

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/10/2020.

**AMAURI ALVES DE SOUZA JÚNIOR**

**Aplicação de ionização por electrospray e química computacional  
no estudo de benzopiranos de espécies de Piperaceae**

*Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Química.*

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maysa Furlan

**Coorientador:** Prof Dr Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S719a Souza Júnior, Amauri Alves de  
Aplicação de ionização por electrospray e química  
computacional no estudo de benzopiranos de espécies de  
Piperaceae / Amauri Alves de Souza Júnior. –  
Araraquara : [s.n.], 2018  
143 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Maysa Furlan

Coorientador: Ian Castro-Gamboa

1. Piperaceae. 2. Benzopiranos. 3. Metabolômica.  
4. Hiperconjugação. 5. Termoquímica. I. Título.

Souza Júnior, Amauri Alves de. **Aplicação de ionização por electrospray e química computacional no estudo de benzopiranos de espécies de Piperaceae**. 2018. 143 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

**Página 10 e linha 27 (AGRADECIMENTOS)**

**Onde se lê**

Agradeço o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de doutoramento e disponibilidade de reserva técnica, os quais foram imperativos para a realização do projeto de pesquisa. Também aproveito para agradecer o apoio da FAPESP pelo financiamento da bolsa de estágio de doutoramento no exterior.

**Leia-se**

Agradeço o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de doutoramento e disponibilidade de reserva técnica, processo nº 2014/22239-8 (FAPESP). Também aproveito para agradecer o apoio da FAPESP pelo financiamento da bolsa de estágio de doutorado no exterior, processo nº 2017/15014-8 (FAPESP). Os recursos financeiros disponibilizados pela FAPESP e CAPES foram imperativos para a realização do projeto de pesquisa.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Aplicação de ionização por electrospray e química computacional no estudo de benzopiranos de espécies de Piperaceae"

**AUTOR: AMAURI ALVES DE SOUZA JÚNIOR**

**ORIENTADORA: MAYSA FURLAN**

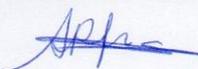
**COORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA**

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



Profª. Drª. MAYSA FURLAN

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



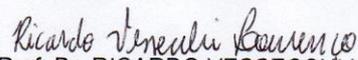
Profª. Drª. ANGELA REGINA ARAUJO

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



Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

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



Prof. Dr. RICARDO VESSECCHI LOURENÇO

Departamento de Química / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Profª. Drª. TAICIA PACHECO FILL

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 29 de outubro de 2018

## SÚMULA CURRICULAR

### DADOS PESSOAIS

Nome: Amauri Alves de Souza Júnior

Filiação: Amauri Alves de Souza e Lúcia Dias Souza

Nascimento: 17/01/1989, Ipameri – GO, Brasil

e-mail: amaurialvejunior@gmail.com

Citação bibliográficas: Souza, A. A.; Souza Júnior, A. A.

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### Doutorado em Química

**Estudos de benzopiranos de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) por ESI-MS/MS combinados a termoquímica computacional com foco em abordagens metabolômicas**

Equipe

**Doutorando:** Amauri Alves de Souza Júnior<sup>1</sup>

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maysa Furlan<sup>1</sup>

**Coorientador:** Prof Dr Ian Castro-Gamboa<sup>1</sup>

**Período:** 2014-2018

**Agências de fomento:** CAPES e FAPESP (2014/22239-8)

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Química, Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-060, Araraquara - SP, Brasil

**Estágio de doutoramento:** University of California – UCDAVIS, DAVIS – CA, USA

**Supervisor:** Prof. Dr. Dean J. Tantillo.

**Período:** 01 de setembro a 31 de dezembro de 2017

**Agência de fomento:** FAPESP/BEPE (Processo: 2017/15014-8)

## **Mestrado em Química**

**Investigação da origem biossintética de cromenos e cromanos em *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae)**

Equipe

**Doutorando:** Amauri Alves de Souza Júnior<sup>1</sup>

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maysa Furlan<sup>1</sup>

**Período:** 2011-2014

**Agências de fomento:** CAPES e FAPESP (2011/16815-8)

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Química, Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-060, Araraquara - SP, Brasil

## **Graduação em Química**

Instituição: Universidade Federal de Goiás – UFG, Departamento de Química

Período: 2007-2011

## **Iniciação Científica**

**Avaliação da fibra de coco (mesocarpo do fruto de *Cocos nucifera* L.) como adsorvente alternativo para a remoção de corantes orgânicos de meio aquoso.**

Equipe

**Aluno:** Amauri Alves de Souza Júnior<sup>2</sup>

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sílvia de Sousa Freitas<sup>2</sup>

**Período:** 2009-2011

**Agências de fomento:** CNPq

<sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás – UFG, Departamento de Química, Avenida Dr<sup>o</sup>. Lamartine Pinto de Avelar, 1120, Setor Universitário, 75704-020, Catalão - GO, Brasil

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F.; PRATI, A. U. C.; SOUZA JUNIOR, A. A.; MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; PINTO, R. A.; GOLIM, M. A.; ARRUDA, M. S. P.; FURLAN, M.; VENTURINI, J. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. *Plos One*, v. 13, p. e0198682, **2018**.
2. POLITI, F. A. S.; SOUZA JUNIOR, A. A.; FANTATTO, R. R.; PIETRO, R. C. L. R.; BARIONI, W.; RABELO, M. D.; BIZZO, H. R.; DE SOUZA CHAGAS, A. C.; FURLAN, M. Chemical composition and *in vitro* anthelmintic activity of extracts of *Tagetes patula* against a multidrug-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Chemistry & Biodiversity*, v.15, p. e1700507, **2018**.
3. TAVARES, W. S.; GRAZZIOTTI, G. H.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; SOUSA, S. F.; CONSOLARO, H. N.; RIBEIRO, P. E. A.; ZANUNCIO, J. C. Screening of Extracts of Leaves and Stems of *Psychotria* spp. (Rubiaceae) against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) for Maize Protection. *Journal of Food Protection*, v. 76, p. 1892-1901, **2013**.

### **Artigo científico (em análise)**

1. SOUZA, A. A.; VESSECCHI, R.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. Combined use of electrospray ionization tandem mass spectrometry and computational chemistry to study protonated 2H-chromenes from *Piper aduncum*. *Journal of Organic Chemistry*, **2018**.

### **Artigo científico (em preparo)**

1. SOUZA, A. A.; VESSECCHI, R.; SAUNDERS, C.; CASTRO-GAMBOA, I.; TANTILLO, D. J.; FURLAN, M. Computational chemistry approach to ESI-MS/MS data analysis: an examination of protonated chromanes, **2018**.

### **Participação em evento científico – Nacional**

1. **40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 7 a 14 de julho de 2017. São Paulo – SP, Brasil.

2. **1ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp Araraquara.** Realizado no Instituto de Química, Araraquara – SP, Brasil. Período: 09 e 13 de janeiro de 2017.
3. **XXXIV Escola de Verão em Química.** Realizado na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil. Período: 17 a 21 de fevereiro de 2014.

#### **Participação em evento científico – Internacional**

1. **The American Society of Pharmacognosy Annual Meeting.** July 29 - August 2, 2017. Portland – OR, USA.
2. **46<sup>th</sup> World Chemistry Congress and IUPAC 49<sup>th</sup> General Assembly.** July 7<sup>th</sup> - 14<sup>th</sup>, 2017. São Paulo - SP, Brazil.
3. **9<sup>th</sup> Joint Natural Products Conference.** July 24-27, 2016. Copenhagen, Denmark.
4. **II Simpósio Internacional de Medicina Regenerativa e Inovação em Saúde.** November 19-21, 2015. Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, Brazil.
5. **2<sup>nd</sup> International Conference on Natural Products Utilization.** October 14-17, 2015. Plovdiv, Bulgária.
6. **First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics.** March 13-14, 2015. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil.

#### **Apresentação de trabalho – Evento científico Internacional**

1. SOUZA, A. A.; VESSECCHI, R.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. **ESI-MS/MS and computational chemistry: important tools for dereplication of benzopyrans from Piperaceae species.** 2017. The American Society of Pharmacognosy Annual Meeting. Saturday, July 29 - August 2, 2017. Portland – OR, USA.
2. SOUZA JÚNIOR, A. A.; ZANIN, L. L.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. **Metabolomics studies of Piperaceae species: a correlation between miniaturization and direct extraction strategies.** 2016. 9<sup>th</sup> Joint Natural Products Conference. July 24-27, 2016. Copenhagen, Denmark.
3. SOUZA JÚNIOR, A. A.; PIVATTO, M.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P.; FURLANA, M. **ESI-MS/MS of benzopyrans: a systematic study of fragmentation mechanism for metabolomic approach.** 2015. 2<sup>nd</sup>

International Conference on Natural Products Utilization. October 14-17, 2015. Plovdiv, Bulgária.

4. POLITI, F. A. S.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; FANTATTO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; FURLAN, M. **Phytochemical study and in vitro acaricidal action of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) ethanolic extract against engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2015. 5<sup>nd</sup> Brazilian Conference on Natural Products. October 26-29. Atibaia - SP, Brazil.

#### **Publicação de trabalho – Evento científico Internacional**

1. SOUZA JÚNIOR, A. A.; ZANIN, L. L.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. Metabolomics studies of Piperaceae species: a correlation between miniaturization and direct extraction strategies. *Planta Medica*, v. 81, p. S1-S381, **2016**.

#### **Palestra**

1. **Espectrometria de massas: o universo *m/z* para aplicações biotecnológicas**. 2016. Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia – Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP, Brasil.

#### **Seminário**

1. **Dinâmica metabólica de terpenos voláteis: uma correlação entre o efeito isotópico cinético e a hiperconjugação**. 2016. Instituto de Química - UNESP, Araraquara - SP, Brasil.

#### **Conferência – Evento científico**

1. **Produtos naturais na saúde e na biotecnologia**. 2015. II Simpósio Internacional de Medicina Regenerativa e Inovação em Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, Brasil.

## **Participação em cursos**

- 1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE: princípios teóricos.** 05 a 07 e agosto de 2015. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, São Carlos - SP, Brasil. Carga Horária: 24 h.
- 2. Introduction to Plant Metabolomics.** 17 a 21 de fevereiro de 2014. Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, São Carlos - SP, Brasil. Carga Horária: 20 h.

Dedico esta tese à minha família, minha mamãe Lúcia, meu papai  
Amauri, meus irmãos, à Carla e meus avós (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de fazer o primeiro agradecimento à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maysa Furlan, por me oferecer oportunidades transformadoras, pelo suporte científico, pelas discussões e conversas produtivas. Obrigado pela confiança e amizade que me foi concedida nestes anos.

Aos membros do NuBBE agradeço pelo companherismo, apoio, troca de conhecimentos e momentos formidáveis no dia-a-dia.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, pela orientação, amizade e motivação.

Ao meu supervisor no estágio de doutoramento, Prof. Dr. Dean J. Tantillo (UCDAVIS), pelo acolhimento na Universtiy of California, excelente convivência, acesso a infraestrutura e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Vessecchi (USP), pela colaboração e ensinamentos na parte de cálculo e espectrometria de massas.

Também aproveito para agradecer ao Professor Ricardo Vessecchi e ao Professor Paulo Clairmont, pelas significativas contribuições no exame de qualificação.

A Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Química de Araraquara e ao Programa de Pós-graduação em química, por ter me concedido a oportunidade da realização do doutorado.

Aos servidores e grandes amigos João Bronzel, Juliana Rodrigues e Nivaldo Boralle pelos treinamentos recebidos.

Ao Professor Norberto Peporine Lopes (USP) pelo suporte nas análises.

Aos professores que compuseram essa banca de defesa, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maysa Furlan, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela R. Araújo, Prof. Dr. Nailton M. Nascimento Jr., Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Taícia P. Fill e Prof. Dr. Ricardo Vessecchi, por suas contribuições, análise e avaliação do trabalho.

Agradeço o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de doutoramento e disponibilidade de reserva técnica, os quais foram imperativos para a realização do projeto de pesquisa. Também aproveito para agradecer o apoio da FAPESP pelo financiamento da bolsa de estágio de doutoramento no exterior.

Aos meus pais, Amauri e Lúcia, por terem me criado e educado com tanto amor, carinho e dedicação incondicional. Uma felicidade estupenda dividir mais uma etapa com vocês!

