AMAURI ALVES DE SOUZA JÚNIOR

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

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

Orientadora: Profª Drª Maysa Furlan
Coorientador: Prof Dr Ian Castro-Gamboa

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan
Coorientador: Ian Castro-Gamboa

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

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

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

Página 10 e linha 27 (AGRADECIMENTOS)

Onde se lê

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

Leia-se

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

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

Instituto de Química

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: AMAURI ALVES DE SOUZA JÚNIOR
ORIENTADORA: MAYSA FURLAN
COORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

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

Profª. Drª. MAYSA FURLAN
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. ANGELA REGINA ARAUJO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. RICARDO VESSECCHI LOURENÇO
Departamento de Quimica / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Profª. Drª. TAICIA PACHECO FILL
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 29 de outubro de 2018

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Amauri Alves de Souza Júnior
Filiação: Amauri Alves de Souza e Lúcia Dias Souza
Nascimento: 17/01/1989, Ipameri – GO, Brasil
e-mail: amaurialvejunior@gmail.com
Citação bibliográficas: Souza, A. A.; Souza Júnior, A. A.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutorado em Química

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

Equipe

Doutorando: Amauri Alves de Souza Júnior[1]
Orientadora: Profª Drª Maysa Furlan[1]
Coorientador: Prof Dr Ian Castro-Gamboa[1]
Período: 2014-2018

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

[1]Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Química, Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-060, Araraquara - SP, Brasil

Estágio de doutoramento: University of California – UCDAVIS, DAVIS – CA, USA
Supervisor: Prof. Dr. Dean J. Tantillo.
Período: 01 de setembro a 31 de dezembro de 2017

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

Mestrado em Química

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

Equipe

Doutorando: Amauri Alves de Souza Júnior[1]
Orientadora: Profª Drª Maysa Furlan[1]
Período: 2011-2014

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

[1]Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Química, Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-060, Araraquara - SP, Brasil

Graduação em Química

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

Período: 2007-2011

Iniciação Científica

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

Equipe

Aluno: Amauri Alves de Souza Júnior[2]
Orientadora: Profª Drª Silvia de Sousa Freitas[2]
Período: 2009-2011

Agências de fomento: CNPq

[2]Univervsidade Federal de Goiás – UFG, Departamento de Químia, Avenida Drº. Lamartine Pinto de Avelar, 1120, Setor Universitário, 75704-020, Catalão - GO, Brasil

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F.; PRATI, A. U. C.; SOUZA JUNIOR, A. A.; MAZZEU, B. F; FELIPPE, L. G.; PINTO, R. A.; GOLIM, M. A.; ARRUDA, M. S. P.; FURLAN, M.; VENTURINI, J. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. *Plos One*, v. 13, p. e0198682, **2018**.

2. POLITI, F. A. S.; SOUZA JUNIOR, A. A.; FANTATTO, R. R.; PIETRO, R. C. L. R.; BARIONI, W.; RABELO, M. D.; BIZZO, H. R.; DE SOUZA CHAGAS, A. C.; FURLAN, M. Chemical composition and *in vitro* anthelmintic activity of extracts of *Tagetes patula* against a multidrug-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Chemistry & Biodiversity*, v.15, p. e1700507, **2018**.

3. TAVARES, W. S.; GRAZZIOTTI, G. H.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; SOUSA, S. F.; CONSOLARO, H. N.; RIBEIRO, P. E. A.; ZANUNCIO, J. C. Screening of Extracts of Leaves and Stems of *Psychotria* spp. (Rubiaceae) against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) for Maize Protection. *Journal of Food Protection*, v. 76, p. 1892-1901, **2013**.

Artigo científico (em análise)

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

Artigo científico (em preparo)

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

Participação em evento científico – Nacional

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

2. **1ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp Araraquara**. Realizado no Instituto de Química, Araraquara – SP, Brasil. Período: 09 e 13 de janeiro de 2017.

3. **XXXIV Escola de Verão em Química**. Realizado na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil. Período: 17 a 21 de fevereiro de 2014.

Participação em evento científico – Internacional

1. **The American Society of Pharmacognosy Annual Meeting**. July 29 - August 2, 2017. Portland – OR, USA.

2. **46th World Chemistry Congress and IUPAC 49th General Assembly**. July 7th - 14th, 2017. São Paulo - SP, Brazil.

3. **9th Joint Natural Products Conference**. July 24-27, 2016. Copenhagen, Denmark.

4. **II Simpósio Internacional de Medicina Regenerativa e Inovação em Saúde.** November 19-21, 2015. Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, Brazil.

5. **2nd International Conference on Natural Products Utilization.** October 14-17, 2015. Plovdiv, Bulgária.

6. **First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics.** March 13-14, 2015. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil.

Apresentação de trabalho – Evento científico Internacional

1. SOUZA, A. A.; VESSECCHI, R.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. **ESI-MS/MS and computational chemistry: important tools for dereplication of benzopyrans from Piperaceae species**. 2017. The American Society of Pharmacognosy Annual Meeting. Saturday, July 29 - August 2, 2017. Portland – OR, USA.

2. SOUZA JÚNIOR, A. A.; ZANIN, L. L.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M. **Metabolomics studies of Piperaceae species: a correlation between miniaturization and direct extraction strategies**. 2016. 9th Joint Natural Products Conference. July 24-27, 2016. Copenhagen, Denmark.

3. SOUZA JÚNIOR, A. A.; PIVATTO, M.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P.; FURLANA, M. **ESI-MS/MS of benzopyrans: a systematic study of fragmentation mechanism for metabolomic approach**. 2015. 2nd

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

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

Publicação de trabalho – Evento científico Internacional

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

Palestra

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

Seminário

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

Conferência – Evento científico

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

Participação em cursos

1. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE: princípios teóricos**. 05 a 07 e agosto de 2015. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, São Carlos - SP, Brasil. Carga Horária: 24 h.

2. **Introduction to Plant Metabolomics**. 17 a 21 de fevereiro de 2014. Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, São Carlos - SP, Brasil. Carga Horária: 20 h.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de alguns dos produtos naturais isolados no século XIX: emetina, colchicina, quinina, salicina, atropina, morfina,* quinidina, codeína e efedrina. 27

Figura 2 – Estrutura química do ácido acetilsalicílico.* 28

Figura 3 - Representação dos íons positivos e negativos que podem ser produzidos nas análises por ESI-MS.[a,b,c] 33

Figura 4 - Proposta para a formação de espécies protonadas de um benzopirano genérico com base no equilíbrio ácido-base de Brönsted-Lowry. 35

Figura 5 - Estrutura química da piperina.* 37

Figura 6 - Estruturas químicas e nomenclatura de 1-benzopiranos, incluindo cromano, 2*H*-cromeno e 4*H*-cromeno. Esses heterocíclicos são o núcleo base de uma extensa variedade de produtos naturais. 37

Figura 7 - Estruturas químicas de alguns 1-benzopiranos naturais.* 39

Figura 8 - Estruturas químicas do 2*H*-cromeno ácido gaudichaudiânico isolado do extrato etanólico de *Piper gaudichadianum* (Piperaceae) e, do derivado esterificado obtido por modificação molecular. 40

Figura 9 - Estruturas químicas dos cromanos isolados do extrato etanólico de partes aéreas *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae).* 40

Figura 10 - Estruturas químicas dos cromanos esterificados com monoterpenos do tipo endo-borneol e endo-fenchol, isolados da fração lipofílica do extrato etanólico das partes aéreas de *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae). 41

Figura 11 - Proposta biossintética de benzopiranos em espécies de *Piper* e *Peperomia*. 41

Figura 12 - Estruturas químicas dos 2*H*-cromenos **1**-**3** previamente isolados do extrato bruto das partes aéreas de *Piper aduncum* (Piperaceae). M.M. indica o valor da massa molecular em unidades de massa atômica (*u*). 52

Figura 13 - Mapa do potencial eletrostático molecular (MEP) de **1** calculado no modelo B3LYP/6-31+G(d,p). A magnitude da densidade de elétrons é indicada pelas cores vermelho (maior) e azul (menor). A análise do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) é ilustrada a direita do MEP. 53

Figura 14 - Cargas atômicas (MK) usando o esquema Merz-Singh-Kollman para os átomos de oxigênios de **1**-**3** calculadas no modelo B3LYP/6-31+G(d,p). 53

Figura 15 - Afinidade protônica (valores em negrito) e basicidade em fase gasosa em kcal/mol para **1**-**3**, calculadas para as principais formas protonadas no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).....54

Figura 16 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**1**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 235. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV. 55

Figura 17 - Proposta de fragmentação para a [**1**+H]$^+$. Na figura são apresentadas duas rotas, denominadas a1 e a2.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).....57

Figura 18 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 235 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. 58

Figura 19 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**2**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 219. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV. 59

Figura 20 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 219 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. 59

Figura 21 - Proposta de fragmentação para a [**2**+H]$^+$. Na figura são apresentadas duas rotas, denominadas b1 e b2.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).....60

Figura 22 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**3**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 287. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV. 61

Figura 23 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 287 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. 62

Figura 24 - Diagrama de energia para a etapa de transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano, produzindo duas espécies protonadas de **3** (**C1** e **C1'**).* 64

Figura 25 - Proposta de fragmentação para a [**3**+H]$^+$. Na figura são apresentadas três rotas, denominadas de c1, c2 e c3.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p). .65

Figura 26 - Diagrama de energia para a perda de 3-metilbuta-1,2-dieno a partir da [**3**+H]$^+$ (C2).*.....67

Figura 27 - Proposta de fragmentação para a $[M+H]^+$ considerando o mecanismo retro Diels-Alder. M indica um benzopirano genérico. 68

Figura 28 - Estruturas químicas dos cromanos **4**-**6**. As substâncias foram estudadas usando o modelo B3LYP/6-311++G(d,p). 69

Figura 29 - Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie neutra (M, neutra).* 70

Figura 30 - Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie protonada na hidroxila fenólica {$[M+H]^+$, espécie protonada}.* 71

Figura 31 - Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie protonada no átomo de oxigênio do anel pirano {$[M+H]^+$, espécie protonada}.* 72

Figura 32 - Afinidade protônica (valores em negrito) e basicidade em fase gasosa em kcal/mol para as substâncias **4**-**12**, calculadas para as principais formas protonadas no modelo B3LYP/6-311++G(d,p). 74

Figura 33 - Geometrias otimizadas para os benzopiranos **4**, **7**, **8**, **9** e **10** no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).* 76

Figura 34 - Geometrias otimizadas para os benzopiranos **4**, **7**, **8**, **9** e **10** no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).* 77

Figura 35 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**10**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 327. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV. 79

Figura 36 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 327 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. 79

Figura 37 - Proposta de fragmentação para a [**10**+H]$^+$.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) relativas são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).* 80

Figura 38 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**11**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV. 82

Figura 39 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 371 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF. 82

Figura 40 - Proposta de fragmentação para a [**11**+H]$^+$.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).....85

Figura 41 - Espectro de massas de ESI(+)-MS/MS da [**12**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV. 86

Figura 42 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 507 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adiquiridos em aparelho Q-TOF. 87

Figura 43 - Proposta de fragmentação para a [**12**+H]$^+$.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).....88

Figura 44 - Gráficos de rendimento em função do solvente de extração para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU), B) *Piper tuberculatum* (PIARB) e C) *Piper arboreum* (PITUB). Para cada espécie os rendimentos dos extratos brutos e daqueles após o preparo de amostra são indicados pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente. 90

Figura 45 - Perfil do número de bandas cromatográficas detectadas (nBCd),* a 254 nm, para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU), B) *Piper tuberculatum* (PIARB) e C) *Piper arboreum* (PITUB). As fases móveis constituídas por ACN/H_2O e MeOH/H_2O são indicadas pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente. 92

Figura 46 - Gráficos de rendimento em função do solvente de extração para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU) e B) *Peperomia obtusifolia* (PEOBT). Para cada espécie os rendimentos dos extratos brutos e daqueles após o preparo de amostra são indicados pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente. O valor na cor verde é o número de bandas cromatográficas detectadas (nBCd) a 254 nm.* 95

Figura 47 - Espectros de massas ESI(+)-MS/MS obtidos em um aparelho Q-TOF selecionando os íons precursores: A) *m/z* 235 e B) *m/z* 219. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV. 97

Figura 48 - Curvas de energia obtidas a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS para os íons precursores: A) *m/z* 235 e B) *m/z* 219. A faixa de ativação de íons utilizada foi de 5 a 35 eV. A *m/z* observada em alta resolução para cada íon precursor é mostrada na parte superior da curva de energia. O experimento foi adquirido em um aparelho Q-TOF.....98

Figura 49 - Proposta de fragmentação para os íons *m/z* 235 e 219.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p). 101

Figura 50 - Espectros de massas ESI(+)-MS/MS obtidos em um aparelho Q-TOF selecionando os íons precursores: A) *m/z* 327 e B) *m/z* 371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV. 104

Figura 51 - Curvas de energia obtidas a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS para os íons precursores: A) *m/z* 327 e B) *m/z* 371. A faixa de ativação de íons utilizada foi de 5 a 35 eV. A *m/z* observada em alta resolução para cada íon precursor é mostrada na parte superior da curva de energia. O experimento foi adquirido em um aparelho Q-TOF.....105

Figura 52 - Diagrama de energia para a etapa de transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano produzindo duas formas protonadas da substância **6** (**F1** e **F1'**).* 107

Figura 53 - Proposta de fragmentação para o íon *m/z* 327. No esquema é apresentado uma terceira proposta para a química de fragmentação do cromano **10**.* 108

Figura 54 - Proposta de fragmentação para o íon *m/z* 371.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p). 110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25

1.1 A importância dos produtos naturais 25
1.2 Metabolômica 29
1.3 Processo de extração para estudos metabolômicos 31
1.4 Espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray 32
1.4.1 Intepretração de dados de ESI-MS/MS assistida por química computacional 34
1.5 A família Piperaceae 36
1.5.1 Benzopiranos 37

2 OBJETIVO 42

2.1 Objetivos específicos 42

3 PARTE EXPERIMENTAL 43

3.1 Suporte cromatográfico 43
3.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 43
3.1.2 Cartuchos para extração em fase sólida e membranas para filtração 43
3.2 Equipamentos 43
3.2.1 Instrumento para análises por CLAE 43
3.2.2 Instrumentos para análises por espectrometria de massas em alta resolução ou experimentos sequenciais 44
3.3 Plataforma computacional 45
3.3.1 Supercomputadores 45
3.3.2 Programas para processamento, análise e apresentação de dados 45
3.4 Métodos 45
3.4.1 Coleta e classificação de material vegetal 46
3.4.1.1 Preparo do material vegetal 46
3.4.1.2 Isolamento e purificação de 2H-cromenos e cromanos 47
3.4.2 Estudo de 2*H*-cromenos e cromanos por espectrometria de massas 47
3.4.2.1 Preparo de amostra 47
3.4.2.2 Análises por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS 47
3.4.3 Estudo do processo de extração de espécies de Piper e Peperomia 48
3.4.3.1 Preparo dos extratos vegetais 48
3.4.3.2 Preparo de amostra 48
3.4.3.3 Análises por CLAE 49

3.4.4 Análises dos extratos vegetais por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS 50
3.4.5 Métodos computacionais.....50

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....52

4.1 Estudo do padrão de dissociação de 2*H*-cromenos isolados de *Piper aduncum* por ESI(+)-MS/MS e química computacional 52
4.2 Estudo do padrão de fragmentação de cromanos isolados de *Peperomia obtusifolia* por ESI(+)-MS/MS e química computacional 68
4.3 Estudo do processo de extração de espécies de *Piper*: rastreamento analítico do perfil metabólico por CLAE.....89
4.4 Estudo do processo de extração das espécies de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*: rastreamento analítico do perfil metabólico por CLAE. 93
4.5 Identificação de 2*H*-cromenos e cromanos em extratos vegetais a partir dos dados obtidos nas análises por ESI(+)-MS/MS e química computacional.....96

5 CONCLUSÃO.....111

REFERÊNCIAS.....113

APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS 123

APÊNDICE B – COORDENADAS CARTESIANAS (XYZ) E GRANDEZAS TERMOQUÍMICAS.....126

APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES POR CLAE 137

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância dos produtos naturais

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

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

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

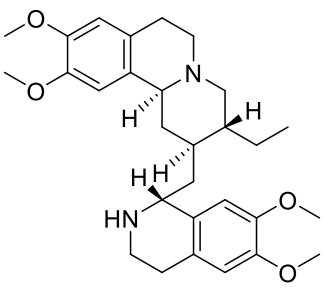
A evolução da ciência e a difusão do conhecimento ao longo de muito tempo (p. ex., sólida medicina tradicional documentada em farmacopéias), especialmente a partir do início do século XIX, impulsionaram o isolamento de inúmeras substâncias farmacologicamente ativas obtidas a partir de plantas medicinais[1–5,7].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

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

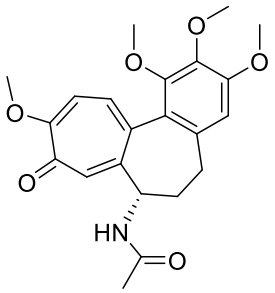
Nesta vertente, o arranjo sistemático desses resultados associado com o acesso a instrumentação analítica robusta e precisa permitiu o desenvolvimento de formulações e o início de uma nova era na medicina. Neste momento, os medicamentos poderiam ser administrados aos pacientes em doses precisas. Um exemplo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

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

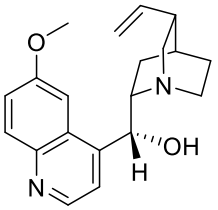
No contexto histórico, em 1828, o farmacêutico alemão J. A. Buchner concluiu que o glicosídeo do álcool salicílico era o principal princípio ativo da planta *Salix alba* (Salicaceae), a qual as cascas eram utilizadas popularmente para alívio das dores e febre. Em 1860, os químicos alemães H. Kolbe e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



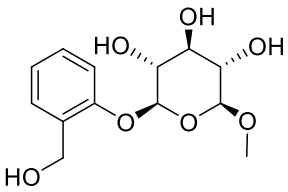
emetina



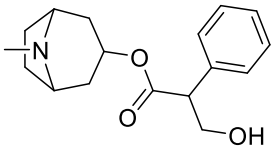
colchicina



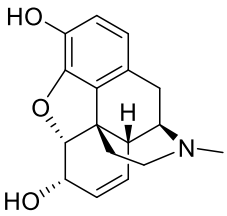
quinina



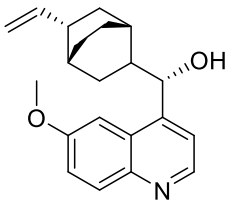
salicina



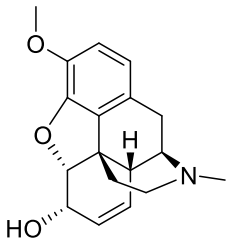
atropina



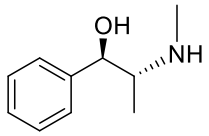
morfina



quinidina



codeína

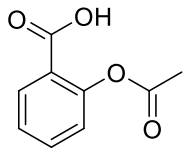


efedrina

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

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

Fonte: Elaborada pelo autor.



