

Fausto Carnevale Neto

Elaboração de métodos analíticos de desreplicação para o estudo metabolômico em espécies de *Qualea* (Vochysiaceae): Detecção e elucidação *in situ* de micromoléculas com potencial antioxidante.

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro Gamboa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Nasser Lopes

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

C289e	Carnevale Neto, Fausto Elaboração de métodos analíticos de desreplicação para o estudo metabolômico em espécies de <i>Qualea</i> (Vochysiaceae) : detecção e elucidação <i>in situ</i> de micromoléculas com potencial antioxidante / Fausto Carnevale Neto. – Araraquara : [s.n], 2010 104 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Ian Castro-Gamboa Coorientador: Márcia Nasser Lopes 1. Produtos naturais. 2. Desreplicação. 3. Técnicas hífenadas. 4. Análise <i>in sílico</i>. I. Título.
-------	---

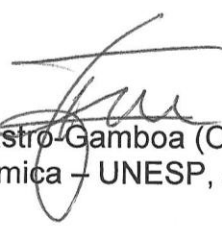
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

FAUSTO CARNEVALE NETO

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

Araraquara, 20 de agosto de 2010.

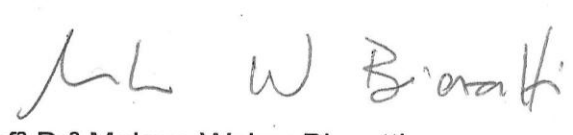
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ian Castro Gamboa (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Maique Weber Biavatti
Centro de Ciências da Saúde - UFSC, Florianópolis

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Nome: Fausto Carnevale Neto

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”-UNESP. Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica. NuBBE.

Rua professor Francisco Degni s/n. jd. Quitandinha, CEP 14.800-900.

Telefone: (16) 3301-6785

E-mail: fausto_pos@yahoo.com

Formação Acadêmica

Graduação

Bacharelado em Farmácia - Bioquímica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”-UNESP.

Local: Araraquara, São Paulo.

Período: 2003-2008.

Disciplinas cursadas durante a Pós-graduação:

1. Estereoquímica e reatividade de compostos orgânicos (12 créditos), **conceito B**
2. Teoria e método de separação, isolamento e purificação de compostos orgânicos (12 créditos), **conceito A**
3. Espectrometria de massas de produtos naturais (06 créditos), **conceito B**
4. Métodos Espectrométricos (12 créditos), **conceito A**
5. Química medicinal aplicada a produtos naturais (12 créditos), **conceito A**
6. Atribuição de configuração absoluta em compostos orgânicos por RMN e CD (04 créditos), **conceito A**
7. Alcalóides (03 créditos), **conceito A**
8. Metabolômica como ferramenta para pesquisa em produtos naturais (02 créditos), **conceito A**

Total: 63 créditos

Artigos

1. CARNEVALE NETO, F., SIQUITELLI, C. D., PAULETTI, P., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Dereplication of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae). **Phytochemistry Letters**. Submetido em 11/2009.
2. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Secondary metabolites from Vochysiaceae: a review. **Phytochemistry Reviews**. Submetido em 05/2010.

Congressos

1. Participação no 17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti realizado em 10/2009.
Participação da Comissão Organizadora do 17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti realizado em 10/2009.
2. Participação no 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) e XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM) realizado em 11/2009.
3. Participação IV Workshop do NuBBE realizado em 12/2009.
4. Participação 33ª Encontro da SBQ realizado em 05/2010.

Apresentação de trabalhos em eventos

1. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., QUEIROZ, M. M. F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Constituintes majoritários das espécies *Qualea grandiflora* e *Qualea cordata* (Vochysiaceae). In: 33ª Reunião da SBQ, 2010.
2. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., QUEIROZ, M. M. F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Desreplicação das espécies *Jatropha multifida* e *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae). In: 33ª Reunião da SBQ, 2010.
3. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., PAULETTI, P. M., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I., SILVA, D. H. S. Avaliação Biológica *in vitro* de espécies de *Qualea* (Vochysiaceae) In: 17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009.

4. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante e inibição da polimerização da β -hematina de *Jatropha multifida* e *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) In: 17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009.
5. QUEIROZ, M. D. L., CARNEVALE NETO, F., SALGADO, H. R. N. Biological assays of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult) TD Penn. (Sapotaceae) In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009.
6. QUEIROZ, M. D. L., CARNEVALE NETO, F., SALGADO, H. R. N. Caracterização fitoquímica e ensaios biológicos de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult) T.D. Penn. (Sapotaceae) In: XVII Jornadas Jovenes Investigadores, 2009.
7. CARNEVALE NETO, F., SIQUITELLI, C. D., PAULETTI, P. M., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Dereplication of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) e XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009.
8. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Detection of major micromolecular constituents from *Jatropha multifida* and *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) e XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM), 2009.
9. QUEIROZ, M. D. L., CARNEVALE NETO, F., SALGADO, H. R. N. Caracterização fitoquímica e ensaios biológicos de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult) T.D. Penn (Sapotaceae) In: 55ª Jornada Farmacêutica Científica da UNESP, 2008.
10. CARNEVALE NETO, F., PAULETTI, P. M., SALGADO, H. R. N., KUMAGAI, D. A., CASTRO-GAMBOA, I. Avaliação *in vitro* da atividade antimalárica e antioxidante de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult) T.D. Penn. (Sapotaceae) In: I Simpósio Paulista de Farmacognosia, 2007.
11. CARNEVALE NETO, F., MIGLIATO, K., MARONA, H. R. N. Acute toxicity study in mice treated with crude bark extract of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult) T.D.Penn. commercialized in Goiânia, GO, Brazil. In: International Symposium on Drug Discovery and IX National Meeting of Medicinal Chemistry Professors, 2006.

12. CARNEVALE NETO, F., MARONA, H. R. N. Antimicrobial activity of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult) T.D.Penn. (SAPOTACEAE) In: International Symposium on Drug Discovery and IX National Meeting of Medicinal Chemistry Professors, 2006.
13. CARNEVALE NETO, F., SALGADO, H. R. N. *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult) T. D. Penn. (Sapotaceae): a busca de novos tratamentos medicinais. In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2006.
14. CARNEVALE NETO, F., MARONA, H. R. N. Caracterização farmacognóstica da casca de *Bumelia sartorum* Mart (Sapotaceae) In: 52ª Jornada Farmacêutica Científica da UNESP, 2005.
15. CARNEVALE NETO, F., SACRAMENTO, L. V. S., SALGADO, H. R. N. Caracterização microscópica e farmacognóstica de *bumelia sartorum* MART (Sapotaceae) in: XVII Congresso de Iniciação Científica, 2005.
16. CARNEVALE NETO, F., MARONA, H. R. N. Gastrointestinal tract effects in mice using *Bumelia sartorum* Mart. (Sapotaceae) In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005.

Apresentação oral em evento

1. *Métodos de desreplicação associados à bioprospecção. IV Workshop do NuBBE*, 2009.

Dedico este trabalho aos meus pais Francisco e Maria Lucia pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida;

Ao meu irmão Fernando, acima de tudo, um amigo leal;

À Fran, pela amizade, carinho e companheirismo;

Ao amigo prof. Dr. Ian Castro-Gamboa por sua estimulante paixão pelas ciências

E aos meus irmãos científicos que tornam o trabalho mais valioso!

Agradecimentos

A Deus;

Ao meu orientador, pelos ensinamentos, não apenas químicos, mas de humanidade e humildade;

A prof^a. Dr^a. Marcia Nasser Lopes, pela orientação;

Ao seu Antônio e a Dona Fátima, pelo carinho e cuidado;

Aos professores do NuBBE, em especial à prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani, pelos ensinamentos e valores compartilhados;

Aos meus grandes amigos Marcus, Ricardo Budja, Cabelo, Henrique, Fellipe, Tadeu, Bruno, Pilão, Manoel, Moicano, Xerson Mello, Daniel, Marcos Marçal, o mais sincero sentimento de amizade;

Ao amigo Alan Cesar Pilon, parceiro nas pesquisas e nas corridas de rua!

Ao Tomaz e prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, da FCFRP da USP pelas análises de Espectrometria de Massas;

Ao prof. Dr. Wagner Vilegas e à prof^a. Dr^a. Isabele Rodrigues Nascimento, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação;

A todos os colegas do NuBBE pela contribuição científica e pelos momentos de descontração;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia de desreplicação bioguiada para *Qualea grandiflora* e *Q. cordata*, duas espécies da família Vochysiaceae presentes no Cerrado Brasileiro com potencial etnofarmacológico, através dos bioensaios *in vitro* de inibição da polimerização da β -hematina bovina (compostos antimaláricos), redução do radical estável DPPH (antioxidante), bioautografia para avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase, avaliação citotóxica em linhagens celulares, avaliação de atividade antifúngica por microdiluição em placa e avaliação tripanocida frente à cepas Y de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e, da detecção *in silico* dos constituintes moleculares majoritários a partir da técnica hifenada de HPLC-DAD-HRMS(ESI).

As folhas e os ramos secos de *Q. grandiflora* e *Q. cordata* foram extraídos por maceração com etanol:água (8:2) e posteriormente fracionados em extração líquido-líquido com os solventes hexano, AcOEt e *n*-butanol. Entre os bioensaios realizados, a avaliação de inibição do radical DPPH apresentou valores significativos para as frações AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* e das folhas de *Q. cordata*. A partir disto, estas frações foram analisadas através da técnica hifenada HPLC-DAD-HRMS(ESI) e permitiram a detecção das flavanonas: 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona e 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona e dos diidroflavonóis: 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol e 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol na fração AcOEt nas folhas de *Q. cordata*, e das flavanonas: 8-metilnaringenina e 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona; benzofenona: Bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona e diidroflavonol: 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*. Também realizou-se a análise *in silico* por RMN da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*, pela comparação dos desenhos virtuais de ^1H RMN dos metabólitos previamente detectados por MS. Os resultados obtidos forneceram mais dados para justificar a detecção dos metabólitos.

Palavras-chave: *Qualea grandiflora*, *Q. cordata*, desreplicação, detecção *in silico*, flavanona C-metiladas.

Abstract

In this work the bioguided phytochemical studies of *Qualea grandiflora* and *Q. cordata*, two species of Vochysiaceae greatly represented in the Brazilian Cerrado and with ethnopharmacology potential, were performed according to *in vitro* bioassays from antioxidant capacity and inhibition of β -hematin polymerization (antimalarial compounds), scavenging activity of DPPH (antioxidant capacity), inhibition of acetyl cholinesterase (anti-Alzheimer), citotoxic activity against tumoral cell lines (anticancer), antifungal activity using a microdilution assay and tripanocidal activity performed with the Y-strain epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, as well as *in silico* dereplication by means of HPLC-DAD-HRMS(ESI). The leaves and stem of *Q. grandiflora* and *Q. cordata* were extracted by maceration in ethanol:water (8:2) and fractionated by liquid-liquid using hexane, AcOEt and *n*-butanol. The bioassays showed that AcOEt stem fraction of *Q. grandiflora* and AcOEt leaves fraction of *Q. cordata* are significantly activity in DPPH reduction. According to this results, the AcOEt fraction of the stem of *Q. grandiflora* and the leaves of *Q. cordata* were evaluated using HPLC-DAD-HRMS(ESI) and allowed the detection of two flavanones: 4',5,7-trihydroxy-3-methoxy-6,8-dimethylflavanone and 5,6,7-trihydroxy-3',4'-dimethoxy-8-methylflavanone, and the dihydroflavonols: 4',7-dihydroxy-5-methoxy-6-methyldihydroflavonol and 3',4'-dimethoxy-5,7-dihydroxy-6,8-dimethyldihydroflavonol from AcOEt leaves fraction of *Q. cordata*, and the flavanones: 8-methyl-naringenine and 4',5,7-trihydroxy-3',6-dimethoxy-8-methylflavanone, the benzophenone: bis (2-hydroxy-4,6-dimethoxy-3-methylphenyl) metanone, and the dihydroflavonol: 3',4',5,6,7-pentahydroxy-8-methyldihydroflavonol from AcOEt stem fraction of *Q. grandiflora*. The AcOEt stem fraction of *Q. grandiflora* was analyzed through *in silico* NMR, comparing virtual ^1H NMR standards spectra from previous MS detected metabolites. These results gave more information in order to justify the detection of reported the metabolites.

Keywords: *Qualea grandiflora*, *Qualea cordata*, dereplication, *in silico* detection, C-methyl flavonoids

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema de Ionização por <i>electrospray</i> no modo positivo.	25
Figura 2 - Esquema de um analisador Q-ToF.	26
Figura 3 - Distribuição geográfica da família Vochysiaceae.	28
Figura 4 - Reação da acetilcolinesterase com o acetato de naftila e a subsequente formação da coloração púrpura no ensaio de CCD.	41
Figura 5 - Reação de redução do reagente MTT em azul de formazan.	42
Figura 6 - Ilustração do seqüestro do radical DPPH e a mudança em sua absortividade a λ 517 nm.	44
Figura 7 – Fluxograma do processo extrativo e do fracionamento	52
Figura 8 - CCD dos extratos de <i>Q. grandiflora</i> (1-7) e <i>Q. cordata</i> (8) para avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase a) no visível. CCD b) a λ 254 nm e c) λ 366nm indicando a eluição das amostras no método cromatográfico utilizado. Fase móvel: CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (80:18:02v/v); (1) Extrato bruto dos ramos de <i>Q.grandiflora</i> ; (2) Fração AcOEt dos ramos de <i>Q.grandiflora</i> ; (3) Fração aquosa final dos ramos de <i>Q.grandiflora</i> ; (4) Extrato bruto das folhas de <i>Q.grandiflora</i> ; (5) Fração hexânica das folhas de <i>Q.grandiflora</i> ; (6) Fração AcOEt das folhas de <i>Q.grandiflora</i> ; (7) Fração aquosa final das folhas de <i>Q.grandiflora</i> , (8) Extrato bruto das folhas de <i>Q.cordata</i> ; (P) padrão galantamina.	55
Figura 9 - Gráfico de % de seqüestro de DPPH para extratos de <i>Qualea grandiflora</i> e <i>Q.cordata</i> .	58
Figura 10 - Perfis cromatográficos a λ 254nm do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAC) e fração aquosa final (FF) dos ramos de <i>Qualea grandiflora</i> , utilizando HPLC-UV/DAD.	61
Figura 11 - Perfis cromatográficos a λ 254nm do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAC) e fração aquosa final (FF) das folhas de <i>Qualea grandiflora</i> , utilizando HPLC-UV/DAD.	62
Figura 12 - Perfis cromatográficos a λ 254nm da fração acetato de etila (FAC) e dos ramos de <i>Qualea cordata</i> , utilizando HPLC-UV/DAD.	62

Figura 13 - Perfis cromatográficos a λ 254nm da fração acetato de etila (FAc), fração butanólica (FB) e fração aquosa final (FF) das folhas de <i>Qualea cordata</i> , utilizando HPLC-UV/DAD.	62
Figura 14 - Cromatograma e espectros de UV das bandas majoritárias da fração acetato de etila (FAc), dos ramos de <i>Qualea grandiflora</i> , utilizando HPLC-UV/DAD.	64
Figura 15 - Cromatograma e espectros de UV das bandas majoritárias da fração acetato de etila (FAc), das folhas de <i>Qualea cordata</i> , utilizando HPLC-UV/DAD.	64
Figura 16 - Corrente total de íons (TIC) para o extrato de acetato de etila dos ramos de <i>Q. grandiflora</i> .	66
Figura 17 - Corrente total de íons (TIC) para o extrato de acetato de etila das folhas de <i>Q. cordata</i> .	66
Figura 18 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 8 metilnaringenina.	68
Figura 19 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para o 4',5,7 triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona..	69
Figura 20 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a bis(2 hidroxí-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona.	72
Figura 21 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para o 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol.	73
Figura 22 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para o 4',5,7 triidroxi-6,8-dimetilflavanona.	74
Figura 23 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para o 4',7 diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol.	76
Figura 24 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 5,6,7 triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona.	78

- Figura 25 - Espectros de MS e MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona. 79
- Figura 26 - Espectro de ^1H RMN da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*, Espectro de ^1H RMN simulado para as moléculas detectada por HPLC-DAD-HRMS(ESI), Subtração entre os espectros de ^1H RMN. 81
- Figura 27 - Espectro de ^1H RMN da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* e espectro de ^1H RMN simulado para as moléculas detectadas por HPLC-DAD-HRMS(ESI). 82
- Figura 28 - Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 2,1 a 2,5 ppm. 83
- Figura 29 - Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 3,6 a 4,1 ppm. 84
- Figura 30 - Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 2,5 a 3,1 ppm. 85

Figura 31 - Espectros de ¹H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 5,3 a 5,7 ppm.

86

Figura 32 - Espectros de ¹H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 6,5 a 7,5 ppm.

87

Figura 33 - Espectros de ¹H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 11,5 a 12,0 ppm.

88

Figura 34 - Espectros de ¹H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 12,0 a 14,0 ppm.

89

Lista de tabelas

Tabela 1 - Metabólitos isolados de espécies da família Vochysiaceae	30
Tabela 2 - Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 5,25g de extrato bruto das folhas de <i>Q.grandiflora</i>	52
Tabela 3 - Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 5,00g de extrato bruto dos ramos de <i>Q.grandiflora</i> .	53
Tabela 4 - Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 2,80g de extrato bruto das folhas de <i>Q.cordata</i> ..	53
Tabela 5 - Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 11,00g de extrato bruto dos ramos de <i>Q.cordata</i> .	53
Tabela 6 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em 3 linhagens tumorais testadas na concentração de 50µg/mL .	56
Tabela 7 - Concentração mínima inibitória da avaliação antifúngica dos extratos de <i>Qualea grandiflora</i> e <i>Q.cordata</i> .	57
Tabela 8 - Porcentagem de inibição de polimerização de hematina pelas frações de <i>Qualea grandiflora</i> .	59
Tabela 9 - Porcentagem de inibição de polimerização de hematina pelas frações de <i>Qualea cordata</i> .	59
Tabela 10 - Resultados do ensaio <i>in vitro</i> de atividade contra epimastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> dos extratos de <i>Q.grandiflora</i> e <i>Q.cordata</i> .	60
Tabela 11 - Valores de massa/carga (<i>m/z</i>) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS(ESI)-MS2 para fração acetato de etila dos ramos de <i>Qualea grandiflora</i> .	65
Tabela 12 - Valores de massa/carga (<i>m/z</i>) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS(ESI)-MS2 para fração acetato de etila das folhas de <i>Qualea cordata</i> .	65

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS	18
1.2. DESREPLICAÇÃO	19
1.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)	22
1.3.1. Ionização dos analitos	22
1.3.2. MS ⁿ	23
1.3.3. Ionização por electrospray (ESI)	23
1.3.4. Os analisadores de massas	25
1.3.5. Sistema de detecção	27
1.4. O TÁXON VOCHYSIACEAE	28
1.5. FITOQUÍMICA	29
1.6. ETNOFARMACOLOGIA	35
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. COLETA DOS ESPÉCIMES	40
3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	40
3.3. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	40
3.3.1. Ensaio de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase - ensaio qualitativo por bioautografia (Cromatografia de Camada Delgada, CCD)	40
3.3.2. Avaliação do potencial citotóxico in vitro	42
3.3.3. Avaliação da atividade antifúngica	43
3.3.4. Ensaio in vitro de redução do DPPH	44
3.3.5. Ensaio in vitro da inibição de polimerização de β-hematina bovina	45
3.3.6. Avaliação in vitro da atividade tripanocida	46
3.4. DESREPLICAÇÃO E DETECÇÃO DO METABÓLITOS MAJORITÁRIOS IN SILICO	47
3.4.1. Preparação das amostras	47
3.4.2. HPLC-DAD	47
3.4.3. HPLC-DAD-HRMS (ESI)	47
3.4.4. RMN	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	54
4.1.1. Ensaio de atividade Anticolinesterásica - ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada CCD)	54
4.1.2. Avaliação do potencial citotóxico in vitro	56
4.1.3. Avaliação da atividade antifúngica	56
4.1.4. Ensaio in vitro de redução do DPPH	57
4.1.5. Ensaio in vitro da polimerização de β-hematina bovina	58
4.1.6. Avaliação in vitro da atividade tripanocida	59
4.2. DESREPLICAÇÃO E DETECÇÃO DO METABÓLITOS MAJORITÁRIOS IN SILICO	61
4.2.1. HPLC-UV/DAD	61
4.2.2. HPLC-HRMS	65
4.2.3. Desreplcação e detecção do metabólitos majoritários na fração AcOEt dos ramos de <i>Q. grandiflora</i>	67
Íon observado [M+H] ⁺ : m/z 287,0917: 8-metilnaringenina	67
Íon observado [M+H] ⁺ : 347,1129: 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona	69
Íon observado [M+H] ⁺ : m/z 363,1421: bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona	71
Íon observado [M+H] ⁺ : 335,0768: 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol	72
4.2.4. Desreplcação e detecção do metabólitos majoritários na fração acetato de etila das folhas de <i>Qualea cordata</i>	74

Íon observado $[M+H]^+$: m/z 331,1165: 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona	74
Íon observado $[M+H]^+$: 317,1025: 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol	75
Íon observado $[M+H]^+$: 347,1119: 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona	77
Íon observado $[M+H]^+$: 361,1273: 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol	78
4.2.5. RMN	80
Análise do substituinte metila (-CH ₃)	83
Análise do substituinte metoxila (-OCH ₃)	84
Análise do ¹ H em C-3 de flavanona	85
Análise do ¹ H em C-2	86
Análise do ¹ H de anel aromático	87
Análise do ¹ H de -OH fenólica da benzofenona	88
Análise do ¹ H de -OH fenólicas queladas em C-5	89
5. CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	93

1.INTRODUÇÃO

1.1. Importância dos produtos naturais

Desde os tempos imemoriais o homem busca na natureza recursos que melhorem suas condições de vida. Devido a disponibilidade destes recursos, os produtos naturais encontram-se na base das atividades humanas e estão presentes em todos os lugares, desde os combustíveis dos automóveis até as fibras e cores de nossas roupas.

A ciência terapêutica é um forte exemplo da importância dos produtos naturais. O emprego de plantas no tratamento e cura de diversas enfermidades tem sido amplamente observado como base normativa para a manutenção da saúde, uma vez que cerca de 80% da população mundial fazem uso terapêutico de aproximadamente 25.000 espécies de plantas (WHO, 2002).

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas e se notabilizam no desenvolvimento do arsenal terapêutico de forma direta como fitoterápico ou de maneira indireta através do uso dos metabólitos bioativos como matérias-primas para a produção de inúmeros medicamentos (Bolzani *et al.*, 2009).

Segundo Cragg e Newman, aproximadamente 50% dos fármacos de uso clínico nos últimos 25 anos ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Para o tratamento do câncer e de doenças infecciosas, mais de 60% dos medicamentos provêm de produtos naturais ou análogos sintéticos, evidenciando o sucesso da química de produtos naturais como estratégia na busca por novos fármacos (Newman e Cragg, 2007, Newman e Cragg, 2009).

Devido a sua importância, o processo de descoberta de fármacos a partir de fontes naturais caracterizou-se, nos últimos 30 anos, pelo desenvolvimento de bioensaios *in vitro* de pequena escala, os quais visam a testar a atividade de muitas amostras num curto espaço de tempo, proporcionando um número de resultados replicados suficientes para a análise estatística. Estes ensaios acelerados (*high throughput screening* - HTS) são usados pela indústria farmacêutica rotineiramente para testar grande número de amostras obtidas através de química combinatória ou de fontes naturais.

Contudo, nos últimos anos tem-se observado uma queda na descoberta de novos fármacos. Dentro da área de química de produtos naturais, isto pode ser justificado pelo

conhecimento já estabelecido dos principais quimiotipos produzidos pelas plantas e pela abordagem reducionista que permeia a terapêutica moderna, estimulando a pesquisa por mecanismos químicos e farmacológicos em nível molecular em detrimento de questões multifatoriais associadas às misturas complexas, como o sinergismo dos compostos (Verpoorte *et al.*, 2005).

Dentro desta perspectiva, a química de produtos naturais tem buscado alternativas na pesquisa por agentes bioativos e novas metodologias estão sendo utilizadas, como *system biology*, que considera as patologias e os mecanismos terapêuticos como processos multifatoriais, a metabolômica, que busca no perfil metabólico total (do doente e do agente terapêutico) informações e correlações relevantes ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, a quimiometria, que permite a análise dos complexos processos multifatoriais, e a desreplicação, que simplifica o processo analítico através da detecção *in silico* (computacional) de moléculas previamente conhecidas (Ulrich-Merzenich *et al.*, 2007; Nicholson e Lindon, 2008; Lang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

1.2. Desreplicação

O termo “desreplicação” (do inglês, *dereplication*) popularizou-se na literatura acadêmica a partir dos anos 90 como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos brutos objetivando a identificação de compostos bioativos conhecidos de maneira a se evitar o re-isolamento e determinação estrutural de uma substância que não seja inédita (Ng *et al.*, 2009).

Além de impedir a replicação de trabalhos, esta abordagem minimiza o consumo de amostra e solvente e acelera o estágio de descoberta de novas substâncias com atividade biológica (Lang *et al.*, 2008).

O procedimento geral da desreplicação envolve a separação dos componentes das matrizes complexas através de métodos cromatográficos, a coleta de dados espectroscópicos e de bioatividade pelo acoplamento (hifenação) de diferentes detectores e/ou coletor de frações, a comparação das informações obtidas às bases de dados, e por fim, a detecção e proposta de elucidação estrutural (Lang *et al.*, 2008).

Vários métodos analíticos de desreplicação foram desenvolvidos para a detecção de moléculas acumuladas em plantas com propriedades adoçantes (Chung *et al.*, 1997),

extratos de origem natural com atividade anti-HIV (Cardellina *et al.*, 1999), extratos de organismos terrestres e marinhos com atividade antibacteriana (Ramakrishna *et al.*, 1999; Leeds *et al.*, 2006), extratos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (Rhee *et al.*, 2001), extratos com atividade inibidora de ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases (Jia, 2003), substâncias de plantas com atividade citotóxica (Kinghorn *et al.*, 2003), substâncias com atividade antituberculose (Stavri *et al.*, 2004), anti-fúngica (Masoko e Eloff, 2005), e como agentes bacteriostáticos (Singh, 2006). Técnicas de *desreplicação* também foram utilizadas para detectar classes específicas de produtos naturais, como flavonóides glicosilados (Waridel *et al.*, 2001), polipeptídeos (Claeson *et al.*, 1998), limonóides (Cui *et al.*, 1998), derivados do ácido cafeíco (Pauli *et al.*, 1999), depsipeptídeos cíclicos (Potterat *et al.*, 2000), flavonóides e derivados de flavonóides (Wolfender *et al.*, 2000), derivados de taxóides (Stefanowicz *et al.*, 2001), vitanolídeos citotóxicos (Minguzzi *et al.*, 2002), sesterterpenos de esponjas marinhas (Stessman *et al.*, 2002), micotoxinas de fungos (Nielsen e Smedsgaard, 2003), fitoestrogênios (Van Elswijk *et al.*, 2004), terpenos glicosilados (Waridel *et al.*, 2004), isoflavanóides (Lambert *et al.*, 2005) e triterpenos pentacíclicos (Gu *et al.*, 2006).