Aos meus Irmãos, Rudnei e Rusivelton, pela inestimada amizade e carinho.

Agradeço carinhosamente a Carla, por estar presente e me acompanhar na minha caminhada científica, dividindo momentos de muito estresse e, principalmente, dias felizes e alegres. Obrigado pelo apoio, paciência, dedicação e carinho!

Ao Sr. Américo (*in memoriam*) e Sra. Leda pelo apoio e amizade.

Agradeço a todos os amigos e familiares pelo apoio e compreensão.

Aos meus amigos-irmãos adquiridos durante o tempo de pós-graduação, em especial ao Alexander, ao Cristiann, ao Cristiano, ao Fernando, à Gislaine, ao Marcos, ao João, ao Juliano, à Marielle, ao Tiago e à Vânia.

## RESUMO

A pesquisa por candidatos a fármacos pelas indústrias farmacêuticas e o desenvolvimento no Brasil de novos produtos aplicados à área da saúde humana e animal são processos que requerem otimização contínua. A metabolômica, particularmente, tem contribuído efetivamente no planejamento de estratégias eficientes aplicadas a bioprospecção de produtos naturais. Nesse contexto, *2H*-cromenos e cromanos que mostram acúmulo em espécies de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) foram selecionados para o desenvolvimento de uma abordagem teórica/experimental aplicada ao estudo de matrizes complexas. Para tanto, métodos computacionais com base na teoria do funcional de densidade foram aplicados para prever grandezas termoquímicas de benzopiranos, incluindo afinidade protônica, basicidade em fase gasosa e diagramas de energia da coordenada de reação. As grandezas termoquímicas obtidas pela aplicação de química computacional foram empregadas em sinergia com os dados de ESI(+)-MS/MS, visando descrever o perfil de fragmentação do núcleo benzopirano do tipo *2H*-cromeno e cromano, incluindo a descrição de mecanismos de fragmentação clássicos e dissociações específicas para cada subclasse. Além disso, uma abordagem metabolômica mimetizando etapas de um estudo de bioprospecção foi realizada com a finalidade de validar o perfil de fragmentação proposto para os *2H*-cromenos e cromanos. Os resultados mostraram que a estrutura química dos benzopiranos confere características intrínsecas ao equilíbrio ácido-base que representa as espécies protonadas. Entre esses aspectos, o *2H*-cromeno prenillado mostrou que a adição do próton na ligação dupla da unidade prenilla está de acordo com um estado de transição de 6 membros. Além disso, as grandezas termoquímicas mostraram que a nucleofilicidade do anel pirano dos cromanos depende dos substituintes ligados ao C2. Assim, o aumento da contribuição por hiperconjugação favoreceu a clivagem heterolítica da ligação O-C2 do anel pirano. Consequentemente, uma bifurcação na fragmentação do núcleo benzopirano dos derivados de cromanos naturais justificou adequadamente a formação do íon diagnóstico após a perda de 122 *u*. Na maioria dos trabalhos, essa fragmentação é explicada atendendo ao mecanismo concertado de retro Diels Alder. Nessa perspectiva, o padrão de fragmentação de *2H*-cromenos e cromanos corroborou com a distribuição de íons na curva de energia, e com o perfil de energia mensurado no modelo B3LYP/6-31+G(d,p). Usando as reações de

fragmentação estudadas por ESI(+)-MS/MS, propostas de identificação estrutural de 2*H*-cromenos e cromanos foram descritas à partir da análise de espectros de massas adquiridos em mistura. Portanto, o presente trabalho confirmou que o uso integrado de ferramentas analíticas e computacionais se configura em uma abordagem eficiente para a pesquisa de substâncias naturais em misturas complexas.

**Palavras-chave:** Piperaceae. *Piper aduncum*. *Peperomia obtusifolia*. Benzopiranos. Ionização por electrospray. Termoquímica computacional. Hiperconjugação. Reação retro Diels-Alder.

## ABSTRACT

The research for new drug candidates by pharmaceutical companies and the development in Brazil of new products applied to human and animal health are processes that require continuous optimization. The metabolomics have contributed effectively to plan efficient strategies applied to the bioprospecting of natural products. In this context, *2H*-chromenes and chromanes that show accumulation in *Piper aduncum* and *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) were selected for the development of a theoretical/experimental approach applied to the study of complex matrices. For this purpose, quantum-chemical calculations based on density functional theory were applied to predict some thermochemical parameters of benzopyrans, including proton affinity, gas-phase basicity and reaction coordinate energy diagrams. Such computational parameters were employed in synergy with the ESI(+)-MS/MS data, aiming to describe the fragmentation profile of the *2H*-chromene and chromane, including the description of classical fragmentation mechanisms and specific dissociations for each subclass. Among these aspects, the prenylated *2H*-chromene showed that the addition of the proton at the double bond of the prenyl unit is related to a 6-member transition state. Besides that, the thermochemical parameters have shown that the nucleophilicity of the pyran ring of the chromans depends on the C2-linked substituents. Thus, increased contribution by hyperconjugation favored the heterolytic cleavage of the O-C2 bond of the pyran ring. Consequently, a bifurcation in the fragmentation of the chromane derivatives justified adequately the formation of the diagnostic ion after the loss of 122 *u*. In most works, this fragmentation is explained by the concerted mechanism of retro Diels Alder. In this perspective, the fragmentation pattern of *2H*-chromenes and chromanes corroborated with the ion distribution in the energy-resolved plot, and with the energy profile measured in the B3LYP/6-31+G(d,p) model. Using the fragmentation reactions studied by ESI(+)-MS/MS, structural analysis and identification for *2H*-chromenes and chromanes were described from the analysis of mass spectra acquired in the mixture. Therefore, the present work confirmed that the integrated use of analytical and computational tools are efficient approaches for identification of natural compounds in complex matrices.

**Keywords:** Piperaceae. *Piper aduncum*. *Peperomia obtusifolia*. Benzopyrans. Electrospray ionization. Computational thermochemistry. Hyperconjugation. Retro Diels-Alder reaction.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estruturas químicas de alguns dos produtos naturais isolados no século XIX: emetina, colchicina, quinina, salicina, atropina, morfina,\* quinidina, codeína e efedrina. ....27
- Figura 2** – Estrutura química do ácido acetilsalicílico.\* .....28
- Figura 3** - Representação dos íons positivos e negativos que podem ser produzidos nas análises por ESI-MS.<sup>a,b,c</sup> .....33
- Figura 4** - Proposta para a formação de espécies protonadas de um benzopirano genérico com base no equilíbrio ácido-base de Brønsted-Lowry..... 35
- Figura 5** - Estrutura química da piperina.\* ..... 37
- Figura 6** - Estruturas químicas e nomenclatura de 1-benzopiranos, incluindo cromano, 2*H*-cromeno e 4*H*-cromeno. Esses heterocíclicos são o núcleo base de uma extensa variedade de produtos naturais..... 37
- Figura 7** - Estruturas químicas de alguns 1-benzopiranos naturais.\* .....39
- Figura 8** - Estruturas químicas do 2*H*-cromeno ácido gaudichaudiânico isolado do extrato etanólico de *Piper gaudichadianum* (Piperaceae) e, do derivado esterificado obtido por modificação molecular.....40
- Figura 9** - Estruturas químicas dos cromanos isolados do extrato etanólico de partes aéreas *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae).\* ..... 40
- Figura 10** -Estruturas químicas dos cromanos esterificados com monoterpênos do tipo endo-borneol e endo-fenchol, isolados da fração lipofílica do extrato etanólico das partes aéreas de *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae)..... 41
- Figura 11** -Proposta biossintética de benzopiranos em espécies de *Piper* e *Peperomia*. ....41
- Figura 12** -Estruturas químicas dos 2*H*-cromenos **1-3** previamente isolados do extrato bruto das partes aéreas de *Piper aduncum* (Piperaceae). M.M. indica o valor da massa molecular em unidades de massa atômica (*u*). .....52
- Figura 13** -Mapa do potencial eletrostático molecular (MEP) de **1** calculado no modelo B3LYP/6-31+G(d,p). A magnitude da densidade de elétrons é indicada pelas cores vermelho (maior) e azul (menor). A análise do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) é ilustrada a direita do MEP. .... 53
- Figura 14** -Cargas atômicas (MK) usando o esquema Merz-Singh-Kollman para os átomos de oxigênios de **1-3** calculadas no modelo B3LYP/6-31+G(d,p). .... 53

- Figura 15** -Afinidade protônica (valores em negrito) e basicidade em fase gasosa em kcal/mol para **1-3**, calculadas para as principais formas protonadas no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).....54
- Figura 16** -Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da **[1+H]<sup>+</sup>** obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 235. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV. .... 55
- Figura 17** -Proposta de fragmentação para a **[1+H]<sup>+</sup>**. Na figura são apresentadas duas rotas, denominadas a1 e a2.\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p)..... 57
- Figura 18** -Curva de energia do íon precursor *m/z* 235 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. ....58
- Figura 19** -Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da **[2+H]<sup>+</sup>** obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 219. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV. .... 59
- Figura 20** -Curva de energia do íon precursor *m/z* 219 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. ....59
- Figura 21** -Proposta de fragmentação para a **[2+H]<sup>+</sup>**. Na figura são apresentadas duas rotas, denominadas b1 e b2.\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p)..... 60
- Figura 22** -Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da **[3+H]<sup>+</sup>** obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 287. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV. .... 61
- Figura 23** -Curva de energia do íon precursor *m/z* 287 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. ....62
- Figura 24** -Diagrama de energia para a etapa de transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano, produzindo duas espécies protonadas de **3 (C1 e C1')**.\* .....64
- Figura 25** -Proposta de fragmentação para a **[3+H]<sup>+</sup>**. Na figura são apresentadas três rotas, denominadas de c1, c2 e c3.\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p). . 65
- Figura 26** -Diagrama de energia para a perda de 3-metilbuta-1,2-dieno a partir da **[3+H]<sup>+</sup> (C2)**.\* ..... 67

- Figura 27** -Proposta de fragmentação para a  $[M+H]^+$  considerando o mecanismo retro Diels-Alder. M indica um benzopirano genérico.....68
- Figura 28** -Estruturas químicas dos cromanos **4-6**. As substâncias foram estudadas usando o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).....69
- Figura 29** -Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie neutra (M, neutra).\* .....70
- Figura 30** -Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie protonada na hidroxila fenólica  $\{[M+H]^+, \text{espécie protonada}\}$ .\* .....71
- Figura 31** -Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie protonada no átomo de oxigênio do anel pirano  $\{[M+H]^+, \text{espécie protonada}\}$ .\* .....72
- Figura 32** -Afinidade protônica (valores em negrito) e basicidade em fase gasosa em kcal/mol para as substâncias **4-12**, calculadas para as principais formas protonadas no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).....74
- Figura 33** -Geometrias otimizadas para os benzopiranos **4, 7, 8, 9** e **10** no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).\* .....76
- Figura 34** -Geometrias otimizadas para os benzopiranos **4, 7, 8, 9** e **10** no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).\* .....77
- Figura 35** -Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da  $[10+H]^+$  obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor  $m/z$  327. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.....79
- Figura 36** -Curva de energia do íon precursor  $m/z$  327 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A  $m/z$  observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. ....79
- Figura 37** -Proposta de fragmentação para a  $[10+H]^+$ .\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) relativas são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).\* .....80
- Figura 38** -Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da  $[11+H]^+$  obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor  $m/z$  371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.....82

