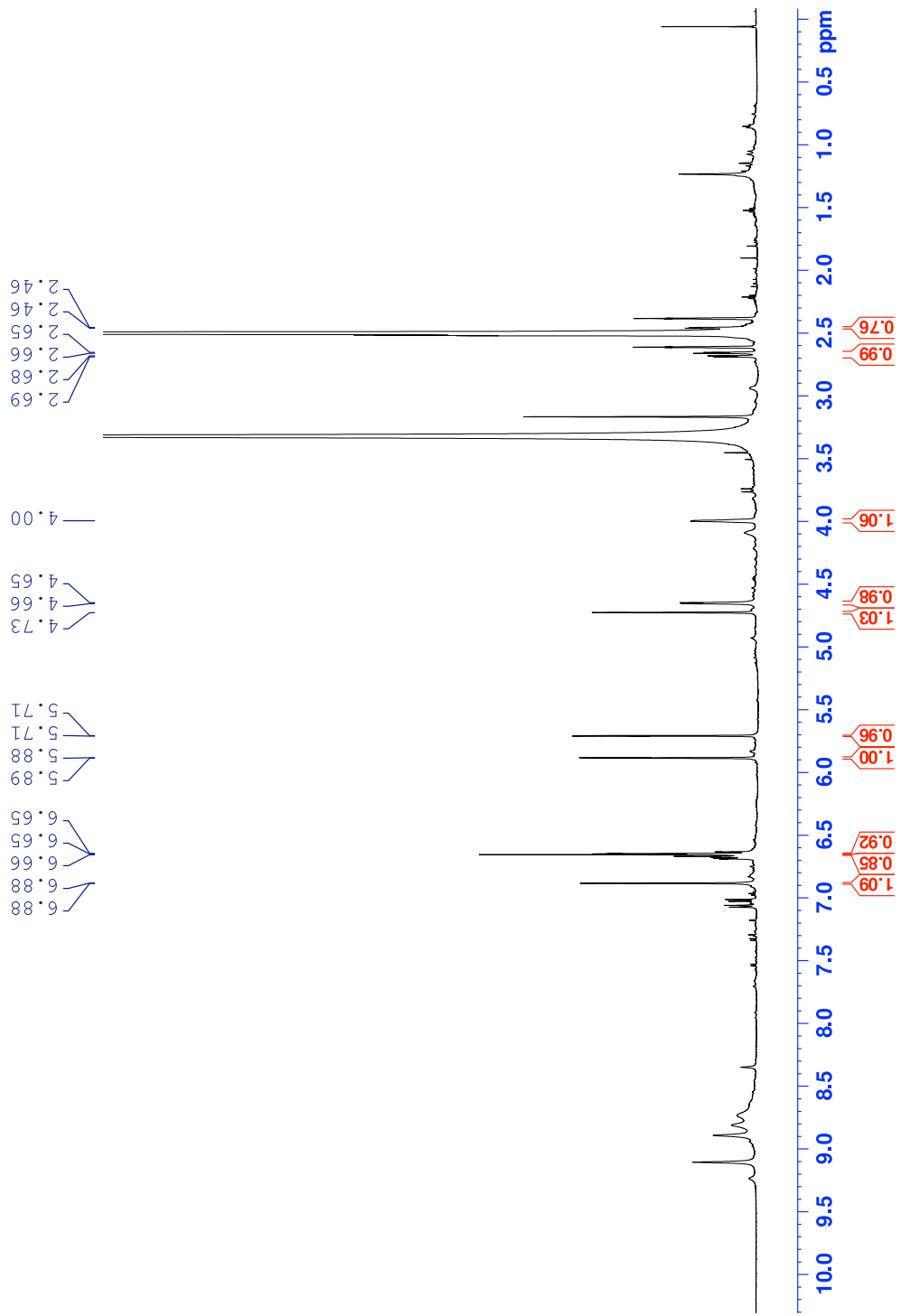


Figura 55 – Espectro de NMR de ^1H da substância 6 (600 MHz – DMSO-d_6).

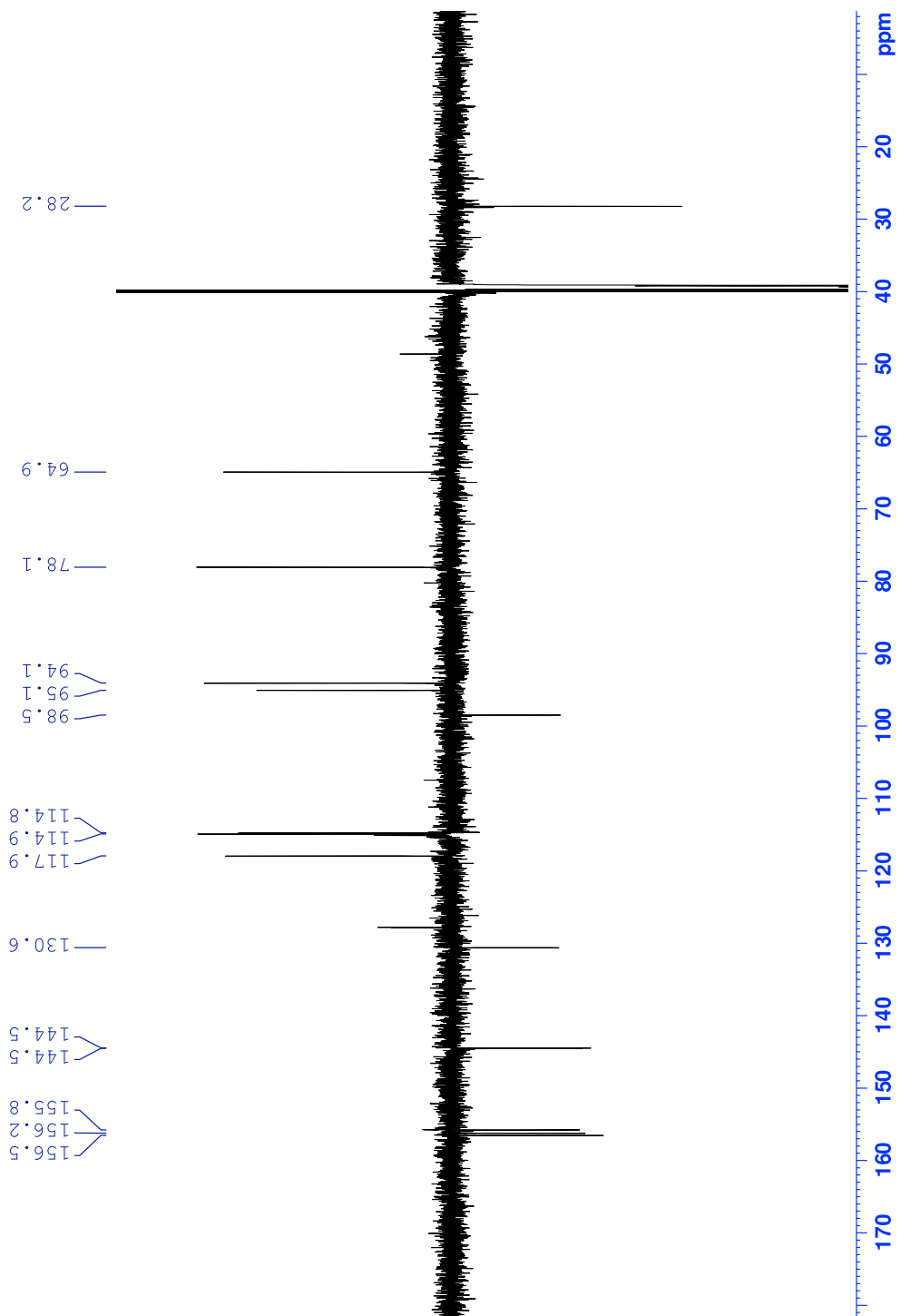


Figura 56 – Espectro de NMR de ^1H da substância 6 (150 MHz, DMSO-d_6).

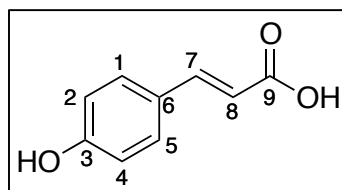


Figura 57 – Estrutura química da substância 7.

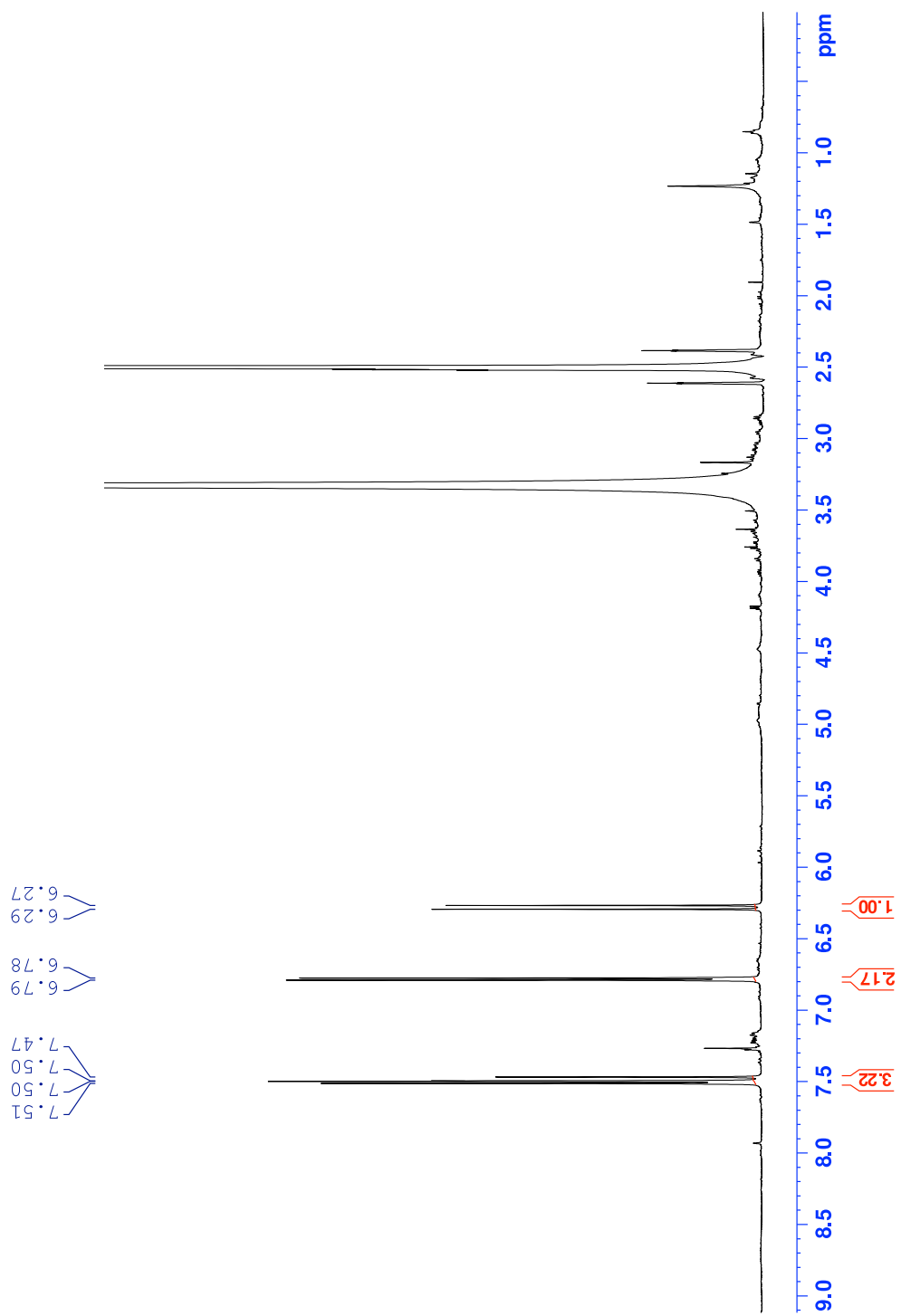
Tabela 19 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 7 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	7,51 (d; 8,7)	130,1
2	6,79 (d; 8,7)	115,7
3	X	159,6
4	6,79 (d; 8,7)	115,7
5	7,51 (d; 8,7)	130,1
6	X	125,3
7	7,48 (d; 16,0)	144,1
8	6,28 (d; 16,0)	115,4
9	X	168,0

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz



6.27
6.29
6.78
6.79
7.47
7.50
7.50
7.51

Figura 58 – Espectro de NMR de ^1H da substância 7 (600MHz, DMSO-d_6).