ácido acetilsalicílico

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

Figura 2 – Estrutura química do ácido acetilsalicílico.*

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

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

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

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

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

1.2 Metabolômica

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

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

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

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

ii) As análises com ênfase na impressão digital metabólica consistem em comparar um panorama geral do metaboloma de amostras distintas. Nesse tipo de abordagem, o objetivo é indicar diferenças na composição metabólica das amostras selecionadas. Assim, a capacidade para identificar e quantificar todos os metabólitos presentes nas matrizes em estudo não é um requisito para o desenvolvimento desse tipo de proposta. Por exemplo, a impressão digital metabólica pode ser utilizada no controle de qualidade de plantas medicinais. O conhecimento prelimiar sobre o metabolismo da espécie alvo, permite definir os métodos instrumentais e os modelos estatísticos mais adequados para aquisição, tratamento e interpretação de dados[16,19,21,22].

iii) O perfil metabólico por sua vez, é uma abordagem com objetivo de determinar variações qualitativas e quantitativas nas substâncias detectadas, de acordo com a técnica analítica de trabalho. Nessa proposta, a percepção de variações específicas em uma ou mais classes de substâncias, auxilia no entendimento da influência de fatores bióticos e/ou abióticos sobre a dinâmica metabólica dos indivíduos estudados. Por exemplo, o perfil metabólico pode ser utilizado para monitorar as respostas bioquímicas de indivíduos modificados geneticamente[17,19,22,25].

iv) A quarta abordagem metabolômica é denominada de análise alvo, que consiste na determinação qualitativa ou quantitativa de metabólitos específicos ou marcadores biológicos produzidos por um dado organismo, célula ou tecido. Os parâmetros que alicerçam a análise alvo estão em acordo com os princípios fundamentais relacionados a prospecção de PNs bioativos. Por exemplo, espécies vegetais previamente investigadas podem ser estudadas com a finalidade de

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

1.3 Processo de extração para estudos metabolômicos

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

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

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

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

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

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

1.4 Espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray

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

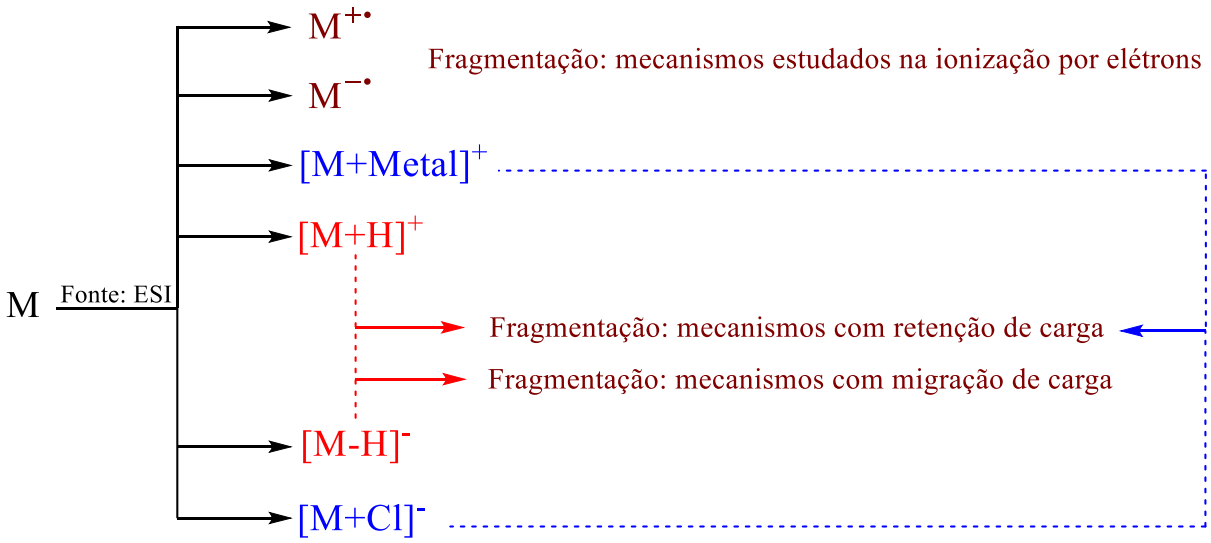
Em termos do fenômeno de geração de íons durante a execução dos experimentos por MS de amostras líquidas, os processos que caracterizam a transferência dessas espécies da fase líquida para gasosa (Figura 3) podem ser sistematizados em três principais transformações químicas: i) os processos de remoção/adição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

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

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

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

A técnica de ativação de íons utilizada com frequência na área de PNs é a dissociação induzida por colisão (CID-MS/MS). Nessa técnica a transferência de energia ocorre a partir da colisão induzida do íon precursor com o gás de colisão (p. ex.: gás N_2)[17,22,35–38].



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

Figura 3 - Representação dos íons positivos e negativos que podem ser produzidos nas análises por ESI-MS.[a,b,c]

Fonte: Adaptado de Demarque et al.[36] (2016).

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

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

1.4.1 Intepretração de dados de ESI-MS/MS assistida por química computacional

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

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

fase gasosa, o que torna a interpretação da química de fragmentação desafiadora[35,36,40,42–44].

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

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

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

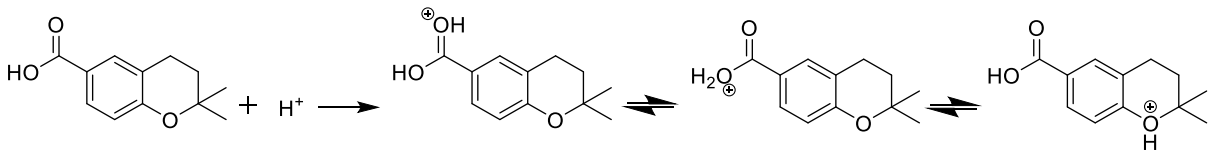


Figura 4 - Proposta para a formação de espécies protonadas de um benzopirano genérico com base no equilíbrio ácido-base de Brönsted-Lowry.

Fonte: Elaborada pelo autor.

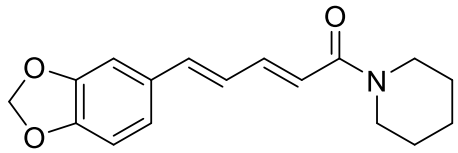
1.5 A família Piperaceae

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

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

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

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



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

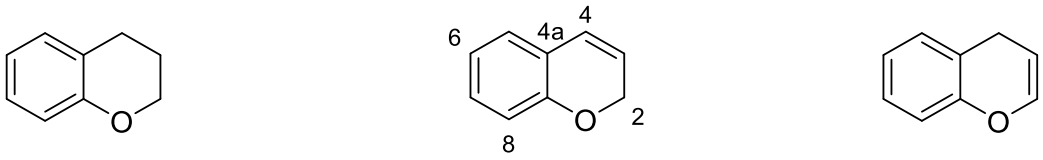
Figura 5 - Estrutura química da piperina.*

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

1.5.1 Benzopiranos

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



cromano 2*H*-cromeno 4*H*-cromeno

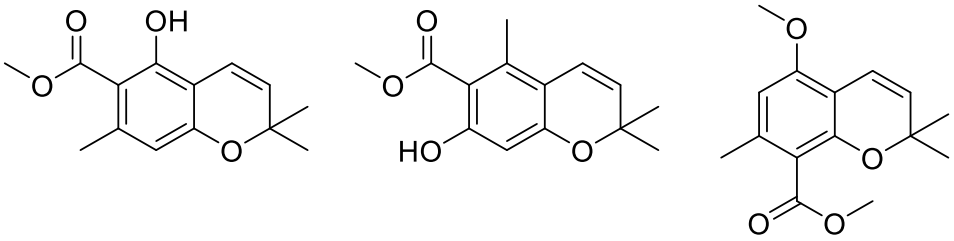
Figura 6 - Estruturas químicas e nomenclatura de 1-benzopiranos, incluindo cromano, 2*H*-cromeno e 4*H*-cromeno. Esses heterocíclicos são o núcleo base de uma extensa variedade de produtos naturais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

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

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



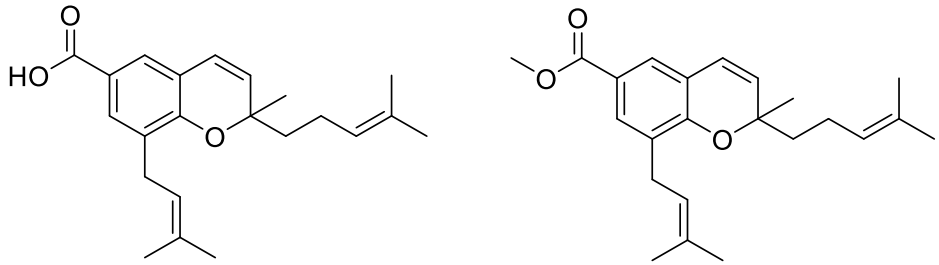
* Esses 2*H*-cromenos são biossintetizados em espécies de Piperaceae[55].

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

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

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

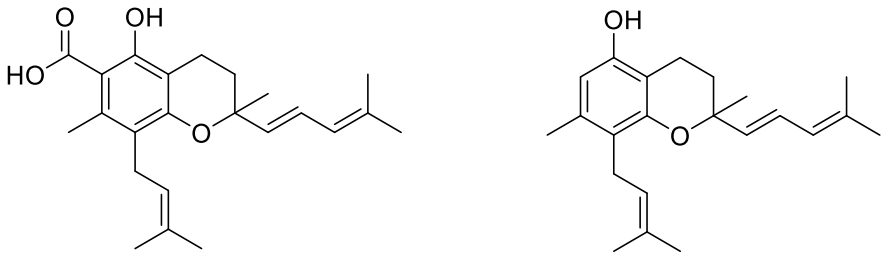


* Ensaio biológico *in vitro* foi realizado com a mistura racêmica desses 2*H*-cromenos frente a cepa Y de *Trypanossoma cruzi*[87].

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

Fonte: Elaborada pelo autor.

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



* A mistura racêmica de cada cromano foi ativa frente frente à cepa Y de *Tripanossoma cruzi*[65].

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

Fonte: Elaborada pelo autor.

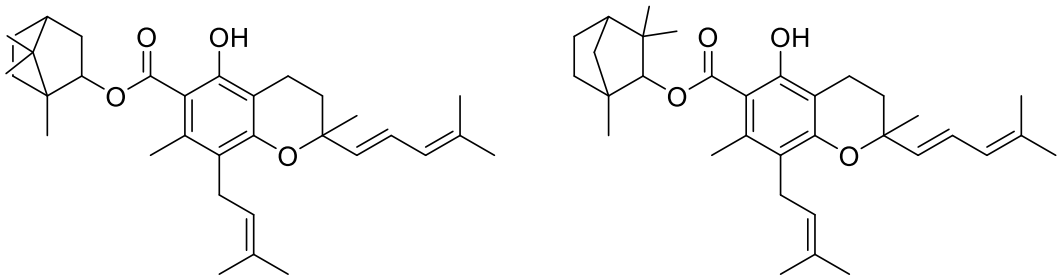


Figura 10 - Estruturas químicas dos cromanos esterificados com monoterpenos do tipo endo-borneol e endo-fenchol, isolados da fração lipofílica do extrato etanólico das partes aéreas de *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae).

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

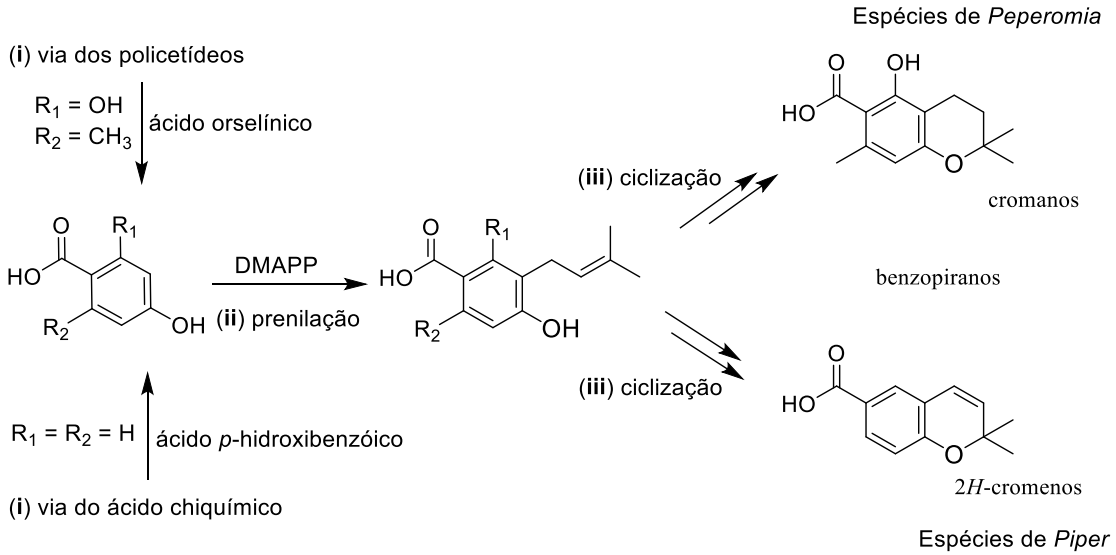


Figura 11 – Proposta biossintética de benzopiranos em espécies de *Piper* e *Peperomia*.

Fonte: Adaptado de Batista et al.[86] (2018).

2 OBJETIVO

- ✓ Aplicar ferramentas experimentais e computacionais no desenvolvimento de estratégias em química de produtos naturais para a prospecção de 2*H*-cromenos e cromanos em matrizes complexas.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Utilizar de métodos computacionais, obtidos por meio da teoria do funcional de densidade, para estudar os principais sítios de protonação de 2*H*-cromenos e cromanos;
- ✓ Efetuar cálculos de diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação do núcleo benzopirano com base no mecanismo de retro Diels-Alder;
- ✓ Utilizar os dados obtidos por ESI-MS/MS e termoquímica computacional para propor um modelo de fragmentação para 2*H*-cromenos e cromanos isolados de espécies de Piperaceae.
- ✓ Preparar extratos vegetais por maceração em solventes orgânicos e triar o perfil metabólico de espécies de *Piper* e *Peperomia* por cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Analisar os extratos vegetais de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* por ESI(+)-MS/MS;
- ✓ Propor a identificação estrutural de 2*H*-cromenos e cromanos em extratos vegetais à partir da interpretação de dados obtidos por ESI(+)-MS/MS e termoquímica computacional.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Suporte cromatográfico

3.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em modo reverso, sendo as colunas cromatográficas analíticas preenchidas com fase estacionária de octadecilsilano (C_{18}):

- ✓ Phenomenex Luna® C_{18} (100 × 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm) e uma pré-coluna: Phenomenex Luna® C_{18} (50 × 4,6 mm);
- ✓ Phenomenex Luna® C_{18} (250 × 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm) e uma pré-coluna: Phenomenex Luna® C_{18} (50 × 4,6 mm).

3.1.2 Cartuchos para extração em fase sólida e membranas para filtração

Para as análises por CLAE as amostras foram previamente submetidas a uma etapa de preparo de amostra, incluindo o processo de extração em fase sólida e filtração. Para esses procedimentos foram empregados:

- ✓ Cartuchos empacotados com fase estacionária de octadecilsilano, marca Strata® (cartuchos de 3 mL preenchidos com 500 mg de fase estacionária);
- ✓ Microfiltro de Nylon em carcaça de polipropileno, marca Chromafil®Xtra (membranas de 13 mm de diâmetro e porosidade de 0,22 µm).

3.2 Equipamentos

3.2.1 Instrumento para análises por CLAE

- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® (Kyoto, Japão) equipado com bombas LC-6AD, detector DAD modelo SPD-M20A, injetor automático modelo SIL-10AF, degaseificador DGU-20A5, controladora CBM-20A. A

interface equipamento/usuário é realizada por meio do software LC-Solution (versão 1.23 SP1).

3.2.2 Instrumentos para análises por espectrometria de massas em alta resolução ou experimentos sequenciais

- ✓ Espectrômetro de massas Bruker Daltonics® modelo micrOTOF-Q II (Q-TOF) equipado com fonte de ionização por electrospray. Para a aquisição de dados foi utilizado o software Bruker DataAnalysis®, versão 4.1. As análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), vinculado a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo. O laboratório é coordenado pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes;
- ✓ Espectrômetro de massas Bruker Daltonics® modelo maXis impact (Q-TOF) equipado com fonte de ionização por electrospray. Para a aquisição de dados foi utilizado o software Bruker DataAnalysis®, versão 4.1. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas, vinculado ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo. O laboratório é coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli;
- ✓ Espectrômetro de massas AB SCIEX® modelo 3200 QTRAP (triplo quadrupolo-íon trap linear) equipado com fonte de ionização por elec trospray. Para aquisição de dados foi utilizado o software Analyst®, versão 1.5.2. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas, vinculado ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo. O laboratório é coordenado pela Prof.ª Dr.ª Maria Valnice Boldrin Zanoni.

3.3 Plataforma computacional

3.3.1 Supercomputadores

- ✓ National Science Foundation por meio da XSEDE (Extreme Science and Enginnering Discovery Environment) – Categoria Bridges (PSC), United States;

- ✓ Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil.

3.3.2 Programas para processamento, análise e apresentação de dados

- ✓ LC-Solution versão 1.23 SP1 (Shimadzu Corporation);
- ✓ Bruker Data Analysis versão 4.1 (Bruker Daltonics);
- ✓ ChemDraw 16 (PerkinElmer, Inc.);
- ✓ Gaussian 09 (Gaussian, Inc.);
- ✓ Gaussian 03 (Gaussian, Inc.);
- ✓ Spartan'10 (Wavefunction, Inc.);
- ✓ CYLview v1.0.561 BETA;
- ✓ Molekel 5.4.0.8.

3.4 Métodos

As etapas experimentais descritas a seguir foram desenvolvidas nos Laboratórios do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, vinculados ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo. Paralelamente, a colaboração com o Prof. Ricardo Vessecchi (FFCLRP - USP), e a participação em um estágio de doutorado no grupo do Prof. Dean J. Tantillo (Theoretical Organic Chemistry - UCDAVIS, USA) auxiliaram significativamente no aprendizado e na obtenção de dados relacionados as grandezas termoquímicas de benzopiranos e, consequentemente, para a conclusão da tese de doutoramento.

3.4.1 Coleta e classificação de material vegetal

Para o desenvolvimento do trabalho, as espécies *Piper aduncum*, *Peperomia obtusifolia*, *Piper tuberculatum* e *Piper arboreum* foram coletadas na casa de vegetação do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP, Brasil. As espécies *P. aduncum* e *Peperomia obtusifolia* foram identificadas pela Drª Inês Cordeiro do Instituto de Botânica (IBt, São Paulo, SP, Brasil) e suas exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica (USP, São Paulo, SP, Brasil), exsicata Kato 0057, e no Herbário do Estado "Maria Eneyda P. Kaufmann Fidalgo" (São Paulo, SP, Brasil), exsicata Kato 070, respectivamente. *P. tuberculatum* e *P. arboreum* foram identificadas pelo professor Dr. Guillermo E. D. Paredes da Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG, Lambayeque, Perú) e suas exsicatas estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica (USP, São Paulo, SP, Brasil), exsicata Kato-163, e no Herbário do Instituto de Biociências (USP, São Paulo, SP, Brasil), exsicata Cordeiro-1936, respectivamente.

3.4.1.1 Preparo do material vegetal

As partes aéreas das espécies estudadas foram coletadas durante o período de 24 h, com intervalo de 8 h entre cada coleta. Essa metodologia foi utilizada com o propósito de aperfeiçoar a representatividade dos cromanos e 2*H*-cromenos nas amostras, uma vez que as preniltransferases envolvidas na formação de 2*H*-cromenos em *Piper aduncum* descrevem ritmo circadiano diurno[70].

Após coleta, o material vegetal foi submetido à etapa de preparo físico das amostras sólidas. Inicialmente, o material foi mantido em estufa de ar circulante a 40 ^{o}C e, a seguir, a redução da granulometria das partículas da matriz foi obtida por processo analítico de pulverização em moinho de facas e peneiramento manual por via seca, com designação das frações granulométricas < 0,35 mm de abertura. A homogeneização das amostras sólidas foi processada manualmente. Ao término de sucessivas etapas de peneiramento, o pó foi transferido para um recipiente de vidro fechado e submetido à mistura por rotação do frasco em várias direções. É importante ressaltar que o volume total de amostra por etapa equivale a 50% da capacidade máxima de armazenamento do frasco.

A coleta do material vegetal consistiu na mistura dos órgãos vegetais (partes

aéreas), incluindo caules, folhas e frutos. Exceto para *Peperomia obtusifolia*, as partes aéreas dos indivíduos se referem aos caules e folhas.

3.4.1.2 Isolamento e purificação de 2H-cromenos e cromanos

Os 2*H*-chromenos e cromanos estudados por espectrometria de massas e química computacional foram isolados das espécies de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae), respectivamente. O preparo de extrato bruto e o processo cromatográfico envolvido no isolamento de 2*H*-cromenos foi realizado como descrito por Morandim et al.[70] (2005). Continuadamente, o preparo de extrato bruto e o processo cromatográfico envolvido no isolamento de cromanos foi realizado como descrito por Batista Junior et al.[67] (2011).

3.4.2 Estudo de 2*H*-cromenos e cromanos por espectrometria de massas

3.4.2.1 Preparo de amostra

Cada substância foi solubilizada na solução hidroalcoólica (MeOH/H_2O, 1/1, v/v) para obter as respectivas soluções estoques na concentração de 1,0 mg/mL. A seguir, cada solução estoque foi diluída para a concentração final de 10 µg/mL (solução de trabalho). As soluções de trabalho foram analisadas por ESI-MS e ESI-MS/MS em modo positivo usando o aparelho micro-TOF-Q Bruker Daltonics.