Diversas hifenações são propostas na abordagem de *desreplicação*, cada uma com vantagens com relação a sensibilidade e a resolução. As mais comuns envolvem os acoplamentos LC-UV/DAD (cromatografia líquida acoplada a detecção por ultra-violeta em detector de arranjo de diodos), LC-MS (acoplamento ao espectrômetro de massas), LC-MSⁿ (acoplamento ao espectrômetro de massas sequencial) e LC-RMN (ressonância magnética nuclear).

O uso de LC-UV/DAD é amplamente conhecido na química de produtos naturais devido ao menor custo do equipamento e das análises, e têm sido utilizado na *desreplicação* através da comparação dos dados espectroscópicos de UV, obtidos diretamente após a separação dos constituintes em um sistema denominado *online*, com as absorções características do composto conhecido. Porém seu uso é limitado apenas para compostos que apresentam cromóforos, como os polifenóis, e a mudança nas condições cromatográficas podem influir negativamente na detecção, principalmente em menores comprimentos de onda (Wolfender *et al.*, 2009).

A espectrometria de massas (MS) tem sido utilizada na *desreplicação* de matrizes naturais devido à sua versatilidade, rapidez e elevada sensibilidade, possibilitando o uso de menores quantidades de amostra. A partir dos dados obtidos (a

massa molecular de baixa ou alta resolução e as fragmentações) realiza-se a determinação estrutural através da busca da fórmula molecular em bases de dados como *AntiBase*, *Dictionary of Natural Products*, *MarinLit* e mesmo o *SciFinder Scholar* ou *STN International* (CAPlus), e justifica-se a detecção por propostas mecânicas de fragmentação (obtidas em experimentos *tandem*) (Lang *et al.*, 2008; Wolfender *et al.*, 2009).

O uso da espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) como ferramenta na desreplicação tem crescido exponencialmente nos últimos anos devido a sua robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos ativos orgânicos mais populosos: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Seu uso pode ser feito a partir de hifenação com LC em fluxo contínuo (*on-flow*) para determinação dos constituintes majoritários, ou por coleta em extração de fase sólida (*solid phase extraction*, SPE) permitindo a realização de espectros 2D e a detecção dos compostos minoritários. Além disto, por meio do uso de seqüências de pulso, é possível a detecção *in situ* de compostos conhecidos através da obtenção de espectros de RMN de moléculas individuais em mistura sem haver a necessidade de separação (Verpoorte *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010).

1.3. Espectrometria de Massas (MS)

Um espectrômetro de massas é um instrumento desenhado para separar espécies carregadas de acordo com suas razões massa-carga (m/z), sendo constituído de diversas partes: interface de ionização, analisador de massas, detector e sistema de processamento dos dados (Hoffmann e Stroobant, 2007).

O seu acoplamento à cromatografia líquida cria uma poderosa ferramenta analítica para a determinação de compostos orgânicos pois permite a identificação e quantificação com alto grau de seletividade e sensibilidade (Wolfender, 2009).

Diversas revisões foram realizadas focando diferentes aspectos do acoplamento LC-MS, bem como a evolução do estado da arte (Robb e Blades, 2008; Theodoridis *et al.*, 2008; Youdim e Saunders, 2010). Na abordagem de desreplicação de produtos naturais, o uso de LC-MS e LC-MSⁿ permitem a obtenção de informações estruturais e a identificação de compostos sem o prévio isolamento. Adicionalmente, os mecanismos de fragmentação obtidos e os cálculos das fórmulas empíricas podem ser utilizados em conjunto com outras técnicas analíticas disponíveis (como RMN) para a identificação de novos compostos (Lang *et al.*, 2008).

1.3.1. Ionização dos analitos

Uma vez que o detector MS tem a capacidade de analisar apenas espécies carregadas, uma técnica de ionização deve ser empregada para que ocorra o reconhecimento dos analitos presentes na amostra. Portanto nesta etapa os compostos são ionizados positivamente ou negativamente (Hoffmann e Stroobant, 2007).

Em razão da grande variedade de amostras e compostos de interesse e de acoplamentos com técnicas de separação, diferentes estratégias de ionização são necessárias para gerar as espécies com carga adequada para a discriminação. Como exemplos de fontes de ionização empregados na MS podemos citar a ionização química (*Chemical Ionization*, CI), ionização por elétrons (*Eletron Ionization*, EI), ionização por spray aquecido (*Thermo-Spray Ionization*, TSP), ionização por bombardeamento com acelerador de átomos (*Fast Atom Bombardment*, FAB), ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), fotoionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*, APPI), ionização por

dessorções a laser assistida por uma matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) e a ionização por *spray* carregado (*Electrospray Ionization*, ESI) (Chen *et al.*, 2005; Takáts *et al.*, 2005; Cotte-Rodriguez *et al.*, 2005).

No acoplamento com a LC, a fase móvel proveniente da coluna cromatográfica é direcionada para o MS, geralmente em um sistema *online*, através de uma conexão direta entre os dois equipamentos. Uma vez que a fase móvel deve ser eliminada para a detecção do íons, tem-se utilizado interfaces à pressão atmosférica (API) que permitem a rápida eliminação da fase móvel (vaporizada) através do sistema de vácuo. Além disso, as técnicas API realizam uma ionização mais branda, o que possibilita a detecção do íon molecular para moléculas facilmente fragmentáveis, como muitos dos metabólitos secundários (Lang *et al.*, 2008; Wolfender, 2009).

1.3.2. MSⁿ

A MSⁿ é a técnica espectrométrica que utiliza dois ou mais estágios de espectrometria de massas (MS¹, MS², MSⁿ), para isolar o íon de interesse através de sua relação *m/z* e realizar sua fragmentação induzida. Quando se realiza este experimento em dois estágios (MS²), denomina-se *tandem*. Esta técnica é amplamente empregada, acoplada à cromatografia, para a detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita mais informação estrutural no caso de técnicas de ionização brandas (Chiaradia *et al.*, 2008).

1.3.3. Ionização por *electrospray* (ESI)

ESI é, basicamente, uma técnica de transferência dos analitos de uma fase líquida para a fase gasosa. Seu emprego no estudo de produtos naturais popularizou-se devido a ionização branda e a produção de íons com múltiplas cargas em moléculas grandes, tais como peptídeos, possibilitando que moléculas orgânicas fossem determinadas em razão da fragmentação total ou parcial (Hoffmann e Stroobant, 2007).

Os mecanismos do ESI ainda estão sob estudo, e não são totalmente compreendidos.

Basicamente, o processo de *electrospray* compreende três etapas: a nebulização da amostra em gotículas eletricamente carregadas, a liberação dos íons das gotículas e o

transporte dos íons da fonte à pressão atmosférica para dentro da região de alto vácuo no MS. Um campo elétrico é aplicado entre o líquido que flui por um capilar e um contra-eletródo, causando a separação dos íons com carga positiva e negativa e formando uma dupla camada de íons no menisco do líquido. A atração eletrostática dos íons em excesso na camada exterior do líquido, em direção ao contra-eletródo, causa uma distorção da sua superfície no formato de um cone (chamado cone de Taylor). Ao mesmo tempo, a tensão superficial do líquido atua para manter a superfície não deformada. A partir de certa voltagem a tensão superficial não é mais capaz de reter a superfície coesa e um fino filamento líquido alonga-se do cone de Taylor, emitindo um jato de gotículas carregadas em direção ao contra-eletródo. À medida que as gotículas viajam em direção ao contra-eletródo o solvente tende a evaporar, aumentando a sua razão carga-volume. Quando a repulsão das cargas ultrapassa a força da tensão superficial das gotículas a fissão coulômbica passa a ocorrer e gotículas menores são ejetadas das gotículas iniciais. O processo pelo qual os íons chegam à fase gasosa tem sido debatido, e atualmente ainda não se conhece todos os detalhes do processo de obtenção dos íons isolados em fase gasosa. Contudo, durante o voo, as gotas sofrem redução de tamanho pela evaporação do solvente por meio de um gás secante à pressão atmosférica, formando os íons que posteriormente serão introduzidos no MS (Hoffmann e Stroobant, 2007).

No acoplamento LC-MS, deve-se considerar como limitante a constituição da fase móvel. Uma vez que a técnica de ESI exige a volatilização da amostra, a interface entre as técnicas exige que se saia pouco voláteis e outros aditivos para a melhora da separação cromatográfica sejam cuidadosamente considerados.

De fato, o importante é que no acoplamento LC-MS, os íons expressados na fase gasosa são um reflexo do que está presente na fase líquida proveniente da coluna cromatográfica. A Figura 1 esquematiza a formação de um ESI em modo positivo (Hoffmann e Stroobant, 2007).

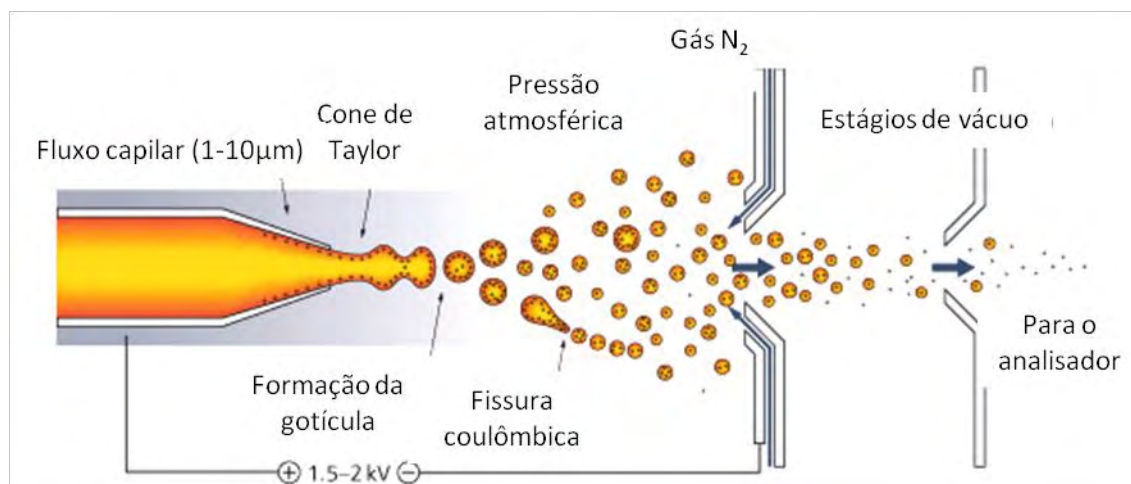


Figura 1. Esquema de Ionização por *electrospray* no modo positivo.

1.3.4. Os analisadores de massas

Os analisadores ou filtros de massas são dispositivos responsáveis pela separação ou resolução dos íons conforme sua razão m/z . Diversos analisadores de massas estão disponíveis atualmente e a escolha depende do tipo de aplicação desejada. Aspectos tais como intervalo de massas, poder de resolução, exatidão de massa, taxa de transmissão dos íons, sensibilidade, quantificação, velocidade de varredura, bem como facilidade de acoplamento com o sistema de separação devem ser considerados. As opções para escolha incluem analisadores de massas do tipo quadrupolo (Q), *ion trap* (aprisionador de íons), analisador de tempo de voo (*time of flight*, ToF), setores do tipo elétrico e magnético, e equipamentos com transformada de Fourier do tipo ressonância ciclônica de íons (FT-ICR) e *orbitrap* (Hu *et al.*, 2005, Hoffmann e Stroobant, 2007).

Além, há a possibilidade de combinação de mais de um analisador para obtenção de análise em *tandem*, quer seja com acoplamento de analisadores do mesmo tipo (ex. triplo quadrupolo) ou com equipamentos híbridos (ex. Quadrupolo-*Time of Flight*, Q-ToF). Adicionalmente, alguns equipamentos do tipo *ion trap* permitem a fragmentação e isolamento de íons de interesse sucessivas vezes, operando no modo *tandem*. Várias publicações sobre as características dos diferentes analisadores e suas principais aplicações encontram-se disponíveis (Domon *et al.*, 2006; Hoffmann e Stroobant, 2007; Chiaradia *et al.*, 2008). O trabalho aqui apresentado utilizou Q-ToF, e este será brevemente discutido.

O filtro de massa do tipo quadrupolo é constituído em quatro barras paralelas, arranjadas em dois pares opostos com voltagens de corrente alternada (ou de radiofrequência opostas). A aplicação destas duas voltagens afeta a trajetória centralizada dos íons. Em se fazendo variar estas voltagens, somente íons com uma determinada razão m/z atravessam no centro do quadrupolo, enquanto os outros íons são desviados da trajetória central. O espectro de massas é obtido em se fazendo variar as voltagens do quadrupolo, de maneira a se realizar uma varredura em toda a faixa de m/z desejada (Hoffmann e Stroobant, 2007; Chiaradia *et al.*, 2008).

Os analisador do tipo ToF baseia-se no princípio de que, como os íons são gerados na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, eles possuem a mesma energia cinética, de maneira que suas velocidades serão apenas diferenciadas pelas suas massas (velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa do íon). Por isto, neste analisador de massas, os íons produzidos na fonte de ionização do espectrômetro são acelerados através de um “tubo de vôle” para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a razão m/z de cada íon (Chiaradia *et al.*, 2008).

Em um analisador híbrido do tipo Q-ToF, o analisador ToF é disposto ortogonalmente à um prévio quadrupolo. Deste modo, é possível detectar todos os íons que entram no tubo de vôle e gerar o espectro MS^n das massas selecionadas (Chiaradia *et al.*, 2008).

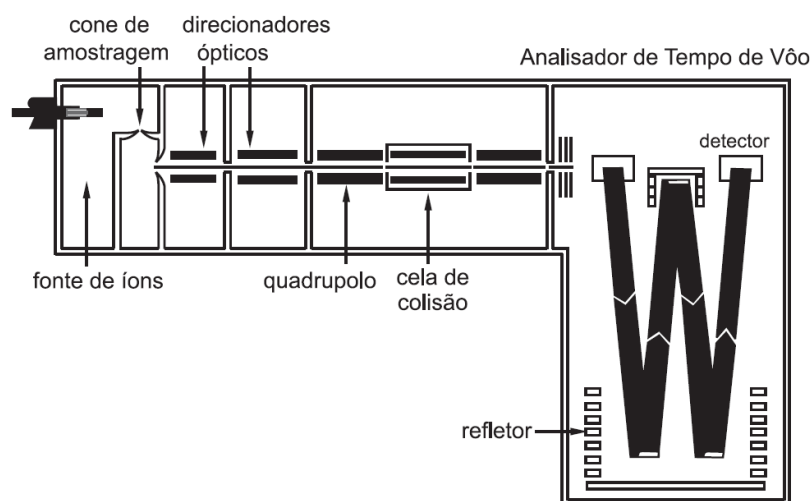


Figura 2. Esquema de um analisador Q-ToF.

1.3.5. Sistema de detecção

O sistema de detecção, formado por uma célula multiplicadora de elétrons, é sensível aos íons provenientes do analisador de massas. O detector multiplica os elétrons removidos da placa de colisão ao longo da sequência de placas em um gradiente de diferença de potencial (ddp), transformando a torrente de elétrons em corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico é convertida em um espectro de massas onde aparecem os picos para cada íon selecionado na relação m/z . Esse mesmo sinal também é utilizado para a quantificação destes íons (Hoffmann e Stroobant, 2007).

1.4. O Táxon Vochysiaceae

A família Vochysiaceae é constituída taxonomicamente por duas tribos, seis gêneros e aproximadamente 200 espécies distribuídas pelas regiões tropicais da América e da África (Figura 3). Entre as tribos existentes está Erismeeae, formada pelos gêneros *Erismadelphus* (que apresenta 3 espécies no oeste africano) e *Erisma* (possuindo 20 espécies localizadas na América do Sul); e a tribo Vochysieae, composta pelos gêneros *Callisthene* (com 10 espécies), *Qualea* (com 60 espécies), *Salvertia* (contendo apenas 1 espécie) e *Vochysia* (o maior gênero, com 105 espécies) (Mayworm *et al.*, 2000).



Figura 3. Distribuição geográfica da família Vochysiaceae.

Os gêneros da família Vochysiaceae se diferenciam pelas características anatômicas de suas flores, variando no número de pétalas e frutos, apresentando diferentes formas de carpo e número de sementes (Mayworm *et al.*, 2000).

Apesar de ser uma família de poucas espécies, Vochysiaceae apresenta importante papel na constituição das matas tropicais, tendo espécies amplamente distribuídas, como a *Qualea grandiflora*, uma das plantas mais comuns do cerrado brasileiro (Sajo *et al.*, 2002).

Estudos visando validar a atual classificação taxonômica da família foram realizados através da análise comparativa da anatomia de folhas e caules e da distribuição de açúcares e ácidos graxos em espécies pertencentes à Vochysiaceae (Mayworm *et al.*, 2000; Mayworm *et al.*, 2002; Sajo *et al.*, 2002).

Recentemente uma nova espécie do gênero *Vochysia* foi reportada e denominada *Vochysia palmirana*, após sua descoberta no cerrado brasileiro (França *et al.*, 2007).

1.5. Fitoquímica

A química da família Vochysiaceae ainda é pouco conhecida. Até hoje, apenas algumas dezenas de metabólitos foram detectados, sendo em sua maioria das classes dos triterpenoides, esteróides e polifenóis (tabela 1).

Em *Qualea* foram relatadas a presença de derivados do ácido elágico, flavonóides C-metilados (nas posições C-6 e C-8) e triterpenos pentacíclicos da classe dos lupanos e oleananos.

As metilações em C-6 e C-8 são incomuns em plantas, o que torna estas moléculas importantes quimiomarcadores do gênero (Nasser *et al.*, 2008).

Tabela 1. Metabólitos isolados de espécies da família Vochysiaceae.

Espécies	Substância	Referências
<i>Erismia calcaratum</i>	ácido tri- <i>O</i> -metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
	ácido 3,3',4-tri- <i>O</i> -metil-4'- <i>O</i> -rutinosilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
<i>Qualea cordata</i>	arabinose, galactose, glicose, manose e rhamnose	Mayworm <i>et al.</i> , 2000
	ácido palmítico, ácido oléico e ácido láurico	Mayworm <i>et al.</i> , 2002
<i>Q. dichotoma</i>	arabinose, galactose, glicose, manose e rhamnose	Mayworm <i>et al.</i> , 2000
	ácido palmítico, ácido oléico e ácido láurico	Mayworm <i>et al.</i> , 2002
<i>Q. cryptantha</i>	arabinose, galactose, glicose, manose e rhamnose	Mayworm <i>et al.</i> , 2000
	ácido palmítico, ácido oléico e ácido láurico	Mayworm <i>et al.</i> , 2002
<i>Qualea labouriauana</i>	(2 <i>R</i>)-5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6,8-dimetilflavanona	Corrêa <i>et al.</i> , 1981
	(2 <i>R</i>)-5,7,4'-triidroxi-8-metilflavanona	Corrêa <i>et al.</i> , 1981
	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3,7,4'-triidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona	Corrêa <i>et al.</i> , 1981
	2,2'-diidroxi-4,4',6,6'-tetrametoxi-3,3'-dimetilbenzofenona	Corrêa <i>et al.</i> , 1981
	2,2',4,4'-tetrametoxi-5,5'-dimetilbenzofenona	Corrêa <i>et al.</i> , 1981
	β-sitosterol	Corrêa <i>et al.</i> , 1985
<i>Qualea paraensis</i>	(2 <i>R</i>)-5,7,2'-triidroxi-4'-metoxi-6,8-dimetilflavanona	Corrêa <i>et al.</i> , 1981

Continua

Tabela 1. Continuação.

<i>Qualea grandiflora</i>	taninos pirogálicos e catequínicos (ácido gálico, pirogalol, pirocatequina) e catecol	Corrêa <i>et al.</i> , 1981
	ácido 3, 3'-di- <i>O</i> -metilelágico	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	ácido 3- <i>O</i> -metilelágico-4'- <i>O</i> -rhamnopiranosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	ácido 3, 3'-di- <i>O</i> -metilelágico-4- <i>O</i> -β-glucopiranosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	arjunglicosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	bellericagenina B	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	28-nor-17,22-seco-2α,3β,19,22,23-pentaidroxi-12-en-oleanano	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	β-sitosterol	Nasser <i>et al.</i> , 2007
<i>Qualea parviflora</i>	Lupenona e lupeol	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	arabinose, galactose, glicose, manose e rhamnose	Mayworm <i>et al.</i> , 2000
	ácido palmítico, ácido oléico e ácido láurico	Mayworm <i>et al.</i> , 2002
	arjunglicosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	bellericagenina B e bellericasídeo B	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	28-nor-17,22-seco-2α,3β,19,22,23-pentaidroxi-12-en-oleanano	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	ácido 3, 3'-di- <i>O</i> -metilelágico	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	ácido 3,3',4-tri- <i>O</i> -metilelágico-4'- <i>O</i> -β-d-glucopiranosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	ácido 3- <i>O</i> -metilelágico-4'- <i>O</i> -α-L-rhamnopiranosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	ácido 3, 3'-di- <i>O</i> -metilelágico-4- <i>O</i> -β-glucopiranosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	β-sitosterol	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	friedelina	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	Lupenona e lupeol	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	betulina	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	ácido <i>epi</i> -betulínico	Nasser <i>et al.</i> , 2007

Continua

Tabela 1. Continuação.

<i>Q. multiflora</i>	arabinose, galactose, glicose, manose e rhamnose	Mayworm <i>et al.</i> , 2000
	ácido palmítico, ácido oléico e ácido láurico	Mayworm <i>et al.</i> , 2002
	arjunglicosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	bellericagenina B	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	bellericasídeo B	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	28-nor-17,22-seco-2 α ,3 β ,19,22,23-pentaidroxi-12-en-oleanano	Nasser <i>et al.</i> , 2006
	ácido 3, 3'-di-O-metilelágico	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	ácido 3-O-metilelágico-4'-O-rhamnopiranosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	ácido 3, 3'-di-O-metilelágico-4-O- β -glucopiranosídeo	Nasser <i>et al.</i> , 2008
	β -sitosterol	Nasser <i>et al.</i> , 2007
<i>Salvertia convallariodora</i>	friedelina	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	lupenona	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	lupeol	Nasser <i>et al.</i> , 2007
	7,3',4'-triidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
	7,3',4'-triidroxiflavona-7-glicosídeo	Lopes <i>et al.</i> , 1979
	3'-metoxi-7,4'-diidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
	3'-metoxi-7,4'-diidroxiflavona-7-glicosídeo	Lopes <i>et al.</i> , 1979
	ácido 3,3',4-tri-O-metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
	ácido 3,3',4,4'-tetra-O-metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
	ácido 3'-O-metil-3,4-O,O-metilideno-elágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
	ácido 3',4'-di-O-metil-O,O-metilideno-elágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975

Continua

Tabela 1. Continuação.

<i>Vochysia acuminata</i>	ácido 3,3',4-tri- <i>O</i> -metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
<i>Vochysia cinnamomea</i>	7,3',4'-triidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
	3'-metoxi-7,4'-diidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
<i>Vochysia divergens</i>	β-sitosterol	Hess <i>et al.</i> , 1999
	ácido betulínico	Hess <i>et al.</i> , 1995
	ácido divergióico	Hess <i>et al.</i> , 1995
	ácido 24-hidroxitormêntico	Hess <i>et al.</i> , 1995
	ácido tormêntico	Bortalanza <i>et al.</i> , 2002
<i>Vochysia ferruginea</i>	ácido 6β-hidroximaslinico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
<i>Vochysia guianensis</i>	vochysina	Baudouin <i>et al.</i> , 1983
<i>Vochysia pacifica</i>	ácido betulínico	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	ácido sericico	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	ácido 24-hidroxitormêntico	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	ácido 24-hidroxitormêntico, glicosil éster	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	traquelosperogenina B	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	quadranosídeo I	Weniger <i>et al.</i> , 2005
	nigaichigosídeo F1	Weniger <i>et al.</i> , 2005
<i>Vochysia pyramidalis</i>	ácido betulínico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
	ácido 4- <i>epi</i> -vismiaefólico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
	ácido 2α,3β,19α-triidroxi-24-oxo-urs-12-en-28-óico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000

Continua

Tabela 1. Continuação.

<i>Vochysia pyramidalis</i>	ácido betulínico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
	ácido 4- <i>epi</i> -vismiaefólico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
	ácido 2 α ,3 β ,19 α -triidroxi-24-oxo-urs-12-en-28-óico	Zucaro <i>et al.</i> , 2000
<i>Vochysia tucanorum</i>	7,3',4'-triidroxiflavona	Lopes <i>et al.</i> , 1979
	ácido betunílico	Gomes <i>et al.</i> , 2009
	eritrodiol	Gomes <i>et al.</i> , 2009
	ácido <i>epi</i> -betunílico	Gomes <i>et al.</i> , 2009
	ácido ursólico	Gomes <i>et al.</i> , 2009
	ácido oleanólico	Gomes <i>et al.</i> , 2009
<i>Vochysia tyrsoidea</i>	ácido tri- <i>O</i> -metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
	ácido tetra- <i>O</i> -metilelágico	Corrêa <i>et al.</i> , 1975
<i>Vochysia vismiaefolia</i>	ácido bartogênico	Araújo & Souza, 1990
	ácido vismiaefólico	Araújo & Souza, 1990

1.6. Etnofarmacologia

Muitas espécies de Vochysiaceae, em especial de *Qualea* e *Vochysia*, são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças (Rodrigues *et al.*, 2001).

A infusão e a decocção das folhas de *Q. grandiflora* é usada para o tratamento de diarreias sanguinolentas, cólicas intestinais, úlceras gástricas, azia e no combate à infecções amebianas. As cascas do caule e as folhas de *Q. grandiflora* também são utilizadas como adstringente e no tratamento de feridas e inflamações (Almeida *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2001; Pot *et al.*, 1994; Matteuci *et al.*, 1995).

De acordo com estudos etnofarmacológicos, as cascas do caule de *Q. parviflora* são relatadas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e infecções respiratórias (Matteuci *et al.*, 1995).

Qualea paraensis tem sido utilizada pela população indígena da Bolívia – denominado Chabocos – no tratamento de escabiose, através de banho com o macerado das cascas do caule (Munoz *et al.*, 2000).

As espécies *Vochysia pacifica* e *V. divergens* são utilizadas em infecções microbianas e no tratamento de congestão pulmonar, dor gástrica e em feridas (Hess *et al.*, 1995; Weniger *et al.*, 2005; Schultes *et al.*, 1990).

As frutas de *Erisma calcaratum* têm sido utilizadas no tratamento de distúrbios de pele, como dermatoses, no combate à febre e contra a malária (Botsaris *et al.*, 2007).

