



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

VINICIUS FERREIRA VIANA

**Constituintes químicos de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae): isolamento
direcionado por espectrometria de massas e caracterização**

João Pessoa – PB
2022

VINICIUS FERREIRA VIANA

**Constituintes químicos de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae): isolamento
direcionado por espectrômetria de massas e caracterização**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.** Área de Concentração: **FARMACOQUÍMICA**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

COORIENTADOR: Prof. Dr. Lucas Silva Abreu

João Pessoa – PB

2022

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

V614c Viana, Vinicius Ferreira.

Constituintes químicos de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) : isolamento direcionado por espectrometria de massas e caracterização / Vinicius Ferreira Viana. - João Pessoa, 2022.
90 f. : il.

Orientação: Josean Fechine Tavares.
Coorientação: Lucas Silva Abreu.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Acanthaceae. 2. Cansa-cavalo. 3. *Harpochilus*. 4. Plantas medicinais. 5. Brazoides. I. Tavares, Josean Fechine. II. Abreu, Lucas Silva. III. Título.

UFPB/BC

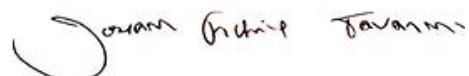
CDU 582.916.51(043)

VINICIUS FERREIRA VIANA

**Constituintes químicos de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae): isolamento
direcionado por espectrômetria de massas e caracterização**

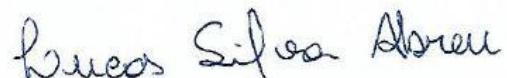
APROVADO EM: 28/09/2022

COMISSÃO EXAMINADORA



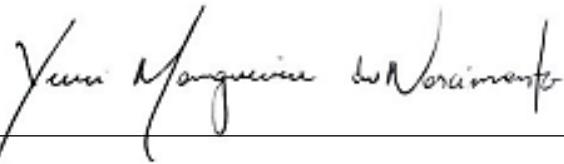
Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)



Prof. Dr. Lucas Silva Abreu

Universidade Federal Fluminense
(Coorientador)



Prof. Dr. Yuri Magueira do Nascimento

Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno)



Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte

Universidade Federal de Sergipe
(Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que durante toda a minha vida é fonte de força e alimento de esperança para seguir conquistando tudo aquilo que a mim é ofertado.

Aos meus orixás, que me guiam, me protegem e me mantêm de pé nessa caminhada surpreendente que é a vida.

A minha mãe, Darcijane Viana, mulher que me deu a vida e continua a me dar a vida todos os dias através do seu amor e dedicação.

A minha avó, Darci Viana (*in memoriam*), que durante toda sua vida se dedicou a garantir que eu pudesse ter a melhor educação e me ensinou que o estudo é um tesouro valioso que, quando conquistado, nunca será tirado de mim.

A minha tia, Deilane Viana, que desde muito jovem sempre ajudou na minha formação enquanto pessoa e cuidou de mim como um filho.

Ao meu avô, João Baixinho, e meus tios, Djames e Djair, que ajudaram a moldar o meu caráter por meio dos seus valores e me mostraram a figura de pais com todo o cuidado e zelo.

Aos meus irmãos, Gabriel, Barbara e Brigida, que compartilharam comigo a felicidade de crescemos juntos e são meu ponto de apoio em todos os momentos.

Aos meus padrinhos, Aracélio e Araci, que depositaram confiança em mim e sempre acreditaram no meu potencial.

A César Dantas, por todo encorajamento e apoio para enfrentar novos objetivos e me ajudar em mais uma jornada da minha vida.

A minha bisa, Juracy Viana (*in memoriam*), e minha tia, Maria Eliane (*in memoriam*), que eu carrego comigo suas lembranças de carinho e aconchego.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, por sua disponibilidade em aceitar que eu integrasse sua equipe de pesquisa, e por todo o compartilhamento de conhecimentos, ensinamentos e direcionamento durante todo o processo de mestrado.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Lucas Silva Abreu, que mesmo em pouco tempo de convivência mostrou ser um ótimo profissional e colega, e que me repassou um pouco do seu vasto conhecimento proporcionando que esse trabalho pudesse caminhar da melhor forma possível.

As minhas amigas, Hanna, Isadora, Karol Martins, Andrezza e Rayssa, que

mesmo com toda a distância física sempre se fizeram presentes em todas as etapas da minha vida.

A Kammila, Geórgia, Jamilly e Karol Gouveia, amigas que a graduação me deu de presente, que se tornaram minha família longe de casa.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que eu pude conhecer através do mestrado e pude conviver durante toda essa jornada de novos aprendizados, por todo o compartilhamento de experiências, conhecimentos e momentos diários de boas conversas e risadas.

Aos técnicos Evandro e Marcelo, pela disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento da pesquisa nos laboratórios da farmacoquímica.

A toda equipe SFCB pelo compartilhamento de conhecimentos.

A todos os professores da pós-graduação por todos os novos ensinamentos repassados durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho por toda colaboração e enriquecimento do trabalho através do compatilhamento de seus conhecimentos.

Aos Prof. Dr. Marcelo Cavalcante e Prof. Dr. Yuri Mangueira por se disponibilizarem a fazer parte da banca avaliadora, agregando valor ao trabalho com seus conhecimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

A Universidade Federal da Paraíba.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Constituintes químicos de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae): isolamento direcionado por espectrômetria de massas e caracterização
Viana, V. F.
Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2022).

RESUMO

A segunda metade do século XX trouxe um avanço no desenvolvimento de medicamentos sintéticos mas ainda há obstáculos que dificultam o acesso de determinadas populações, a exemplo da população mais carente, a medicina profissional e saúde de qualidade. Com isso, as plantas medicinais acabam por se tornar a fonte terapêutica mais importante frente ao tratamento de doenças, principalmente em países subdesenvolvidos. *Harpochilus neesianus*, conhecida popularmente como “cansa-cavalo” e “canudo da Caatinga”, é uma espécie do gênero *Harpochilus* Nees pertencente a família Acanthaceae, endêmica dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Bahia no nordeste do Brasil. O objetivo deste trabalho foi realizar uma abordagem fitoquímica por meio da identificação de constituintes químicos isolados de *Harpochilus neesianus*. As partes aéreas da espécie foram coletadas no município de Pocinhos – PB e foram submetidas aos processos de secagem e pulveirização, posteriormente foi realizada a extração do material vegetal por meio de maceração, onde o extrato obtido foi submetido a uma partição líquido-líquido resultando nas fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica. O emprego de técnicas cromatográficas como cromatografia líquida sob média pressão (CLMP) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando a fase acetato de etila possibilitou o isolamento de três compostos inéditos: brazoides E, F e G. As técnicas cromatográficas empregadas tiveram como fase estacionária silica de fase reversa C-18 e como fase móvel metanol. Estes foram identificados por meio da espectrometria de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C , como também técnicas bidimensionais. Os resultados obtidos neste trabalho, foram de grande importância para a contribuição de conhecimentos fitoquímicos do gênero *Harpochilus*, especificamente da espécie *Harpochilus neesianus*, visto que se trata de um gênero recentemente descoberto que não possui informações relacionadas aos seus compostos químicos.

Palavras-chaves: Cansa-cavalo, Acanthaceae, *Harpochilus*, plantas medicinais, brazoides.

Chemical constituents of *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae): mass spectrometry-directed isolation and characterization.
Viana, V. F.
Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2022).

ABSTRACT

The second half of the 20th century brought progress in the development of synthetic medicines, but there are still obstacles that make it difficult for certain people, such as the poorest population, to have access to professional medicine and quality health care. With this, medicinal plants end up becoming the most important therapeutic source for the treatment of diseases, especially in underdeveloped countries. *Harpochilus neesianus*, popularly known as “cansa-cavalo” and “canudo da Caatinga”, is a species of the genus *Harpochilus* Nees belonging to the family Acanthaceae, endemic to the states of Rio Grande do Norte, Paraíba and Bahia in northeastern Brazil. The objective of this work was to carry out a phytochemical approach through the identification of chemical constituents isolated from *Harpochilus neesianus*. The aerial parts of the species were collected in the municipality of Pocinhos - PB and were submitted to the drying and pulverizing processes, later the extraction of the vegetal material was carried out through maceration, where the obtained extract was submitted to a liquid-liquid partition resulting in the hexane, chloroform, ethyl acetate and n-butanolic phases. The use of chromatographic techniques such as liquid chromatography under medium pressure (LCMP) and high performance liquid chromatography (HPLC) using the ethyl acetate phase allowed the isolation of three new compounds: brazoids E, F and G. The chromatographic techniques employed had as Silica C-18 stationary phase and methanol as mobile phase. These were identified using mass spectrometry and ¹H and ¹³C NMR, as well as two-dimensional techniques. The results obtained in this work were of great importance for the contribution of phytochemical knowledge of the genus *Harpochilus*, specifically of the species *Harpochilus neesianus*, since it is a newly discovered genus that does not have information related to its chemical compounds.

Palavras-chaves: Cansa-cavalo, Acanthaceae, *Harpochilus*, medicinal plants, brazoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica dos biomas brasileiros.....	21
Figura 2 – Distribuição geográfica mundial da família Acanthaceae.....	23
Figura 3 – Brazoides A-D (1-4) isolados a partir de <i>J. Gendarussa</i>	26
Figura 4 – Distribuição geográfica das espécies do gênero <i>Harpochilus</i> na região nordeste do Brasil	27
Figura 5 – Espécie <i>Harpochilus neesianus</i>	28
Figura 6 – Espécie <i>Harpochilus neesianus</i>	28
Figura 7 – Cromatograma da fração HNC180050.....	36
Figura 8 – Cromatograma da fração HNC180020.....	37
Figura 9 – Espectro de massas da substância HNC180050.	39
Figura 10 – Espectro de Infravermelho (KBr) da fração HNC180050.	40
Figura 11 – Estruturas do composto isolado brazóide E (1) e do composto referência brazóide D (2)	45
Figura 12 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050	46
Figura 13 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD ₃ OD) HNC180050 na região de 120 – 180 ppm	46
Figura 13 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050 na região de 10 – 85 ppm.....	47
Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C , APT, (125 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050..	47
Figura 16 – Expansão de espectro de RMN de ^{13}C , APT, (125 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050 na região de 115 – 180 ppm.....	48
Figura 17 – Expansão de espectro de RMN de ^{13}C , APT, (125 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050 na região de 0 – 85 ppm.....	48
Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050.	49
Figura 19 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050 na região de 6 – 10 ppm.	49
Figura 20 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD ₃ OD) de HNC180050	

na região de 2 – 5,5 ppm.	50
Figura 21 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 0 – 2,5 ppm.....	50
Figura 22 – Mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050...51	
Figura 23 – Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de (6,0 – 9,0 ppm) x (70,0 – 145,0 ppm).	51
Figura 24 – Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de (3,0 – 6,0 ppm) x (0,0 – 200,0 ppm)	52
Figura 25 – Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de (0,0 – 2,5 ppm) x (0,0 – 200,0 ppm)	52
Figura 26 – Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de (1,0 – 8,0 ppm) x (10,0 – 90,0 ppm)	53
Figura 27 – Mapa de contornos HSQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de (1,0 – 13,0 ppm) x (0,0 – 200,0 ppm)	53
Figura 28 – Expansão do mapa de contornos HSQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de (6,0 – 9,0 ppm) x (110,0 – 150,0 ppm)	54
Figura 29 – Expansão do mapa de contornos HSQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de (0,0 – 5,5 ppm) x (0,0 – 80,0 ppm).	54
Figura 30 – Espectro de massas da substância HNC182004.....	55
Figura 31 – Estruturas químicas do composto isolado Brazóide F (1) e do composto referência Brazóide E (2).....	58
Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004.....59	
Figura 33 – Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004 na região de 150 – 187 ppm.....	59
Figura 34 – Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004 na região de 107 – 145 ppm.....	60
Figura 35 – Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004 na região de 10 – 105 ppm.....	60
Figura 36 – Espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004.61	
Figura 37 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004 na região de 6,5 – 7,3 ppm.....61	

Figura 38 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 3,2 – 5,3 ppm.....	62
Figura 39 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 2,4 – 4,2 ppm.....	62
Figura 40 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 0,2 – 2,0 ppm.....	63
Figura 41 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004	63
Figura 42 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (6,5 – 7,5 ppm) x (110,0 – 165,0 ppm).	64
Figura 43 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (3,7 – 5,7 ppm) x (100,0 – 185,0 ppm).	64
Figura 44 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (3,0 – 6,2 ppm) x (5,0 – 105,0 ppm).	65
Figura 45 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (0,7 – 3,0 ppm) x (10,0 – 95,0 ppm).	65
Figura 46 – Mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (0,0 – 10,0 ppm) x (10,0 – 180,0 ppm).	66
Figura 47 – Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (3,0 – 5,3 ppm) x (30,0 – 90,0 ppm)	66
Figura 48 – Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (0,8 – 4,3 ppm) x (0,0 – 85,0 ppm)	67
Figura 49 – Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (6,6 – 7,15 ppm) x (110,0 – 140,0 ppm).....	67
Figura 50 – Espectro de massas da substância HNC182006	68
Figura 51 – Estruturas químicas do composto isolado Brazóide I (1) e do composto referência Brazóide F (2).....	71
Figura 52 – Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006.....	72
Figura 53 – Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de 100 – 180 ppm.....	72
Figura 54 – Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de	

HNC182006 na região de 0 – 90 ppm.....	73
Figura 55 – Espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006.....	73
Figura 56 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de 6,35 – 7,30 ppm.....	74
Figura 57 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de 3,3 – 5,3 ppm.....	74
Figura 58 – Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de 0,6 – 2,8 ppm.....	75
Figura 59 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC2006	75
Figura 60 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de (4,2 – 8,0 ppm) x (100,0 – 200,0 ppm).	76
Figura 61 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de (0,2 – 3,8 ppm) x (120,0 – 200,0 ppm).	76
Figura 62 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de (0,0 – 3,5 ppm) x (60,0 – 190,0 ppm)	77
Figura 63 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de (0,2 – 3,6 ppm) x (10,0 – 100,0 ppm).	77
Figura 64 – Mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de (0,0 – 7,5 ppm) x (0,0 – 140,0 ppm).	78
Figura 65 – Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de (0,5 – 3,5 ppm) x (5,0 – 70,0 ppm).	78
Figura 66 – Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de (3,0 – 7,5 ppm) x (50,0 – 140,0 ppm).....	79

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Elaboração do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Harpochilus neesianus</i>	31
Esquema 2 – Partição do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Harpochilus neesianus</i>	32
Esquema 3 – Fracionamento da fase acetato de etila (AcOEt)	33
Esquema 4 – Purificação e isolamento de constituintes químicos da fase acetato de etila.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies da família Acanthaceae, constituintes químicos e atividades biológicas.....	25
Quadro 2 – Dados das frações obtidas por CC Sephadex LH-20.....	34
Quadro 3 – Dados das frações obtidas por CLMP	34
Quadro 4 – Método analítico desenvolvido por CLAE para fração 50%	35
Quadro 5 – Método analítico desenvolvido por CLAE para fração 50%	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e técnicas bidimensionais HMBC e HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050, brazóide E, em comparação aos dados obtidos por SOUZA et al., 2017	45
Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e técnicas bidimensionais HMBC e HMQC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004, brazóide F, em comparação aos dados obtidos na tabela brazóide E.....	58
Tabela 3 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e técnicas bidimensionais HMBC e HMQC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182006, brazóide G, em comparação aos dados obtidos na tabela brazóide F.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	“Attached Proton Test”
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em Coluna
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLMP	Cromatografia Líquida sob Média Pressão
COSY	“Correlation Spectroscopy”
d	Dubleto
dd	Duplo doubleto
ddd	Duplo duplo doubleto
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de Massas
ESFA	Fase acetato de etila de <i>Harpochilus neesianus</i>
ESFB	Fase butanólica de <i>Harpochilus neesianus</i>
ESFC	Fase clorofórmica de <i>Harpochilus neesianus</i>
ESFH	Fase hexânica de <i>Harpochilus neesianus</i>
ESI	“Electrospray ionization”
EtOH	Etanol
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
HRESI-MS	“High Resolution Eletron Spray Ionization Mass Spectra”
J	Constante de acoplamento
m	Multipleto
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e SintéticosBioativos
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Tripleto
tl	Tripleto largo
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Geral	20
2.2. Específicos	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1. Considerações sobre a flora do Brasil	21
3.2. Considerações sobre a família Acanthaceae.....	22
3.3. Considerações sobre o gênero <i>Harpochilus</i> e espécie <i>Harpochilus neesianus</i>.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Material e equipamentos utilizados	29
4.2. Material vegetal.....	30
4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal	30
4.2.2. Processamento do material vegetal	30
4.3. Obtenção do extrato etanólico bruto de <i>Harpochilus neesianus</i>	30
4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto.....	31
4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE -EM/EM) do EEB e da fase acetato de etila	32
4.6. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila.....	33
4.7. Processamento cromatográfico da fração F.AcOEt-3 por cromatografia líquida sob média pressão (CLMP).....	34
4.8. Processamento cromatográfico das frações 20% e 50% obtidas por CLMP	35
4.9. Caracterização estrutural dos compostos isolados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	38
4.10. Espectrometria de massas	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

5.1.	Identificação estrutural da substância 1	39
5.2.	Identificação estrutural da substância 2	55
5.3.	Identificação estrutural da substância 3	72
6.	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A segunda metade do século XX trouxe um avanço no desenvolvimento de medicamentos sintéticos mas ainda há obstáculos que dificultam o acesso de determinadas populações, a exemplo da população mais carente, a medicina profissional e saúde de qualidade. Mesmo existindo um sistema único de saúde que atua de forma totalmente gratuita, e que essa atuação se estenda a todas as zonas incluindo as zonas rurais, a demanda existente entre povos sem poder aquisitivo resultam em um atendimento inadequado e insuficiente. Uma outra dificuldade enfrentada são os altos valores cobrados em medicamentos produzidos pela indústria. Com isso, as plantas medicinais acabam por se tornar a fonte terapêutica mais importante frente ao tratamento de doenças, principalmente em países subdesenvolvidos (OLIVEIRA et al., 2019)

As plantas medicinais possuem grande potencial promissor, isso porque estima-se que cerca de meio milhão de plantas existentes no mundo ainda não possuem nenhum tipo de estudo relacionado ao seu emprego medicinal. As atividades biológicas apresentadas por plantas ainda desconhecidas podem possuir uma ação importante em tratamentos ou realização de futuras pesquisas. Um levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde mostrou que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento necessita do uso de medicamentos, e a utilização de plantas é o principal meio de cuidados primários à saúde (SINGH et al., 2015).

O conhecimento básico envolvendo a utilização de plantas de forma medicinal é repassado entre as comunidades de forma que as informações são trocadas entre estes povos. O uso desse conhecimento quanto ao emprego de plantas como fontes terapêuticas atrai a atenção de pesquisadores no que diz respeito a avaliação e exploração de produtos naturais possibilitando a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (DIRAR et al., 2021).

A família Acanthaceae está inserida entre as dez famílias de plantas com flores mais numerosas. Por possuírem uma enorme variação morfológica e classificações com aspectos desconhecidas, o número de estudos envolvendo essa família ainda é pouco. A América do Sul é considerada um dos centros que mais possuem espécies de Acanthaceae, e somente na flora brasileira é apontada a presença de mais de 40 gêneros distribuídas por todos os biomas, principalmente em áreas com alto grau de

preservação. O uso popular de espécies dessa família é bastante tradicional no tratamento de doenças como asma, ferimentos, hemorragias e fraturas (BRAZ & AZEVEDO, 2016; OLIVEIRA et al., 2019).

Dentre os gêneros englobados por essa família, encontra-se o gênero *Harpochilus* Nees endêmico do nordeste brasileiro, podendo ser encontradas espécies nas vegetações da Caatinga e Mata Atlântica. Esse gênero atualmente apresenta três espécies, sendo uma delas a espécie *Harpochilus neesianus* ocorrendo principalmente entre os estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba (COSTA-LIMA & CHAGAS, 2019).

Apesar de ser uma espécie endêmica do nordeste brasileiro, a *Harpochilus neesianus* está inserida em um gênero recém descoberto e com poucos estudos relatados, fazendo com que ambos sejam desconhecidos do ponto de vista científico quanto as suas propriedades químicas. Diante dessa escassez de informações envolvendo a espécie e seu gênero, o presente estudo possui grande relevância objetivando, por meio do seu desenvolvimento, a obtenção de informações inéditas sobre estes sendo assim o primeiro estudo a relatar conhecimentos fitoquímicos do gênero *Harpochilus* Nees, mais especificamente da espécie *Harpochilus neesianus*.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Contribuir com os conhecimentos fitoquímicos do gênero *Harpochilus* e família Acanthaceae, a partir da pesquisa envolvendo as partes aéreas da espécie *Harpochilus neesianus*, através da identificação dos seus constituintes químicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair substâncias bioativas presentes no extrato etanólico bruto de partes aéreas de *Harpochilus neesianus* por meio de partição líquido-líquido;
- Elaborar métodos analíticos utilizando CLAE-DAD para possível isolamento de componentes químicos presentes nas frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto;
- Isolar e purificar os metabólitos secundários encontrados na espécie *Harpochilus neesianus*, utilizando técnicas extractivas com solventes orgânicos e métodos cromatográficos;
- Elucidar ou identificar as estruturas químicas dos constituintes químicos de *Harpochilus neesianus* através da análise de dados obtidos pelo emprego de métodos espectroscópicos, como Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C e bidimensionais (HMBC, HMQC, COSY e NOESY), infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

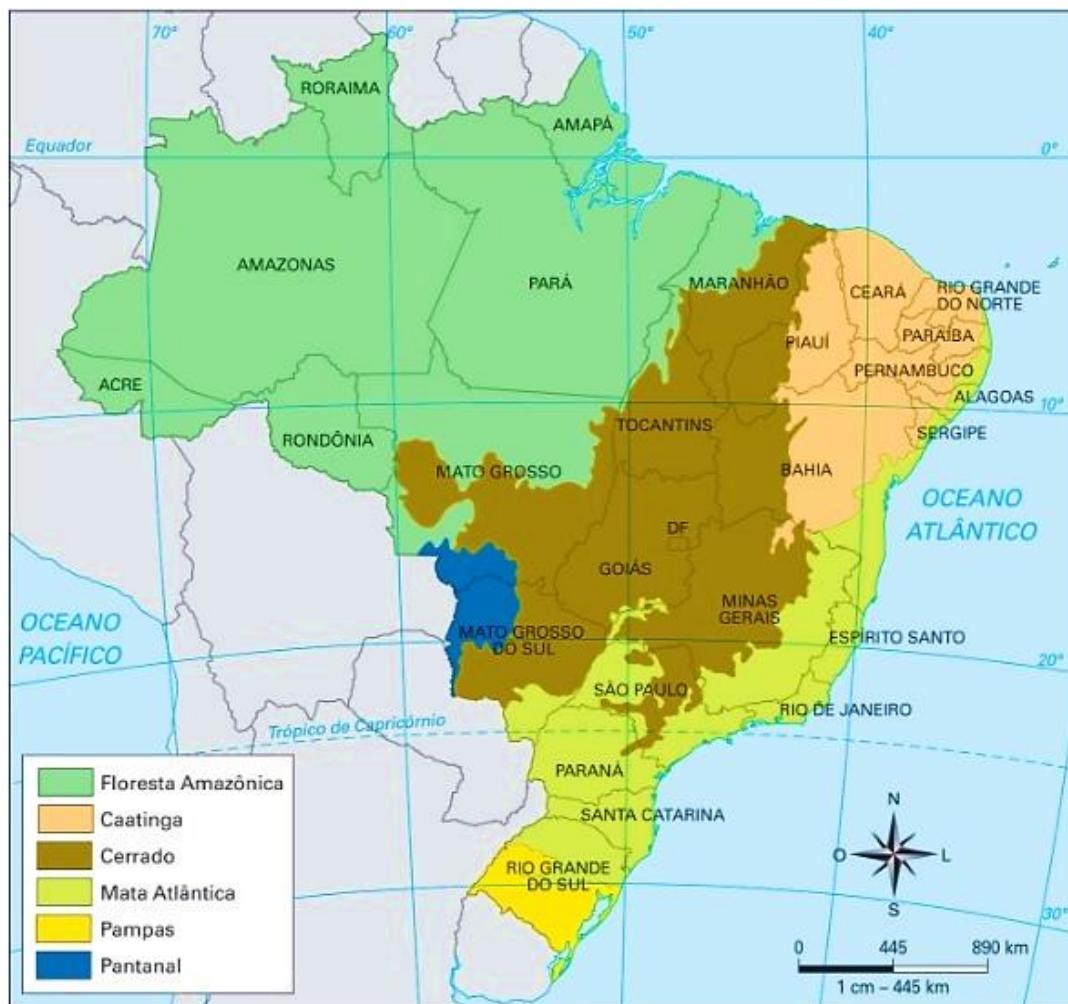


3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Considerações sobre a flora do Brasil

O Brasil é reconhecido como o país que possui uma das floras mais ricas do mundo, apresentando em maior porcentagem (56%) o endemismo de plantas nos Neotrópicos (FORZZA et al., 2012; AZEVEDO & DE MORAES, 2019). O país detém seis tipos de domínios fitogeográficos compostos por diferentes tipos de vegetação sendo estes a Amazônia, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pampa, o Pantanal e a Caatinga (IBGE, 2019).

Figura 1 – Distribuição geográfica dos biomas brasileiros



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)

A Caatinga se destaca por ser a única extensa região que está inteiramente incorporada em território nacional e que detém uma herança de conhecimentos

tradicionais guardados pela população local (TRENTIN et al., 2013; SILVA et al., 2015). Uma das principais características da Caatinga é o fato desse bioma apresentar um clima semiárido e um período de seca que dura entre 7 a 9 meses. Tais condições ecológicas presentes neste local induzem a necessidade das plantas ali presentes passarem por um processo de adaptação, estimulando a produção de metabólitos secundários (BASSO et al., 2005; AGOSTINI et al., 2020).

Composta por florestas e matas que apresentam períodos sazonais de seca, a Caatinga comporta espécies eminentemente ameaçadas de extinção. O número de descobertas incríveis de plantas tem aumentado e seus relatos têm crescido nos últimos anos. Historicamente esse bioma tem sido ignorado fazendo com que apenas 1,2% de seu território esteja inserido em projetos de áreas protegidas, e isso pode estar relacionado ao fato da Caatinga ter sido vista como uma região carente em espécies, diversidade e endemismo levando a um baixo empenho na realização de estudos envolvendo sua flora, o que promove pouco conhecimento a seu respeito e a torna a vegetação mais ameaçada do Brasil. Durante a última década esse panorama foi transformado devido ao crescimento exponencial de pesquisas científicas (QUEIROZ et al., 2019).

Em consequência da crescente destruição da vegetação natural e da ausência de interesse em eficazes ações de conservação, é de extrema urgência a necessidade de um novo olhar sob a diversidade de plantas presentes na Caatinga, para que assim seja possibilitado produção de novas pesquisas e planos de conservação (QUEIROZ et al., 2019).

Esse bioma possui plantas bastante utilizadas na medicina popular e compõem um papel fundamental no âmbito social e cultural (BASSO et al., 2005; TRENTIN et al., 2011; AGOSTINI et al., 2020). Estudos relacionados a esse região ainda se mostram escassos principalmente quando envolve a descoberta de novos compostos biologicamente ativos, moléculas inéditas que podem possuir diferentes aplicações (AGOSTINI et al., 2020).

3.2. Considerações sobre a família Acanthaceae

Acanthaceae é uma família de plantas pertencente à ordem Lamiales sendo um dos maiores grupos de angiospermas com enorme diversidade quanto a sua taxonomia, morfologia e de ampla distribuição geográfica. Tem uma ampla faixa de

distribuição abrangendo cerca de 346 gêneros e o número estimado de espécies compreendidas por essa família varia, mas de acordo com listas feitas por pesquisadores modernos há uma estimativa de que existam entre 4.000 a 5.000 espécies conhecidas e desconhecidas do Velho Mundo (VM) e Novo Mundo (NM) (KHAN et al., 2017; KIEL et al., 2018; MANZITTO-TRIPP et al., 2022; MATOS et al., 2022). É encontrada em vários biomas de climas tropicais e subtropicais em todo o mundo, tendo como principais centros de diversidade a Indo-Malásia, África, América Central e América do Sul, onde o México e Brasil se destacam como os habitats mais ricos em espécies de Acanthaceae. É constituída essencialmente por ervas anuais e perenes, arbustos e trepadeiras, porém com a presença de algumas árvores de grande porte (CORTÊS & RAPINI, 2013; FONGOD et al., 2013; KHAN et al., 2017; MANZITTO-TRIPP et al., 2022).

Figura 2 – Distribuição geográfica mundial da família Acanthaceae (representação da vegetação global em verde; em amarelo e laranja estão as áreas de maior incidência da família).



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Acesso em: 13 Jan 2022.
Disponível em: <<https://tropicos.org/name/42000303>>

Existe uma tradicional subdivisão da família em quatro subfamílias sendo elas Acanthoideae, Nelsonioideae, Thunbergioideae e Mendonciaceae, com descrição baseada principalmente pela diferenciação na tipologia de seus frutos e sementes (INDRIUNAS, 2011). Os principais sistemas de classificação são os de Nees (1847b) apresentando onze tribos, Bentham (1876) com cinco tribos, Lindau (1895b) que subdivide em quatro subfamílias e Bremekamp (1965) demonstrando três subfamílias

(INDRIUNAS, 2011).

A partir da reunião de dados moleculares, morfológicos e citogenéticos, Scotland & Vollesen (2000) sugerem que há três subfamílias sendo estas Nelsonioideae, Thunbergioideae e Acanthoideae, e que esta última se subdivide em duas tribos (Acantheae e Ruellieae) em que *Ruelliae* engloba as subtribos Ruelliinae, Andrographiinae, Barleriinae e Justiciinae (INDRIUNAS, 2011).

A subtribo Justicieae é tão ampla quanto a família Acanthaceae sendo uma de suas maiores constituintes, e apresenta uma relevante diversidade morfológica. Engloba cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies de prevalência tropical, com principal incidência se dando em florestas úmidas e dominância em locais semiáridos. Estudos de caracterização fitoquímica envolvendo plantas do semiárido demonstram que espécies que compõem essa tribo são promissoras em relação a sua atividade biológica (SCOTLAN & VOLLESEN, 2000; CORTÊS & RAPINI, 2013).

Considerada o grupo de Acanthaceae mais difícil quanto a sua taxonomia, mostrando relações infratribais problemáticas a partir da classificação de Lindau (1985) de Acanthaceae, McDade et al., (2000) realizou um estudo que demonstrou a existência de quatro linhagens prevalecentes dentro da tribo sendo elas Isoglossianae, Pseuderanthemum, Tetramerium e “justicioid” (KIEL et al., 2017).

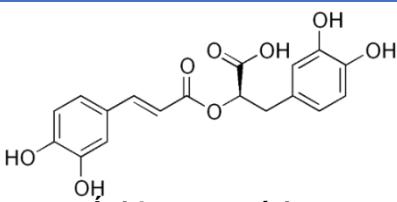
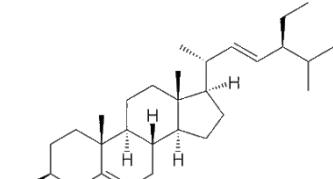
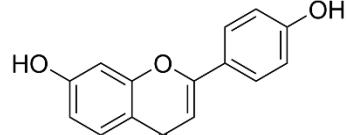
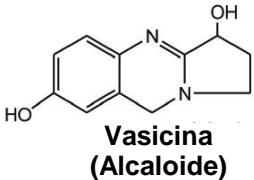
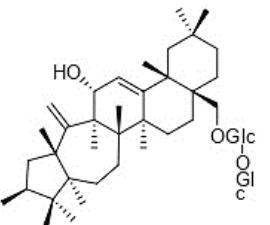
Segundo McDade et al. (2000), a linhagem “justicióides” é fortemente representada, abrangendo cerca de 12 gêneros do velho e do novo mundo, sendo essa informação reafirmada por Kiel et al. (2017) em que confirma que essa linhagem comprehende espécies do novo mundo que estão inseridas em pequenos gêneros como *Cephalacanthus Lindau*, *Clistax Mart.*, *Megaskepasma Lindau*, *Poikilacanthus Lindau* e *Harpochilus Nees* (SILVA et al., 2022).

Alguns gêneros que compõem essa família são bastante conhecidos, exemplos como *Acanthus*, *Thunbergia*, *Ruspolia*, *Barleria*, *Ruellia* e *Justicia*, sendo suas espécies popularmente utilizadas como plantas ornamentais (KHAN et al., 2017). Somente no Brasil podem ser encontrados 41 gêneros e mais de 430 espécies, em que destas destacam-se principalmente *Justicia L.*, *Ruellia L.*, e *Aphelandra R. Br.* (PROFICE, 2010; CORTÊS & RAPINI, 2013). Espécies de Acanthaceae exercem uma função ecológica fundamental, isso porque diferentes tipos de polinizadores como abelhas, borboletas, mariposas e morcegos, necessitam de seu néctar e pólen para sobreviverem (KHAN et al., 2017). Possuem enorme valor para animais servindo de alimento e para comunidades sendo utilizadas como

medicamentos (KHAN et al., 2017).