3.4.2.2 Análises por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS

Paras as análises por MS, as soluções de trabalho foram inseridas na fonte de ionização por meio de uma bomba de infusão com vazão de 10,0 µL/min, sendo os experimentos divididos em duas linhas analíticas:

i) os íons precursores foram analisados em alta resolução, sendo mensurados as *m/z* das espécies protonadas de cromanos e 2*H*-cromenos com erro calculado inferior a 5 ppm; e

ii) os íons precursores foram submetidos aos experimentos por ESI(+)-MS/MS usando a técnica de dissociação induzida por colisão (CID). O processo de ativação de íons por CID foi realizado com gás N_2. Para

avaliar o perfil de distribuição de íons, o estudo por CID aplicou uma a faixa de energia (E_{lab}) crescente: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 eV. Os cromatogramas de íons totais foram processados no software Data Analysis. Curvas de energia foram construídas para cada espécie protonada, usando a distribuição relativa de íons (intensidade, em %) em função da energia aplicada no processo de dissociação induzida por colisão (E_{lab}, em eV).

Os experimentos por ESI(+)-MS/MS também foram realizados em um espectrômetro de massas AB SCIEX® modelo 3200 QTRAP (triplo quadrupolo-íon trap linear).

3.4.3 Estudo do processo de extração de espécies de *Piper* e *Peperomia*

3.4.3.1 Preparo dos extratos vegetais

Etapa 1: Cada extrato foi preparado pesando-se 1,0 g de material vegetal e, então, macerado em 10 mL do respectivo solvente (um conjunto de 3 solventes orgânicos foi utilizado: metanol, etanol e acetona). Após adição do solvente orgânico, os suportes de extração foram mantidos em banho de ultrassom por 10 min. Na próxima etapa, cada sobrenadante foi separado do resíduo vegetal por filtração em papel de filtro. Ao término, os extratos foram concentrados a pressão reduzida para fornecer os extratos secos.

Etapa 2: Cada extrato foi preparado pesando-se 1,0 g de material vegetal e, então, macerado em 10 mL do respectivo solvente. Um conjunto de 5 solventes orgânicos foi utilizado: etanol, acetona, isopropanol, butanol e acetato de etila. Após adição do solvente orgânico, os suportes de extração foram mantidos em banho de ultrassom por 10 min e, a seguir, cada sobrenadante foi separado do resíduo vegetal por filtração em papel de filtro. Ao término, os extratos foram concentrados a pressão reduzida para fornecer os extratos secos. O delineamento experimental foi definido em triplicada (n = 3).

3.4.3.2 Preparo de amostra

Para as análises por CLAE, os extratos vegetais obtidos nas Etapas **1** e **2** do item 3.4.3.1 foram submetidos ao processo de extração em fase sólida (EFS), com a finalidade de remover o material graxo (p. ex., ceras e pigmentos lipofílicos) e pré-concentrar os analitos de interesse.

Dessa maneira, para desenvolver o procedimento pré-analítico, cartuchos preenchidos com fase estacionária de octadecilsilano foram previamente ativados com metanol e, a seguir, equilibrados com MeOH/H_2O (95/05, v/v). Os extratos foram solubilizados em MeOH/H_2O (95/05, v/v) na concentração de 25 mg/mL (razão 1/20, matriz/fase estacionária). Na próxima etapa, 1,0 mL da solução foi aplicada ao cartucho, e os analitos eluídos com 3,0 mL de fase móvel MeOH/H_2O (95/05, v/v). As amostras foram concentradas para determinar o rendimento dos extratos vegetais e reservadas para as análises por CLAE.

3.4.3.3 Análises por CLAE

Após o processo de EFS, os extratos vegetais foram preparados na concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida, as soluções foram filtradas em microfiltro de politetrafluoroetileno de 0,22 µm e analisados por CLAE de acordo com os métodos descritos a seguir. É importante ressaltar que as amostras obtidas nas Etapas 1 e 2 foram analisadas de acordo com os métodos designados por Análises 1 e 2, respectivamente.

Análise 1: Para as análises por CLAE foi utilizada uma coluna Luna® C_{18} (L = 10 cm) e o método cromatográfico inicial foi realizado em gradiente linear exploratório como sugerido por Snyder, Kirkland e Dolan[88] (2010), com a inserção de algumas modificações. A fase móvel inicial consistiu de 95% de A (H_2O acidificada com 0,1% de ácido acético) e 5% de B (ACN ou MeOH) até 100% de B em 20 min, seguido por 100% de B até 24 min, com posterior equilíbrio da coluna com 5% de B por 6 min. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min, à temperatura de 25 ± 1 ºC, o volume de injeção foi de 20 µL e a detecção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), sendo o intervalo de comprimento de onda entre 200 a 600 nm.

Análise 2: Para as análises por CLAE foi utilizada uma coluna Luna® C_{18} (L = 25 cm), e o método cromatográfico inicial foi realizado em gradiente linear exploratório como sugerido por Snyder, Kirkland e Dolan[88] (2010), com a inserção de algumas modificações. A fase móvel inicial consistiu de 95% de A (H_2O acidificada com 0,1%

de ácido acético) e 5% de B (MeOH) até 100% de B em 35 min, seguido por 100% de B até 45 min, com posterior equilíbrio da coluna cromatográfica com 5% de MeOH por 15 min. A vazão utilizada foi 1,0 mL/min, com temperatura de 25 ± 1,0 ^{o}C, o volume de injeção de 20 µL e a detecção na região do UV-Vis, sendo o intervalo de comprimento de onda entre 200 a 600 nm.

3.4.4 Análises dos extratos vegetais por ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS

As amostras de *Peperomia obtusifolia* e *Piper aduncum* foram solubilizadas em solução hidroalcoólica (MeOH/H_2O, 1/1, v/v) na concentração de 0,2 mg/mL. A seguir, as soluções foram filtradas em microfiltro de politetrafluoroetileno de 0,22 µm e analisadas em um aparelho micro-TOF-Q Bruker Daltonics. As soluções foram inseridas na fonte de ionização por meio de uma bomba de infusão com vazão de 1,0 µL/min. Os experimentos por MS foram divididos em duas linhas analíticas:

i) os íons precursores foram analisados por ESI(+)-MS, sendo mensurados as *m/z* das espécies protonadas de 2*H*-cromenos cromanos com erro calculado inferior a 5 ppm; e

ii) os íons precursores foram analisados por CID(+)-MS/MS. O processo de ativação de íons por CID foi realizado com gás N_2. Para avaliar o perfil de distribuição de íons, o estudo de fragmentação aplicou uma faixa E_{lab} crescente: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 eV. Os cromatogramas de íons totais foram processados no software Data Analysis. Curvas de energia foram construídas para cada espécie protonada, usando a distribuição relativa de íons (intensidade, em %) em função da energia aplicada no processo de dissociação induzida por colisão (E_{lab}, em eV).

3.4.5 Métodos computacionais

Os cálculos com base na teoria do funcional de densidade (DFT) e buscas conformacionais foram realizados nos softwares Gaussian 03[89] (Gaussian 03, 2003; É importante notar que os cálculos foram realizados na Universidade de São Paulo – USP, em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Vessecchi) e 09[90] (Gaussian 09, 2013; É importante destacar que os cálculos foram realizados na Universidade Estadual Paulista - UNESP, sob a orientação da Prof^{a} Dr^{a} Maysa Furlan e na Universidade da

California – UCDAVIS, sob a orientação do Prof. Dr. Dean J. Tantillo) e Spartan'10[91] (Spartan'10, 2010; É importante evidenciar que os cálculos foram realizados na Universidade da California – UCDAVIS, sob a orientação do Prof. Dr. Dean J. Tantillo), respectivamente. Ilustrações das estruturas moleculares usando o modelo "Balls & Sticks" foram geradas no software CYLview[92] (CYLview, 2009).

Inicialmente, todas as geometrias foram otimizadas usando o funcional B3LYP com o conjunto de função de base 6-31+G(d,p), uma vez que estudos publicados em periódicos especializados sugerem que este método apresenta os menores erros na predição de geometria e reatividade de substâncias orgânicas[45,93–97]. Além disso, a escolha do funcional B3LYP considerou o custo computacional e a descrição de um conjunto de dados moleculares para as respectivas sub-classes de benzopiranos, os quais poderão auxiliar trabalhos no futuro. Finalmente, testes críticos foram realizados previamente para as substâncias 2,3-dihidro-pirano e tetrahidropirano, sendo que os resultados com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p) indicaram erros absolutos em torno de 2,0 kcal/mol.

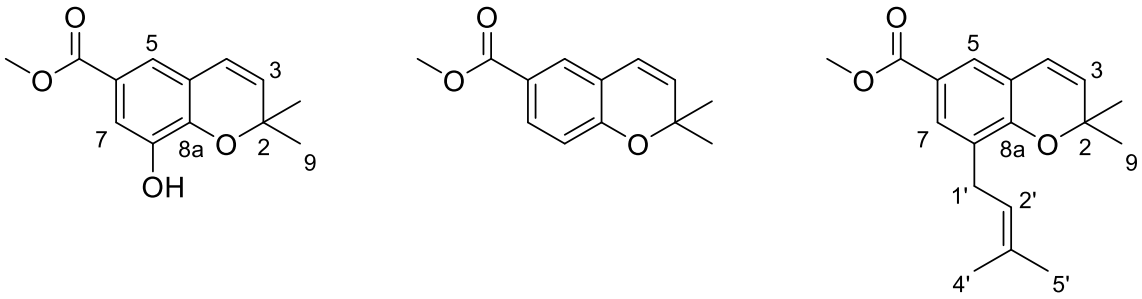
A metodologia selecionada para os estudos combinou os resultados obtidos nos cálculos baseados na DFT, com os dados gerados na busca conformacional de cada espécie na forma neutra e protonada. Essa estratégia híbrida foi aplicada para determinar os principais sítios de protonação, sendo selecionados descritores para o potencial eletrostático molecular, orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), carga atômica, afinidade protônica e basicidade em fase gasosa[35,98–104]. Todos os pontos estacionários foram caracterizados por cálculos de frequência e as energias apresentadas incluem a correção da energia no ponto zero[51,105,106].

As propostas de fragmentação foram alicerçadas pelos valores de energia relativa de Gibbs dos íons produtos (os valores são relativos ao íon precursor da rota de fragmentação). É importante destacar que a análise dos valores de energia de Gibbs deve ser ponderada, uma vez que a condição de equilíbrio termodinâmico pode não ser atingida no processo de CID[107,108]. Os cálculos da coordenada intrínseca de reação foram aplicados para corroborar as estruturas dos estados de transição estudados[109,110], os quais foram apresentados a partir do diagrama de energia da coordenada de reação[51,105,106]. Para avaliar a performance do estudo, as geometrias foram re-otimizadas no modelo B3LYP/6-311++G(d,p) para os cálculos de afinidade protônica, basicidade em fase gasosa e na investigação do mecanismo de retro Diels-Alder para a dissociação do núcleo benzopirano.

4RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do padrão de dissociação de 2*H*-cromenos isolados de *Piper aduncum* por ESI(+)-MS/MS e química computacional

Para interpretar os espectros de massas sequenciais dos 2*H*-cromenos **1**-**3** protonados (Figura 12), cálculos químico-quânticos com base na teoria do funcional de densidade (DFT) foram realizados com a finalidade de mensurar os potenciais sítios de protonação. A análise dos dados obtidos para os 2*H*-cromenos no modelo B3LYP/6-31+G(d,p) mostrou que a carboxila é o sítio de protonação mais favorável, uma vez que o mapa do potencial eletrostático molecular (MEP) representa a maior densidade de elétrons nas substâncias **1**-**3** (Figura 13)[98]. Do ponto de vista espacial, a análise do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) mostrou que o sistema π contribui para a distribuição de densidade de elétrons no núcleo benzopirano (Figura 13). Assim, a protonação em **1**, por exemplo, pode ocorrer preferencialmente nos grupos carboxila e hidroxila. Além disso, as cargas atômicas (Figura 14) associadas com as análises do MEP e HOMO confirmaram que o grupo carboxila é o sítio mais suscetível a etapa de protonação de **1**-**3**[98].



1
$C_{13}H_{14}O_4$
M.M. 234,09

2
$C_{13}H_{14}O_3$
M.M. 218,09

3
$C_{18}H_{22}O_3$
M.M. 286,16

Figura 12 - Estruturas químicas dos 2*H*-cromenos **1**-**3** previamente isolados do extrato bruto das partes aéreas de *Piper aduncum* (Piperaceae). M.M. indica o valor da massa molecular em unidades de massa atômica (*u*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

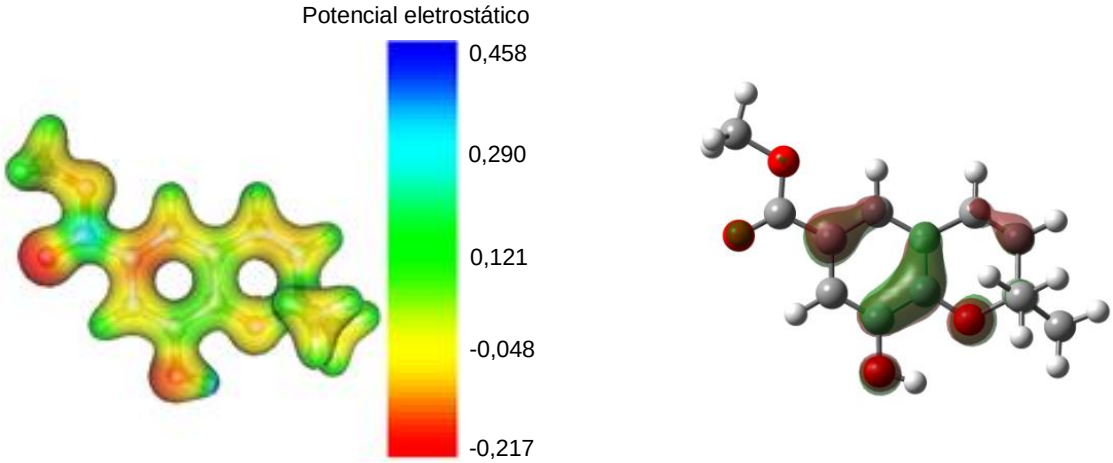
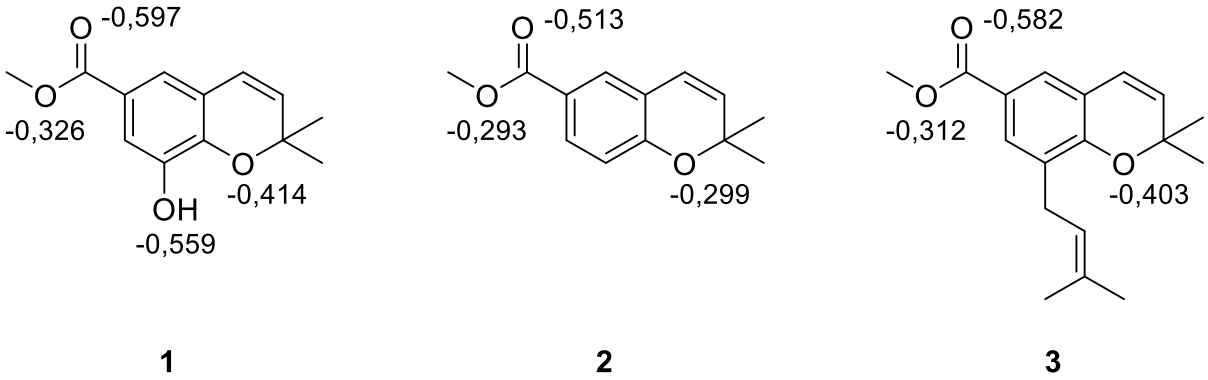


Figura 13 - Mapa do potencial eletrostático molecular (MEP) de **1** calculado no modelo B3LYP/6-31+G(d,p). A magnitude da densidade de elétrons é indicada pelas cores vermelho (maior) e azul (menor). A análise do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) é ilustrada a direita do MEP.

Fonte: Elaborada pelo autor.



1 **2** **3**

Figura 14 - Cargas atômicas (MK) usando o esquema Merz-Singh-Kollman para os átomos de oxigênios de **1**-**3** calculadas no modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base nesses resultados, descritores que ponderam a estabilidade da substância após o evento químico podem ser aplicados para melhorar a qualidade do modelo. Nesse contexto, a afinidade protônica (PA) e a basicidade em fase gasosa (GB) foram mensuradas com modelo B3LYP/6-311++G(d,p)[99–102]. Os dados apresentados na Figura 14 mostraram que os valores calculados para PA e GB são coerentes com a basicidade de ésteres e, consequentemente, a etapa de protonação na carboxila é energeticamente favorecida em relação aos demais sítios moleculares avaliados[111]. Assim, a ordem que descreve os principais sítios de protonação do 2*H*-

cromeno **1** (Figura 15) é: i - carboxila (PA = 213,4 kcal/mol); ii - átomo de oxigênio do anel pirano (PA = 195,6 kcal/mol); e iii - hidroxila fenólica (PA = 185,5 kcal/mol).

A mesma analogia pode ser aplicada as substâncias **2** e **3**. Além disso, os valores de PA e GB mostraram que a unidade prenila tem efeito sobre o caráter nucleofílico do átomo de oxigênio do anel pirano, como mensurado para o 2*H*-cromeno **3** (Figura 15)**.**

Usando a descrição dos potenciais sítios de protonação, as rotas de fragmentação por ESI-MS/MS foram propostas visando identificar um perfil de dissociação em fase gasosa para as substâncias **1**-**3**. A análise do espectro de massas ESI(+)-MS/MS de **1** mostrou que o íon produto *m/z* 203 é o pico base (Figura 16). A fragmentação proposta para explicar a formação do íon *m/z* 203 a partir do íon precursor *m/z* 235 foi baseada em uma clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente (Figura 17)[36].

Por outro lado, ao considerar a hibridização, a protonação de ésteres deve ocorrer no átomo de oxigênio da subunidade acila[36,111], o que também reforça os dados de afinidade protônica e basicidade em fase gasosa obtidos no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p). Portanto, a perda de metanol requer um equilíbrio tautomérico entre os átomos de oxigênio.

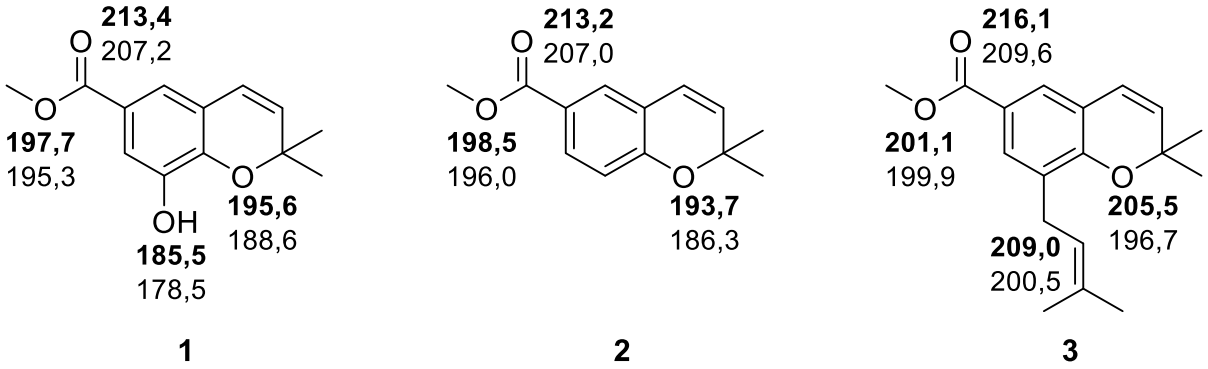


Figura 15 - Afinidade protônica (valores em negrito) e basicidade em fase gasosa em kcal/mol para **1**-**3**, calculadas para as principais formas protonadas no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

Fonte: Elaborada pelo autor.