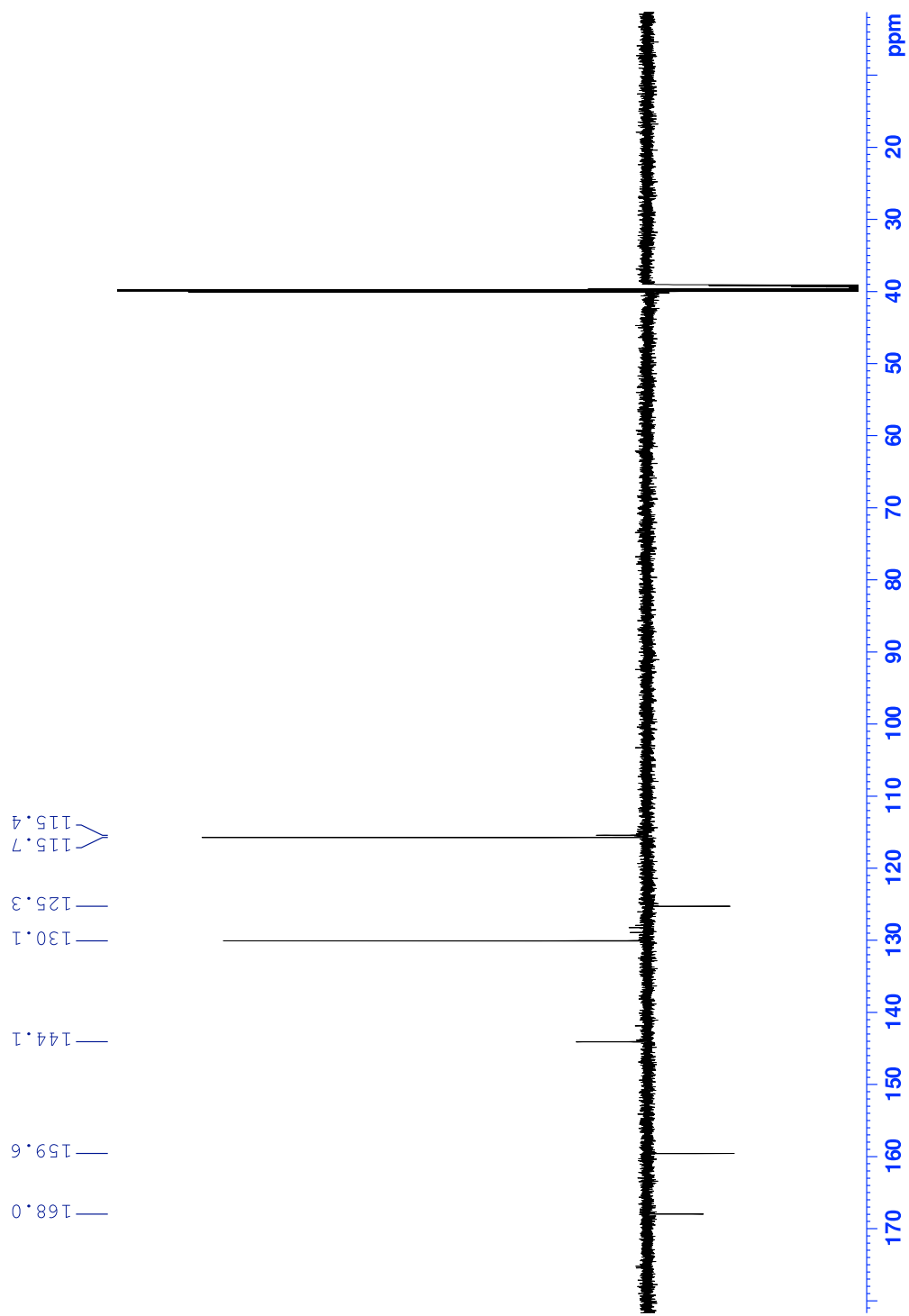


Figura 59 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 7 (600 MHz, DMSO-d₆).

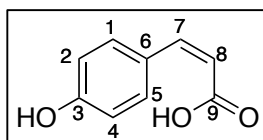


Figura 60 – Estrutura química da substância 8.

Tabela 20 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 8 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b}; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm)^d
1	7,63 (d; 8,6)	132,3
2	6,74 (d; 8,6)	114,8
3	X	158,5
4	6,74 (d; 8,6)	114,8
5	7,63 (d; 8,6)	132,3
6	X	125,8
7	6,74 (sobreposto)	141,4
8	5,72 (d; 12,9)	117,1
9	X	167,8

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz

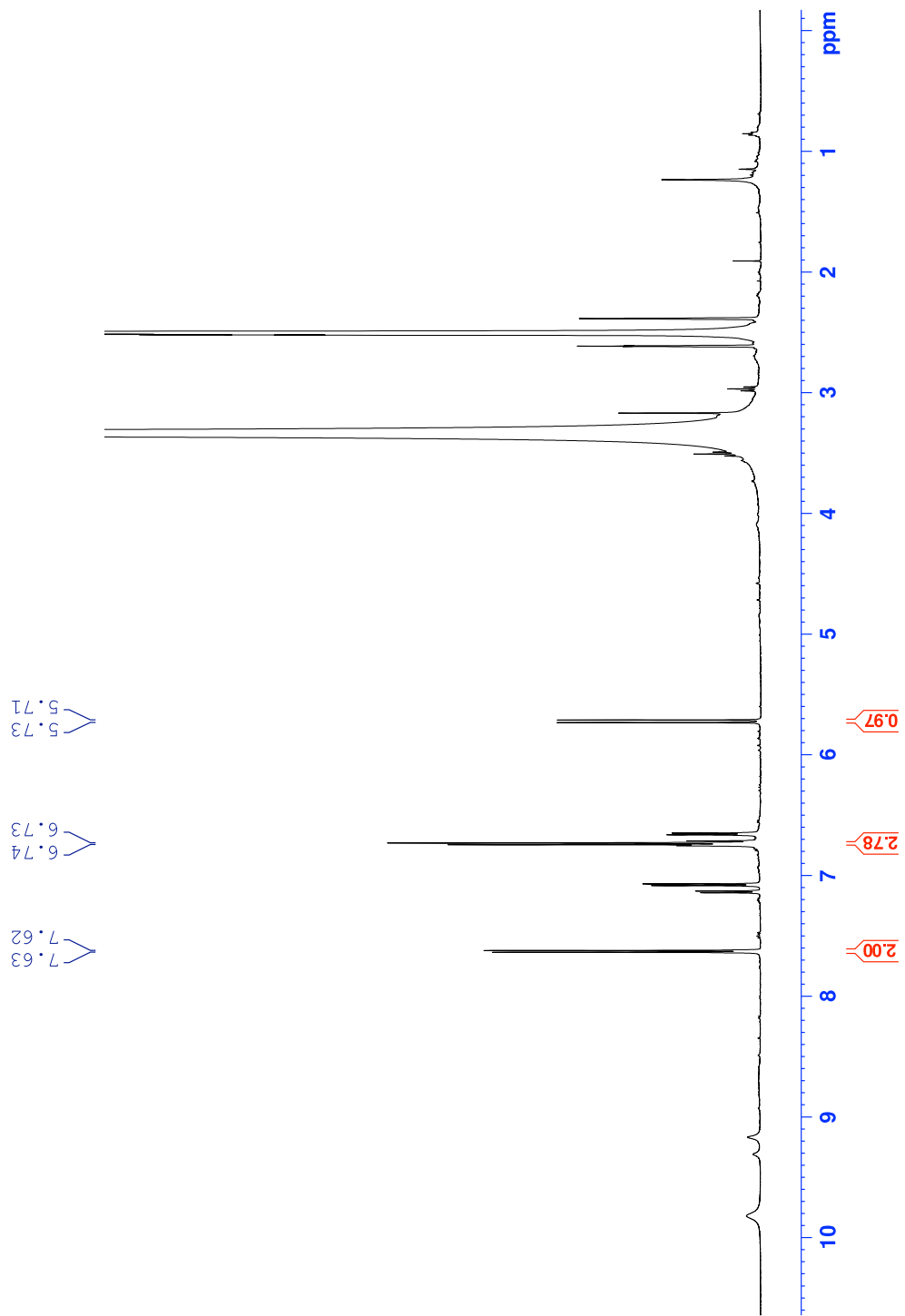


Figura 61 – Espectro de NMR de ^1H da substância 8 (600 MHz, DMSO-d_6).