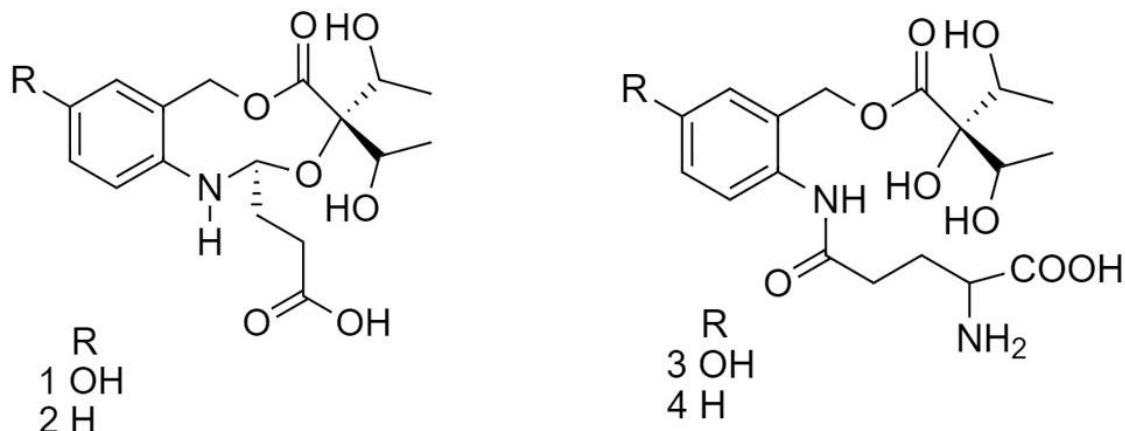
As espécies vegetais de Acanthaceae possuem papel importante como terapia de diversas doenças. Isso pode ser atribuído a presença de vários metabólitos secundários importantes como alcaloides, compostos fenólicos, terpenóides, taninos, quinonas, saponinas, flavonóides, glicosideos cardíacos, carboidratos e proteínas com diferentes aplicações terapêuticas (Quadro 1) (KHAN et al., 2017).

Quadro 1 – Espécies da família Acanthaceae, constituintes químicos e atividades biológicas.

Espécies	Compostos isolados	Atividade biológica	Referência
<i>Thunbergia erecta</i>	 Ácido rosmarínico (Polifenol)	Anticolinesterase Tratamento do Alzheimer	Refaey et al. (2021)
<i>Odontonema strictum</i>	 Stigmasterol (Fitoesterol)	Antioxidante	Pierre & Moses. (2015)
<i>Avicennia schaueriana</i>	 Apigenina (Flavonóide)	Antioxidante	Machado, K. N. (2022)
<i>Justicia adhatoda</i>	 Vasicina (Alcaloide)	Broncodilatador Antiinflamatório	Corrêa & Alcântara. (2011)
<i>Justicia betonica</i>	 Justicioisideo E (Triterpeno glicosilado)	Antiinflamatório	Corrêa & Alcântara. (2011)

Estudos fitoquímicos envolvendo a família Acanthaceae mostraram que espécies do gênero *Justicia* possuíam como principais constituintes químicos triterpenóides, esteróides, flavonóides e compostos nitrogenados em sua composição. A partir disso, Souza et al. (2017) realizaram um estudo tendo como objeto a espécie *Justicia gendarussa*, em que por meio de técnicas espectrométricas como Ressonância Magnética Nuclear (uni e bidimensional) e Espectrometria de Massas (EM) isolaram e identificaram a presença de quatro novos alcaloides que foram denominados como Brazoides A-D (1-4) (pág. 26, Fig. 3) (SOUZA et al., 2017).

Figura 3 – Brazoides A-D (1-4) isolados a partir de *J. Gendarussa*.



3.3. Considerações sobre gênero *Harpochilus* e espécie *Harpochilus neesianus*

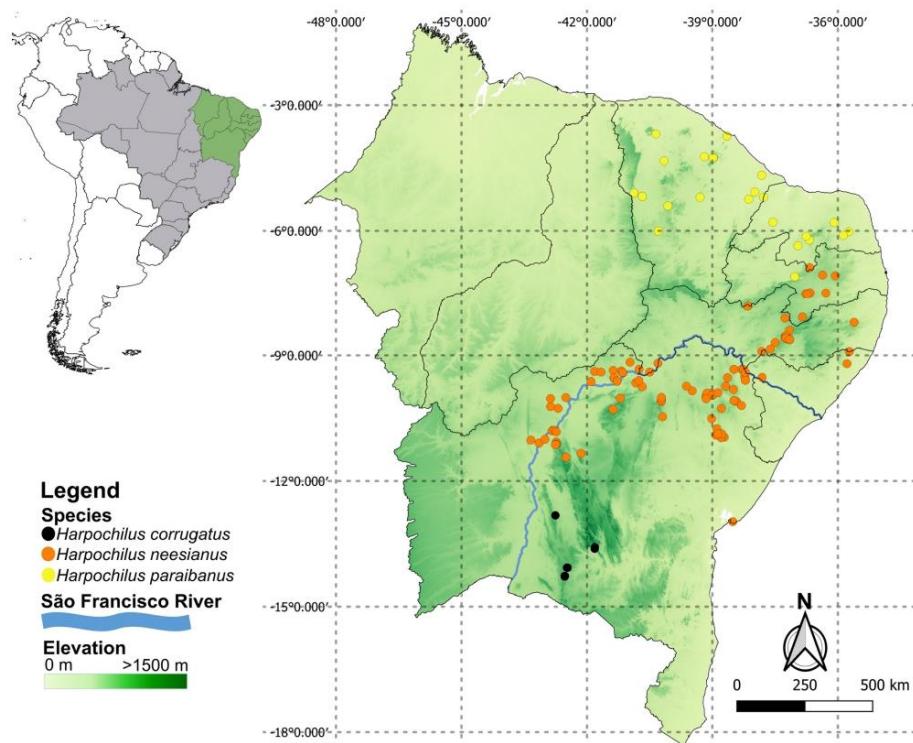
Harpochilus Nees (1847) é um gênero pouco conhecido pertencente à família Acanthaceae sendo endêmico no nordeste do Brasil, especificamente nos estados da Bahia, Pernambuco e Paraíba. Duas espécies foram descritas por Nees e estão associadas à Vegetação da Mata Atlântica e a Caatinga sendo estas *Harpochilus phaeocarpus* Nees (1847) e *Harpochilus neesianus* Martius ex Nees (1847), respectivamente. *Harpochilus trimerocalyx* Rizzini (1948) também foi descrita como endêmica do nordeste, mas logo após foi sinonimizada como *Anisacanthus trilobus* Lindau (1914) (VOGEL et al., 2004; PROFICE et al., 2017; MONTEIRO et al., 2018).

Monteiro et al. (2018) descreveu uma nova espécie peculiar de Acanthaceae durante a realização de um inventário florístico da Caatinga. Suas características eram compatíveis com a tribo Justicieae, mais especificamente com o gênero *Harpochilus*. Denominada *Harpochilus paraibanus*, a nova espécie é descrita para a

região do semiárido do estado da Paraíba, Brasil onde apenas nove espécimes foram relatadas no estudo, levando esta a ser classificada como espécie em perigo.

Silva et al. (2022) realizou um estudo demonstrando que as espécies de *Harpochilus* encontradas no centro-sul do estado da Bahia, Brasil se diferenciavam da *Harpochilus neesianus*. Após uma longa pesquisa e observações feitas por pesquisadores florais, e baseado em estudos das espécimes já conhecidas, o estudo em questão descreveu a existência de uma nova espécie chamada de *Harpochilus corrugatus* sendo esta também avaliada como espécie em perigo.

Figura 4 – Distribuição geográfica das espécies do gênero *Harpochilus* na região nordeste do Brasil.



(Fonte: Silva et al., 2022)

Nees (1847) descreveu de forma completa e ilustrada a espécie *Harpochilus neesianus*, sendo caracterizada como um arbusto robusto com folhas macias e ovadas podendo chegar até três metros de altura sendo registrada principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco e Paraíba. Tem crescimento disperso mas seu povoamento se restringe a campos rupestres, Cerrado e Caatinga arbustivo-arbórea, predominantemente em territórios mais áridos com solo pedregoso ou com presença de arenito avermelhados. Há registros de polinização feita por abelhas e vespas, mas seu principal polinizador é o morcego. Sua floração e frutificação ocorre durante todo

o ano de fevereiro a novembro, sendo que entre maio e julho acontece de forma mais espaçada (VENDAS et al., 1998; VOGEL et al., 2004; CÔRTES & RAPINI, 2013; SILVA et al., 2022). Alguns de seus nomes populares são cansa-cavalo, brinco, camará, caneta, canudo, canudo da Caatinga, canudo-de-cachimbo, tamaratá (CÔRTES & RAPINI, 2013). A espécie objeto de estudo não possui estudos fitoquímicos relatados na literatura, com isso há a ausência de informações quanto aos seus constituintes e propriedades químicas.

Figura 5 – Espécie *Harpochilus neesianus*



(Fonte: Silva et al., 2022)

Figura 6 – Espécie *Harpochilus neesianus*



(Fonte: Silva et al., 2022)

MATERIAL E MÉTODOS



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material e equipamentos utilizados

Os constituintes químicos de *Harpochilus neesianus* foram obtidos por meio de etapas de separação cromatográficas envolvendo desde o fracionamento até o isolamento e identificação destes compostos. Para isso, foram empregadas técnicas clássicas como coluna aberta, e técnicas analíticas modernas como cromatografia por exclusão em coluna, cromatografia líquida sob média pressão (CLMP) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A cromatografia por exclusão em coluna foi realizada utilizando como fase fixa o Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences), e como fase móvel o metanol grau P.A. da Sigma-Aldrich.

A CLMP foi realizada em um cromatógrafo (Büchi®) equipado com módulo de bombeamento de solvente C-605, bomba injetora e detector UV-VIS-C-640, uma unidade de controle C-620, um coletor de frações C-660 e uma coluna Borosilikat 3.3 da marca Büchi. Como fase estacionária foi utilizado sílica de fase reversa C-18 e como fase móvel, soluções de metanol em água grau 1 acidificada (0,1% ácido fórmico) em ordem descrescente de polaridade.

A CLAE foi realizada em um cromatógrafo analítico (Shimadzu®), equipado com uma coluna de fase reversa C-18 das marcas Kromasil e YMC, bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A HT e detector UV-VIS SPD-M20A, como fase móvel foi utilizado água ultrapurificada (milli-Q) acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau HPLC da Merk. Já em escala preparativa foi realizada em um preparativo da marca Shimadzu®, equipado com uma coluna de fase reversa C-18 modelo YMC-Actus Triart C18 (YMC®) com 250 mm x 21,2 mm de d.i. e 5 µm de tamanho da partícula, bombas LC-6AD, injetor manual, e detector UV-VIS SPD-M10A. Como fase móvel foi utilizado água ultrapurificada (milli-Q) acidificada (0,1% ácido fórmico), metanol grau HPLC da Merk e acetonitrila grau HPLC. O metanol também foi empregado no preparo da amostra.

A CLAE em escala semi-preparativa foi realizada em um cromatógrafo (Shimadzu®) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC6AD, injetor manual e detector UV-VIS-SPD-M10A. A coluna utilizada foi de fase reversa (Kromasil®) com 250 mm x 4,6 mm de d. i. e 5 µm de tamanho da partícula.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e de ^{13}C (RMN de ^{13}C), e técnicas bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY) foram obtidos em espectrômetros das marcas Varian System operando a 500MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C), e Brucker operando a 400 MHz (^1H) e 100MHz (^{13}C), localizados no Laboratório Multusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. Para o preparo das amostras a serem analisadas, foram utilizados solventes deuterados (CD_3OD e $\text{DMSO}-d_6$) da Cambridge Isotope Laboratories.

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos utilizando espectrômetros de massas de alta e baixa resolução da marca Bruker, modelo micro TOF II e Ion-Trap AmazonX, respectivamente. As amostras foram preparadas com metanol grau HPLC da Merk.

4.2. Material Vegetal

4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal

As partes aéreas de *Harpochilus neesianus* foram coletadas no município de Pocinhos, estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. José Iranildo Miranda de Melo. Uma exsicata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário Manuel de Arruda Câmara (HACAM) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UEPB, sob registro HACAM 3219.

4.2.2. Processamento do material vegetal

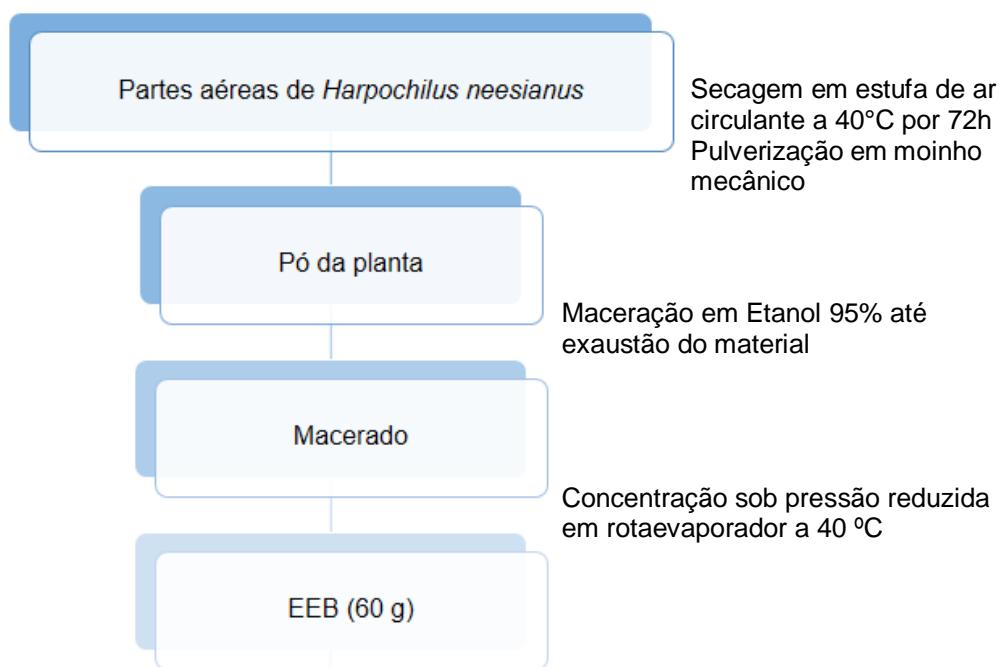
O processo de dessecação das partes aéreas de *Harpochilus neesianus* foi realizado em uma estufa com ar circulante à uma temperatura de 40 °C durante o período de 72 horas. Após sua secagem ser concluída, o material seco foi pulveirizado em um moinho mecânico sendo obtido 1500 g do pó da planta.

4.3. Obtenção do extrato etanólico bruto de *Harpochilus neesianus*

O material vegetal, após passar pelos processos de secagem e pulveirização, foi submetido à uma extração por maceração em etanol (EtOH) a 95% até completa exaustão. O processo foi feito por 3 vezes em intervalos de 72 horas para cada

extração. Após coletada, a solução extractiva foi filtrada e concentrada em um rotaevaporador a uma temperatura de 40 °C sendo, por fim, obtido o extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1).

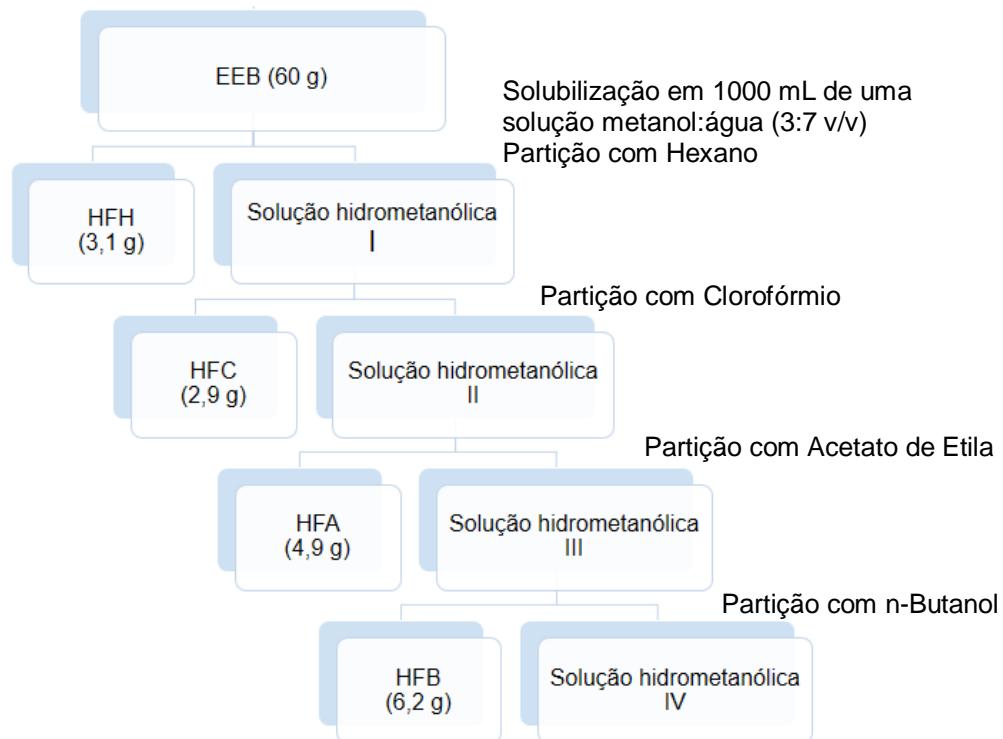
Esquema 1 – Elaboração do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de *Harpochilus neesianus*.



4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto

Uma fração do Extrato Etanólico Bruto (60 g) das partes aéreas de *Harpochilus neesianus* foi diluída em 1000 mL de uma solução metanol:água (3:7 v/v) e colocado em um agitador mecânico durante 60 minutos para homogeneinização. Após homogeneinizar, foi realizado o processo de partição líquido/líquido utilizando uma ampola de separação e solventes com a seguinte ordem crescente de polaridade: hexano (500 mL), clorofórmio (2000 mL), acetato de etila (3500 mL) e n-butanol (1650 mL). Por fim, em um rotaevaporador a uma temperatura de 40 °C, as soluções obtidas foram concentradas sob pressão reduzida fornecendo quatro fases: hexânica (3,126 g), clorofórmica (2,928 g), acetato de etila (4,907 g) e n-butanólica (6,258 g) (Esquema 2).

Esquema 2 – Partição do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de *Harpochilus neesianus*.



Legenda: HFH – Fase hexânica de *Harpochilus neesianus*; HFC – Fase clorofórmica de *Harpochilus neesianus*; HFA – Fase acetato de etila de *Harpochilus neesianus*; HFB – Fase butanólica de *Harpochilus neesianus*.

4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectometria de massas (CLAE-EM/EM) do EEB e da fase acetato de etila.

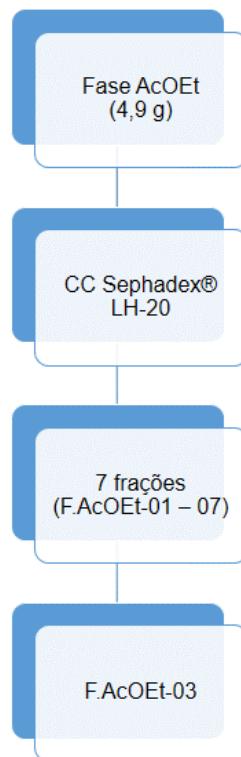
Para a realização da análise por CLAE-EM/EM, foram preparadas amostras do EEB e da fase acetato de etila. Foi solubilizada 1 mg de cada amostra em 1 ml de metanol grau HPLC, as soluções foram filtradas em um filtro de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro e, por fim, 20 µL de cada amostra foi injetado no espectômetro de massas com ionização por eletrospray nos modos positivo e negativo. O método desenvolvido para análise variou a concentração de metanol (MeOH) em água grau 1 acidificada (0,1 ácido fórmico) de 5 à 100% em 90 minutos sob fluxo de 0,6 mL/min.

As massas moleculares e padrões de fragmentação dos constituintes químicos foram comparados com dados da literatura sendo observadas a presença de possíveis substâncias ainda não descritas, possibilitando o direcionamento da pesquisa para o isolamento e identificação desses compostos a partir da fase acetato de etila.

4.6. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila

Foi realizada uma cromatografia em coluna com a fase acetato de etila (4,9 g) utilizando como fase fixa Sephadex LH-20 e como fase móvel o metanol (MeOH), dessa separação cromatográfica foram coletadas 7 frações (F.AcOEt-01 – 07). Essas frações passaram por uma secagem a temperatura ambiente e logo após foram preparadas soluções contendo 1 mg de cada amostra para 1 mL de metanol e submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CLAE-ESI-EM/EM), para definir qual a fração mais promissora para o isolamento dos metabólitos secundários de interesse, sendo estabelecido então a fração F.AcOEt-03 por ter também a maior massa.

Esquema 3 – Fracionamento da fase acetato de etila (AcOEt).



Quadro 2 – Dados das frações obtidas por CC Sephadex LH-20.

Fração	Peso
F.AcOEt 1	0,0452 g
F.AcOEt 2	1,2652 g
F.AcOEt 3	3,4519 g
F.AcOEt 4	0,0221 g
F.AcOEt 5	0,0078 g
F.AcOEt 6	0,0093 g
F.AcOEt 7	0,0203 g

4.7. Processamento cromatográfico da fração F.AcOEt-3 por cromatografia líquida sob média pressão (CLMP)

O fracionamento da amostra F.AcOEt-3 (3,4519 g) de *H. neesianus* foi realizado por cromatografia líquida sob média pressão utilizando sílica de fase reversa C-18 como fase estacionária e como fase móvel quatorze soluções de metanol em água grau 1 acidificada (0,1% ácido fórmico) por ordem de polaridade decrescente de 10 à 100% com 150 mL sob fluxo de 15 mL/min.

Quadro 3 – Dados das frações obtidas por CLMP.

Fração	Peso
10%	0,2703 g
20%	0,0268 g
30%	0,0225 g
40%	0,2209 g
50%	0,0510 g
55%	0,1684 g
60%	0,2564 g
65%	0,2687 g
70%	0,1821 g
75%	0,2535 g
80%	0,2645 g
85%	0,1756 g
90%	0,2364 g
100%	0,2654 g

As frações foram submetidas a análises por CLAE em escala analítica para que assim fosse possível a seleção das frações que se mostrassem mais promissoras para o isolamento dos compostos de interesse. A partir disso, observou-se que a fração 50% (51 mg) possuía a presença de pequenas impurezas sendo necessário passar pelo processo de purificação. A fração 20% (268 mg) mostrou também a possível presença de algumas substâncias, sendo também escolhida para a etapa de isolamento de compostos.

4.8. Processamento cromatográfico das frações 20% e 50% obtidas por CLMP

A análise da fração 50% (51 mg) foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala analítica tendo como primeira etapa a preparação de uma solução contendo 1 mg de amostra em uma concentração de 1 mg ml^{-1} de metanol grau HPLC. Como fase móvel foi utilizada água ultrapurificada acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau HPLC. O cromatógrafo analítico possibilitou o desenvolvimento de um método eficaz para a etapa de isolamento da substância de interesse presente na fração, em que neste método foram injetadas $20 \mu\text{L}$ de amostra em que a concentração de metanol variou de 5 à 35% em um período de 55 minutos com fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. No cromatograma (Fig. 7, pág. 36) foi possível observar 1 pico principal em um comprimento de onda de 320nm.

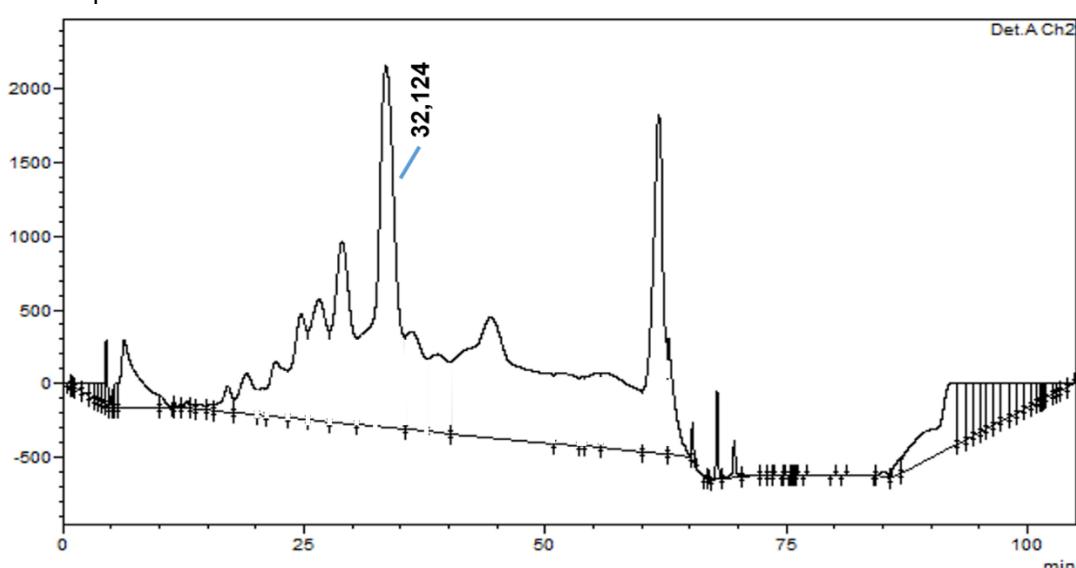
Quadro 4 – Método analítico desenvolvido por CLAE para fração 50%.

Tempo de corrida (min)	Concentração de B (%)
0,01	5
5	35
55	35
60	100
80	100
85	5

Partiu-se então para o cromatógrafo semi-preparativo, sendo preparada uma solução com 51 mg da amostra em $1000 \mu\text{L}$ de metanol grau HPLC. Foram realizadas dez injeções contendo $100 \mu\text{L}$ da solução, e o método desenvolvido durante a fase analítica foi empregado porém o fluxo foi alterado para 3 mL/min . A fração obtida foi coletada e concentrada sob pressão reduzida em um rotaevaporador a uma

temperatura de 40 °C. Esta fração corresponde ao pico principal com tempo de retenção em 32,12 min visualizado no cromatograma analítico (Fig. 7, pág. 36), por fim isolada e codificada como HNC180050.

Figura 7 - Cromatograma da fração HNC180050, em destaque o tempo de retenção do pico principal referente ao composto isolado.



A análise da fração 20% (268 mg) também foi realizada por CLAE em escala analítica, com preparação de uma solução contendo 1 mg da amostra em uma concentração de 1 mg mL^{-1} de metanol grau HPLC. Foi utilizada água ultrapurificada acidificada (0,1% ácido fórmico) e acetonitrila grau HPLC como fase móvel. Foi desenvolvido um método eficiente em cromatógrafo analítico possibilitando o isolamento de substâncias de interesse presentes na fração. Neste método a concentração de acetonitrila variou de 5 à 10% em 40 minutos com fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. No cromatograma (Fig. 8, pág. 37) foi possível observar 2 picos principais.

Quadro 5 – Método analítico desenvolvido por CLAE para fração 20%.

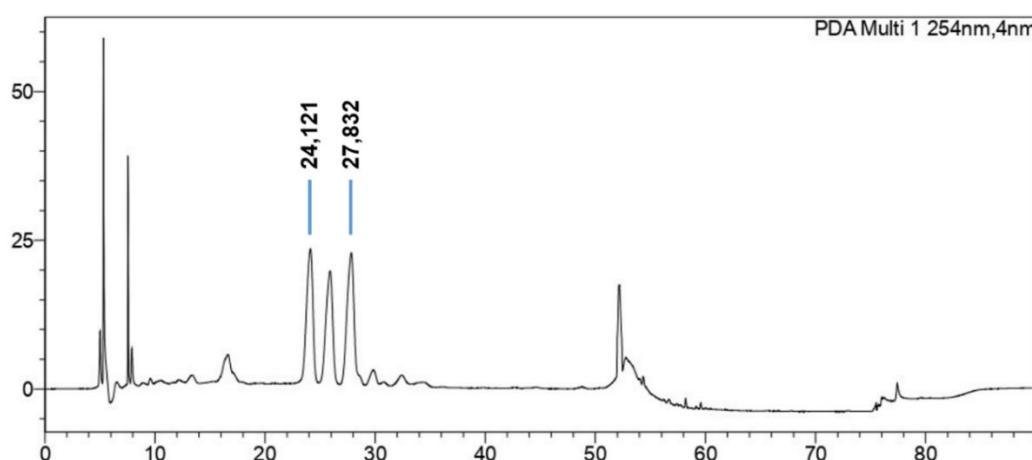
Tempo de corrida (min)	Concentração de B (%)
0,01	5
40	10
45	100
65	100
70	5

O método desenvolvido foi então transposto para o cromatógrafo preparativo, em que 268 mg da amostra foi solubilizado em 800 μL de metanol grau HPLC. Foram

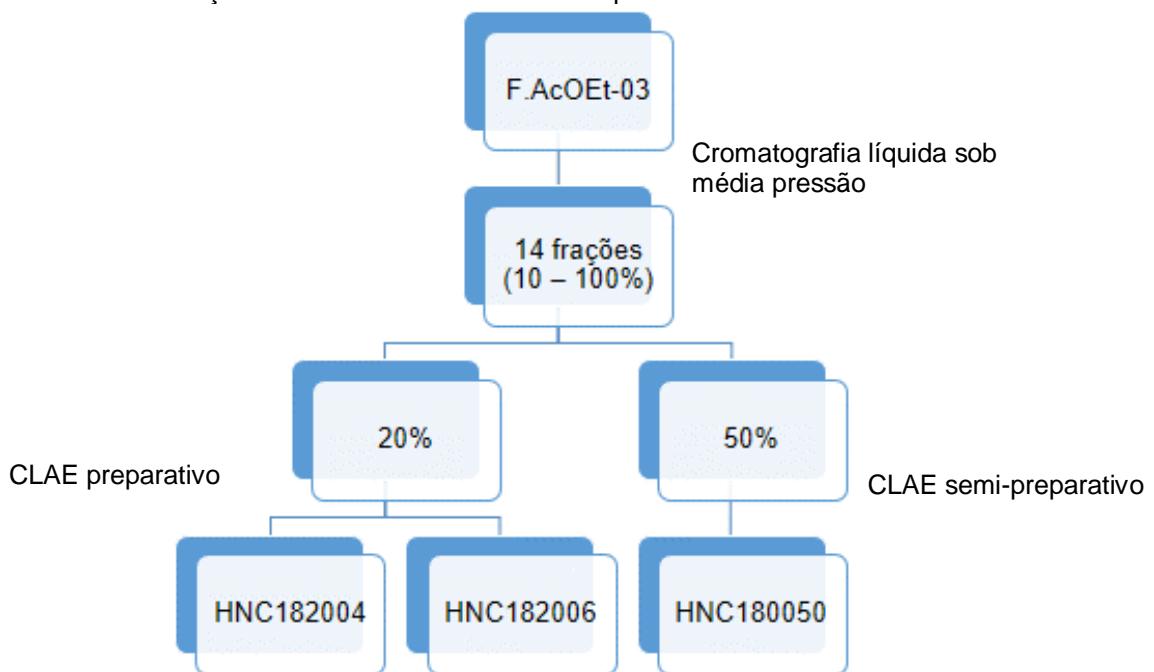
realizadas oito injeções contendo 100 µL da solução, sendo emprego o método analítico desenvolvido com alteração no fluxo para 8 mL/min. As frações obtidas foram coletadas e concentradas sob pressão reduzida em um rotaevaporador a uma temperatura de 40 °C. As duas frações principais correspondem aos picos com tempo de retenção em 24,12 min e 27,83 min, e foram codificadas como HNC182004 e HNC182006.

As etapas envolvidas no processo de purificação e isolamento dos compostos da fase acetato de etila podem ser vistos no Esquema 4.

Figura 8 - Cromatograma da fração HNC180020, em destaque o tempo de retenção dos picos dos compostos isolados..
mAU



Esquema 4 – Purificação e isolamento de constituintes químicos da fase acetato de etila..



4.9. Caracterização estrutural dos compostos isolados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após passarem por etapas de purificação e isolamento, as estruturas dos constituintes químicos foram elucidadas a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , abrangendo técnicas uni e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY) junto a comparação com dados fornecidos pela literatura. Os espectros foram obtidos utilizando metanol deuterado (CD_3OD) para a substância HNC180050 e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) para as substâncias HNC182004 e HNC182006.

Os deslocamentos químicos foram exibidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Os sinais característicos de ^1H e ^{13}C dos solventes utilizados foram estabelecidos como padrão interno, em que para os espectros de RMN ^1H os sinais em δ_{H} 2,49 ppm são característicos para o $\text{DMSO}-d_6$ e em δ_{H} 3,30 ppm para o CD_3OD . Já para os espectros de RMN de ^{13}C os sinais em δ_{C} 39,5 ppm e em δ_{C} 49,0 ppm são característicos para o $\text{DMSO}-d_6$ e para o CD_3OD , respectivamente. As multiplicidades no espectro de ^1H foram indicados conforme as convenções: *s* (singuleto), *s/l* (singuleto largo), *d* (dupleto), *dd* (duplo dupleto), *dl* (dupleto largo), *t* (tripleto), *q* (quadruplete) e *m* (multipleto).