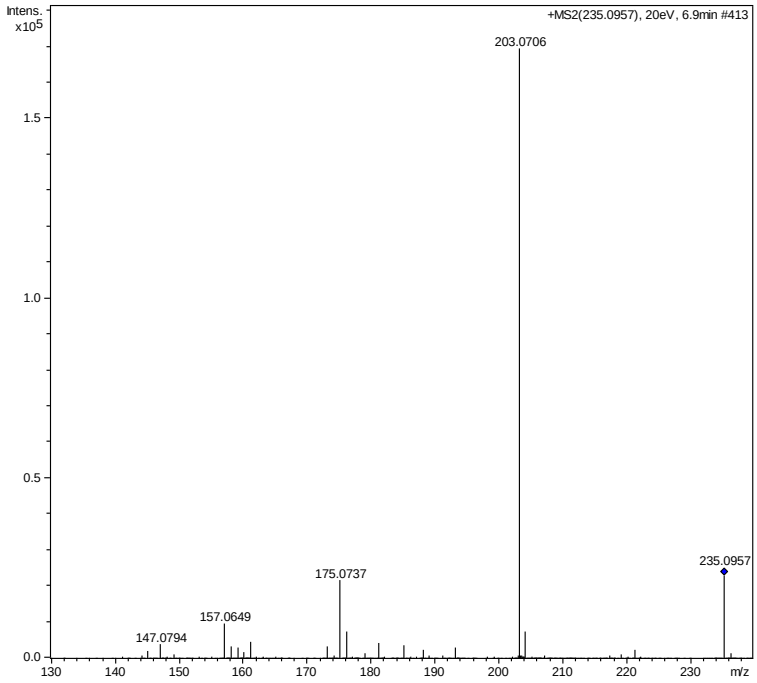


Figura 16 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**1**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 235. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

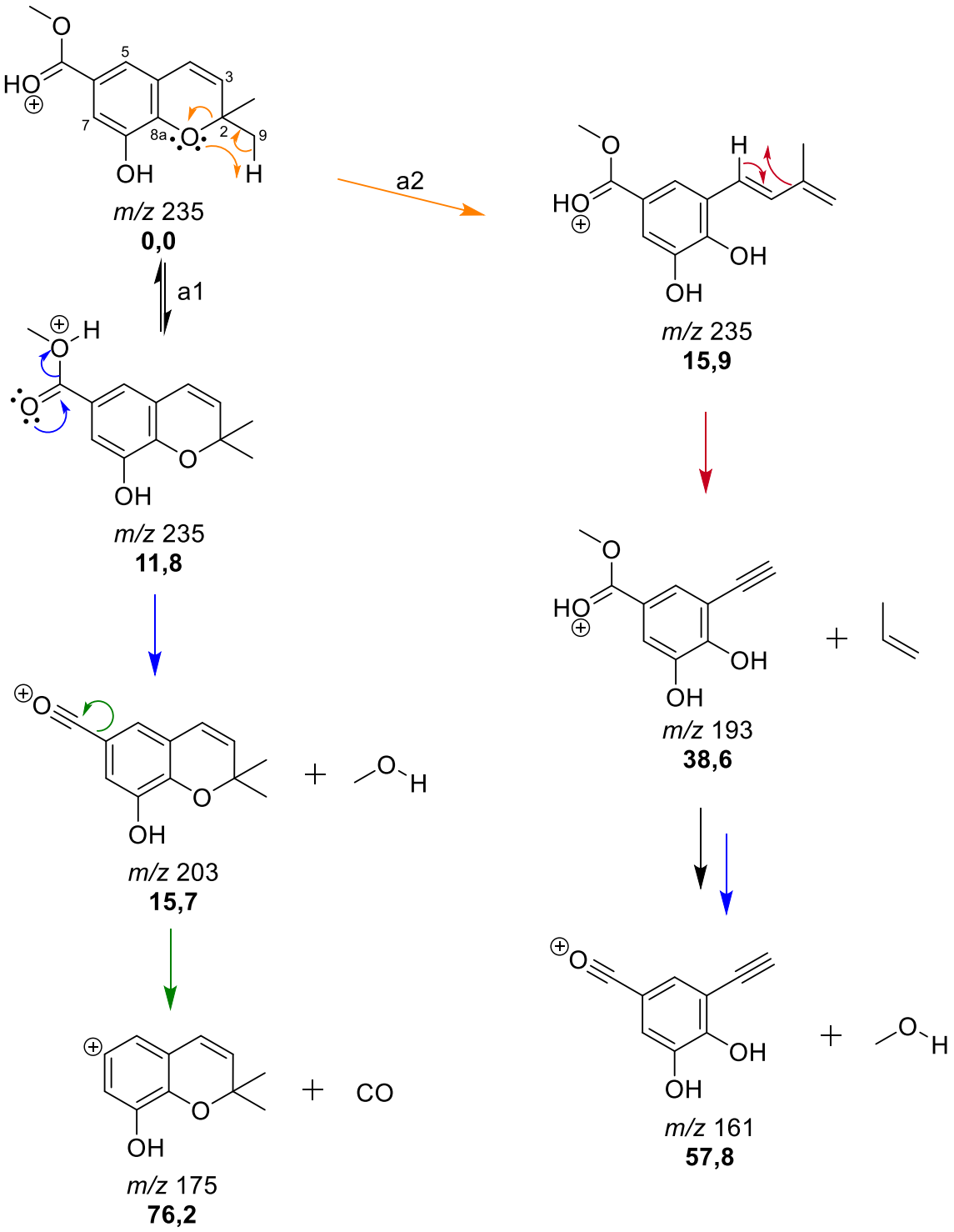
Nesse contexto, a fragmentação do íon precursor pode ser estabelecida com base no fenômeno de transferência de energia em colisões simples entre o íon precursor e o gás nitrogênio (N_2). Do ponto de vista matemático, a transferência de energia em colisões simples pode ser estimada para um determinado íon precursor e um valor de energia de ativação por colisão de referência. Dessa forma, a energia predita corresponde a um valor máximo que pode variar com o gás de colisão utilizado na análise por ESI-MS/MS[112]. Para exemplificar a álgebra envolvida na predição de transferência de energia, considere a ativação do íon precursor *m/z* 235 com os seguintes parâmetros: i - energia de colisão = 5 eV; e ii - gás de colisão = N_2. Nessas condições, a transferência estimada de energia para o íon precursor *m/z* 235 corresponde a 12,3 kcal/mol, dado pela solução: [28/(235 + 28)] x 5 eV = 12,3 kcal/mol.

Dessa forma, a etapa elementar de transferência do próton é favorecida nas condições de ativação de íons, principalmente, para valores de energia de colisão maiores que 5 eV. Assim, a formação do íon acílio *m/z* 203 com energia relativa de Gibbs de 15,7 kcal/mol corroborou a perda neutra de MeOH (32 *u*), após o equilíbrio tautomérico entre os átomos de oxigênio. Na etapa seguinte, o íon produto *m/z* 175

com energia relativa de Gibbs de 76,2 kcal/mol é obtido a partir da perda de CO (Figura 17, rota a1)[36]. A análise da curva de energia da [**1**+H]$^+$ (Figura 18) indicou que a intensidade relativa do íon produto *m/z* 175 é, aproximadamente, 50% para energia de colisão (E_{lab}) ≥ a 30 eV, sendo a energia máxima transferida nessas condições de 73,6 kcal/mol[113,114]. Do ponto de vista energético, a formação do íon acílio é favorecida em comparação ao íon feníla, como reforça as energias relativas mensuradas com o conjunto de função de base 6-31+G(d,p), e a distribuição relativa de íons na curva de energia (Figura 18).

Concomitantemente, uma segunda rota de fragmentação foi proposta para justificar a formação dos íons produtos *m/z* 193 e 161. Como esboçado na Figura 17, o ponto de partida para a formação dos íons *m/z* 193 e 161 é a abertura do anel pirano (rota a2). Na próxima etapa, o par de elétrons não ligante do átomo de oxigênio assiste a formação de uma nova ligação σ (O-H), em sincronia com a formação de uma ligação π (C=C), originando um íon isomérico *m/z* 235. Em termos energéticos, as etapas envolvidas nesse rearranjo estrutural são limitantes para obter os produtos da transformação e, consequentemente, a perda de 32 *u* descrita na rota a1 é mais favorável. Em contrapartida, a extensão da conjugação do sistema π contribui para minimizar parte da energia requerida na quebra das ligações químicas[36]. Além disso, os argumentos que justificam a rota a2 tem origem na etapa de protonação, ou seja, a adição do próton ocorre na carboxila.

A energia relativa de Gibbs calculada para o íon isomérico *m/z* 235 corresponde a aproximadamente 16,0 kcal/mol (Figura 17, rota a2). Na próxima etapa, a perda de 42 *u*, via eliminação intramolecular do tipo 1,2, explica a formação do íon *m/z* 193 (ΔG = 38,6 kcal/mol)[36]. Em condições de ESI-MS/MS, uma etapa subsequente corrobora a formação do íon *m/z* 161 (ΔG = 57,8 kcal/mol), após a perda de 32 *u* via clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente[36]. A análise da curva de energia da [**1**+H]$^+$ indica que o íon *m/z* 161 é o pico base quando E_{lab} ≥ a 30 eV (Figura 18). Portanto, a química de fragmentação descrita na rota 2 pode ser justificada com base no conteúdo de energia adicional obtido para valores de E_{lab} ≥ a 25 eV[112–114].



* As setas coloridas representam tipos específicos de reações de fragmentação[36]: clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente (azul); clivagem induzida simples (verde); abertura do anel pirano e transferência de hidrogênio (laranja); e eliminação intramolecular do tipo 1,2 (vermelho escuro).

Figura 17 - Proposta de fragmentação para a [**1**+H]$^+$. Na figura são apresentadas duas rotas, denominadas a1 e a2.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Fonte: Elaborado pelo autor.

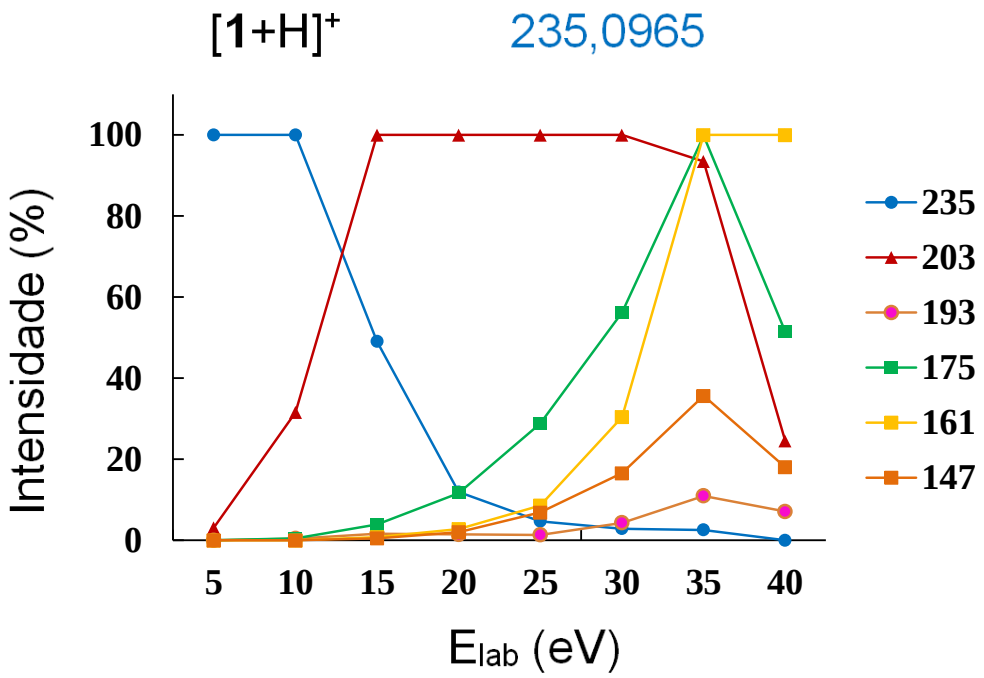


Figura 18 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 235 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesse contexto, a análise do espectro de massas ESI(+)-MS/MS e da curva de energia da [**2**+H]$^+$ (Figuras 19 e 20), indicou que os principais íons produtos são formados por perdas neutras equivalentes, àquelas discutidas para a [**1**+H]$^+$[114]. Por exemplo, a formação dos íons produtos *m/z* 187 e 159 pode ser explicado a partir das perdas neutras consecutivas de MeOH (32 *u*) e CO (28 *u*) (Figura 21; rota b1). Além disso, o íon isomérico *m/z* 219 (ΔG = 16,3 kcal/mol) pode ser fragmentado com a perda de 42 *u*, gerando o íon produto *m/z* 177 (ΔG = 38,7 kcal/mol) via eliminação intramolecular do tipo 1,2. Na próxima etapa, o íon produto *m/z* 145 (ΔG = 56,8 kcal/mol) é formado após a perda de 32 *u*, por meio de uma clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente (Figura 21; rota b2)[36].

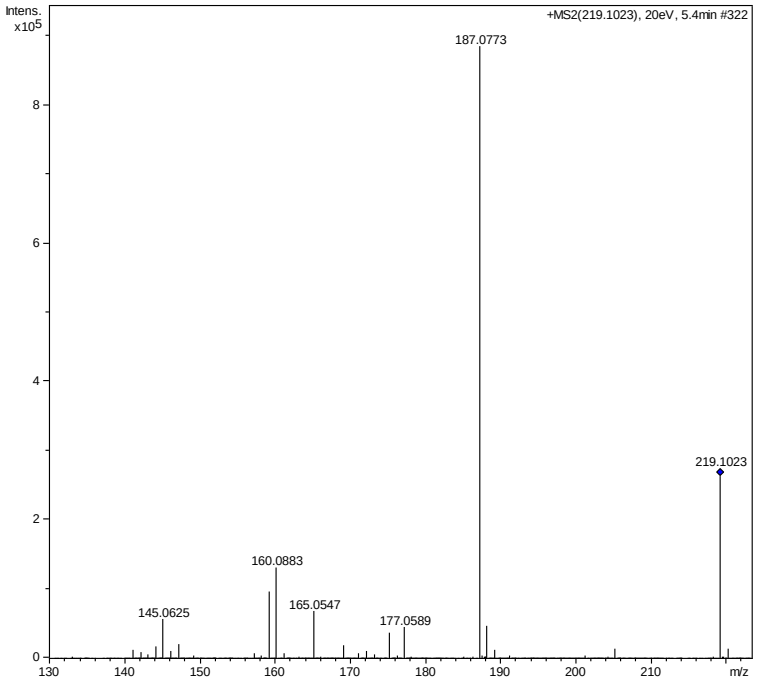


Figura 19 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**2**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 219. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

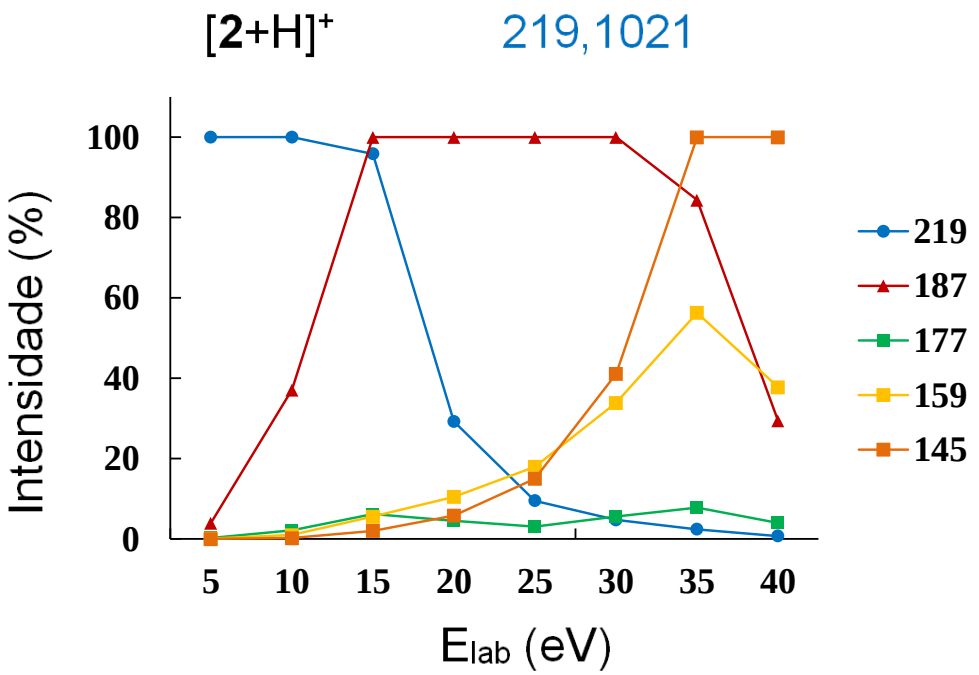
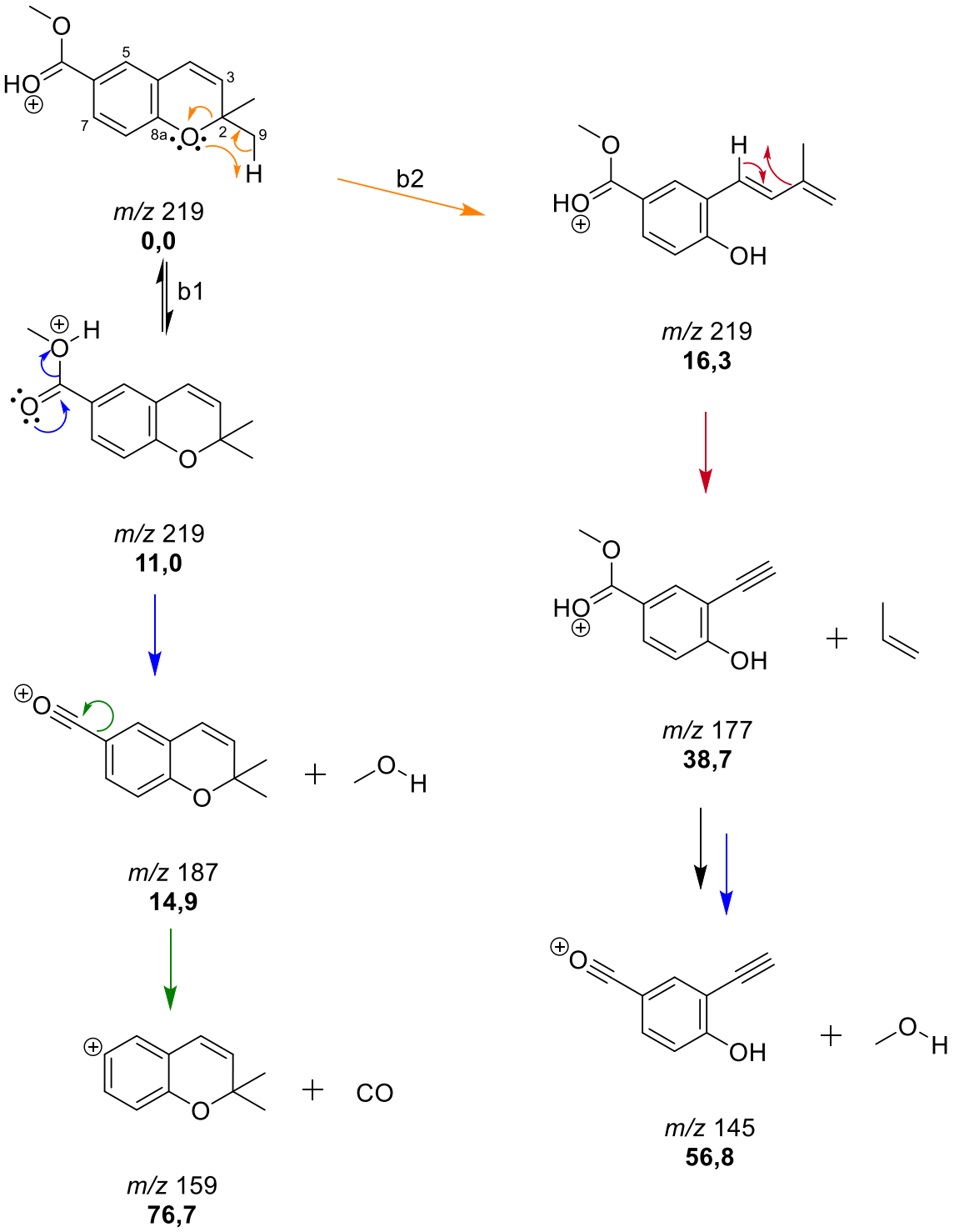


Figura 20 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 219 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF.

Fonte: Elaborada pelo autor.



* As setas coloridas representam tipos específicos de reações de fragmentação[36]: clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente (azul); clivagem induzida simples (verde); abertura do anel pirano e transferência de hidrogênio (laranja); e eliminação intramolecular do tipo 1,2 (vermelho escuro).

Figura 21 - Proposta de fragmentação para a [**2**+H]$^+$. Na figura são apresentadas duas rotas, denominadas b1 e b2.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em contrapartida, a análise do espectro de massas ESI(+)-MS/MS e da curva de energia da [**3**+H]$^+$ (Figuras 22 e 23), indicou que a intensidade do íon produto *m/z* 255 é praticamente inexistente comparada aos íons *m/z* 203 e 187, gerados a partir das [**1**+H]$^+$ e [**2**+H]$^+$, respectivamente. Consequentemente, o dado experimental confirma que o íon *m/z* 255 não é diagnóstico para a fragmentação da [**3**+H]$^+$. Além disso, os principais íons produtos *m/z* 231, 219 e 199 são formados a partir do íon *m/z* 287, com perdas neutras de 56, 68 e 88 *u*, respectivamente. Para alicerçar essa observação, as espécies protonadas de **1**-**3** também foram analisados em um espectrômetro Q-TRAP, sendo o perfil de íons fragmentos similares aos obtidos utilizando um Q-TOF (Apêndice A). Assim, o padrão de substituição do anel aromático do 2*H*-cromeno **3** é indicativo da ocorrência de reações de fragmentação não observadas para a dissociação de **1**-**2**. Do ponto de vista molecular, o padrão de substituição pode influenciar o equilíbrio ácido-base que antecede o experimento de dissociação em fase gasosa.