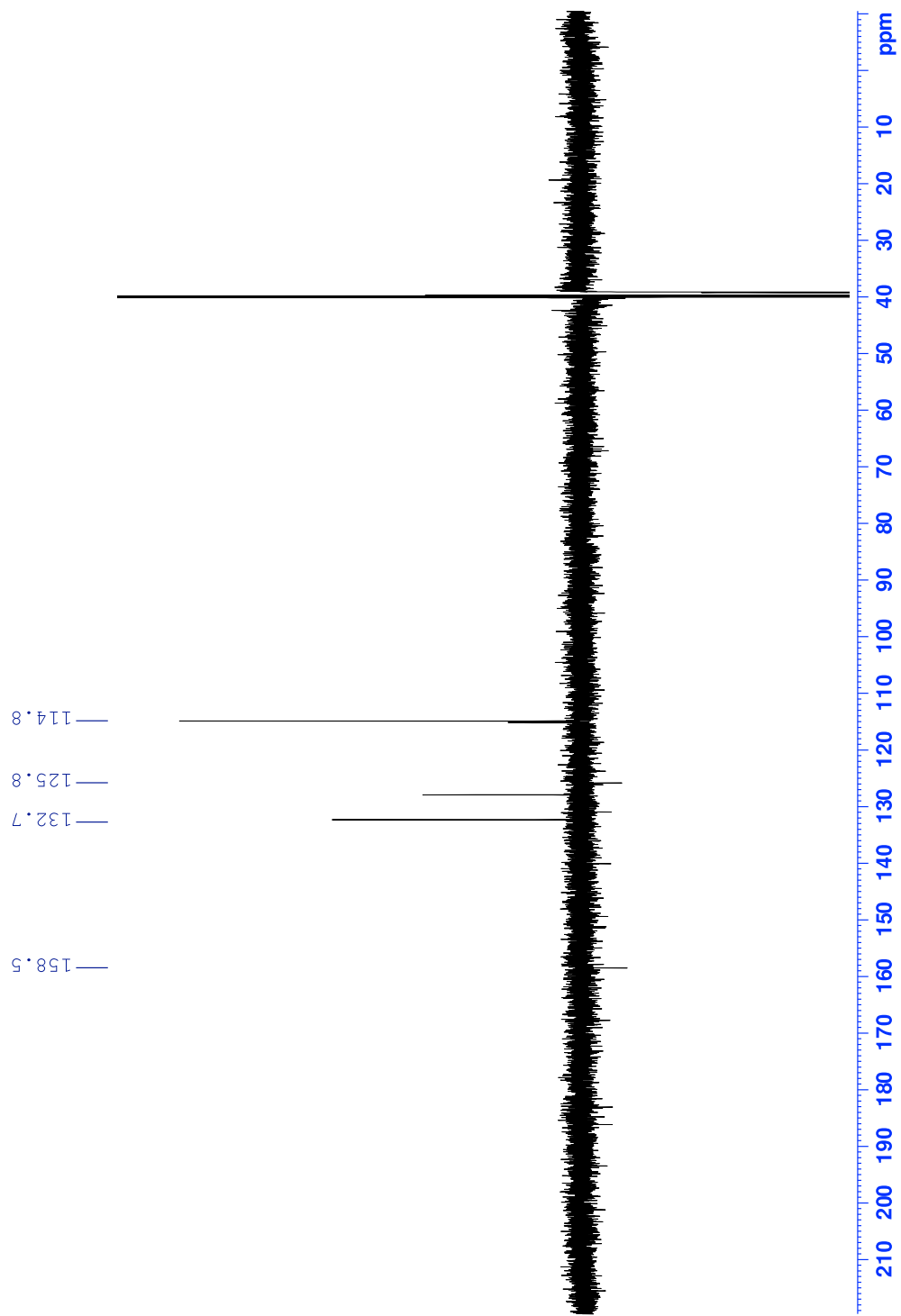


Figura 62 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 8 (150MHz, DMSO-d₆).

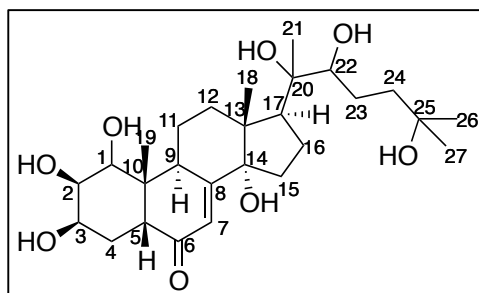


Figura 63 – Estrutura química da substância 9.

Tabela 21 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 9 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	3,62 (sl)	74,3
2	3,65 (sl)	66,6
3	3,87 (sl)	68,9
4	1,65 (m) 1,52 (sobreposto)	32,1
5	2,42 (dd; 13,0; 3,5)	45,1
6	X	202,0
7	5,65 (d; 2,2)	120,5
8	X	
9	2,95 (m)	33,8
10	X	42,1
11	1,58 – 1,54 (m)	20,4
12	1,99 (m) 1,71 (d; 12,6)	30,8
13	X	47,8
14	X	82,9
15	1,79 (m) 1,49 (sobreposto)	30,4
16	1,87 (q; 9,9) 1,54 (sobreposto)	20,2
17	2,25 (t; 8,4)	48,7
18	0,77 (s)	17,1
19	0,92 (s)	19,5
20	X	75,7
21	1,05 (sobreposto)	21,0
22	3,11 (d; 10,0)	76,2
23	1,46 (sobreposto) 1,10 (m)	26,1
24	1,63 (m) 1,25 (m)	41,4
25	X	68,7
26	1,07 (s)	30,0
27	1,05 (sobreposto)	29,0

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

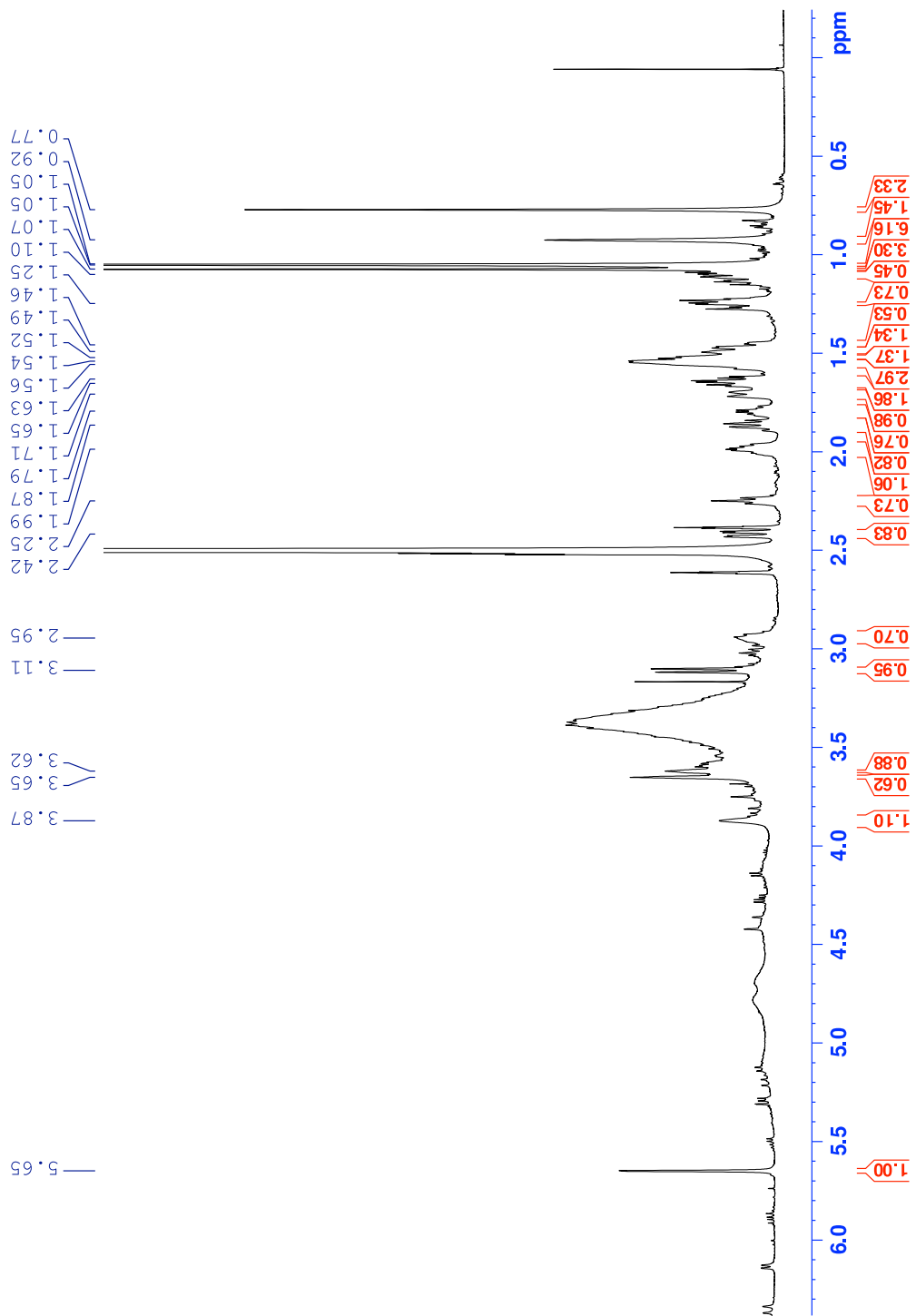


Figura 64 – Espectro de NMR de ^1H da substância 9 (600 MHz – DMSO-d_6).

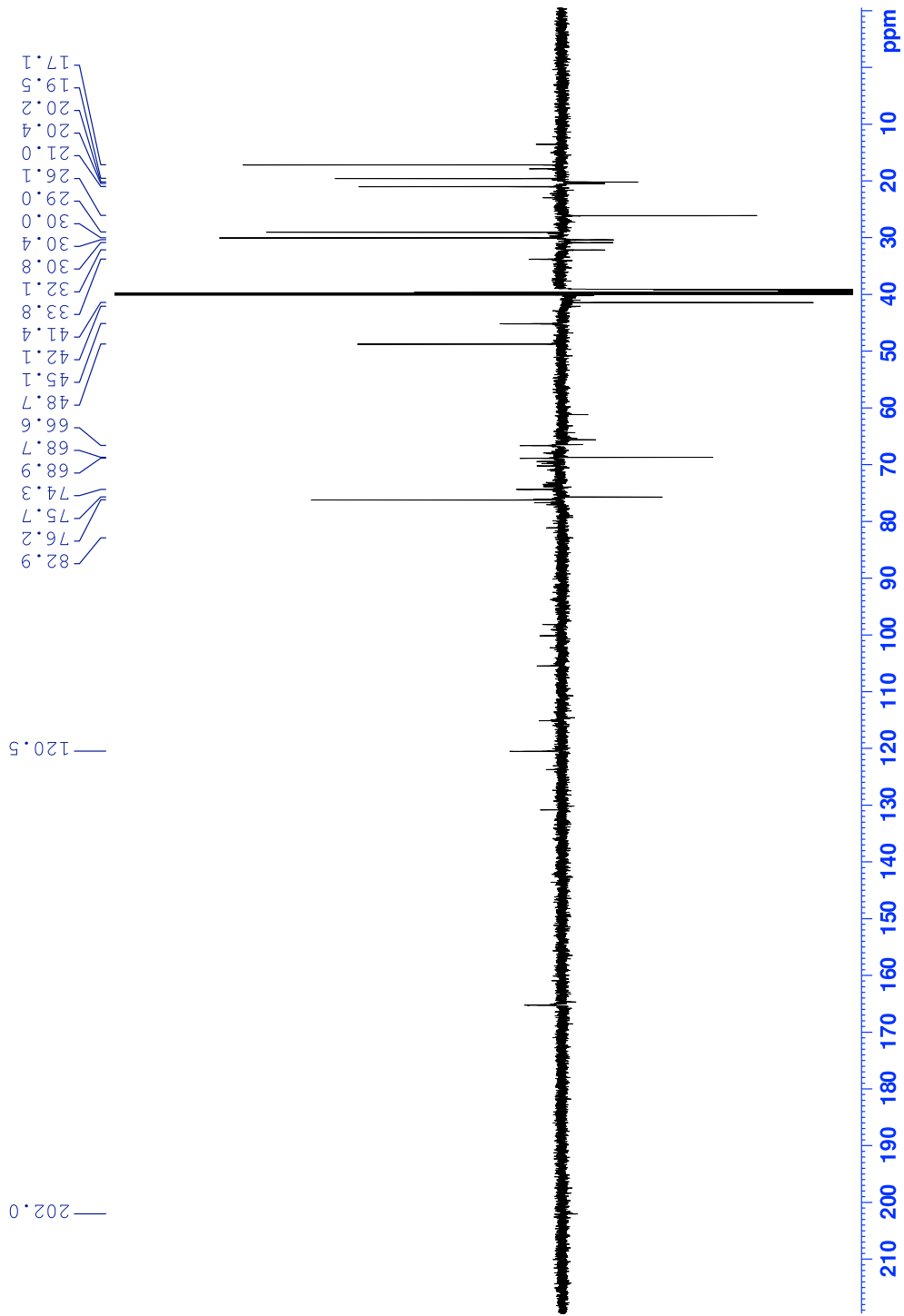


Figura 65 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 9 (150 MHz – DMSO-d₆).