Estudos farmacológicos foram realizados para validar as informações etnofarmacológicas e buscar novas moléculas com potencial terapêutico.

A avaliação em ratos concluiu que *Q. grandiflora* possui potente ação antiúlcera baseado na estimulação à síntese de muco pela mucosa gástrica, possivelmente devido à ação de compostos derivados isoprenóides e taninos (Hiruma-Lima *et al.*, 2006). O extrato metanólico das cascas do caule de *Qualea grandiflora* também foi estudado (Alves *et al.*, 2000) e demonstrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à penicilina. Já o extrato etanólico apresentou atividade moderada para as cepas de *Staphylococcus epidermidis*, com concentração mínima inibitória (*minimal inhibitory concentration*, MIC) de 500 µg/mL, fraca atividade sobre as demais bactérias Gram-positivas testadas e inativa frente a bactérias Gram-negativas (Ayres *et al.*, 2008).

Adicionalmente, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Qualea grandiflora* Mart. indicou ação depressora sobre o sistema nervoso central, efeito analgésico e potencial anticonvulsivante cujo mecanismo envolvido, bem como os compostos ativos, permanecem desconhecidos (Gaspi *et al.*, 2006).

De Souza e colaboradores (1984) observaram que *Qualea multiflora* apresenta atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, importante vetor de *Schistosoma mansoni* no Brasil, sendo letais para moluscos adultos em concentrações de 10 ppm. *Qualea paraensis* mostrou atividade antimalárica em ensaio em camundongos infectados com *Plasmodium vinckei*, sendo, contudo, inativa *in vitro* (Munoz *et al.*, 2000). Em ensaio semelhante, *Q. grandiflora* não apresentou atividade inibitória (Brandão *et al.*, 1985).

2.OBJETIVOS

Este trabalho encontra-se inserido no projeto temático “Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e busca de drogas potenciais”, projeto financiado pela FAPESP (processo número 2003/02176-7) sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani, no grupo de pesquisas Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) e teve como objetivos:

- Extração das folhas e ramos de *Qualea grandiflora* e *Q. cordata* por maceração e fracionamento dos extratos brutos por extração líquido-líquido com os solventes de polaridade crescente hexano, AcOEt e *n*-butanol.
- Avaliação da bioatividade dos extratos brutos e frações através de bioensaios *in vitro*.
- Obtenção do perfil cromatográfico dos extratos brutos e frações de *Qualea grandiflora* e *Q. cordata* a partir do uso de HPLC-UV/DAD.
- Elaboração de metodologia de desreplicação e análise dos extratos bioativos através da técnica HPLC-DAD-HRMS(ESI) e desenho virtual de metabólitos por RMN para a detecção dos compostos majoritários.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta dos espécimes

Qualea grandiflora e *Q. cordata* foram coletadas em Assis – SP e identificadas pela botânica Prof^a. Giselda Durigan, para obtenção de extratos para o estudo químico. Exsicatas com o nome GD-2033 e GD-2125, respectivamente, foram depositadas no herbário do Instituto de Botânica da cidade de São Paulo.

3.2. Obtenção dos Extratos

Ramos e folhas foram secos à temperatura ambiente, triturados e posteriormente submetidos à extração por processo de maceração com EtOH: H₂O (8:2), a temperatura ambiente, segundo o protocolo estabelecido no NuBBE. Os extratos brutos foram dissolvidos em MeOH:H₂O (8:2) e submetidos a processo de extração líquido-líquido com Hexano, AcOEt e *n*-butanol.

3.3. Avaliação de atividade biológica

3.3.1. Ensaio de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase - ensaio qualitativo por bioautografia (Cromatografia de Camada Delgada, CCD)

Este teste baseia-se na clivagem do 1-acetato de naftila pela enzima acetilcolinesterase, para formar o 1-naftol, o qual reage com o sal Fast Blue B, gerando um composto diazônio de coloração púrpura, em um mecanismo de reação semelhante à clivagem fisiológica da acetilcolina nas fendas sinápticas - Figura 4 (Marston *et al.*, 2002).

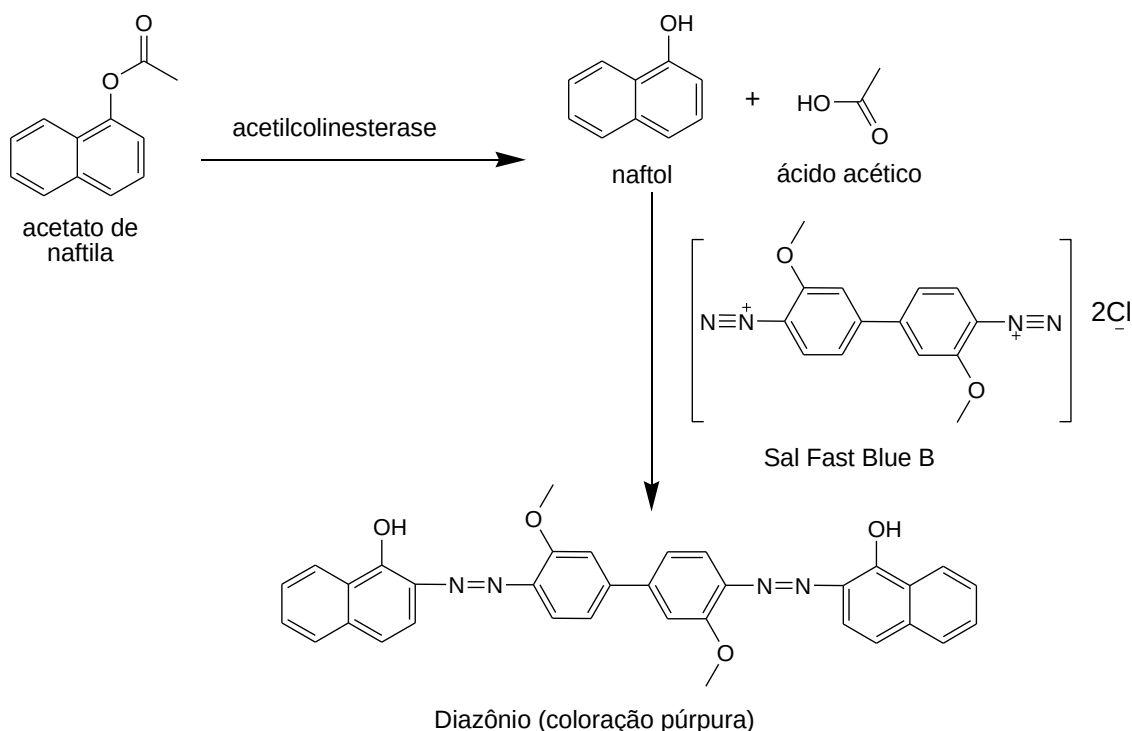


Figura 4. Reação da acetilcolinesterase com o acetato de naftila e a subsequente formação da coloração púrpura no ensaio de CCD.

Os extratos de *Qualea grandiflora* e *Q. cordata* foram dissolvidos em metanol (20 mg/mL). 200 mg (10 mL) de cada amostra foi analisada em CCD de sílica gel 60 F254 (0,2 mm, MERCK). Como controle positivo foi utilizado galantamina (1 mg) dissolvida em metanol.

As placas cromatográficas foram eluídas com a fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:18:2). Após o desenvolvimento da cromatografia, as placas foram observadas em 254 nm e 366 nm, e fotografadas em câmera fotográfica Epson.

Em seguida foi aplicada na placa uma solução salina da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%) e o solvente foi evaporado novamente. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos e, em seguida, aplicou-se uma mistura das soluções: etanólica de 1-naftil acetato (5 mL; 0,25%) e aquosa do sal Fast Blue B (20 mL; 0,25%). (Marston *et al.*, 2002). A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os resultados foram fotografados e os valores de R_f onde houve inibição da reação foram determinados.

3.3.2. Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

O estudo citotóxico foi realizado segundo análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas - Figura 5 (Mosmann *et al.*, 1983).

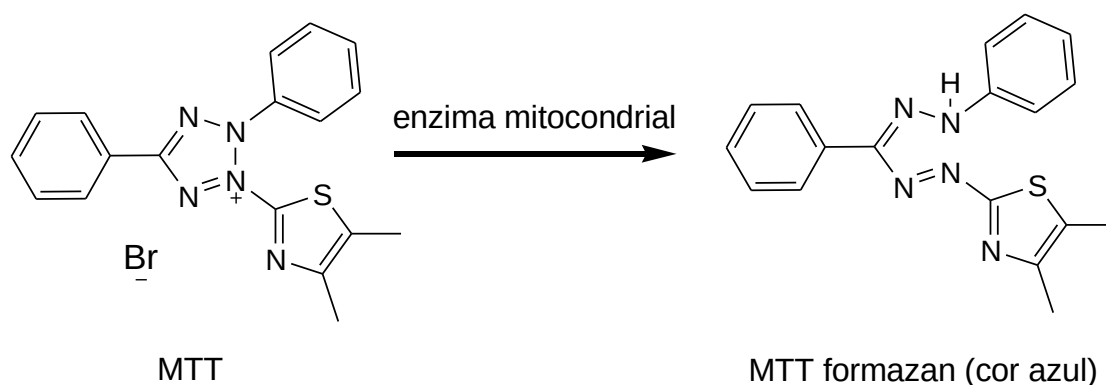


Figura 5. Reação de redução do reagente MTT em azul de formazan.

O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge *et al.*, 1996).

As linhagens celulares MDA/MB-435 (câncer de mama) e SF-295 (câncer do sistema nervoso central, glioblastoma) foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cel/mL enquanto que a linhagem HCT-8 (câncer de cólon) à concentração de $0,3 \times 10^6$ cel/mL em microplacas de 96 cavidades. Após 24 horas, as amostras, dissolvidas em DMSO estéril na concentração de 50µg/mL foram adicionadas. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C. Em seguida as culturas celulares foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Foi adicionado às placas 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), que foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Doxorubicina (0.01–0.58 µg/ml) foi utilizada como controle positivo

Os experimentos foram analisados segundo a média $\pm$ desvio padrão (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

3.3.3. Avaliação da atividade antifúngica

As cepas dos microrganismos utilizados na avaliação antifúngica foram *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012, crescidos e mantidos em meio de ágar Sabouraud-dextrose por 24 h para as espécies de *Candida* e por 48 h para *Cryptococcus neoformans*, em temperatura ambiente. O método usado para avaliação da atividade foi a microdiluição em caldo, descrito no documento M27-A2 (2002) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com adaptações para extratos vegetais (Scorzoni *et al.*, 2007). O meio de cultura usado foi RPMI 1640 com L-glutamina em tampão pH 7,0 - com ácido morfolinopropano-sulfônico (MOPS) 0,165 M-, suplementado com glicose 2%. Os extratos e frações foram dissolvidos em DMSO nas concentrações de 0,4 a 250 µg/mL e adicionados às microplacas de 96 cavidades contendo meio RPMI. As suspensões celulares contendo os fungos foram preparadas em solução salina 0,85% e diluídas 1:100 em RPMI até concentração final de 1×10^4 a 5×10^4 unidades formadoras de colônias por mL (CFU/mL). Cada suspensão foi inoculada nas microplacas previamente preparadas com as amostras-teste, que foram incubadas com agitação a 37 °C por 24 h para *Candida sp.* e 48 h para *Cryptococcus neoformans*. Anfotericina B (0,03 a 16 µg/mL) foi usada como controle positivo. A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração de amostra que inibiu completamente o crescimento do fungo. Pelo método espectrofotométrico, a MIC foi definida como a menor concentração em que a densidade óptica foi reduzida a 90% daquela observada para a solução controle (sem amostra). Os resultados foram analisados visual e espectrofotometricamente. Amostras que apresentaram MIC menor que 75,0 µg/mL foram consideradas com boa atividade; MIC entre 75,0 e 150,0 µg/mL indicou atividade moderada; MIC entre 150,0 e 250,0 µg/mL indicou atividade fraca e, para MIC maior que 250,0 µg/mL a amostra foi considerada inativa (Scorzoni *et al.*, 2007).

3.3.4. Ensaio *in vitro* de redução do DPPH

Este ensaio baseia-se na transferência de elétrons do composto antioxidante para o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) – Figura 6.

O DPPH radical apresenta coloração lilás, porém, quando este se reduz, muda sua cor para amarelo. Deste modo é possível determinar quantitativamente a capacidade antioxidante de uma amostra através de um detector UV.

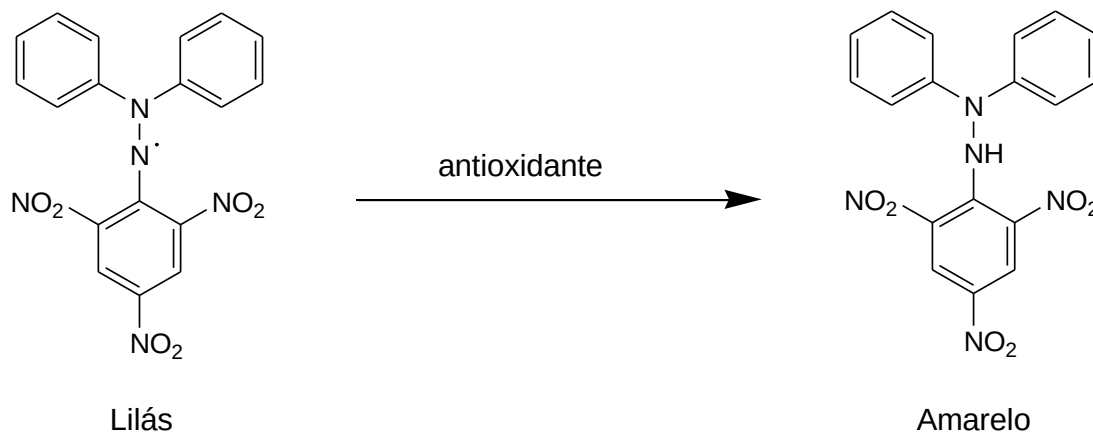


Figura 6. Ilustração do seqüestro do radical DPPH e a mudança em sua absortividade a λ 517 nm.

Cerca de 200 μ L de uma solução 101,4 μ M de DPPH foram adicionados as amostras diluídas em MeOH (grau HPLC), nas concentrações de 0,2, 0,1, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008 e 0,005 mg/mL e distribuídas em poços de microplacas de 96 cavidades. As amostras foram preparadas em triplicata, tendo como controle positivo uma solução de rutina (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 100,0; 80,0; 60,0, 40,0; 20,0; 10,0 e 5,0 μ M. Para o controle negativo foi utilizado um volume de 200 μ L de DPPH e 100 μ L de MeOH. Decorridos 30 minutos sob abrigo da luz, tomou-se a medida das absorbâncias (A) dos poços a 517 nm, em leitor de placas acoplado ao computador. Os cálculos de percentual de radical livre foram efetuados a partir da seguinte equação:

$$\% = \frac{(A_{\text{controle -DPPH}} - A_{\text{amostra}}) \times 100}{A_{\text{controle -DPPH}}}$$

Os dados obtidos foram então inseridos em um gráfico relacionando a porcentagem de redução e a concentração, e os valores de concentração inibitória de 50% (*half maximal inhibitory concentration* - IC₅₀) foram determinados.

3.3.5. Ensaio *in vitro* da inibição de polimerização de β -hematina bovina

Os ensaios da polimerização da β -hematina bovina foram realizados e aperfeiçoados no NuBBE baseando-se na metodologia de Ignatushchenko *et al.* 1997.

Este ensaio mimetiza uma condição patológica envolvendo o ciclo sanguíneo da infecção, na qual o protozoário *Plasmodium* produz polímeros de heme (denominado pigmento malárico) durante a digestão da hemoglobina, devido a sua toxicidade. Ao concluir seu ciclo de desenvolvimento no interior das hemácias, o parasito rompe-as liberando o pigmento responsável pelos fatores clínicos característicos da infecção.

Para a realização das análises foram utilizados os extratos brutos e frações das folhas e ramos. O reagente β -hematina foi preparado pesando-se 14,6 mg e dissolvendo em 3,5 mL de NaOH (0,2 N) gerando a solução final na concentração de 6,4 mM.

As amostras foram dissovidas em DMSO na concentração de 2,7 mg/mL. Em seguida, uma alíquota de 50 μ L das amostras foi adicionada a 100 μ L da solução de hematina, 200 μ L de tampão acetato de sódio (0,5M) e 50 μ L de ácido acético glacial (17,4M), em triplicata.

Para o controle negativo utilizou-se 50 μ L de solvente (DMSO). O controle positivo utilizado foi a cloroquina na concentração de 10 mM (3,2 mg/mL).

As alíquotas contendo as amostras foram agitadas para homogeneização e deixadas em estufa a 37 °C por 24 horas. O pH das soluções deve ser igual a 3,8. Após 24 horas:

- Descartou-se o sobrenadante;
- Lavou-se o precipitado com 400 μ L de DMSO deixando-o em centrífuga por dez minutos;
- Lavou-se com 400 μ L de metanol passando novamente em centrífuga por dez minutos;
- Dissolveu-se o precipitado em 1000 μ L de NaOH (0,2 N);
- Aplicaram-se as soluções finais em microplaca de diluição e levou-se ao leitor de microplacas em comprimento de onda de 405 nm.

3.3.6. Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida

Todos os experimentos foram realizados utilizando a cepa Y das formas epimastigotas de *T.cruzi*. Os parasitos foram cultivados em meio LIT (*Liver-Infusion Tryptose*) a 28°C, e os testes realizados durante a fase log de crescimento (cultura de sete dias).

Os extratos de *Q. grandiflora* e *Q. cordata* foram dissolvidos em DMSO e adicionados às microplacas de 96 cavidades contendo meio LIT com as formas epimastigotas do *T.cruzi* (fase log) em amostras de diferentes concentrações (25 a 500 µg/mL). As placas foram incubadas em câmara úmida a 28 °C por 72 horas.

A seguir, adicionou-se 10 µL de solução 2,5 mg/mL de reagente MTT em todas as cavidades e a placa foi novamente incubada, ao abrigo da luz por 75 minutos a 28 °C. A análise colorimétrica determinou a conversão do reagente MTT em azul de formazan pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (Dutta *et al.*, 2005).

Adicionou-se 100 µL da solução 10% sulfato dodecil de sódio (SDS-0,01 N HCl) para dissolver os cristais de *formazan*, incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. O controle positivo utilizado foi benznidazol. A IC₅₀ foi determinada por análise de regressão linear após 72 horas de incubação. Para as análises estatísticas empregou-se o método de probit (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

3.4. Desreplicação e detecção do metabólitos majoritários *in silico*

3.4.1. Preparação das amostras

As amostras analisadas nos métodos cromatográficos passaram por processo de remoção de interferentes apolares através de *clean-up* por extração de fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de C₁₈ Strata de 55 µm, 5 g/20 mL, 70 Å (Phenomenex, Torrance, CA), previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de H₂O.

20,0 mg de cada amostra foram dissolvidos em 1,0 mL da mistura MeOH/H₂O (8:2, v/v). Esta solução foi aplicada ao cartucho de SPE e eluída com 5 mL de MeOH/H₂O (8:2, v/v) e posteriormente secas em ar comprimido. Após a secagem, as amostras foram dissolvidas em MeOH e filtradas em microfiltro de polipropileno de 0,45 µm de poro.

3.4.2. HPLC-DAD

As análises foram realizadas em cromatógrafo analítico ternário Shimadzu (Kyoto, Japan) modelo LC-10 AD com detector UV-Diodes Array Shimadzu SPD-M10 A VP e auto-injetor Shimadzu modelo SIL-10.

O método para as análises cromatográficas utilizou coluna monolítica Onyx® C18, (100 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA); pré-coluna: Onyx® C18, (5 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA). Fase móvel: A (0,1% de ácido acético, em H₂O) e B (0,1% de ácido acético, em metanol) partindo de gradiente exploratório 5-95% MeOH:H₂O a 95-5% MeOH:H₂O durante 30 minutos. As amostras foram preparadas na concentração de 15,0 mg mL⁻¹. Foi utilizado uma vazão de 3,00 mL/min; temperatura, 30 °C; e volume de injeção de 20 µL.

3.4.3. HPLC-DAD-HRMS (ESI)

Os experimentos de espectrometria de massas de alta resolução foram realizados apenas no modo positivo em Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics ultraTOFQ-ESI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA).

As condições instrumentais utilizadas foram: sonda *eletrospray* de 3kV e cone de 25V; Gás N₂ utilizado para nebulização em fluxo de 345 L h⁻¹ e 27 L h⁻¹, respectivamente. As amostras foram preparadas na concentração de 15,0 mg mL⁻¹. Foi utilizado uma vazão de 3,00 mL/min e um split da fase móvel eluente do sistema HPLC na razão 1:3 para injeção no espectrômetro a 150 µL min⁻¹. A temperatura do sistema permaneceu em 180 °C. A célula de colisão foi preenchida com N₂ em pressão de 7 psi e a energia de colisão foi fixada entre 15 e 25 eV no caso dos experimentos *tandem*. Para a calibração interna dos experimentos foi utilizado uma solução de Na-TFA (10 mg mL⁻¹). Para a caracterização dos compostos detectados por HPLC-HRMS, foram selecionados os fragmentos provenientes de bandas cromatográficas bem resolvidas. Em seguida, uma avaliação comparativa de cada espectro obtido foi realizada utilizando a base de dados da DNP (www.dnp.chemnetbase.com).

3.4.4. RMN

Os experimentos de RMN ^1H foram realizados em espectrômetro Bruker AVANCE, Ultra Shield-Plus de 14.1 T, fazendo uso de uma sonda criogênica de 5 mm. Os deslocamentos químicos foram descritos em ppm. Tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno.

Para a detecção das moléculas propostas por HPLC-HRMS, fez-se a simulação dos espectros de ^1H RMN para cada molécula detectada nas frações de *Q. grandiflora* e *Q. cordata*. Em seguida, os espectros foram somados para gerar o desenho virtual de ^1H RMN em mistura e então comparados ao espectro de ^1H RMN das frações em estudo.

A análise *in silico* (simulação e comparação) utilizou o software MestReNova ver. 6.0.2-5475 (Mestrelab research S.L, Santiago da Compostela, ESP). A margem de erro para os deslocamentos químicos gerados pelo algoritmo de predição é inferior a 5%.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Obtenção dos extratos

Vários relatos da literatura mostram que, para a grande maioria das plantas, a extração a temperatura ambiente com etanol/água (1:1 ou 8:2) por maceração prolongada, possibilita uma extração bastante exaustiva, capaz de extrair distintas categorias de princípios ativos sem perdas (Calixto & Yunes, 2001).

Uma vez obtido o extrato bruto, os métodos de extração entre solventes possibilitam um pré-fracionamento das substâncias presentes. Quando se utiliza esse método combinado com testes biológicos obtêm-se, rapidamente, resultados mais significativos devido à maior concentração e separação entre componentes (Hostettman *et al.*, 2003).

Qualea grandiflora e *Q. cordata* foram separados em folhas e ramos. Após pulverização do material em moinho de facas obteve-se 830 g dos ramos e 95 g das folhas de *Q. grandiflora* e 395 g dos ramos e 52 g das folhas de *Q. cordata*. Este material foi submetido à extração por maceração em EtOH:H₂O (8:2). Parte dos extratos brutos obtidos foram dissolvidos em 200 mL de metanol/água (8:2) e submetidos a fracionamento com solventes de polaridade crescente hexano, AcOEt e *n*-butanol (3 x 200 mL), em funil de separação, os quais originaram, respectivamente, as frações FH, FAc e FB. A fração aquosa restante após as extrações com os solventes foi denominada fração final (FF) (Tabela 2 a 5). A seguir o fluxograma do processo extrativo e do fracionamento (figura 7).

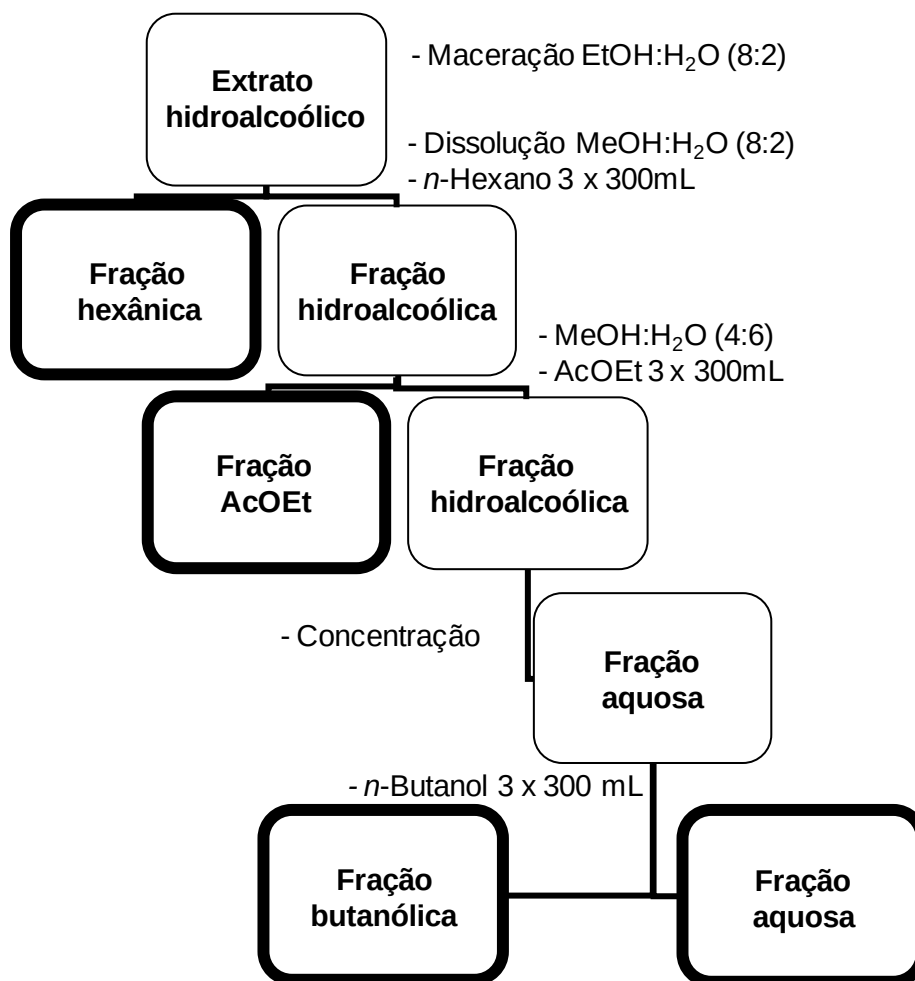


Figura 7. Fluxograma do processo extrativo e do fracionamento.

Tabela 2. Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 5,25g de extrato bruto das folhas de *Q.grandiflora*

FRAÇÃO	MASSA (g)	%
FH	1,34	25,5
FAc	2,33	44,3
FB	-	-**
FF	1,22	23,2
total	4,89	93,0

Tabela 3. Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 5,00g de extrato bruto dos ramos de *Q.grandiflora*.