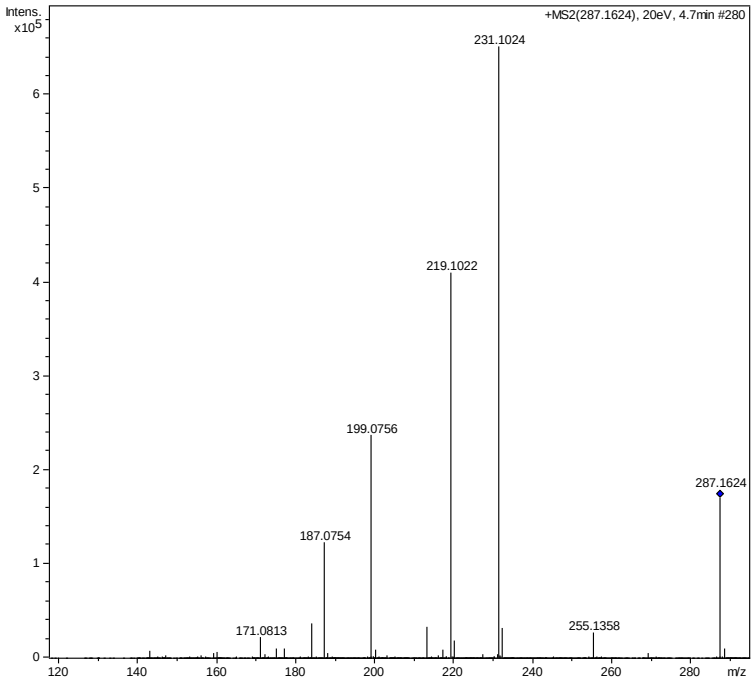


Figura 22 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**3**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 287. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 20 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa maneira, cálculos com base na teoria do funcional de densidade foram utilizados para entender os aspectos inerentes ao 2*H*-cromeno prenilado (**3**) e, a seguir, as rotas de fragmentação dos íons diagnósticos foram propostas. Os parâmetros termodinâmicos obtidos no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) corroboraram que a protonação deve ocorrer preferencialmente na carboxila (PA = 216,1 kcal/mol; Figura 15). Em termos de afinidade protônica, as amplitudes entre o valor calculado para a carboxila em relação a unidade prenila (PA = 209,0 kcal/mol) e o átomo de oxigênio do anel pirano (PA = 205,5 kcal/mol) são 7,1 e 10,6 kcal/mol, respectivamente. No balanço energético, a estabilidade da espécie protonada é um parâmetro essencial para justificar o sentido da etapa de protonação. Considerando a adição do próton na unidade prenila, a espécie protonada obtida é um carbocátion terciário. Consequentemente, a hiperconjugação entre as ligações σ C-H e C-C e o orbital vazio π* do centro catiônico contribuem para estabilizar a carga positiva[105,106,115–117].

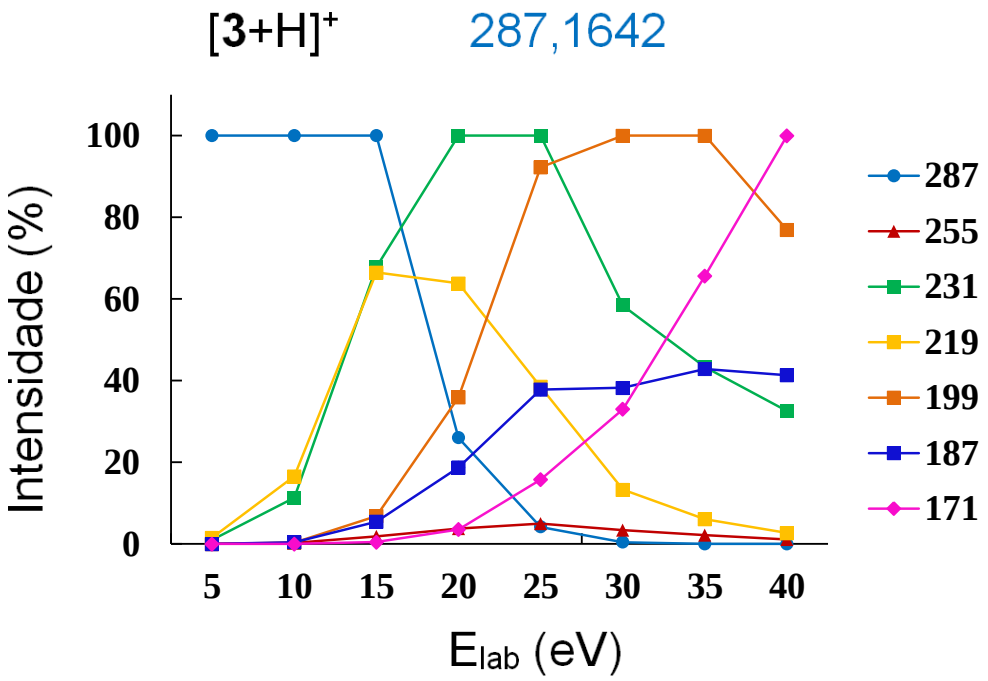


Figura 23 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 287 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF.

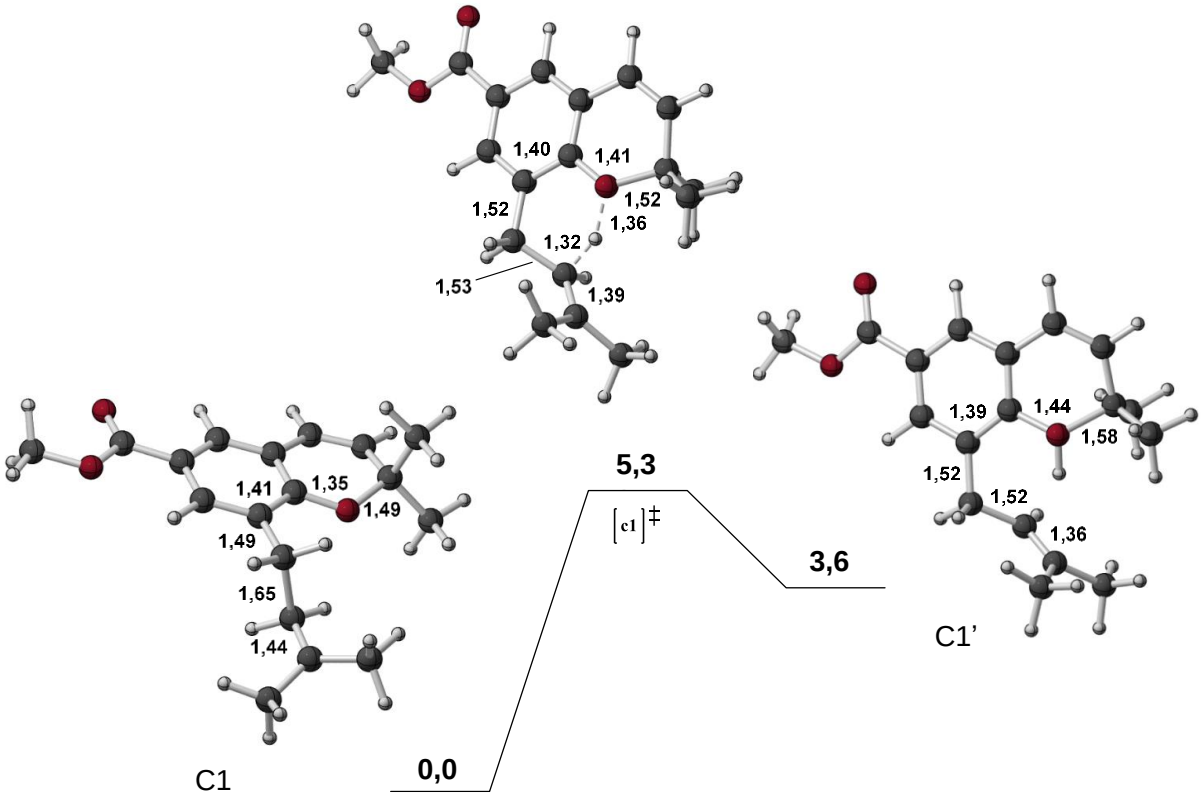
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesse ponto, dois fatores precisam ser destacados: i - a protonação na ligação dupla não é uma etapa descrita com regularidade nos estudos por ESI-MS/MS[36]; e ii - o efeito de hiperconjugação causou pouca influência nos dados calculados para afinidade protônica e basicidade em fase gasosa.

Com base no exposto, novos argumentos são requeridos para justificar a unidade prenila como principal sítio de protonação do 2*H*-cromeno prenilado. Adicionalmente, a unidade prenila é o bloco construtor dos terpenoides e, consequentemente, avançar na respectiva hipótese pode contribuir para racionalizar o perfil de fragmentação por ESI-MS/MS de outras classes de produtos naturais.

A Figura 24 mostra as características chave do diagrama de energia da coordenada de reação para a etapa elementar de transferência do próton, entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano, calculado no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). A análise do diagrama de energia indicou que as duas espécies protonadas de menor energia, C1 e C1', diferem por apenas 3,6 kcal/mol. Além disso, a distância de ligação C1'-C2' na estrutura C (1,65 Å) é significativamente maior que na estrutura C' (1,52 Å).

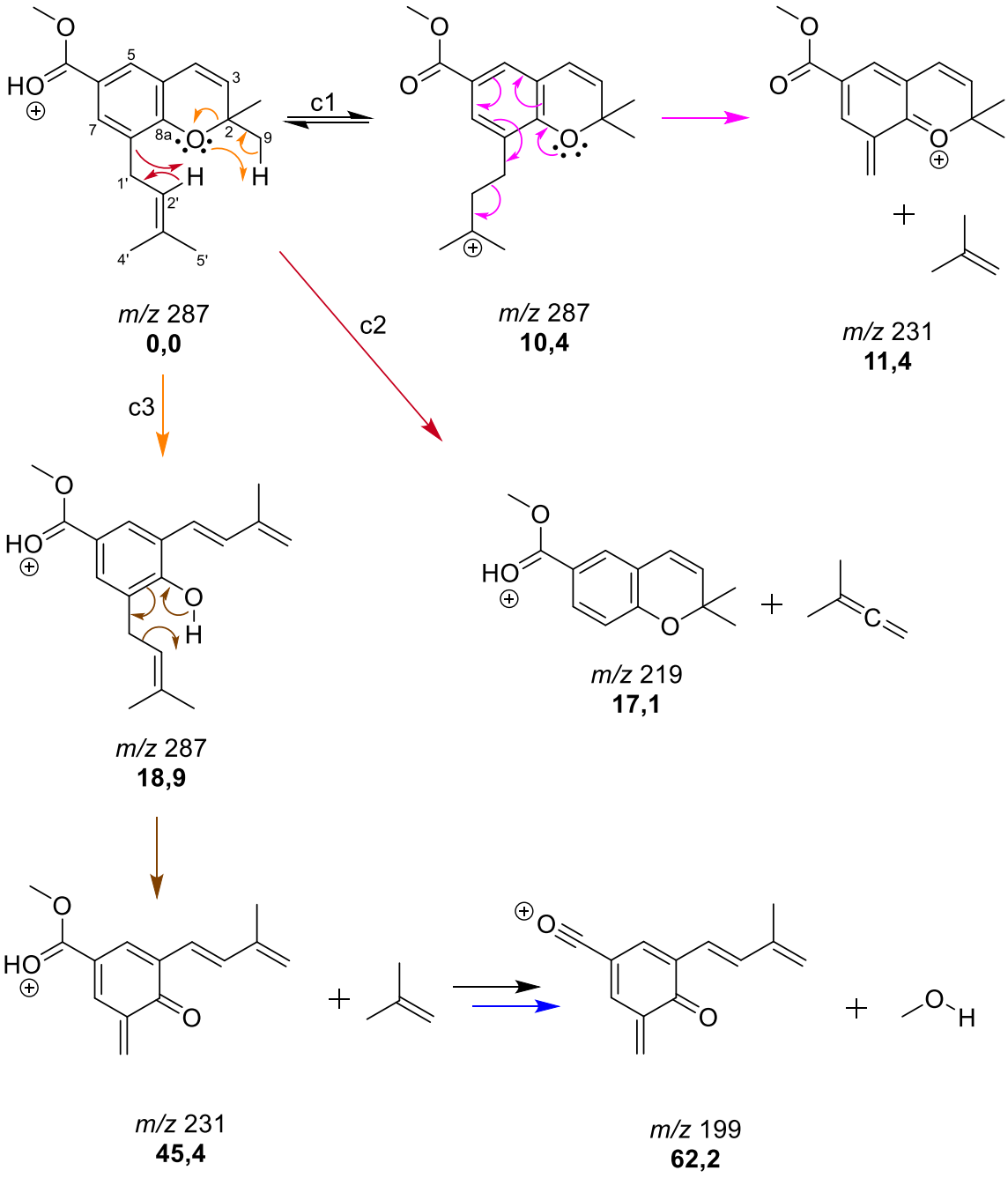
Portanto, os resultados obtidos corroboraram que a transferência intramolecular do próton entre C1 e C1' pode ocorrer via um estado de transição de 6 membros. Consequentemente, o íon precursor *m/z* 287 é melhor justificado por um carbocátion terciário. Na próxima etapa, a dissociação do íon *m/z* 287 gerou o íon oxônio *m/z* 231 (ΔG = 9,9 kcal/mol), após a perda neutra de 56 *u* (Figura 25, rota c1). A análise da curva de energia é indicativa para a formação do íon *m/z* 231 a partir de 5 eV (Figura 23). Além disso, a perda de 2-metilpropeno também foi observada no estudo de derivados de quinonoides por ESI-MS/MS e química computacional[36,47,114].



* As geometrias otimizadas das estruturas protonadas e do estado de transição (com distâncias de ligação selecionadas em Å), bem como as energias relativas de Gibbs (kcal/mol, energias relativas a energia de Gibbs da estrutura **C1**; B3LYP/6-31+G(d,p)) são mostradas no diagrama de energia. A energia de Gibbs (absoluta) para a estrutura do estado de transição é -924,912613 hartree. O valor imaginário da frequência vibracional que caracteriza o estado de transição é -739,79 cm^{-1}. As energias de Gibbs (absolutas) para C1 e C1’ são -924,921074 e -924,915377 hartree, respectivamente (Apêndice B).

Figura 24 - Diagrama de energia para a etapa de transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano, produzindo duas espécies protonadas de **3** (**C1** e **C1’**).*

Fonte: Elaborada pelo autor.



* As setas coloridas representam tipos específicos de reações de fragmentação[36]: clivagem induzida por assistência do heteroátomo (rosa); eliminação intramolecular do tipo 1,2 (vermelho escuro); abertura do anel pirano e transferência de hidrogênio (laranja); reação do tipo retro-heteroeno (marrom); e clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente (azul).

Figura 25 - Proposta de fragmentação para a [**3**+H]$^+$. Na figura são apresentadas três rotas, denominadas de c1, c2 e c3.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

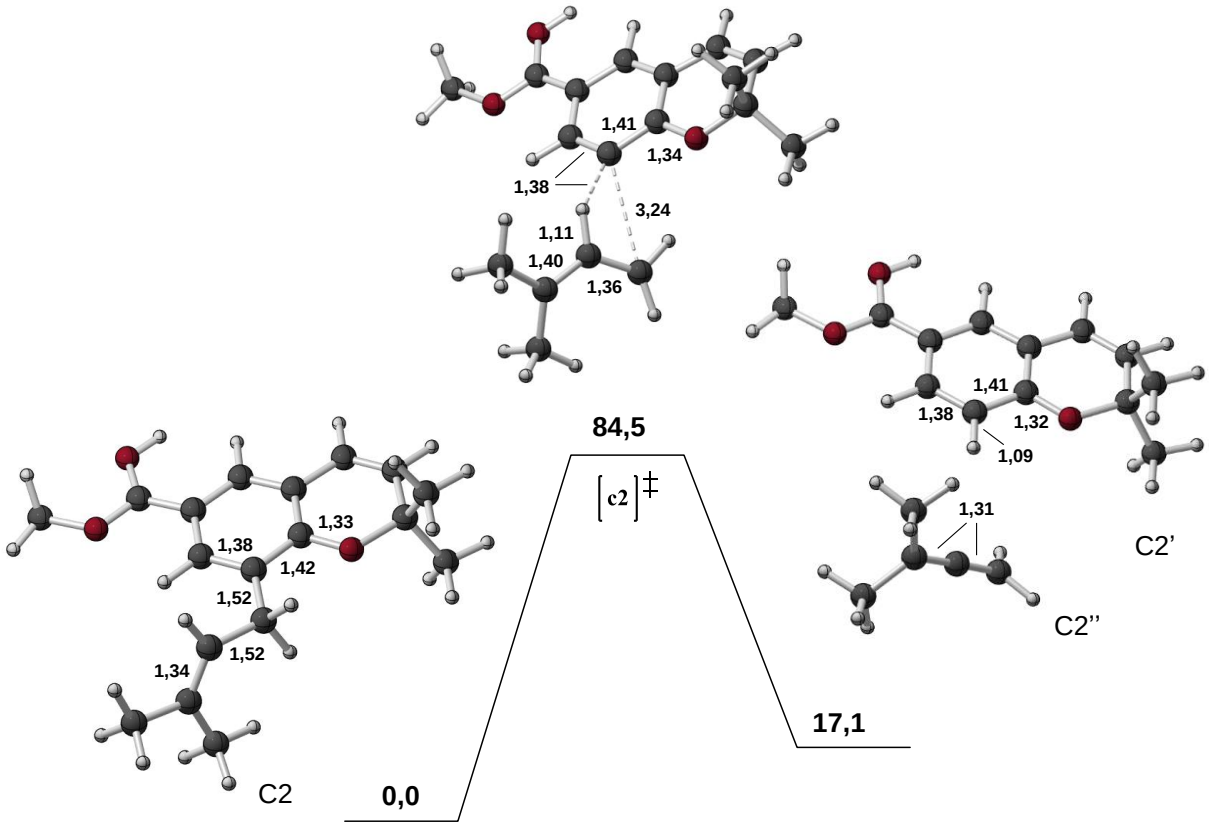
Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, uma reação de fragmentação foi proposta para justificar a formação do íon produto *m/z* 219 com base na perda neutra de 68 *u*. Uma análise preliminar do mecanismo de reação permitiu averiguar que essa dissociação em fase gasosa requereria uma demanda energética significativa e, por isso, o processo reacional apresentado pode ser considerado pouco plausível (Figura 25, rota c2). Entretanto, a curva de energia da [**3**+H]$^+$ confirma que o íon *m/z* 219 é diagnóstico (Figura 23)[113,114]. Com objetivo de entender a proposta de fragmentação, o perfil de energia da coordenada de reação foi calculada usando o conjunto de função de base 6-31g+G(d,p), e os resultados foram esboçados na Figura 26. O diagrama de energia indicou que a perda de 68 *u* da [**3**+H]$^+$, via eliminação intramolecular do tipo 1,2[36], requer aproximadamente 84,0 kcal/mol.

Nas análises por ESI-MS/MS, a energia transferida para o íon precursor pode sobrepor essa barreira, dependendo da energia de colisão aplicada no experimento de fragmentação. É importante ressaltar que a intensidade dos íons *m/z* 231 e 219, na curva de energia reforçou que a protonação ocorre na unidade prenila, uma vez que acima de 15 eV a intensidade relativa do íon *m/z* 231 sobrepõe ao íon *m/z* 219. Esse comportamento pode ser justificado por meio dos diagramas de energia da coordenada de reação (Figuras 24 e 26).

Por outro lado, a etapa limitante para justificar a formação do íon produto *m/z* 199 (Figura 25; rota c3) é a mesma apresentada para as substâncias **1** e **2**. Em suma, a distribuição populacional do íon *m/z* 199 na curva de energia (Figura 23), principalmente, quando E_{lab} ≥ 25 eV também corrobora que a protonação do 2*H*-cromeno **3** ocorre preferencialmente na unidade prenila.

Portanto, o uso integrado de química computacional e da técnica de dissociação induzida por colisão permitiu estabelecer um padrão de fragmentação para os 2*H*-cromenos **1**-**3**.



* As geometrias otimizadas das estruturas protonadas e do estado de transição (com distâncias de ligação selecionadas em Å), bem como as energias relativas de Gibbs (kcal/mol, energias relativas a energia de Gibbs da estrutura **C2**; B3LYP/6-31+G(d,p)) são mostradas no diagrama de energia. A energia de Gibbs (absoluta) para a estrutura do estado de transição é -924,803045 hartree. O valor imaginário da frequência vibracional que caracteriza o estado de transição é -196,16 cm^{-1}. As energias de Gibbs (absolutas) para C2, C2' e C2'' são -924,937702, -729,679094 e -195,231328 hartree, respectivamente (Apêndice B).