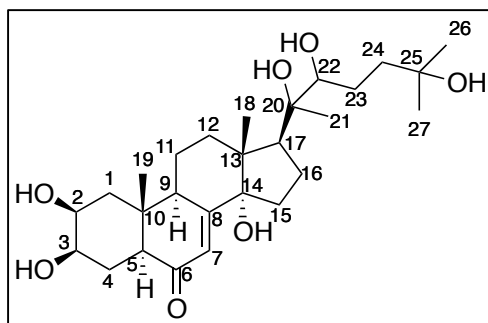


Figura 66 – Estrutura química da substância 11.

Tabela 22 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 11 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	$\alpha \rightarrow 1,43$ (dd; 14,0; 2,6) $\beta \rightarrow 1,89$ (dd; 14,0; 2,6)	42,4
2	3,73 (sl)	68,3
3	3,41 (m)	70,6
4	$\alpha \rightarrow 1,54$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,69$ (sobreposto)	23,9
5	2,20 (dd; 12,2; 3,0)	53,6
6	X	199,4
7	5,68 (d; 2,5)	121,7
8	X	164,0
9	2,59 (sobreposto)	46,2
10	X	37,5
11	$\alpha \rightarrow 1,51$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,78$ (m)	20,1
12	$\alpha \rightarrow 2,00$ (td; 12,8; 5,0) $\beta \rightarrow 1,68$ (m)	30,7
13	X	46,6
14	X	82,6
15	$\alpha \rightarrow 1,49$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,77$ (m)	30,3
16	$\alpha \rightarrow$ $\beta \rightarrow 1,85$ (sobreposto)	20,1
17	2,24 (t; 8,7)	48,7
18	0,75 (s)	17,0
19	0,88 (s)	15,1
20	X	75,6
21	1,06 (s)	20,9
22	3,11 (dd; 4,3; 10,7)	76,2
23	1,46 (sobreposto) 1,11 (sobreposto)	26,1
24	1,63 (dd; 12,6; 4,5) 1,27 (sobreposto)	41,3
25	X	68,7

26	1,07 (s)	29,9
27	1,04 (s)	29,0

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

^d Valores atribuídos por experimentos de HMBC e HSQC.

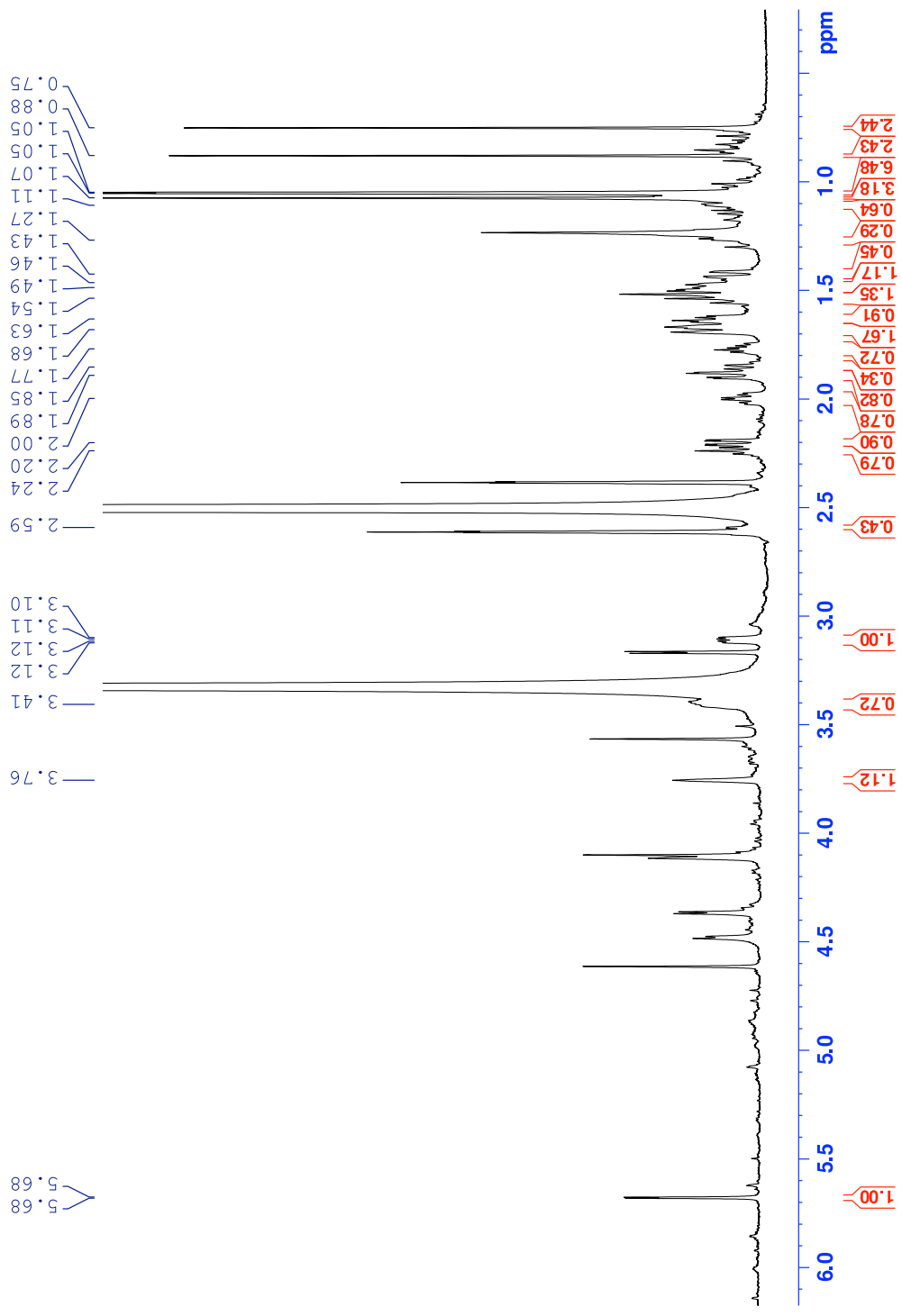


Figura 67 – Espectro de NMR de ^1H da substância 11 (600 MHz – DMSO-d_6).

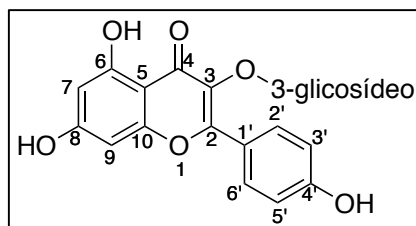


Figura 68 – Estrutura química da substância 12.

Tabela 23 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 12 (NMR 14,1 T – DMSO-d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	X	X
2	X	156,4
3	X	133,3
4	X	
5	X	103,7
6	X	161,1
7	6,18 (d; 1,8)	98,7
8	X	164,5
9	6,40 (d; 1,8)	93,6
10	X	156,4
1'	X	120,7
2'	8,05 (d; 8,9)	130,9
3'	6,86 (d; 8,9)	115,0
4'	X	159,0
5'	6,86 (d; 8,9)	115,0
6'	8,05 (d; 8,9)	130,9

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

^d Valores atribuídos por experimentos de HMBC e HSQC.

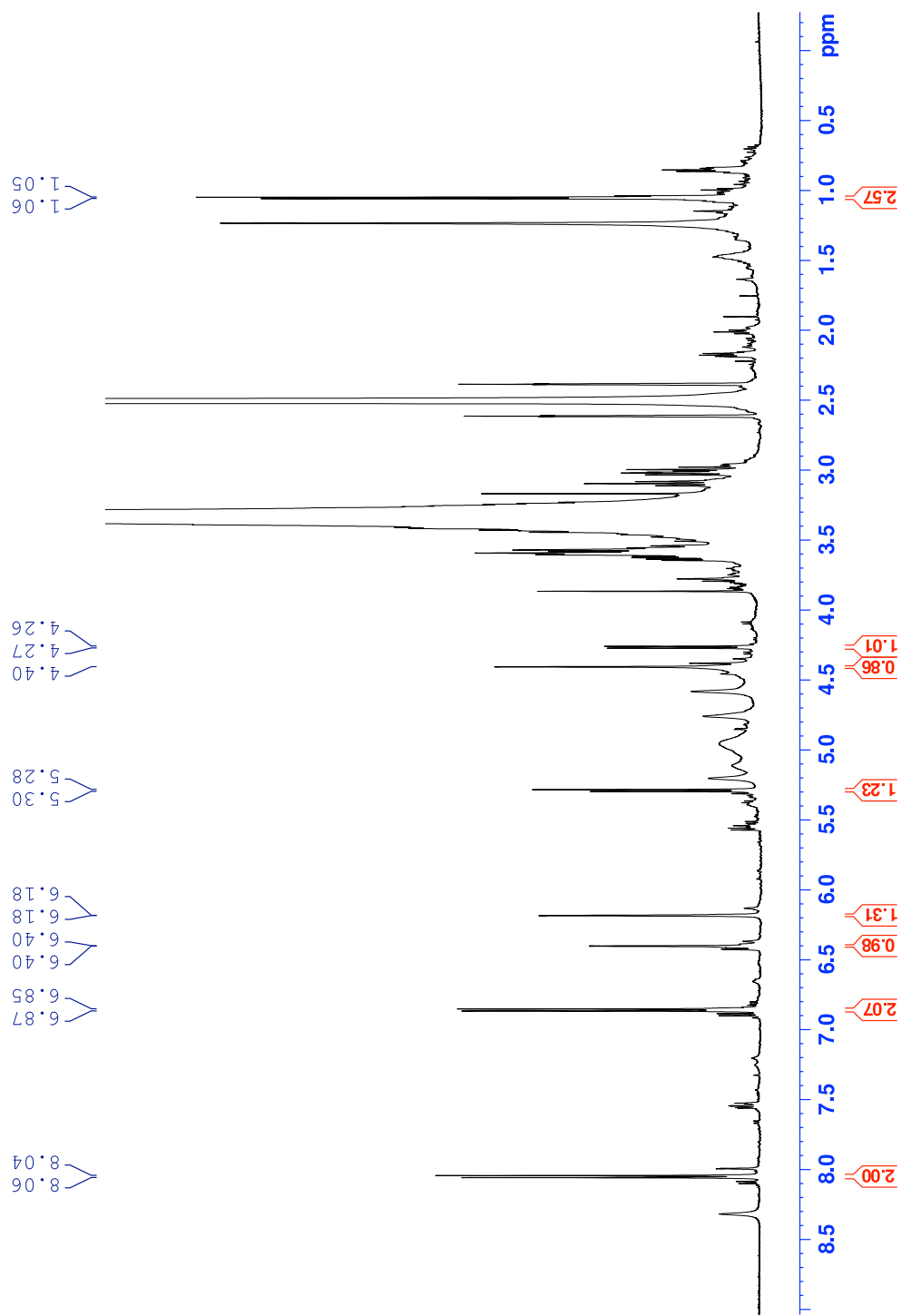


Figura 69 – Espectro de NMR de ^1H da substância 12 (600 MHz – DMSO-d_6).