- Figura 39** -Curva de energia do íon precursor  $m/z$  371 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A  $m/z$  observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. ....82
- Figura 40** -Proposta de fragmentação para a  $[11+H]^+$ .\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p)..... 85
- Figura 41** -Espectro de massas de ESI(+)-MS/MS da  $[12+H]^+$  obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor  $m/z$  371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.....86
- Figura 42** -Curva de energia do íon precursor  $m/z$  507 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A  $m/z$  observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. ....87
- Figura 43** -Proposta de fragmentação para a  $[12+H]^+$ .\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p)..... 88
- Figura 44** -Gráficos de rendimento em função do solvente de extração para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU), B) *Piper tuberculatum* (PIARB) e C) *Piper arboreum* (PITUB). Para cada espécie os rendimentos dos extratos brutos e daqueles após o preparo de amostra são indicados pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente. ....90
- Figura 45** -Perfil do número de bandas cromatográficas detectadas (nBCd),\* a 254 nm, para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU), B) *Piper tuberculatum* (PIARB) e C) *Piper arboreum* (PITUB). As fases móveis constituídas por ACN/H<sub>2</sub>O e MeOH/H<sub>2</sub>O são indicadas pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente. ....92
- Figura 46** -Gráficos de rendimento em função do solvente de extração para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU) e B) *Peperomia obtusifolia* (PEOBT). Para cada espécie os rendimentos dos extratos brutos e daqueles após o preparo de amostra são indicados pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente. O valor na cor verde é o número de bandas cromatográficas detectadas (nBCd) a 254 nm.\* .....95
- Figura 47** -Espectros de massas ESI(+)-MS/MS obtidos em um aparelho Q-TOF selecionando os íons precursores: A)  $m/z$  235 e B)  $m/z$  219. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV. ....97
- Figura 48** -Curvas de energia obtidas a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS para os íons precursores: A)  $m/z$  235 e B)  $m/z$  219. A faixa de ativação de íons utilizada foi de 5 a 35 eV. A  $m/z$  observada em alta resolução para cada íon precursor é mostrada na parte superior da curva de energia. O experimento foi adquirido em um aparelho Q-TOF..... 98

- Figura 49** -Proposta de fragmentação para os íons  $m/z$  235 e 219.\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p). ..... 101
- Figura 50** -Espectros de massas ESI(+)-MS/MS obtidos em um aparelho Q-TOF selecionando os íons precursores: A)  $m/z$  327 e B)  $m/z$  371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV. .... 104
- Figura 51** -Curvas de energia obtidas a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS para os íons precursores: A)  $m/z$  327 e B)  $m/z$  371. A faixa de ativação de íons utilizada foi de 5 a 35 eV. A  $m/z$  observada em alta resolução para cada íon precursor é mostrada na parte superior da curva de energia. O experimento foi adquirido em um aparelho Q-TOF..... 105
- Figura 52** -Diagrama de energia para a etapa de transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano produzindo duas formas protonadas da substância **6** (**F1** e **F1'**).\* ..... 107
- Figura 53** -Proposta de fragmentação para o íon  $m/z$  327. No esquema é apresentado uma terceira proposta para a química de fragmentação do cromano **10**.\* ..... 108
- Figura 54** -Proposta de fragmentação para o íon  $m/z$  371.\* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p). ..... 110

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AceO	acetona
ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
BuOH	butanol
CID	dissociação induzida por colisão (collision-induced dissociation)
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DFT	teoria do funcional de densidade (density functional theory)
EFS	extração em fase sólida (solid phase extraction)
$E_{lab}$	energia aplicada no processo de dissociação induzida por colisão
eV	eletronvolt
ESI	ionização por electrospray (electrospray ionization)
ESI-MS	espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray
EtOH	etanol
GB	basicidade em fase gasosa (gas-phase basicity)
g	gramas
Hartree	unidade atômica de energia
HOMO	orbital molecular ocupado de maior energia
IsOH	isopropanol
MeOH	metanol
MEP	mapa do potencial eletrostático molecular
MM	massa molecular
MS	espectrometria de massas (mass spectrometry)
MS/MS	espectrometria de massas sequencial

<i>m/z</i>	relação massa/carga
nBCD	número de bandas cromatográficas detectadas
PA	afinidade protônica (proton affinity)
PNs	produtos naturais
Q-TOF	analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo
Q-TRAP	analisador do tipo quadrupolo-ion trap
rDA	reação retro Diels-Alder
<i>u</i>	unidade de massa atômica unificada
UV-Vis	ultravioleta-visível
v/v	volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1	<b>A importância dos produtos naturais .....</b>	<b>25</b>
1.2	<b>Metabolômica .....</b>	<b>29</b>
1.3	<b>Processo de extração para estudos metabolômicos.....</b>	<b>31</b>
1.4	<b>Espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray .....</b>	<b>32</b>
1.4.1	Intepretração de dados de ESI-MS/MS assistida por química computacional .....	34
1.5	<b>A família Piperaceae.....</b>	<b>36</b>
1.5.1	Benzopiranos.....	37
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>42</b>
2.1	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>43</b>
3.1	<b>Suporte cromatográfico.....</b>	<b>43</b>
3.1.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
3.1.2	Cartuchos para extração em fase sólida e membranas para filtração.....	43
3.2	<b>Equipamentos .....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Instrumento para análises por CLAE .....	43
3.2.2	Instrumentos para análises por espectrometria de massas em alta resolução ou experimentos sequenciais .....	44
3.3	<b>Plataforma computacional .....</b>	<b>45</b>
3.3.1	Supercomputadores .....	45
3.3.2	Programas para processamento, análise e apresentação de dados.....	45
3.4	<b>Métodos .....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Coleta e classificação de material vegetal.....	46
3.4.1.1	<i>Preparo do material vegetal .....</i>	<i>46</i>
3.4.1.2	<i>Isolamento e purificação de 2H-cromenos e cromanos .....</i>	<i>47</i>
3.4.2	Estudo de 2H-cromenos e cromanos por espectrometria de massas .....	47
3.4.2.1	<i>Preparo de amostra.....</i>	<i>47</i>
3.4.2.2	<i>Análises por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS .....</i>	<i>47</i>
3.4.3	Estudo do processo de extração de espécies de Piper e Peperomia.....	48
3.4.3.1	<i>Preparo dos extratos vegetais.....</i>	<i>48</i>
3.4.3.2	<i>Preparo de amostra.....</i>	<i>48</i>
3.4.3.3	<i>Análises por CLAE .....</i>	<i>49</i>

3.4.4	Análises dos extratos vegetais por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS .....	50
3.4.5	Métodos computacionais.....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
4.1	Estudo do padrão de dissociação de 2 <i>H</i> -cromenos isolados de <i>Piper aduncum</i> por ESI(+)-MS/MS e química computacional .....	52
4.2	Estudo do padrão de fragmentação de cromanos isolados de <i>Peperomia obtusifolia</i> por ESI(+)-MS/MS e química computacional .....	68
4.3	Estudo do processo de extração de espécies de <i>Piper</i> : rastreamento analítico do perfil metabólico por CLAE.....	89
4.4	Estudo do processo de extração das espécies de <i>Piper aduncum</i> e <i>Peperomia obtusifolia</i> : rastreamento analítico do perfil metabólico por CLAE. ....	93
4.5	Identificação de 2 <i>H</i> -cromenos e cromanos em extratos vegetais a partir dos dados obtidos nas análises por ESI(+)-MS/MS e química computacional.....	96
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>
	<b>APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS .....</b>	<b>123</b>
	<b>APÊNDICE B – COORDENADAS CARTESIANAS (XYZ) E GRANDEZAS TERMOQUÍMICAS.....</b>	<b>126</b>
	<b>APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES POR CLAE .....</b>	<b>137</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A importância dos produtos naturais

Ao longo do processo de desenvolvimento da civilização e novas perspectivas de qualidade de vida da sociedade, os recursos naturais têm sido fonte de matéria-prima imperativa para a manutenção das mais diversas necessidades básicas. Nesse contexto, as plantas se configuram em excelentes fontes para suprir a demanda de itens essenciais, incluindo moradia, mobiliário, vestuário, combustível (biomassa), alimentação e medicamentos. Nessa perspectiva, um dos maiores pilares no desenvolvimento da humanidade pode ser atribuído ao uso das espécies vegetais para a prevenção e o tratamento de doenças que acometem o homem, permitindo consolidar a melhoria da saúde e a expectativa de vida da população<sup>1-6</sup>.

Documentos datados de 2600 anos a.C. registraram o uso da medicina tradicional na região da Mesopotâmia, corroborado pelo desenvolvimento de sofisticadas formulações líquidas com propriedades terapêuticas produzidas a partir de extratos vegetais. Por exemplo, essa “extratoteca” contemplava o preparo de óleos essenciais de espécies de *Cedrus*, *Cupressus*, *Glycyrrhiza*, *Commiphora* e *Papaver*, perfazendo um conjunto de formulações que poderiam ser indicadas para o tratamento de inflamações, infecções parasitárias, resfriados e para o alívio das dores<sup>4,7</sup>.

Historicamente, o documento egípcio (1500 a.C.) conhecido como "Papiro de Ebers", relata um número significativo de enfermidades e o emprego de formulações empíricas, de origem animal e vegetal, para os mais variados fins medicinais. Além disso, outros documentos na China e na Índia datados de 1000 a.C., registraram também o uso da medicina tradicional, cujo acervo contava com centenas de produtos naturais (PNs) oriundos de plantas<sup>7</sup>.

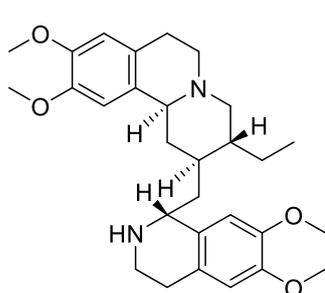
A evolução da ciência e a difusão do conhecimento ao longo de muito tempo (p. ex., sólida medicina tradicional documentada em farmacopéias), especialmente a partir do início do século XIX, impulsionaram o isolamento de inúmeras substâncias farmacologicamente ativas obtidas a partir de plantas medicinais<sup>1-5,7</sup>. Neste sentido, os primeiros exemplos de PNs isolados de plantas medicinais foram: emetina (1817);

colchicina (1820); quinina (1820); salicina (1827); atropina (1831); morfina (1832); quinidina (1833); codeína (1848) e efedrina (1887), como esboçado na Figura 1<sup>4,6</sup>.

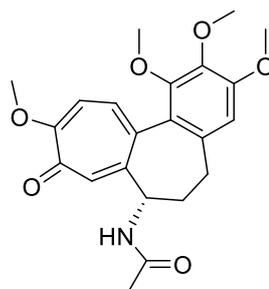
Nesta vertente, o arranjo sistemático desses resultados associado com o acesso a instrumentação analítica robusta e precisa permitiu o desenvolvimento de formulações e o início de uma nova era na medicina. Neste momento, os medicamentos poderiam ser administrados aos pacientes em doses precisas. Um exemplo clássico é o caso da Morfina<sup>®</sup>, um potente analgésico lançado no mercado pela empresa E. Merck, em 1926. A morfina é o princípio ativo desse medicamento (Figura 1), um produto natural extraído de *Papaver somniferum* (Papaveraceae)<sup>1,7-9</sup>.

Outro exemplo de destaque dos avanços científicos do século XIX pode ser ilustrado com o desenvolvimento da Aspirina, um analgésico e antipirético comercializado pela empresa Bayer à partir de 1899. O princípio ativo da aspirina, o ácido acetilsalicílico (Figura 2), é uma substância pura obtida via semi-síntese com efeitos colaterais leves e eficácia terapêutica comprovada<sup>1,8,9</sup>.

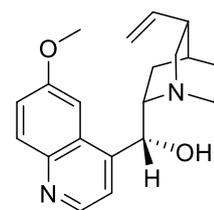
No contexto histórico, em 1828, o farmacêutico alemão J. A. Buchner concluiu que o glicosídeo do álcool salicílico era o principal princípio ativo da planta *Salix alba* (Salicaceae), a qual as cascas eram utilizadas popularmente para alívio das dores e febre. Em 1860, os químicos alemães H. Kolbe e E. Lautemann sintetizaram o ácido salicílico a partir do fenol inspirados pela estrutura química deste glicosídeo, contribuindo para que o químico alemão, F. Hoffmann, propusesse a obtenção do ácido acetilsalicílico via acetilação da hidroxila do ácido salicílico, em 1898<sup>1,6,8,9</sup>.