Figura 26 - Diagrama de energia para a perda de 3-metilbuta-1,2-dieno a partir da [**3**+H]$^+$ (C2).*

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Estudo do padrão de fragmentação de cromanos isolados de *Peperomia obtusifolia* por ESI(+)-MS/MS e química computacional

A química de fragmentação apresentada na seção anterior contribuiu para a inserção de conhecimentos a respeito da etapa de protonação, incluindo a visualização de tendências nas rotas de dissociação em fase gasosa descritas para justificar a formação de íons produtos diagnósticos. Além disso, o estudo das formas protonadas do 2*H*-cromeno **3** alicerçou novos questionamentos sobre os principais efeitos que governam as etapas de protonação, tanto na unidade prenila quanto no átomo de oxigênio do anel pirano de derivados de benzopiranos. Diante do exposto, uma série de cromanos previamente selecionada foi investigada usando modelos baseados na DFT e, a seguir, cromanos naturais (subclasse de benzopirano) isolados de *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) foram analisados por ESI(+)-MS/MS.

Primeiramente, a reação retro Diels-Alder (rDA) foi considerada para descrever a fragmentação do núcleo benzopirânico de um dado cromano, como ilustrado na Figura 27. Nesse exemplo, o íon produto diagnóstico é formado a partir da perda neutra de um alqueno. Com base no mecanismo rDA, a formação de íons diagnósticos obtidos nas análises por ESI-MS/MS pode ser utilizada para justificar propostas de identificação estrutural de produtos naturais de interesse, incluindo flavonoides, flavonas, flavonois, chalconas, isoflavonas e proantocianidinas[36,48]. Maiores detalhes do emprego do mecanismo rDA em processos típicos de identificação estrutural pode ser consultado na revisão publicada por Demarque et al.[36] (2016).

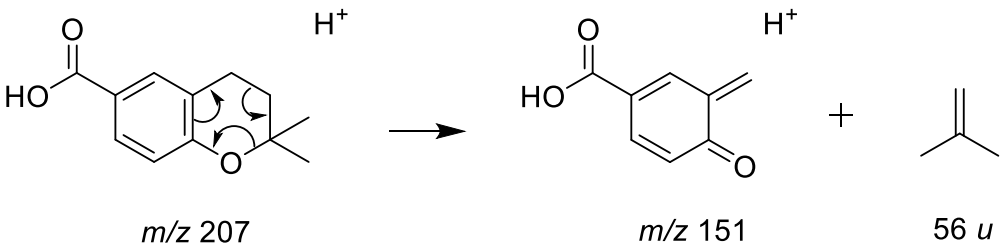
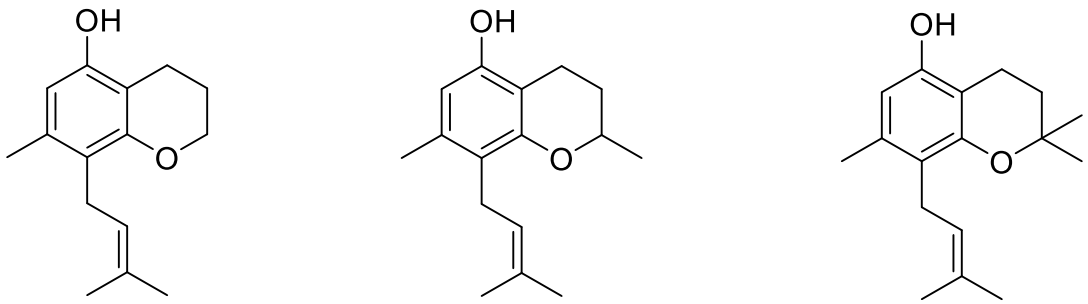


Figura 27 - Proposta de fragmentação para a $[M+H]^+$ considerando o mecanismo retro Diels-Alder. M indica um benzopirano genérico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esboçado a importância do mecanismo rDA na identificação estrutural de produtos naturais por ESI-MS/MS, a química de fragmentação dos cromanos (**4**-**6**) (Figura 28) foi investigada utilizando o modelo B3LYP/6-311++G(d,p), com intuito de estabelecer padrões de fragmentação para as duas subclasses de benzopiranos. Com a finalidade de explorar características chave em fase gasosa, os cálculos das barreiras de energias das respectivas substâncias foram calculados para as espécies neutras e protonadas.

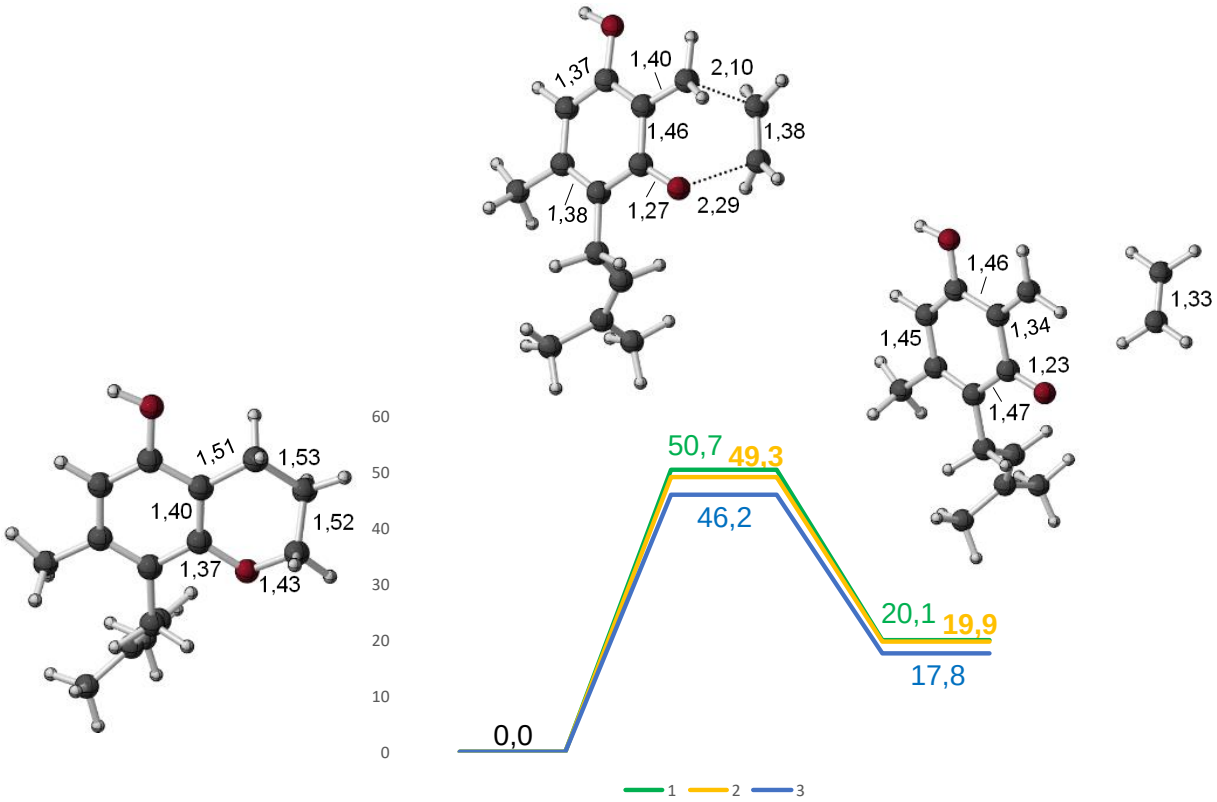
As Figuras 29, 30 e 31 representam as particularidades dos diagramas de energia das coordenadas de reação, calculadas para a fragmentação do anel benzopirano dos cromanos (**4**-**6**) com base no mecanismo rDA. Primeiramente, a análise dos diagramas de energia da coordenada de reação para os cromanos **4**-**6**, na forma neutra (Figura 29), indicou que as energias de ativação requeridas para deslocar a reação no sentido da fragmentação são 50,7, 49,3 e 46,2 kcal/mol, respectivamente.



4 **5** **6**

Figura 28 - Estruturas químicas dos cromanos **4**-**6**. As substâncias foram estudadas usando o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

Fonte: Elaborada pelo autor.

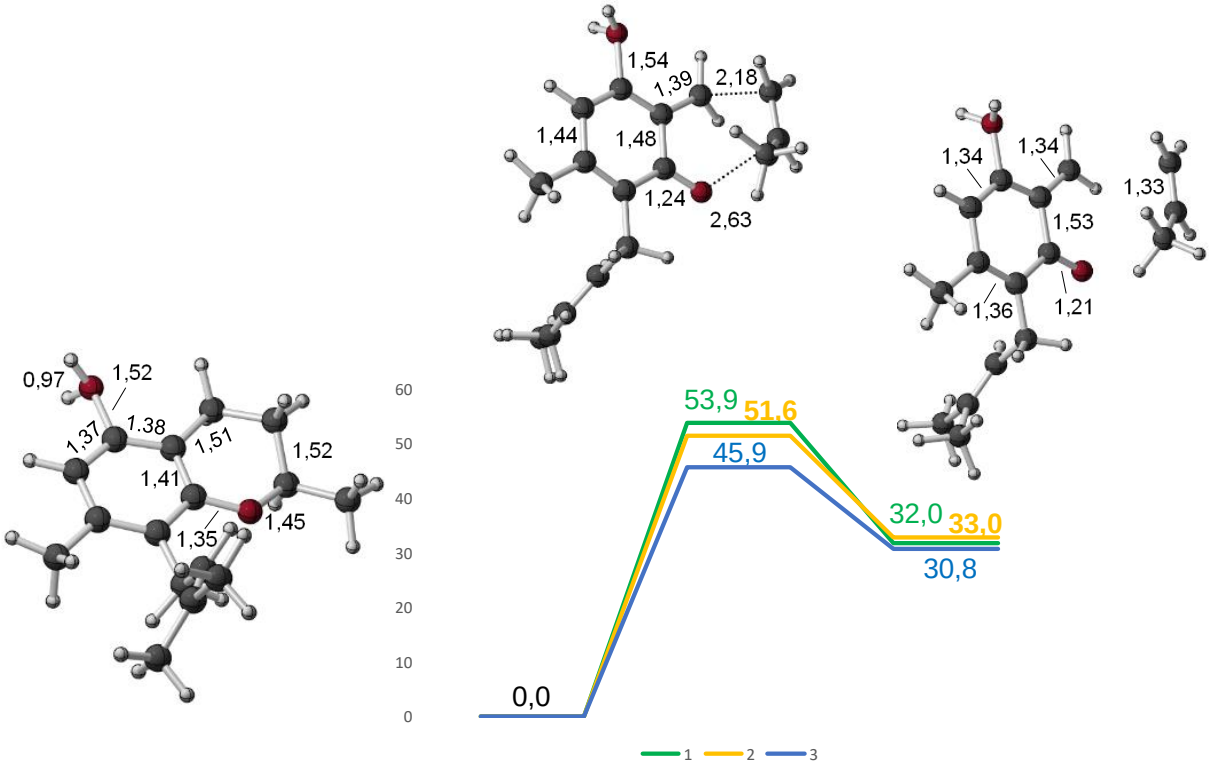


* Para cada substância, as energias relativas de Gibbs das estruturas dos fragmentos e respectivos estados de transição (kcal/mol, energias relativas a energia de Gibbs da estrutura neutra M; B3LYP/6-31+G(d,p)) são mostradas nos diagramas de energia. As geometrias otimizadas com distâncias de ligação (em Å) selecionadas são mostradas para a fragmentação do cromano **4**, incluindo as geometrias do reagente, do estado de transição e dos respectivos fragmentos.

Figura 29 - Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie neutra (M, neutra).*

Fonte: Elaborada pelo autor.

Alternativamente, ao considerar os cromanos **4**, **5** e **6** previamente protonados na hidroxila fenólica, os cálculos indicaram que as energias de ativação requeridas para deslocar a reação no sentido da fragmentação são 53,9, 51,6 e 45,9 kcal/mol (Figura 30), respectivamente, e, portanto, divergiram sutilmente dos valores obtidos para as espécies neutras.

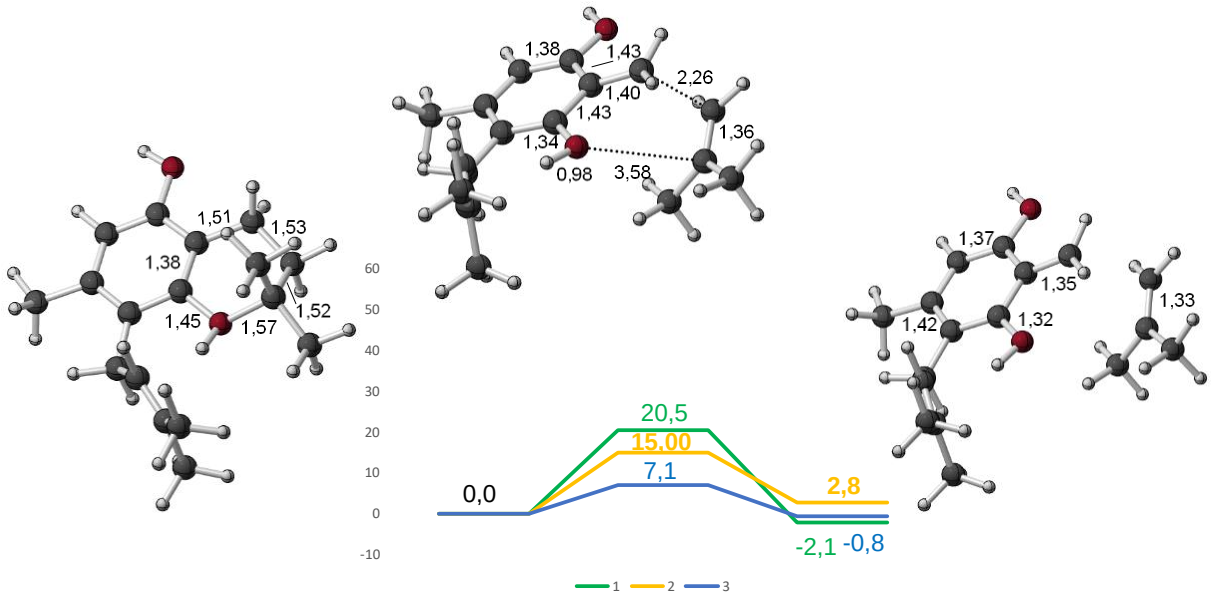


* Para cada substância, as energias relativas de Gibbs das estruturas dos fragmentos e respectivos estados de transição (kcal/mol, energias relativas a energia de Gibbs da espécie protonada $[M+H]^+$; B3LYP/6-31+G(d,p)) são mostradas nos diagramas de energia. As geometrias otimizadas com distâncias de ligação (em Å) selecionadas são mostradas para a fragmentação do cromano **5**, incluindo as geometrias do reagente, do estado de transição e dos respectivos fragmentos.

Figura 30 - Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie protonada na hidroxila fenólica {$[M+H]^+$, espécie protonada}.*

Fonte: Elaborada pelo autor.

Entretanto, ao considerar os cromanos **4**-**6** previamente protonados no átomo de oxigênio do anel pirano, os cálculos mostraram que as barreiras de energia para a fragmentação via mecanismo rDA diminuíram substancialmente (Figura 31), as quais correspondem a 20,0 (**4**), 15,0 (**5**) e 7,0 (**6**) kcal/mol. Portanto, os resultados corroborraram que os cromanos protonados (**4**-**6**) podem ser dissociados por ESI(+)-MS/MS em condições brandas de ativação de íons, dependendo da nucleofilicidade dos grupos ligados ao anel benzopirano.



* Para cada substância, as energias relativas de Gibbs das estruturas dos fragmentos e respectivos estados de transição (kcal/mol, energias relativas a energia de Gibbs da $[M+H]^+$; B3LYP/6-31+G(d,p)) são mostradas nos diagramas de energia. As geometrias otimizadas com distâncias de ligação (em Å) selecionadas são mostradas para a fragmentação do cromano **6**, incluindo as geometrias do reagente, do estado de transição e dos respectivos fragmentos.

Figura 31 - Diagramas de energia da coordenada de reação para a fragmentação dos cromanos **4** (verde), **5** (amarelo) e **6** (azul), com base no mecanismo retro Diels-Alder e considerando a espécie protonada no átomo de oxigênio do anel pirano {$[M+H]^+$, espécie protonada}.*

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nessa perspectiva, a análise dos comprimentos de ligação das geometrias otimizadas dos reagentes (cromanos **4**-**6**) e dos correspondentes estados de transição, com base no mecanismo rDA, reforça que a protonação pode ser a etapa limitante para justificar as perdas neutras de alquenos durante a fragmentação de substâncias contendo o núcleo benzopirano. Por exemplo, os cálculos baseados na DFT confirmaram o aumento significativo nas distâncias de ligação, O-C2 e O-C8a, para a adição do próton no átomo de oxigênio do anel pirano. Além disso, os cálculos de otimização de geometria, de espécies neutras e protonadas, também indicaram uma diminuição sutil na distância de ligação, C4a-C8a, para a protonação ocorrendo no átomo de oxigênio do anel pirano.

Dessa maneira, a diminuição da barreira de energia com base no mecanismo rDA, para a etapa de protonação do átomo de oxigênio do anel pirano, pode ser justificada em função do enfraquecimento das ligações, O-C2 e O-C8a, associado

com o aumento da densidade de elétrons localizada entre C4a-C8a. Assim, para os cromanos **4**-**6**, os diagramas de energia da coordenada de reação confirmaram que os substituintes ligados ao C2 influenciaram na reatividade do anel pirano e, portanto, na química de fragmentação do anel benzopirano.

Baseado nesses resultados e com a finalidade de melhorar o modelo, a afinidade protônica e a basicidade em fase gasosa foram mensuradas para os cromanos **4**-**12** (Figura 32), usando o modelo B3LYP/6-311++G(d,p). Os dados apresentados na Figura 32 mostraram que os valores calculados para PA e BG são coerentes com as barreiras de energia da coordenada de reação, calculadas para a reação rDA (Figuras 29-31).

Consequentemente, a etapa de protonação no átomo de oxigênio do anel pirano é energeticamente favorecida em relação aos demais sítios moleculares avaliados. Assim, a análise dos dados obtidos por termoquímica computacional (Figura 32) ratificou duas observações importantes: i - a protonação deve ocorrer preferencialmente no átomo de oxigênio do anel pirano. Para a substância **4**, por exemplo, as amplitudes entre os valores de PA e BG para a protonação no anel pirano e no grupo hidroxila são 22,5 e 20,7 kcal/mol, respectivamente (PA = 209,6 e 187,1 kcal/mol, GB = 201,1 e 180,4 kcal/mol); e ii - a reatividade do anel pirano frente a adição do próton é diretamente influenciada pelo substituinte ligado ao **C2**. É importante destacar que os valores mensurados para PA das substâncias **4**; **5**; **6**; **7**; **8**; **9** e **10** correspondem a 209,6; 211,2; 213,1; 213,8; 212,7; 222,2 e 231,6 kcal/mol, respectivamente.