4.10. Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos a partir da diluição das amostras em metanol grau HPLC. O preparo das amostras a serem analisadas foi feito por meio da diluição de 1 mg destas em 1 mL de metanol grau HPLC. Desta solução, foi retirado uma alíquota de 200 μL e adicionado em 800 μL de metanol grau HPLC. Em seguida, 20 μL da última solução foi adicionado em 980 μL de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Por fim, foi realizada a injeção direta das amostras no espectrômetro de massas utilizando a técnica de Ionização por Eletrospray em modo positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

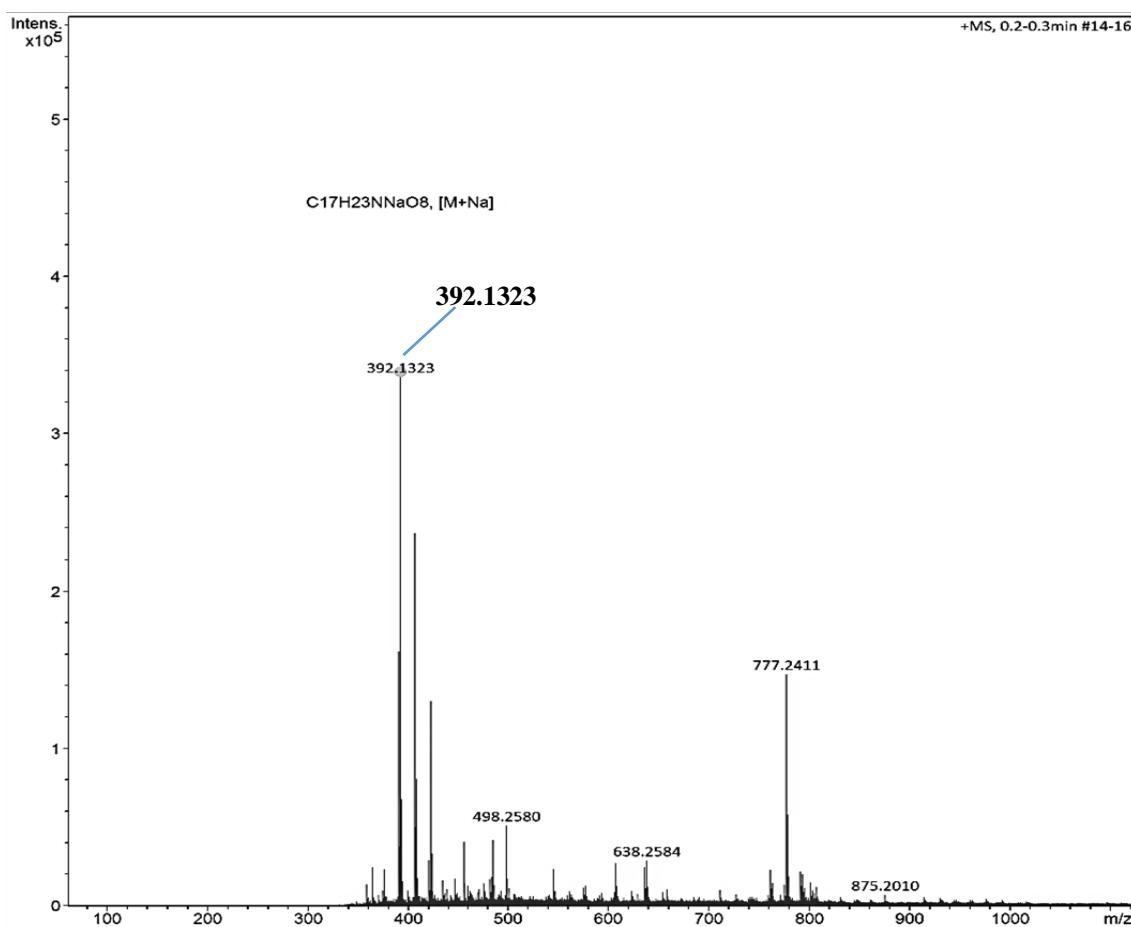


5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação estrutural de substância 1

A substância 1 (HNC180050) foi isolada na forma de um óleo de coloração amarelada com 0,005 g. O espectro de massas obtido mostrou um pico em m/z 392.4323 [M+Na] compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{23}NO_8$.

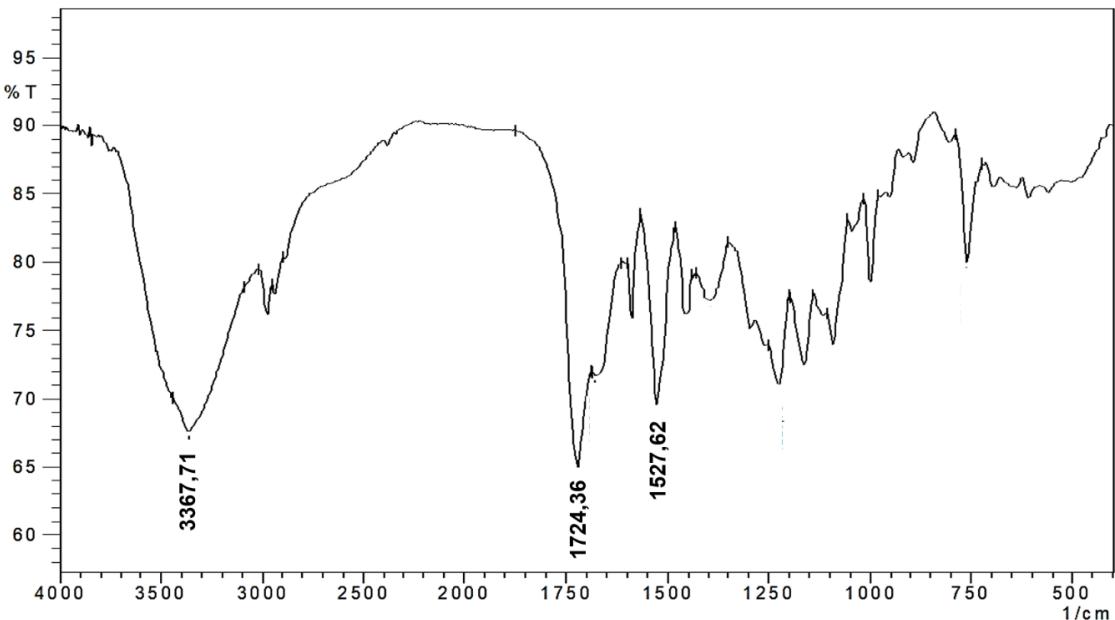
Figura 9 - Espectro de massas da substância HNC180050.



No espectro de infravermelho (IV) foram observadas algumas bandas de absorção características de grupos funcionais. Grupos carbonílicos geram uma forte absorção na região de 1820-1660 cm^{-1} sendo o pico mais intenso do espectro. A partir disso foi possível notar a existência de uma absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 1724,36 indicando a presença de carbonilas. Já ácidos absorvem em uma região entre 3400-2400 cm^{-1} resultando em uma banda larga, também sendo possível observar no espectro uma banda de absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 3367,71 indicando a presença de um ácido carboxílico. Quando ocorre absorções de intensidade média na faixa de 1650-1400 cm^{-1} há uma

sugestão de presença de anel aromático, com isso, a presença de uma banda de absorção em $\nu_{\text{máx}}$ 1527,62 evidenciou a existência de um sistema aromático na molécula (PAVIA et al., 2015).

Figura 10 - Espectro de Infravermelho (KBr) da fração HNC180050.



O espectro de RMN de ^{13}C na técnica APT (Fig. 15, pág. 47), obtido a 125 MHz em CD_3OD , e sua expansão (Fig. 16-17, pág. 48) apresentaram dezessete deslocamentos químicos. Destes, dois sinais foram atribuídos a grupos metílicos ($\text{C-}11$ e $\text{C-}13$), três sinais a grupos metilênicos ($\text{C-}7$, $\text{C-}12$ e $\text{C-}3'$, todos sp^3), seis sinais a carbonos metínicos (dois carbonos oxigenados sp^3 representados pelo sinal $\delta_{\text{C}} 72,64$ ($\text{CH-}10$) e $\delta_{\text{C}} 70,17$ ($\text{CH-}2'$); e quatro carbonos aromáticos sp^2). Por fim foram evidenciados sinais correspondentes a carbonos não hidrogenados, incluindo um carbono oxigenado sp^3 em $\delta_{\text{C}} 82,43$ ($\text{C-}9$), dois carbonos aromáticos sp^2 em $\delta_{\text{C}} 137,45$ ($\text{C-}2$) e $\delta_{\text{C}} 129,82$ ($\text{C-}1$), este último estando ligado diretamente a um átomo de nitrogênio. Os deslocamentos químicos em $\delta_{\text{C}} 120,85$; $\delta_{\text{C}} 130,47$; $\delta_{\text{C}} 125,06$ e $\delta_{\text{C}} 131,73$ foram atribuídos aos carbonos aromáticos $\text{C-}3$, $\text{C-}4$, $\text{C-}5$ e $\text{C-}6$, respectivamente, fechando um sistema aromático dissustituído (SOUZA et al., 2017). Estas e demais atribuições foram reunidas na Tabela 1.

Foi notada a presença de sinais característicos de carbonos ligados a átomos com maior eletronegatividade, a exemplo do oxigênio e nitrogênio, por estes elementos promoverem um maior deslocamento químico nesse átomo de carbono. Este aumento

pode ser explicado pelo efeito de blindagem diamagnética local, onde átomos de carbono têm sua densidade eletrônica diminuída devido ao efeito retirador de elétrons pelos seus ligantes mais eletronegativos. A retirada desses elétrons provoca uma desproteção, uma vez que a presença dos mesmos promove a blindagem do núcleo ao campo magnético aplicado. Com isso, quanto maior for a eletronegatividade do elemento ligante, mais desprotegido estará o carbono resultando em um maior deslocamento químico (PAVIA et al., 2015). A partir dessas afirmações, os sinais em δ_C 175,41; δ_C 174,70 e δ_C 175,43 revelaram a presença de oxigenações na molécula. Quando comparados a dados da literatura, esses sinais foram atribuídos nesta ordem aos carbonos carbonílicos C-8, C-1' e C-4', respectivamente (SOUZA et al., 2017). Além de estarem ligados ao substituinte eletronegativo oxigênio, os carbonos carbonílicos sofrem um aumento em seus deslocamentos químicos devido a desproteção resultante da sua hibridação sp^2 (SILVERSTEIN et al., 2000).

No espectro de RMN de 1H (Fig. 18, pág. 49), obtido a 500 MHz em CD_3OD , e em suas expansões (Fig. 19-21, pág. 49-50), foi possível observar a presença de treze deslocamentos químicos. Analisando-os, foi possível evidenciar a presença de sinais referentes a hidrogênios aromáticos por estarem inseridos na região entre δ_H 6,5 - 8,0 ppm. Esses sinais são justificados a partir do efeito chamado de anisotropia magnética, que acontece quando o anel é colocado em um campo magnético induzindo a circulação dos elétrons π ao redor do anel, fazendo com que estes interajam com o campo magnético ocasionando a desblindagem dos hidrogênios do sistema aromático, promovendo assim um maior deslocamento químico (SILVERSTEIN et al., 2000; PAVIA et al.,).

Foi possível observar dois dupletos (d), um em δ_H 7,70 (H-3) e outro em δ_H 7,45 (H-6), o primeiro estando acoplado em orto com o triploto (t) em δ_H 7,37(H-4) com uma constante de acoplamento de 8,0 Hz, uma vez que neste tipo de acoplamento a constante pode variar entre 7,0 a 10 Hz. E o segundo duploto também apresentou acoplamento em orto, agora, com o triploto visualizado em δ_H 7,23 (H-5) com uma constante de acoplamento de 7,5 Hz. Todos os quatro sinais apresentaram integral para um hidrogênio sendo compatíveis com um anel aromático dissustituído.

O prótons do sistema aromático também são influenciados pela presença ou ausência de grupos doadores ou retiradores de elétrons. O sinal em δ_H 7,70 está orto a um grupo retirador, grupos retiradores levam a um maior efeito de desproteção nas

posições orto e para, ocasionando um maior deslocamento químico do hidrogênio ligado nessas posições, dessa forma o sinal com maior deslocamento foi atribuído ao H-3. O menor deslocamento químico do H-6 (δ_H 7,45) pode ser justificado pelo mesmo estar orto a um grupo doador de elétrons, uma vez que estes grupos proporcionam proteção nas posições orto e para do anel aromático, promovendo assim um menor deslocamento químico desses hidrogênios.

A presença de um par de dupletos (*d*) com deslocamentos químicos em δ_H 5,24 e em δ_H 5,22 ($J = 12,5$; integrando para um hidrogênio) foram atribuídos aos hidrogênios ligados ao C-7 e devido a sua ligação ao oxigênio de uma função éster promove uma maior desproteção. Um outro par de deslocamentos químicos, sendo um duplo largo (*dl*) em δ_H 2,90 ($J = 15,4$) e um multipleto (*m*) em δ_H 2,75 foram atribuídos a hidrogênios metilênicos H-3'. A presença de mais um sinal de hidrogênios ligados a carbonos metilênicos foi evidenciada em δ_H 1,79, sinal com multiplicidade de quarteto e integral para dois hidrogênios, entando acoplados aos hidrogênios da metila H-13, com uma constante de acoplamento de 7,3 Hz, justificando sua multiplicidade e sugerindo a presença dessa terminação com o C-12 livre de oxigenação.

Foi observado um sinal de hidrogênio oximetílico em δ_H 4,57; sendo um singuleto largo (*sl*), atribuído ao H-2', uma vez que há uma maior desproteção desse próton devido sua direta ponte com um oxigênio de hidroxila e com um carbono carbonílico. Foi notado também a presença de um quarteto (*q*) correspondente a um outro hidrogênio oximetílico em δ_H 3,83 ($J = 6,4$; integrando para um hidrogênio) e um sinal de hidrogênios metílicos com multiplicidade de duploto (*d*) em δ_H 1,05 ($J = 6,4$; integrando para três hidrogênios), e foram atribuídos nesta ordem aos hidrogênios H-10 e 3H-11 do grupo hidróxi-etyl. Um outro sinal evidenciou a presença de um segundo grupo de hidrogênios metílicos, que foi o triploto (*t*) em δ_H 0,75 ($J = 7,3$; integrando para três hidrogênios), sendo atribuído aos hidrogênio 3H-13 (SOUZA et al., 2017). As atribuições feitas foram compiladas na Tabela. É importante destacar que carbonos com hibridação sp^3 possuem prótons com uma faixa de ressonância menor quando comparados a hidrogênios de carbonos sp^2 , isso pode ser explicado pois estes últimos possuem um caráter s maior (33%) fazendo com que eles possuam uma maior eletronegatividade devido o maior poder que o orbital s tem fazendo com que seus elétrons sejam mantidos mais próximos ao núcleo, promovendo assim uma

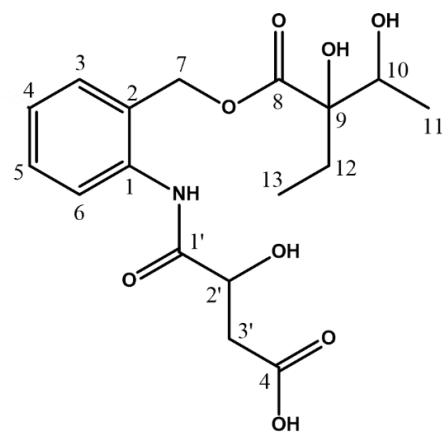
diminuição na blindagem do próton (PAVIA et al., 2015).

Todas as atribuições de sinais de prótons e carbono foram assinaladas através do mapa de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC). O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 22, pág. 51), exibiu um mapa de contorno correlações entre os sinais δ_H 3,83 (H-10), δ_H 1,79 (H-12), δ_H 5,24 e δ_H 5,22 (2 H-7) com o carbono carbonílico com deslocamento químico em δ_C 175,41; confirmado a posição C-8 dessa carbonila. Também foi observada a correlação entre os sinais em δ_H 5,24 e δ_H 5,22 (2 H-7) com o carbono em δ_C 137,45 (C-2), confirmando sua inserção no sistema aromático, em conjunto com a correlação dos sinais em δ_H 7,70 (H-3) e δ_H 7,45 (H-6), esta última a 4 ligações, com o carbono em δ_C 64,83 (C-7) confirmaram a inserção da unidade na posição C-2 do anel aromático.

As posições das metilas foram determinadas através das correlações entre o sinal δ_H 0,75 (3H-13) com o carbono quaternário δ_C 82,43 (C-9) e com o carbono metilenico δ_C 29,81 (C-12), que confirmaram a posição da metila δ_C 8,13 (C-13). As correlações do sinal δ_H 1,05 (3H-11) com os carbonos em δ_C 72,64 (C-10) e δ_C 82,43 (C-9), confirmaram a posição dessa segunda metila.

A análise dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear direta (HSQC) (Fig. 27, pág. 53) possibilitou a atribuição de deslocamentos químicos relacionados a carbonos hidrogenados. Entre as correlações existentes, destacam-se as correlações entre os sinais δ_C 64,05 com δ_H 5,24 e δ_H 5,22; δ_C 40,34 com δ_H 2,75 e δ_H 2,90, confirmado os carbonos metilênicos nas posições C-7 e C-3' respectivamente. O deslocamento em δ_C 17,83 com δ_H 1,05; δ_C 8,13 com δ_H 0,75 confirmaram os carbonos metílicos nas posições C-11 e C-13. Todas as atribuições encontram-se reunidas na Tabela.

A partir da análise dos dados espectrais junto aos dados da literatura foi possível identificar a substância HNC180050 como Brazóide E, confirmado assim que se trata de um composto nunca antes relatado na literatura, sendo este o primeiro estudo a conseguir isolar e descrever a sua elucidação estrutural (SOUZA et al., 2017).



Estrutura do Brazóide E

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e bidimensionais (HMQC e HMBC) (500 e 125 MHz, CD_3OD) de HNC180050, brazóide E, em comparação aos dados obtidos por SOUZA et al., 2017.

Posição	HMQC		$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	Brazóide D	
	δ_{H} BRAZOIDE E	δ_{C} BRAZOIDE E		δ_{H}	δ_{C}
1	-	129,82	H-3; H-5; 2H-7	-	131,8
2	-	137,45	H-3; H-4; H-6	-	137,5
3	7,70 (1H; <i>d</i> ; $J = 8,0$ Hz)	120,85	H-4; H-5	7,48 (1H; <i>d</i> ; $J = 7,5$ Hz)	127,8
4	7,37 (1H; <i>t</i> ; $J = 8,0$ Hz)	130,47	-	7,36 (1H; <i>t</i> ; $J = 7,5$ Hz)	130,4
5	7,23 (1H; <i>t</i> ; $J = 7,5$ Hz)	125,06	H-6; H-3	7,36 (1H; <i>t</i> ; $J = 7,5$ Hz)	127,5
6	7,45 (1H; <i>d</i> ; $J = 7,5$ Hz)	131,73	H-4	7,50 (1H; <i>d</i> ; $J = 7,5$ Hz)	131,6
7	5,24 (1H; <i>d</i> ; $J = 12,5$ Hz) 5,22 (1H; <i>d</i> ; $J = 12,5$ Hz)	64,5	H-3; H-6	4,83 (s)	65,5
8	-	175,41	2H-7; H-10; 2H-12	-	175,5
9	-	82,43	2H-12; 3H-11; 3H-13	-	84,5
10	3,83 (1H; <i>q</i> ; $J = 6,4$ Hz)	72,64	3H-11; 2H-12	4,03 (<i>m</i>)	70,5
11	1,05 (3H; <i>d</i> ; $J = 6,4$ Hz)	17,83	H-10	1,14 (<i>d</i> , $J = 6,3$)	17,8
12	1,79 (2H; <i>q</i> ; $J = 7,3$ Hz)	29,81	3H-13; H-10	4,03 (<i>m</i>)	70,5
13	0,75 (3H; <i>t</i> ; $J = 7,3$ Hz)	8,13	2H-12	1,14 (<i>d</i> , $J = 6,3$)	17,8
1'	-	174,70	-	-	174,5
2'	4,57 (1H; br s)	70,17	-	2,67 (<i>t</i> , $J = 7,0$)	28,1
3'	2,90 (1H; br <i>d</i> ; $J = 15,4$ Hz) 2,75 (1H; <i>m</i>)	40,34	-	2,20 (<i>m</i>)	33,6
4'	-	175,43	-	3,66 (<i>t</i> , $J = 5,5$)	55,8
5'	-	-	-	-	-

Figura 11 – Estruturas do composto isolado brazóide E (**1**) e do composto referência brazóide D (**2**).

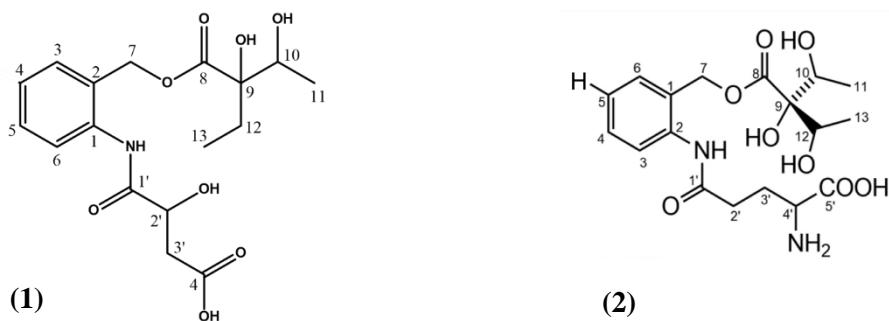


Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de HNC180050.

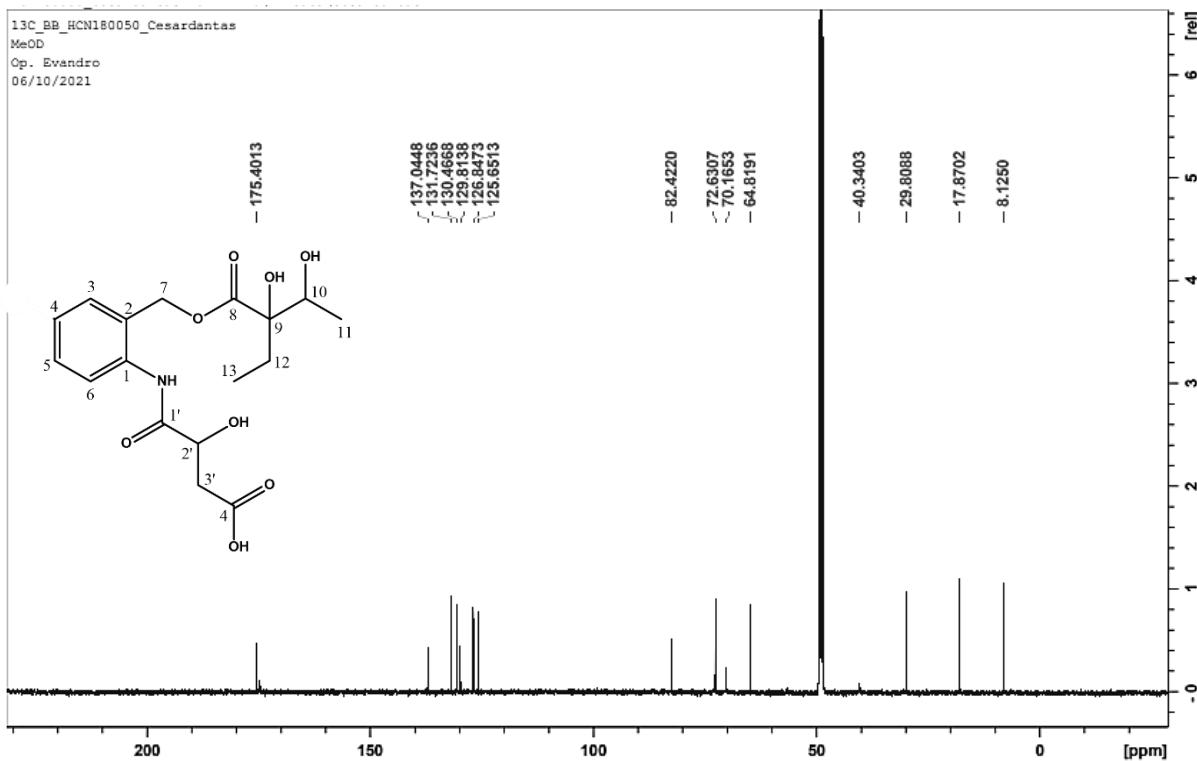


Figura 13 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 120 – 180 ppm.

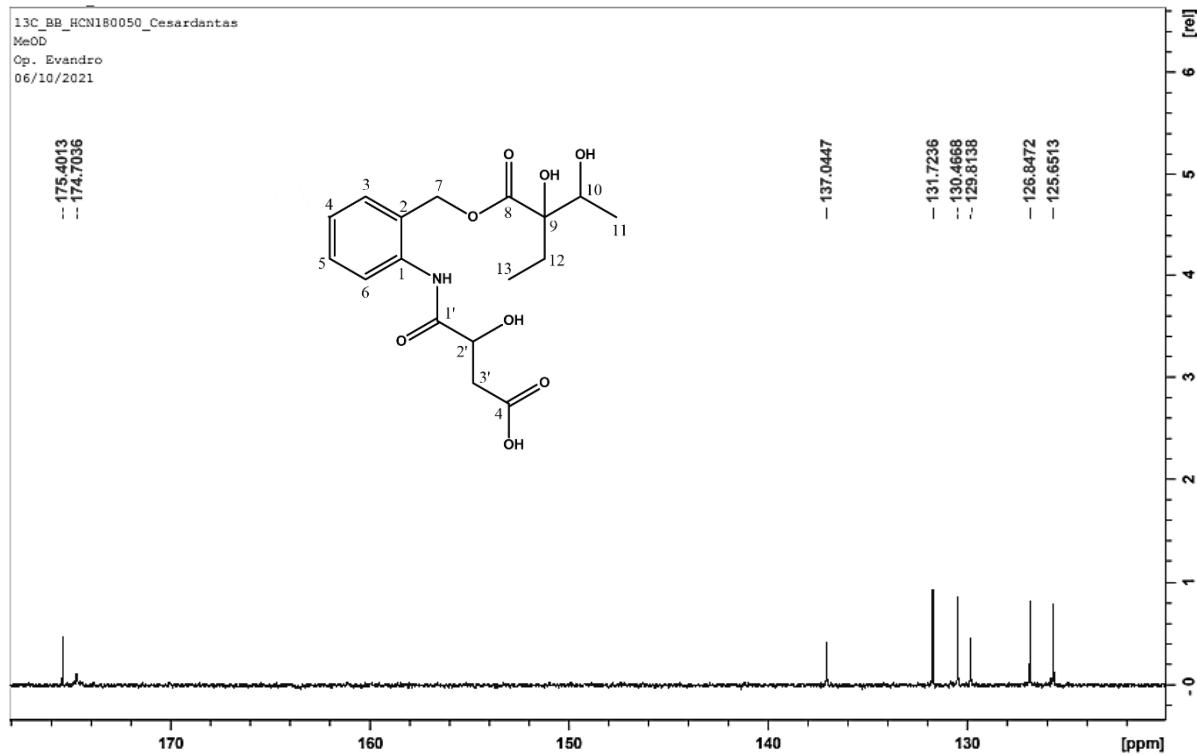


Figura 14 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 10 – 85 ppm.

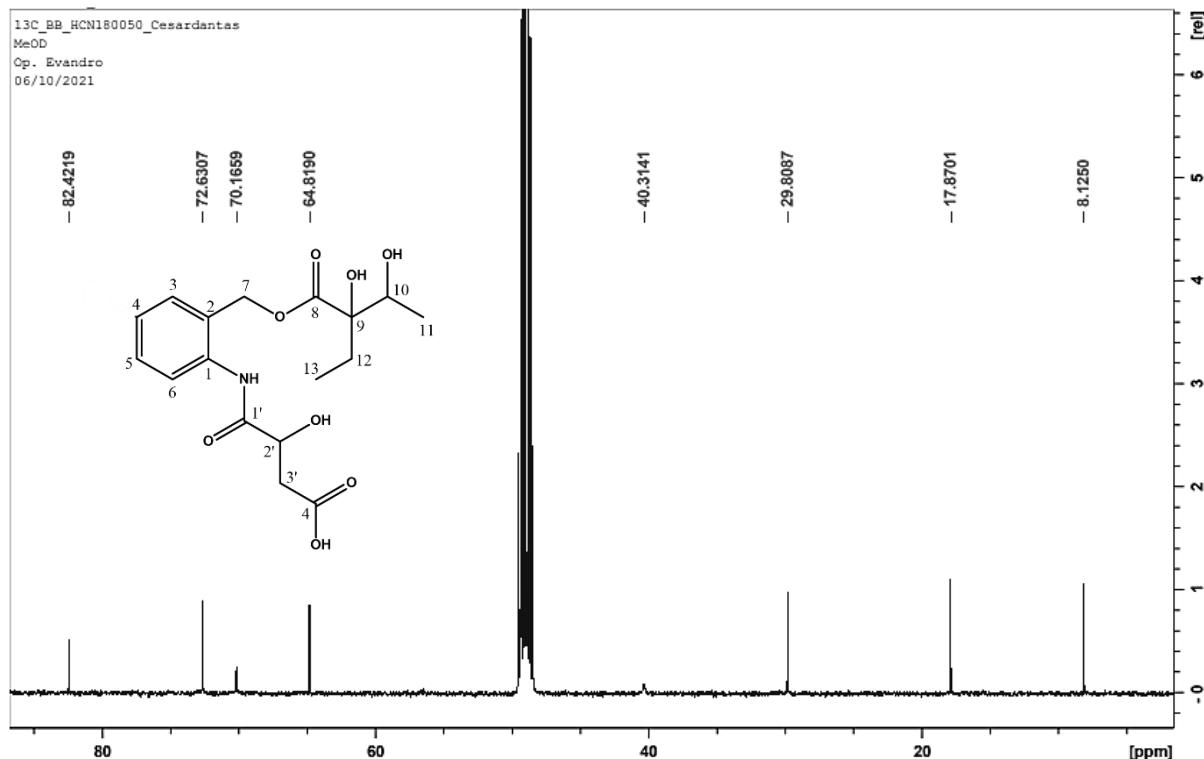


Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C , APT, (125 MHz, CD_3OD) de HNC180050.

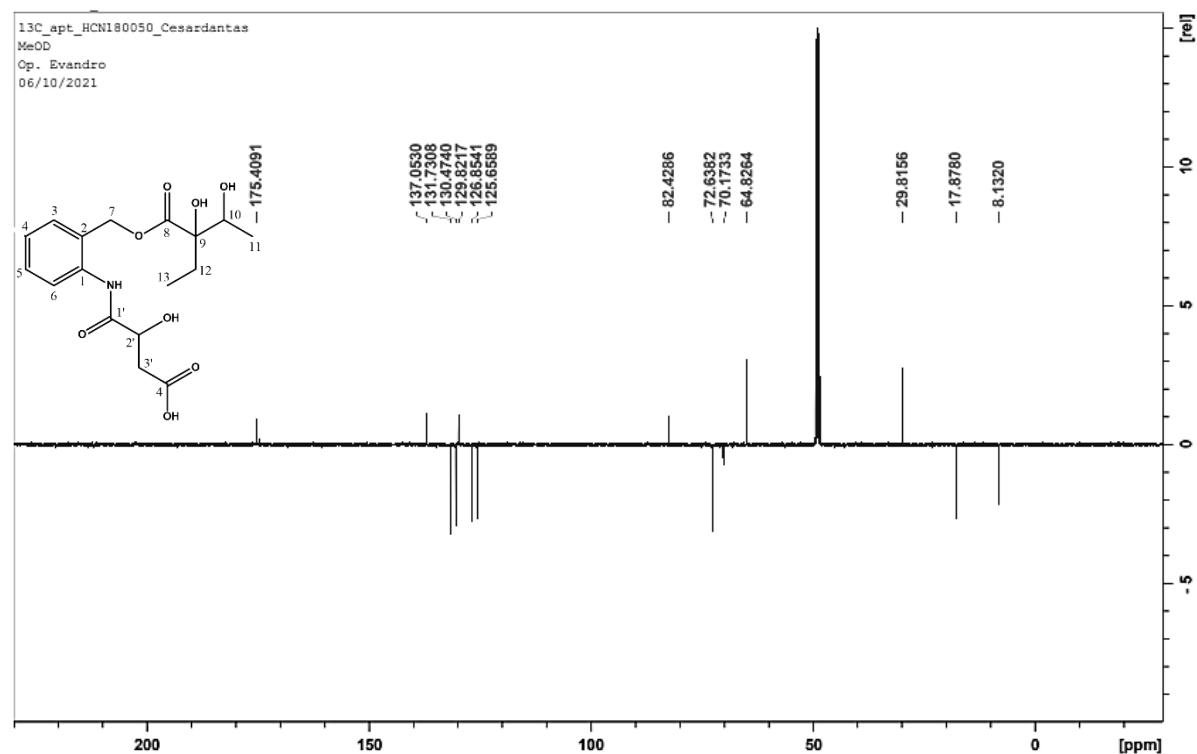


Figura 16 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C , APT, (125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 115 – 180 ppm.