FRAÇÃO	MASSA (g)	%
FH	1,37	27,4
FAc	2,49	49,8
FB	-	—**
FF	0,90	18,0
total	4,76	95,2

Tabela 4. Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 2,80g de extrato bruto das folhas de *Q.cordata*..

FRAÇÃO	MASSA (g)	%
FH	0,54	19,3
FAc	0,27	9,6
FB	1,10	39,3
FF	0,27	9,6
total	2,18	77,8

Tabela 5. Massas e rendimento das frações obtidas a partir de 11,00g de extrato bruto dos ramos de *Q.cordata*.

FRAÇÃO	MASSA (g)	%
FH	0,54	4,9
FAc	3,98	36,2
FB	3,47	31,5
FF	2,98	26,3
Total	10,89	98,9

** A fração *n*-butanol não foi realizada devido a baixa quantidade de extrato solúvel neste solvente, observada durante a extração.

4.1. Avaliação de atividade biológica

4.1.1. Ensaio de atividade Anticolinesterásica - ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada CCD)

Segundo os resultados obtidos e mostrados na figura 8 as amostras 1, 3, 4, 6, 7 e 8 apresentaram capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE), contudo apenas as amostras 4 e 6 tiveram compostos ativos no ensaio eluídos no método cromatográfico utilizado apresentando R_f 0,72cm para a amostra 4 e 0,59cm/0,64cm/0,70cm para a amostra 6. Uma vez que a fase móvel utilizada foi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:02v/v) a atividade pode estar vinculada a compostos apolares como triterpenos (já relatados nas espécies estudadas). Já os compostos não eluídos na fase móvel escolhida podem estar relacionados aos flavonóides (detectados nas duas espécies de *Qualea*).

Segundo a literatura, poucos flavonóides apresentam capacidade inibitória da enzima AChE. Contudo, a flavanona naringenina isolada de *Citrus junos* (Rutaceae) apresentou resposta dose-dependente na inibição de AChE *in vitro* bem como provocou amnésia em ratos, o que pode ser relacionado com ação anti-AChE. De maneira semelhante, outra flavanona, hispidona, isolada de *Onosma hispida* (Boraginaceae) apresentou ação moderadamente inibitória (IC_{50} 11,6 μM) (Houghton *et al.*, 2006).

Adicionalmente, estudos de *molecular docking* (simulação computacional de interação molécula-receptor) permitiram determinar a capacidade de interação entre flavanóides (agliconas) e o sítio alostérico da AChE. Os resultados sugerem compatibilidade de interação devido principalmente a ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos da enzima e hidroxilas presentes no anel A do flavonóide (Houghton *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2009).

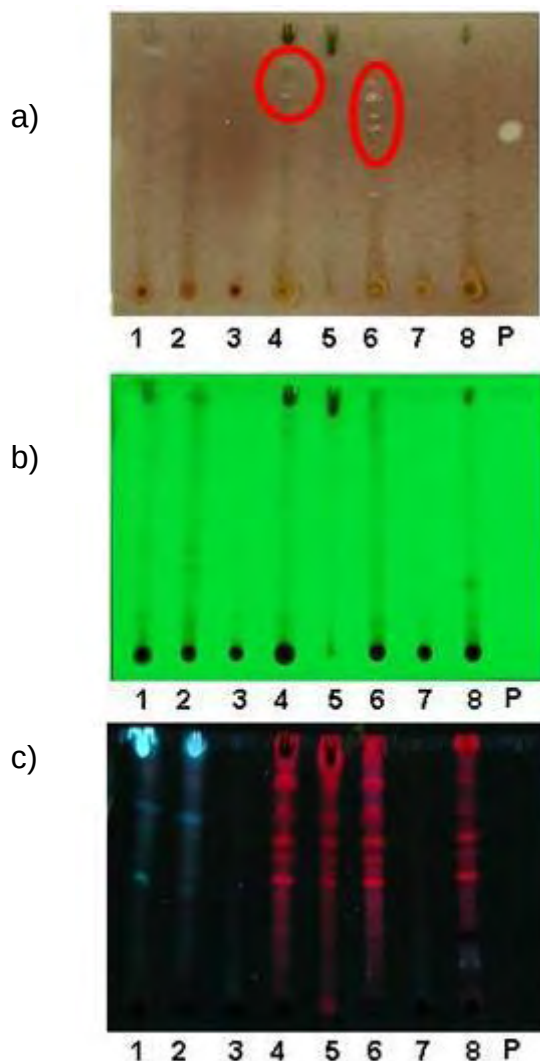


Figura 8. CCD dos extratos de *Q. grandiflora* (1-7) e *Q. cordata* (8) para avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase a) no visível. CCD b) a λ 254 nm e c) λ 366nm indicando a eluição das amostras no método cromatográfico utilizado. Fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:18:02v/v); (1) Extrato bruto dos ramos de *Q. grandiflora*; (2) Fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*; (3) Fração aquosa final dos ramos de *Q. grandiflora*; (4) Extrato bruto das folhas de *Q. grandiflora*; (5) Fração hexânica das folhas de *Q. grandiflora*; (6) Fração AcOEt das folhas de *Q. grandiflora*; (7) Fração aquosa final das folhas de *Q. grandiflora*, (8) Extrato bruto das folhas de *Q. cordata*; (P) padrão galantamina.

4.1.2. Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

O percentual de inibição de crescimento celular de todas as amostras está descrito na Tabela 6. Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 6. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em 3 linhagens tumorais testadas na concentração de 50µg/mL.

Amostra	MDAMB-435 (média IC%)	DP	SF 295 (média IC%)	DP	HCT 8 (média IC%)	DP
EB ramos Qg	14,4	±1,0	38,0	±1,2	47,4	±1,6
FAC ramos Qg	1,6	±0,3	43,3	±1,6	46,7	±3,2
FF ramos Qg	0	0	0	0	14,1	±0,5
EB folhas Qg	0	0	0	0	20,1	±1,7
FH folhas Qg	0	0	0	0	14,1	±0,8
FAC folhas Qg	37,1	±1,4	0	0	20,5	±3,5
FF folhas Qg	14,4	±1,0	38,4	±2,0	42,6	±2,2
EB folhas Qc	26,8	±1,7	47,0	±1,5	65,1	±1,8
DOX	100,0	±0,7	83,6	±2,9	96,8	±4,6

(Qg) *Qualea grandiflora*; (Qc) *Qualea cordata*

Segundo os resultados, pode-se concluir que os extratos de *Qualea grandiflora* e *Q. cordata* não apresentaram potencial citotóxico *in vitro* na concentração testada para as linhagens tumorais utilizadas.

4.1.3. Avaliação da atividade antifúngica

Os dados de inibição do crescimento dos fungos estão apresentados na tabela 7. Os resultados obtidos mostram pouca atividade para os extratos de *Qualea cordata* frente aos fungos testados, enquanto que o extrato bruto e frações AcOEt e aquoso final dos ramos de *Qualea grandiflora* apresentaram intensa atividade antifúngica para a cepa de *Candida krusei*, reconhecidamente multirresistente (Boff *et al.*, 2008).

Tabela 7. Concentração mínima inibitória da avaliação antifúngica dos extratos de *Qualea grandiflora* e *Q.cordata*.

	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Amostra	Concentração Mínima Inibitória (µg/mL)			
EB ramos Qg	250,0	62,5	250,0	>250,0
FAc ramos Qg	250,0	31,2	>250,0	250,0
FF ramos Qg	>250,0	15,6	250,0	>250,0
EB folhas Qg	>250,0	>250,0	>250,0	>250,0
FH folhas Qg	>250,0	250,0	>250,0	250,0
FAc folhas Qg	>250,0	125,0	>250,0	250,0
FF folhas Qg	>250,0	125,0	250,0	>250,0
EB folhas Qc	>250,0	250,0	250,0	>250,0
anfotericina B	0,1	1,4	1,2	1,0

4.1.4. Ensaio *in vitro* de redução do DPPH

A determinação da atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas e ramos de *Qualea* foi avaliada através do teste de redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), o qual se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante.

Os resultados obtidos e inseridos nos gráficos comparativos indicaram forte atividade antioxidante para as frações AcOEt dos ramos de *Q.grandiflora* (IC₅₀: 7,8 µg/mL) e para as frações AcOEt (IC₅₀: 5,1 µg/mL) e *n*-butanólica das folhas de *Q.cordata* (IC₅₀: 3,9 µg/mL) quando comparados ao padrão rutina (IC₅₀ 5,0 µg/mL).

A atividade antioxidante *in vitro* demonstrada pelos extratos de *Q. grandiflora* e *Q. cordata* (Figura 9) pode ser justificada pela presença de diversos compostos fenólicos, como derivados de ácido elágico (descritos na literatura) e flavonóides (previamente isolados e detectados neste estudo), possivelmente atuando de maneira sinérgica na redução do DPPH.

Estes resultados abrem caminho para a possível validação do uso popular destas espécies vegetais como agentes quimioprotetores ou mesmo anti-inflamatórios. Contudo, outros estudos são necessários para a verificar a eficácia terapêutica destas espécies, como a realização de estudos farmacológicos mais aprofundados e a determinação do perfil cromatográfico de bioatividade.

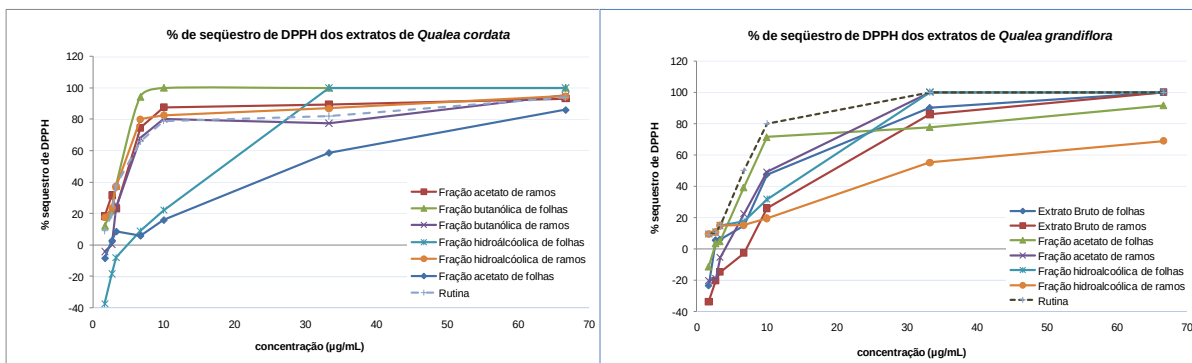


Figura 9. Gráfico de % de sequestro de DPPH para extratos de *Qualea grandiflora* e *Q.cordata*.

4.1.5. Ensaio *in vitro* da polimerização de β -hematina bovina

O ensaio baseia-se na busca por compostos capazes de inibir a polimerização do heme (ferroporfirina IX – de estrutura similar a β -hematina e tóxica ao parasito) e a consequente produção do pigmento malárico, hemozoína, responsável pelo quadro clínico da malária.

Na tabela 8 e 9 é possível observar que a fração AcOEt dos ramos de *Q.grandiflora* apresenta maior atividade com 86,3% de inibição.

Tabela 8. Porcentagem de inibição de polimerização de hematina pelas frações de *Qualea grandiflora*.

Amostra	% de inibição de polimerização
Cloroquina	91,0 ±2,0
FAC ramos	86,3 ±4,0
FH ramos	46,9 ±3,0
FH folhas	36,1 ±4,0
FAC folhas	27,6 ±5,0
FF folhas	Inativo a 2,75 mg/mL
FF ramos	Inativo a 2,75 mg/mL

Tabela 9. Porcentagem de inibição de polimerização de hematina pelas frações de *Qualea cordata*.

Amostra	% de inibição de polimerização
Cloroquina	99,1 ±1,0
FAC ramos	Inativo a 2,75 mg/mL
FH ramos	Inativo a 2,75 mg/mL
FH folhas	35,0 ±8,0
FAC folhas	Inativo a 2,75 mg/mL
FF folhas	Inativo a 2,75 mg/mL
FF ramos	Inativo a 2,75 mg/mL

4.1.6. Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida

Os valores de IC₅₀ são mostrados na tabela 10 e indicam atividade tripanocida para a fração AcOEt das folhas de *Qualea grandiflora*.

Este resultado pode ser justificado pela presença de compostos fenólicos altamente conjugados corroborado pela desreplicação das frações, uma vez que um dos mecanismos de ação tripanocida propostos exige a presença de grupamento carbonila

α,β insaturado capaz de sofrer adição nucleofílica 1,4 com os resíduos de aminoácidos presentes no receptor biológico (Bialy *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2003).

Tabela 10. Resultados do ensaio *in vitro* de atividade contra epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* dos extratos de *Q.grandiflora* e *Q.cordata*.

Concentração testada ($\mu\text{g/mL}$)	% de parasitas mortos							
	EB	Fac	FF	EB	FH	FAC	EB	Padrão
	ramos Qg	ramos Qg	ramos Qg	folhas Qg	folhas Qg	folhas Qg	folhas Qc	
500	90,0	92,0	21,0	18,0	88,0	100,0	0	100,0
400	85,0	90,0	12,5	13,0	87,0	100,0	0	100,0
300	62,0	84,0	7,5	10,5	68,0	100,0	0	100,0
200	36,0	76,0	0	8,5	27,0	100,0	0	100,0
100	25,0	46,0	0	0	4,0	84,0	0	100,0
50	0	6,0	0	0	0,0	54,0	0	100,0
25	0	0	0	0	0,0	27,0	0	98,0
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	244,0	134,0	>500,0	>500,0	265,0	51,0	ND	12,0

4.2. Desreplicação e detecção do metabólitos majoritários *in silico*

4.2.1. HPLC-UV/DAD

Os perfis cromatográficos dos extratos brutos e frações de extração líquido-líquido das folhas e ramos de *Qualea grandiflora* e *Q.cordata* foram analisados utilizando a técnica HPLC-DAD em gradiente exploratório e estão demonstrados a seguir (figuras 10 a 13),

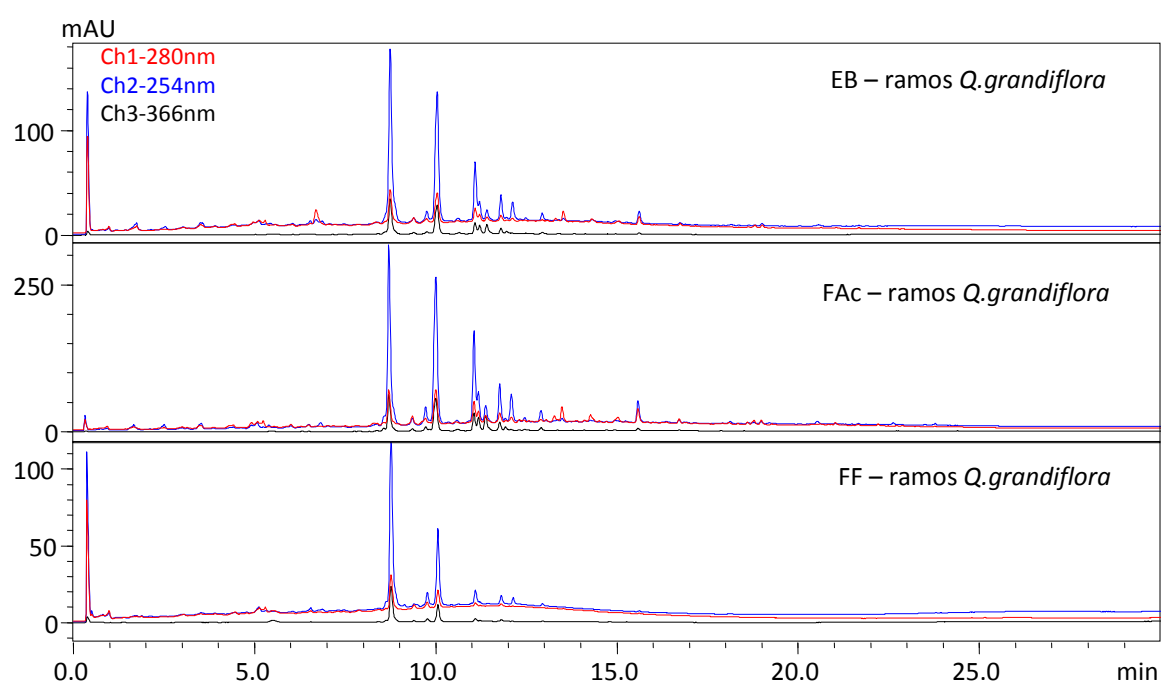


Figura 10. Perfis cromatográficos a λ 254nm do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAc) e fração aquosa final (FF) dos ramos de *Qualea grandiflora*, utilizando HPLC-UV/DAD.

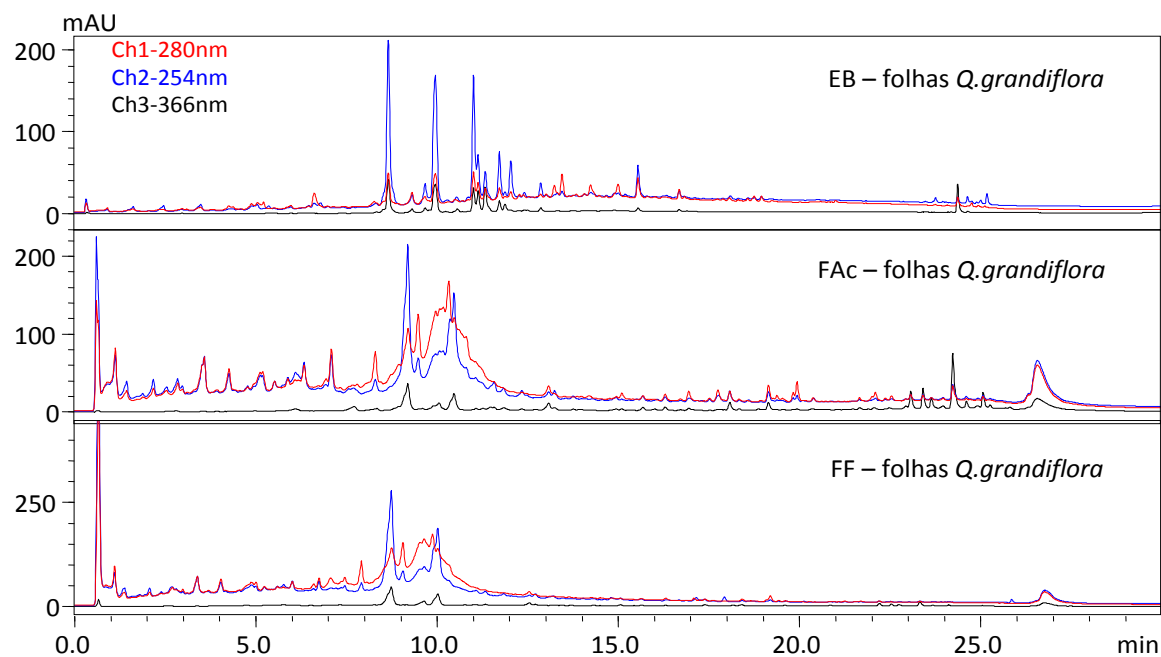


Figura 11. Perfis cromatográficos a λ 254nm do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAc) e fração aquosa final (FF) das folhas de *Qualea grandiflora*, utilizando HPLC-UV/DAD.

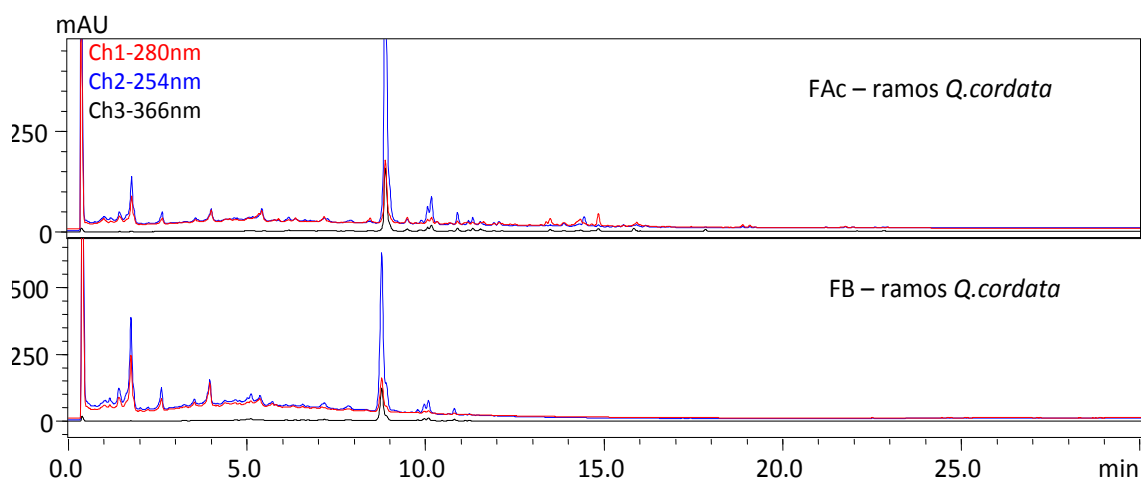


Figura 12. Perfis cromatográficos a λ 254nm da fração acetato de etila (FAc) e dos ramos de *Qualea cordata*, utilizando HPLC-UV/DAD.

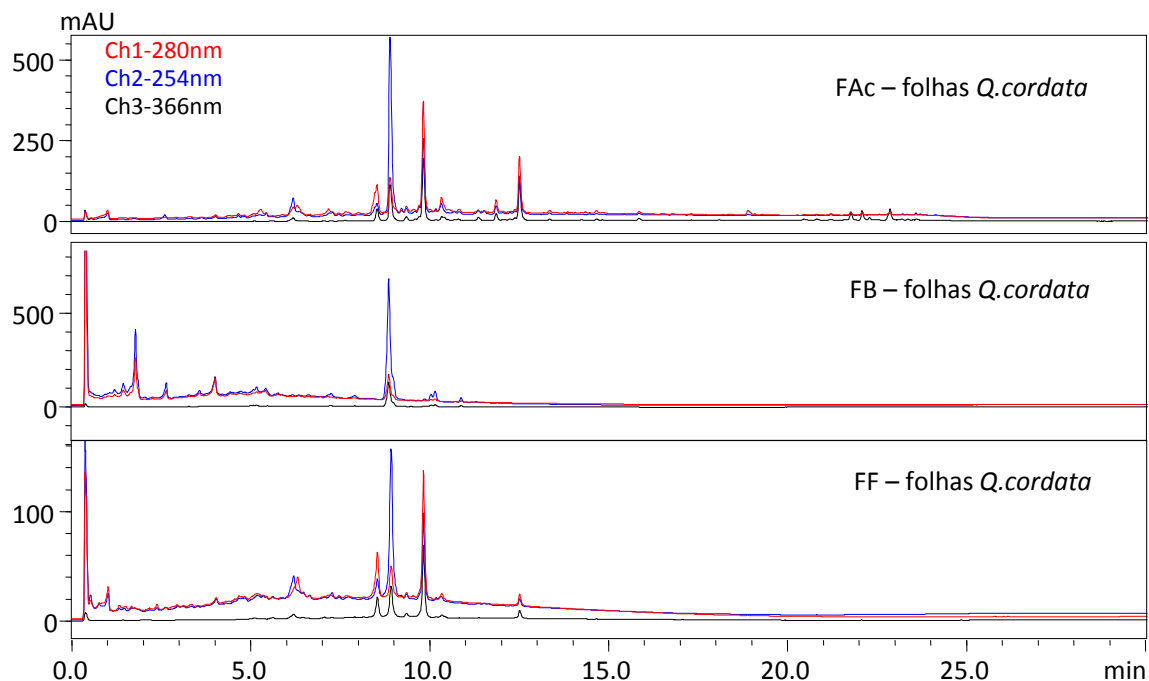


Figura 13. Perfis cromatográficos a λ 254nm da fração acetato de etila (FAc), fração butanólica (FB) e fração aquosa final (FF) das folhas de *Qualea cordata*, utilizando HPLC-UV/DAD.

A análise da constituição fitoquímica dos extratos evidenciou uma série de bandas cromatográficas distribuídas ao longo do tempo, indicando uma rica complexidade molecular.

Para facilitar a análise *in silico*, foi proposto o fracionamento dos extratos brutos a partir do método de extração líquido-líquido (ELL) com o uso de solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e *n*-butanol).

Os resultados demonstraram que a separação dos constituintes não foi significativa uma vez que as substâncias distribuíram-se por todas as fases. Contudo, como os perfis cromatográficos das frações foram analisados através de um método de detecção limitado à presença de grupos cromóforos (UV) e devido aos diferentes resultados obtidos nos bioensaios *in vitro*, o processo de ELL não pode ser considerado ineficiente. Para uma melhor avaliação da eficiência deste processo, deve-se utilizar um método de detecção universal, como o *light scattering* (ELSD) ou o índice de refração (IR), capazes de fornecer um perfil cromatográfico mais completo, que permitam visualizar todos os componentes das amostras, não se limitando apenas à moléculas com grupos cromóforos.

A partir da complexidade apresentada no perfil cromatográfico e pelos seus resultados promissores nos bioensaios, as frações AcOEt dos ramos de *Qualea*

grandiflora e das folhas de *Q. cordata* foram selecionadas para análise *in silico* por HPLC-HRMS(ESI).

Os espectros de absorbância no UV dos compostos majoritários detectados através de HPLC-UV/DAD para estas frações (figuras 14 e 15) sugerem a presença de derivados do ácido elágico (com máximos de absorção em λ 254 nm e λ 366 nm) e de flavanonas (com máximos de absorção próximos a λ 270 nm e λ 330 nm para a naringenina), quimiotipos já relatados em *Qualea*.

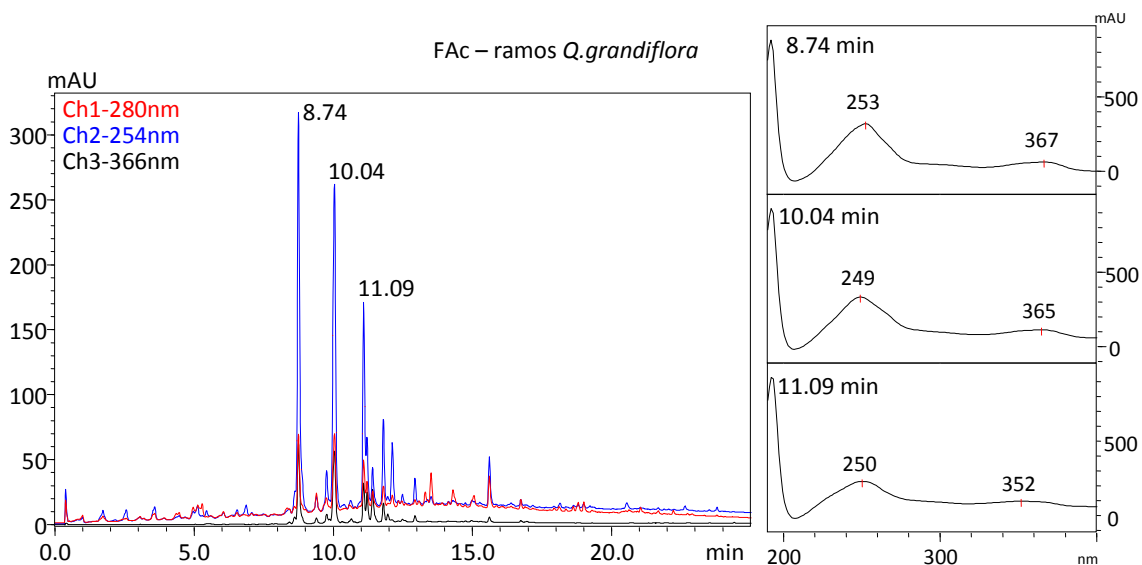


Figura 14. Cromatograma e espectros de UV das bandas majoritárias da fração acetato de etila (FAC), dos ramos de *Qualea grandiflora*, utilizando HPLC-UV/DAD.