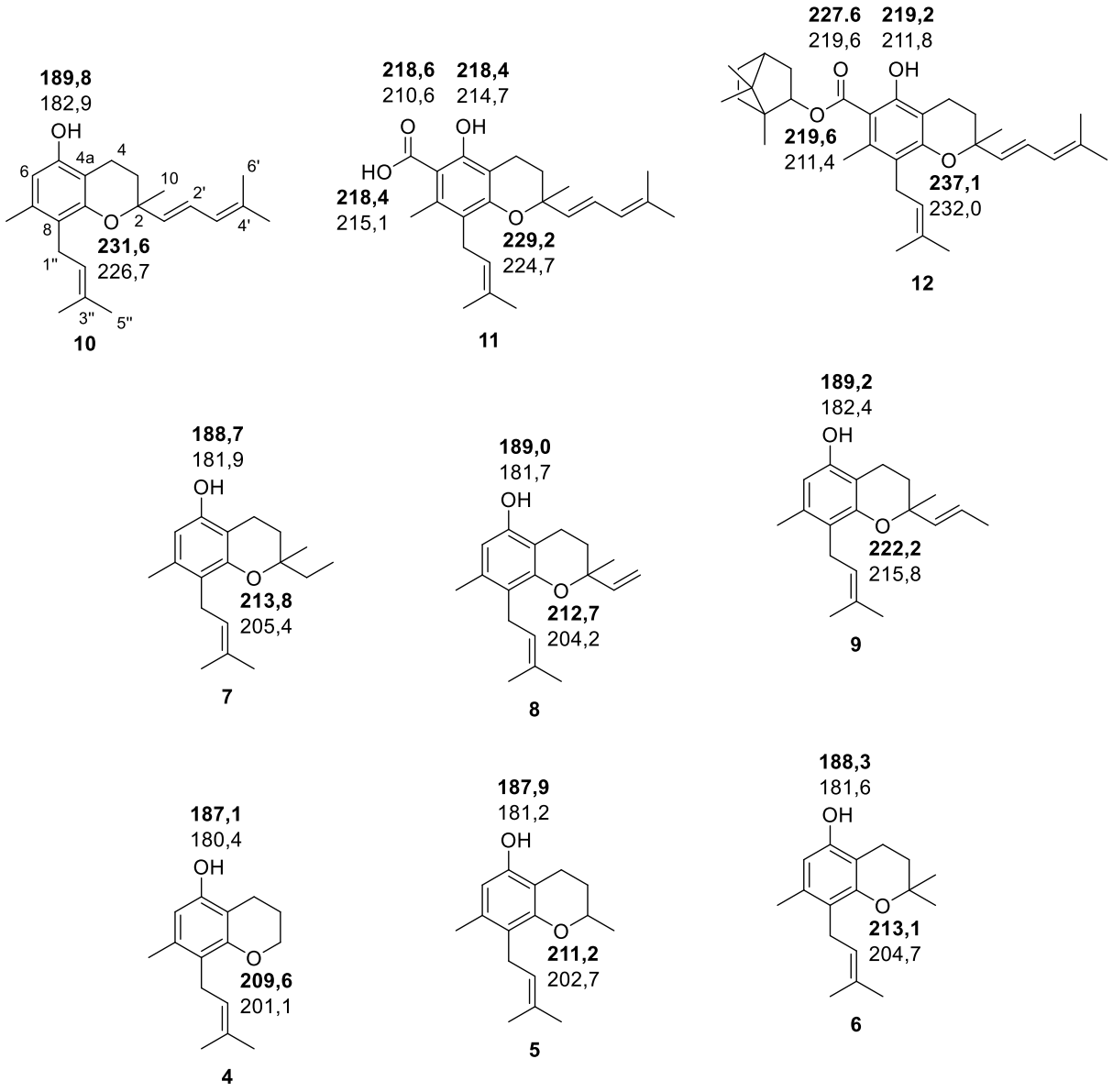


Figura 32 - Afinidade protônica (valores em negrito) e basicidade em fase gasosa em kcal/mol para as substâncias **4**-**12**, calculadas para as principais formas protonadas no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

Fonte: Elaborada pelo autor.

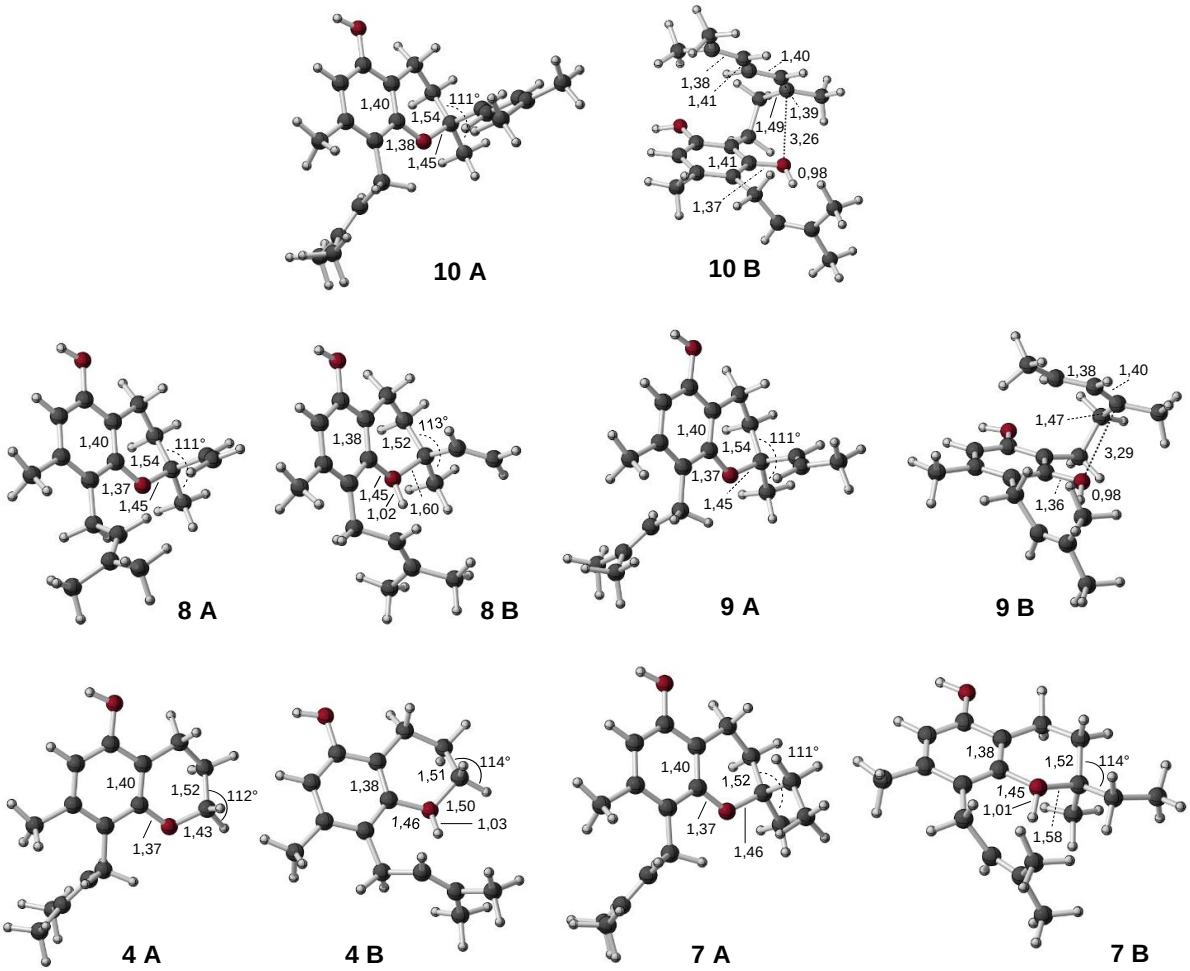
Considerando a reação ácido-base (Brönsted-Lowry) que ocorre no grupo fenólico, os valores calculados para PA e GB também mostraram um aumento gradativo para as substâncias da série. No entanto, a amplitude entre os valores de PA e GB calculados para a hidroxila fenólica e para o átomo de oxigênio do anel pirano, coloca em evidência o efeito do subtituinte ligado ao C2 no aumento da reatividade molecular (Figura 32).

Conjugado a esses aspectos, os resultados sumarizados na Figura 33 mostraram que a distância de ligação O-C2, após a etapa de adição do próton no átomo de oxigênio do anel pirano do cromano **4**, é relativamente curta (1,50 Å) quando comparada aos cromanos **7** (1,58 Å), **8** (1,60 Å), **9** (3,29 Å) e **10** (3,26 Å). É importante destacar que a adição do próton no anel pirano de **9**-**10** corroborou com uma clivagem heterolítica da ligação O-C2.

Nesse contexto, o aumento na distância de ligação O-C2 das espécies protonadas pode ser explicada com base no efeito de hiperconjugação, associado com os efeitos estereoeletrônicos derivados de um anel de 6 membros. Interações hiperconjugativas são conceitos importantes para racionalizar a estabilidade de intermediários, por exemplo, a formação de carbocátion. Assim, os resultados obtidos são consistentes com o aumento de estabilidade do carbocátion formado após a protonação do átomo de oxigênio do anel pirano, em função da contribuição por hiperconjugação das ligações σ C-H e C-C com o orbital π^* do centro catiônico[105,106,115–118].

Além disso, a estabilidade pode ser expressa em termos da deslocalização da carga positiva por meio do sistema vinílico. Consequentemente, os dados obtidos no modelo B3LYP/6-311++G(d,p) permitiu estabelecer uma tendênica na ordem de protonação dos cromanos **4**-**12**, sendo que a etapa de protonação ocorre preferencialmente no átomo de oxigênio do anel pirano.

No contexto de estabilidade de carbocátions, o cromano **8** reforça a tendência investigada na respectiva série de benzopiranos. A análise dos valores de PA e GB indicou que o carater nucleofílico de **8** diminui em relação aos cromanos **6**-**7**. Portanto, a observação concorda com a menor estabilidade da espécie protonada, uma vez que um dos contribuintes de ressonância do íon formado via clivagem heterolítica da ligação O-C2 é um carbocátion primário.



* Para cada substância as características estruturais chave são representadas para a espécie neutra (**A**) e protonada (**B**). A espécie **B** corresponde a protonação ocorrendo no átomo de oxigênio do anel pirano. Distâncias de ligação (em Å) selecionadas são mostradas.

Figura 33 - Geometrias otimizadas para os benzopiranos **4**, **7**, **8**, **9** e **10** no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).*

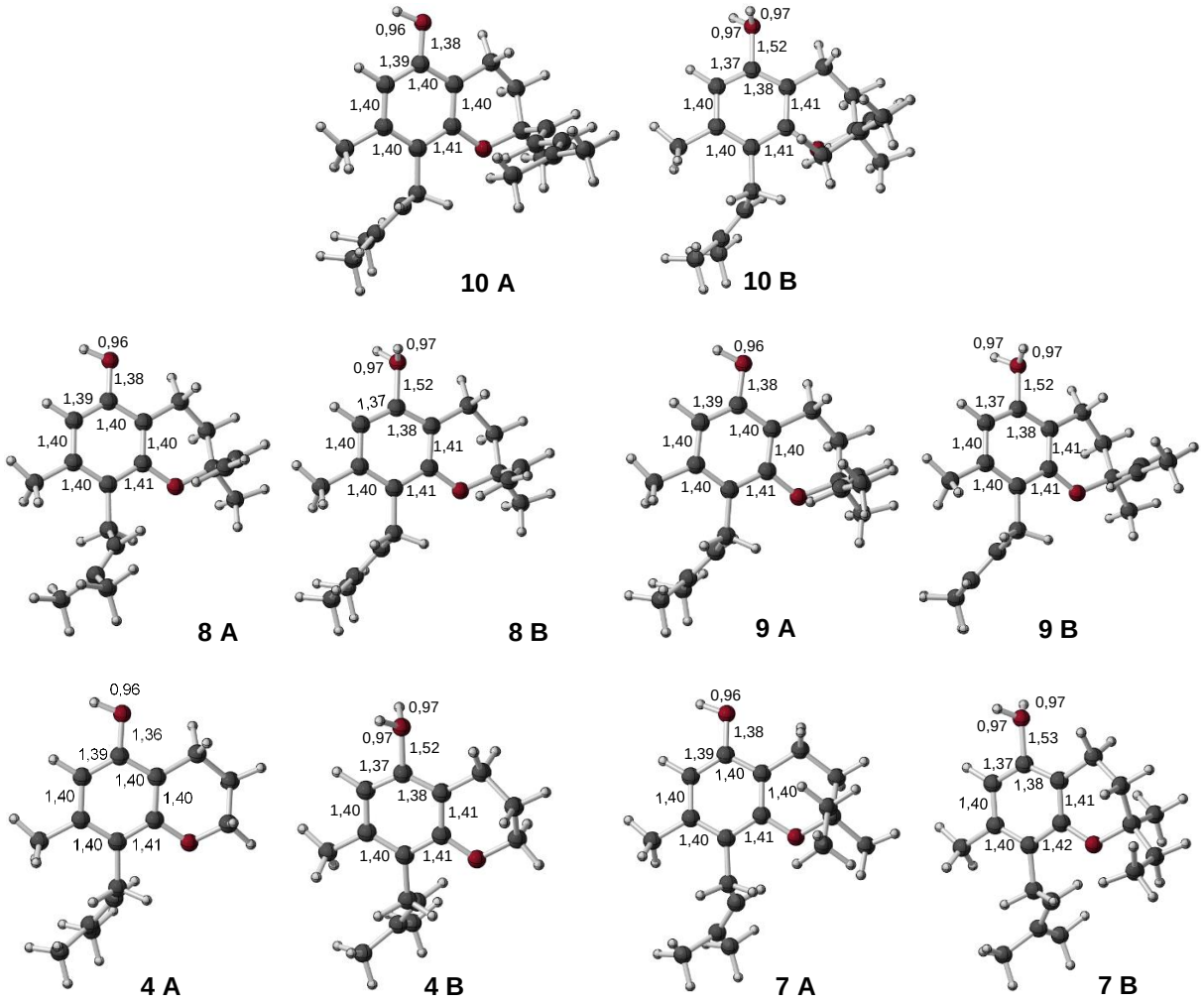
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação a protonação ocorrendo na hidroxila fenólica, as geometrias otimizadas indicaram a formação de um íon produto benzílico após a perda de água. Como ilustrado na Figura 34, a análise das distâncias de ligação C5-O, C4a-C5 e C5-C6 confirma que a formação do íon benzílico deve ocorrer em condições brandas de ativação de íons.

Portanto, para os cromanos **4**-**12**, as grandezas termoquímicas obtidas no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) corroboraram que a etapa de protonação ocorre preferencialmente no anel pirano. Além disso, para os cromanos **9**-**10**, o aumento da

distância de ligação O-C2 mostrou que a protonação assistiu uma etapa de isomerização, via abertura do anel pirano (Figura 33)[36].

Fundamentado pela descrição dos potenciais sítios de protonação, as rotas de fragmentação por ESI(+)-MS/MS foram propostas com a finalidade de entender, bem como descrever um perfil de dissociação em fase gasosa para os cromanos **10**-**12**. É importante mencionar que essas substâncias foram previamente isoladas do extrato vegetal de *Peperomia obtusifolia*[66,67,69].



* Para cada substância as características estruturais chave são representadas para a espécie neutra (**A**) e protonada (**B**). A espécie **B** corresponde a protonação ocorrendo no grupo fenólico. Distâncias de ligação (em Å) selecionadas são mostradas.

Figura 34 - Geometrias otimizadas para os benzopiranos **4**, **7**, **8**, **9** e **10** no modelo B3LYP/6-311++G(d,p).*

Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente, a análise do espectro de massas ESI(+)-MS/MS de **10** (*m/z* 327) mostrou que o íon produto *m/z* 205 é o pico base (Figura 35). Além disso, a ausência de um íon com *m/z* 309 no espectro de massas confirma que a possível perda de água não ocorreu em condições de ESI(+)-MS/MS (Figuras 35 e 36). Como ilustrado na Figura 37, a etapa de protonação no anel pirano favoreceu a clivagem heterolítica da ligação O-C2 do íon *m/z* 327. Na próxima etapa, a fragmentação proposta para explicar a formação do íon produto *m/z* 205 foi baseada em uma clivagem induzida por assistência do heteroátomo, via perda de 122 *u*. O perfil de energia estimado para a rota de fragmentação indicou que a energia relativa de Gibbs do íon diagnóstico *m/z* 205 é 19,8 kcal/mol.

Ao avançar na intepretação do modelo, a análise da curva de energia da [**10**+H]$^+$ indicou que a intensidade relativa do íon *m/z* 205 é 100%, para o intervalo de energia de colisão variando de 15 até 35 eV (Figura 36). Nesse ponto, o aumento da energia de colisão favoreceu um segundo processo de fragmentação, que resultou na formação do íon *m/z* 149 com energia relativa de Gibbs de 35,1 kcal/mol. Uma reação do tipo retro-eno justifica a formação do íon produto *m/z* 149 após a perda de 56 *u* (Figura 37)[36,112,114]. Dessa forma, os dados experimentais estão em acordo com os resultados calculados no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p).

Nesse contexto, uma segunda rota de fragmentação foi proposta para justificar a formação dos íons produtos *m/z* 205, 187 e 149. Como esboçado na Figura 37, o ponto de partida é a protonação na hidroxila fenólica. Na próxima etapa, o átomo de oxigênio do anel pirano assiste a clivagem da ligação C-C via mecanismo concertado, ou seja, o íon produto *m/z* 205 (ΔG = 32,5 kcal/mol) é formado com base no mecanismo rDA. Na etapa seguinte, a perda de 56 *u* via reação do tipo retro-eno explica a formação do íon *m/z* 149 (ΔG = 62,5 kcal/mol). Em condições de ESI-MS/MS, a clivagem direta de uma ligação C-O corrobora com a formação do íon *m/z* 187 (ΔG = 52,6 kcal/mol), após a perda de 18 *u*[36,48].

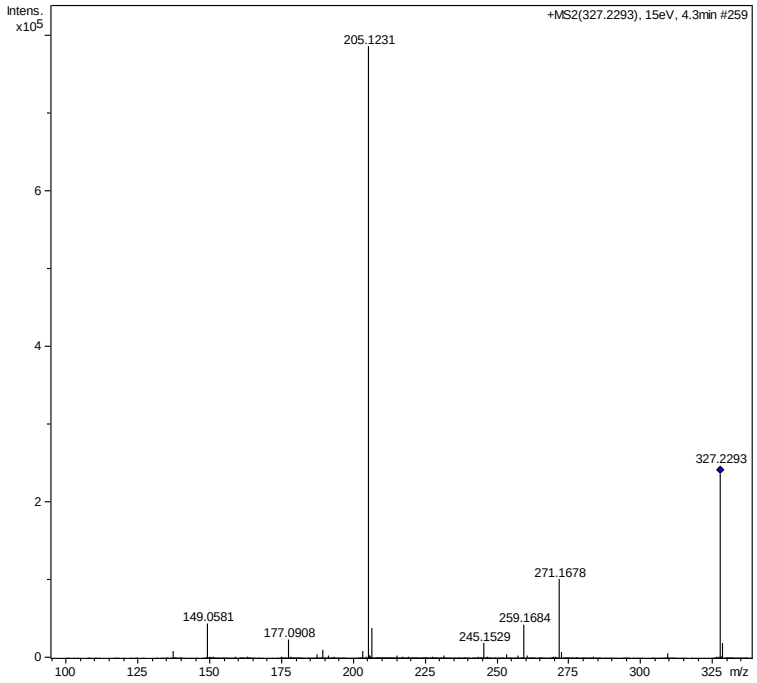


Figura 35 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**10**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 327. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