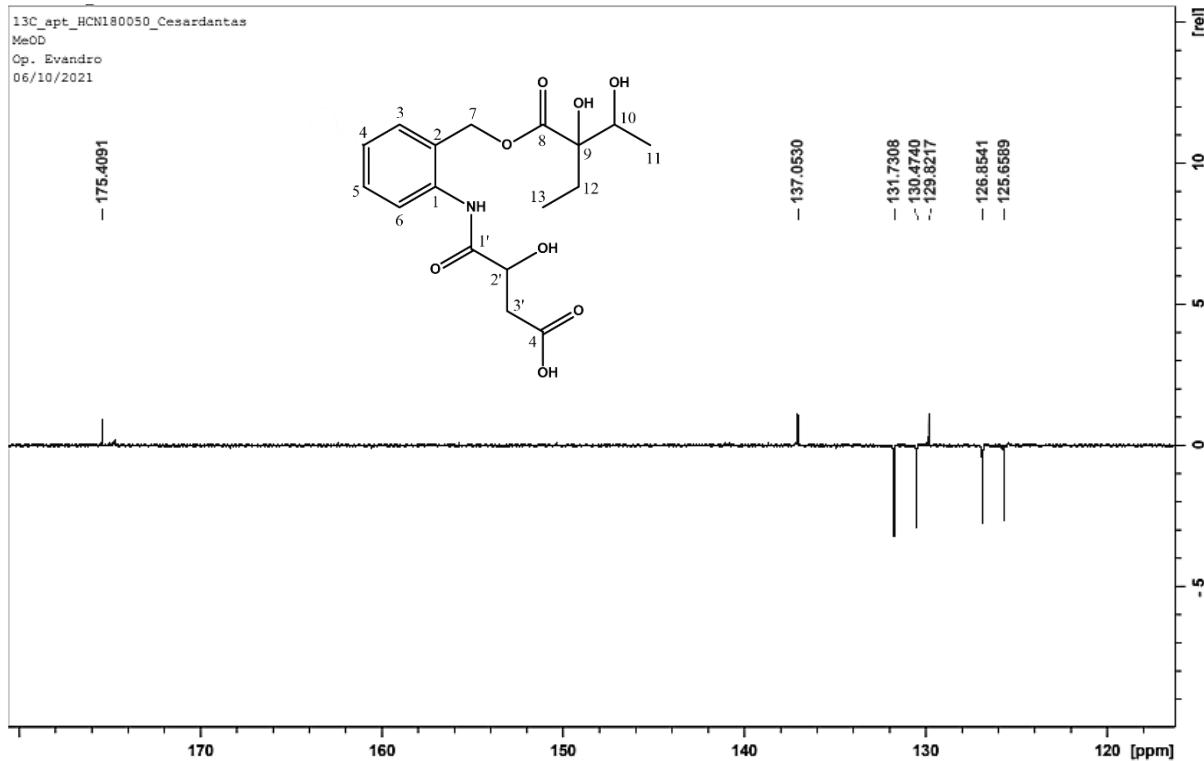


Figura 17 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C , APT, (125 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 0 – 85 ppm.

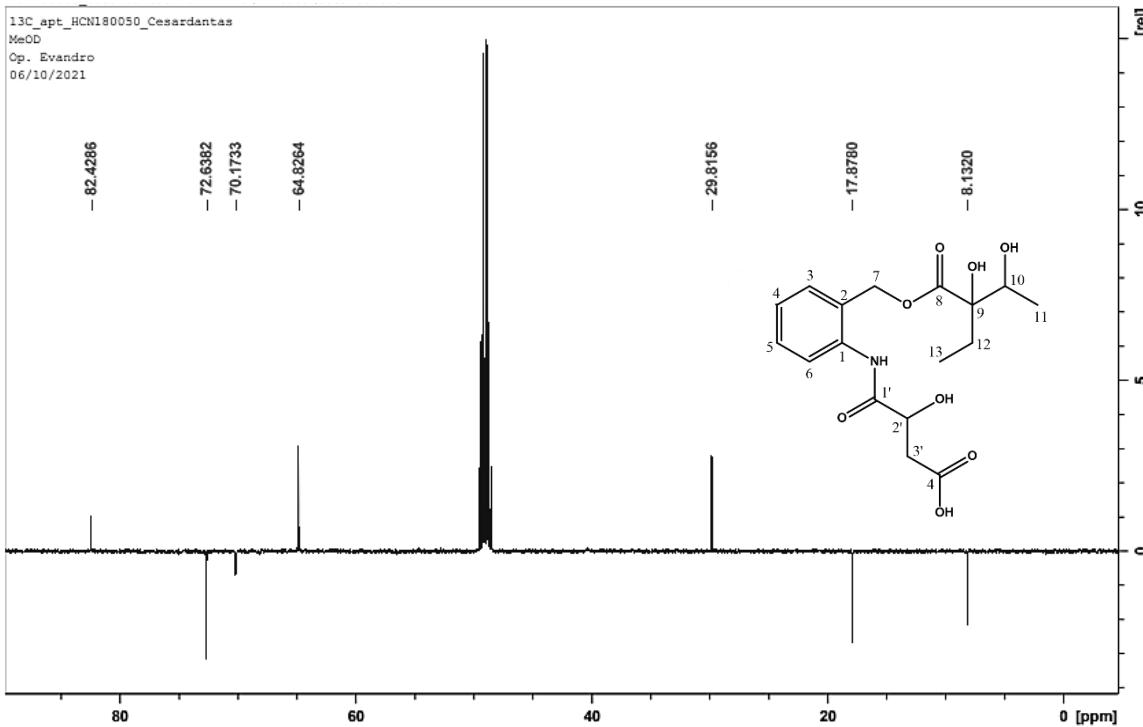


Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD_3OD) de HNC180050.

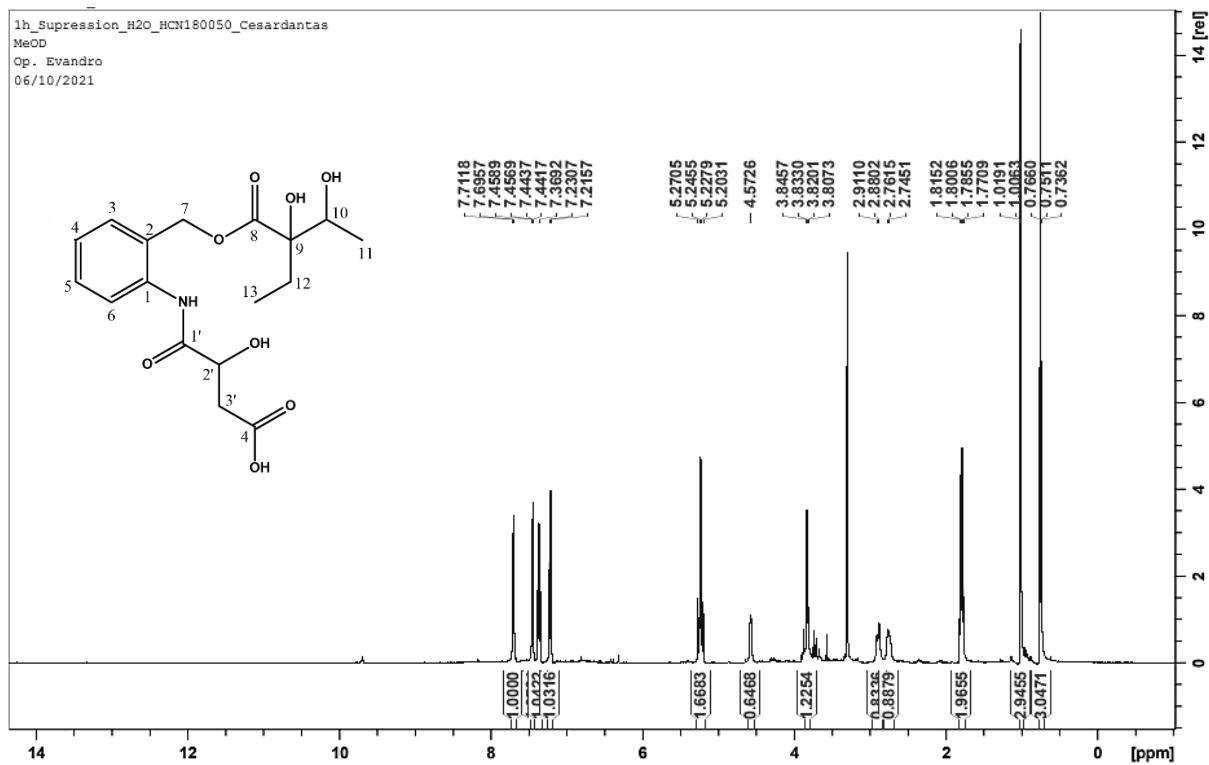


Figura 19 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 6 – 10 ppm.

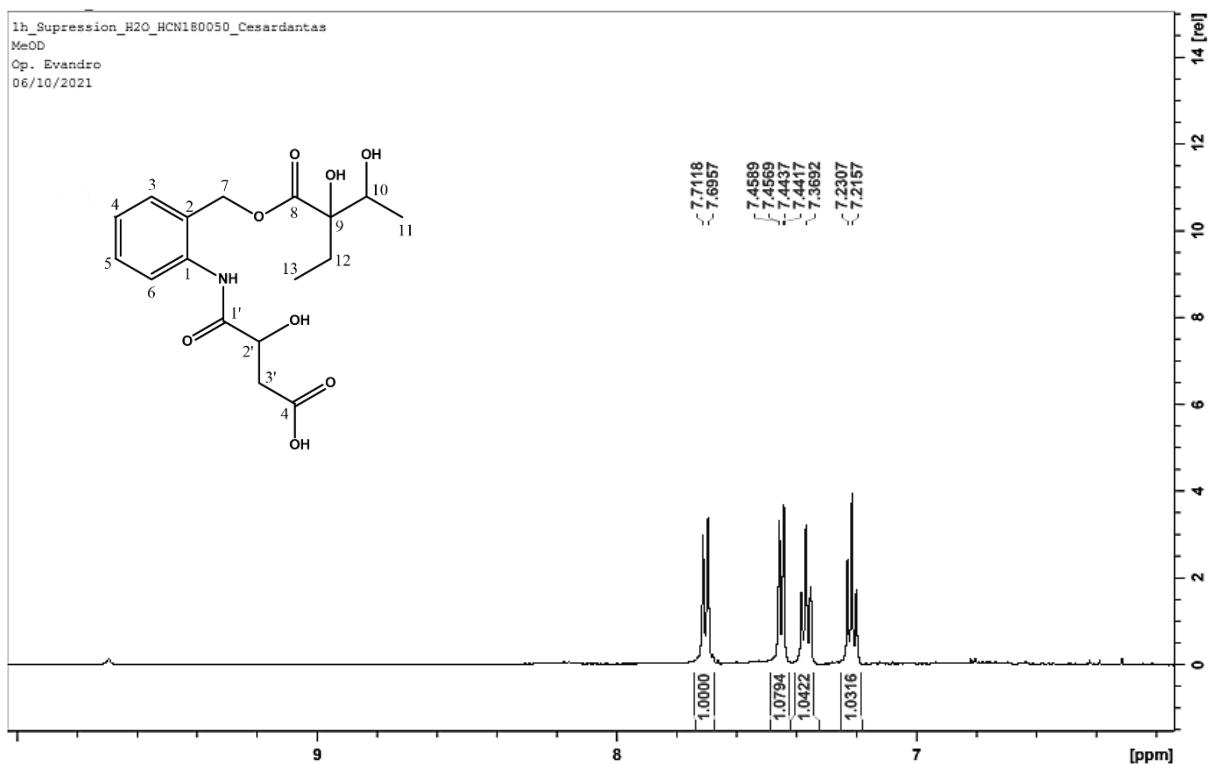


Figura 20 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 2 – 5,5 ppm.

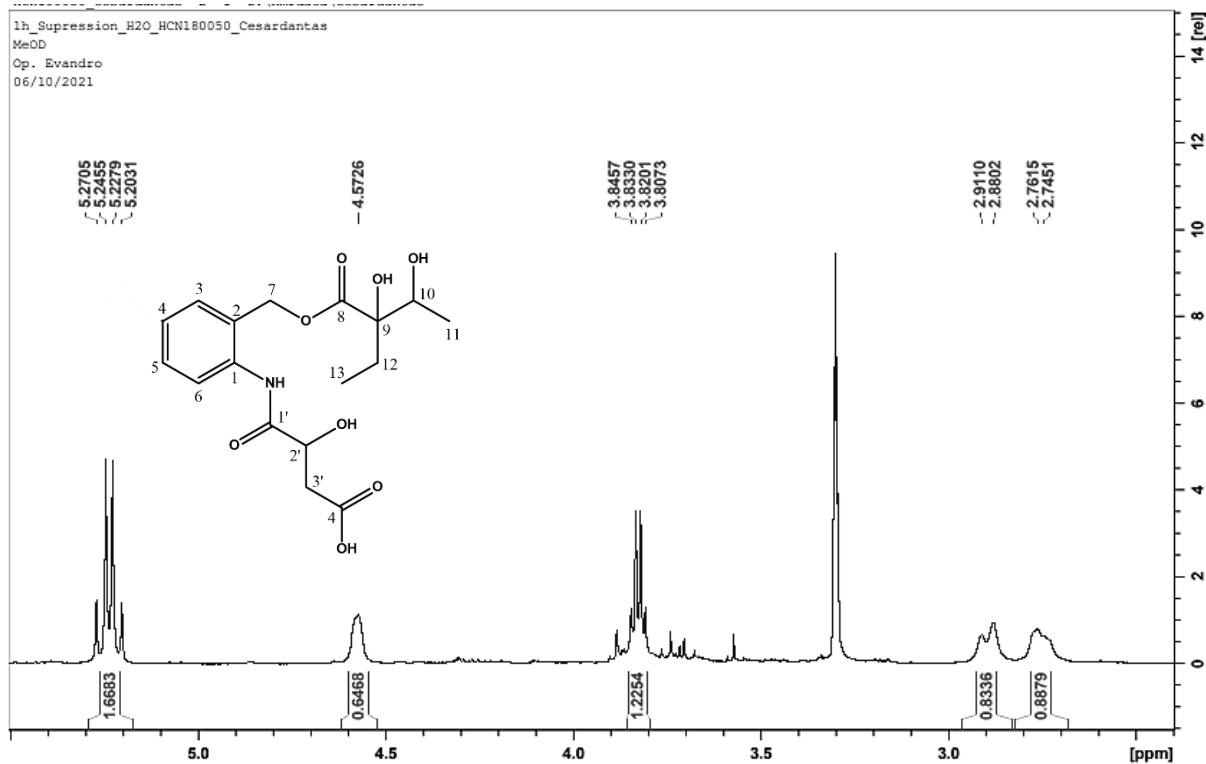


Figura 21 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (500 MHz, CD_3OD) de HNC180050 na região de 0 – 2,5 ppm.

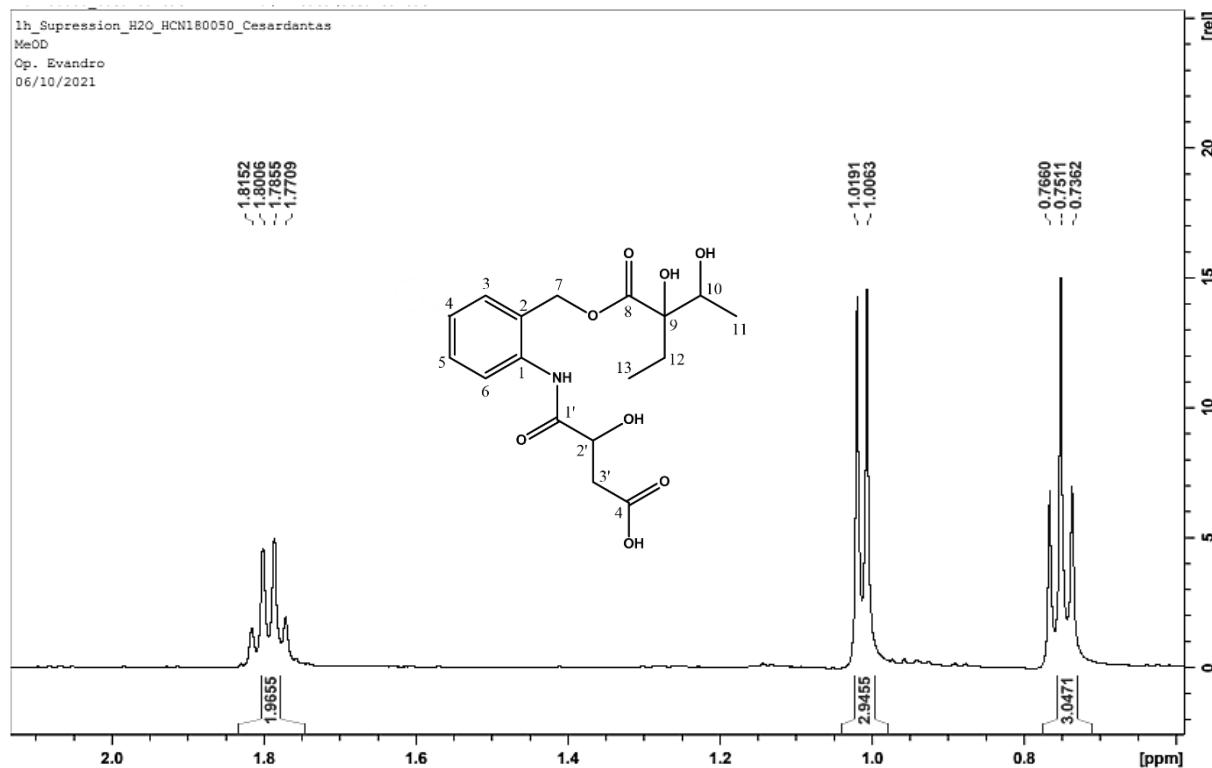


Figura 22- Mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050.

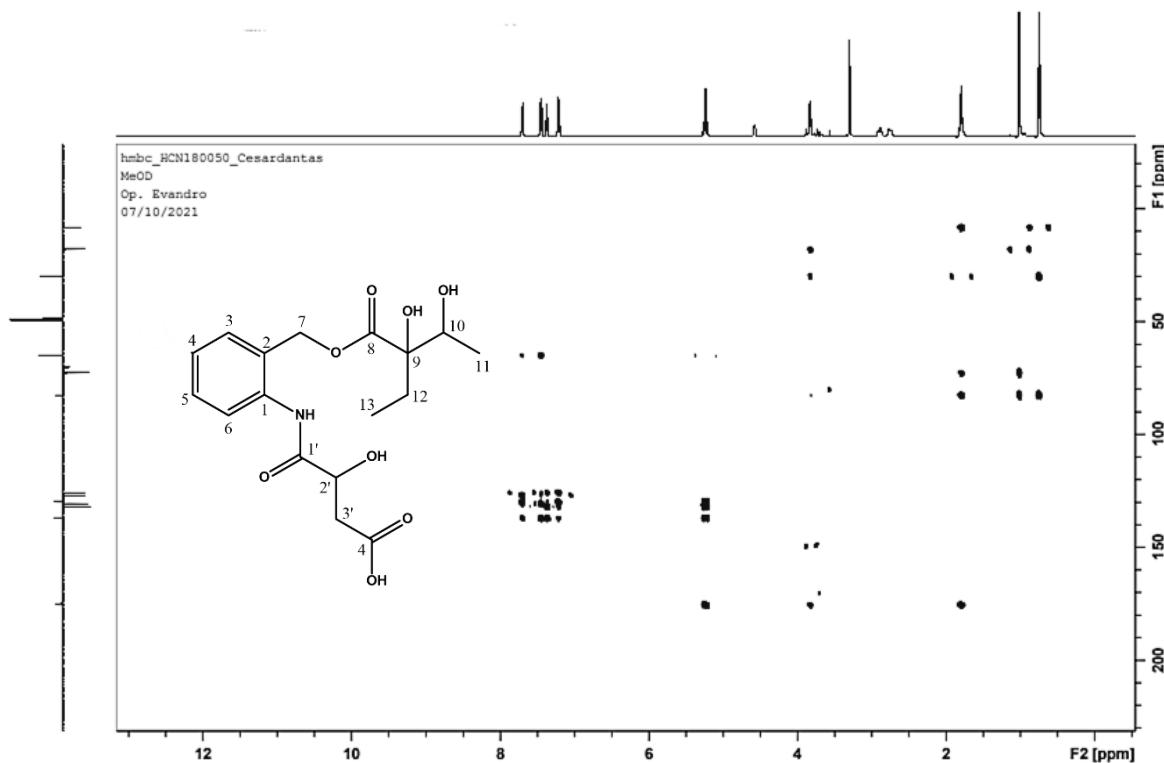


Figura 23 - Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050 na região de (6,0 – 9,0 ppm) x (70,0 – 145,0 ppm)

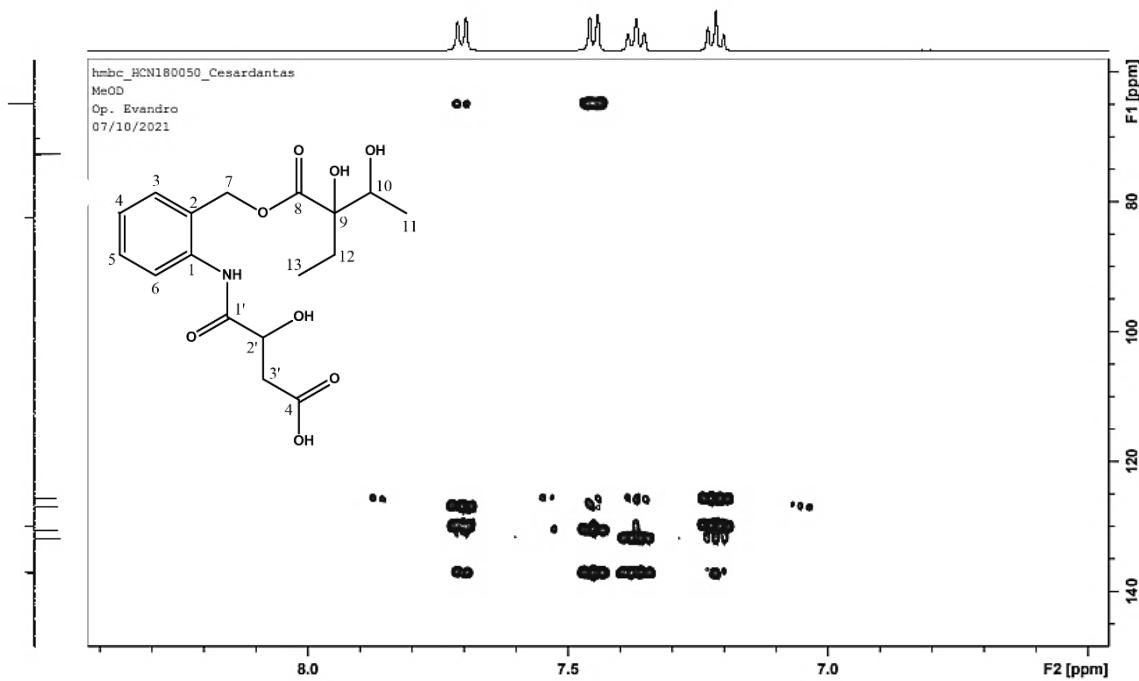


Figura 24 - Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050 na região de (3,0 – 6,0 ppm) x (0,0 – 200,0 ppm)

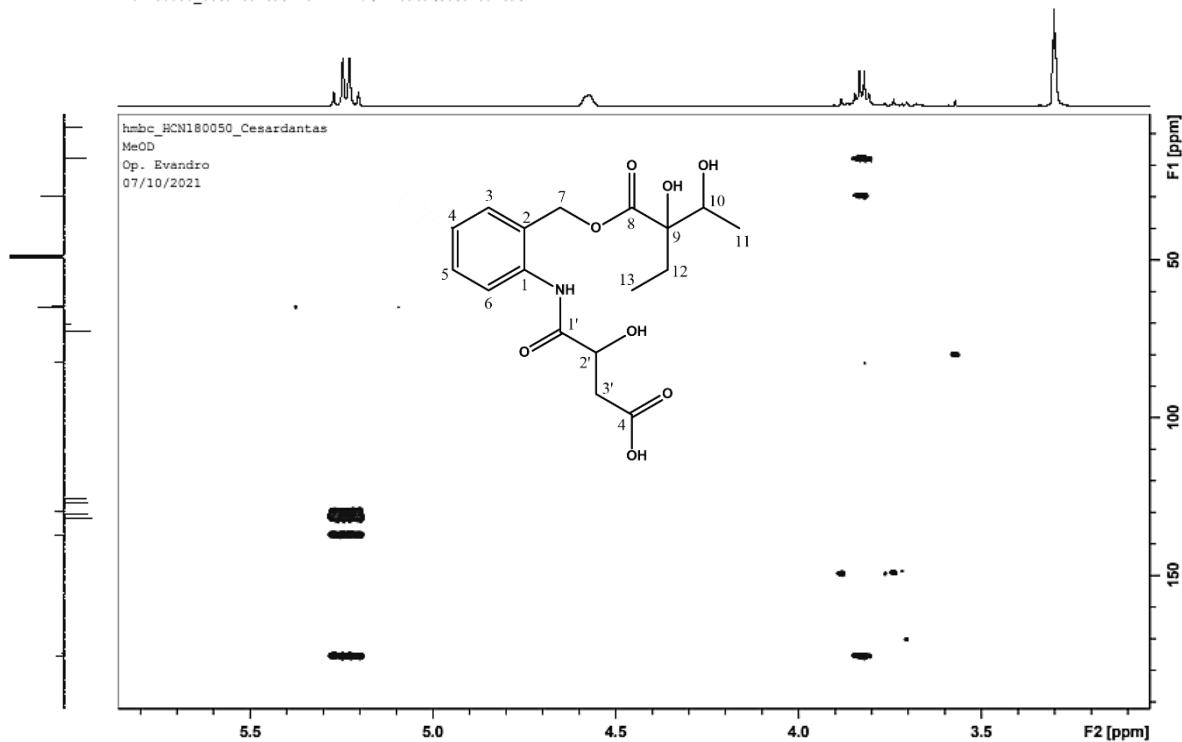


Figura 25 - Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050 na região de (0,0 – 2,5 ppm) x (0,0 – 200,0 ppm)

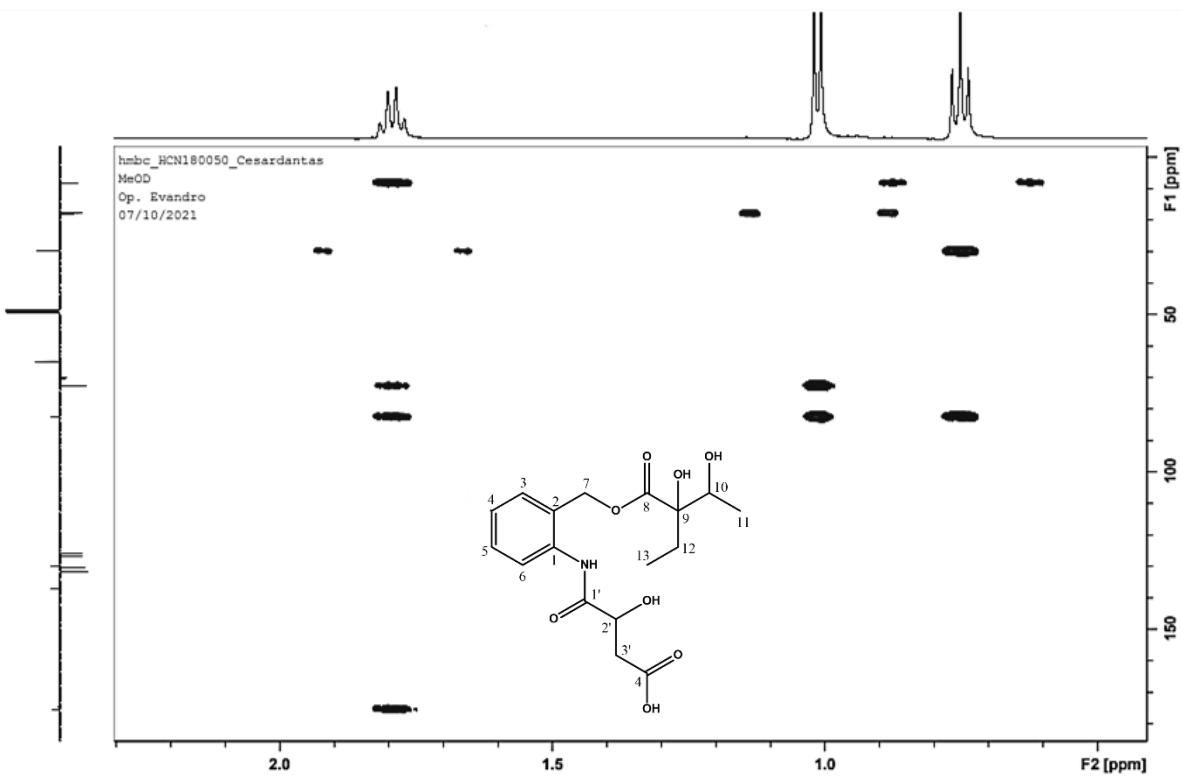


Figura 26 - Expansão do mapa de contornos HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050 na região de (1,0 – 8,0 ppm) x (10,0 – 90,0 ppm)

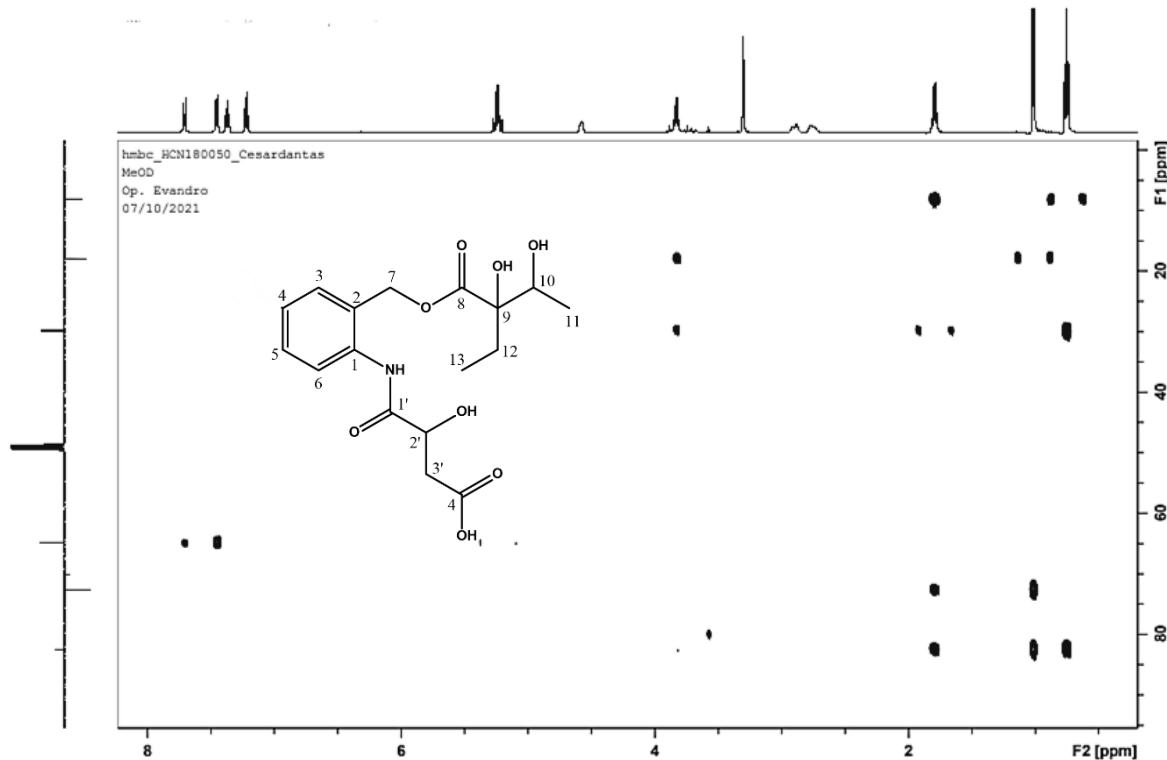


Figura 27 - Mapa de contornos HSQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050 na região de (1,0 – 13,0 ppm) x (0,0 – 200,0 ppm)

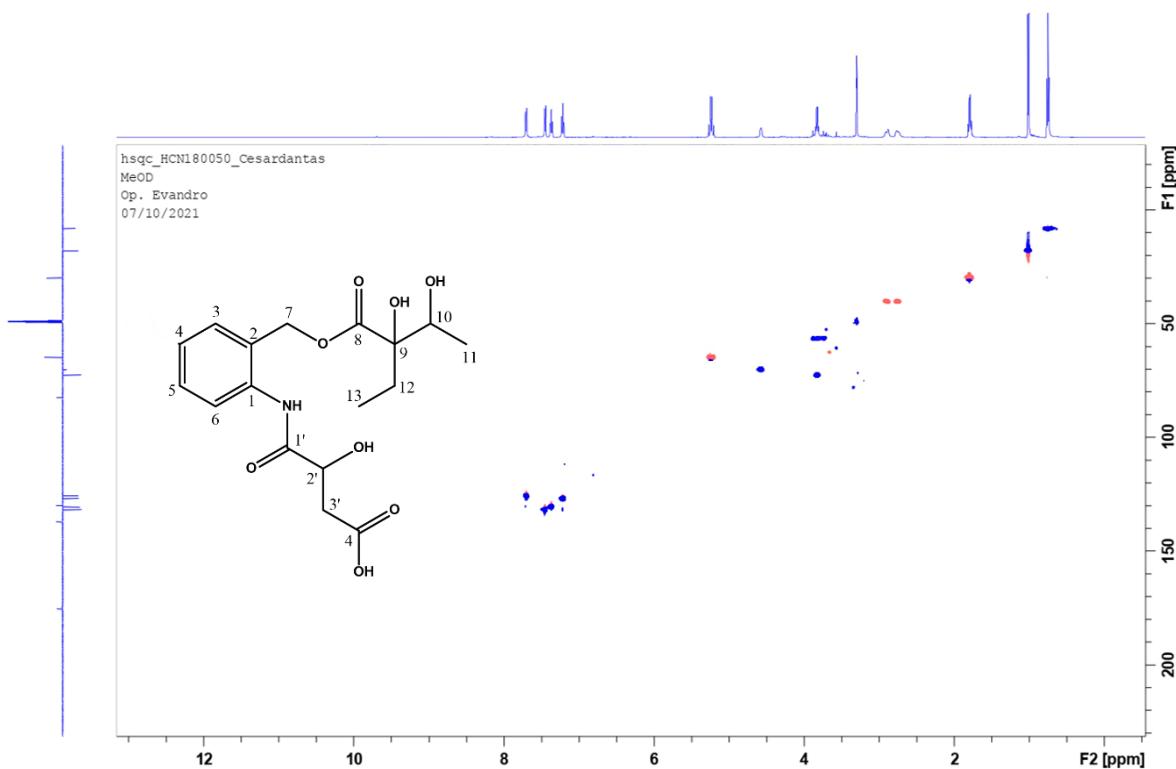


Figura 28 - Expansão do mapa de contornos HSQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050 na região de (6,0 – 9,0 ppm) x (110,0 – 150,0 ppm)