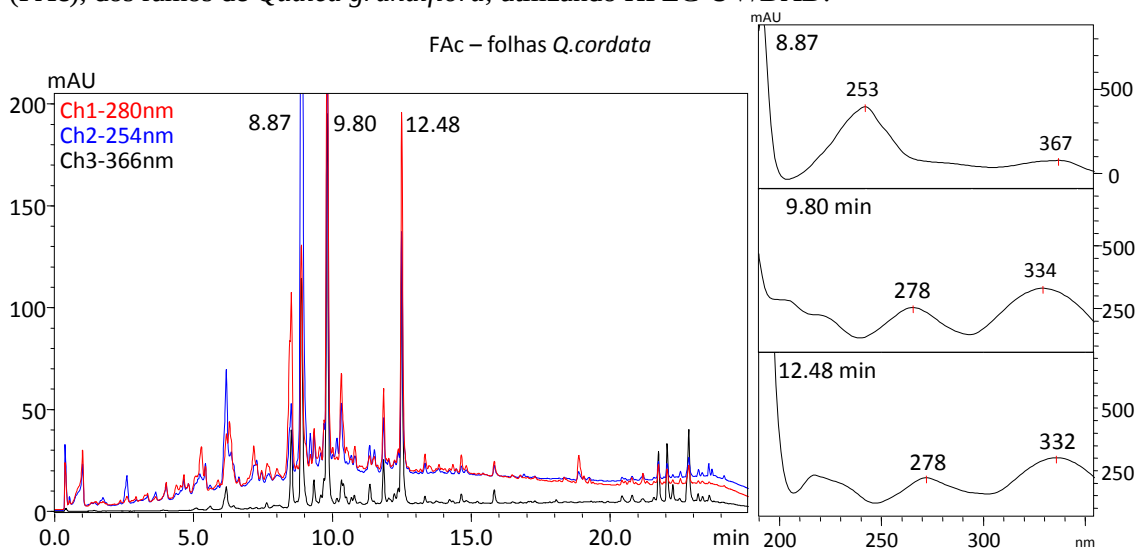


Figura 15. Cromatograma e espectros de UV das bandas majoritárias da fração acetato de etila (FAC), dos ramos de *Qualea cordata*, utilizando HPLC-UV/DAD.

4.2.2. HPLC-HRMS

A análise dos dados obtidos por HPLC-HRMS(ESI) das frações AcOEt dos ramos de *Qualea grandiflora* e AcOEt das folhas de *Q. cordata*, utilizando a interface do software Bruker Data Analysis versão 3.2 conjugado ao dicionário de produtos naturais da Chapman & Hall com abrangência nos anos de 1942 a 2000, constataram, *in silico*, uma série de metabólitos já isolados em outras espécies de *Qualea*.

Os espectros de massas obtidos por esta técnica hifenada foram feitos no modo positivo utilizando como interface o *electrospray*. A partir dos íons majoritários obtidos nos fragmentogramas, foram emulados os possíveis adutos catiônicos a serem formados, tomando em consideração a fase móvel utilizada, isto é, metanol e água acidificada além de cátions presentes na água como sódio e potássio. Todos os íons majoritários foram detectados na forma de molécula protonada $[M+H]^+$. As massas emuladas estão compiladas na tabela 11 e 12.

Tabela 11. Valores de massa/carga (m/z) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS(ESI)-MS2 para fração acetato de etila dos ramos de *Qualea grandiflora*.

Fórmula molecular calculada	m/z observado	m/z calculado	Erro (ppm)	Tempo de retenção observado no TIC/minutos
$C_{16}H_{14}O_5$	287,0917	287,0919	0,8	9,7
$C_{18}H_{18}O_7$	347,1129	347,1131	0,5	12,9
$C_{19}H_{22}O_7$	363,1421	363,1444	6,3	14,9
$C_{16}H_{14}O_8$	335,0768	335,0767	0,5	8,9

Tabela 12. Valores de massa/carga (m/z) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS(ESI)-MS2 para fração acetato de etila das folhas de *Qualea cordata*.

Fórmula molecular calculada	m/z observado	m/z calculado	Erro (ppm)	Tempo de retenção observado no TIC/minutos
$C_{18}H_{19}O_6$	331,1165	331,1181	5,0	8,4
$C_{17}H_{17}O_6$	317,1025	317,1025	0,0	5,9
$C_{18}H_{19}O_7$	347,1120	347,1131	3,4	4,7
$C_{19}H_{21}O_7$	361,1273	361,1287	3,9	10,3

As figuras 16 e 17 mostram os cromatogramas da corrente de íons totais (*Total Ion Current* – TIC, modo positivo) das frações AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* e AcOEt das folhas de *Q. cordata*, respectivamente.

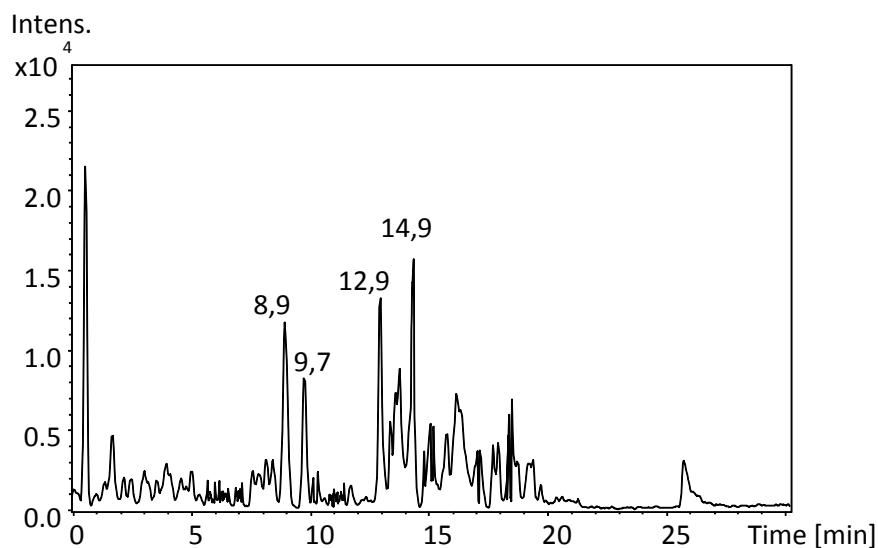


Figura 16. Corrente total de íons (TIC) para o extrato de acetato de etila dos ramos de *Q. grandiflora*.

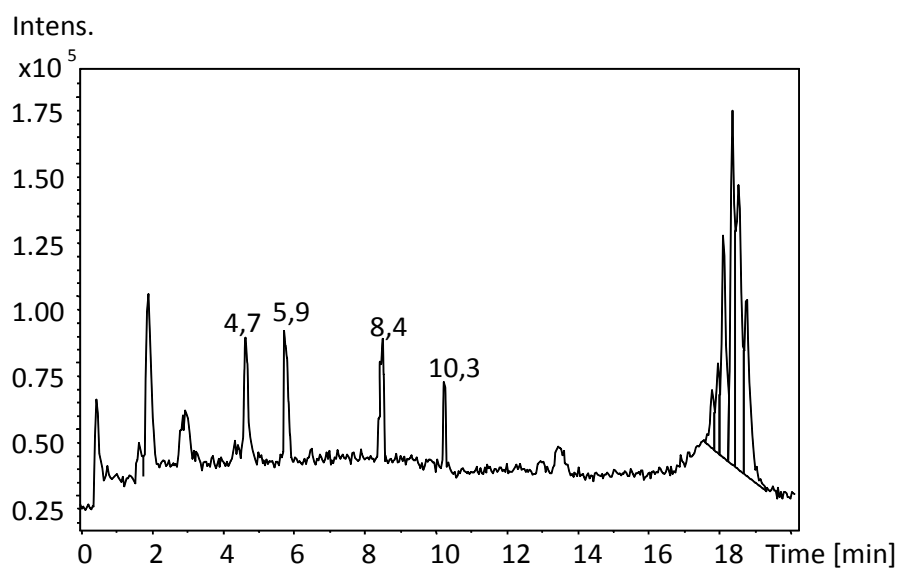


Figura 17. Corrente total de íons (TIC) para o extrato de acetato de etila das folhas de *Q. cordata*.

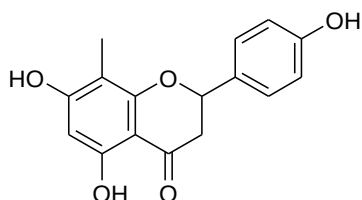
Como pode ser observado, após processamento dos espectros de massas dos íons mais abundantes, apenas os espectros de massas referentes aos tempos de retenção mencionados nas tabelas acima apresentaram dados significativos quando tiveram suas

massas de alta resolução comparadas com aquelas compiladas na base de dados do DNP (www.dnp.chemnetbase.com). A margem de erro entre m/z detectada e a massa molecular proposta foi menor que 10 ppm.

Para poder constatar a validade da fórmula molecular da análise *in silico* com o dado real obtido para as amostras, foi realizado uso de MS/MS em cada um dos compostos detectados. A discussão e justificação dos fragmentos filhos foram realizadas através de propostas racionais de fragmentação.

4.2.3. Desreplicação e detecção do metabólitos majoritários na fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*

Íon observado $[M+H]^+$: m/z 287,0917: 8-metilnaringenina



O íon atribuído a esta flavanona apresentou três fragmentos filhos principais, ao aplicar uma energia de colisão de 18 eV no MS/MS. Os espectros de MS e de MS/MS e as propostas dos padrões de fragmentação encontram-se na figura 18. As vias mecanísticas de fragmentação para este derivado metilado da naringenina foram justificadas por um rearranjo inicial do tipo retro-Diels-Alder seguido de perda de CO (monóxido de carbono) fornecendo o fragmento m/z : 139,04. Para justificar o fragmento m/z : 95,05 propõe-se um rearranjo de retro-Diels-Alder com eliminação de etino para a formação final do aleno.

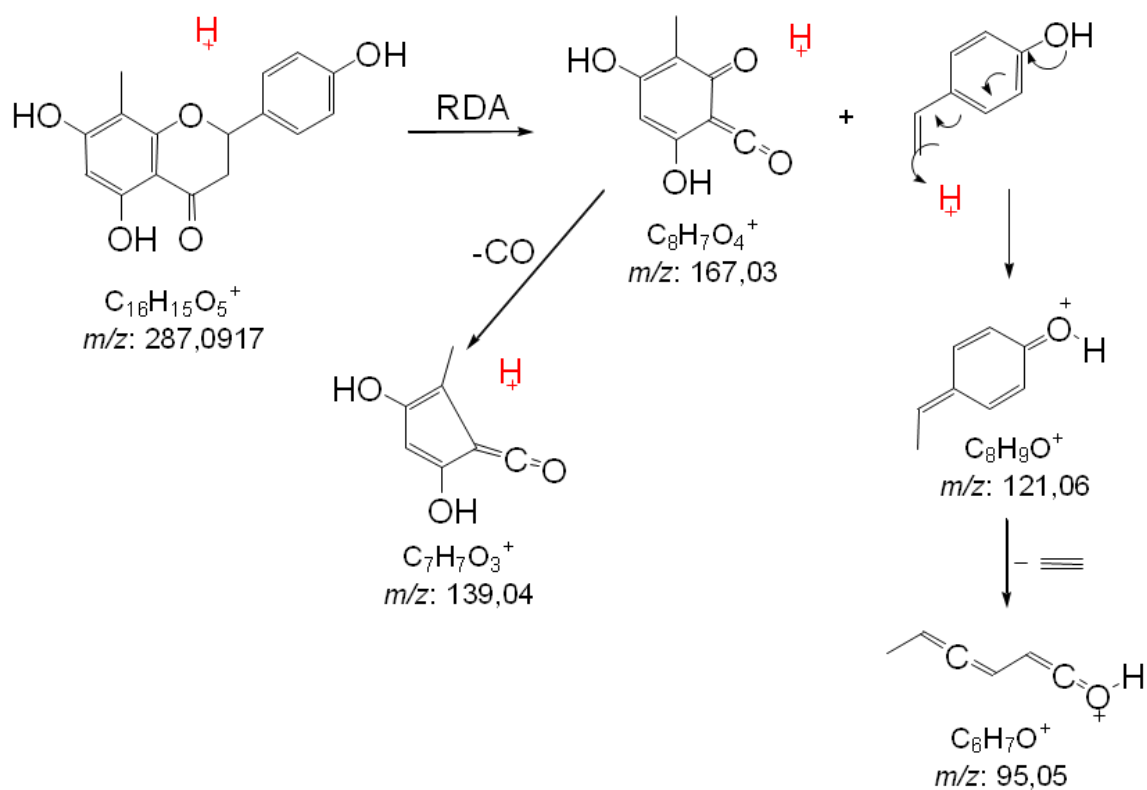
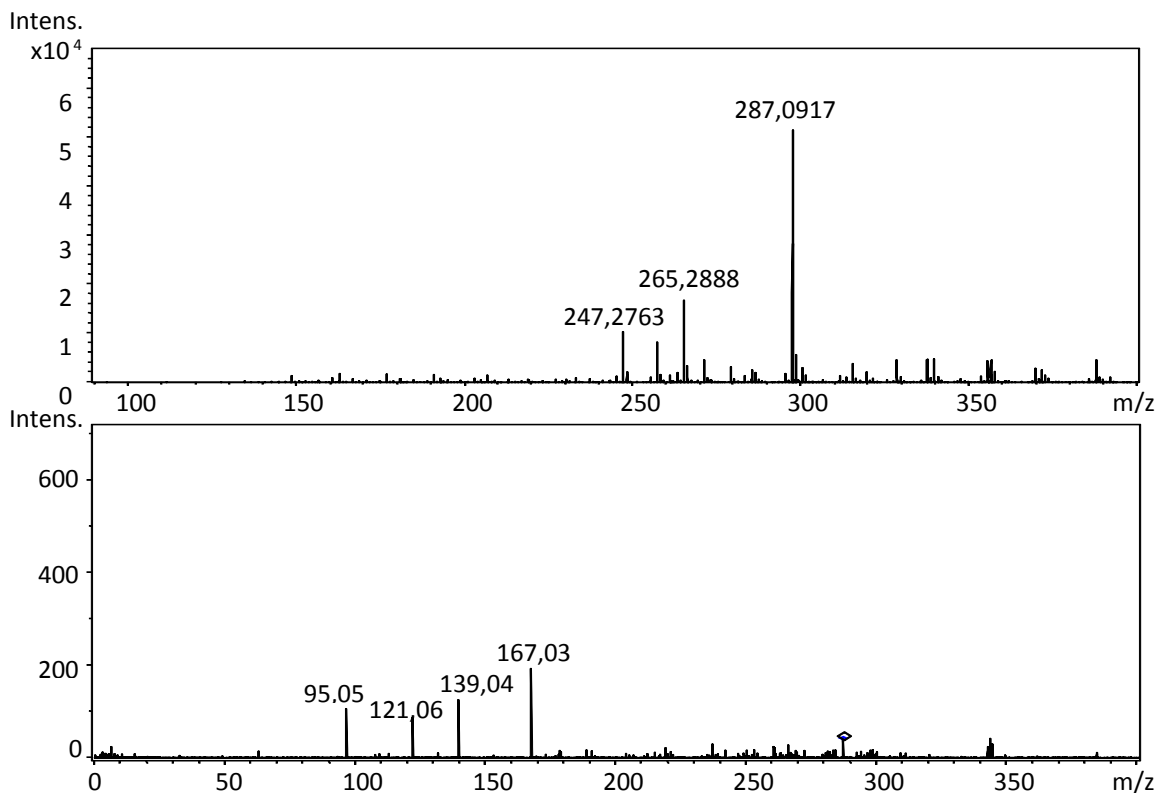
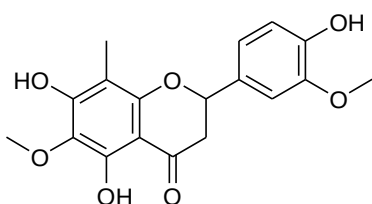
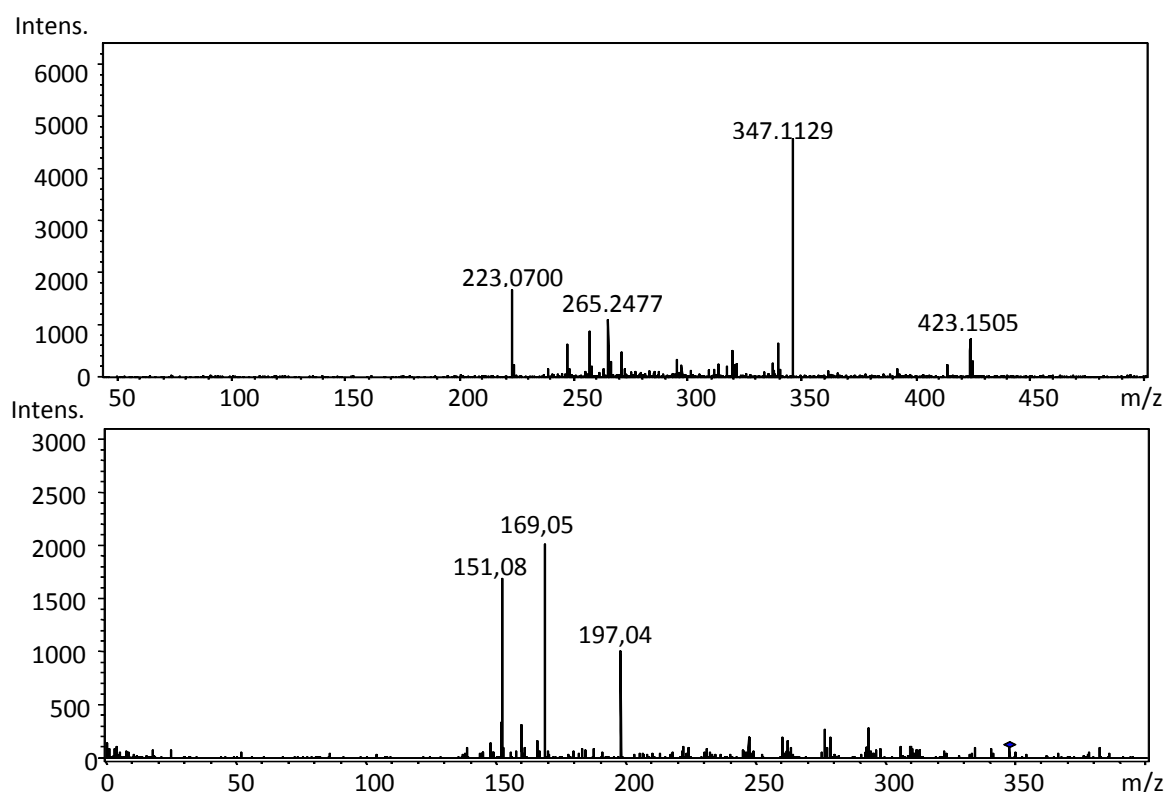


Figura 18. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 8-metilnaringenina.

Íon observado $[M+H]^+$: 347,1129: 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona.



No caso desta flavanona, foram evidenciados dois fragmentos no experimento de MS/MS (espectros de MS e MS/MS na figura 19). Neste tipo de metabólito são usuais os rearranjos retro-Diels- Alder o que fornece o fragmento m/z : 197,04. Perda de CO do dieno gerado no RDA fornece o fragmento mais abundante com m/z : 169,05. A proposta de fragmentação está detalhada na figura 20.



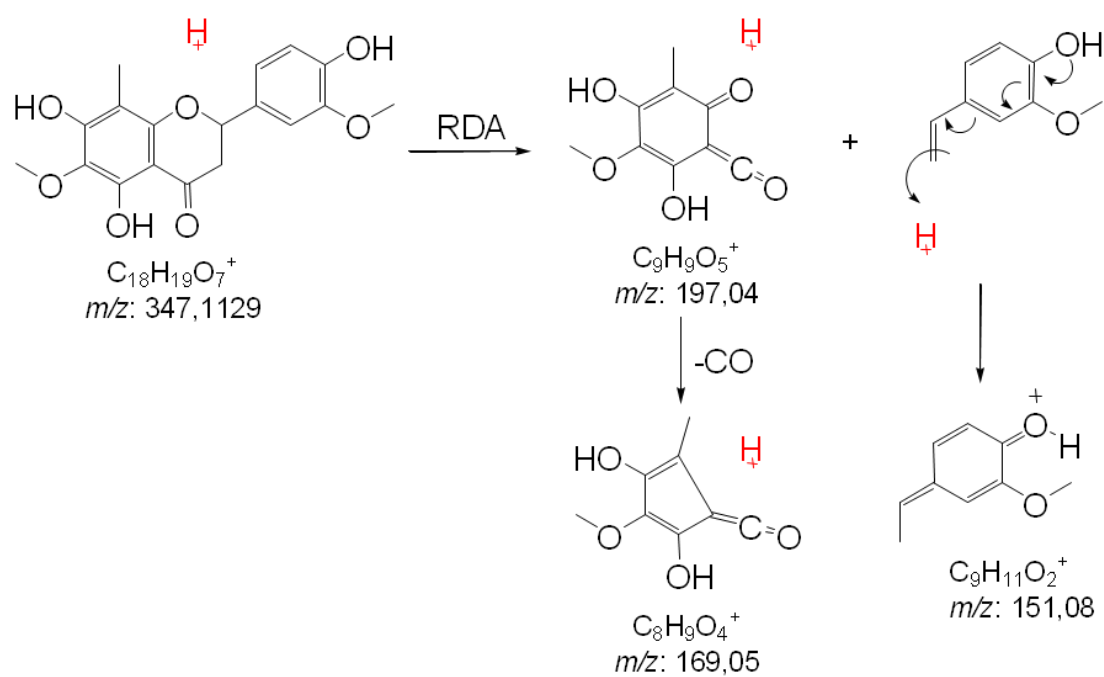
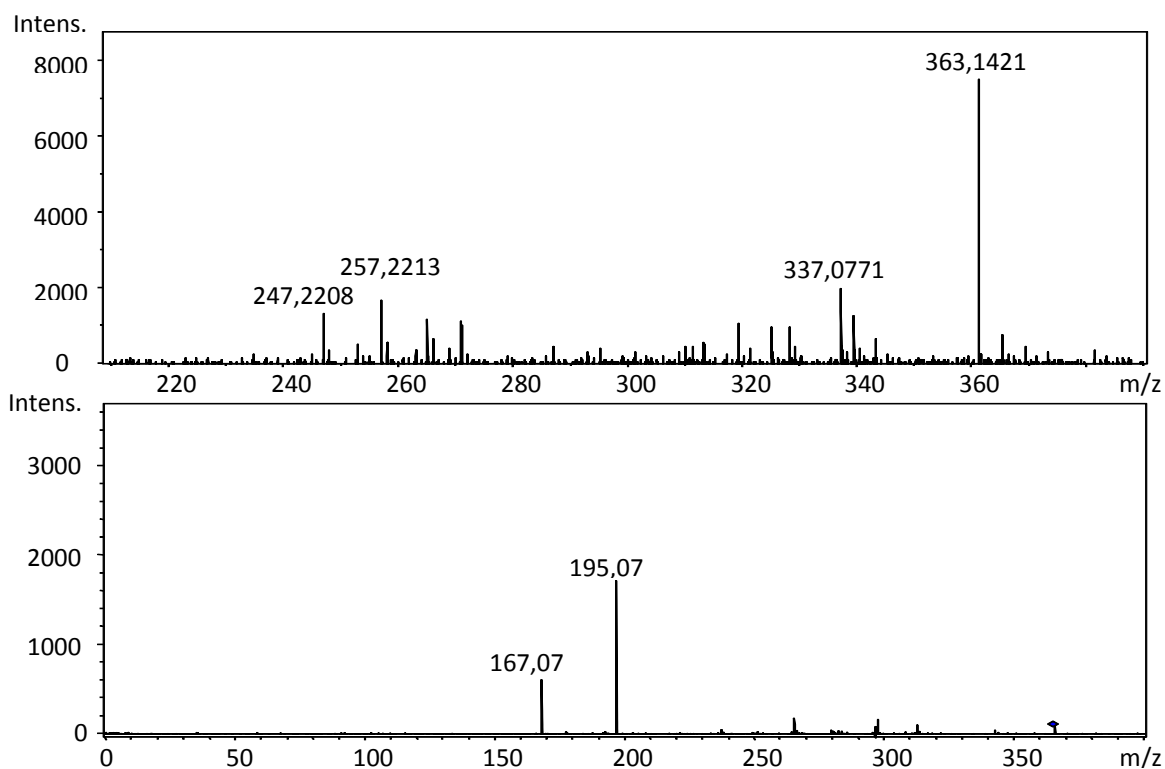


Figura 19. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona.

Íon observado $[M+H]^+$: m/z 363,1421: bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona.

Esta benzofenona apresentou no experimento MS/MS (espectros na figura 20) dois fragmentos filhos principais: um íon acílio de m/z : 195,07, sofrendo subsequente perda de CO e gerando um cátion fenila de m/z : 167,07. Perdas de metoxila não foram evidenciadas provavelmente devido à baixa energia de colisão empregada na análise (menor que 30 eV).