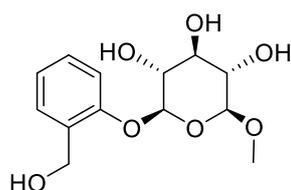
emetina



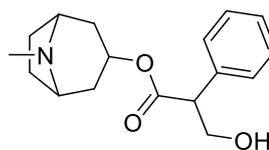
colchicina



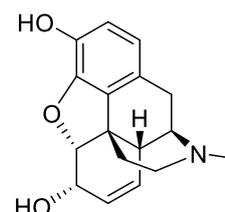
quinina



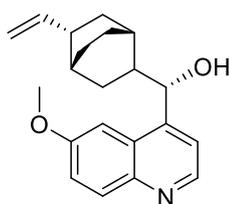
salicina



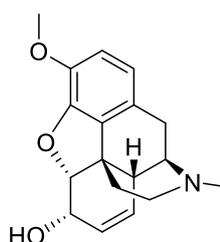
atropina



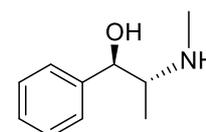
morfina



quinidina



codeína

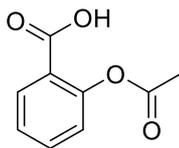


efedrina

\* Esse alcaloide de importância milenar e com ação analgésica foi originalmente isolado de *Papaver somniferum* (Papaveraceae), em 1804, pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm e é conhecido como o marcador de tempo da Química de Produtos Naturais<sup>1,6</sup>.

**Figura 1** - Estruturas químicas de alguns dos produtos naturais isolados no século XIX: emetina, colchicina, quinina, salicina, atropina, morfina,\* quinidina, codeína e efedrina.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.



ácido acetilsalicílico

\* A aspirina é o fármaco mais usado no mundo. Além de apresentar eficiência comprovada, os efeitos colaterais da aspirina são leves quando comparados a outros fármacos de interesse<sup>6</sup>.

**Figura 2** – Estrutura química do ácido acetilsalicílico.\*

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

As décadas 1930-1950 estabeleceram um novo marco importante da ciência para o provimento de saúde e bem-estar humano, por meio do desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos a partir de PNs. Este período, denominado de “décadas dos antibióticos”, foi consagrado com a descoberta da penicilina (1939); da actinomicina (1942); da estreptomicina (1943); do cloranfenicol (1947); da neomicina (1949) e da eritromicina A (1950)<sup>6,9</sup>.

A contribuição dos PNs para o planejamento de novos medicamentos também se mostrou extremamente importante para a quimioterapia antineoplásica. Os alcaloides vincristina e vimblastina, ambos isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae); o paclitaxel, isolado de cascas de árvores de *Taxus brevifolia* (Taxaceae); a daunorubicina e o seu análogo hidroxilado doxorubicina, ambos isolados de *Streptomyces sp.* são exemplos que devem ser destacados<sup>8-10</sup>.

Mais recentemente, em 2016, uma revisão sistemática realizada por Newman e Cragg reforçou a importância dos PNs nos avanços para descoberta de novos fármacos<sup>11</sup>. Um dado relevante do estudo conduzido por esses pesquisadores englobou a terapêutica antineoplásica e antimicrobiana, no período de 1940 a 2014. De acordo com esses autores, no intervalo avaliado, os PNs e derivados semissintéticos - inspirados em PNs – representaram 41% e 65%, dos fármacos aprovados para o desenvolvimento de novos medicamentos com ação frente à diversos tipos de tumores e doenças infecciosas, respectivamente<sup>11</sup>. Portanto, essa breve contextualização corrobora na perspectiva que a natureza é uma fonte inestimável de princípios ativos, que podem ser usados na produção de medicamentos eficazes para a cura de doenças que acometem o homem<sup>2-6,8,11,12</sup>.

Em contrapartida, apesar dos inegáveis avanços alcançados no campo dos medicamentos oriundos de PNs, as análises sistemáticas têm indicado os desafios dos estudos de bioprospecção e, até mesmo, um acentuado declínio nos investimentos em programas de pesquisa voltados ao uso sustentável da biodiversidade. Entre os fatores que levaram a esse retrocesso, destaca-se o tempo demasiado necessário para a conclusão desse tipo de ciência; a grande demanda de investimentos em recursos humanos qualificados e, não menos importante, a infraestrutura de ponta que é indispensável<sup>2,6,11-14</sup>.

Nesse contexto, a Química de Produtos Naturais tem ganhado relevância com o desenvolvimento das ciências “ômicas”, incluindo a genômica, transcriptômica, a proteômica e a metabolômica. A metabolômica, particularmente, têm contribuído efetivamente no planejamento de estratégias eficientes aplicadas a bioprospecção de PNs, integralizando as etapas de aquisição, mineração e interpretação do conjunto de dados gerados durante os delineamentos experimentais<sup>15-20</sup>.

## 1.2 Metabolômica

A metabolômica é o termo usado para definir as análises de caráter qualitativo e quantitativo acerca de todos os metabólitos de uma determinada matriz de origem biológica (incluindo células, tecidos ou organismos), sob um conjunto de condições bióticas e abióticas específicas<sup>18</sup>. No entanto, o mapeamento completo da composição metabólica - análise metabolômica - de uma dada matriz, requer o uso de estratégias analíticas altamente sensíveis. Conseqüentemente, esse parâmetro é responsável por originar limitações ao planejamento de estudos metabolômicos<sup>16,17,21,22</sup>. Apesar disso, novas ferramentas – mais robustas e precisas – têm sido desenvolvidas e vêm sendo aplicadas com sucesso na pesquisa em PNs.

Com a finalidade de sistematizar as oportunidades da metabolômica no contexto dos PNs, os estudos metabolômicos podem ser classificados em quatro diferentes abordagens: i) metabolômica, ii) impressão digital metabólica, iii) perfil metabólico e iv) análise alvo<sup>15,16,22,23</sup>.

- i) Metabolômica é o estudo que visa identificar e quantificar o conjunto de todos os metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo, célula ou tecido específico, sob condições bióticas ou abióticas

previamente definidas. No entanto, as aplicações dessa abordagem ainda apresentam limitações, pois determinados organismos podem produzir numerosos metabólitos. Conseqüentemente, a detecção quantitativa e simultânea de todos os metabólitos torna-se inviabilizada pelo uso de uma única técnica analítica. Adicionalmente, no contexto de elaboração de respostas, a interpretação da infinidade de dados gerados na metabolômica também é desafiadora<sup>17-19,22,24</sup>.

- ii) As análises com ênfase na impressão digital metabólica consistem em comparar um panorama geral do metaboloma de amostras distintas. Nesse tipo de abordagem, o objetivo é indicar diferenças na composição metabólica das amostras selecionadas. Assim, a capacidade para identificar e quantificar todos os metabólitos presentes nas matrizes em estudo não é um requisito para o desenvolvimento desse tipo de proposta. Por exemplo, a impressão digital metabólica pode ser utilizada no controle de qualidade de plantas medicinais. O conhecimento preliminar sobre o metabolismo da espécie alvo, permite definir os métodos instrumentais e os modelos estatísticos mais adequados para aquisição, tratamento e interpretação de dados<sup>16,19,21,22</sup>.
- iii) O perfil metabólico por sua vez, é uma abordagem com objetivo de determinar variações qualitativas e quantitativas nas substâncias detectadas, de acordo com a técnica analítica de trabalho. Nessa proposta, a percepção de variações específicas em uma ou mais classes de substâncias, auxilia no entendimento da influência de fatores bióticos e/ou abióticos sobre a dinâmica metabólica dos indivíduos estudados. Por exemplo, o perfil metabólico pode ser utilizado para monitorar as respostas bioquímicas de indivíduos modificados geneticamente<sup>17,19,22,25</sup>.
- iv) A quarta abordagem metabolômica é denominada de análise alvo, que consiste na determinação qualitativa ou quantitativa de metabólitos específicos ou marcadores biológicos produzidos por um dado organismo, célula ou tecido. Os parâmetros que alicerçam a análise alvo estão em acordo com os princípios fundamentais relacionados a prospecção de PNs bioativos. Por exemplo, espécies vegetais previamente investigadas podem ser estudadas com a finalidade de

identificar substâncias inéditas. Paralelamente, análises comparativas de indivíduos que pertencem ao mesmo gênero ou família podem auxiliar a prospectar fontes alternativas de PNs de interesse terapêutico. Dessa forma, a otimização dos processos de extração, associados ao emprego de métodos de separação e detecção, com especificidade para os PNs alvos, pode auxiliar no desenvolvimento de modelos experimentais eficientes e versáteis no estudo de matrizes complexas<sup>15,17,19,22,24</sup>.

### **1.3 Processo de extração para estudos metabolômicos**

Na química de produtos naturais, a metodologia de extração é uma estratégia chave para otimizar o delineamento experimental, uma vez que o protocolo de extração pode priorizar a representatividade amostral ou a seletividade de grupos de substâncias. Assim, é importante ressaltar que a escolha do processo extrativo tem consequências diretas sobre a definição do perfil metabólico de referência. Além disso, os estudos metabolômicos são constituídos, em sua maioria, por um número expressivo de amostras. Nessa perspectiva, para a seleção ou adequação de um protocolo de extração do metaboloma, a metodologia deve considerar o objetivo analítico associado a executabilidade e a minimização de processos de degradação, modificação estrutural e perda de analitos<sup>17,22,26</sup>.

Na busca por PNs utilizando-se de métodos clássicos, ou abordagens mais sofisticadas de metabolômica, vários processos de extração têm sido investigados, como a extração por solventes, extração por arraste a vapor, extração por fluido supercrítico e líquidos iônicos. A extração por maceração com solventes orgânicos é a metodologia empregada com maior frequência nos estudos metabolômicos de substâncias bioativas, tanto para matrizes vegetais, quanto para fungos, bactérias e outros animais<sup>27,28</sup>.

A principal vantagem do uso de solventes orgânicos para o preparo de extratos brutos é a possibilidade de otimização da capacidade de extração, uma vez que tanto a polaridade quanto a seletividade podem nortear a solubilidade do meio extrator<sup>17,29-32</sup>.

Em termos qualitativos (diversidade estrutural) e quantitativos (quantidade de analitos alvos), o uso da extração com solventes orgânicos pode orientar para a

escolha de abordagens metabolômicas representativas ou simplesmente seletivas. Além disso, a polaridade do solvente extrator pode ser estabelecida à partir de misturas homogêneas, que combinam grupos específicos de solventes orgânicos, bem como solventes orgânicos e água<sup>15,27,33</sup>.

Outra vantagem que justifica o número de trabalhos descritos avaliando-se o uso de solventes orgânicos (ou mistura de solventes) como meio extrator, é a compatibilidade com a maioria dos métodos analíticos utilizados nas abordagens metabolômicas, incluindo a cromatografia líquida de alta e ultra eficiência, a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray<sup>20,22,25,28</sup>.

#### 1.4 Espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica em que os íons presentes em uma determinada amostra são gerados no estado gasoso e, posteriormente, separados por meio da razão massa/carga ( $m/z$ )<sup>34</sup>.

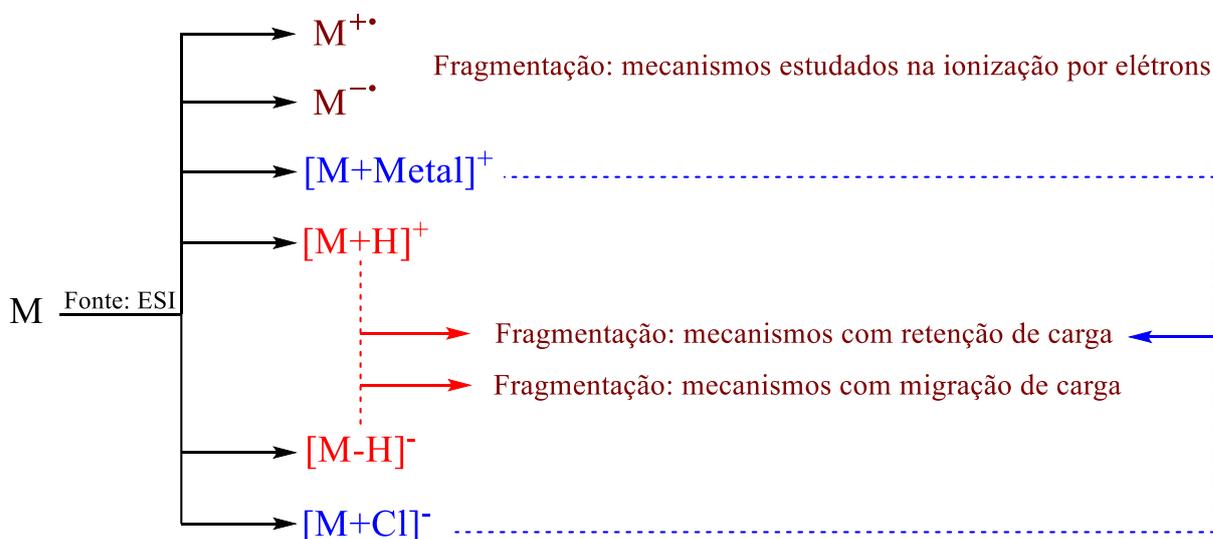
Em termos do fenômeno de geração de íons durante a execução dos experimentos por MS de amostras líquidas, os processos que caracterizam a transferência dessas espécies da fase líquida para gasosa (Figura 3) podem ser sistematizados em três principais transformações químicas: i) os processos de remoção/adição de um elétron e posterior formação de íons radicais ( $M^{\cdot+}$  ou  $M^{\cdot-}$ ); ii) os eventos de protonação ou desprotonação que ocorrem por reações ácido-base, gerando espécies protonadas ( $[M+H]^+$ ) ou desprotonadas ( $[M-H]^-$ ); e iii) a formação de espécies cationizadas (p. ex.  $[M+Na]^+$ ) ou anionizadas (p. ex.  $[M+Cl]^-$ )<sup>34-36</sup>.