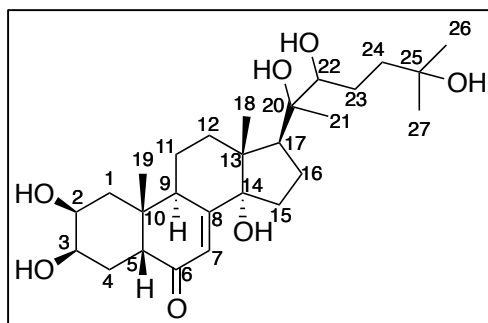


Figura 70 – Estrutura química da substância 13.

Tabela 24 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 13 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	$\alpha \rightarrow 1,61$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,27$ (sobreposto)	36,7
2	3,58 (sl)	66,8
3	3,76 (sl)	66,6
4	$\alpha \rightarrow 1,46$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,59$ (sobreposto)	31,6
5	2,20 (dd; 13,0; 4,0)	50,1
6	X	202,6
7	5,63 (d; 2,3)	120,5
8	X	165,1
9	3,01 (m)	33,2
10	X	37,7
11	$\alpha \rightarrow 1,65$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,53$ (sobreposto)	20,1
12	$\alpha \rightarrow 2,02$ (td; 12,8; 4,7) $\beta \rightarrow 1,73$ (d; 12,8)	30,9
13	X	46,9
14	X	83,1
15	$\alpha \rightarrow 1,49$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,78$ (td; 11,0; 6,0)	30,3
16	$\alpha \rightarrow 1,57$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,86$ (t; 9,5)	20,3
17	2,26 (t; 8,7)	48,7
18	0,76 (s)	17,2
19	0,83 (s)	23,9
20	X	75,7
21	1,06 (s)	21,2
22	3,11 (d; 10,5)	76,2
23	1,47 (sobreposto) 1,12 (td; 12,0; 4,0)	26,2
24	1,64 (td; 12,5; 4,3) 1,24 (sobreposto)	41,1
25	X	68,7

26	1,05 (s)	29,0
27	1,08 (s)	30,0

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

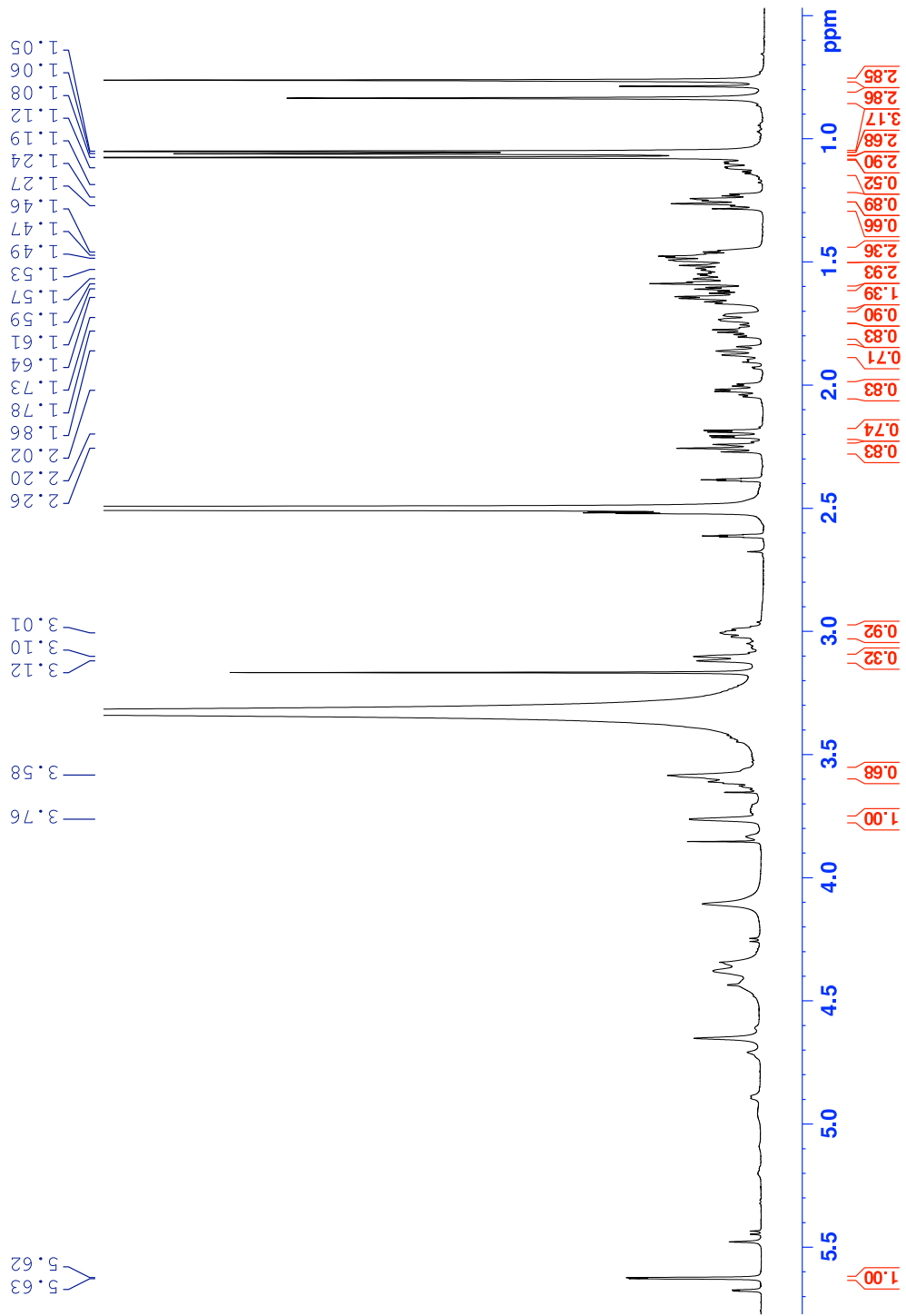


Figura 71 – Espectro de NMR de ^1H da substância 13 (600 MHz – DMSO-d_6).

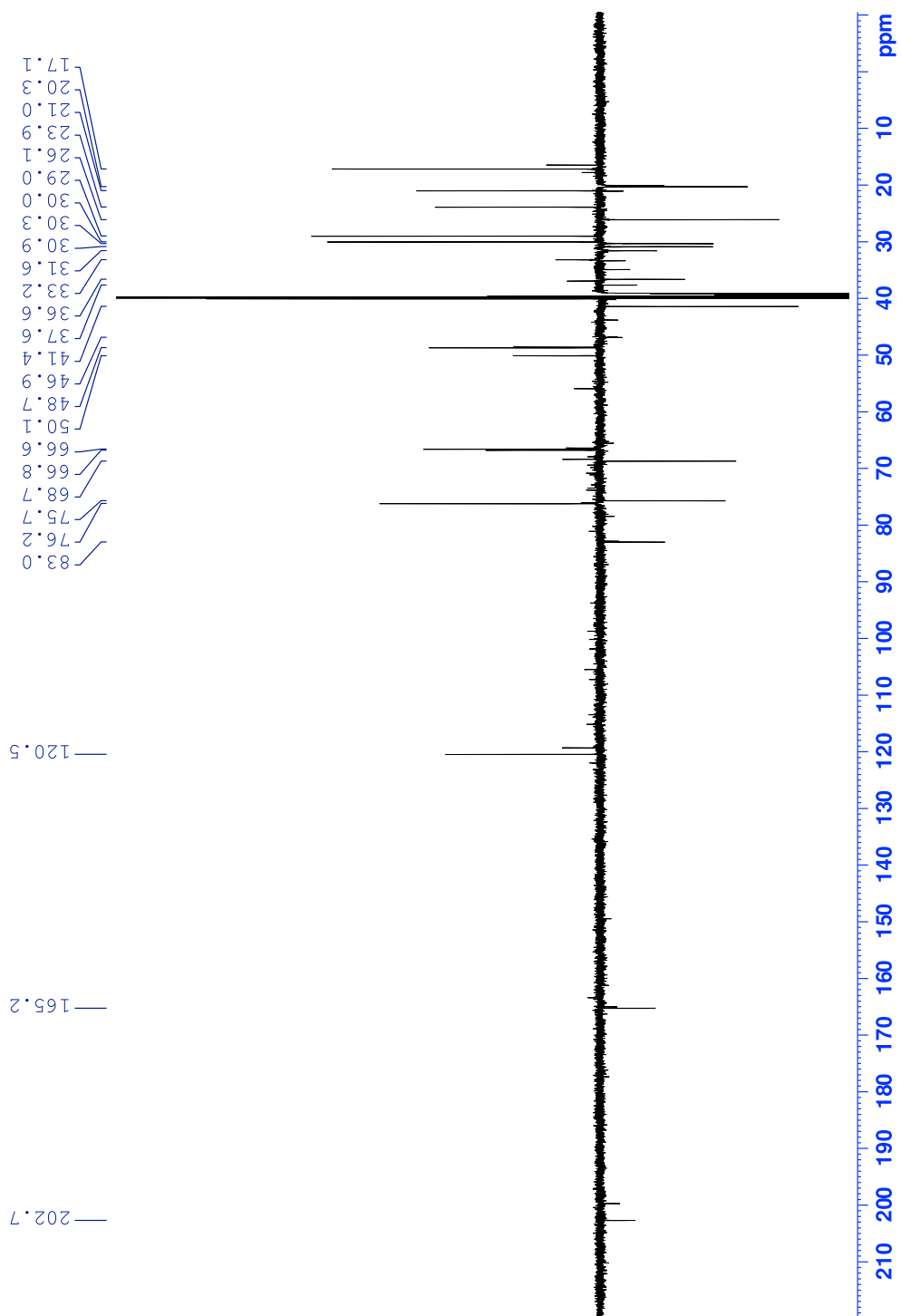


Figura 72 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 13 (150 MHz, DMSO-d₆).

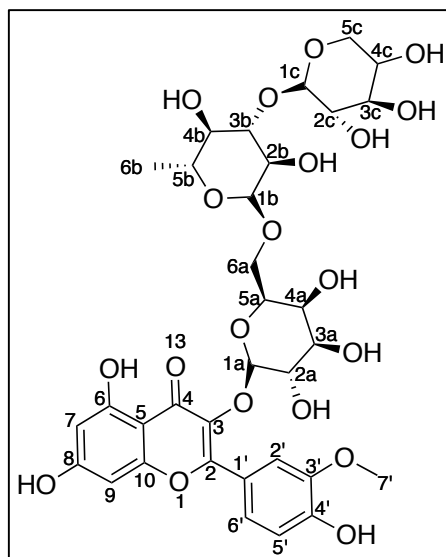


Figura 73 – Estrutura química da substância 14.