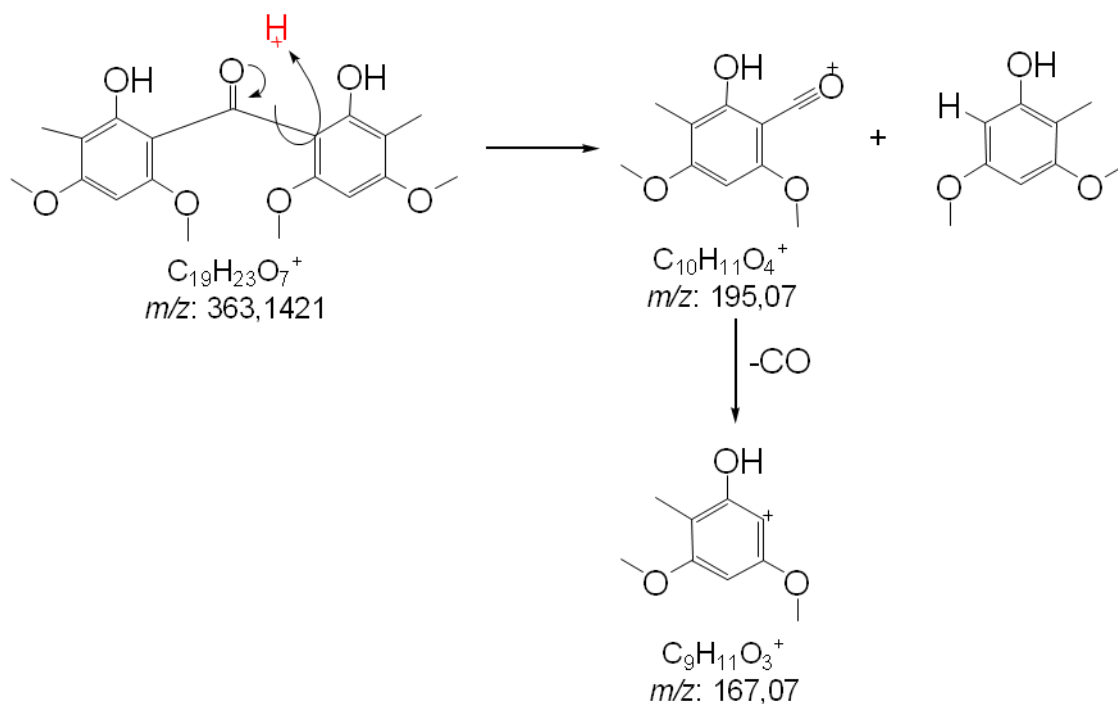
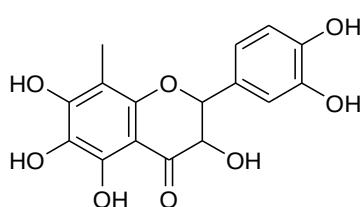


Figura 20. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona.

Íon observado $[M+H]^+$: 335,0768: 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol.



Este diidroflavonol apresentou quatro íons produtos quando aplicado uma energia de colisão de 20 eV (espectros na figura 21). O fragmento produto de maior abundância (m/z : 183,03) pode ser justificado através de um rearranjo retro-Diels-Alder. Posterior perda de CO do dienófilo e desidratação do dieno dariam origem aos íons m/z : 155,03 e 135,04, respectivamente. A proposta dos padrões de fragmentação pode ser evidenciada na figura 21.

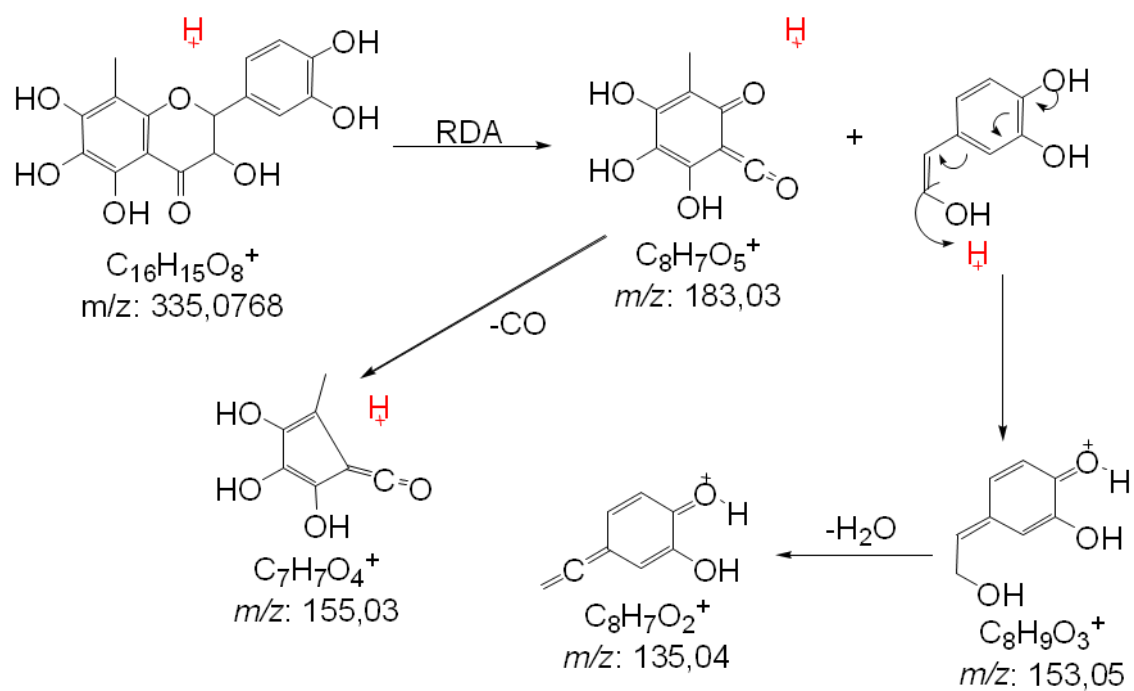
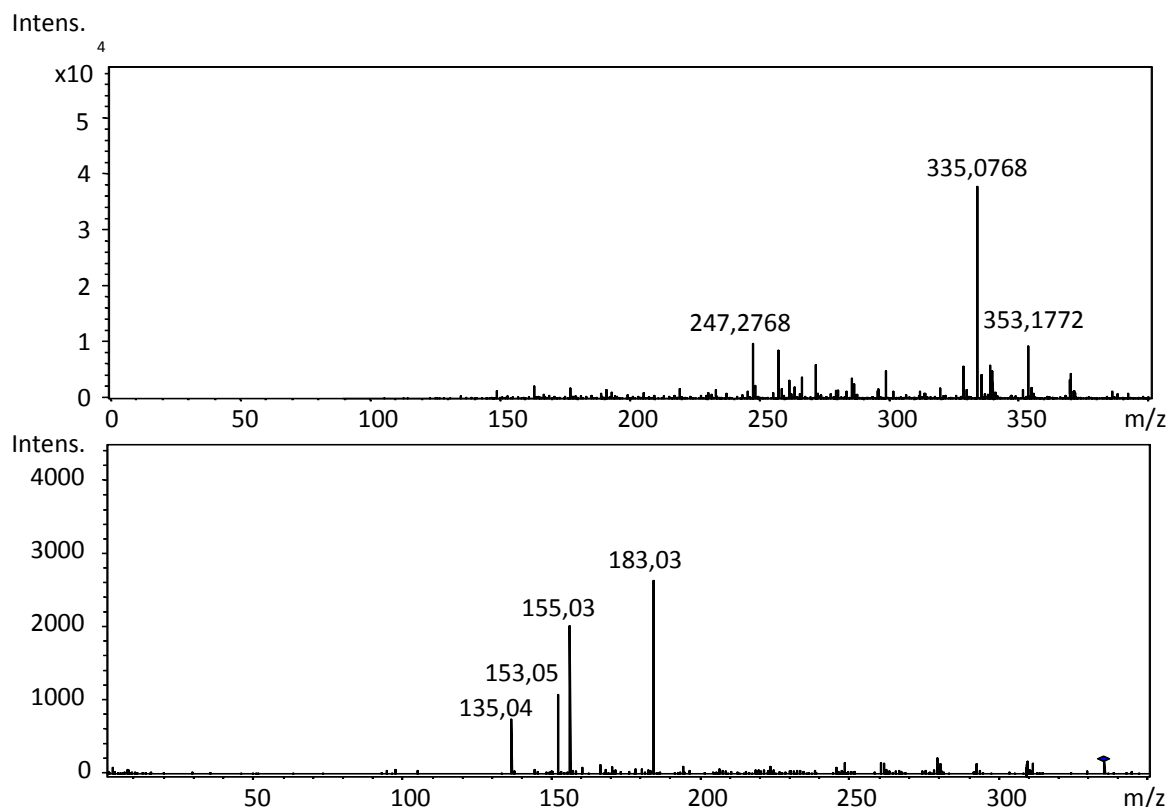
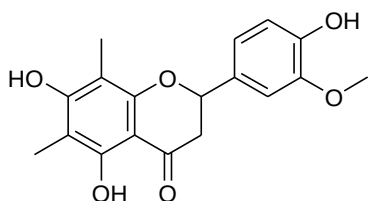


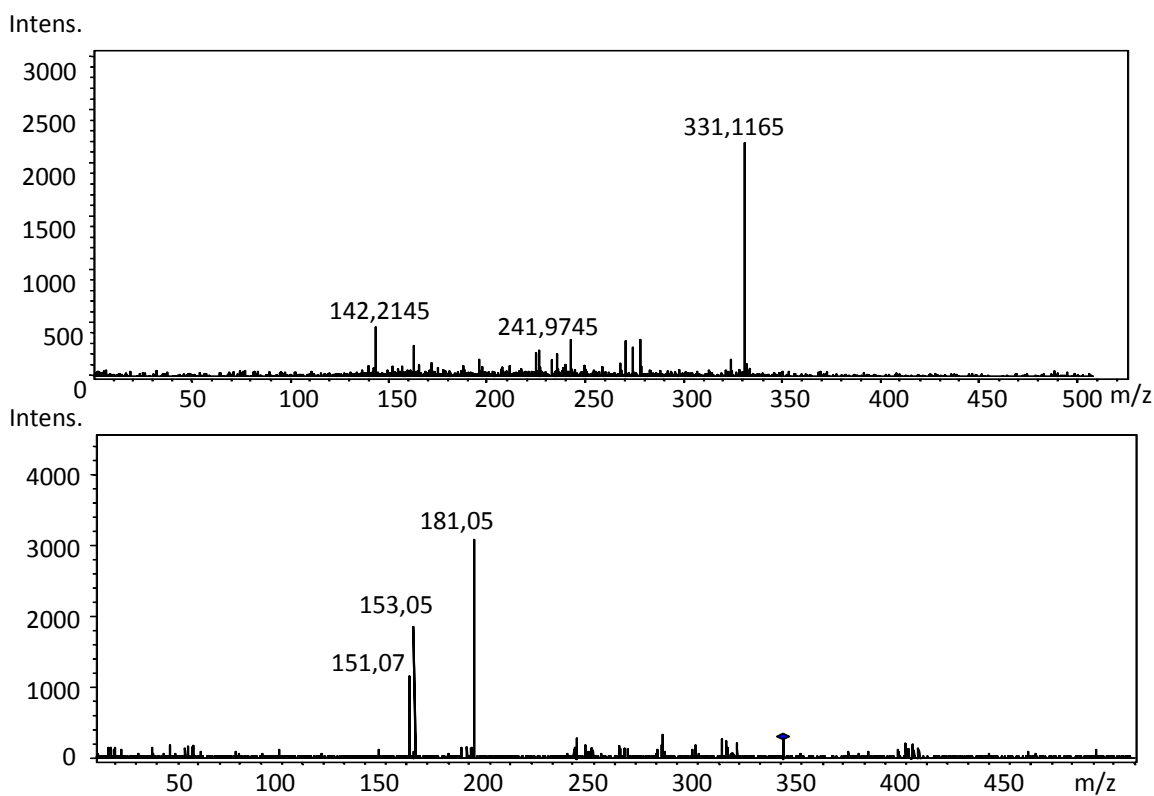
Figura 21. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para o 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol.

4.2.4. Desreplicação e detecção do metabólitos majoritários na fração acetato de etila das folhas de *Qualea cordata*.

Íon observado $[M+H]^+$: m/z 331,1165: 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona.



Este íon apresentou três fragmentos principais, utilizando uma energia de colisão de 18 eV. As propostas dos padrões de fragmentação encontram-se na figura 22. As vias mecanísticas de fragmentação para esta flavanona foram justificadas por um rearranjo retro-Diels-Alder inicial seguida de eliminação de CO fornecendo o fragmento m/z : 153,05.



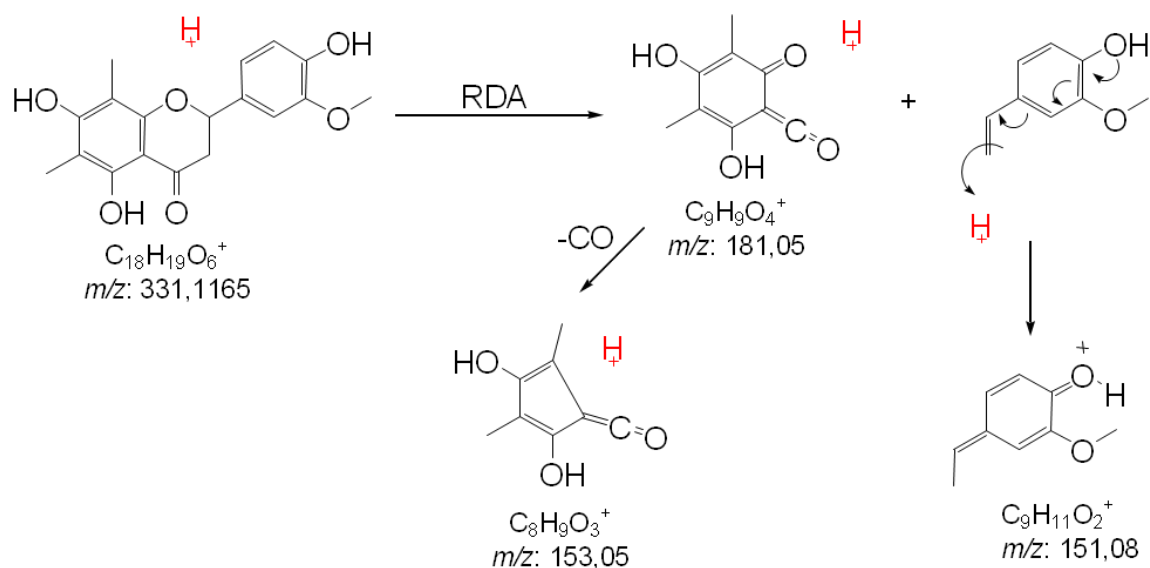
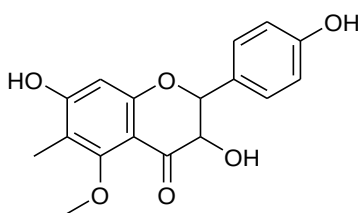


Figura 22. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 4',5,7-trihidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona.

Íon observado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 317,1025: 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol.



No caso deste diidroflavonol foram evidenciados dois fragmentos no experimento MS/MS (espectros na figura 23). Neste tipo de molécula são usuais os rearranjos retro-Diels-Alder o que fornece o fragmento de abundância mais intenso ($m/z: 181,05$). Desidratação do fragmento gerado na RDA que contém o anel B forneceria o fragmento menos abundante com $m/z: 119,05$. A proposta de fragmentação está detalhada na figura 23.

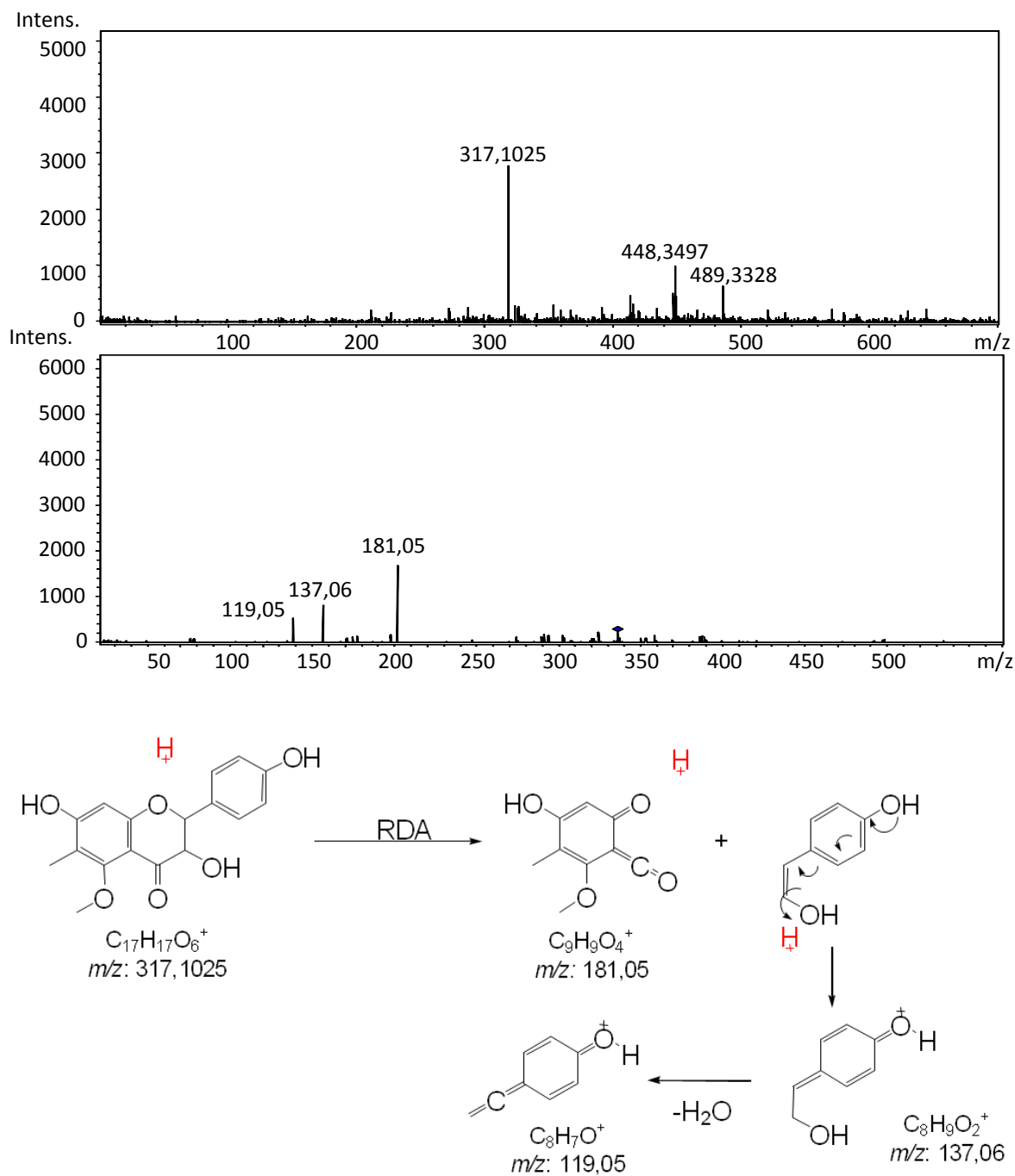
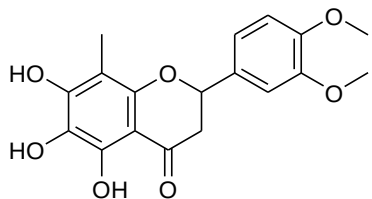
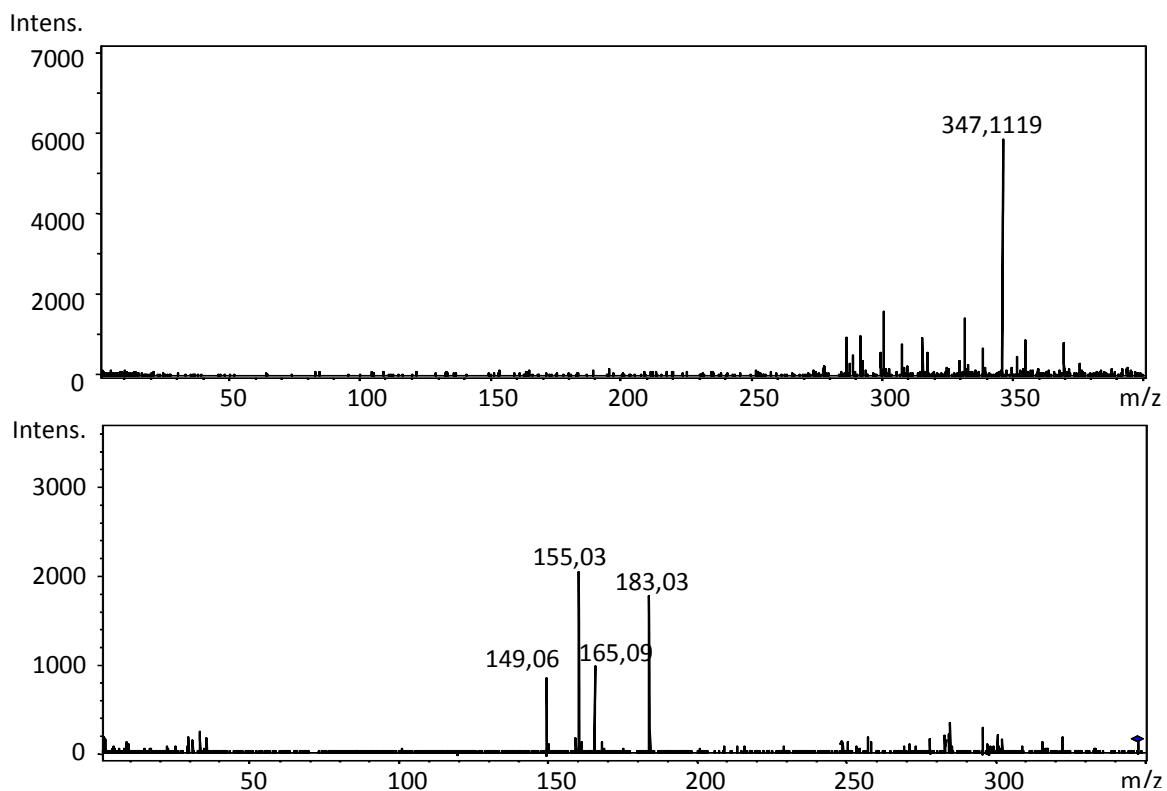


Figura 23. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para o 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol.

Íon observado $[M+H]^+$: 347,1119: 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona.



Esta flavanona apresentou 4 íons produtos no experimento MS/MS quando aplicado uma energia de colisão de 20 eV ao íon m/z : 347,1120 (espectros na figura 24). Os íons mais abundantes podem ser justificados pelo rearranjo retro-Diels-Alder da flavanona principal. Subseqüentes descarbonilações e eliminação de metano justificam o aparecimento de íons de menor abundancia (m/z : 155,03 e 149,06). A proposta das fragmentações evidenciadas está detalhada na figura 24.



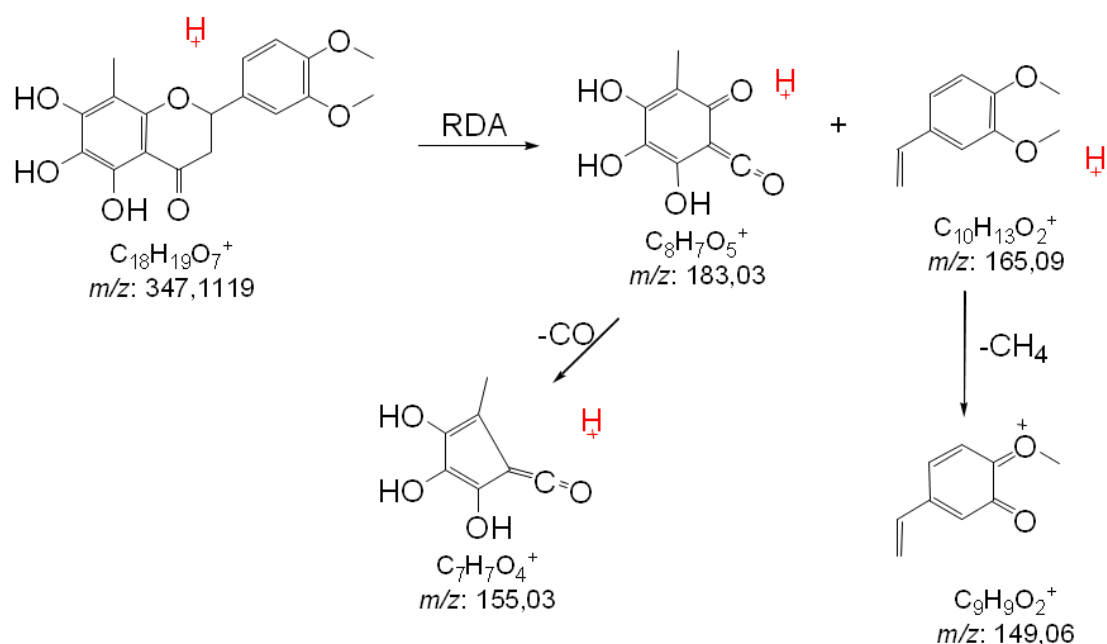
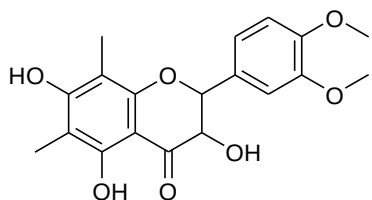


Figura 24. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona.

Íon observado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 361,1273): 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol.



Este diidroflavonol apresentou três íons produtos quando aplicado uma energia de colisão de 20 eV ao íon m/z 361,1273. O fragmento de maior abundância (m/z : 181,05) pode ser justificado pelo rearranjo retro-Diels-Alder, onde a relação m/z tanto do dieno como do dienófilo é a mesma. Posterior eliminação de CO do dienófilo e desidratação do dieno dariam origem aos íons m/z : 153,05 e 163,08, respectivamente. A proposta dos padrões de fragmentação pode ser evidenciada na figura 25.

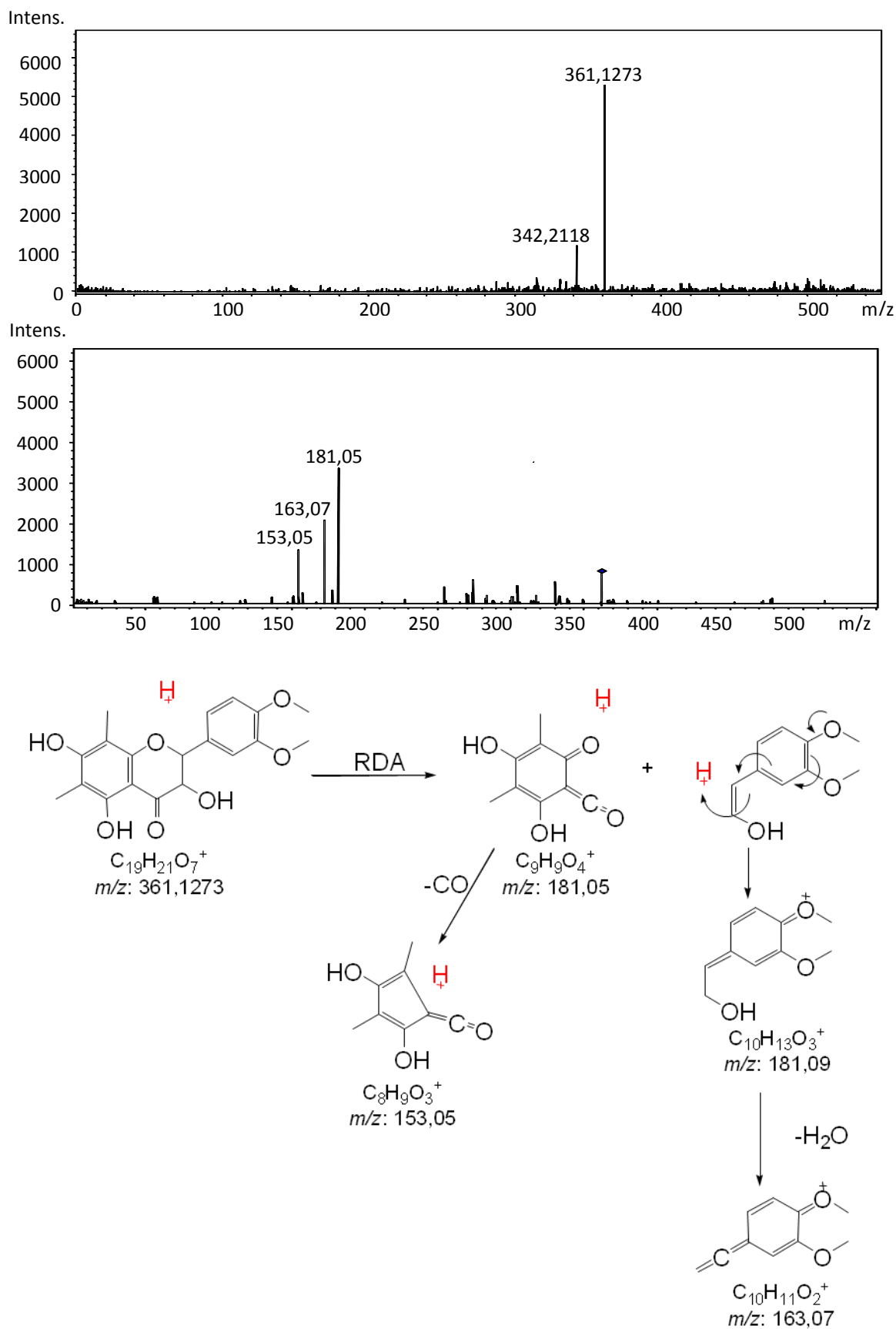


Figura 25. Espectros de MS e de MS/MS e proposta do padrão de fragmentação para a 5,6,7-trihidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona.