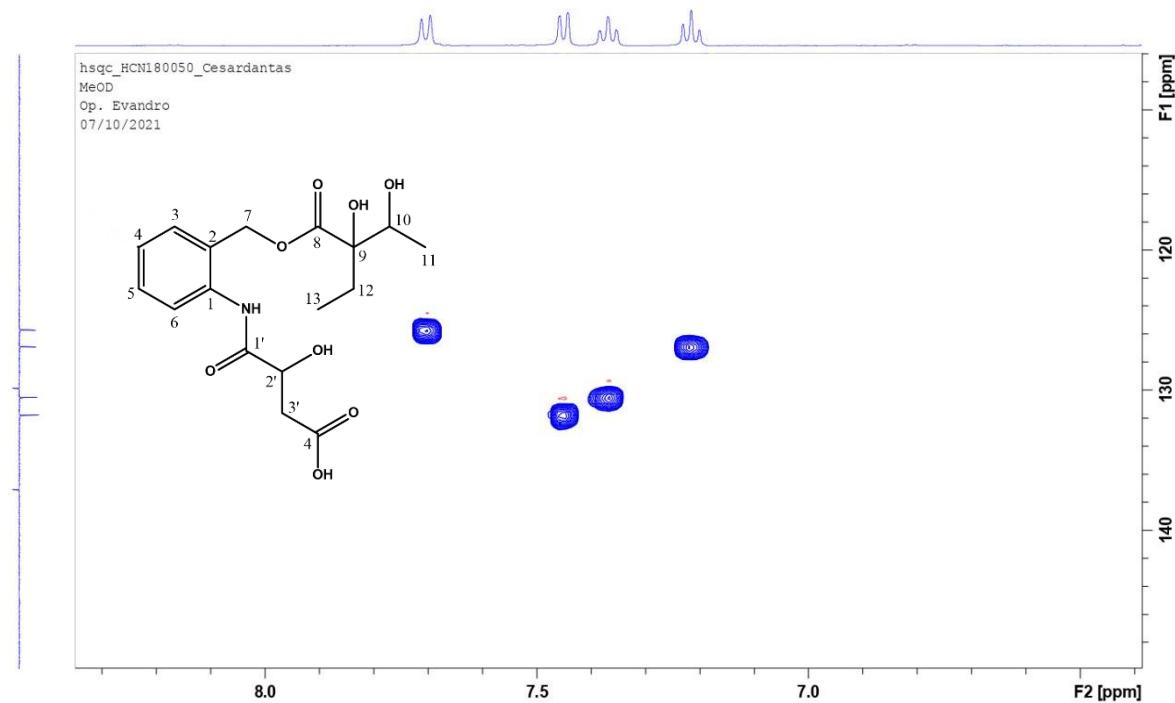
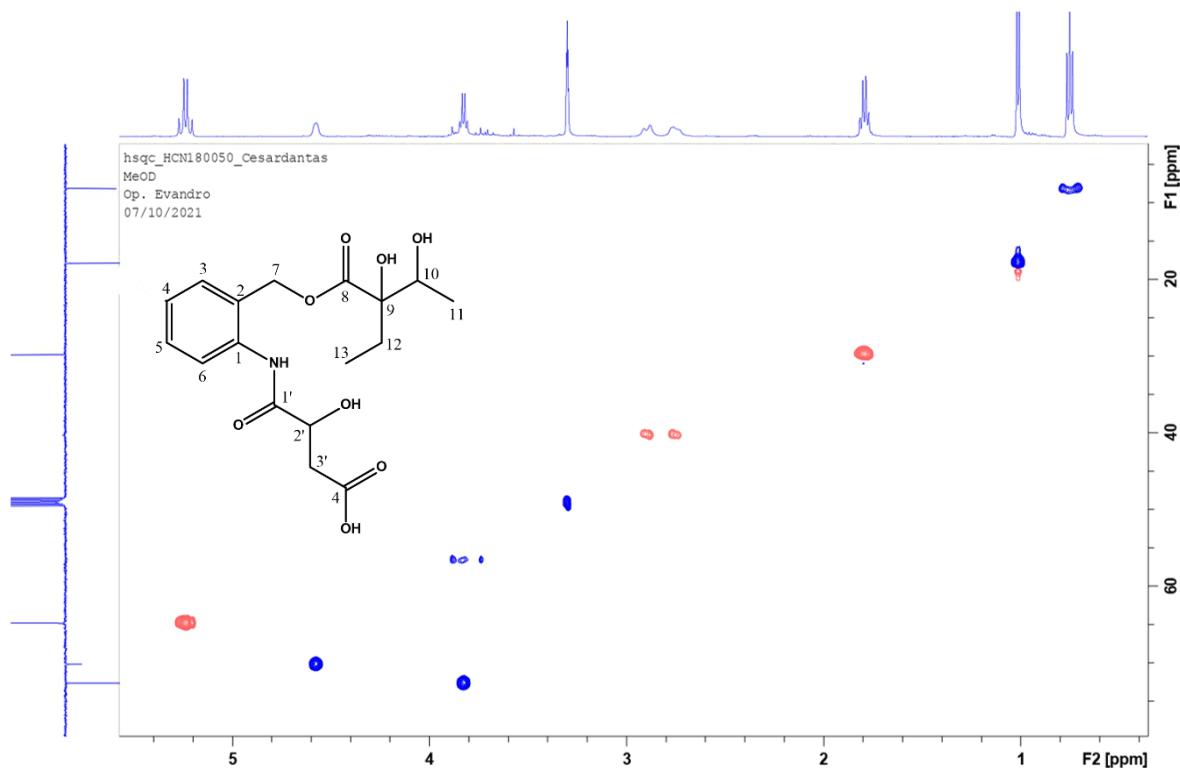


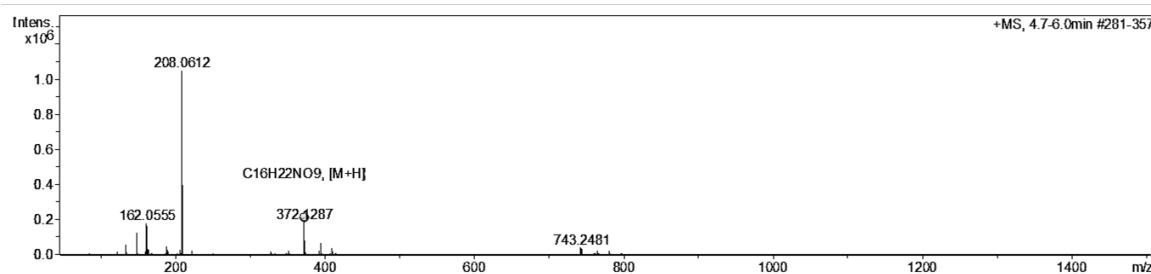
Figura 29 - Expansão do mapa de contornos HSQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de HNC180050 na região de (0,0 – 5,5 ppm) x (0,0 – 80,0 ppm)



5.2. Identificação estrutural de substância 2

A substância 2 (HNC182004) foi isolada na forma de um óleo de coloração castanho com 0,003 g. O espectro de massas obtido mostrou um pico em m/z 371.1216 [M+H] compatível com a fórmula molecular C₁₆H₂₁NO₉.

Figura 30 - Espectro de massas da substância HNC182004



O espectro de RMN de ¹³C na técnica BB (Fig. 32, pág. 59), obtido a 100 MHz em DMSO-*d*₆, e suas expansões (Fig. 33-35, pág. 59-60) apresentaram quatorze deslocamentos químicos, com dois sinais mais intensos, cada um referente a dois átomos de carbonos por estarem compartilhando o mesmo ambiente químico. O deslocamento químico em δ_C 18,15 foi atribuído a dois carbonos metilícios (C-11 e C-13), os sinais em δ_C 64,82 e δ_C 44,60 a carbonos metilênicos (C-7 e C-2', respectivamente e ambos sp³), quatro sinais atribuídos a carbonos metínicos sendo três carbonos aromáticos sp² em δ_C 117,17; δ_C 117,14 e δ_C 129,65 (C-3, C-5, C-6); e dois carbonos sp³ oxigenados (C-10, C-12) provavelmente pela presença de um grupo hidroxila, evidenciados pelo sinal com maior intensidade em δ_C 70,11 (SOUZA et al., 2017).

Carbonos quaternários hidroxilados também foram evidenciados pela presença do sinal em δ_C 84,58 (C-9), os deslocamentos químicos em δ_C 133,85 (C-1) e δ_C 128,10 (C-2) foram atribuídos a carbonos aromáticos, o primeiro estando ligado diretamente a um átomo de nitrogênio. O sinal em δ_C 156,19 (C-4) também atribuído a carbono aromático, sendo este diretamente ligado a um átomo de oxigênio, de um grupo OH. Os deslocamentos químicos em δ_C 117,17; δ_C 117,14 e δ_C 129,65 foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-3, C-5 e C-6, respectivamente, fechando um sistema aromático trissubstituído (SOUZA et al., 2017). Estas e demais atribuições foram reunidas na Tabela .

A presença dos sinais em δ_C 175,15; δ_C 168,83 e δ_C 172,44; característicos de carbonos com ligantes mais eletronegativos, evidenciaram a existência de três carbonos carbonílicos na molécula. Em conformidade com os dados da substância 1, esses deslocamentos químicos foram atribuídos aos carbonos C-8, C1' e C-3', respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2000).

No espectro de RMN de 1H (Fig. 36, pág. 63), obtido a 400 MHz em DMSO- d_6 , e em suas expansões (Fig. 37-40, pág. 61-63), observou-se a presença de sete deslocamentos químicos, sendo dois destes sinais equivalentes a dois grupos de hidrogênios de unidade, uma vez que estão no mesmo ambiente químico. Analisando estes sinais, foi observado a presença de três deslocamentos característicos de um sistema aromático ABX, sendo um duplo dupletos (dd) em δ_H 6,72 ($J = 9,0; 3,0$ Hz) acoplando em meta com o dupletos em δ_H 6,84 ($J = 3,0$ Hz) e em orto com outro dupletos em δ_H 7,07 ($J = 9,0$ Hz), confirmando a presença de um anel aromático trissubstituído, e foram atribuídos nesta ordem aos hidrogênios H-5, H-3 e H-6. Também foram observados sinais correspondentes a presença de hidrogênios oximetínicos e metílicos sendo estes um quarteto em δ_H 3,88 ($J = 6,5$; integrando para dois hidrogênios, H-10 e H-12) e um dupletos em δ_H 0,97 ($J = 6,5$; integrando para seis hidrogênios, H-11 e H-13), e a partir desses sinais pode-se deduzir a presença de duas unidades hidroxi-etil na molécula (SOUZA et al., 2017).

Os singletos (s) em δ_H 4,99 e em δ_H 3,28 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-7 e H-2', o maior deslocamento químico desses prótons é justificado pela anisotropia dos grupos carbonílicos aos quais seus carbonos estão ligados, uma vez que os oxigênios dessas carbonilas exercem um maior efeito de desblindagem sobre eles (PAVIA et al., 2015).

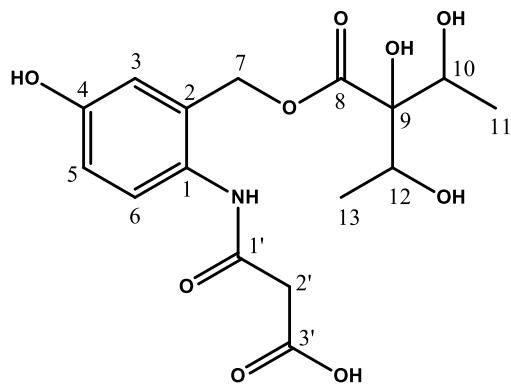
Por meio do mapa de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC) foram realizados os assinalamentos das atribuições dos sinais de prótons e carbono. O mapa de contornos do espectro do HMBC (Fig. 45, pág. 65) exibiu correlações entre os sinais de hidrogênios δ_H 6,84 (H-3), δ_H 7,07 (H-6), δ_H 6,72 (H-5) com o sinal de carbono em δ_C 156,19 confirmado assim a posição de inserção da hidroxila em C-4.

As correlações entre os sinais de hidrogênio em δ_H 4,99 (H-7) e de carbono em δ_C 117,17 (C-3), δ_C 133,85 (C-1), δ_C 128,10 (C-2) confirmaram a inserção do C-7 no sistema aromático, sendo observado também a correlação de H-7 com o carbono

carbonílico com sinal em δ_C 175,15; confirmando a posição da carbonila em C-8. Também foram observadas correlações entre os hidrogênios ligados aos carbonos oximetínicos com sinal em δ_C 84,58 referente ao C-9 a duas ligações, e correlações entre esses hidrogênios a três ligações com sinal de carbono em δ_C 175,15 referente ao carbono da carbonila (C-8) sendo estes H-10 e H-12 confirmando a inserção dessas unidades hidróxi-etyl no carbono quaternário C-9.

A análise dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear direta (HSQC) (Fig. 53, pág. 69) possibilitou a atribuição de deslocamentos químicos relacionados a carbonos hydrogenados. Foi possível observar a correlação entre os sinais em δ_H 6,84 com δ_C 117,17; δ_H 6,72 com δ_C 117,14 e δ_H 7,07 com δ_C 129,65; referente aos carbonos C-3, C-5 e C-6 respectivamente, comprovando o anel trissubstituído. As correlações entre δ_H 0,97 com δ_C 18,15 confirmaram os carbonos metílicos C-11 e C-13. Já a correlação entre os deslocamentos em δ_H 3,28 com δ_C 44,60 confirmaram o carbono metilênico C-2'. A correlação entre os sinais δ_H 3,88 com δ_C 70,11 foram atribuídos ao carbono oxigenado C-12. Todas as atribuições encontram-se reunidas na Tabela.

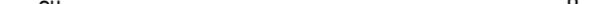
A partir da análise dos dados espectrais junto aos dados da literatura foi possível identificar a substância HNC182004 como Brazóide F, confirmando assim que se trata de um composto nunca antes relatado na literatura, sendo este o primeiro estudo a conseguir isolar e descrever a sua elucidação estrutural.



Estrutura do Brazóide F

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e bidimensionais (HMBC e HMQC) (500 e 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004, brazóide F, em comparação aos dados obtidos na tabela brazóide E.

Posição	HMQC		HMBC		Brazóide E	
	δ_H BRAZOIDE F	δ_C BRAZOIDE F	$\delta_C \times \delta_H$		δ_H	δ_C
1	-	133,85	H-6; 2H-7	-	-	129,82
2	-	128,10	H-3; 2H-7; H-5 ($^4J_{CH}$); H-6	-	-	137,45
3	6,84 (1H; d; $J = 3,0$ Hz)	117,17	2H-7	7,70 (1H; d; $J = 8,0$ Hz)	-	120,85
4	-	156,19	H-3; H-5; H-6	7,37 (1H; t; $J = 8,0$ Hz)	-	130,47
5	6,72 (1H; dd; $J = 9,0$; 3,0 Hz)	117,14	H-3	7,23 (1H; t; $J = 8,0$ Hz)	-	125,06
6	7,07 (1H; d; $J = 9,0$ Hz)	129,65	-	7,45 (1H; d; $J = 7,5$ Hz)	-	131,73
7	4,99 (2H; s)	64,82	H-3	5,24 (1H; d; $J = 12,5$ Hz) 5,22 (1H; d; $J = 12,5$ Hz)	-	64,83
8	-	175,15	2H-7; H-10; 2H-12	-	-	175,41
9	-	84,58	3H-11; 3H-13	-	-	82,43
10	3,88 (2H; q; $J = 6,5$ Hz)	70,11	3H-11	3,83 (1H; q; $J = 6,4$ Hz)	-	72,64
11	0,97 (3H; d; $J = 6,5$ Hz)	18,15	H-10	1,05 (3H; d; $J = 6,4$ Hz)	-	17,83
12	3,88 (2H; q; $J = 6,5$ Hz)	70,11	3H-13	1,79 (2H; q; $J = 7,3$ Hz)	-	29,81
13	0,97 (3H; d; $J = 6,5$ Hz)	18,15	H-11	0,75 (3H; t; $J = 7,3$ Hz)	-	8,13
1'	-	168,83	2H-2'	-	-	174,70
2'	3,28 (1H; s)	44,60	-	4,57 (1H; br s)	-	70,17
3'	-	172,44	2H-2'	2,90 (1H; br d; $J = 15,4$ Hz) 2,75 (1H; m)	-	40,34
4'	-	-	-	-	-	175,43

Figura 31– Estruturas químicas do composto isolado Brazóide F (**1**) e do composto referência Brazóide E (**2**). 

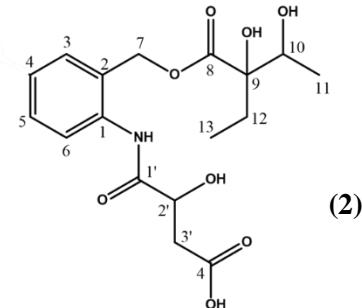
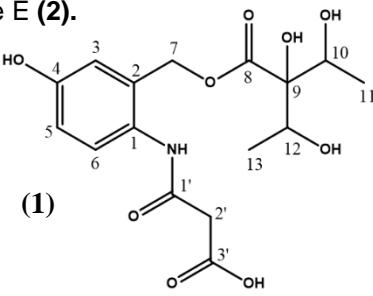


Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004.

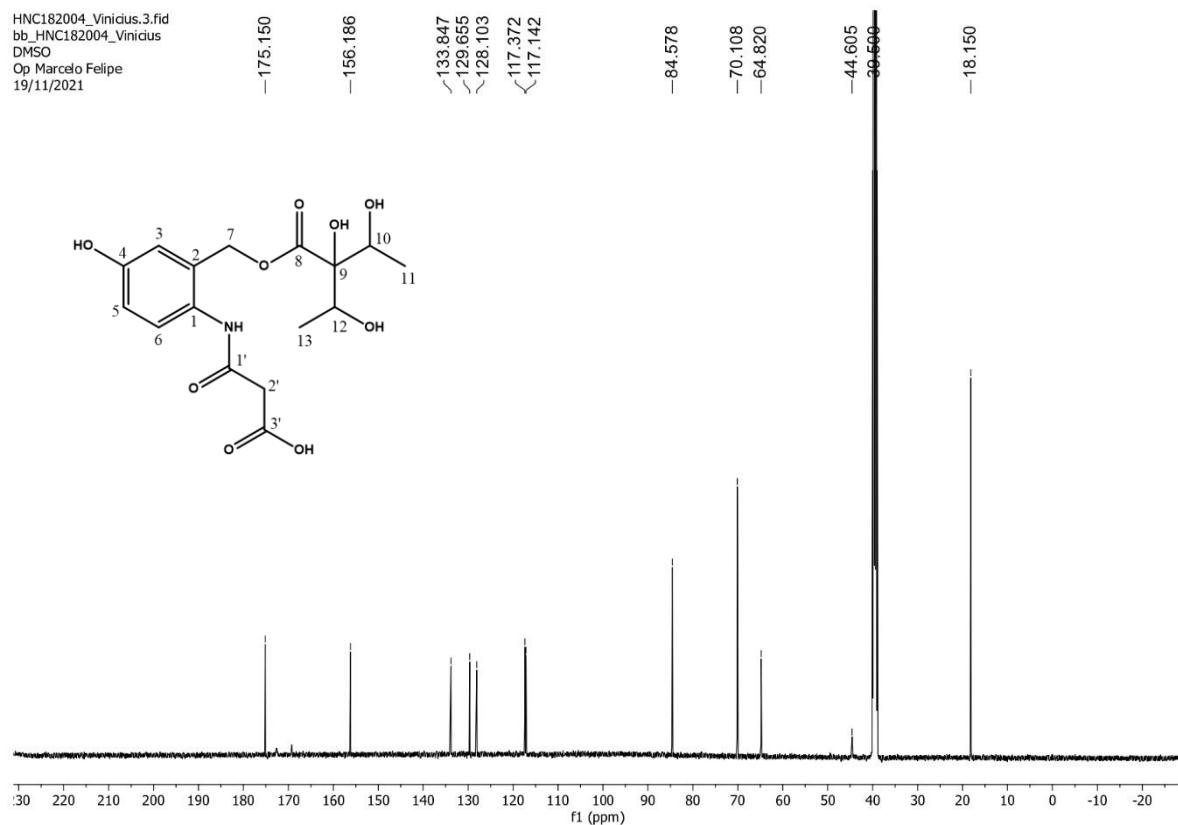


Figura 33 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 150 – 187 ppm

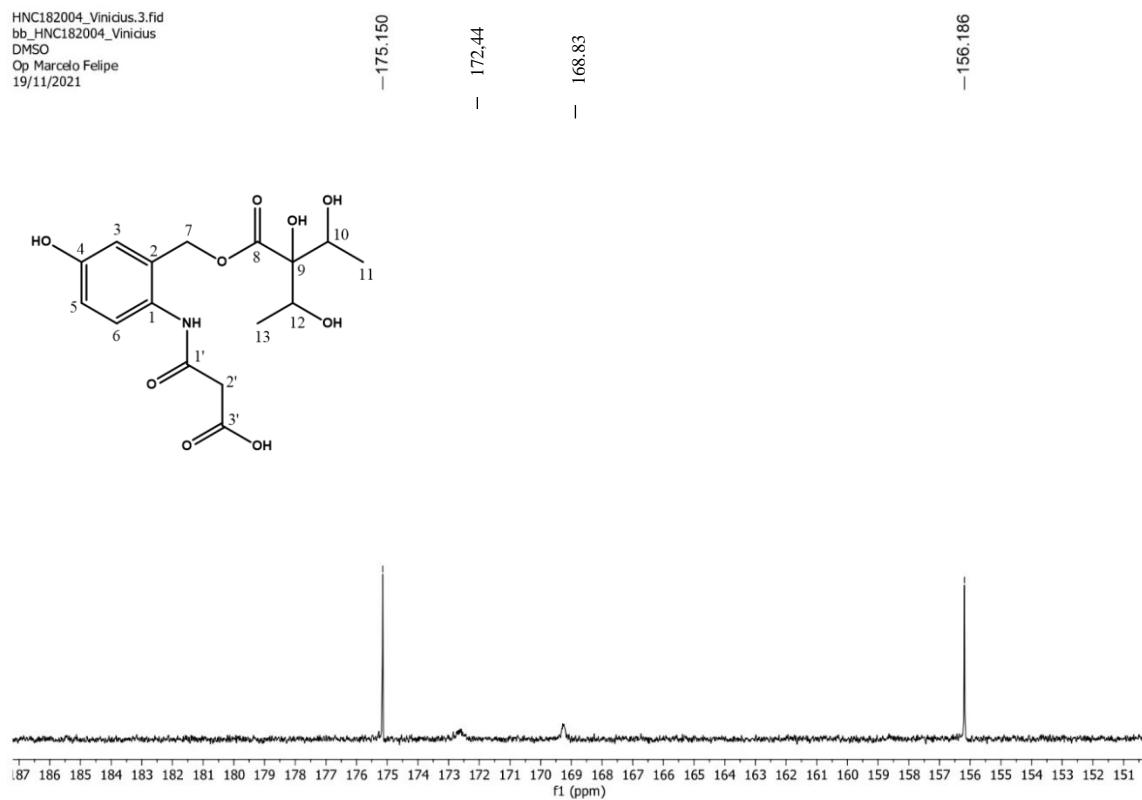


Figura 34- Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 107 – 145 ppm.

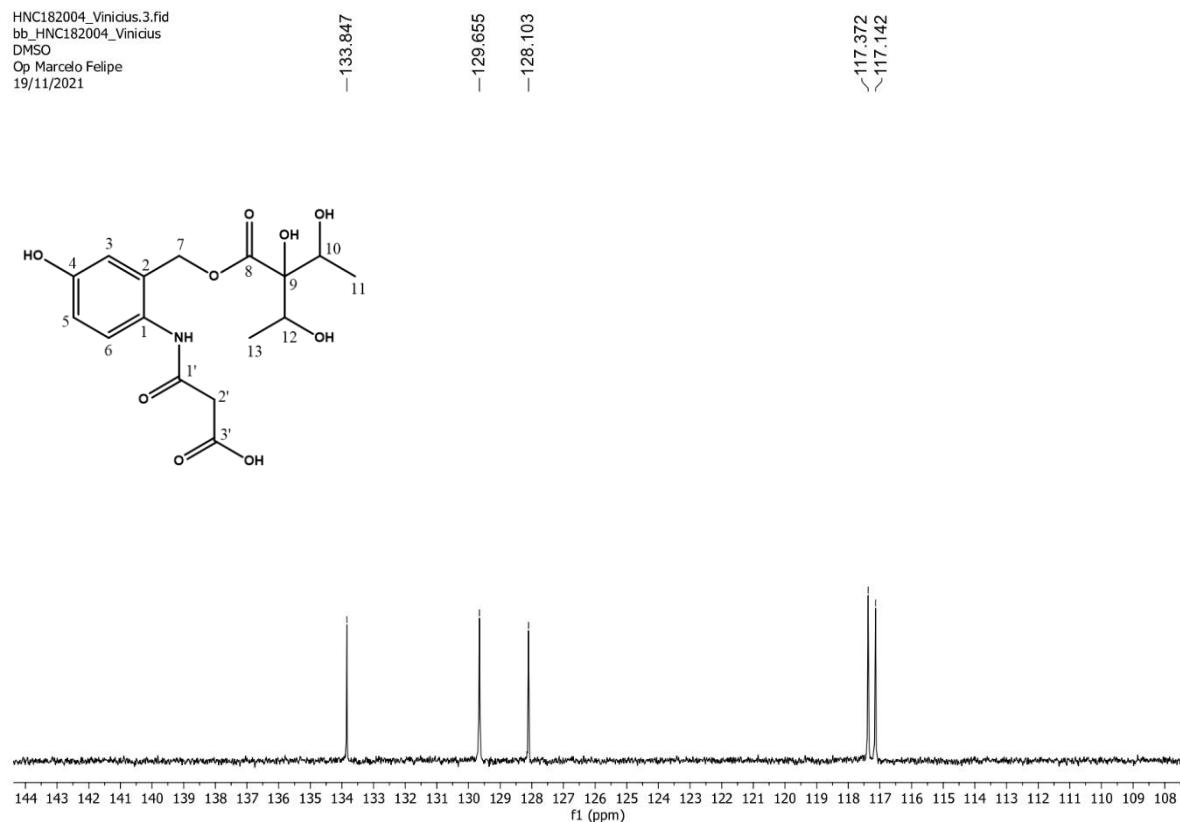


Figura 35 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 10 – 105 ppm.

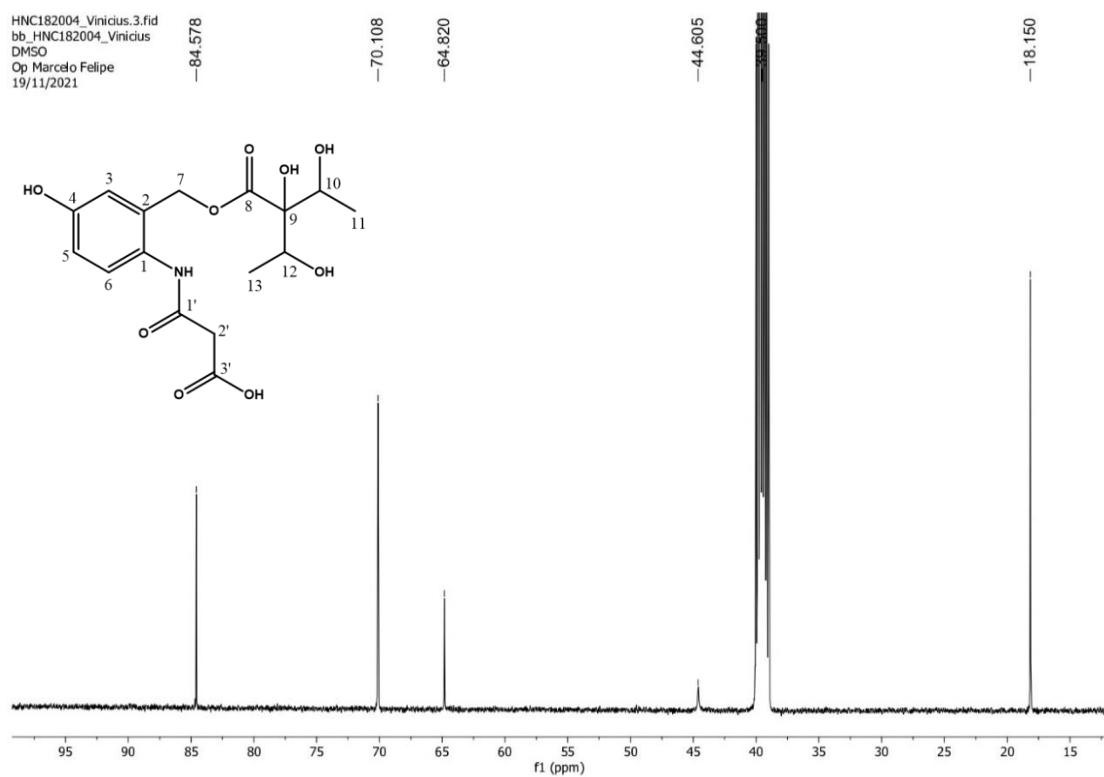


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004.

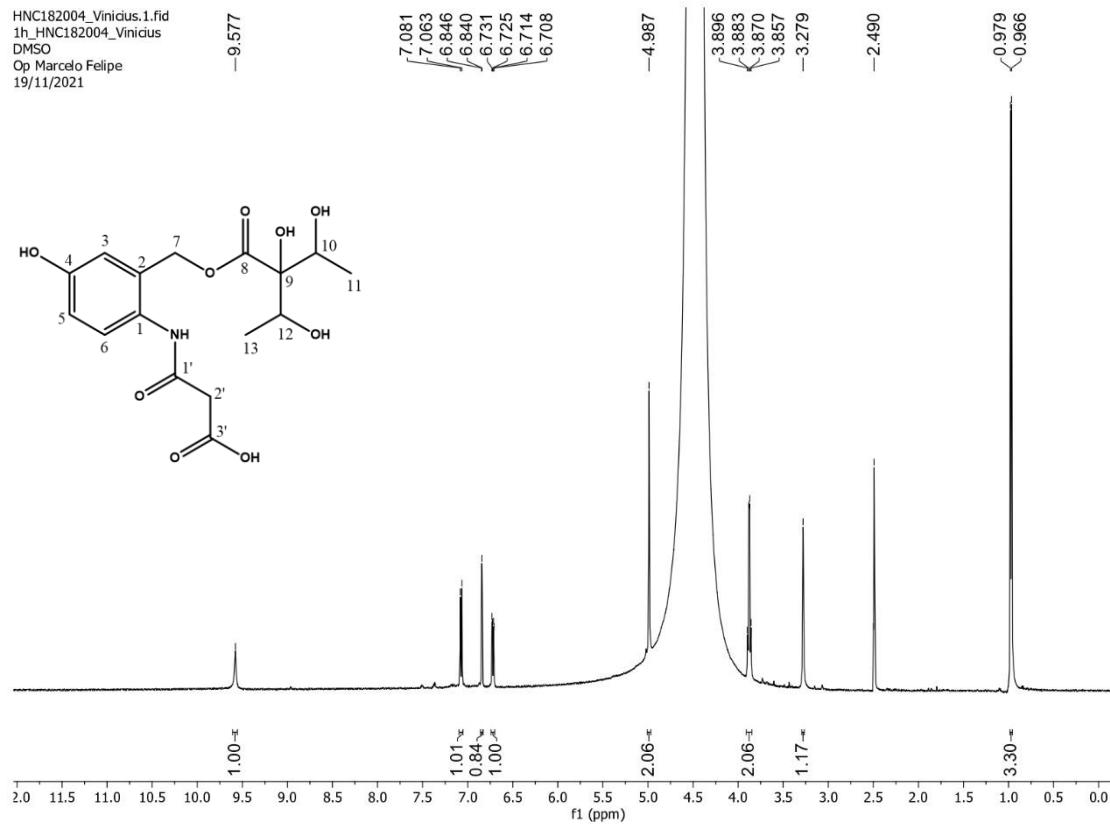


Figura 37 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 6,5 – 7,3 ppm.