Tabela 25 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 14 (NMR 14,1 T – MeOD).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	X	X
2	X	159,0
3	X	135,5
4	X	179,5
5	X	105,7
6	X	163,1
7	6,23 (sl)	100,0
8	X	166,1
9	6,43 (sl)	94,9
10	X	158,6
1'	X	123,0
2'	8,05 (d; 1,5)	114,7
3'	X	148,4
4'	X	150,9
5'	6,91 (d; 8,3)	116,0
6'	7,62 (d; 8,3)	123,9
7'	3,98 (s)	57,0
1a	5,21 (d; 8,0)	104,9
2a	7,83 (t; 8,8)	73,1
3a	3,59 (sobreposto)	75,1
4a	3,74 (sobreposto)	71,8
5a	3,67 (sobreposto)	75,7
6a	3,72 (sobreposto)	68,0
1b	4,54 (sl)	102,0
2b	3,77 (sobreposto)	70,1
3b	3,54 (sobreposto)	82,4
4b	3,42 (m)	72,7

5b	3,58 (sobreposto)	65,9
6b	1,15 (d; 6,0)	18,0
1c	4,30 (d; 7,5)	106,5
2c	3,22 (dd; 8,5; 7,6)	75,2
3c	3,28 (sobreposto)	77,6
4c	3,46 (m)	71,1
5c	3,77 (sobreposto)	66,9
	3,09 (t; 11,0)	

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

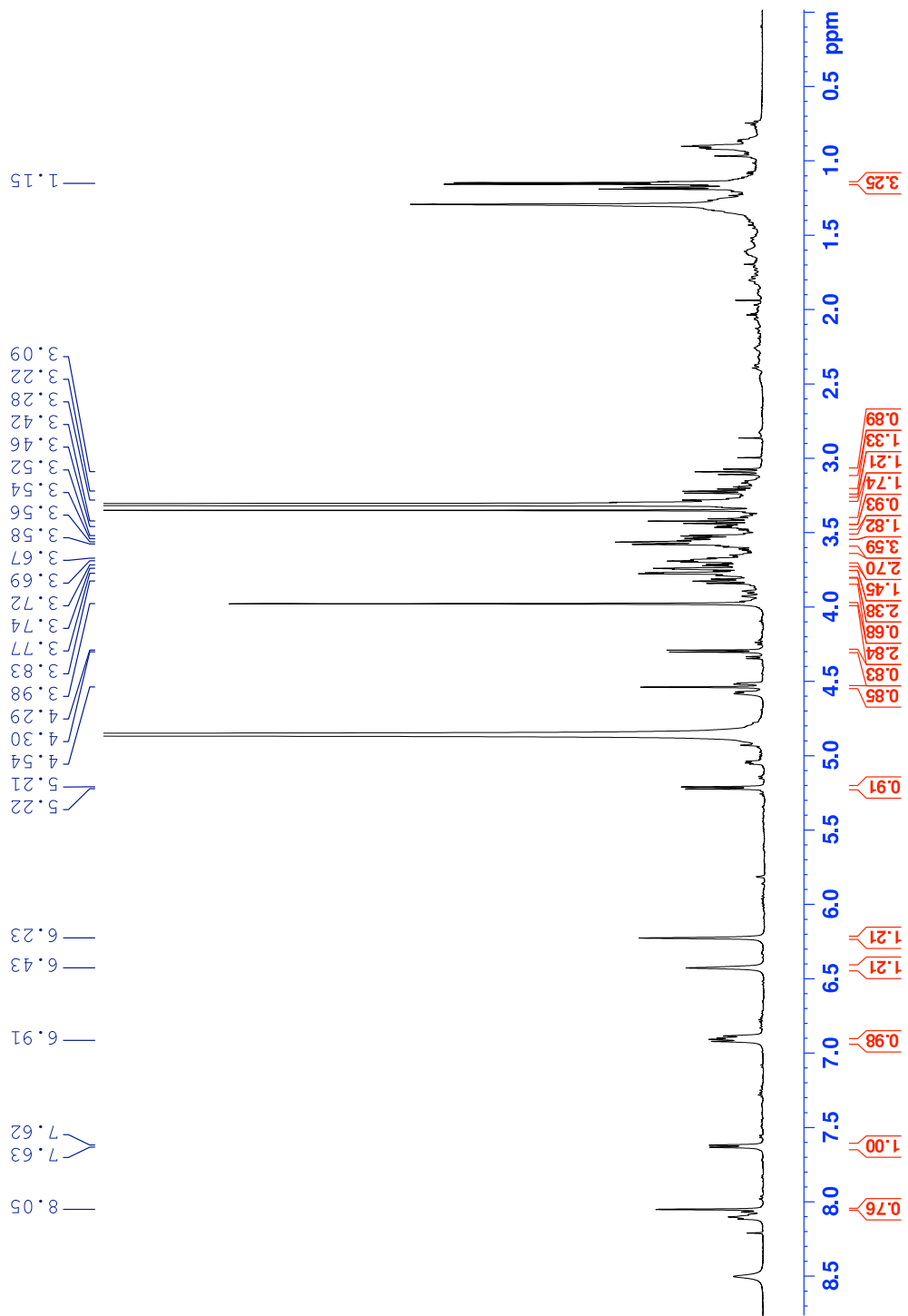


Figura 74 – Espectro de NMR de ^1H da substância 14 (600 MHz – MeOD).

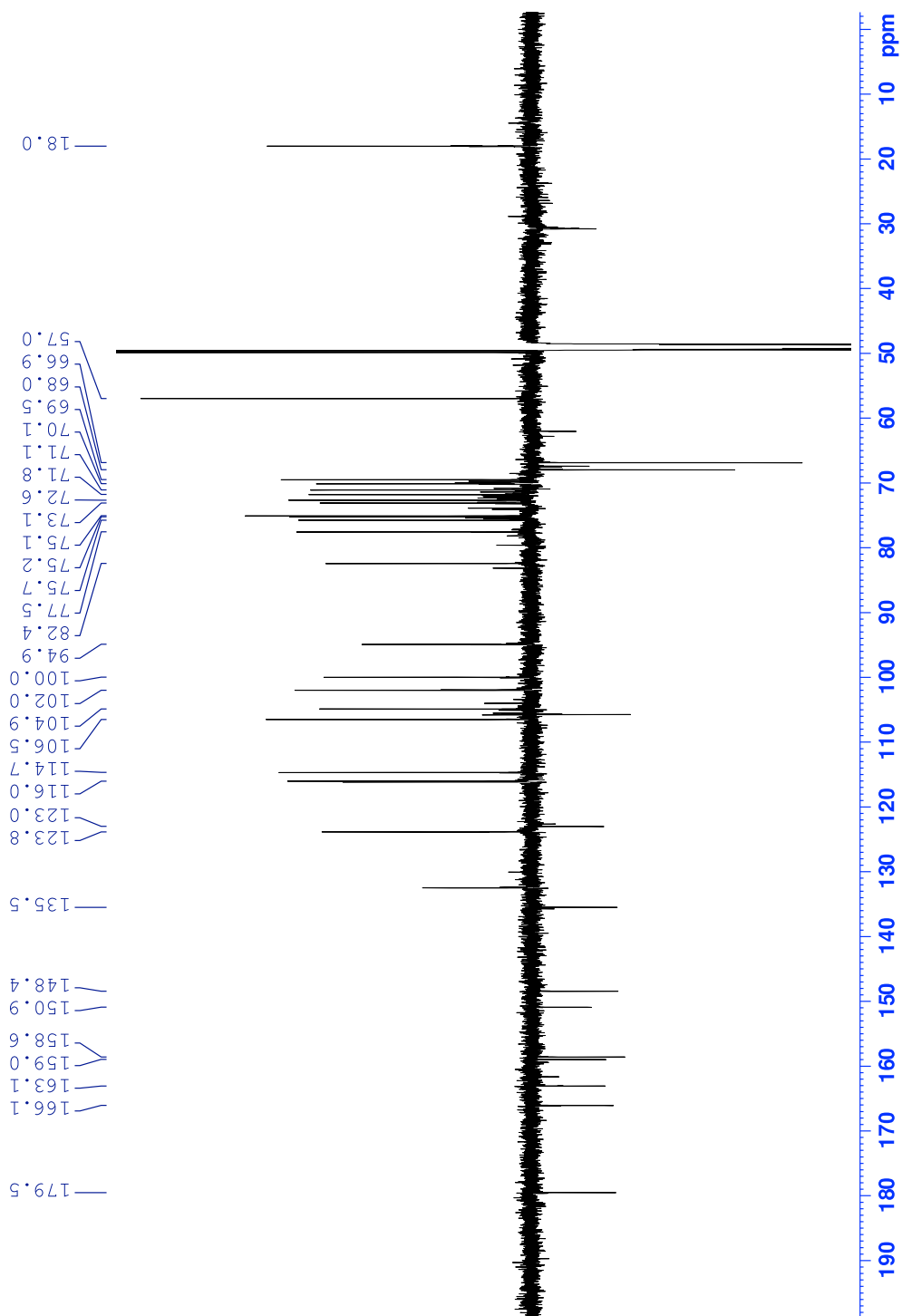


Figura 75 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 14 (150 MHz – MeOD).

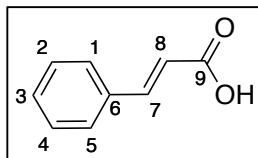


Figura 76 – Estrutura química da substância 16.

Tabela 26 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 16 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	7,67 (om; 6,8; 2,0)	128,2
2	7,41 (m)	128,9
3	7,42 (m)	130,1
4	7,41 (m)	128,9
5	7,67 (om; 6,8; 2,0)	128,2
6	X	134,3
7	7,57 (d; 16,0)	143,6
8	6,52 (d; 16,0)	119,6
9	X	167,7