Particularmente, as análises por espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray (ESI-MS) são compostas, em sua maioria, por espécies protonadas ( $[M+H]^+$ ) ou desprotonadas ( $[M-H]^-$ ). Nesse contexto, as análises por ESI-MS permitem escolher o modo de ionização que será utilizado nos experimentos (positivo ou negativo). Além do modo de ionização positivo e negativo, os modernos espectrômetros de massas podem ser empregados para determinar a  $m/z$  do analito em alta resolução, dependendo da tecnologia do analisador de massas. Conseqüentemente, a  $m/z$  de substâncias de interesse podem ser mensuradas em alta resolução por ESI-MS, incluindo análises diretas ou hifenadas à cromatógrafos líquidos de alta e ultra eficiência. Outra contribuição do desenvolvimento dos analisadores de

massas ao campo da MS é a possibilidade de execução de experimentos em modo sequencial (p. ex. ESI-MS/MS)<sup>17,21,22,34-36</sup>.

Nesse contexto, os analitos previamente ionizados no espectrômetro de massas (denominados de íons precursores) podem ser analisados em um segundo estágio. Nesse próximo estágio, os íons precursores selecionados serão submetidos ao processo de ativação de íons, o qual consiste em aumentar a energia interna do íon precursor e, conseqüentemente, favorecer a ocorrência de processos de dissociação em fase gasosa, os quais convertem um dado íon precursor em íons fragmentos<sup>17,22,35-37</sup>.

A técnica de ativação de íons utilizada com frequência na área de PNs é a dissociação induzida por colisão (CID-MS/MS). Nessa técnica a transferência de energia ocorre a partir da colisão induzida do íon precursor com o gás de colisão (p. ex.: gás N<sub>2</sub>)<sup>17,22,35-38</sup>.



- <sup>a</sup> Os íons precursores obtidos nas análises por ESI-MS podem ser do tipo: M<sup>+</sup>, M<sup>-</sup>, [M + Metal]<sup>+</sup>, [M + H]<sup>+</sup>, [M - H]<sup>-</sup> e [M - Cl]<sup>-</sup>.
- <sup>b</sup> Os íons precursores (carga positiva ou negativa) podem ser conduzidos a um segundo estágio analítico usando instrumentos de ESI-MS/MS ou ESI-MS<sup>n</sup>.
- <sup>c</sup> Esse próximo estágio corresponde ao processo de ativação de íons. Dependendo do tipo de íon gerado e da técnica de ativação de íons empregada, os íons fragmentos são produzidos de acordo com três principais classes de reações: mecanismos clássicos (derivados da ionização por elétrons); e mecanismos com retenção e migração de carga.

**Figura 3** - Representação dos íons positivos e negativos que podem ser produzidos nas análises por ESI-MS.<sup>a,b,c</sup>

**Fonte:** Adaptado de Demarque et al.<sup>36</sup> (2016).

Dessa forma, a interpretação dos processos reacionais envolvidos na formação dos íons fragmentos é uma ferramenta valiosa para a identificação estrutural de PNs previamente isolados. Além disso, a técnica de CID-MS/MS pode ser utilizada para propor estruturas químicas de classes de substâncias em misturas, fato que tem contribuído para o uso crescente da técnica de ESI-MS/MS no desenvolvimento de propostas de estudos metabolômicos, tanto focados em impressão digital metabólica, quanto em perfil metabólico e análise alvo<sup>17,22,25,35,36,39</sup>.

Em contrapartida, a ausência de bases de dados pode ser um fator limitante na interpretação dos espectros de ESI-MS/MS, o que normalmente pode requerer o uso de padrões de referência para confirmar a identidade das substâncias. Nessa perspectiva, o uso integrado da técnica de ESI-MS/MS e química computacional surge como uma excelente alternativa no desenvolvimento de estratégias para a prospecção de PNs bioativos<sup>35,36,40,41</sup>.

#### **1.4.1 Interpretação de dados de ESI-MS/MS assistida por química computacional**

As etapas elementares envolvidas nas reações químicas que formam as espécies protonadas ( $[M+H]^+$ ) e desprotonadas ( $[M-H]^-$ ), com base no fenômeno da ionização por electrospray, podem ser interpretadas à partir da teoria ácido/base de Brønsted-Lowry.<sup>35,36,42</sup> Por outro lado, na maioria das vezes, os produtos naturais são substâncias orgânicas polifuncionais e, conseqüentemente, o sítio de protonação ou desprotonação pode ser representado por um ou mais grupos funcionais. Para exemplificar, a Figura 4 apresenta as espécies protonadas de um benzopirano, caracterizada por um equilíbrio químico entre três possíveis sítios de reatividade molecular<sup>35,36,42</sup>.

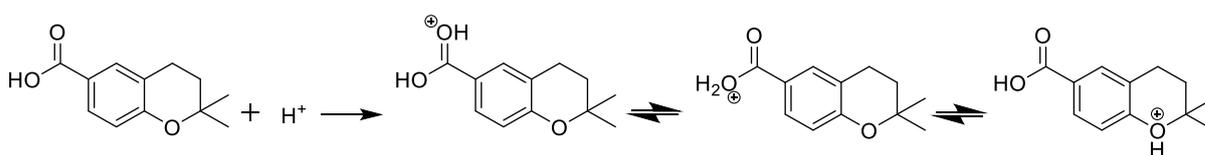
Em princípio, o sentido do equilíbrio ácido-base encontra-se deslocado para o sítio de maior caráter básico, a carboxila. No entanto, a transferência para a fase gasosa ou a colisão com gás inerte pode promover a migração do próton para regiões de menor caráter básico. Diante das perspectivas apresentadas, o sítio de protonação não pode ser denominado uma região exata da estrutura química para iniciar a(s) proposta(s) de fragmentação por ESI-MS/MS. Do ponto de vista de proposta de identificação estrutural, esses eventos químicos governam o perfil de dissociação em

fase gasosa, o que torna a interpretação da química de fragmentação desafiadora<sup>35,36,40,42-44</sup>.

Nessa perspectiva, a literatura tem comprovado que a química computacional demonstra ser uma ferramenta valiosa na predição de propriedades termodinâmicas de substâncias orgânicas por cálculos de acidez, basicidade, energia de dissociação de ligação, barreira de energia envolvida em um dado estado de transição e outros<sup>45,46</sup>. Dentre os vários métodos computacionais que podem ser empregados para prever as grandezas termoquímicas citadas, a teoria do funcional de densidade (DFT), em sinergia com a química orgânica, tem sido o modelo mais amplamente utilizado para interpretar e correlacionar os resultados obtidos por ESI-MS/MS<sup>35,39-41,43,44,47-49</sup>.

Nos últimos dez anos, esses estudos de emprego de DFT em ESI-MS/MS têm sido realizados, principalmente: i) na predição da reatividade de cada sítio molecular em função da adição do próton; ii) na predição do perfil de energia relativa dos íons produtos (perfil de energia relativo ao íon precursor); e iii) na estimativa do perfil de energia da coordenada de reação de um dado rearranjo intramolecular e/ou de um dado mecanismo de fragmentação. Adicionalmente, o uso de descritores apropriados exercem um papel fundamental na descrição de etapas reacionais que ocorrem via um comportamento não clássico<sup>45,46,50-52</sup>.

Nesse contexto, o uso integrado da técnica de ESI-MS/MS e química computacional é uma estratégia inovadora no estudo de matrizes complexas, uma vez que o entendimento dos fenômenos decorrentes dos experimentos por ESI-MS/MS permitem otimizar as etapas de aquisição, tratamento e interpretação de dados.



**Figura 4** - Proposta para a formação de espécies protonadas de um benzopirano genérico com base no equilíbrio ácido-base de Brønsted-Lowry.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

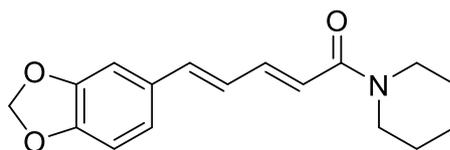
## 1.5 A família Piperaceae

A família Piperaceae é um importante táxon vegetal que engloba árvores, arbustos e plantas suculentas. Suas espécies são distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Nessa família estão classificados cinco gêneros e aproximadamente 4300 espécies. Dentre os gêneros, os mais abrangentes são *Piper* (L.) e *Peperomia* (Ruiz e Pavon), com 2000 e 1700 espécies, respectivamente<sup>53-55</sup>. Os gêneros de menor representatividade em número de espécies identificadas são *Manekia* (Trel.)<sup>56</sup>, *Zippelia* (Blume) e *Verhuellia* (Miq.)<sup>57</sup>.

Do ponto de vista de estudos químicos das espécies de Piperaceae, uma variedade de classes de PNs têm sido isolados e identificados, incluindo lignanas, secolignanas<sup>58</sup>, flavonoides<sup>59-60</sup>, alcaloides<sup>60</sup>, derivados do ácido benzoico<sup>54,61</sup>, amidas alifáticas e aromáticas<sup>62-64</sup> e benzopiranos<sup>65-70</sup>.

O metabólito secundário mais conhecido na família Piperaceae é a piperina, uma amida biossintetizada pela espécie *Piper nigrum*, popularmente conhecida por pimenta-do-reino (Figura 5). É importante destacar que, do ponto de vista econômico, a exportação de pimenta-do-reino no Brasil alcançou o patamar de 35.000 toneladas no ano de 2014, sendo o estado do Pará o principal produtor desta especiaria<sup>71,72</sup>.

Do ponto de vista da importância farmacológica, a espécie *Piper methysticum* desempenha um papel que deve ser destacado pela descoberta e comercialização do Ansiopax<sup>®</sup>, um medicamento desenvolvido com base no extrato seco e padronizado da espécie. Comumente conhecido como Kava-Kava, esse medicamento foi regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo indicado para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso central, como a ansiedade, a insônia e a hiperatividade<sup>73-74</sup>. Além disso, é importante ressaltar que a espécie *Piper umbellata* (sinon. *Pothomorphe umbellata*) foi inscrita na primeira edição da Farmacopéia brasileira, publicada em 1929<sup>75</sup>.



\* A principal fonte de acúmulo da piperina - isolada em 1819 pelo químico e físico dinamarquês Hans Christian Oersted - é o fruto da pimenta-do-reino, *Piper nigrum* (Piperaceae)<sup>71</sup>.