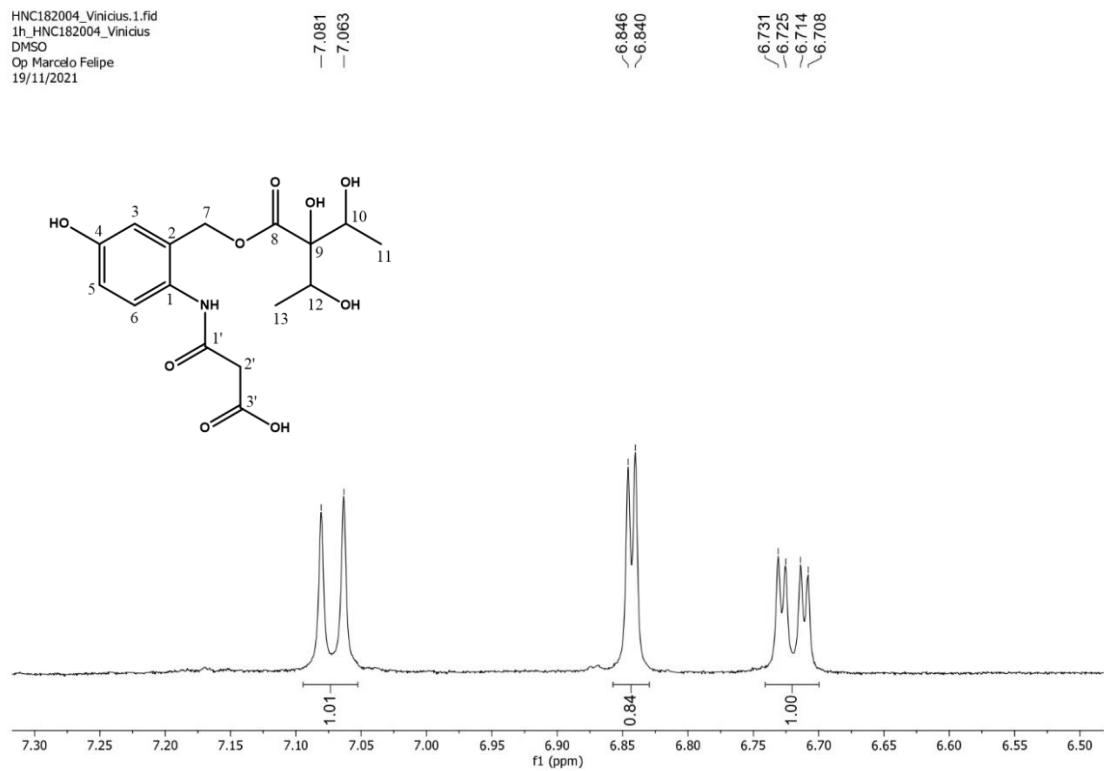


Figura 38 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 3,2 – 5,3 ppm.

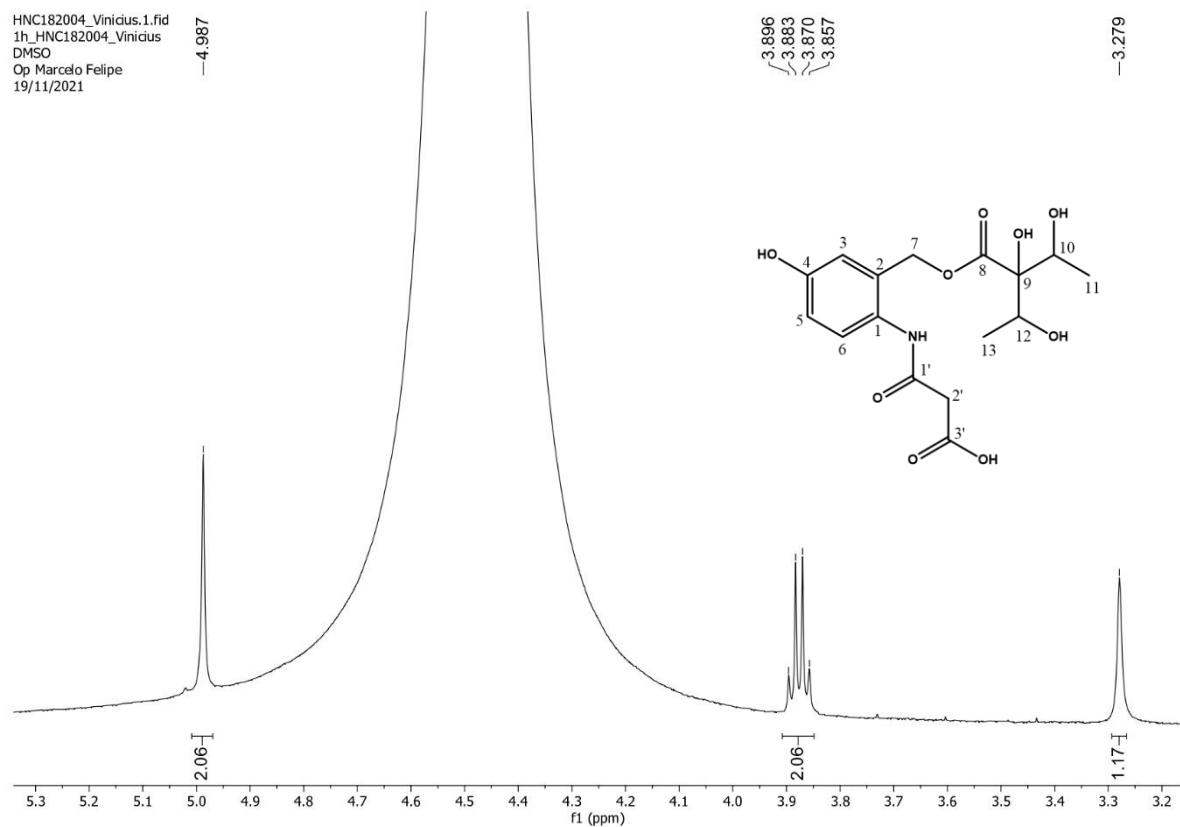


Figura 39 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de 2,4 – 4,2 ppm.

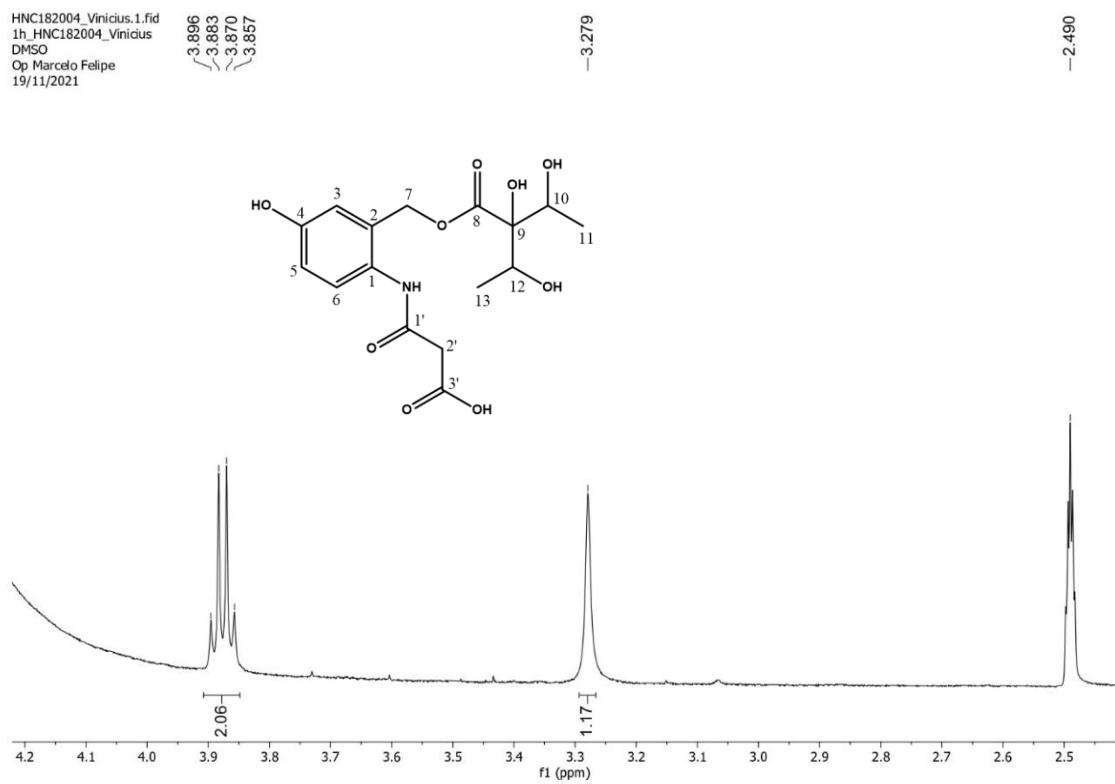


Figura 40 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004 na região de 0,2 – 2,0 ppm.

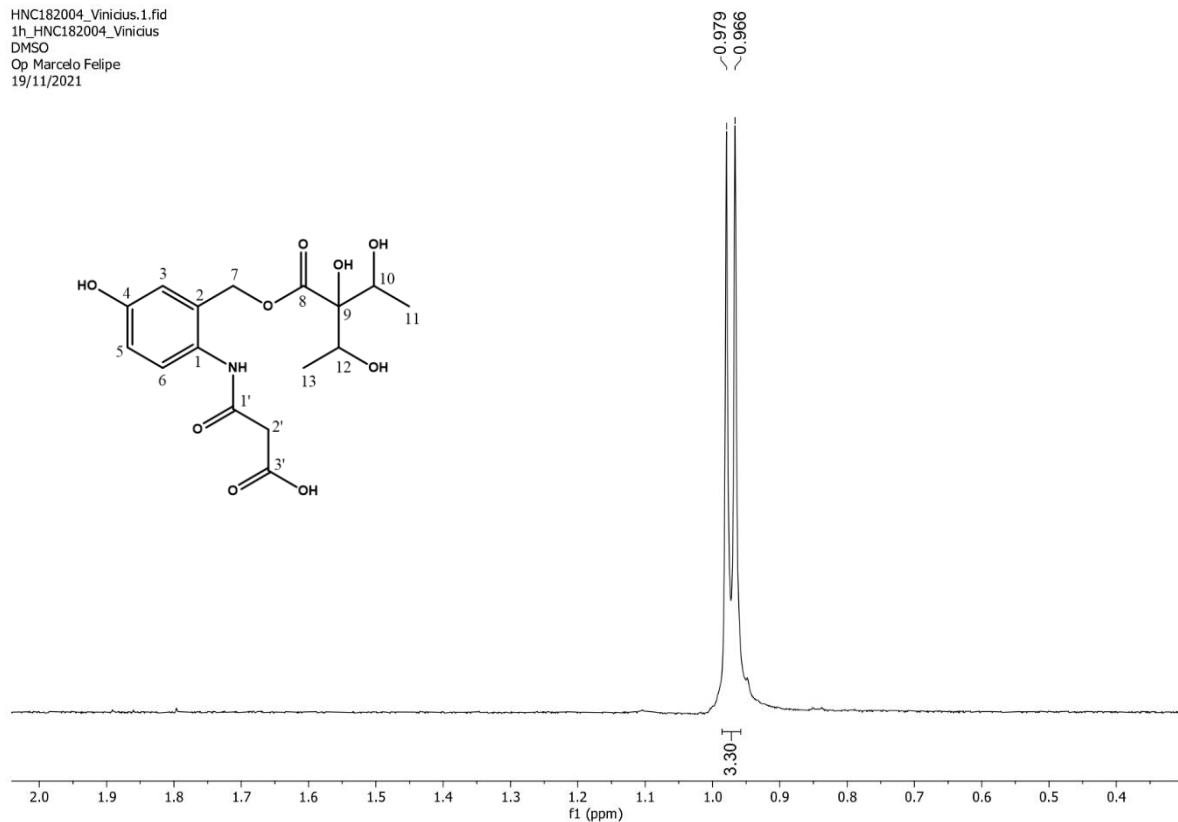


Figura 41 - Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182004.



Figura 42 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (6,5 – 7,5 ppm) x (110,0 – 165,0 ppm)

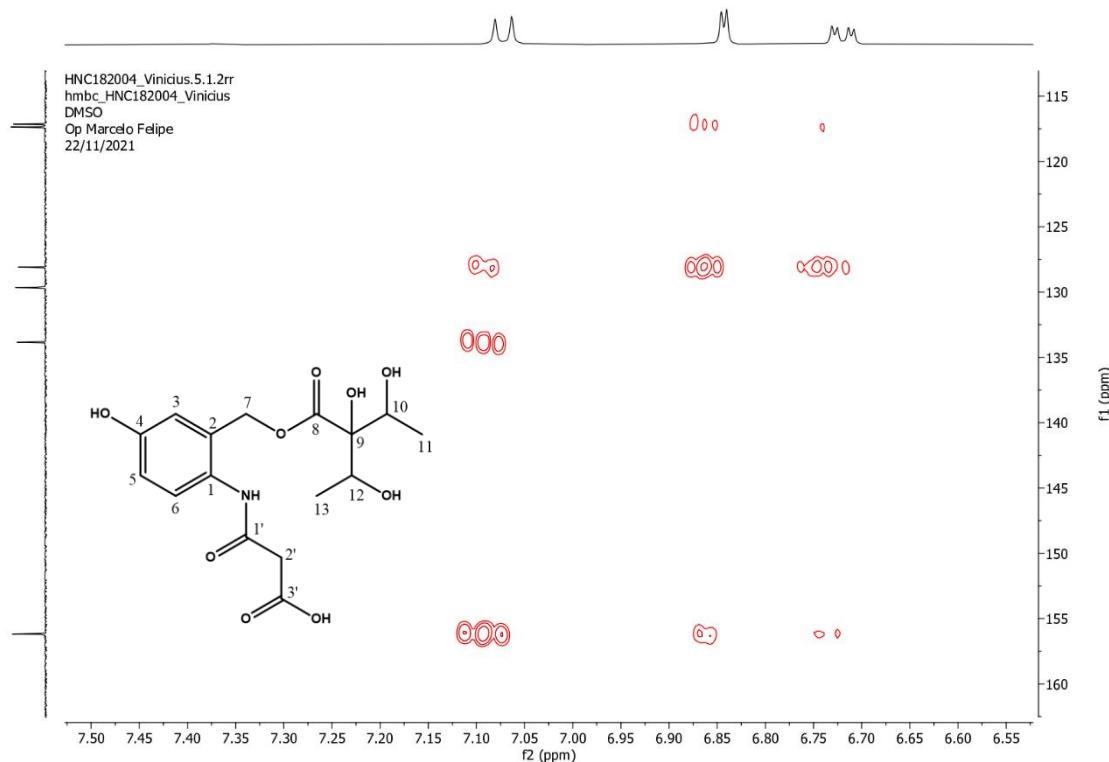


Figura 43 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (3,7 – 5,7 ppm) x (100,0 – 185,0 ppm)

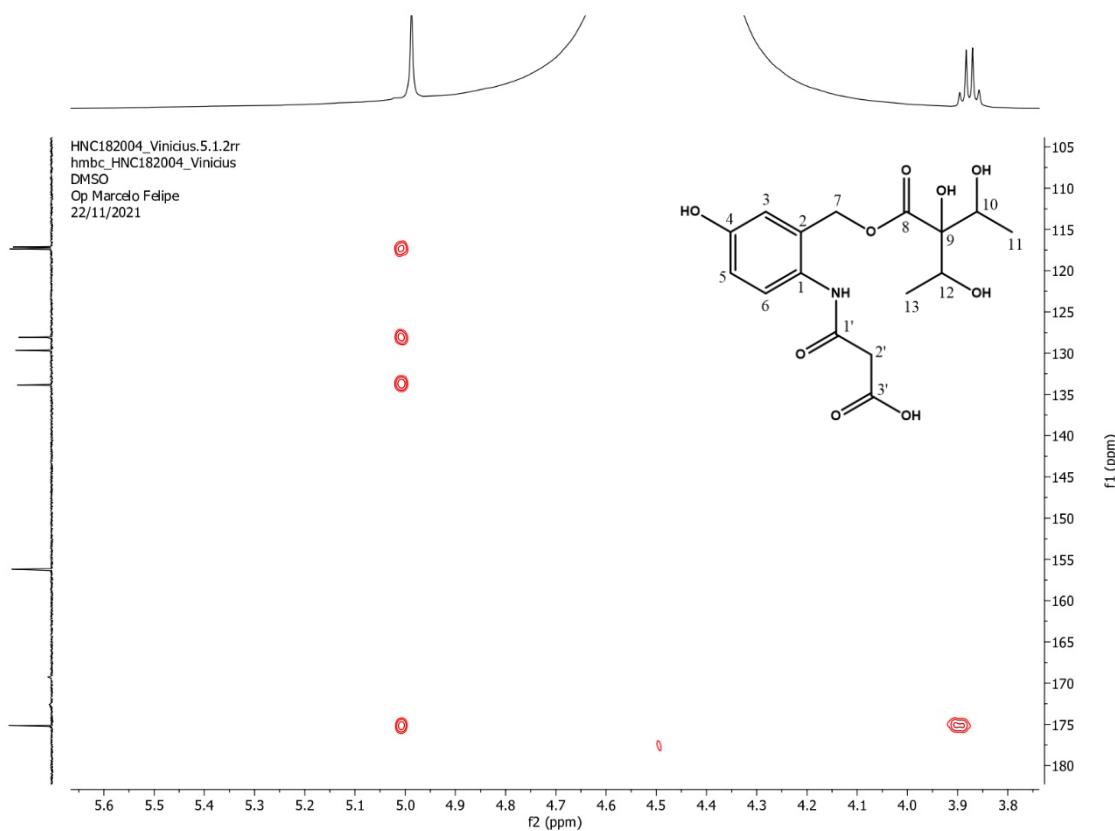


Figura 44 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (3,0 – 6,2 ppm) x (5,0 – 105,0 ppm)

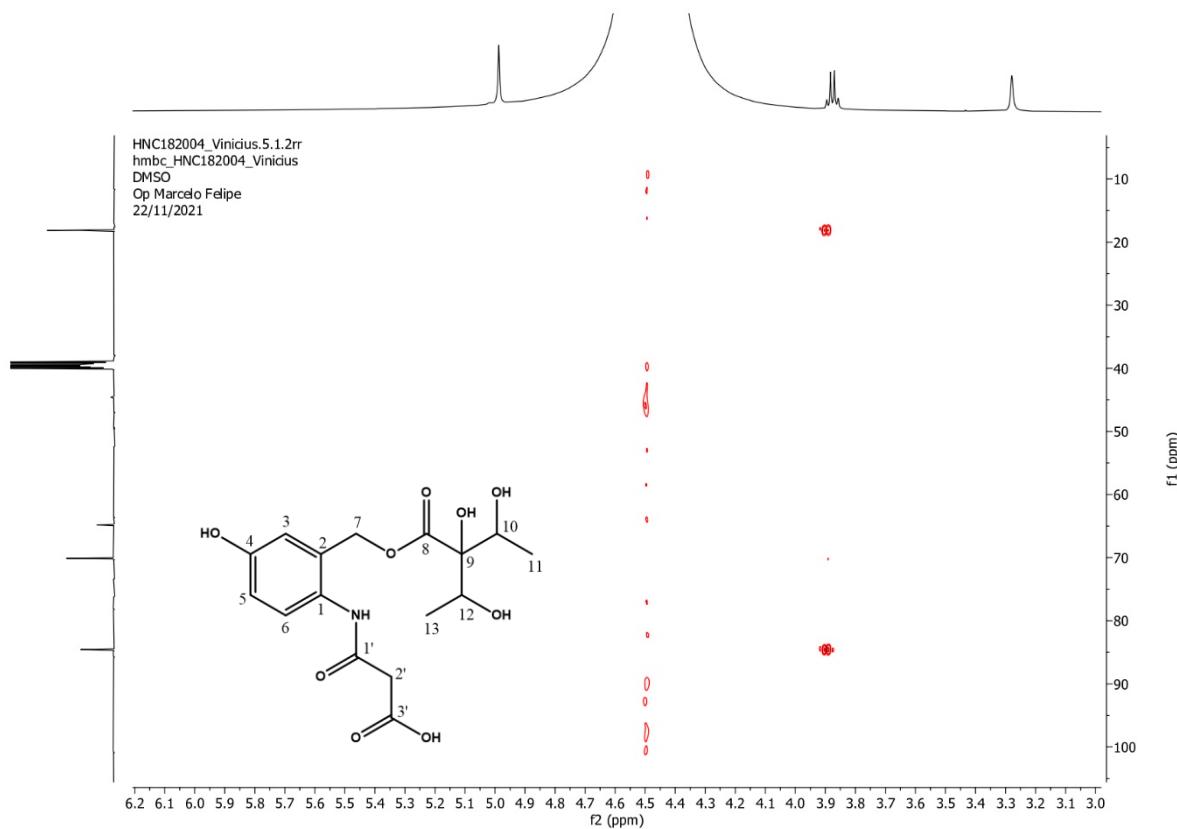


Figura 45 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (0,7 – 3,0 ppm) x (10,0 – 95,0 ppm)

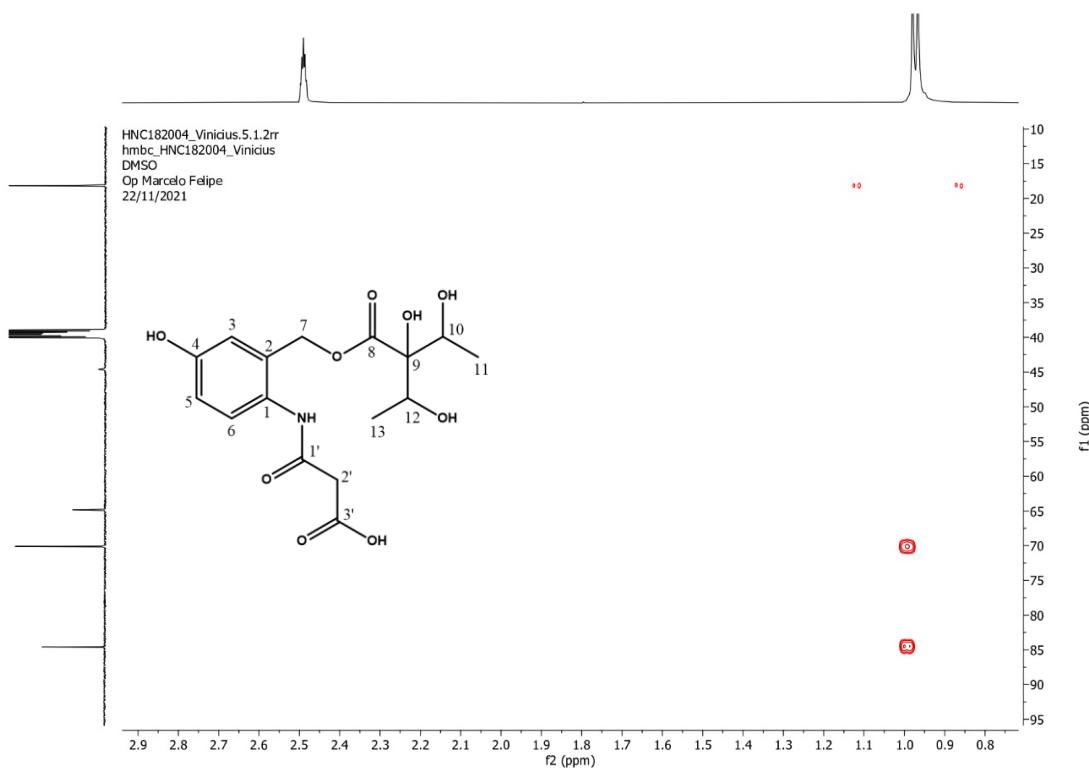


Figura 46 - Mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (0,0 – 10,0 ppm) x (10,0 – 180,0 ppm)

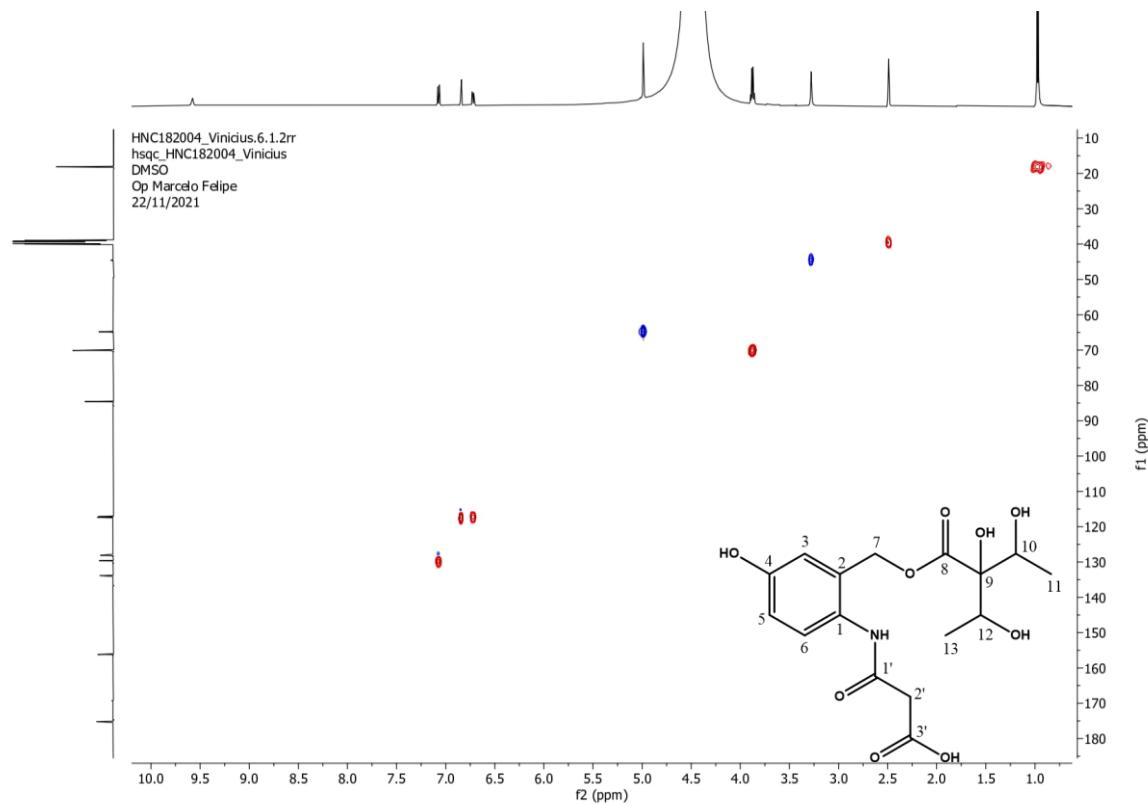


Figura 47 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (3,0 – 5,3 ppm) x (30,0 – 90,0 ppm)

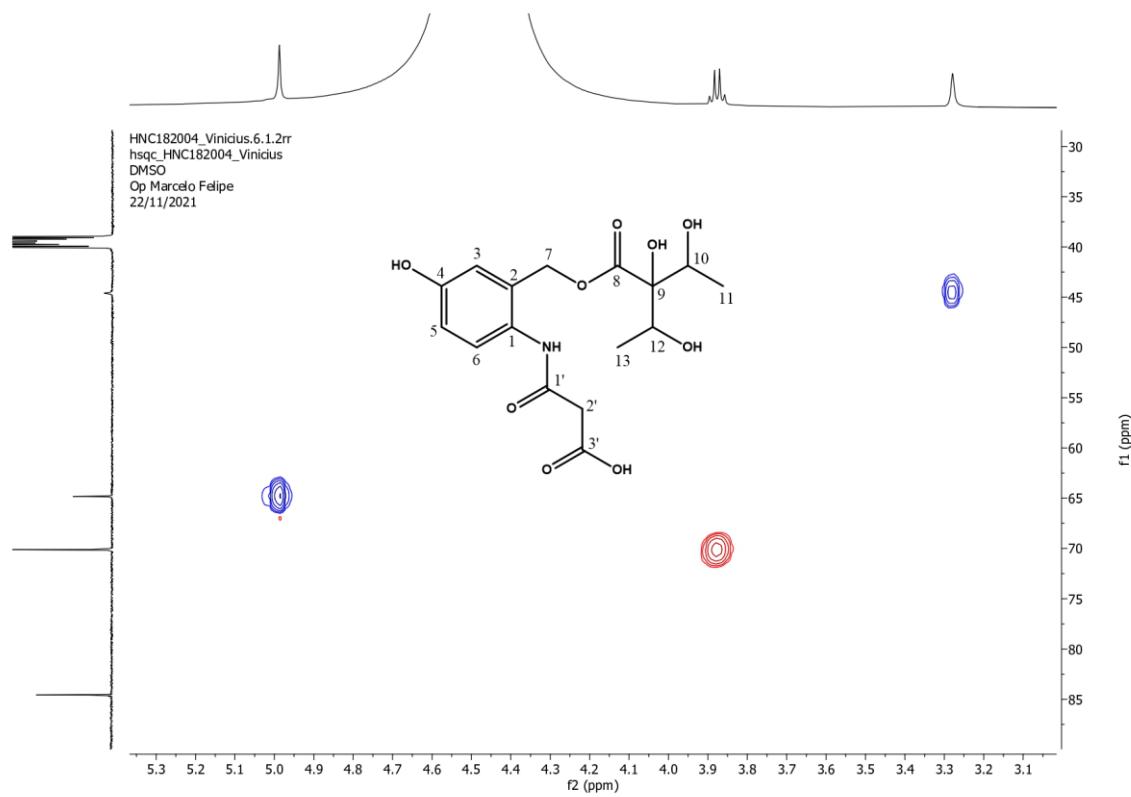


Figura 48 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (0,8 – 4,3 ppm) x (0,0 – 85,0 ppm)

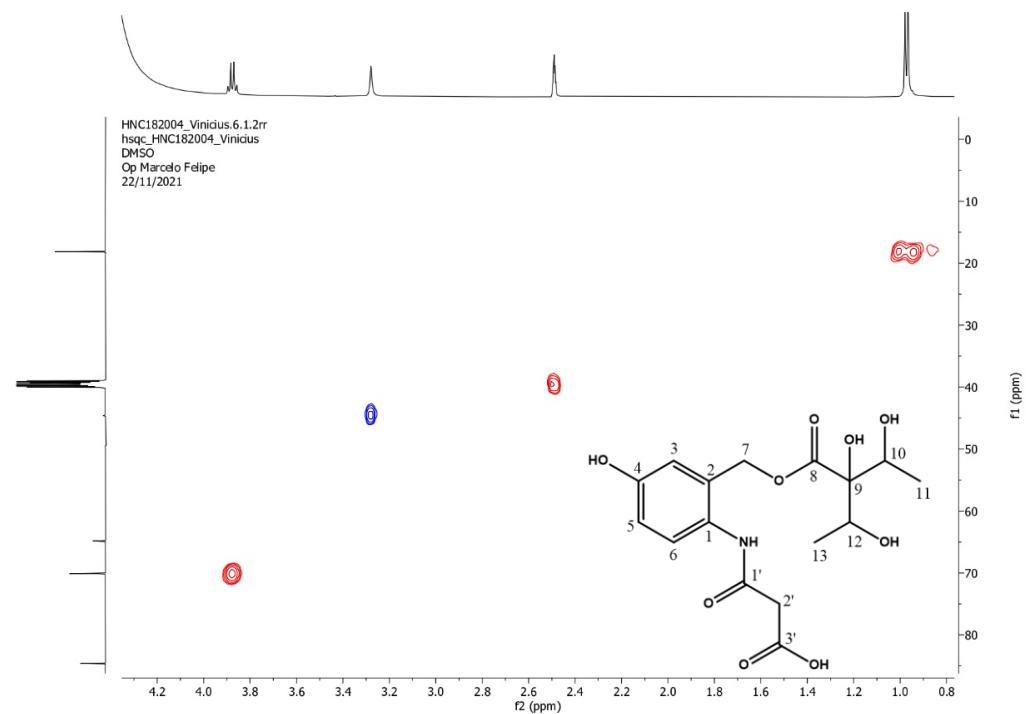
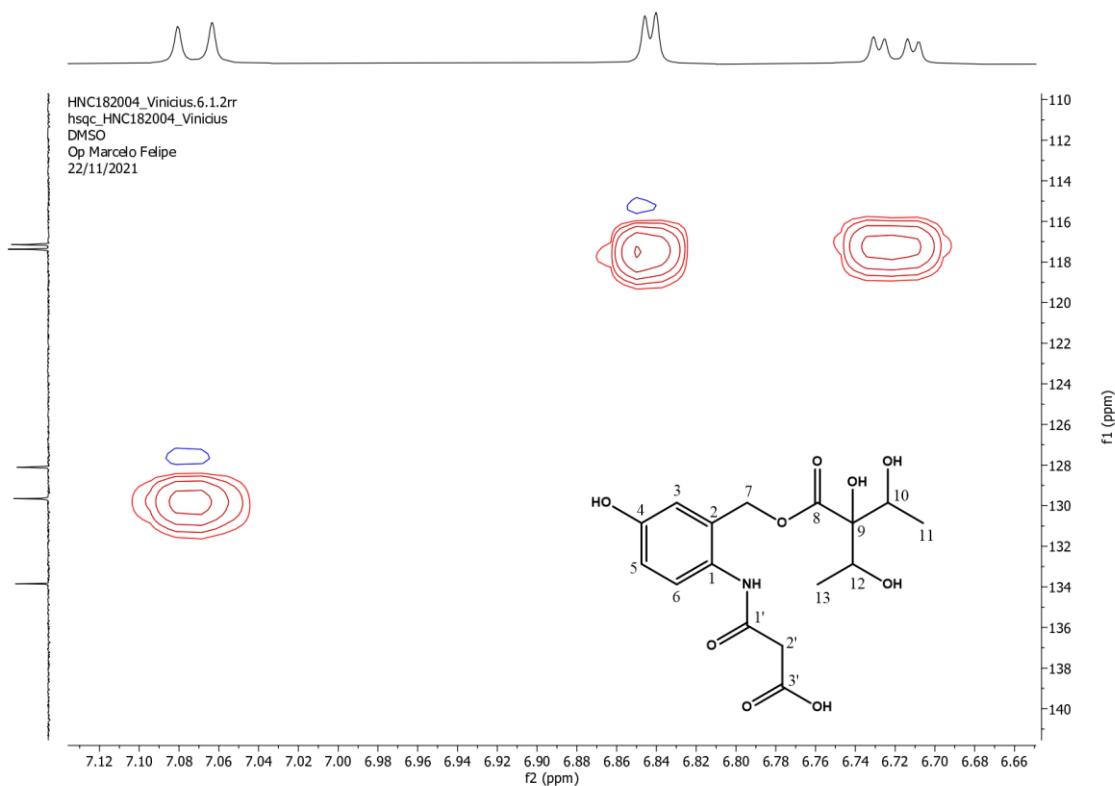


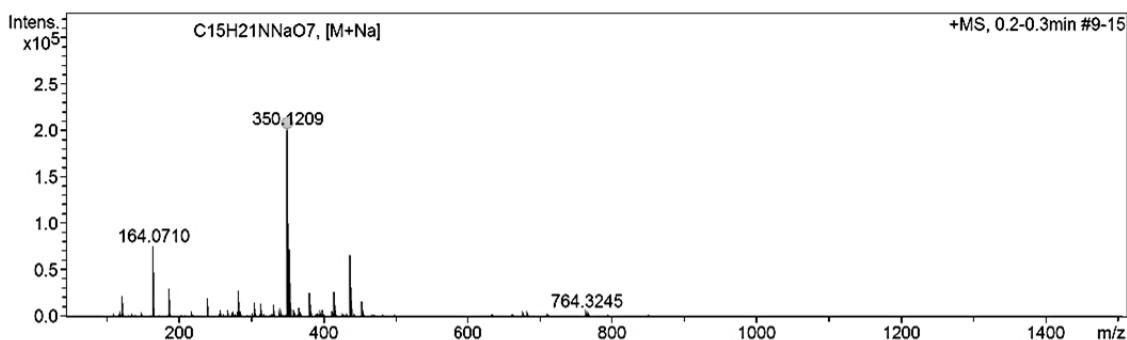
Figura 49 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (6,6 – 7,15 ppm) x (110,0 – 140,0 ppm)



5.3. Identificação estrutural de substância 3

A substância 3 (HNC182006) foi isolada na forma de um óleo de coloração castanho com 0,003 g. O espectro de massas obtido mostrou um pico em m/z 349.3829 [M+Na] compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{20}NO_7$

Figura 50 – Espectro de massas da substância HNC182006.