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

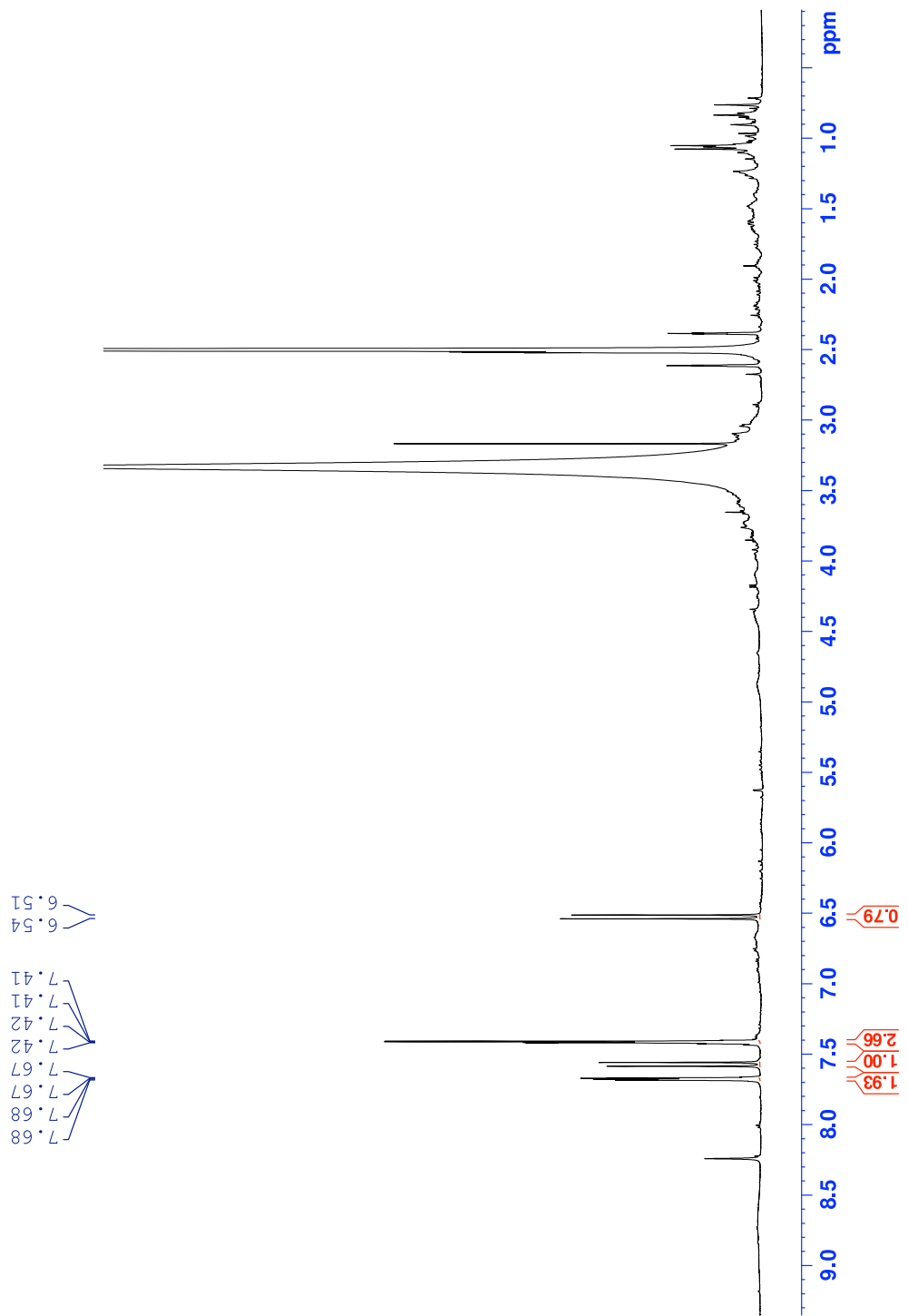


Figura 77 – Espectro de NMR de ¹H da substância 16 (600 MHz, DMSO-d₆).

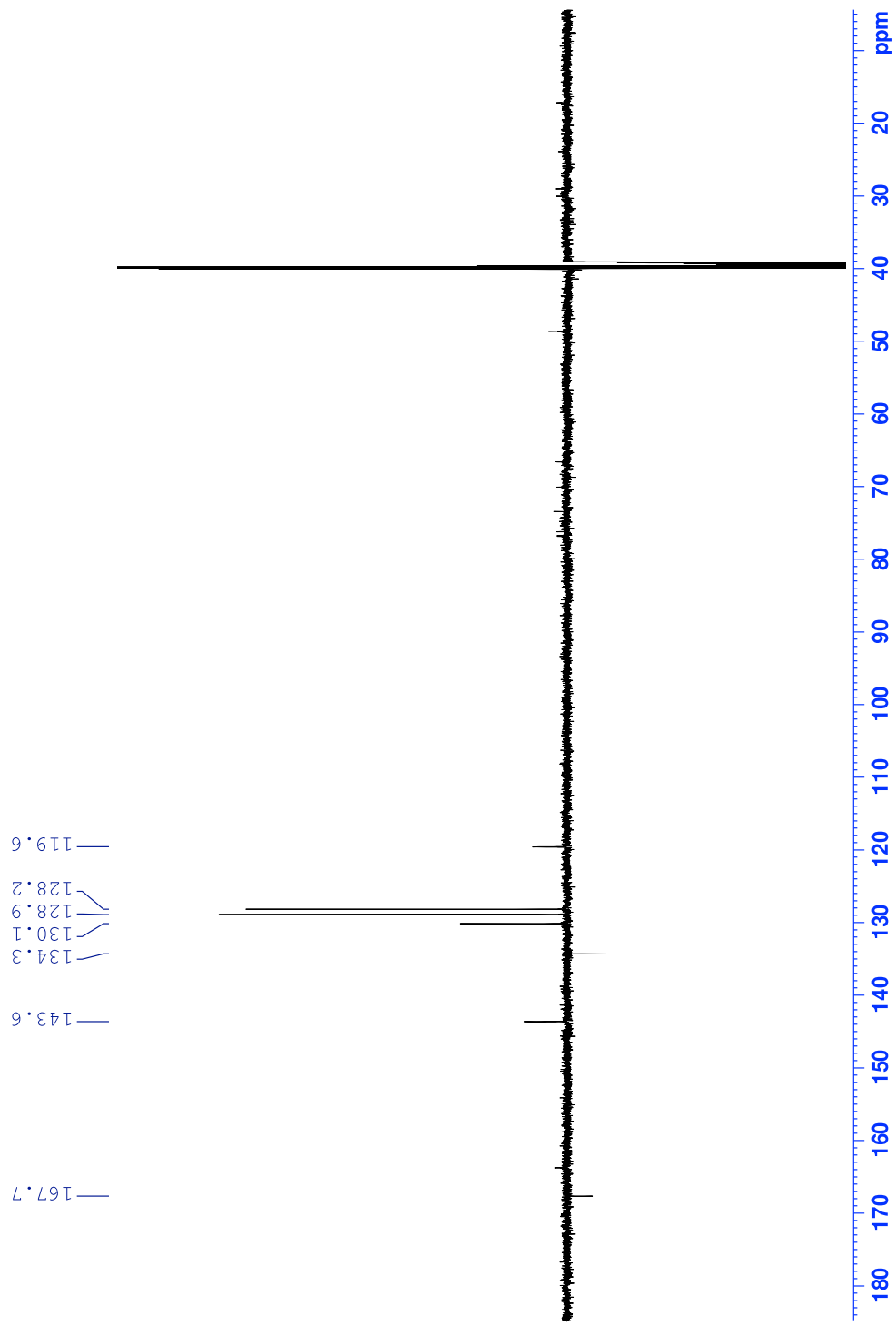


Figura 78 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 16 (150 MHz, DMSO-d₆).

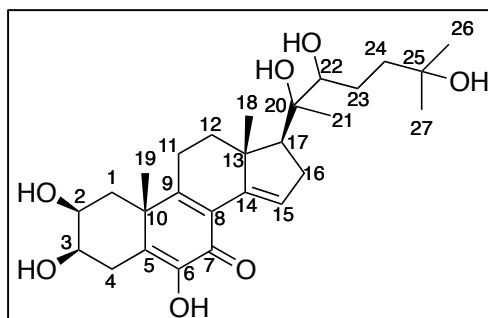


Figura 79 – Estrutura química da substância 18.

Tabela 27 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 18 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm) ^d
1	$\alpha \rightarrow 2,28$ (dd; 14,0; 2,5) $\beta \rightarrow 1,23$ (dd; 10,3; 4,5)	41,5
2	3,83 (sl)	68,1
3	3,33 (sobreposto)	71,9
4	$\alpha \rightarrow 2,39$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 2,91$ (12,0; 4,5)	26,8
5	X	132,5
6	X	142,5
7	X	179,4
8	X	122,8
9	X	163,7
10	X	
11	$\alpha \rightarrow 1,63$ (dd; 11,5; 4,5) $\beta \rightarrow 1,27$ (sobreposto)	41,4
12	$\alpha \rightarrow 1,43$ (m) $\beta \rightarrow 2,18$ (d; 12,0)	35,9
13	X	46,1
14	X	141,2
15	6,77 (sl)	125,8
16	$\alpha \rightarrow 2,64$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 2,13$ (ddd; 16,0; 7,5; 3,5)	31,2
17	1,84 (dd; 10,5; 8,0)	54,6
18	0,98 (s)	17,7
19	1,40 (s)	27,0
20	X	74,9
21	1,13 (s)	20,1
22	3,17 (sl)	76,4
23	1,46 (m) 1,11 (sobreposto)	26,0
24	1,67 (dd; 13,0; 4,4) 1,48 (sobreposto)	41,4
25	X	68,6
26	1,07	29,8
27	1,04	28,9

- ^a Deslocamentos químicos em ppm.
- ^b multiplicidade (m).
- ^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.
- ^d Valores atribuídos por experimentos de HMBC e HSQC.

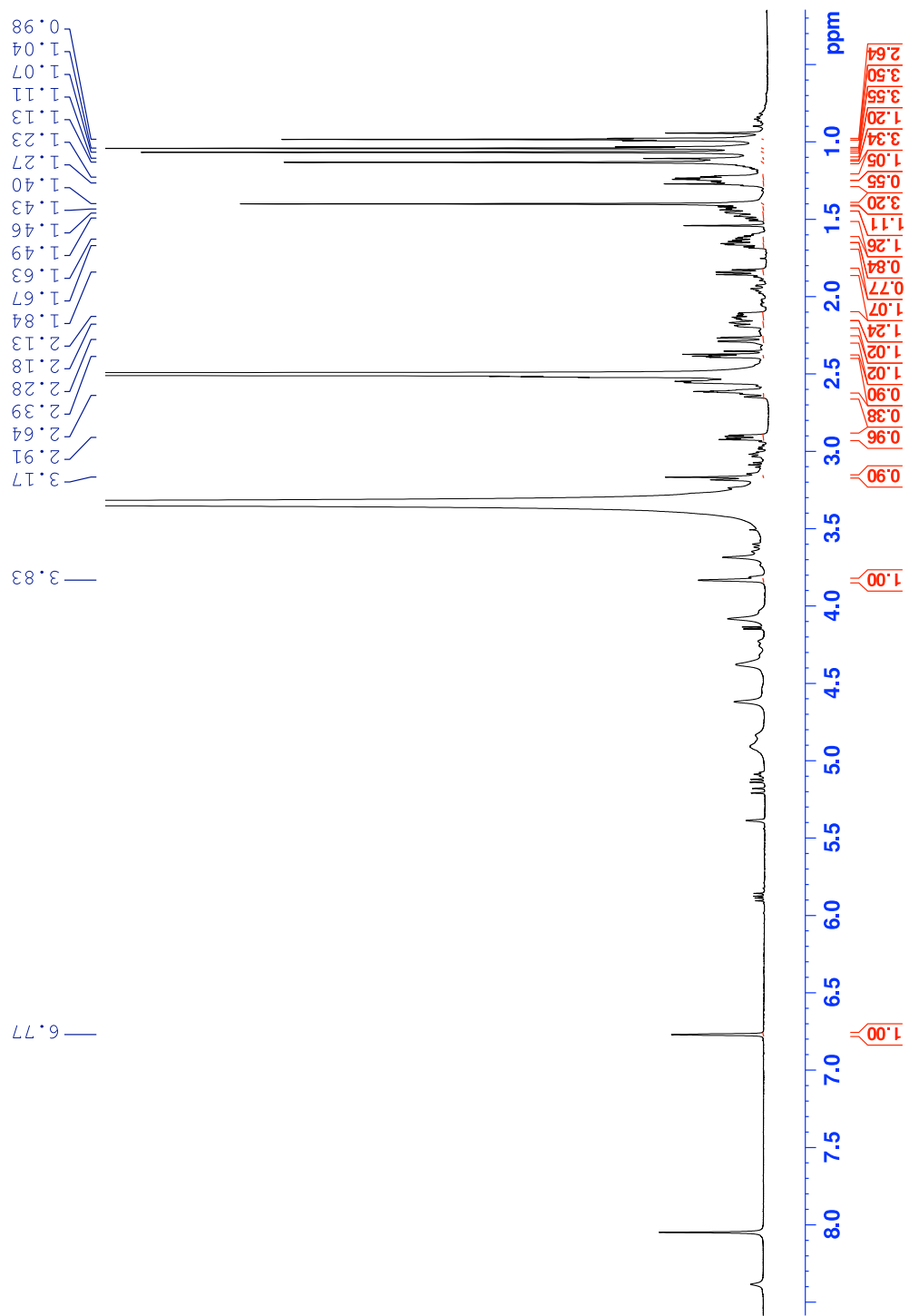


Figura 80 – Espectro de NMR de ^1H da substância 18 (600 MHz – DMSO-d_6).