4.2.5. RMN

A fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* foi analisada por RMN para a detecção dos metabólitos previamente identificados por HPLC-DAD-HRMS (ESI).

A metodologia utilizada para a desreplicação através de RMN iniciou-se com a elaboração dos padrões virtuais de ^1H RMN de cada molécula previamente detectada através do uso do software de predição *Modgraph NMRPredict desktop* (Mestrelab research S.L, Santiago da Compostela, ESP). Essas predições foram realizadas em condições semelhantes à análise realizada com a fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*, na frequência de 14.1 T e DMSO como solvente

Os espectros virtuais de ^1H RMN de cada molécula detectada foram condensados em um único espectro de ^1H RMN para criar um espectro virtual da mistura desses metabólitos (4 flavanonas, 3 diidroflavonóis e 1 benzofenona), como esperado na matriz vegetal. Em seguida, os espectros simulado e real (da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*) foram comparados permitindo verificar os sinais de deslocamento químico característicos das moléculas propostas na amostra analisada – Figura 26.

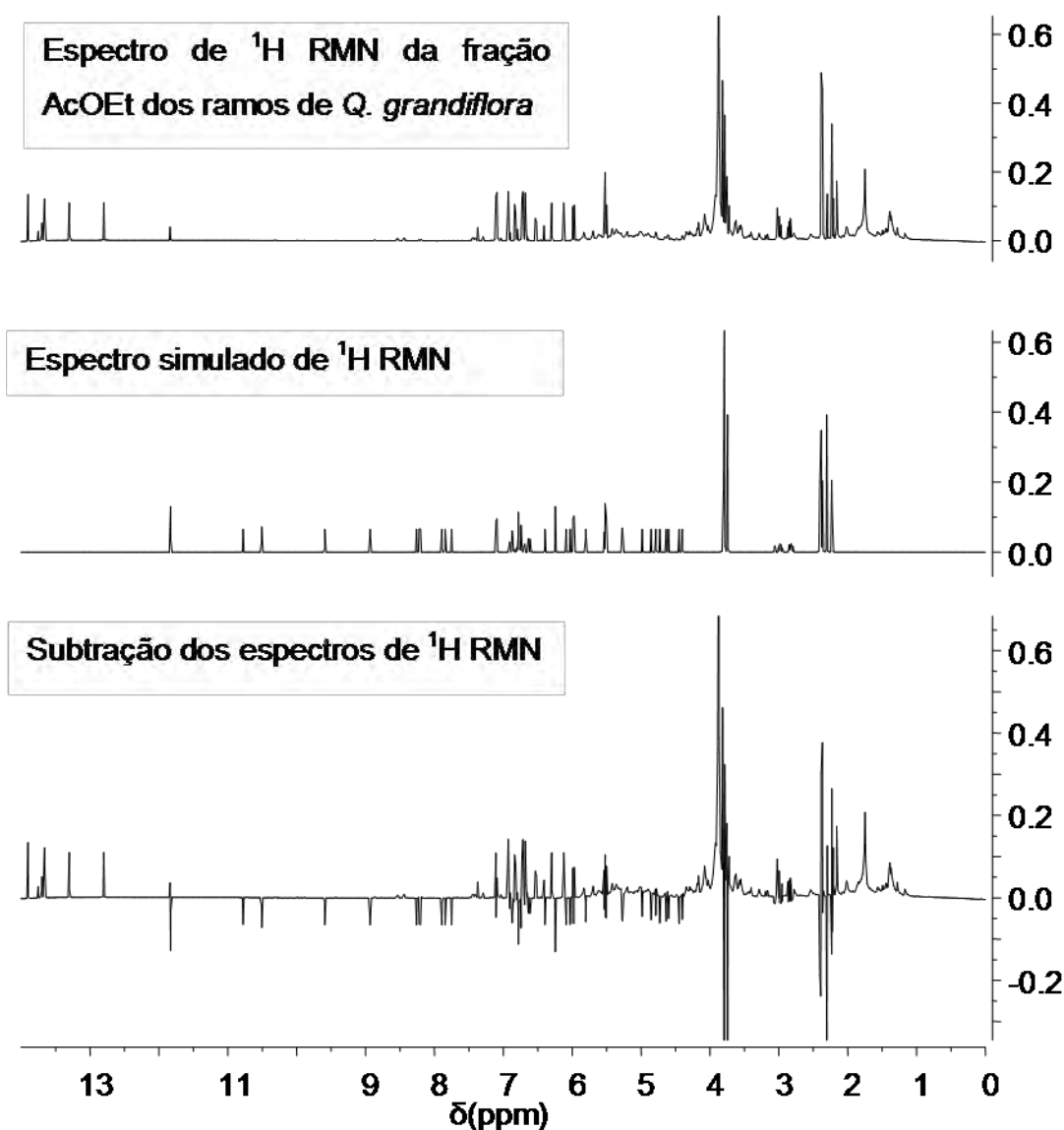


Figura 26. Espectro de ^1H RMN da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*, espectro de ^1H RMN simulado para as moléculas detectada por HPLC-DAD-HRMS(ESI), subtração entre os espectros de ^1H RMN.

O resultado desta comparação sugere a presença dos quatro metabólitos propostos para *Q. grandiflora*, bem como dos quatro compostos fenólicos detectados na fração AcOEt das folhas de *Q. cordata*.

Para a análise dos espectros de ^1H , foram selecionadas as regiões com sinais característicos para os metabólitos detectados (figura 27), indicados na lista a seguir:

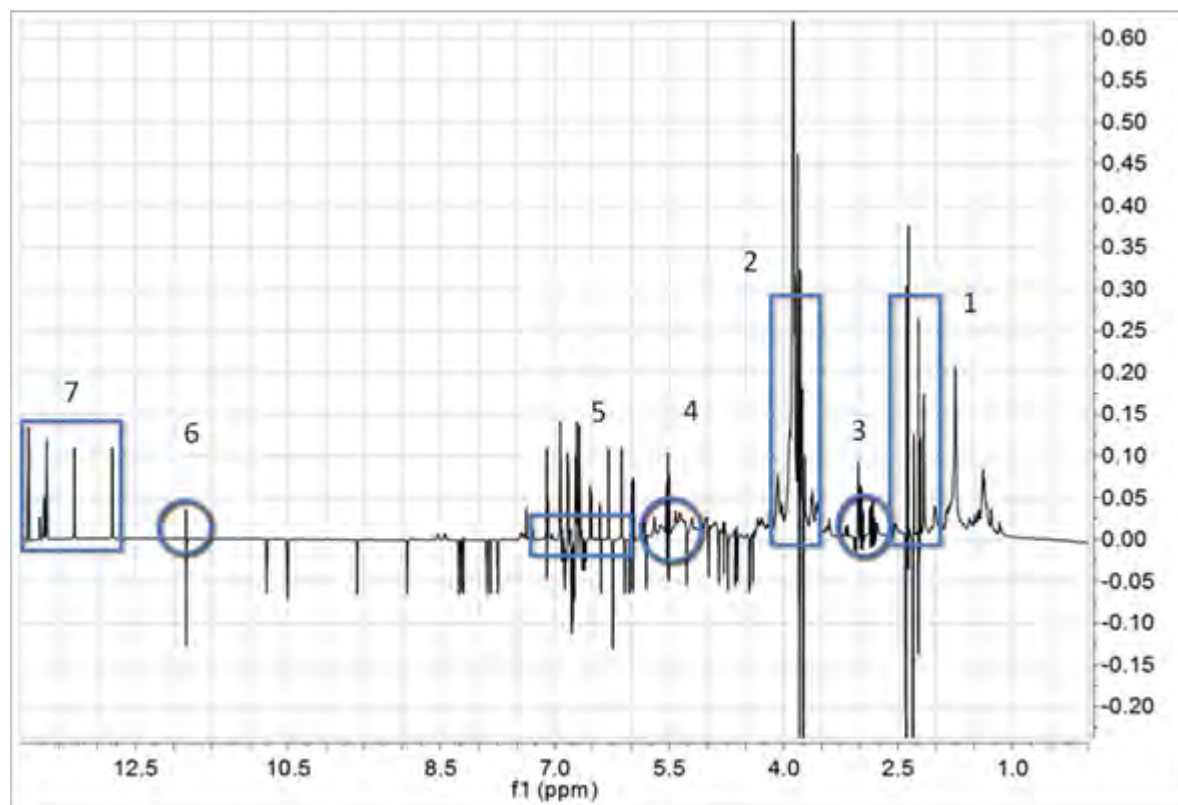


Figura 27. Espectro de ^1H RMN da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (positivo no eixo y) e espectro de ^1H RMN simulado para as moléculas detectadas por HPLC-DAD-HRMS(ESI) (negativo no eixo y).

1. Substituições de grupos metila (δ entre 2,1 e 2,5 ppm; **1**) em anel aromático;
2. Substituições de grupos metoxila (δ entre 3,6 e 4,1 ppm; **2**) em anel aromático;
3. ^1H em C-3 para flavanonas (δ entre 2,5 e 3,3 ppm, **3**);
4. ^1H em C-2 para flavanonas e flavanóis ($\delta \approx 5,5$ ppm, **4**);
5. ^1H nos anéis aromáticos (δ entre 6,5 e 7,5 ppm, **5**);
6. Hidroxila fenólica na benzofenona ($\delta \approx 11,8$ ppm, **6**);
7. ^1H de hidroxilas fenólicas queladas em C-5 ($\delta > 12,0$ ppm, **7**).

Análise do substituinte metila (-CH₃)

A presença de substituições metila (-CH₃) em anéis aromáticos é caracterizada em RMN de ¹H por δ entre 2,0 e 2,5 ppm.

A simulação dos espectros de ¹H RMN das moléculas propostas por MS gerou sinais característicos para as metilas presentes nos flavonóides e para as metilas da benzofenona. A comparação destes sinais com o obtido pela análise de RMN da fração AcOEt permitiu detectar estas substituições na fração, conforme ilustrado na figura 28.

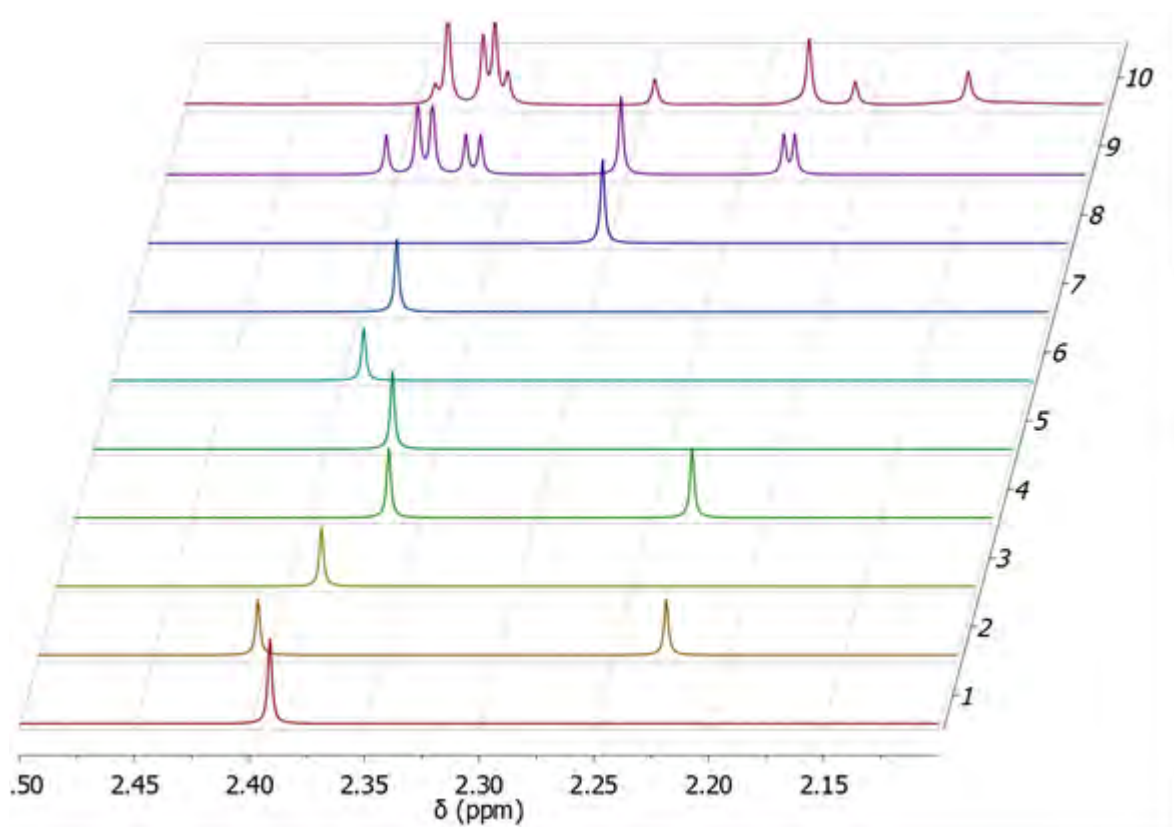


Figura 28. Espectros de ¹H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (**1**), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (**2**), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (**3**), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (**4**), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (**5**), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (**6**), 8-metilnaringenina (**7**), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (**8**), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (**9**) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (**10**), no intervalo de 2,1 a 2,5 ppm.

Análise do substituinte metoxila (-OCH₃)

A presença de substituições -OCH₃ em anéis aromáticos é caracterizada em RMN de ¹H por singletos com δ entre 3,5 e 4,0 ppm. A simulação dos espectros de ¹H RMN das moléculas propostas gerou sinais característicos para as metoxilas presentes nos anéis aromáticos dos flavonóides na faixa de 3,8 ppm. A comparação dos sinais simulados com obtido pela análise de RMN da fração AcOEt permitiu detectar a presença destes substituintes na fração, conforme ilustrado na figura 29.

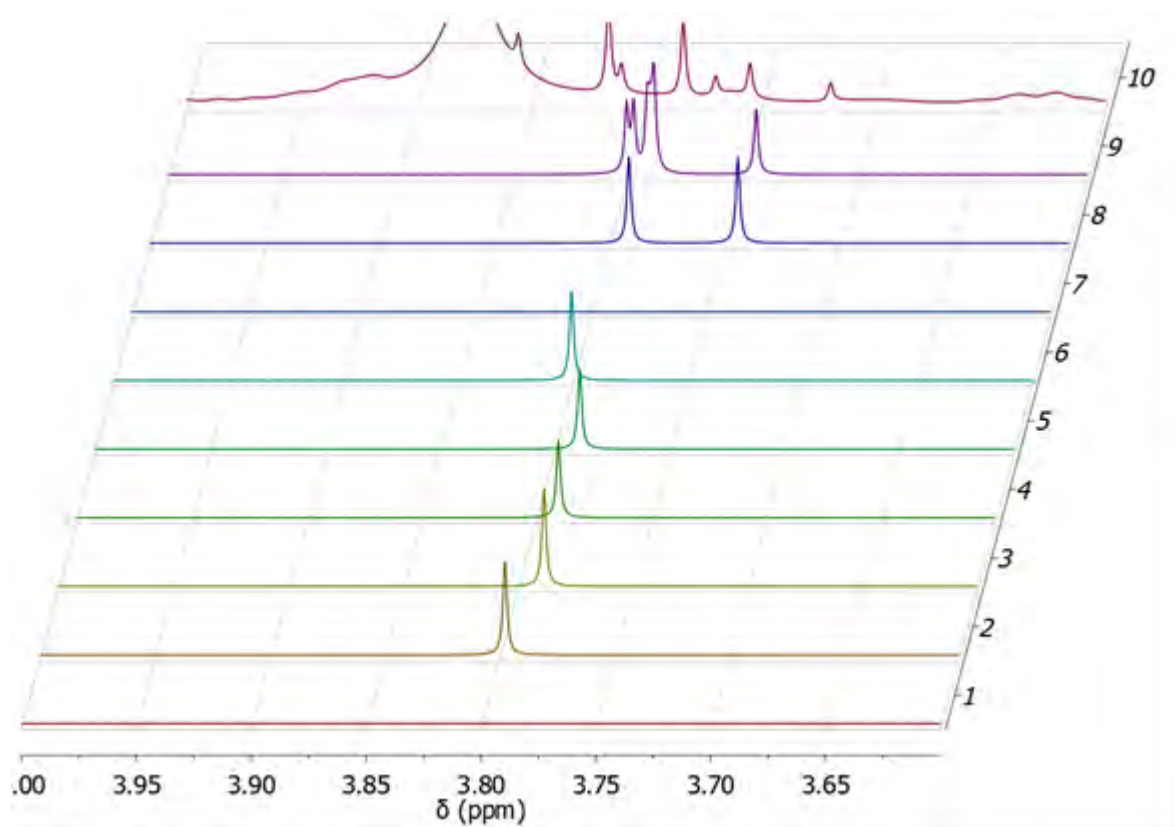


Figura 29. Espectros de ¹H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (**1**), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (**2**), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (**3**), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (**4**), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (**5**), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (**6**), 8-metilnaringenina (**7**), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (**8**), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (**9**) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (**10**), no intervalo de de 3,6 a 4,1 ppm.

Análise do ^1H em C-3 de flavanona

Os sinais de ^1H em C-3 do anel C de flavanonas são detectados na faixa de 3,5 e 2,8 ppm e são caracterizados pelo acoplamento com o ^1H em C-2, além das diferenças de δ devido à variação quanto a posição dos ^1H em C-3 (geminais) em axial ou equatorial. A partir da predição gerada pelo software, obteve-se sinais duplo dubleto devido ao acoplamento (J) constante de 12 Hz entre ^1H geminais (3α e 3β) e de J 7 Hz entre os ^1H de C-2 e C-3. A comparação com os dados obtidos na fração AcOEt permite detectar sinais semelhantes, o que indica sua presença na fração analisada, conforme ilustrado na figura 30.

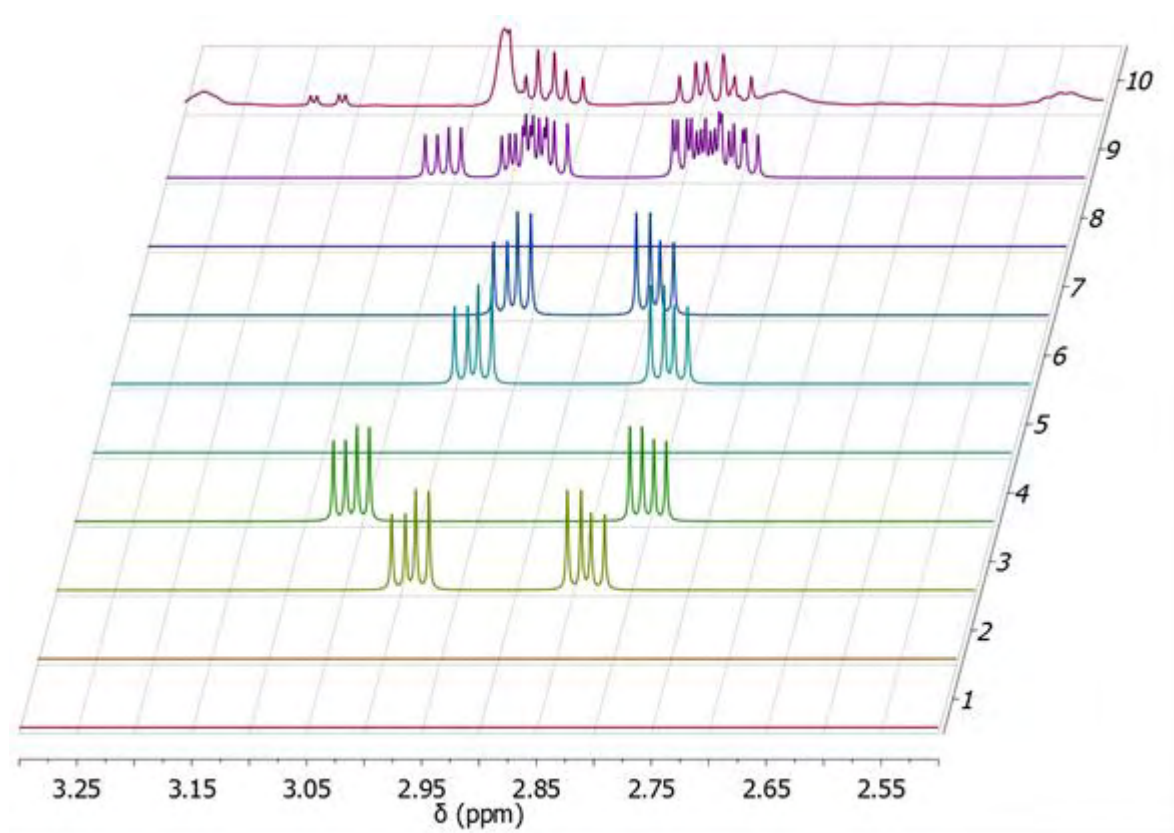


Figura 30. Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 2,5 a 3,3 ppm.

Análise do ^1H em C-2

O sinal do ^1H localizado na posição C-2 é característico em diidroflavonóides, variando apenas no acoplamento, dependente do ambiente químico próximo, ou seja, dos substituintes presentes em C-3. Para flavanonas, os dois ^1H geminais em C-3 (em axial e equatorial) são capazes de acoplar com o ^1H em C-2 fornecendo um tripleto largo com J de 7 Hz. Já para o diidroflavonol, um dos ^1H em C-3 é substituído por uma hidroxila. Logo, o sinal gerado deste acoplamento com o ^1H em C-3 é um dubleto. A partir da comparação entre o espectro simulado e aquele obtido pela fração (figura 31), é possível verificar esses sinais, indicativo da presença de flavanona e diidroflavonol.

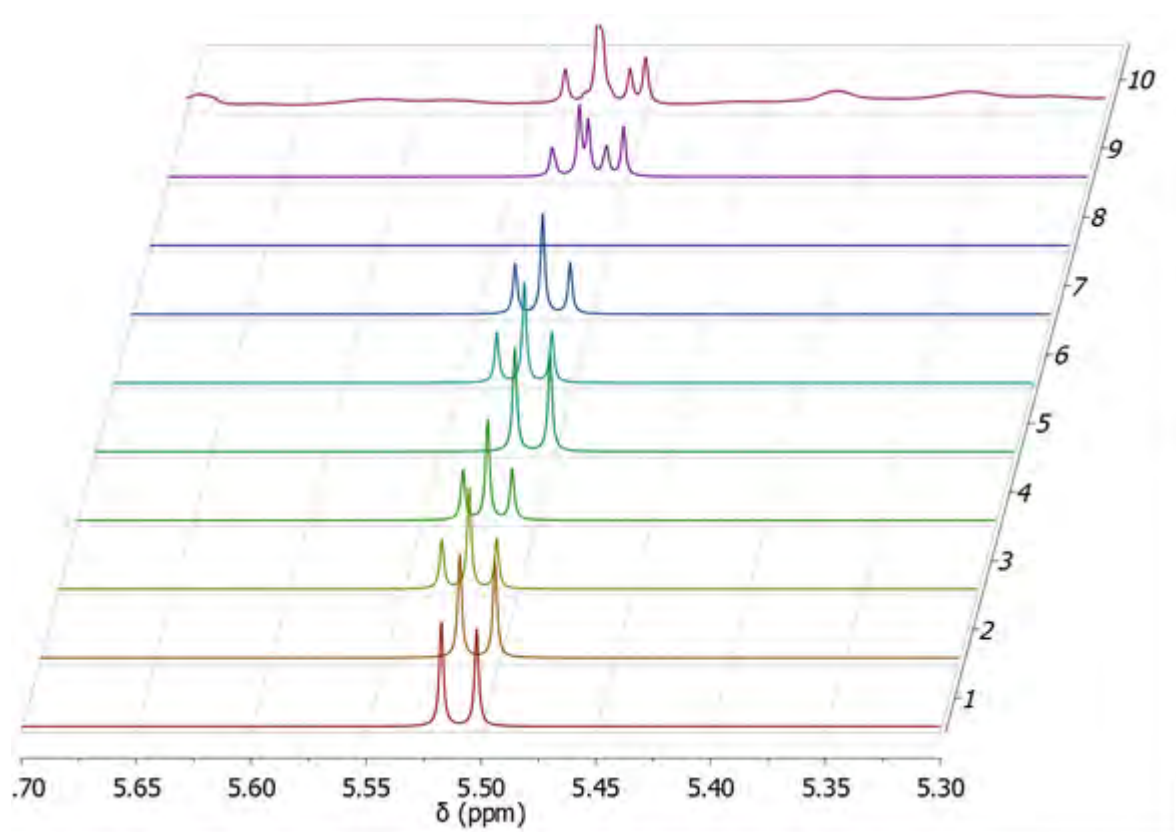


Figura 31. Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 5,3 a 5,7 ppm.

Análise do ^1H de anel aromático

A região do espectro de ^1H RMN entre 6,5 e 7,5 ppm está relacionada aos ^1H presentes no anel aromático. A simulação gera diversos sinais devido aos acoplamentos *orto* e *meta*. A comparação com o espectro de ^1H RMN da amostra permite verificar a presença de sinais semelhantes, mesmo em uma região com complexidade de sinais, o que auxilia na validação dos estudos de desreplicação. O intervalo de δ está ilustrado na figura 32.