O espectro de RMN de ^{13}C na técnica BB (Fig. 59, pág. 76), obtido a 100 MHz em DMSO-*d*₄, e suas expansões (Fig. 60-61, pág. 76-77) apresentaram quinze deslocamentos químicos e apresenta um sinal mais intenso referente a dois átomos de carbonos, em que esses compartilham o mesmo ambiente químico. Foram observados a presença de sinais de três carbonos metílicos em δ_{C} 18,64 (C-11, C-13) e em δ_{C} 23,67 (C-2'), um sinal referente a carbono metilênico em δ_{C} 64,84 (C-7, sp^3), e cinco deslocamentos químicos atribuídos a carbonos metínicos sendo três carbonos aromáticos sp^2 em δ_{C} 117,40; δ_{C} 117,37 e δ_{C} 129,95 (C-3, C-5, C-6); e dois carbonos sp^3 oxigenados (C-10, C-12) evidenciados pelo sinal com maior intensidade em δ_{C} 71,48, indicando a presença de grupos hidroxila (SOUZA et al., 2017).

Foi possível evidenciar a existência de um grupo carboxila pelo sinal em δ_{C} 173,77 (C-8), característico de carbonos ligados a elementos eletronegativos. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 173,58 (C-1') e em δ_{C} 84,58 (C-9) evidenciaram a presença de carbonos quaternários, sendo este último um carbono hidroxilado. A presença de um outro grupo hidroxila, este ligado diretamente ao sistema aromático, pode ser notado pela observação do sinal em δ_{C} 156,41 (C-4). Por fim, os sinais em δ_{C} 133,72 (C-1) e δ_{C} 128,30 (C-2) foram atribuídos a dois carbonos aromáticos em que o primeiro indica sua ligação direta com um átomo de nitrogênio, fechando assim o sistema aromático trissubstituído. Estas e demais atribuições foram reunidas na Tabela 3.

No espectro de RMN de ^1H (Fig. 62, pág. 77), obtido a 400 MHz em DMSO- d_4 , e em suas expansões (Fig. 63-65, pág. 78-79), foram vistos sete deslocamentos químicos em que três destes sinais são característicos para um sistema aromático ABX. Este sistema foi confirmado pelo duplo dupletos (dd) em δ_{H} 6,70 ($J = 3,0; 8,5$ Hz), acoplando em meta e em orto com os dupletos (d) em δ_{H} 6,76 ($J = 3,0$ Hz) e δ_{H} 6,99 ($J = 8,5$ Hz) respectivamente, comprovando a presença de um anel aromático trissubstituído e sendo atribuídos aos hidrogênios H-5, H-3 e H-6.

A presença de hidrogênios oximetínicos e metílicos também foram evidenciados pela observação do quarteto (q) com sinal em δ_{H} 3,91 ($J = 6,5$; integrando para dois hidrogênios, H-10 e H-12) e de um dupletos (d) em δ_{H} 0,95 ($J = 5,2$; integrando para seis hidrogênios, H-11 e H-13) e a análise desses dados confirmaram a presença de dois grupos hidroxi-etyl na molécula. O singuleto (s) em δ_{H} 1,97; integrando para três hidrogênios, confirmou a presença de um terceiro grupo metílico atribuído ao hidrogênio H-2'. Já o singuleto (s) em δ_{H} 4,93 foi atribuído ao hidrogênio metilênico H-7, uma vez que seu deslocamento quiímico pode ser justificado pela anisotropia ocasionada pela ligação direta com o átomo de oxigênio da carbonila (SOUZA et al., 2017).

Os assinalamentos das atribuições entre sinais de prótons e carbono foram realizados a partir do mapa de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC). O mapa do HMBC (Fig. 66, pág. 79) mostrou correlação entre os sinais de hidrogênios δ_{H} 6,84 (H-3), δ_{H} 7,07 (H-6), δ_{H} 6,72 (H-5)

Por meio do mapa de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMBC) foram realizados os assinalamentos das atribuições dos sinais de prótons e carbono. O mapa do HMBC exibiu correlações entre os sinais de hidrogênios δ_{H} 6,76 (H-3), δ_{H} 6,99 (H-6), δ_{H} 6,70 (H-5) com o sinal de carbono em δ_{C} 156,41 confirmando assim a posição da hidroxila no carbono 4.

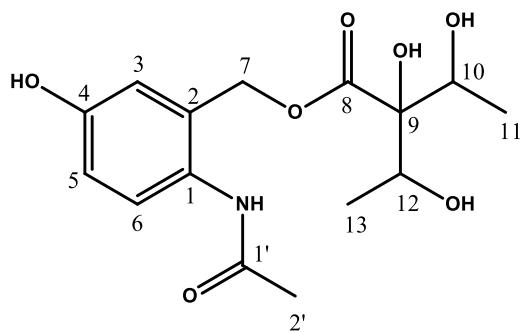
A correlação dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 4,93 (H-7) e carbonos em δ_{C} 117,40 (C-3), δ_{C} 133,72 (C-1), δ_{C} 128,30 (C-2) confirmaram a posição do C-7 em que encontra-se inserido ao anel aromático,

As correlações entre os sinais de hidrogênio em δ_{H} 4,99 (H-7) e de carbono em δ_{C} 117,40 (C-3), δ_{C} 133,85 (C-1), δ_{C} 128,10 (C-2) confirmaram a inserção do C-7 no sistema aromático, podendo ser notada a correlação entre H-7 com o sinal de carbono carbonílico em δ_{C} 173,77 confirmando a inserção da carbonila na posição C-8. Os

hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos apresentaram correlação a duas ligações com o sinal de C-9 em δ_C 84,58, tendo esses hidrogênios também correlações com o sinal de carbono da carbonila em δ_C 173,77 (C-8) sendo eles H-10 e H-12, indicando a presença de unidades hidróxi-étil no carbono quaternário C-9. Por fim, a metilia na posição 2' foi definida por meio da correlação observada entre os hidrogênios H-2' com o carbono carbonílico da posição C-1'.

A análise dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear direta (HSQC) (Fig. 73, pág. 83) possibilitou a atribuição de deslocamentos químicos relacionados a carbonos hidrogenados. Foi possível observar a correlação entre os sinais em δ_H 6,76 com δ_C 117,40; δ_H 6,70 com δ_C 117,37 e δ_H 6,99 com δ_C 129,95; referente aos carbonos C-3, C-5 e C-6 respectivamente, comprovando o anel trissubstituído. As correlações entre δ_H 0,95 com δ_C 18,64 confirmaram os carbonos metílicos C-11 e C-13. Já a correlação entre os deslocamentos em δ_H 1,97 com δ_C 23,67 confirmaram o carbono metilênico C-2'. A correlação entre os sinais δ_H 3,91 com δ_C 71,48 foram atribuídos aos carbonos oxigenados C-10 e C-12. Todas as atribuições encontram-se reunidas na Tabela.

A partir da análise dos dados espectrais junto aos dados da literatura foi possível identificar a substância HNC182006 como Brazóide G, confirmado assim que se trata de um composto nunca antes relatado na literatura, sendo este o primeiro estudo a conseguir isolar e descrever a sua elucidação estrutural



Estrutura do Brazóide G

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e bidimensionais (HMQC e HMBC) (500 e 125 MHz, DMSO) de HNC182006, brazóide I, em comparação aos dados obtidos na tabela brazóide F.

Posição	HMQC		HMBC		Brazóide F	
	δ_{H} BRAZOIDE G	δ_{C} BRAZOIDE G	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$		δ_{H}	δ_{C}
1	-	133,72	H-6; 2H-7	-	133,85	
2	-	128,30	H-3; 2H-7; H-5; H-6	-	128,10	
3	6,76 (1H; d; $J = 3,0$)	117,40	2H-7	6,84 (1H; d; $J = 3,0$ Hz)	117,17	
4	-	156,41	H-3; H-5; H-6	-	156,19	
5	6,70 (1H; dd; $J = 3,0; 8,5$)	117,37	H-3	6,72 (1H; dd; $J = 9,0;$ 3,0 Hz)	117,14	
6	6,99 (1H; br d; $J = 8,5$)	129,95	-	7,07 (1H; d; $J = 9,0$ Hz)	129,65	
7	4,93 (2H; s)	64,84	H-3	4,99 (2H; s)	64,82	
8	-	173,77	2H-7; H-10/H-12	-	175,15	
9	-	84,58	H-10/H-12; 3H- 11/3H-13	-	84,58	
10	3,91 (2H; q; $J = 6,5$)	71,48	3H-11	3,88 (2H; q; $J = 6,5$ Hz)	70,11	
11	0,95 (6H; d; $J = 5,2$)	18,64	3H-13	0,97 (3H; d; $J = 6,5$ Hz)	18,15	
12	3,91 (2H; q; $J = 6,5$)	71,48	3H-13; H-10	3,88 (2H; q; $J = 6,5$ Hz)	70,11	
13	0,95 (6H; d; $J = 5,2$)	18,64	H-11	0,97 (3H; d; $J = 6,5$ Hz)	18,15	
1'	-	173,58	3H-2'	-	168,83	
2'	1,97 (3H; s)	23,67	-	3,28 (1H; s)	44,60	
3'	-	-	-	-	172,44	

Figura 51 – Estruturas químicas do composto isolado Brazóide G (**1**) e do composto referência Brazóide F (**2**)

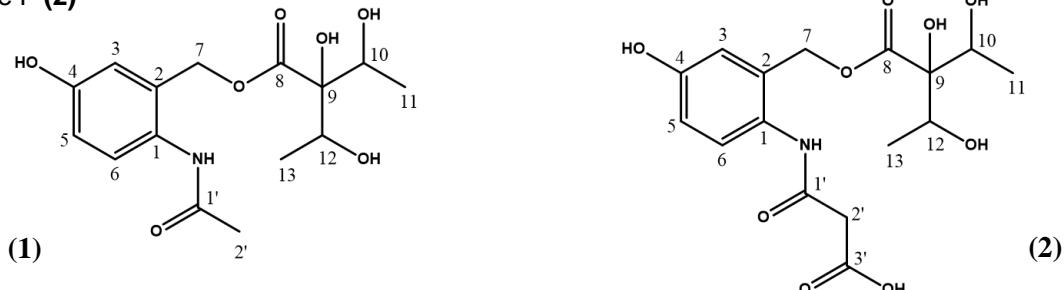


Figura 52 - Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006.

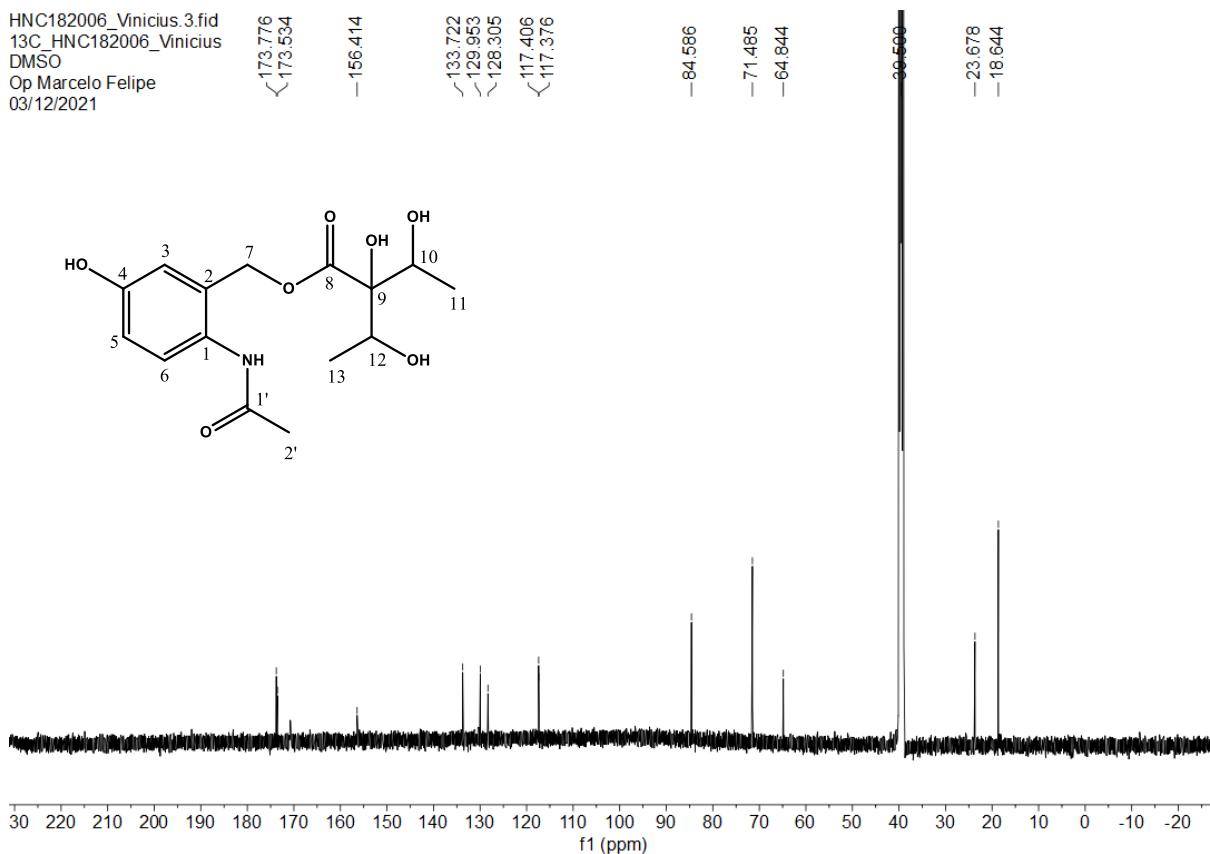


Figura 53 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de 100 – 180 ppm

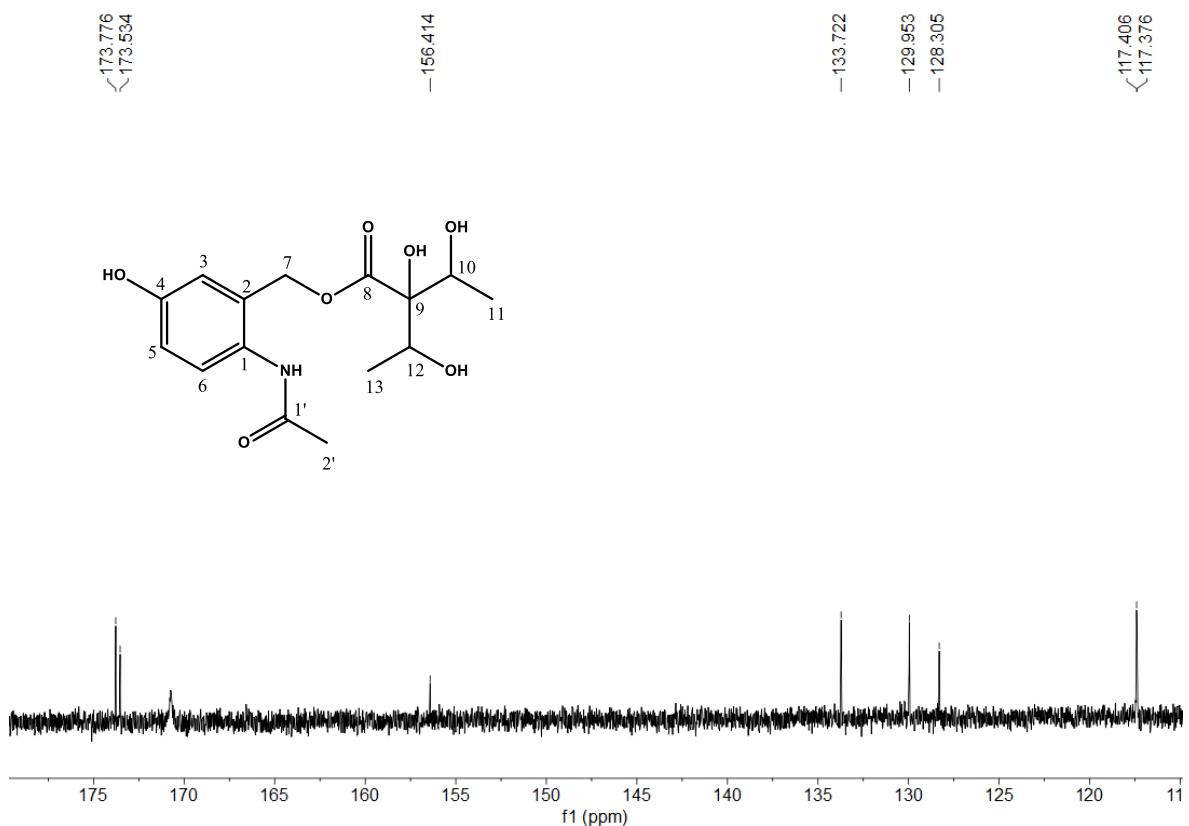


Figura 54 - Expansão de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de 0 – 90 ppm

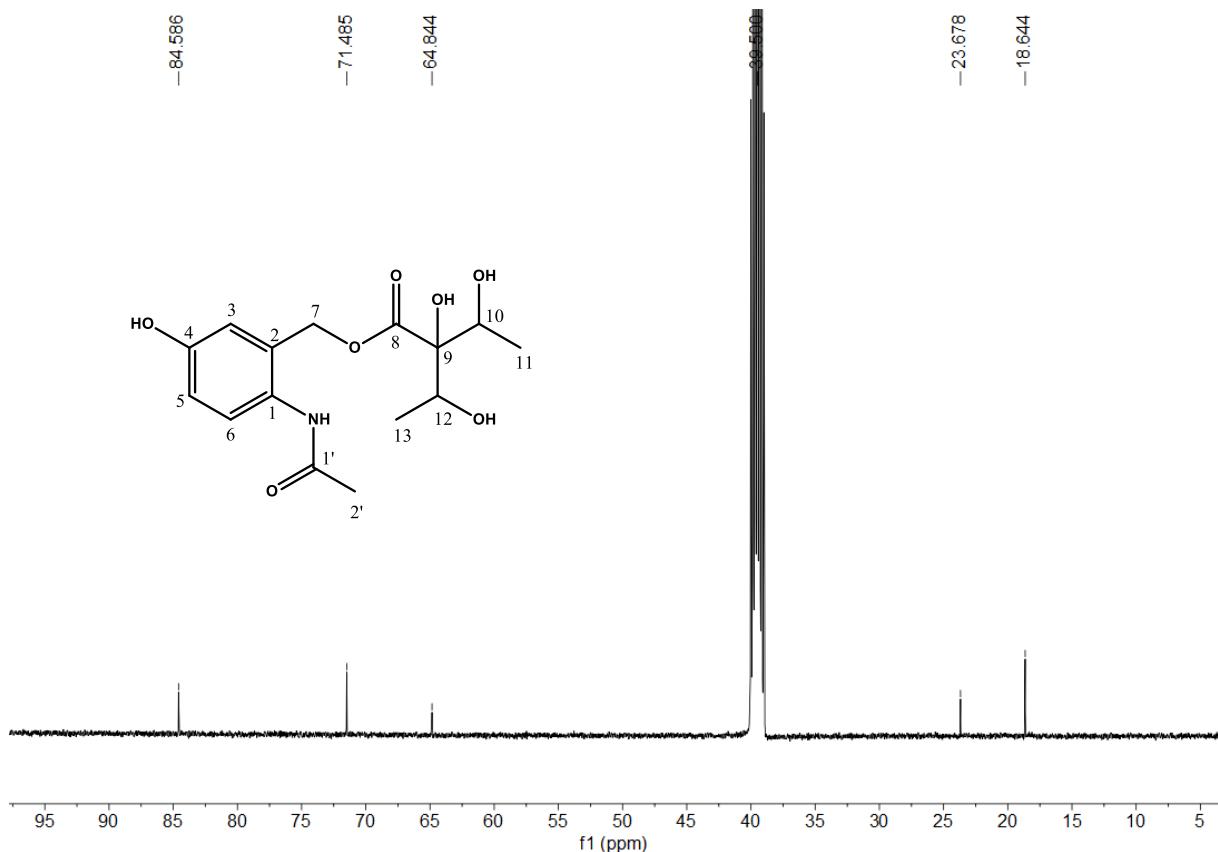


Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006.

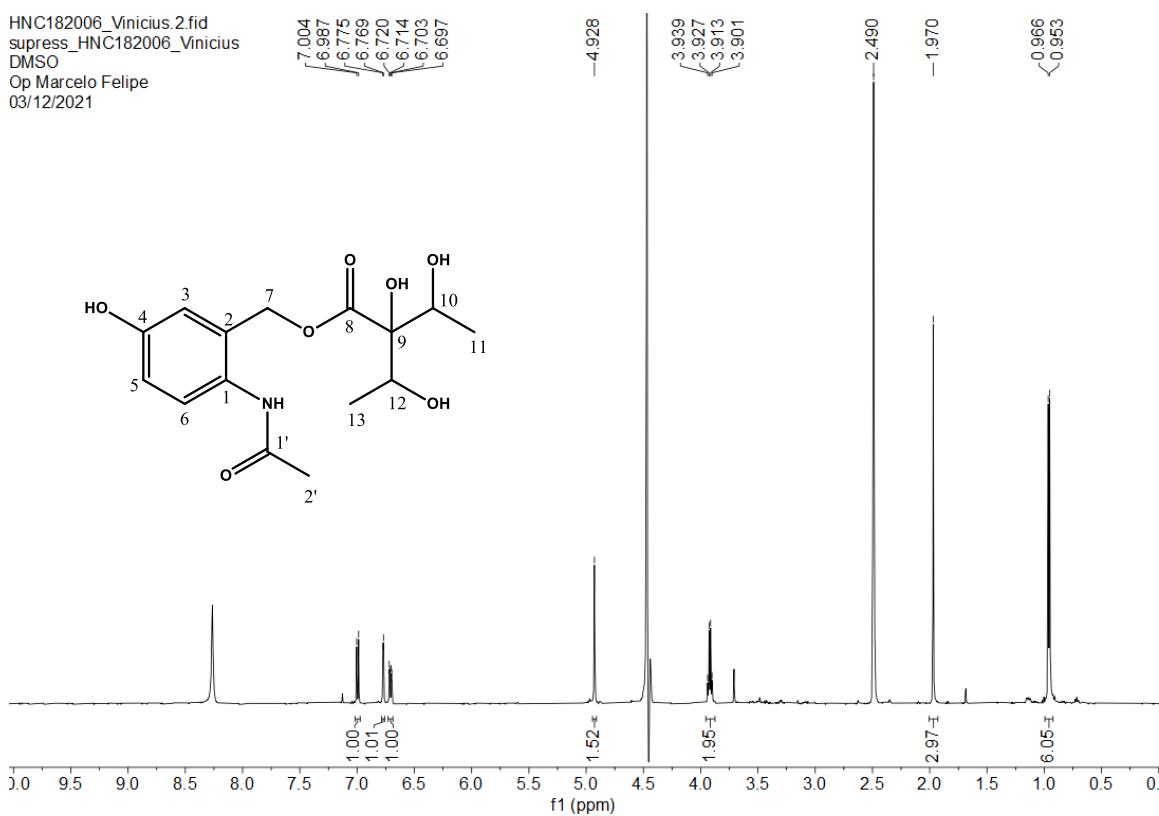


Figura 56 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182006 na região de 6,35 – 7,30 ppm.

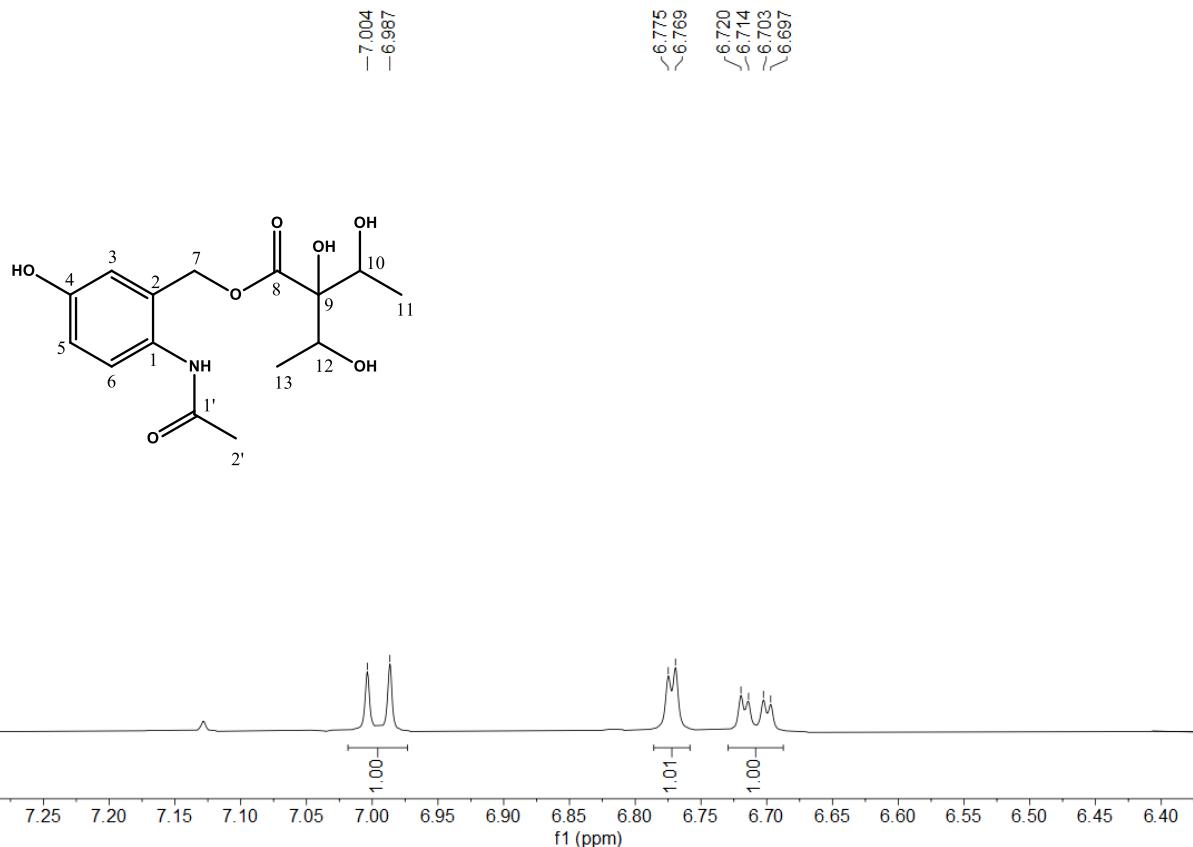


Figura 57 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de HNC182006 na região de 3,3 – 5,3 ppm.

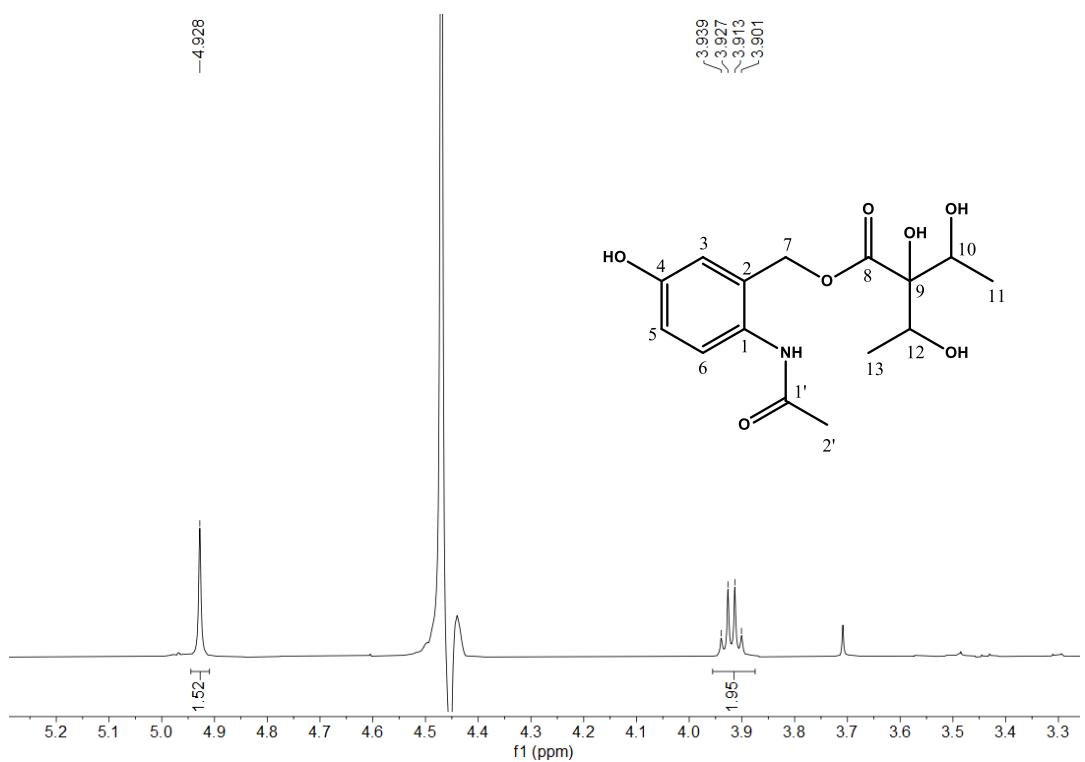


Figura 58 - Expansão de espectro de RMN de ^1H , (400 MHz, DMSO- d_6) de HNC182006 na região de 0,6 – 2,8 ppm.