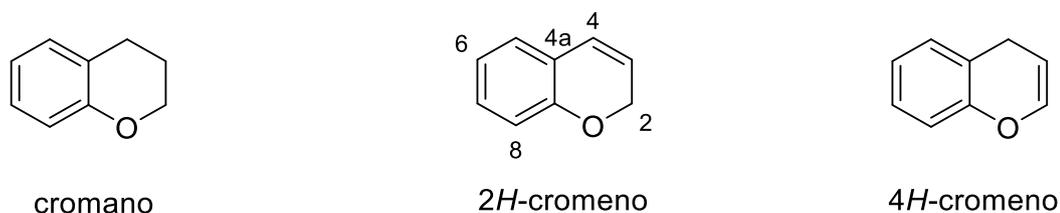
**Figura 5** - Estrutura química da piperina.\*

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Em relação aos estudos de bioprospecção, o isolamento de substâncias majoritárias dos extratos vegetais de *Piper* e *Peperomia* conjugados a ensaios biológicos *in vitro*, têm indicado que o táxon Piperaceae é uma fonte promissora para a pesquisa de novos bioativos com ação de inibição enzimática, antimicrobiana, anti-inflamatória, citotóxica e antiprotozoária. Particularmente, os benzopiranos constituem um grupo de PNs farmacologicamente ativos biossintetizados por espécies de *Piper* e *Peperomia*<sup>53-55,62,65</sup>.

### 1.5.1 Benzopiranos

Os cromenos e cromanos são substâncias heterocíclicas caracterizados pela presença de um núcleo benzopirânico, ou seja, um anel benzeno fundido a um anel pirano, com diferentes níveis de saturação<sup>76</sup>. Diferentemente dos cromanos, os cromenos são caracterizados pela presença de insaturação no núcleo 1-benzopirano, que pode estar localizada entre os carbonos C2 e C3 ou C3 e C4, sendo denominados de *4H*-cromeno e *2H*-cromeno, respectivamente (Figura 6)<sup>77</sup>.



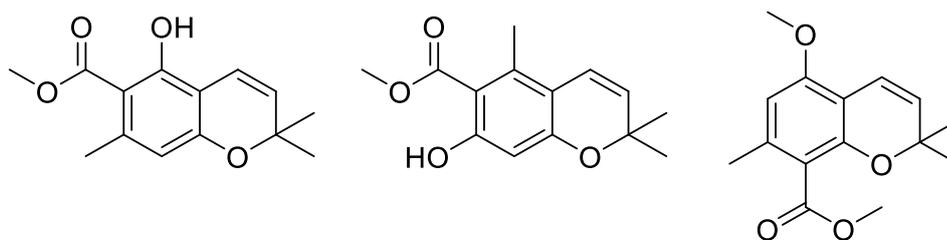
**Figura 6** - Estruturas químicas e nomenclatura de 1-benzopiranos, incluindo cromano, *2H*-cromeno e *4H*-cromeno. Esses heterocíclicos são o núcleo base de uma extensa variedade de produtos naturais.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Na natureza, além dos cromanos e cromenos, o núcleo benzopirânico pode estar presente como subunidade em um número significativo de substâncias responsáveis por diversas propriedades farmacológicas, incluindo chalconas, cumarinas, flavonas, tocoferóis (vitamina E) e tetraidrocanabinoides<sup>76,78</sup>. A potencialidade farmacológica associada aos benzopiranos é atribuída, principalmente, à seletividade da ligação do fármaco a determinadas classes de receptores protéicos com alta afinidade. Essa propriedade ocorre em função do caráter lipofílico desses fármacos, que confere certa eficiência em atravessar o ambiente lipídico hidrofóbico da membrana plasmática celular<sup>79,80</sup>.

Conjugado a esses aspectos, os benzopiranos permitem a introdução de variados substituintes por meio de síntese em fase sólida, incluindo estruturas químicas com um ou mais anéis heterocíclicos. Uma revisão da literatura demonstrou que cerca de 12.000 substâncias naturais, ou originárias de síntese planejadas, contém o núcleo benzopirano em sua estrutura química<sup>79,81</sup>. Além disso, nos últimos anos, ensaios *in vitro* têm mostrado o potencial de substâncias com núcleo benzopirano para o desenvolvimento de medicamentos com ação antitumoral<sup>82</sup>, antimicrobiana<sup>83</sup>, anticoagulante<sup>84</sup> e antitripanossoma<sup>68</sup>.

Com relação aos aspectos químicos, biológicos e biossintéticos dos 2*H*-cromenos e cromanos presentes em espécies de Piperaceae (Figura 7), vários estudos têm sido realizados<sup>85,86</sup>. Em se tratando de estudos de bioprospecção dessas duas classes de metabólitos da família Piperaceae, a atividade tripanocida têm tido o maior destaque. No trabalho publicado por Batista Junior et al.<sup>87</sup> (2008), o cromeno, ácido gaudichaudiânico, isolado como mistura racêmica do extrato etanólico de folhas de *Piper gaudichaudianum*, e o seu respectivo análogo obtido por modificação molecular (Figura 8), demonstraram apresentar potente atividade tripanocida frente à forma epimastigota da cepa Y de *Trypanossoma cruzi*. Nesse trabalho, os autores também evidenciaram o potencial tripanocida de outros 2*H*-cromenos, incluindo àqueles característicos da espécie *P. aduncum*. Paralelamente, Mota et al.<sup>68</sup> (2009), ao estudarem a composição química do extrato etanólico obtido de partes aéreas de *Peperomia obtusifolia*, verificaram que a mistura racêmica dos cromanos também é ativa frente à cepa Y de *T. cruzi* (Figura 9).



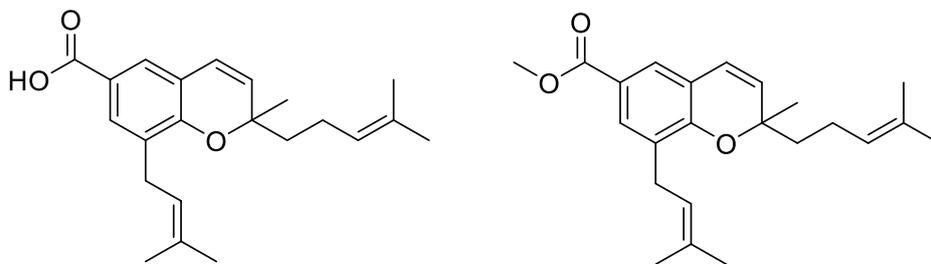
\* Esses 2*H*-cromenos são biossintetizados em espécies de Piperaceae<sup>55</sup>.

**Figura 7** - Estruturas químicas de alguns 1-benzopiranos naturais.\*

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Nessa perspectiva, estudos com a mistura racêmica do ácido gaudichaudiânico foi um marco importante para entender a relação entre atividade tripanocida e benzopiranos oriundos da família Piperaceae. Assim, Batista Junior et al.<sup>65</sup> (2011) descreveram ensaios da mistura racêmica do ácido gaudichaudiânico, e dos seus respectivos enantiômeros frente ao parasita *T. cruzi*. Os resultados demonstraram a origem de sinergismo na ação tripanocida, uma vez que a atividade foi mais pronunciada para a mistura 50:50, quando comparada ao desempenho de cada um dos enantiômeros separadamente<sup>65</sup>.

Aliado a esses aspectos, o estudo da fração lipofílica do extrato bruto de *Peperomia obtusifolia* culminou no isolamento, elucidação estrutural e determinação da configuração absoluta dos enantiômeros e diastereoisômeros do cromano ácido, esterificados com monoterpenos *endo*-borneol e *endo*-fenchol (Figura 10)<sup>66,67</sup>. Vale ressaltar que os derivados esterificados com monoterpenos do tipo *endo*-fenchol são constituintes minoritários. Consequentemente, a descrição acima corrobora que a família Piperaceae pode fornecer alvos farmacológicos promissores no cenário de desenvolvimento de novos medicamentos.

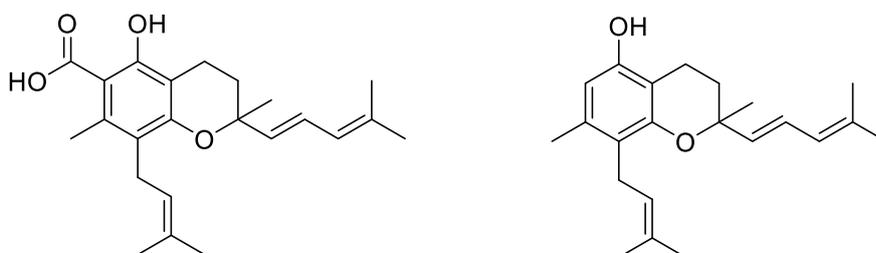


\* Ensaio biológico *in vitro* foi realizado com a mistura racêmica desses 2H-cromenos frente a cepa Y de *Trypanossoma cruzi*<sup>67</sup>.

**Figura 8** - Estruturas químicas do 2H-cromeno ácido gaudichaudiânico isolado do extrato etanólico de *Piper gaudichadianum* (Piperaceae) e, do derivado esterificado obtido por modificação molecular.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

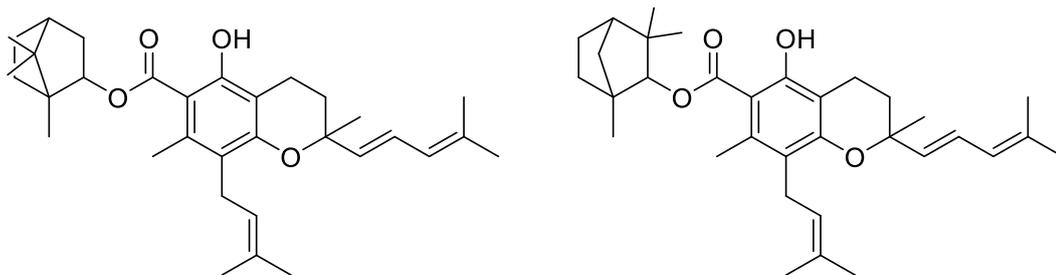
Em contrapartida, do ponto de vista de biogênese, a formação de 2H-cromenos e cromanos em plantas é determinada por duas rotas biossintéticas distintas. Assim, as porções aromáticas dos benzopiranos que mostram acúmulo em espécies de *Piper* e *Peperomia* são correlacionadas com as vias do chiquimato e policetílica, respectivamente<sup>85,86</sup> (Figura 11). Conseqüentemente, os 2H-cromenos e cromanos de espécies de Piperaceae podem ser distinguidos com base no nível de saturação do anel pirano e no respectivo padrão de substituição do anel aromático. Além disso, estudos químicos têm mostrado a predominância de benzopiranos do tipo 2H-cromeno e cromano em espécies de *Peperomia*. No entanto, estudos apontam que as espécies de *Piper* são caracterizadas apenas por benzopiranos do tipo 2H-cromeno<sup>53,55,85,86</sup>.



\* A mistura racêmica de cada cromano foi ativa frente a cepa Y de *Trypanossoma cruzi*<sup>65</sup>.

**Figura 9** - Estruturas químicas dos cromanos isolados do extrato etanólico de partes aéreas *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae).\*

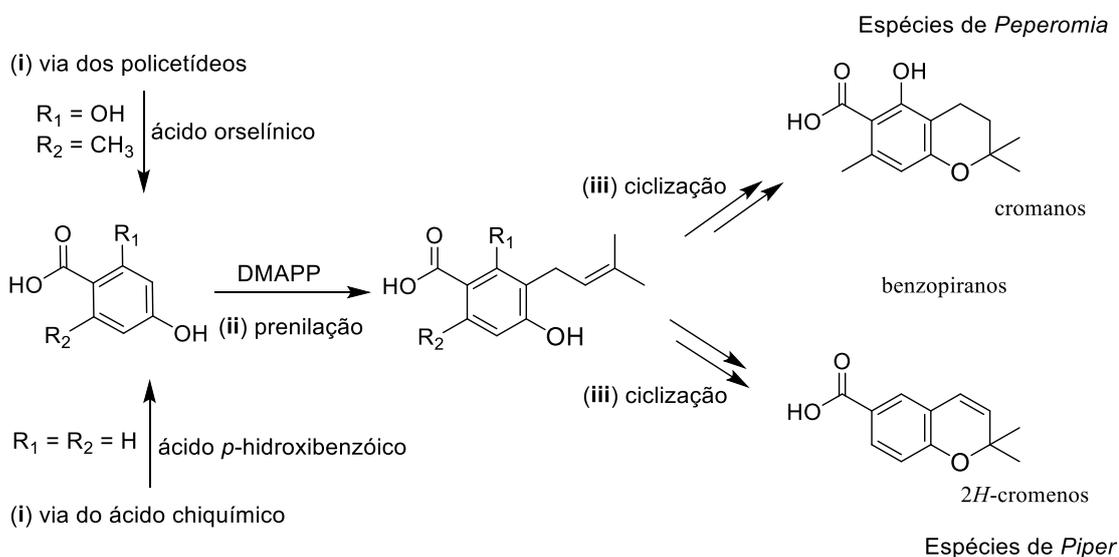
**Fonte:** Elaborada pelo autor.