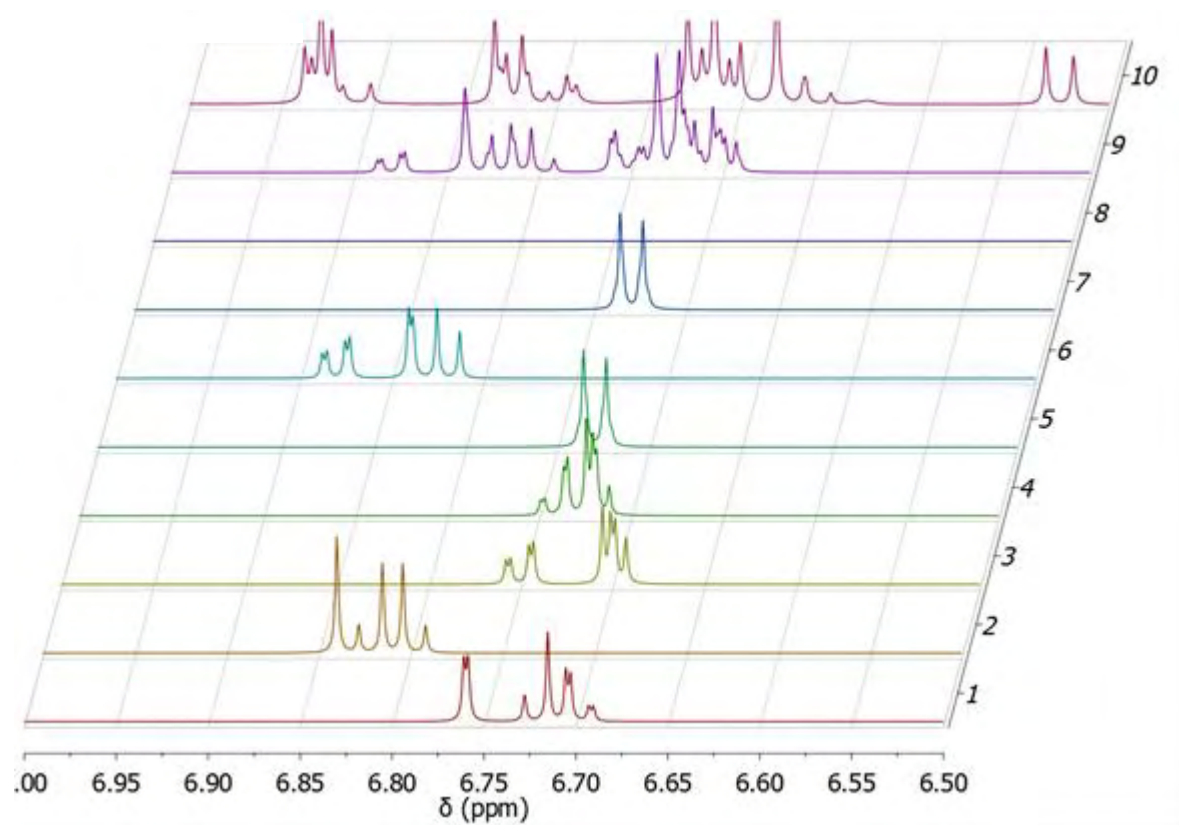


Figura 32. Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 6,5 a 7,5 ppm.

Análise do ^1H de $-\text{OH}$ fenólica da benzofenona

A benzofenona proposta pelos experimentos em HPLC-DAD-HRMS(ESI) apresenta em sua estrutura dois substituintes $-\text{OH}$ nas posições C-2 e C-2'. Devido a simetria da molécula, este sinal aparece como um único singlete, simulado pelo software na região de 11,8 ppm. A comparação entre os espectros simulado e da fração AcOEt sugerem a presença deste sinal, conforme ilustra a figura 33.

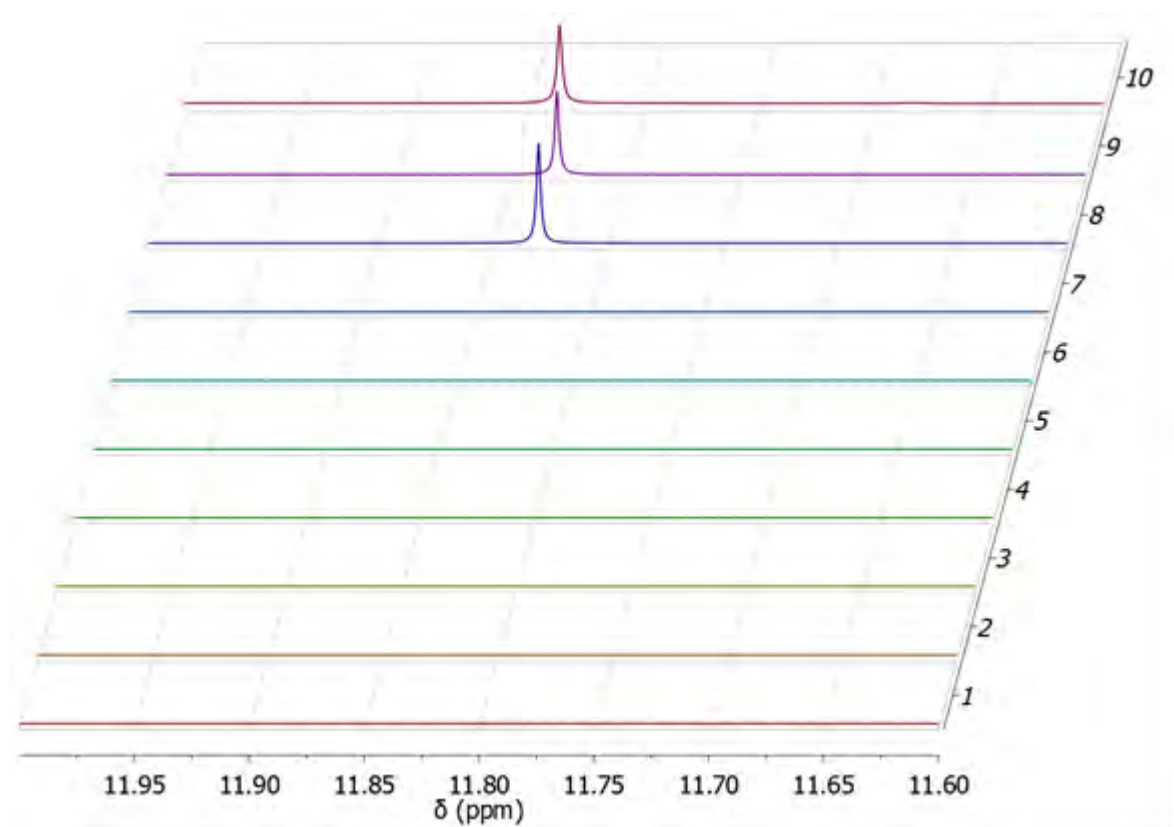


Figura 33. Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (1), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (2), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (3), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (4), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (5), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (6), 8-metilnaringenina (7), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (8), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (9) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (10), no intervalo de 11,6 a 12,0 ppm.

Análise do ^1H de $-\text{OH}$ fenólicas queladas em C-5

Sinais de ^1H de hidroxilas fenólicas em C-5 são muito característicos para flavonóides uma vez que este hidrogênio sofre efeito anisotrópico da ligação carbonílica adjacente em C-4, o que causa um deslocamento do sinal para δ acima de 11 ppm. O software não é capaz de simular com confiabilidade δ de ^1H para relações oxigênio-hidrogênio, como em hidroxilas. Deste modo não é possível comparar os dados da amostra com a simulação (figura 34). Contudo, devido a especificidade destes sinais, sua presença nas regiões de campo mais elevado do espectro de ^1H RMN da fração é mais um indicativo da presença de flavonóides com hidroxilas em C-5.

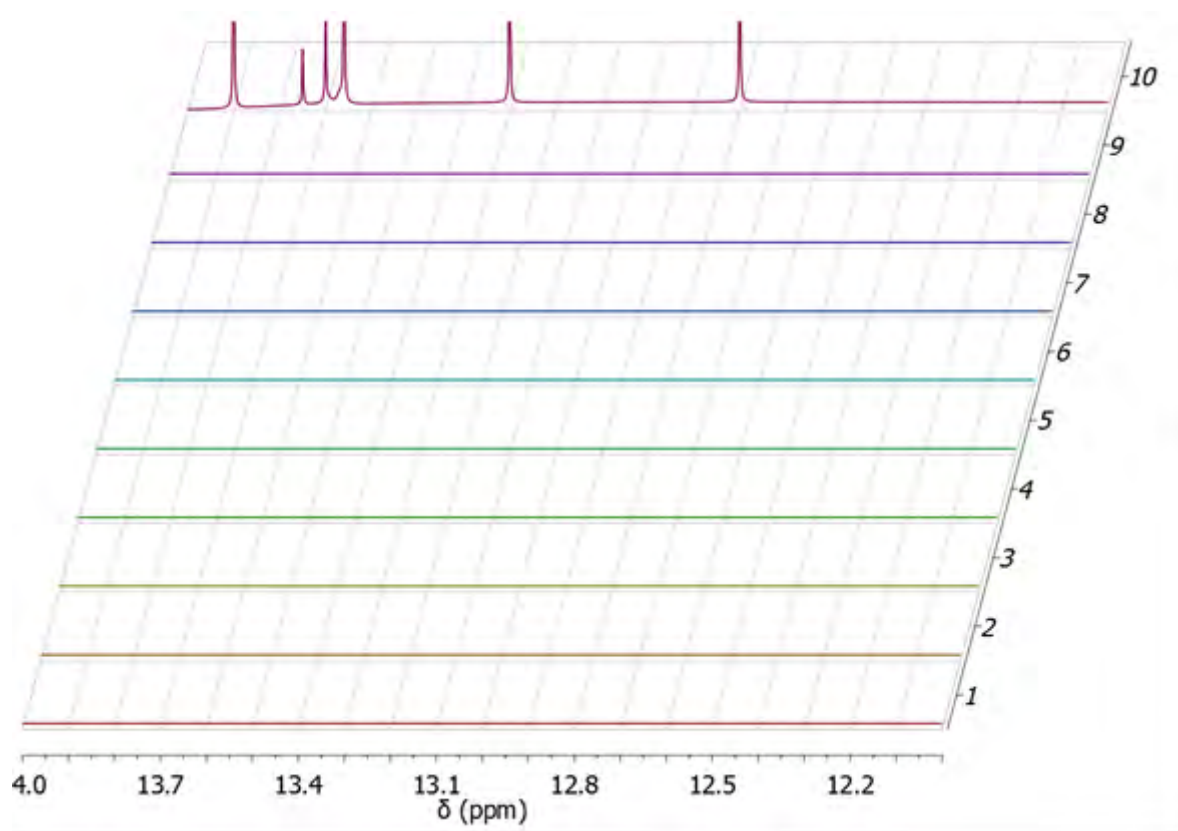


Figura 34. Espectros de ^1H RMN de 3',4',5,6,7-pentaidroxi-8-metildiidroflavonol (**1**), 3',4'-dimetoxi-5,7-diidroxi-6,8-dimetildiidroflavonol (**2**), 4',5,7-triidroxi-3',6-dimetoxi-8-metilflavanona (**3**), 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-6,8-dimetilflavanona (**4**), 4',7-diidroxi-5-metoxi-6-metildiidroflavonol (**5**), 5,6,7-triidroxi-3',4'-dimetoxi-8-metilflavanona (**6**), 8-metilnaringenina (**7**), bis(2-hidroxi-4,6-dimetoxi-3-metilfenil)metanona (**8**), soma dos padrões virtuais das moléculas detectadas por MS (**9**) e da fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* (**10**), no intervalo de 12,0 a 14,0 ppm.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram preparados os extratos brutos e frações resultantes da extração líquido-líquido dos ramos e folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea cordata*, os quais foram analisados por HPLC-DAD e HPLC-DAD-HRMS(ESI) para a obtenção de dados espectroscópicos utilizados na determinação do perfil químico.

Os bioensaios *in vitro* forneceram informações preliminares promissoras para estas espécies vegetais, com resultados mais relevantes para o ensaio de inibição do reagente DPPH, inibição da polimerização da hematina bovina, e inibição enzimática de acetilcolinesterásica, e guiaram a seleção das frações com maior potencial para a detecção de moléculas de interesse.

A estratégia de desreplicação dos extratos desenvolvida permitiu a rápida identificação de metabólitos presentes nas partições biologicamente promissoras. O uso da abordagem *in silico* em associação às bases de dados que compilam massas de alta resolução de metabólitos secundários permitiu a detecção de algumas moléculas com massas de alta resolução similares àquelas observadas nos extratos de *Q. grandiflora* e *Q. cordata*. Dessa série, 8 moléculas já relatadas em outras espécies vegetais, inclusive em *Qualea*, puderam ser propostas estruturalmente através de padrões de fragmentação fazendo uso de experimentos de HPLC-HRMS(ESI).

O padrão de substituição proposto pelos flavonóides C-metilados detectados na fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora* e na fração AcOEt das folhas de *Q. cordata*, e confirmados pelos íons produtos nos experimentos de MS/MS, não pode ser confirmado pelos resultados obtidos. Uma vez que estas substituições são incomuns para vegetais superiores, estando contudo presentes na fitoquímica de outras espécies de *Qualea* descritas na literatura, torna-se necessário o estudo através do uso de outras técnicas espectroscópicas para a confirmação destas substituições.

Os espectros de UV obtidos nas análises sugerem a presença de derivados do ácido elágico, isolados nas espécies estudadas em estudos descritos na literatura, e estimulam a análise *in silico* de outras frações através da técnica hifenada HPLC-HRMS(ESI) com o intuito de se detectar mais metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais, possibilitando um enfoque racional nos alvos moleculares de interesse.

Uma vez que é possível chegar ao espectro de RMN de moléculas individuais em mistura sem haver a necessidade de separação, através de sequências de pulso, a aplicação desta técnica nos estudos de desreplicação de matrizes complexas surge como um novo caminho na química de produtos naturais, suprimindo limitações importantes da

espectrometria de massas, como a falta de reprodutibilidade, resolução de misturas isoméricas, entre outras.

Neste trabalho, o uso da RMN na desreplicação iniciou-se com a elaboração de padrões virtuais de ^1H RMN produzidos a partir de dados dos quimiotipos já detectados e da comparação aos espectros de ^1H RMN pertencentes à fração AcOEt dos ramos de *Q. grandiflora*. Os resultados preliminares desta abordagem forneceram informações relevantes que auxiliam na detecção dos metabólitos propostos por MS, e permitirão obter mais dados que confirme as detecções através do uso de técnicas bidimensionais.

Os resultados obtidos neste trabalho enriquecem a discussão à respeito da aplicação da desreplicação no estudo dos produtos naturais e fornecem dados às duas espécies vegetais com potencial terapêutico.

6.REFERÊNCIAS

Referências

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, E. C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA, 1998. 304 p.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

ARAÚJO, F. W. L.; SOUZA, M. P.; BRAZ FILHO, R. Vismiaefolic acid, a new triterpene from *Vochysia vismiaefolia*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1436-1440, 1990.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; GERALDO, M. V. J.; MENOR, J. C. M.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 90-97, 2008.

BAUDOIN, G.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M.; VUILHORGNE, M.; LALLEMAND, J. Y.; JACQUEMIN, H. Isolement, structure et synthèse de la vochysine, pyrrolidinoflavanne de *Vochysia guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 681-687, 1983.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BIALY, L.; WALDMANN, H. Synthesis and biological evaluation of cytostatin analogues. **Chemical Communications**, v. 15, p. 1872-1873, 2003.

BOFF, E.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T.; SCHEID, L. A.; LORETO, E.; DAL FORNO, N. F.; AQUINO, V.; SEVERO, L. C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 36-40, 2008.

BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antiallodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 453, p. 203-208, 2002.

BOTSARIS, S. A. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of flora medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 1-8, 2007.

BRANDÃO, M.; BOTELHO, M.; KRETTLI, E. Antimalarial experimental chemotherapy using natural products. **Ciência e Cultura**, v. 37, p. 1152-1163, 1985.

BUCK, S. B.; HARDOUIN, C.; ICHIKAWA, S.; SOENEN, D. R.; GAUSS, C. M.; HWANG, I.; SWINGLE, M. R.; BONNESS, K. M.; HONKANEN, R. E.; BOGER, D. L. Fundamental role of the fostriecin unsaturated lactone and implications for selective protein phosphatase inhibition. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 15694-15695, 2003.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, 500 p.

CARDELLINA, J. H.; FULLER, R. W.; GAMBLE, W. R.; WESTERGAARD, C.; BOSWELL, J.; MUNRO, M. H. G.; CURRENS, M.; BOYD, M. R. Evolving strategies for the selection, dereplication and prioritization of antitumor and HIV-inhibitory natural products extracts. **Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 43, p. 25-35, 1999.

CHEN, H.; TALATY, N. N.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 6915-6927, 2005.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHUNG, M-S.; KIM, N-C.; LONG, L.; SHAMON, L.; AHMAD, W-Y.; SAGRERO-NIEVES, L.; KARDONO, L. B. S.; KENNELLY, E. J.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Dereplication of saccharide and polyol constituents of candidate sweet-tasting plants: isolation of the sesquiterpene glycoside mukurozioside IIb as a sweet principle of *Sapindus rarak*. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 49-54, 1997.

CLAESON, P.; GOERANSSON, U.; JOHANSSON, S.; LUIJENDIJK, T.; BOHLIN, L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 77-81, 1998.

CORRÊA, D. B.; BIRCHAL, E.; AGUIAR, J. E. V.; GOTTLIEB, O. R. Ellagic acids from Vochysiaceae. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1138-1139, 1975.

CORRÊA, D. B.; GUERRA, L. F. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S. C-Methyl phenolics from *Qualea* species. **Phytochemistry**, v. 20, p. 305-307, 1981.

CORRÊA, D. B.; GUERRA, L. F. B.; PÁDUA, A. P.; GOTTLIEB, O. R. Ellagic acids from *Callisthene major*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1860-1861, 1985.

COTTE-RODRIGUEZ, I.; TAKÁTS, Z.; TALATY, N.; CHEN, H.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 6755-6764, 2005.

CUI, B.; CHAI, H.; CONSTANT, H. L.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V.; BEECHER, C. W. W.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Limonoids from *Azadirachta excelsa*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1283-1287, 1998.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, p. 212-217, 2006.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, p. 119-122, 2005.

FRANÇA, F.; PROENÇA, C. E. B. *Vochysia palmirana* (Vochysiaceae), a new species from Goiás and Tocantins, Brazil. **Brittonia**, v. 59, p. 374-376, 2007.

GASPI, F. O. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 19-24, 2006.

GOMES, R. C. G.; BONAMIN, F.; DARIN, D. D.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C.; DOKKEDALB, A. L.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 466-471, 2009.

GU, J-Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMAN, B. N. Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 102-106, 2006.

HESS, S. C.; MONACHE, F. D. Divergioic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 104-106, 1999.

HESS, S. C.; BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; MORETTO, E.; CRUZ, R. B.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R. A. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 97-100, 1995.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. *Qualea grandiflora*, a brazilian “cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 207-214, 2006.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 502 p.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Ed. UFSCar, 2003. p. 59-100.

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

HU, Q.; NOLL, R. J.; LI, H.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; COOKS, R. G. The orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 430- 443, 2005.

IGNATUSHCHENKO, M. V.; WINTER, R. W.; BÄCHINGER, H. P.; HINRICHS, D. J.; RISCOE, M. K. Xanthones as antimalarial agents; studies of a possible mode of action. **FEBS Letters**, v. 409, p. 67-73, 1997.

JIA, Q. Generating and screening a natural product library for Cyclooxygenase and Lipoxygenase dual inhibitors. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 29, p. 643-718, 2003.

KHAN, M. T. H.; ORHAN, I.; SENOL, F. S.; KARTAL, M.; SENER, B.; DVORSKÁ, M.; SMEJKAL, K.; SLAPETOVÁ, T. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, p. 383-389, 2009.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v. 5, p. 536-549, 2010.

KINGHORN, D.; FARNSWORTH, N.; SOEJARTO, D.; CORDELL, G.; SWANSON, S.; PEZZUTO, J.; WANI, M.; WALL, M.; OBERLIES, N.; KROLL, D.; KRAMER, R.; ROSE, W.; VITE, G.; FAIRCHILD, C.; PETERSON, R.; WILD, R. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 53-67, 2003.

LAMBERT, M.; STRK, D.; HANSEN, S. H.; SAIRAFIANPOUR, M.; JAROSZEWSKI, J. W. Rapid extract dereplication using HPLC-SPE-NMR: analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1500-1509, 2005.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

LEEDS, J. A.; SCHMITT, E. K.; KRASTEL, P. Recent developments in antibacterial drug discovery: microbe-derived natural products - from collection to the clinic. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, p. 211-226, 2006.

LI, W. H. J.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; LEITÃO FILHO, H. F. 5-Deoxyflavones from the Vochysiaceae. **Phytochemistry**, v. 18, p. 362, 1979.

MARSTON, A.; KISSILING, J.; HOSTETTMANN, K. A. A rapid TLC bioautography method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MASOKO, P.; ELOFF, J. N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 1425-1431, 2005.

MATTEUCI, M. B. A.; GUIMARÃES, N. N. R.; TIVERON FILHO, D.; SANTOS, C. A flora do cerrado e suas formas de aproveitamento. **Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária**, v. 25, p. 13-30, 1995.

MAYWORM, M. A. S.; SALATINO, A. Distribution of seed fatty acids and the taxonomy of Vochysiaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 91-972, 2002.

MAYWORM, M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S.; SALATINO, A. Monomer composition of polysaccharides of seed cell walls and the taxonomy of Vochysiaceae. **Phytochemistry**, v. 55, p. 581-587, 2000.

MINGUZZI, S.; BARATA, L. E. S.; SHIN, Y. G.; JONAS, P. F.; CHAI, H-B.; PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 635-641, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

- MUNOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. evaluation of the antimalarial activity of plants used by the chacobo indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 127-137, 2000.
- NASSER, A. L. M. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Qualea* ssp (Vochysiaceae).** 2007. 197 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- NASSER, A. L. M.; MAZZOLIN, L. P.; EBERLIN, M. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Preparative droplet counter-current chromatography for the separation of the new nor-seco-triterpene and pentacyclic triterpenoids from *Qualea parviflora*. **Chromatographia**, v. 64, p. 695-699, 2006.
- NASSER, A. L. M.; CARLI, C. B. A.; RODRIGUES, C. M.; MAIA, D. C. G.; CARLOS, I. Z.; EBERLIN, M. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Identification of ellagic acid derivatives in methanolic extracts from *Qualea* species. **Journal of Biosciences**, v. 63, p. 794-800, 2008.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, p. 313-331, 2009.
- NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W-T.; GHASSEMIAN, M.; SIMMONS, T. L.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication and *de novo* sequencing of nonribosomal peptides. **Nature Methods**, v. 6, p. 596-599, 2009.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. System biology: metabonomics. **Nature**, v. 455, p. 1054-1056, 2008.
- NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.

- PAULI, G. F.; KUCZKOWIAK, U.; NAHRSTEDT, A. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, p. 827-836, 1999.
- POT, A.; POT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Planaltina: EMBRAPA, 1994. 320 p.
- POTTERAT, O.; KLAUS, W.; HAAG, H. Liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptides in a crude extract of the fungus *Metarrhizium anisopliae*. **Journal of Chromatography A**, v. 872, p. 85-90, 2000.
- RAMAKRISHNA, N. V. S.; NADKARNI, S. R.; BHAT, R. G.; NAKER, S. D.; VIJAYA KUMAR, E. K. S.; LAL, B. Screening of natural product extracts for antibacterial activity: early identification and elimination of known compounds by dereplication. **Indian Journal of Chemistry**, v. 38, p. 1384-1387, 1999.
- RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217-223, 2001.
- ROBB, D. B.; BLADES, M. W. State-of-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, p. 34-49, 2008.
- ROCHA, A. B.; SILVA, J. B.; PANIZZA, S. Substâncias tânicas da casca de *Qualea grandiflora* Martius (Vochysiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 2, p. 109-114, 1980.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande-Minas Gerais. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 25, p. 102-123, 2001.
- SAJO, M. G.; RUDALL, P. J. Leaf and stem anatomy of Vochysiaceae in relation to subfamilial and suprafamilial systematic. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 138, p. 339-364, 2002.
- SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SINGH, M. P. Rapid test for distinguishing membrane-active antibacterial agents. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 125-130, 2006.

SCHULTES, R. E.; RAFFAULF, R. F. **The healing forest**: medicinal and toxic plants of the northwest amazonia. Portland: Discorides Press, 1990, 484 p.

SOUZA, C. P. de; AZEVEDO, M. L. de; LOPES, J. L.; SARTI, S. J.; SANTOS FILHO, D. dos; LOPES, J. N.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M.; LEITÃO FILHO, H. F. Chemoprophylaxis of schistosomiasis: molluscacidal activity of natural products assays with adult snails and oviposition. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, p. 333-338, 1984.

STAVRI, M.; SCHNEIDER, R.; O'DONNELL, G.; LECHNER, D.; BUCAR, F.; GIBBONS, S. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 774-776, 2004.

STEFANOWICZ, P.; PRASAIN, J. K.; YEBOAH, K. F.; KONISHI, Y. Detection and partial structure elucidation of basic taxoids from *Taxus wallichiana* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 3583-3589, 2001.

STESSMAN, C. C.; EBEL, R.; CORVINO, A. J.; CREWS, P. Employing dereplication and gradient 1D NMR methods to rapidly characterize sponge-derived sesterterpenes. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1183-1186, 2002.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry and biology. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 1261-1275, 2005.

THEODORIDIS, G.; GIKA, H. G.; WILSON, I. D. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 251-260, 2008.

ULRICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H.; WAGNER, H. Application of the "-Omic-" technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, p. 70-82, 2007.

VAN ELSWIJK, D. A.; SCHOBEL, U. P.; LANSKY, E. P.; IRTH, H.; VAN DER GREEF, J. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 65, p. 233-241, 2004.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and system biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 53-56, 2005.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 3-14, 2007.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; LACHAVANNE, J-B.; HOSTETTMANN, K. Identification of the polar constituents of *Potamogeton* species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MS_n and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2401-2410, 2004.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight *tandem* mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 29-41, 2001.

WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B. H.; VONTHRON-SÉNÉCHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. J.; BASARAN, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 75-77, 2005.

WOLFENDER, J-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

WOLFENDER, J-L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-ToF-MS/MS and multiple stage IT-MS_n for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analysis**, v. 28, p. 895-906, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine strategy 2002-2005**. Geneva, 2002. 61 p.

YOUDIM, K. A.; SAUNDERS, K. C. A review of LC–MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p.1326-1336, 2010.

ZUCARO, Y. L.; COMPAGNONE, R. S.; HESS, S. C.; MONACHE, F. D. 6 β -Hydroxymaslinic acid, a triterpene from *Vochysia ferruginea*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 241-244, 2000.