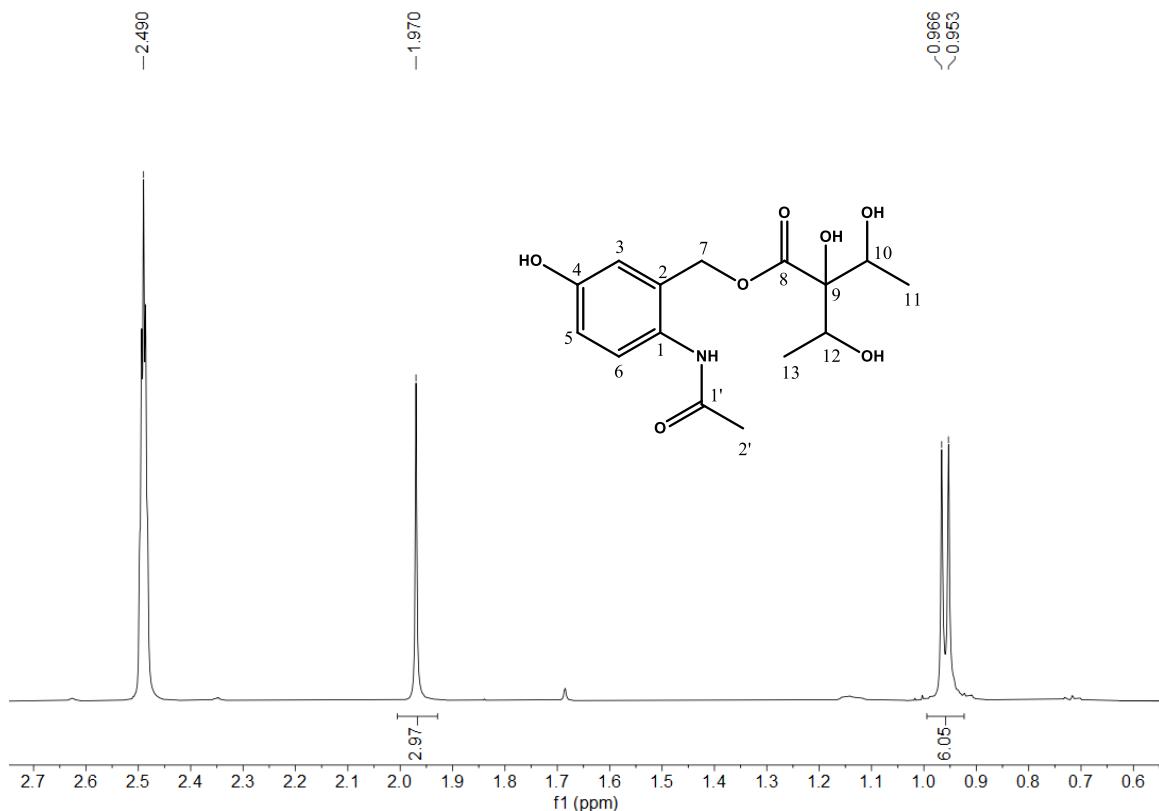


Figura 59 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC2006

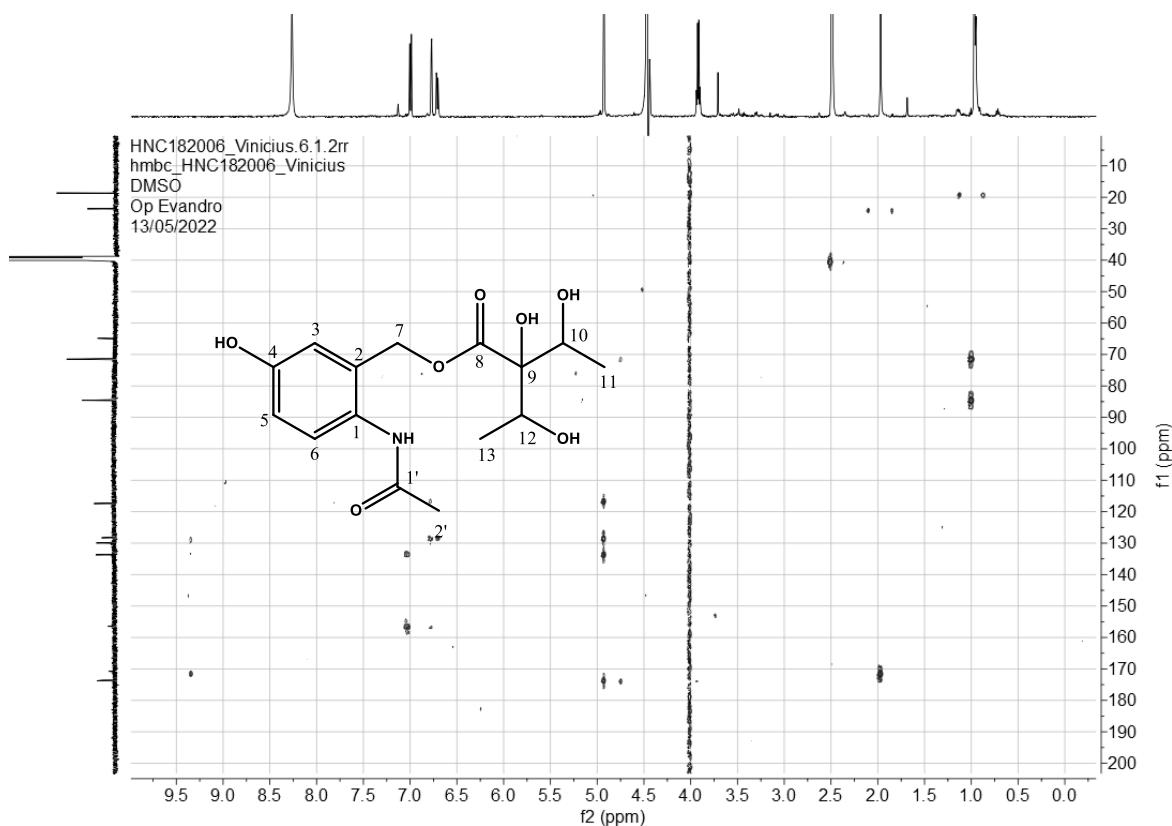


Figura 60 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (4,2 – 8,0 ppm) x (100,0 – 200,0 ppm)

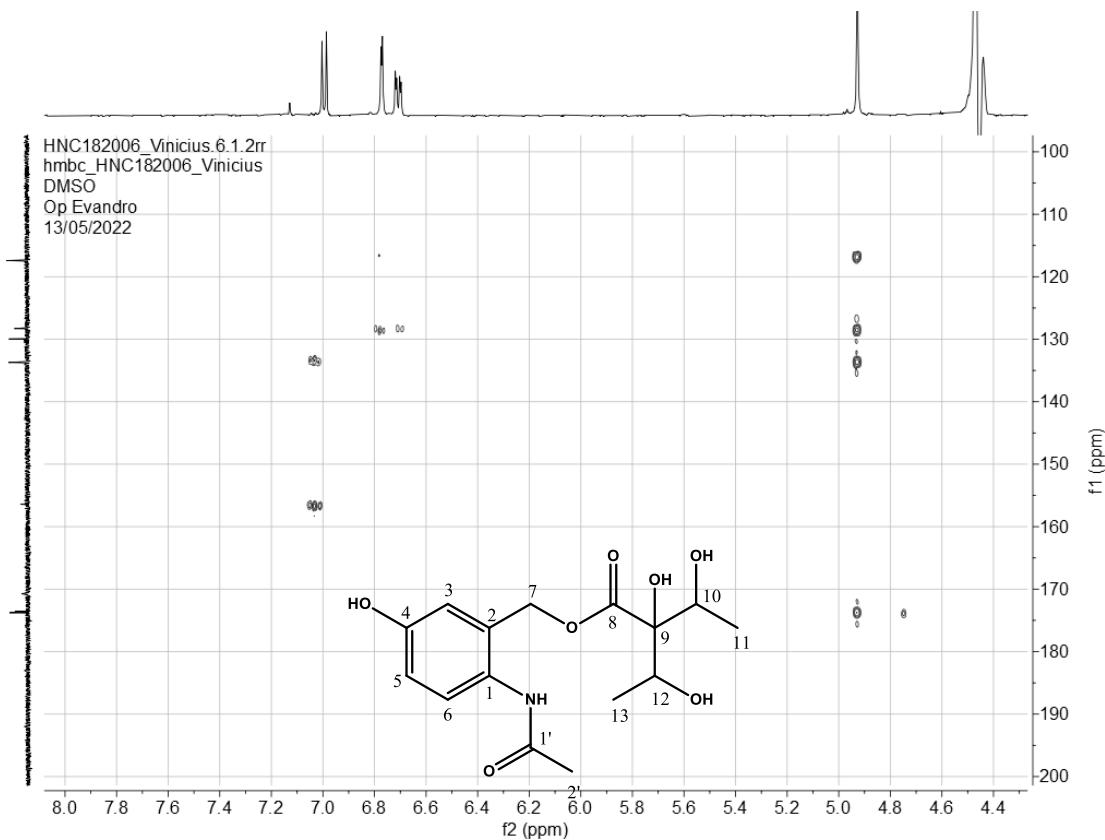


Figura 61 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182006 na região de (0,2 – 3,8 ppm) x (120,0 – 200,0 ppm)

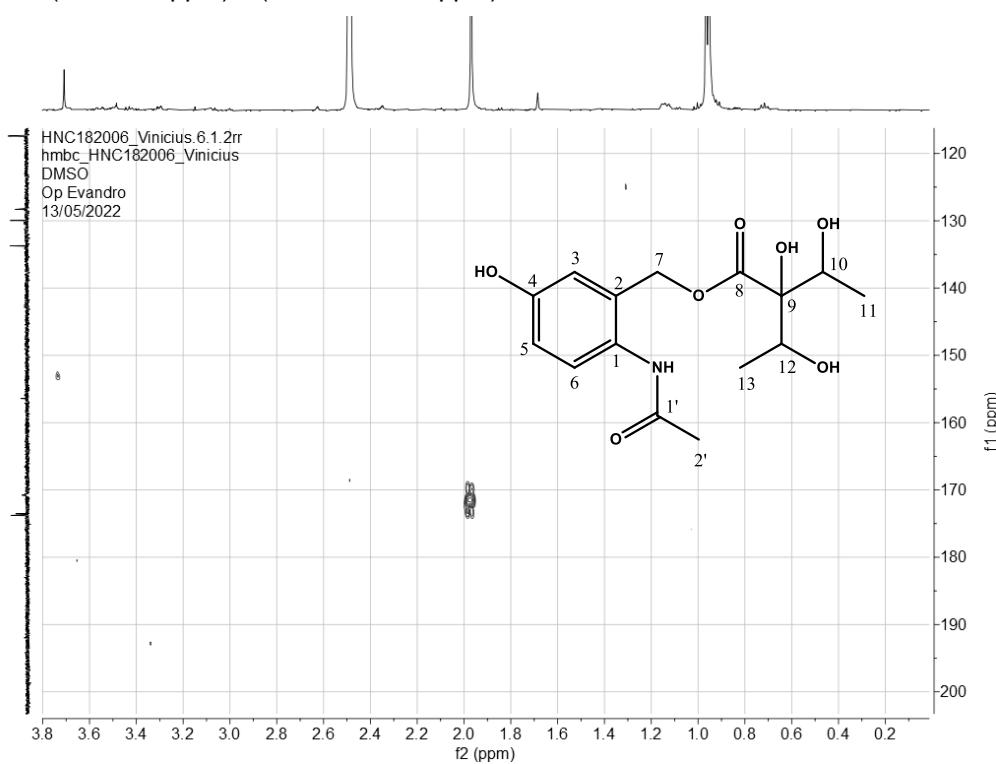


Figura 62 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182006 na região de (0,0 – 3,5 ppm) x (60,0 – 190,0 ppm)

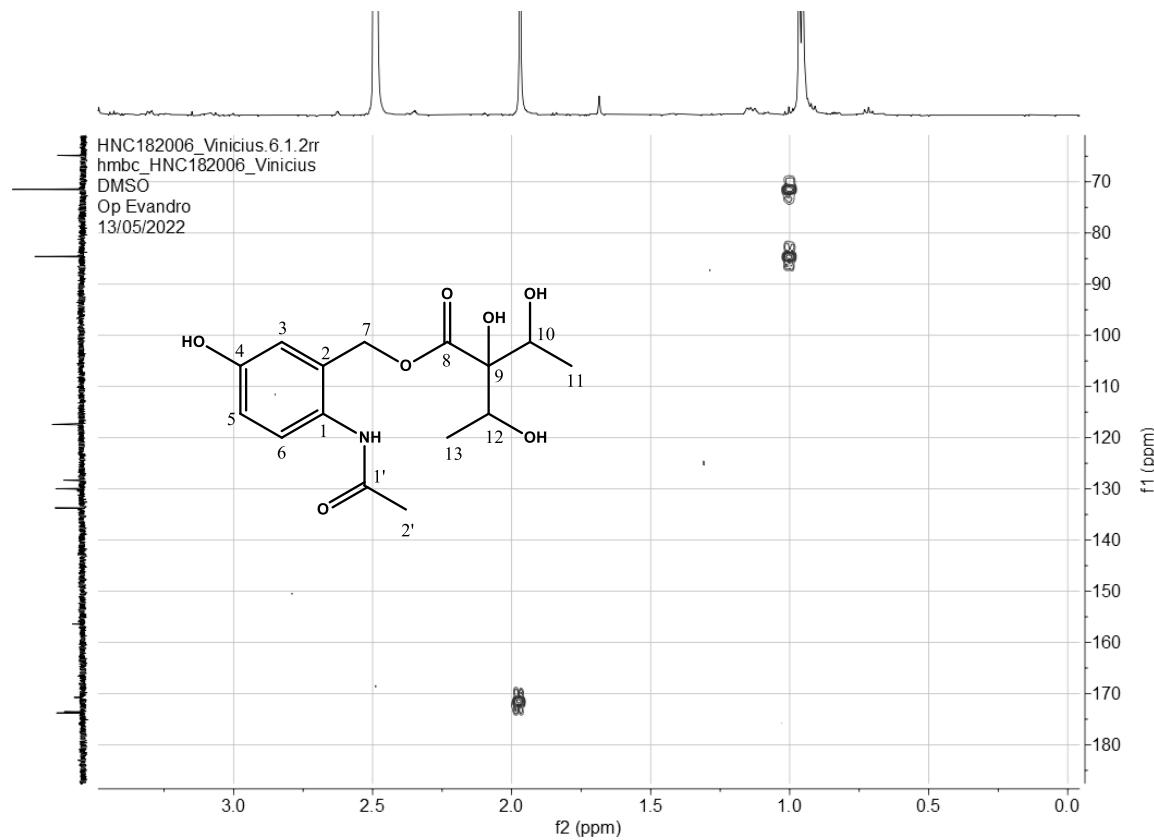


Figura 63 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (0,2 – 3,6 ppm) x (10,0 – 100,0 ppm)

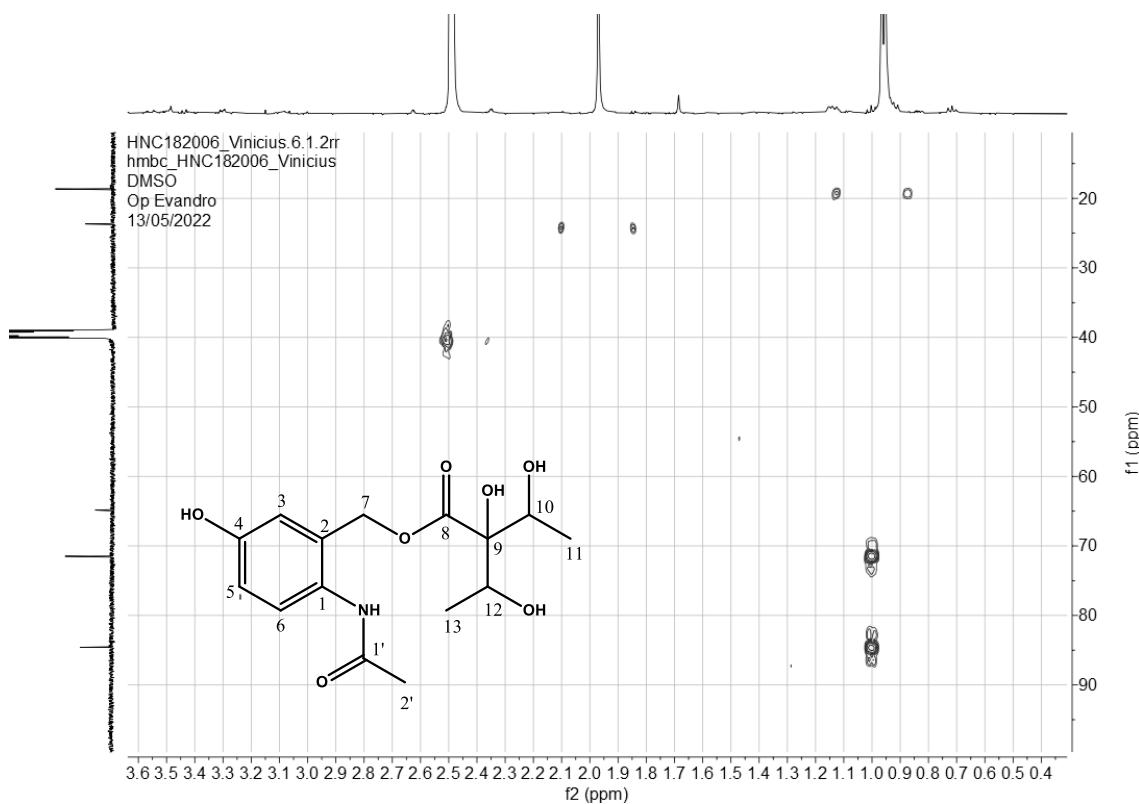


Figura 64 - Mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (0,0 – 7,5 ppm) x (0,0 – 140,0 ppm)

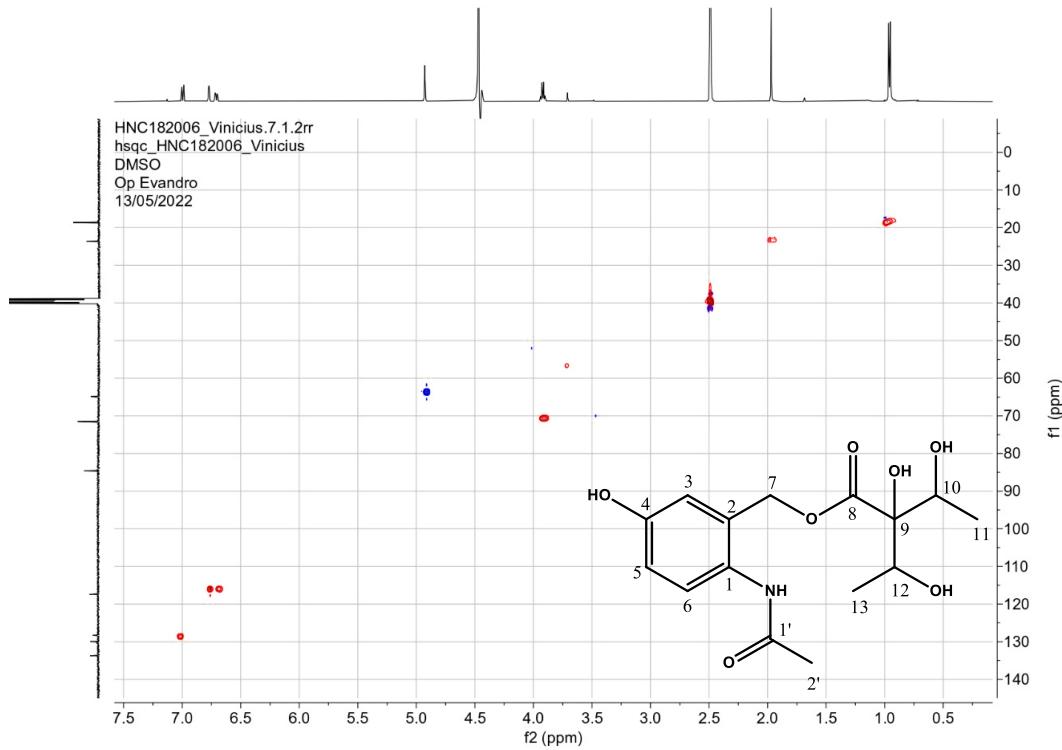


Figura 65 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de HNC182004 na região de (0,5 – 3,5 ppm) x (5,0 – 70,0 ppm)

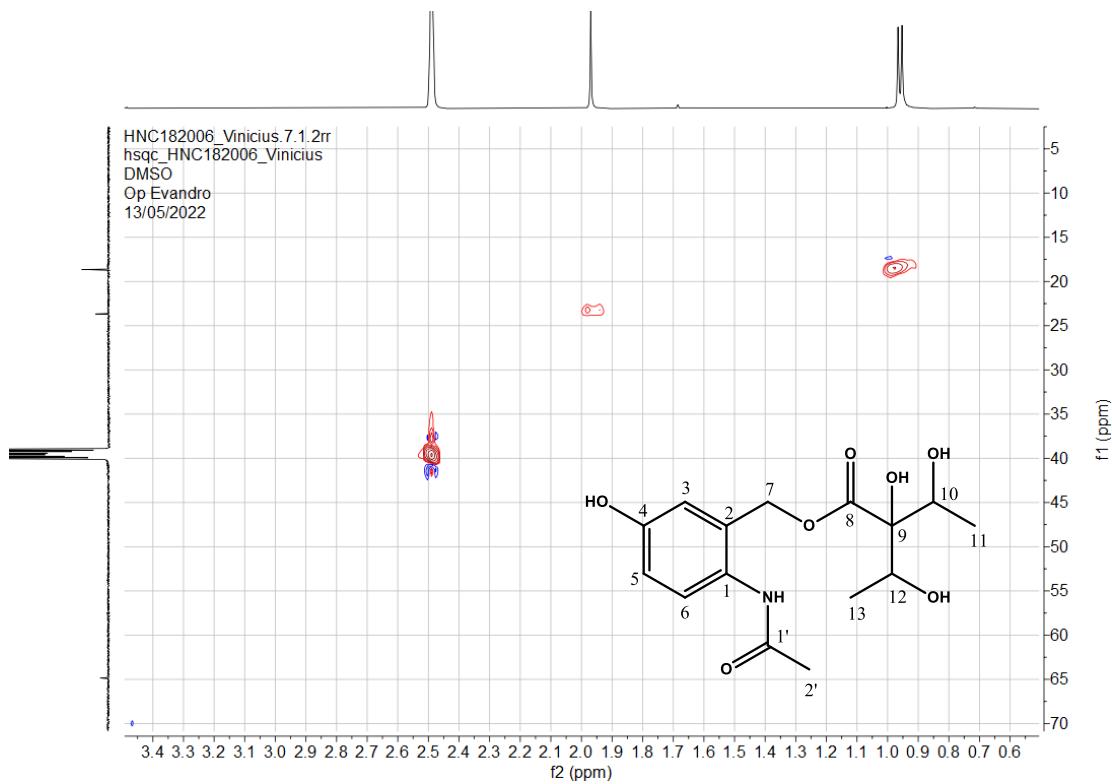
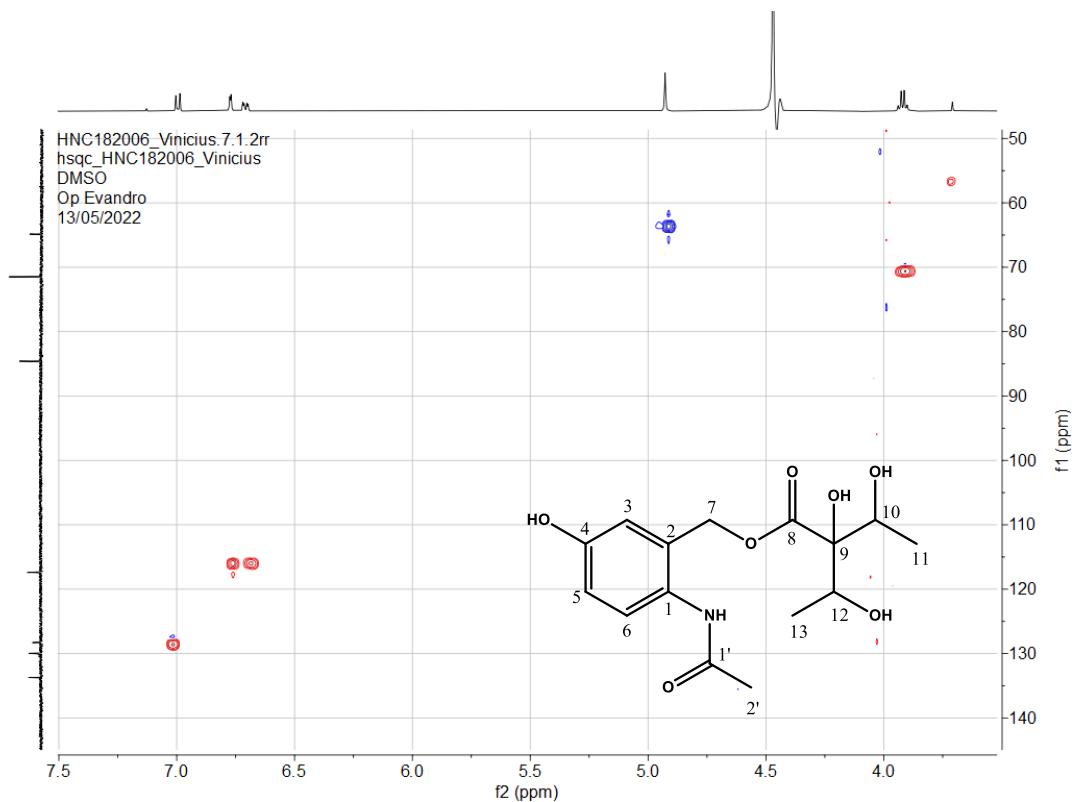


Figura 66 - Expansão do mapa de contornos HSQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) de HNC182004 na região de (3,0 – 7,5 ppm) x (50,0 – 140,0 ppm)



CONCLUSÕES



6. CONCLUSÕES

A partir da partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Harpochilus neesianus* foi obtido a fase acetada de etila. Por meio do emprego de técnicas cromatográficas modernas foi possível realizar o direcionamento do estudo a fim de possibilitar o isolamento de compostos químicos. Tais técnicas como a espectrometria de massas, cromatografia líquida sob média pressão e cromatografia líquida de alta eficiência, possibilitaram o isolamento de três compostos inéditos, sendo estes denominados de brazoides E, F e G.

É importante relatar que esse é o primeiro estudo fitoquímico envolvendo a espécie *Harpochilus neesianus* e o gênero *Harpochilus*, e dessa forma a identificação desses compostos garantem um maior conhecimento a respeito da química de ambos.

Os compostos isolados e identificados a partir dessa espécie foram nomeados como forma de homenagear o grande pesquisador Professor Doutor Raimundo Braz-Filho, visto que ele foi o responsável por identificar os primeiros brazóides (A – D) isolados a partir da *J. gendarussa* e que serviram de referência para o desenvolvimento dessa pesquisa. Assim, pode-se afirmar que este é o primeiro estudo a confirmar e relatar a existência dos brazoides E, F e G.

O isolamento e identificação desses compostos possui grande valor do ponto de vista fitoquímico, uma vez que estes trazem a possibilidade do desenvolvimento de novos estudos objetivando a descoberta de possíveis atividades biológicas permitindo que, se confirmado essas atividades, esses compostos bioativos possam ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, V. O.; MACEDO, A. J.; MUXAGATA, E.; SILVA, M. V.; PINHO, G. L. L. Non-toxic antifouling potential of Caatinga plant extracts: effective inhibition of marine initial biofouling. **Hydrobiologia**, v. 847, n. 1, p. 45-60, 2020.
- AZEVEDO, I. H. F.; MORAES, P. L. R. Seed Morphology of *Ruellieae* Species (Acanthaceae) in Brazil and Its Taxonomic Implications. **Systematic Botany**, v. 44, n. 3, p. 631-651, 2019.
- BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. D.; MOREIRA, I. D. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475-506, 2005.
- BRAZ, D. M.; AZEVEDO, I. H. F. Acanthaceae da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Hoehnea**, v. 43, p. 497-516, 2016.
- CORRÊA, G. M.; ALCÂNTARA, A. F. de C. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 22, p. 220-238, 2012.
- CÔRTES, A. L. A.; RAPINI, A. Justicieae (Acanthaceae) do semiárido do estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 40, p. 253-292, 2013.
- COSTA-LIMA, J. L.; CHAGAS, E. C. O. A revision of Harpochilus sheds light on new combinations under *Justicia* (Acanthaceae). **Phytotaxa**, v. 393, n. 2, p. 119-130, 2019.
- DIRAR, A. I.; ADHIKARI-DEVKOTA, A.; KUNWAR, R. M.; PAUDEL, K. R.; BELWAL, T.; GUPTA, G.; CHELLAPANN, D. K.; HANSBRO, P. M.; DUA, K.; DEVKOTA, H. P. Genus *Blepharis* (Acanthaceae): A review of ethnomedicinally used species, and their phytochemistry and pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 265, p. 113255, 2021.
- FONGOD, A. G. N.; MODJENPA, N. B.; VERANZO, M. C. Ethnobotany of Acanthaceae in the Mount Cameroon region. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 38, p. 2859-2866, 2013.
- FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A. F.; CARVALHO JR., A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J.R.; SYLVESTRE, L.; MAIA, L.C.; LOHmann, L.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M.N.; MAMEDE, M.C.; BASTOS, M.N.C.; MORIM, M.P.; BARBOSA, M.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T. B. & SOUZA, V.C. 2012. Introdução. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/> (Acesso em 23/03/2022).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Biomass e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250 000/IBGE**, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. - Rio de Janeiro: IBGE. v. 45, 2019.

INDRIUNAS, A. **Revisão taxonômica de Herpetacanthus Nees (Acanthaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e Meio ambiente). São Paulo, Brasil, Instituto de Botânica, 2011.

KHAN, I.; JAN, S. A.; SHINWARI, Z. K.; ALI, M.; KHAN, Y.; KUMAR, T. Ethnobotany and medicinal uses of folklore medicinal plants belonging to family Acanthaceae: An updated review. **MOJ Biol Med**, v. 1, n. 2, p. 34-38, 2017.

KIEL, C. A.; DANIEL, T. F.; DARBYSHIRE, I.; MCDADE, L. A. Unraveling relationships in the morphologically diverse and taxonomically challenging “justicioid” lineage (Acanthaceae: Justicieae). **TAXON**, v. 66, n. 3, p. 645-674, 2017.

KIEL, C. A.; DANIEL, T. F.; MCDADE, L. A. Phylogenetics of New World ‘justicioids’ (Justicieae: Acanthaceae): Major lineages, morphological patterns, and widespread incongruence with classification. **Systematic Botany**, v. 43, n. 2, p. 459-484, 2018.

MACHADO, Kamilla Nunes. **Fitoquímica e atividades biológicas de Avicennia schaueriana Stapf & Leechm. ex Moldenke (Acanthaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2022.

MANZITTO-TRIPP, E. A.; DARBYSHIRE, I.; DANIEL, T. F.; KIEL, C. A.; MCDADE, L. A. Revised classification of Acanthaceae and worldwide dichotomous keys. **TAXON**, v. 71, n. 1, p. 103-153, 2022.

MATOS, P.; BATISTA, M. T.; FIGUEIRINHA, A. A review of the ethnomedicinal uses, chemistry, and pharmacological properties of the genus *Acanthus* (Acanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 293, p. 115271, 2022.

MCDADE, L. A.; DANIEL, T. F., MASTA, S. E., & RILEY, K. M. Phylogenetic relationships within the tribe Justicieae (Acanthaceae): evidence from molecular sequences, morphology, and cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 435-458, 2000.

MONTEIRO, F. K. S.; FERNANDO, E. M. P.; LUCENA, M. F. A.; MELO, J. I. M. A new species of northeastern Brazilian endemic genus *Harpochilus* (Acanthaceae). **Phytotaxa**, v. 358, n. 3, p. 289-294, 2018.

MONTEIRO, F. K. S.; FERNANDO, E. M. P.; LUCENA, M. F. A.; MELO, J. I. M. A taxonomic synopsis of Acanthaceae Juss. native to Paraíba State, Brazil. **Harvard Papers in Botany**, v. 23, n. 2, p. 189-204, 2018.

OLIVEIRA, G. K.; VICENTE, M. M.; OTENIO, J. K.; CARNEIRO, V. P. P.; GUMY, M. P.; VELASQUEZ, L. G.; LOURENÇO, E. L. B; JACOMASSI, E. Etnobotânica, etnofarmacologia e farmacologia das espécies Acanthaceae, Aizoaceae, Alismataceae e Amaranthaceae. **FITOS**, v. 13, n. 4, p. 314-337, 2019.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia.** 4. ed. Cengag Learning, 2015.

PIERRE, L. L.; MOSES, M. N. Isolation and characterisation of stigmasterol and β -sitosterol from *Odontonema strictum* (acanthaceae). **Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 88-95, 2015

PROFICE, S. R. Novas combinações para espécies brasileiras de Acanthaceae. **Rodriguésia**, v. 61, p. S85-S88, 2010.

QUEIROZ, L. P.; FERNANDES, M. F.; CARDOSO, D. An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high species richness and endemism. **Journal of Arid environments**, v. 174, p. 104079, 2020.

REFAEY, M. S.; ABDELHAMID, R. A.; ELIMAM, H.; ELSHAIER, Y. A. M. M.; ALI, A. A.; ORABI, M. A. A. et al. Bioactive constituents from *Thunbergia erecta* as potential anticholinesterase and anti-ageing agents: Experimental and in silico studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 108, p. 104643, 2021.

SCOTLAND, R. W.; VOLLESEN, K. Classification of acanthaceae. **Kew Bulletin**, p. 513-589, 2000.

SILVA, F. A.; KAMEYAMA, C.; ZAPPI, D. C.; GIL, A. S. B. The genus *Justicia* (Acanthaceae) in the state of Pará, Amazon, Brazil. **Rodriguésia**, v. 73, 2022.

SILVA, F. A.; ALBUQUERQUE-LIMA, S.; TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C. *Harpochilus corrugatus* (Acanthaceae), a new and endangered chiropterophylous species from the highlands of central-southern Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 545, n. 2, p. 151-162, 2022.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C. L. C.; FRASSON, A. P.; TASCA, T.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SINGH, P.; KHOSA, R. L.; MISHRA, G.; TAHSEEN, M. A. A phytopharmacological review on *Justicia picta* (Acanthaceae): A well known tropical folklore medicinal plant. **J Coastal Life Med**, v. 3, p. 1000-2, 2015.

SOUZA, L. G. S.; ALMEIDA, M. C. S.; LEMOS, T. L. G.; RIBEIRO, P. R. V.; CANUTO, K. M.; BRAZ-FILHO, R.; CISTIA, C. N. D.; SANT'ANNA, C. M. R.; BARRETO, F. S.; MORAES, M. O. Brazoides AD, new alkaloids from *Justicia gendarussa* Burm. F. species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1281-1287, 2017.

TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013.

VOGEL, S.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. *Harpochilus neesianus* and other novel cases of chiropterophily in neotropical Acanthaceae. **TAXON**, v. 53, n. 1, p. 55-60, 2004.