**Figura 10** - Estruturas químicas dos cromanos esterificados com monoterpenos do tipo endoborneol e endofencol, isolados da fração lipofílica do extrato etanólico das partes aéreas de *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae).

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Diante da abundância de benzopiranos na família Piperaceae e na particularidade das estruturas químicas de cada subclasse, novos questionamentos merecem ser elucidados a respeito do perfil de fragmentação por ESI(+)-MS/MS de 2*H*-cromenos e cromanos. Com base na potencialidade dos métodos computacionais baseados na DFT para o cálculo de grandezas termoquímicas de PNs, esse trabalho tem por objetivo investigar se as duas subclasses podem ser descritas a partir de um modelo de dissociação em fase gasosa em comum. Naturalmente, devido a particularidade das estruturas químicas, os resultados podem trazer subsídios para descrever um perfil de fragmentação para cada subclasse (Figura 11). Além disso, com a finalidade de avaliar a eficiência do perfil de fragmentação descrito para 2*H*-cromenos e cromanos, uma abordagem metabolômica em matrizes complexas foi estudada visando mimetizar as etapas de um estudo de bioprospecção.



**Figura 11** – Proposta biossintética de benzopiranos em espécies de *Piper* e *Peperomia*.

**Fonte:** Adaptado de Batista et al.<sup>86</sup> (2018).

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, *2H*-cromenos e cromanos previamente isolados de extratos vegetais de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* foram analisados por ESI(+)-MS/MS aplicando-se a técnica de dissociação induzida por colisão. Com a finalidade de propor a química de fragmentação do anel benzopirano, grandezas termoquímicas foram calculadas usando métodos baseados na DFT. Nesse contexto, a reatividade dos possíveis sítios de protonação foi investigada pela análise do mapa de potencial eletrostático molecular, cargas atômicas, orbital molecular ocupado de maior energia, afinidade protônica, basicidade em fase gasosa e diagramas de energia.

Dessa forma, os dados experimentais conjugados aos valores estimados para afinidade protônica e basicidade em fase gasosa indicaram que o padrão de substituição do anel aromático influenciou na etapa de protonação. Além disso, o perfil de energia calculado para a transferência do próton, entre o átomo de oxigênio do anel pirano e a unidade prenila, corroborou que a etapa de protonação na ligação dupla descreve um estado de transição de 6 membros.

Concomitantemente, os parâmetros termoquímicos confirmaram que a etapa de protonação nos cromanos ocorre preferencialmente no átomo de oxigênio do anel pirano. Nessa perspectiva, os dados teóricos revelaram que o aumento dos valores de afinidade protônica e basicidade em fase gasosa na série dos cromanos podem ser correlacionados ao(s) substituinte(s) ligado(s) ao C2. Esse comportamento é explicado por meio da estabilidade de carbocátions, uma vez que a ocorrência de interações hiperconjugativas contribuiu para diminuir a energia do íon precursor. Consequentemente, para algumas substâncias da série, o estudo de otimização de geometria sinalizou a clivagem heterolítica da ligação O-C2 do anel pirano.

A interpretação da reatividade dos possíveis sítios de protonação auxiliou na descrição das rotas de fragmentação de *2H*-cromenos e cromanos. Particularmente, o mecanismo de fragmentação do núcleo benzopirano dos cromanos pode ocorrer por meio de uma bifurcação, em concordância com a geometria de menor energia do íon precursor alvo. Para todos os cromanos protonados, a formação de íons diagnósticos pode ser explicada com base em uma clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente ou no mecanismo de retro Diels Alder. Além disso, análises de extratos vegetais de espécies de Piperaceae por ESI(+)-MS/MS corroboraram com

o padrão de fragmentação descrito para 2*H*-cromenos e cromanos. Consequentemente, os resultados apresentados estão em conformidade com a reatividade dos sítios de protonação, incluindo as rotas de fragmentação, a distribuição de íons nas curvas de energia e o perfil de energia termodinâmico calculado no nível B3LYP/6-31+G(d,p).

Portanto, o uso integrado da técnica de dissociação induzida por colisão e química computacional auxiliou no desenvolvimento de uma abordagem metabolômica com vistas a identificar benzopiranos bioativos em matrizes complexas. Adicionalmente, o aperfeiçoamento de estratégias inspiradas no modelo estudado pode contribuir para o avanço da pesquisa em química de produtos naturais, incluindo o desenvolvimento de propostas com escopo direcionado a ensaios biológicos *in vitro*, a procedimentos biotecnológicos e a estudos de bioprospecção.

## REFERÊNCIAS

- (1) BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- (2) BERLINCK, R. G. S.; DE BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- (3) BOLZANI, V. DA S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 2012.
- (4) PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. Supl. 1, p. 45–61, 2002.
- (5) VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- (6) YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: \_\_\_\_\_ (Org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna Farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016, Cap. 1, pp. 11-39.
- (7) CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- (8) CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.
- (9) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215–234, 2000.
- (10) BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.
- (11) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- (12) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.
- (13) PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446–1455, 2007.
- (14) BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J.-L. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.
- (15) CANUTO, G. A. B.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L. R.; DE SOUZA, A. R. L.;

- FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.
- (16) FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; DA SILVA BOLZANI, V. Metabolômica, Uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.
- (17) WOLFENDER, J.-L.; RUDAZ, S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1056–1090, 2013.
- (18) ROCHFORT, S. Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813–1820, 2005.
- (19) VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 53–56, 2005.
- (20) KLUGER, B.; BUESCHL, C.; NEUMANN, N.; STÜCKLER, R.; DOPPLER, M.; CHASSY, A. W.; WATERHOUSE, A. L.; RECHTHALER, J.; KAMPLEITNER, N.; THALLINGER, G. G.; ADAM, G.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Untargeted profiling of tracer-derived metabolites using stable isotopic labeling and fast polarity-switching LC-ESI-HRMS. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11533–11537, 2014.
- (21) WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; FERREIRA QUEIROZ, E. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11533–11537, 2014.
- (22) ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VÊNCIO, R. Z. N.; LOPES, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 784–806, 2014.
- (23) BERTRAND, S.; AZZOLLINI, A.; NIEVERGELT, A.; BOCCARD, J.; RUDAZ, S.; CUENDET, M.; WOLFENDER, J. L. Statistical correlations between HPLC activity-based profiling results and NMR/MS microfraction data to deconvolute bioactive compounds in mixtures. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 259, 2016.
- (24) SPICER, R.; SALEK, R. M.; MORENO, P.; CAÑUETO, D.; STEINBECK, C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. **Metabolomics**, v. 13, n. 9, p. 1–16, 2017.
- (25) FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J.-L.; SILVA, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167–178, 2012.
- (26) MUSHTAQ, M. Y.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; WILSON, E. G. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 291–306, 2014.
- (27) YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Comprehensive

- extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 17, p. 6902–6906, 2011.
- (28) FERREIRA, V. G.; LEME, G. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FUNARI, C. S. Online extraction coupled to liquid chromatography analysis (OLE-LC): eliminating traditional sample preparation steps in the investigation of solid complex matrices. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 17, p. 8421–8427, 2016.
- (29) KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; LUIJENDIJK, T. J. C.; ROCHA, R. A. V.; VERPOORTE, R. Comparison of extraction methods for secologanin and the quantitative analysis of secologanin from *Symphoricarpos albus* <sup>1</sup>H-NMR. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 257–261, 2004.
- (30) KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 4–13, 2010.
- (31) PILON, A. C.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R. T.; CARDOSO, P.; CARNEIRO, R. L.; DA SILVA BOLZANI, V.; CASTRO-GAMBOA, I. Partial least squares model and design of experiments toward the analysis of the metabolome of *Jatropha gossypifolia* leaves: extraction and chromatographic fingerprint optimization. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1023–1030, 2016.
- (32) BUENO, P. C. P.; PEREIRA, F. M. V.; TORRES, R. B.; CAVALHEIRO, A. J. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 10, p. 1649–1656, 2015.
- (33) YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 157–169, 2011.
- (34) SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Mass spectrometry. In SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometry identification of organic compounds**. 6th ed. New York: John Wiley, 1998. Chap. 2, pp 2–70.
- (35) VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 840–853, 2008.
- (36) DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.
- (37) JARMUSCH, A. K.; COOKS, R. G. Emerging capabilities of mass spectrometry for natural products. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 730–738, 2014.
- (38) YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; DE FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.

- (39) DA SILVA-JUNIOR, E. A.; PALUDO, C. R.; GOUVEA, D. R.; KATO, M. J.; FURTADO, N. A. J. C.; LOPES, N. P.; VESSECCHI, R.; PUPO, M. T. Gas-phase fragmentation of protonated piplartine and its fungal metabolites using tandem mass spectrometry and computational chemistry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 8, p. 517–525, 2017.
- (40) DA CUNHA PINTO, A.; VESSECCHI, R.; DA SILVA, C. G.; AMBRÓSIO, D. L.; DOS SANTOS JÚNIOR, H. M.; REZENDE, M. J. C.; GATES, P. J.; REZENDE, C. M.; LOPES, N. P. Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of isopimarane diterpenes from Velloziaceae. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 1, p. 61–68, 2016.
- (41) GUARATINI, T.; FEITOSA, L. G. P.; SILVA, D. B.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; VESSECCHI, R. Gas-phase dissociation study of erythrinian alkaloids by electrospray ionization mass spectrometry and computational methods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 9, p. 571–579, 2017.
- (42) CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.
- (43) VESSECCHI, R.; EMERY, F. S.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. Gas-phase reactivity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones: a computational and mass spectrometry study of lapachol congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 12, p. 1648–1659, 2012.
- (44) MARTÍNEZ-CIFUENTES, M.; CLAVIJO-ALLANCAN, G.; ZUÑIGA-HORMAZABAL, P.; ARANDA, B.; BARRIGA, A.; WEISS-LÓPEZ, B.; ARAYA-MATURANA, R. Protonation sites, tandem mass spectrometry and computational calculations of *o*-carbonyl carbazolequinone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1071, 2016.
- (45) VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E. Evaluation of the enthalpy of formation, proton affinity, and gas-phase basicity of  $\gamma$ -butyrolactone and 2-pyrrolidinone by isodesmic reactions. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 17, p. 4060–4066, 2008.
- (46) HYLAKRYSPIN, I.; GRIMME, S.; BÜKER, H. H.; NIBBERING, N. M. M.; COTTET, F.; SCHLOSSER, M. The gas phase acidity of oligofluorobenzenes and oligochlorobenzenes: about the additivity or non-additivity of substituent effects. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 4, p. 1251–1256, 2005.
- (47) VESSECCHI, R.; EMERY, F. S.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. Fragmentation studies and electrospray ionization mass spectrometry of lapachol: protonated, deprotonated and cationized species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 14, p. 2101–2108, 2010.
- (48) VESSECCHI, R.; JULIÃO ZOCOLO, G.; RUBIO GOUVEA, D.; HÜBNER, F.; CRAMER, B.; RODRIGUES DE MARCHI, M. R.; HUMPF, H. U.; LOPES, N. P. Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 14, p. 2020–2026, 2011.
- (49) SARTORI, L. R.; VESSECCHI, R.; HUMPF, H. U.; DA COSTA, F. B.; LOPES, N. P. A

- systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 7, p. 723–730, 2014.
- (50) TANTILLO, D. J. Walking in the woods with quantum chemistry-applications of quantum chemical calculations in natural products research. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 8, p. 1079–1086, 2013.
- (51) BUTLER, M.; MICHAEL SIU, K. W.; HOPKINSON, A. C. Transnitrosylation products of the dipeptide cysteinyl-cysteine: an examination by tandem mass spectrometry and density functional theory. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 8, p. 6047–6052, 2016.
- (52) LODEWYK, M. W.; SIEBERT, M. R.; TANTILLO, D. J. Computational prediction of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 3, p. 1839–1862, 2012.
- (53) KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529–538, 2007.
- (54) LÓPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M.; FLAUSINO, O.; BOLZANI, V. DA S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4251–4260, 2010.
- (55) GUTIERREZ, Y. V.; YAMAGUCHI, L. F.; DE MORAES, M. M.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 6, p. 1009–1033, 2016.
- (56) WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 477–497, 2007.
- (57) SAMAIN, M. S.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; JIMÉNEZ RODRÍGUEZ, F.; STOLL, A.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of botany**, v. 105, n. 5, p. 677–688, 2010.
- (58) FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; HE, Y.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. VCD to determine absolute configuration of natural product molecules: secolignans from *Peperomia blanda*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 21, p. 4208–4214, 2012.
- (59) MOTA, J. D. S.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M. Isoswertisin flavones and other constituents from *Peperomia obtusifolia*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2011.
- (60) FACUNDO, V. A.; BÁLICO, L. J.; LIMA, D. K. S.; SANTOS, A. R. S.; MORAIS, S. M.; DA SILVA, G. V. J.; MILITÃO, J. S. L. T. Non-substituted B-ring flavonoids and an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 206–208, 2012.
- (61) LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. D. A.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M.;

- GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004.
- (62) COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; DA SILVA BOLZANI, V.; DEBONSI, H. M.; DUÓ PASSERINI, G.; CICALI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703–711, 2009.
- (63) VASQUES DA SILVA, R.; DEBONSI NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. DA S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521–527, 2002.
- (64) NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621–626, 2000.
- (65) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; AMBRÓSIO, D. L.; CICALI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; NAFIE, L. A.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 1154–1160, 2011.
- (66) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LÓPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 45, p. 6051–6054, 2012.
- (67) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure elucidation and absolute stereochemistry of isomeric monoterpene chromane esters. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 2603–2612, 2011.
- (68) DA SILVA MOTA, J.; LEITE, A. C.; BATISTA, J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; CICALI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, v. 75, n. 6, p. 620–623, 2009.
- (69) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) Using VCD and DFT calculations. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 21, n. 19, p. 2402–2407, 2010.
- (70) MORANDIM, A. DE A.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. DA S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 4, p. 282–286, 2005.
- (71) FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; DE LIMA, M. E. F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208–224, 2012.
- (72) MATOS T. S.; NASCIMENTO, E. C.; GENUNCIO, G. C.; NEITZKE, R. S. **Perspectivas e potencialidades do mercado de pimentas**. Disponível em:

<http://www.revistacampoenegocios.com.br/perspectivas-e-potencialidades-do-mercado-de-pimentas/>>. Acesso em: 12 sep. 2018.

- (73) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa N° 02, de 13 de maio de 2014**. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2014. 32 p. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf)>. Acesso em: 12 set. 2018.
- (74) JUSTO, S. C.; SILVA, C. M. *Piper methysticum* G. Forster (Kava-Kava): uma abordagem geral. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 73–82, 2008.
- (75) BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19<sup>th</sup> century european naturalists and in the official pharmacopoeia. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 73–82, 2008.
- (76) TANG, Y.; WEI, J.; ZHONG, W.; LIU, X. Synthesis and characterization of chroman-containing compounds and their preliminary assessment of cytotoxicity toward two human cancer cell lines. **Heteroatom Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 423–429, 2010.
- (77) VAN OTTERLO, W. A. L.; NGIDI, E. L.; KUZVIDZA, S.; MORGANS, G. L.; MOLEELE, S. S.; DE KONING, C. B. Ring-closing metathesis for the synthesis of 2*H*- and 4*H*-chromenes. **Tetrahedron**, v. 61, n. 42, p. 9996–10006, 2005.
- (78) NAJAFI, M.; NAZARPARVAR, E.; MOOD, K. H.; ZAHEDI, M.; KLEIN, E. DFT/B3LYP study of the substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies of chroman derivatives in the gas phase and solvent environment. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 965, n. 1, p. 114–122, 2011.
- (79) NICOLAOU, K. C.; PFEFFERKORN, J. A.; ROECKER, A. J.; CAO, G. Q.; BARLUENGA, S.; MITCHELL, H. J. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. general principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 41, p. 9939–9953, 2000.
- (80) NICOLAOU, K. C. Advancing the drug discovery and development process. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 35, p. 9128–9140, 2014.
- (81) NICOLAOU, K. C.; HALE, C. R. H.; NILEWSKI, C.; IOANNIDOU, H. A. Constructing molecular complexity and diversity: total synthesis of natural products of biological and medicinal importance. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 15, p. 5185–5238, 2012.
- (82) GACH, K.; SZYMAŃSKI, J.; POMORSKA, D.; DŁUGOSZ, A.; MODRANKA, J.; JANECKI, T.; JANECKA, A. Combined effects of anticancer drugs and new synthetic  $\alpha$ -methylene- $\delta$ -lactones on MCF-7 cells. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 5971–5977, 2015.
- (83) BINGI, C.; NARENDER REDDY, E.; CHENNAPURAM, M.; POORNACHANDRA, Y.; KUMAR, C. G.; JAGADEESH BABU, N.; ATMAKUR, K. One-pot catalyst free synthesis of novel kojic acid tagged 2-aryl/alkyl substituted-4*H*-chromenes and evaluation of their antimicrobial and anti-biofilm activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 9, p. 1915–1919, 2015.

- (84) MLADENović, M.; STANKović, N.; MATIĆ, S.; STANIĆ, S.; MIHAILOVIĆ, M.; MIHAILOVIĆ, V.; KATANIĆ, J.; BOROJA, T.; VUKOVIĆ, N. Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize the *in vivo* DNA damage induced by alkylation through the inhibition of topoisomerase II $\alpha$ : a story behind the molecular modeling approach. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 1, p. 243–266, 2015.
- (85) BATISTA, A. N. L.; SANTOS-PINTO, J. R. A. D.; BATISTA, J. M.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; SANTONI, M. M.; ZANELLI, C. F.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; PALMA, M. S.; FURLAN, M. The combined use of proteomics and transcriptomics reveals a complex secondary metabolite network in *Peperomia obtusifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1275–1286, 2017.
- (86) BATISTA, A. N. L.; VALENTINI, S. R.; KATO, M. J.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Biosynthetic Insights into *p*-Hydroxybenzoic Acid-Derived Benzopyrans in *Piper gaudichaudianum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 1105–1114, 2018.
- (87) BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538–540, 2008.
- (88) SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Gradient elution. In SNYDER, L. R. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3th ed. New Jersey: Wiley, 2010. Chap. 9, pp 403–471.
- (89) Gaussian 03, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A. JR.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, B.; MENNUCCI, M.; COSSI, G.; SCALMANI, N.; REGA, G. A.; PETERSSON, H.; NAKATSUJI, M.; HADA, M.; EHARA, K.; TOYOTA, R.; FUKUDA, J.; HASEGAWA, M.; ISHIDA, T.; NAKAJIMA, Y.; HONDA, O.; KITAO, H.; NAKAI, M.; KLENE, X.; LI, J.; KNOX, E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.
- (90) Gaussian 09, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A. JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.;

- YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
- (91) Spartan'10, Wavefunction, Ind.: Irvine, CA, USA, 2010.
- (92) LEGAULT, C. Y. CYLview BETA 1.0. University of Sherbrooke, Canada 2009.
- (93) DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 54, n. 2, p. 724–728, 1971.
- (94) LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 1988.
- (95) BECKE, A. D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 2, p. 1372–1377, 1993.
- (96) ALEM, K. VAN; SUDHÖLTER, E. J. R.; ZUILHOF, H. Quantum chemical calculations on  $\alpha$ -substituted ethyl cations: a comparison between B3LYP and post-HF methods. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 102, n. 52, p. 10860–10868, 1998.
- (97) BURK, P.; KOPPEL, I. A.; KOPPEL, I.; LEITO, I.; TRAVNIKOVA, O. Critical test of performance of B3LYP functional for prediction of gas-phase acidities and basicities. **Chemical Physics Letters**, 2000, v. 323, n. 5-6, p. 482–489, 2000.
- (98) SINGH, U. C.; KOLLMAN, P. A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 129–145, 1984.
- (99) DEAKYNE, C. A. Proton affinities and gas-phase basicities: theoretical methods and structural effects. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 227, n. 3, p. 601–616, 2003.
- (100) ABOUD, J. L. M.; FOCES-FOCES, C.; NOTARIO, R.; TRIFONOV, R. E.; VOLOVODENKO, A. P.; OSTROVSKII, V. A.; ALKORTA, I.; ELGUERO, J. Basicity of N-H- and N-methyl-1,2,3-triazoles in the gas phase, in solution, and in the solid state - an experimental and theoretical study. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, n. 16, p. 3013–3024, 2001.
- (101) TORRENT-SUCARRAT, M.; DE PROFT, F.; AYERS, P. W.; GEERLINGS, P. On the applicability of local softness and hardness. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 5, p. 1072–1080, 2010.
- (102) MAYHAN, C. M.; KUMARI, H.; MCCLURE, E. M.; LIEBMAN, J. F.; DEAKYNE, C. A. Proton affinity and gas-phase basicity of hydroxyquinol: a computational study. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 73, p. 171–177, 2014.
- (103) HUNTER, E. P. L.; LIAS, S. G. Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: an update. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 27, n. 3, p. 413–656, 1998.
- (104) DECOUZON, M.; GAL, J.-F.; HERREROS, M.; MARIA, P.-C.; MURRELL, J.; TODD, J. F. J. On the use of the kinetic method for the determination of proton affinities by

- fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 10, n. 2, p. 242–245, 1996.
- (105) HONG, Y. J.; TANTILLO, D. J. Quantum chemical dissection of the classic terpinyl/pinyl/bornyl/camphyl cation conundrum - the role of pyrophosphate in manipulating pathways to monoterpenes. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 20, p. 4589–4600, 2010.
- (106) HONG, Y.; TANTILLO, D. Branching out from the bisaboyl cation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 2450–2463, 2014.
- (107) MACLENNAN, M. S.; SUTHERLAND, K. N.; ORLOVA, G. Fragmentations and proton-transfer mechanisms of gaseous radical-cationic tryptophan: a theoretical study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 822, n. 1–3, p. 21–27, 2007.
- (108) GAL, J.-F.; MARIA, P.-C.; RACZYNSKA, E. D. Thermochemical aspects of proton transfer in the gas phase. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 7, p. 699–716, 2001.
- (109) GONZALEZ, C.; SCHLEGEL, H. B. Reaction path following in mass-weighted internal coordinates. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 94, n. 14, p. 5523–5527, 1990.
- (110) FUKUI, K. The path of chemical reactions - the IRC approach. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, n. 12, p. 363–368, 1981.
- (111) BOUCHOUX, G. Gas-phase basicities of polyfunctional molecules. Part 1: theory and methods. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 775–835, 2007.
- (112) MCLUCKEY, S. A. Principles of collision activation in analytical mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 3, p. 599–614, 1992.
- (113) KENTTAMAA, H. I.; COOKS, R. G. Tautomer characterization by energy resolved mass spectrometry. Dimethyl phosphite and dimethyl phosphonate ions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 7, p. 1881–1886, 1985.
- (114) HARRISON, A. G. Energy-resolved mass spectrometry: a comparison of quadrupole cell and cone-voltage collision-induced dissociation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 16, p. 1663–1670, 1999.
- (115) CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Chemical bonding and molecular structure. In: \_\_\_\_\_. **Advanced organic chemistry**. 5th ed. New York: Springer, 2007. Part A, chap. 1, pp 1–117.
- (116) CHOI, S. R.; BREUGST, M.; HOUK, K. N.; POULTER, C. D.  $\delta$ -Deuterium isotope effects as probes for transition-state structures of isoprenoid substrates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 8, p. 3572–3580, 2014.
- (117) GATTO, N.; VATTEKKATTE, A.; KÖLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BOLAND, W. Isotope sensitive branching and kinetic isotope effects to analyse multiproduct terpenoid synthases from *Zea Mays*. **Chemical Communications**, v. 51, n. 18, p. 3797–3800, 2015.
- (118) VATTEKKATTE, A.; GATTO, N.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BOLAND, W. Substrate geometry controls the cyclization cascade in multiproduct terpene synthases from *Zea Mays*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 6021–6030, 2015.