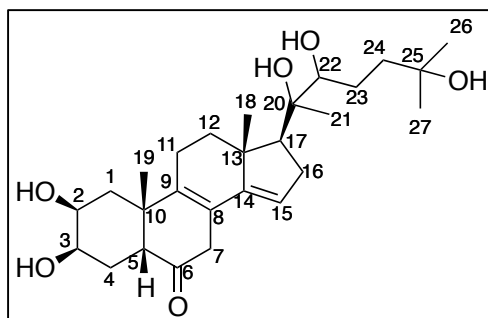


Figura 81 – Estrutura química da substância 19.

Tabela 28 – Valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C obtidos para a substância 19 (NMR 14,1 T – DMSO- d_6).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (600 MHz) (m^{b} ; J^{c})	δ_{C} (150 MHz) (ppm)
1	$\alpha \rightarrow 1,74$ (dd; 13,0; 3,0) $\beta \rightarrow 1,43$ (sobreposto)	37,2
2	3,24	68,1
3	3,74 (sl)	66,6
4	$\alpha \rightarrow 1,50$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 1,59$ (td; 13,0; 1,7)	31,8
5	2,30 (dd; 12,6; 4,0)	52,2
6	X	212,0
7	3,38 – 3,23 (sobreposto)	38,5
8	X	121,7
9	X	135,4
10	X	42,5
11	2,23 – 1,21 (sobreposto)	22,0
12	$\alpha \rightarrow 1,47$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 2,15$ (dd; 12,8; 4,4)	36,5
13	X	45,6
14	X	148,0
15	5,39 (sl)	118,9
16	$\alpha \rightarrow 2,56$ (sobreposto) $\beta \rightarrow 2,04$ (ddd; 16,5; 7,5; 3,2)	30,4
17	1,89 (dd; 11,0; 7,5)	55,8
18	0,97 (s)	18,0
19	0,90 (s)	29,0
20	X	75,1
21	1,11 (s)	20,1
22	3,17 (sl)	76,5
23	1,45 (sobreposto) 1,13 (sobreposto)	26,0
24	1,65 (dd; 12,4; 5,0) 1,23 (m)	41,5
25	X	68,7
26	1,07 (s)	29,9
27	1,04 (s)	29,0

^a Deslocamentos químicos em ppm.

^b multiplicidade (m).

^c Constante de acoplamento (J), expressa em Hz.

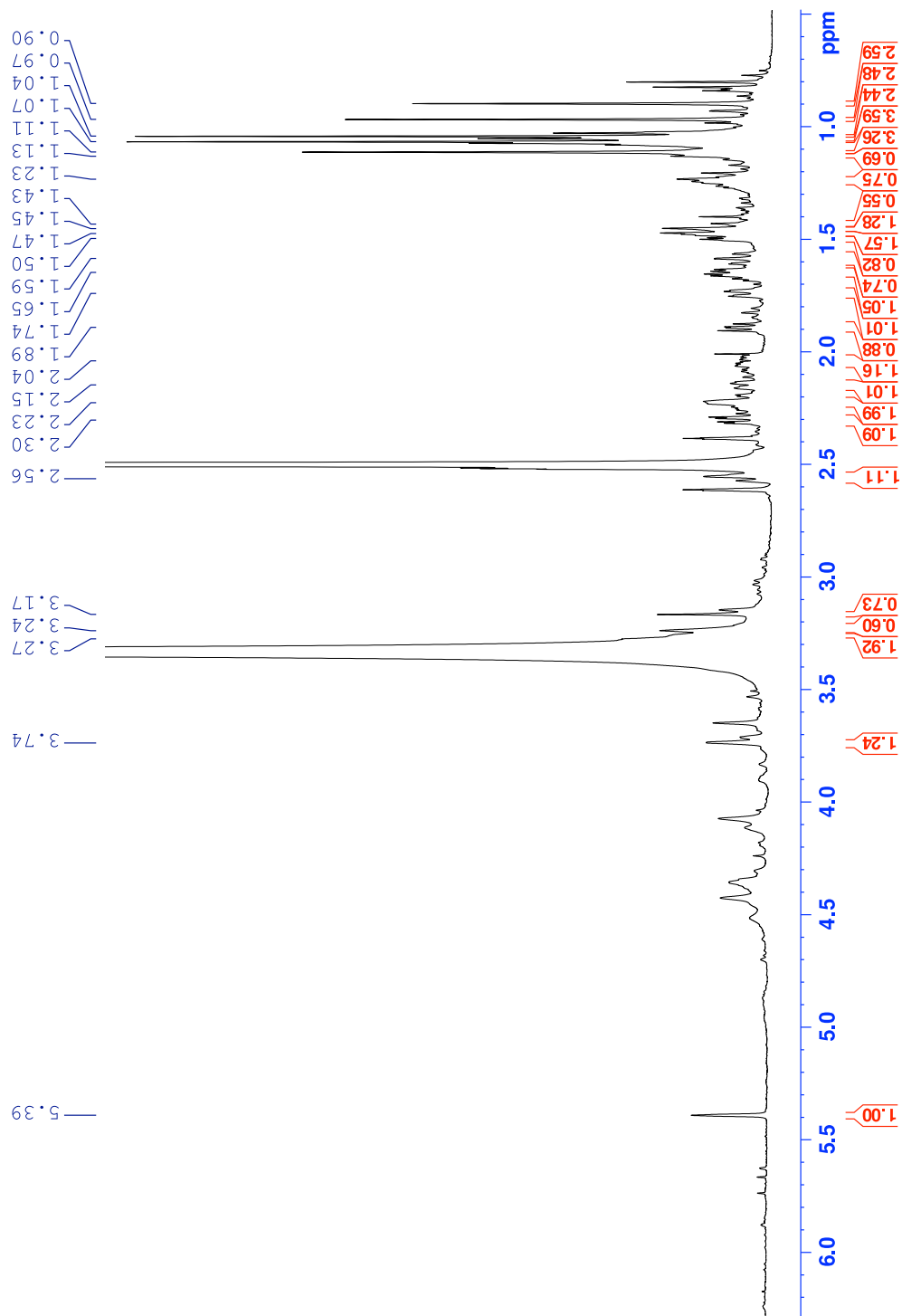


Figura 82 – Espectro de NMR de ^1H da substância 19 (600 MHz – DMSO-d_6).

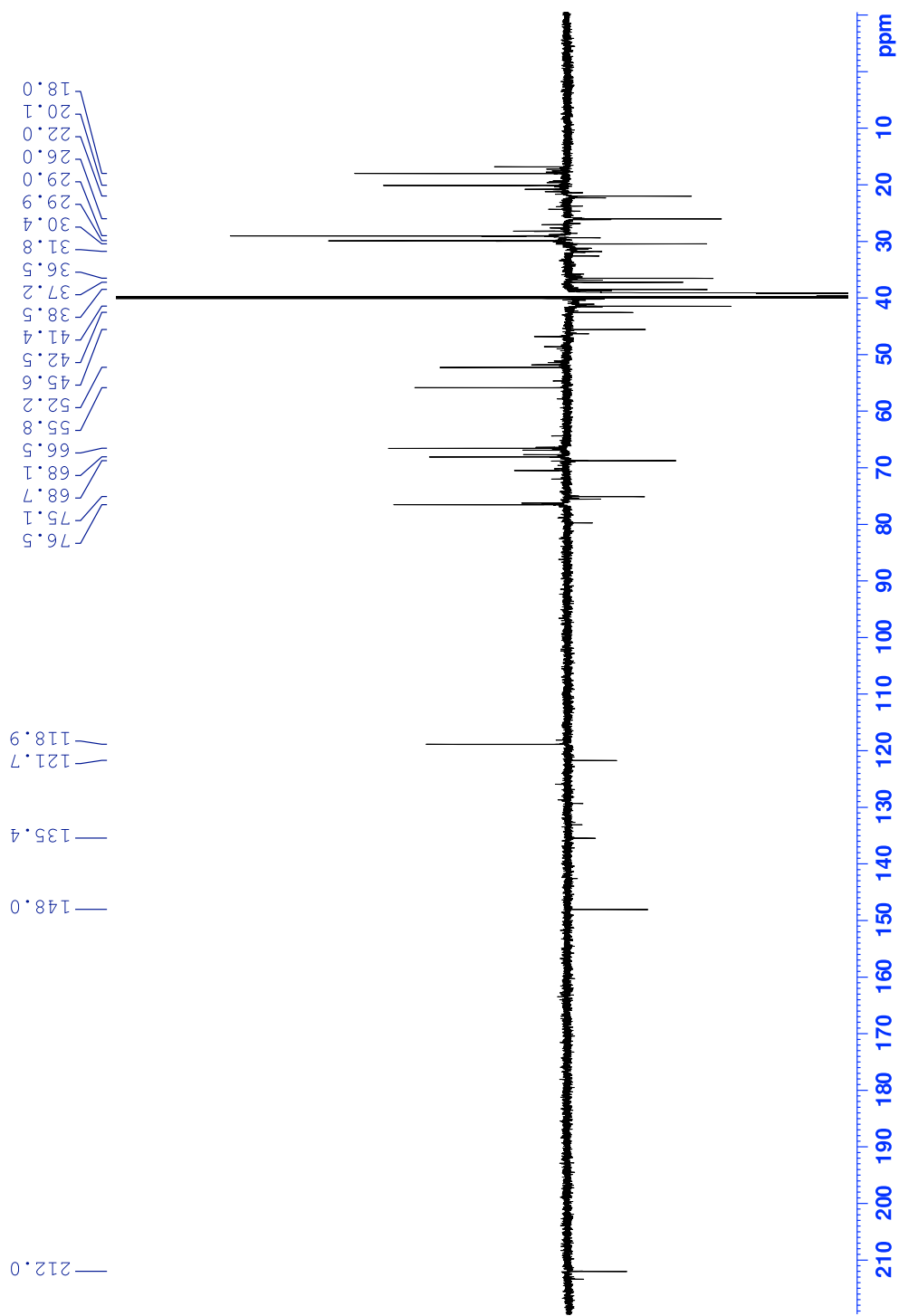


Figura 83 – Espectro de NMR de DEPTQ da substância 19 (150 MHz – DMSO-d₆).