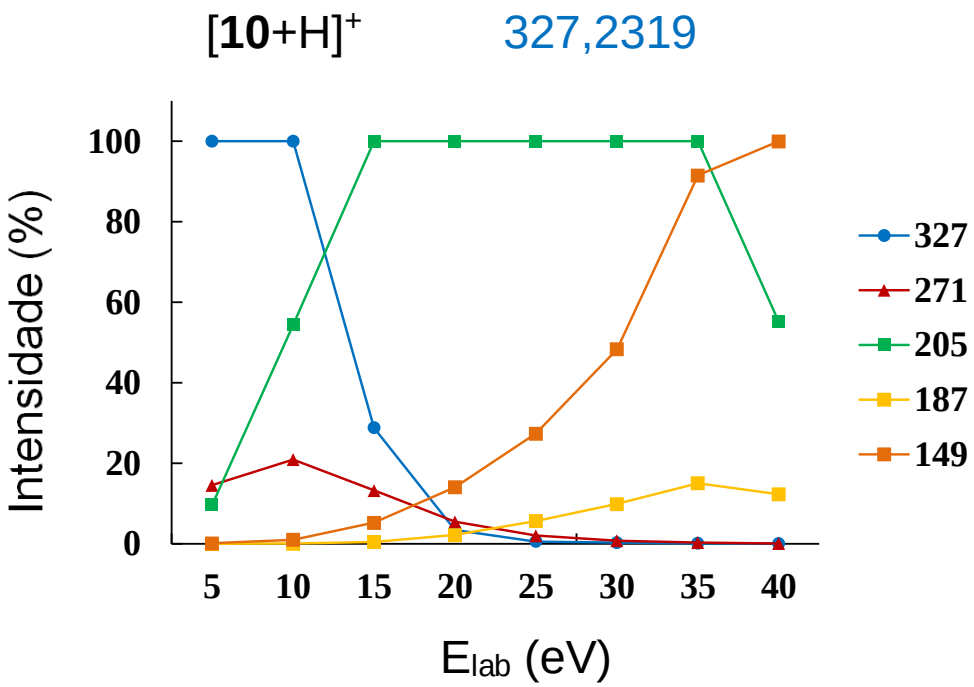
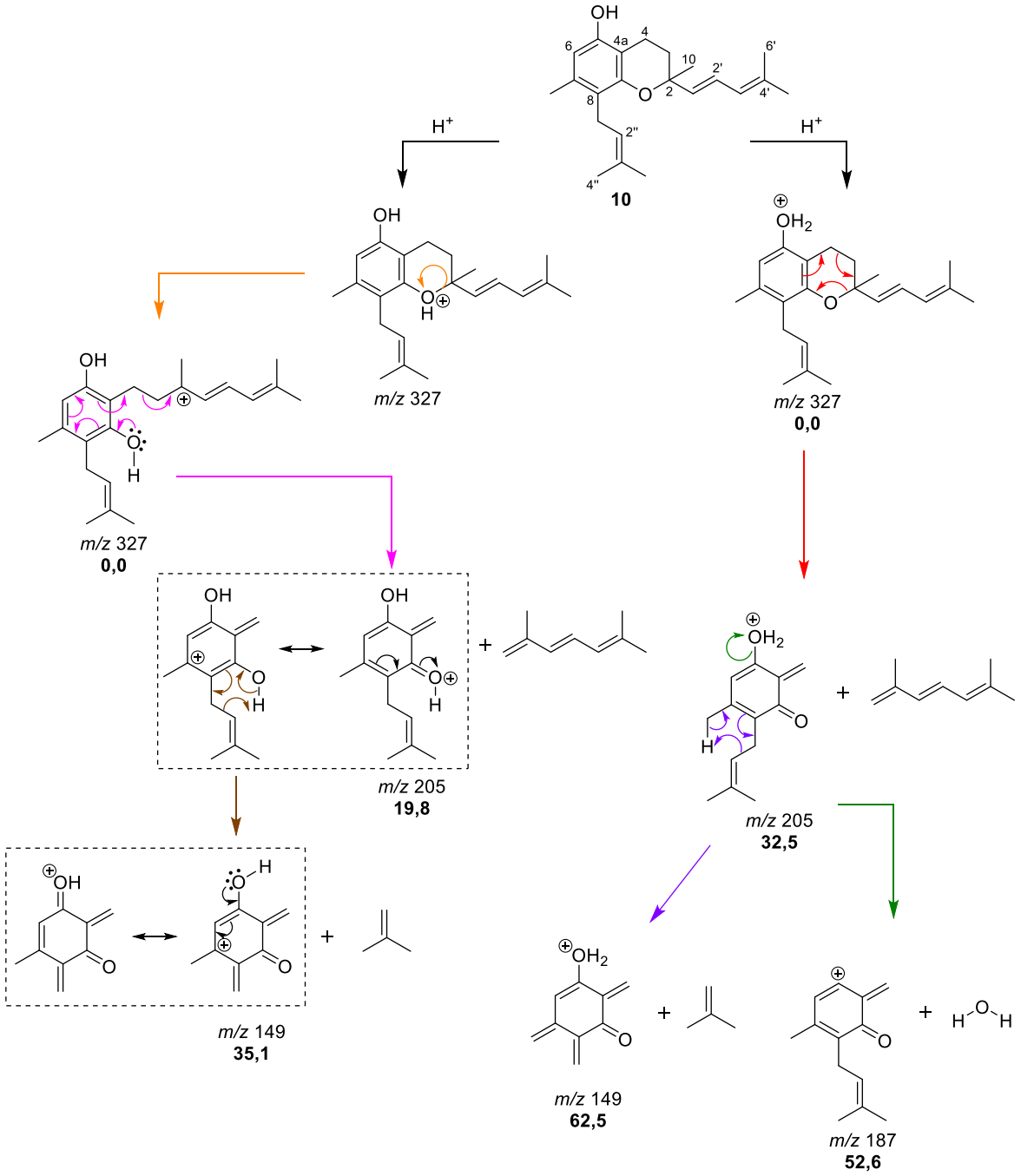


Figura 36 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 327 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF.

Fonte: Elaborada pelo autor.



* As setas coloridas representam tipos específicos de reações de fragmentação[36]: clivagem heterolítica da ligação C-C e abertura do anel pirano (laranja); clivagem induzida por assistência do heteroátomo (rosa); reação do tipo retro-heteroeno (marrom); reação retro Diels-Alder (vermelho); clivagem induzida simples (verde) e reação do tipo retro-eno (violeta). Algumas estruturas contribuintes de ressonância possíveis são mostradas para fins didáticos.

Figura 37 - Proposta de fragmentação para a [**10**+H]$^+$.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) relativas são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em termos energéticos, as etapas elementares descritas na primeira rota são mais favoráveis em relação a segunda rota (Figura 37). A análise da curva de energia da [**10**+H]$^+$ indicou que a distribuição relativa do íon *m/z* 205 em 5, 10 e 15 eV, corresponde a 10, 55 e 100%, respectivamente (Figura 36). No contexto de ativação de íons, a energia máxima transferida em colisões simples é aproximadamente 9,0 kcal/mol (E_{lab} = 5 eV); 18,0 kcal/mol (E_{lab} = 10 eV); e 27,0 kcal/mol (E_{lab} = 15 eV). Assim, o perfil de energia relativa de Gibbs calculada para a primeira rota é similar a predição de energia transferida e, consequentemente, corrobora com a curva de energia[112–114].

Dessa maneira, a formação do íon diagnóstico *m/z* 205 é melhor justificado pela análise das Figuras 29-34, uma vez que a distância de ligação O-C2 aumentou após a adição do próton no átomo de oxigênio do anel pirano. Assim, os resultados reafirmaram a influência da etapa de protonação sobre a química de fragmentação por ESI(+)-MS/MS. Além disso, a racionalização dessa bifurcação é de extrema importância para estudos futuros, uma vez que pode contribuir na sistematização das fragmentações por ESI(+)-MS/MS de PNs de interesse.

Nessa perspectiva, a análise do espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**11**+H]$^+$ (*m/z* 371) permite destacar a formação de íons produtos *m/z* 353, 249 e 231 (Figura 38). Contrariamente a fragmentação de **10**, os resultados obtidos para o cromano **11** confirmam que uma possível perda H_2O (18 *u*) ocorreu em condições de ESI(+)-MS/MS. Além disso, a análise da curva de energia mostrou que a intensidade relativa do íon produto *m/z* 353 é 40% para $E_{lab} \geq 5$ eV (Figura 39). Assim, a fragmentação proposta para explicar a formação do íon produto *m/z* 353 foi baseada em uma clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente[36,112,113] (Figura 40).

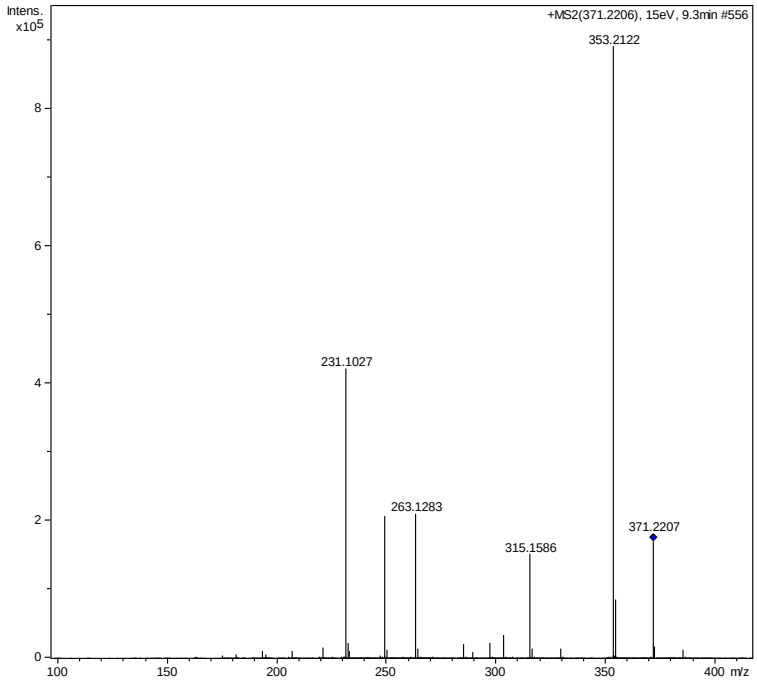


Figura 38 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**11**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

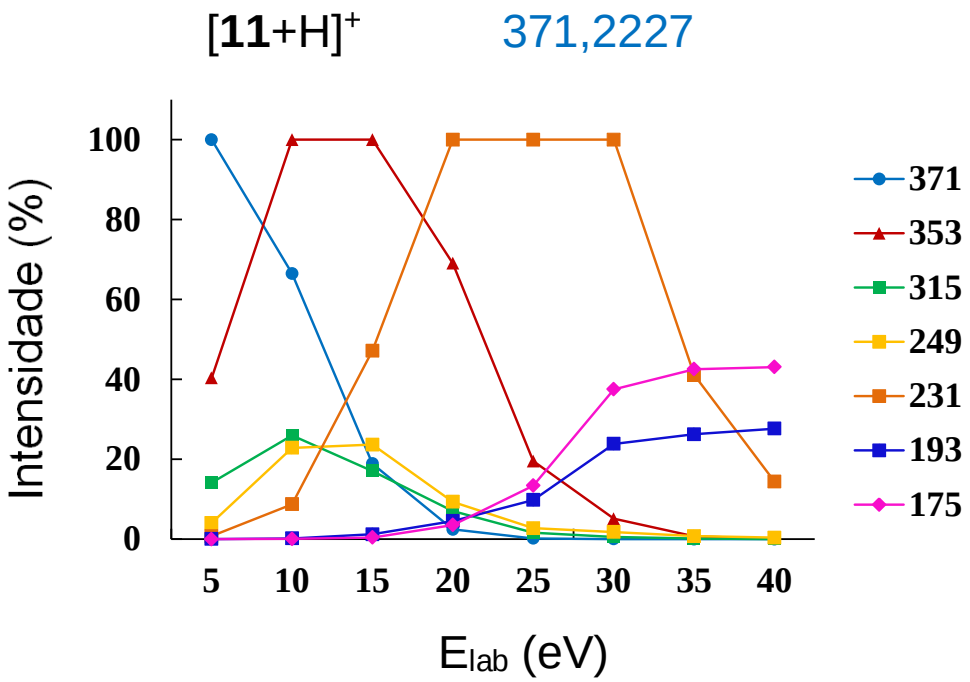


Figura 39 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 371 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adquiridos em aparelho Q-TOF.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como mostrado na Figura 40, os cálculos de otimização de geometria do equilíbrio ácido-base corroboraram com a eliminação de água via clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente, formando um íon produto *m/z* 353. Portanto, a perda de H_2O a partir da espécie protonada do cromano ácido (**11**) é favorecida devido a estabilidade do íon acílio *m/z* 353 (ΔG = -11,11 kcal/mol)[36,111].

Ao avançar na intepretação do perfil de fragmentação, a análise da curva de energia da [**11**+H]$^+$ indicou que a intensidade relativa do íon *m/z* 231 é 100%, para o intervalo de energia de colisão variando de 20 até 30 eV (Figura 39). Nessas condições, os valores de energia máxima transferida em colisões simples entre o íon *m/z* 371 e o gás de colisão correspondem a 32,36 kcal/mol (E_{lab} = 20 eV); 40,46 kcal/mol (E_{lab} = 25 eV); e 48,55 kcal/mol (E_{lab} = 30 eV). Assim, o aumento da energia de colisão favorece a perda neutra de 122 *u* (C_9H_{14},) a partir do íon acílio *m/z* 353, o que resulta no íon produto *m/z* 231 (ΔG = 26,28 kcal/mol). A dissociação em fase gasosa do núcleo benzopirano com base no mecanismo rDA requer uma energia crítica de aproximadamente 37,4 kcal/mol (Figura 40). Assim, o conteúdo de energia adicional disponível à partir de 20 eV é suficiente para justificar a formação do íon produto *m/z* 231[36,48,112,113].

Dentro desse panorama, uma segunda rota de fragmentação foi proposta a partir do íon precursor *m/z* 371. Como esboçado na Figura 40, o ponto de partida para a formação do íon *m/z* 249 é a protonação do átomo de oxigênio do anel pirano, resultando no íon isomérico *m/z* 371 após a clivagem heterolítica da ligação O-C2. Na próxima etapa, uma clivagem induzida por assistência do heteroátomo explica a perda neutra de 122 *u* originando um íon produto *m/z* 249[36].

Do ponto de vista energético, a formação do íon *m/z* 249 requer uma energia crítica de aproximadamente 21,5 kcal/mol. Assim, a proposta de fragmentação descrita na rota 2 foi alicerçada pela análise da curva de energia da [**11**+H]$^+$, uma vez o íon *m/z* 249 é gerado em colisões brandas de ativação de íons (Figura 39).

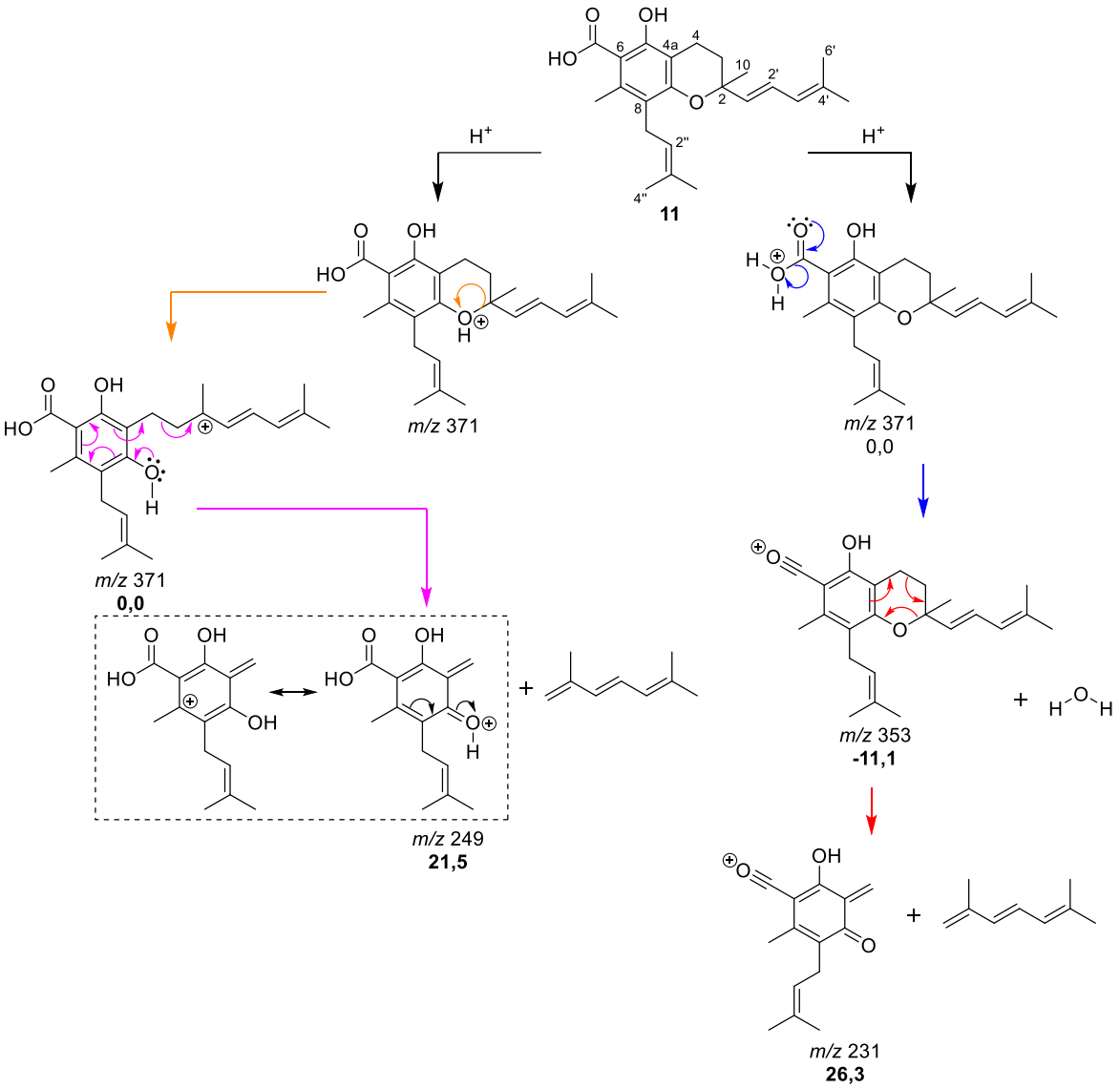
Nesse contexto, o perfil de fragmentação de **11** pode ser correlacionado ao de **10**. O estudo teórico corroborou que o átomo de oxigênio do anel pirano é o sítio molecular com maior caráter nucleofílico, baseado nos dados obtidos no modelo B3LYP/6-311++G(d,p). No entanto, o padrão de substituição do anel aromático influenciou no modelo de protonação previamente calculado para a série de benzopiranos. Como observado nas curvas de energia das espécies protonadas, a

distribuição relativa dos íons produtos confirmam que os íons diagnósticos da [**11**+H]$^+$ são formados por reações de fragmentação específicas.

Particularmente, a etapa de protonação da carboxila foi favorecida devido a estabilidade do íon acílio formado após a perda de H_2O. Além disso, em termos de otimização de geometria, a ocorrência de uma interação de hidrogênio contribuiu significativamente na ordem de reatividade da subunidade acila de **11**. Portanto, os aspectos químicos envolvidos durante a etapa de protonação governam, na maioria das vezes, a química de fragmentação por ESI(+)-MS/MS.

Nesse contexto, a análise do espectro de massas ESI(+)-MS/MS e da curva de energia da [**12**+H]$^+$, permitiu deduzir que os principais íons produtos gerados durante a ativação de íons, são consistentes com a química de fragmentação da [**11**+H]$^+$, incluindo a detecção dos íons *m/z* 385, 371, 353, 249 e 231 (Figuras 41 e 42). Por exemplo, a formação dos íons produtos *m/z* 353 e 231 pode ser explicada a partir das perdas neutras consecutivas de 154 e 122 *u*, respectivamente.

Com base nos conceitos de hibridização, a protonação de ésteres deve ocorrer no átomo de oxigênio da subunidade acila e, por isso, o equilíbrio tautomérico é a etapa limitante para iniciar a proposta de fragmentação (Figura 43). Assim, a energia necessária para deslocar a reação no sentido da tautomerização é aproximadamente 12,0 kcal/mol, como observado no perfil de energia calculado no modelo B3LYP/6-31+G(d,p). Do ponto de vista energético, a transferência do próton poderá acontecer para E_{lab} ≥ a 10 eV, uma vez que a energia transferida em colisões simples é 12,1 kcal/mol quando E_{lab} = 10 eV (p. ex.: colisão entre o íon precursor e o gás de colisão)[36,111,112,114]. Consequentemente, a etapa elementar de tautomerização favorece a clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente, justificando a formação do íon acílio *m/z* 353 (ΔG = 13,2 kcal/mol) a partir do íon *m/z* 507 (Figura 43). Na próxima etapa, o mecanismo rDA justifica a formação do íon produto *m/z* 231, após a perda de 122 *u* (Figura 40). Concordando com o cromano ácido (**11**), a proposta de reção também é favorecida para o derivado esterificado (**12**) devido a estabilidade do íon acílio[36].



* As setas coloridas representam tipos específicos de reações de fragmentação[36]: clivagem heterolítica da ligação C-C e abertura do anel pirano (laranja); clivagem induzida por assistência do heteroátomo (rosa); reação do tipo retro-heteroeno (marrom); clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente (azul); reação retro Diels-Alder (vermelho). Algumas estruturas contribuintes de ressonância possíveis são mostradas para fins didáticos.

Figura 40 - Proposta de fragmentação para a [**11**+H]$^+$.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Adicionalmente, a análise da curva de energia da [**12**+H]$^+$ indicou que a intensidade relativa do íon produto *m/z* 353 é 100%, no intervalo de ativação de 10 ≤ E_{lab} ≤ 25 eV (Figura 42). Paralelamente, duas rotas de fragmentação foram propostas para descrever a formação dos íons produtos *m/z* 385 e 371 a partir do íon precursor

m/z 507. Como mostrado na Figura 43, a protonação do átomo de oxigênio do anel pirano favorece a clivagem heterolítica da ligação O-C2, produzindo um íon isomérico *m/z* 507 devido a abertura do anel pirano. Nas condições de ESI(+)-MS/MS, a etapa que desloca a reação no sentido de formação do íon isomérico *m/z* 507 é chave para propor uma bifurcação no perfil de fragmentação do cromano **12**. Assim, o íon isomérico *m/z* 507 pode ser dissociado em fase gasosa com a perda de 122 *u*, gerando o íon produto *m/z* 385 via clivagem induzida por assistência do heteroátomo[36,112,113].

Por outro lado, um rearranjo de hidrogênio do tipo retro-heteroeno (reação de McLafferty) com perda neutra de 136 *u* (Figura 43), corroborou com a formação do íon produto *m/z* 371 (ΔG = 7,4 kcal/mol). A análise da curva de energia da [**12**+H]$^+$ indicou que os íons *m/z* 385 e 371 são obtidos em colisões brandas de ativação de íons, alicerçando a prosposta de bifurcação do mecanismo de fragmentação do íon *m/z* 507[36,112–114].

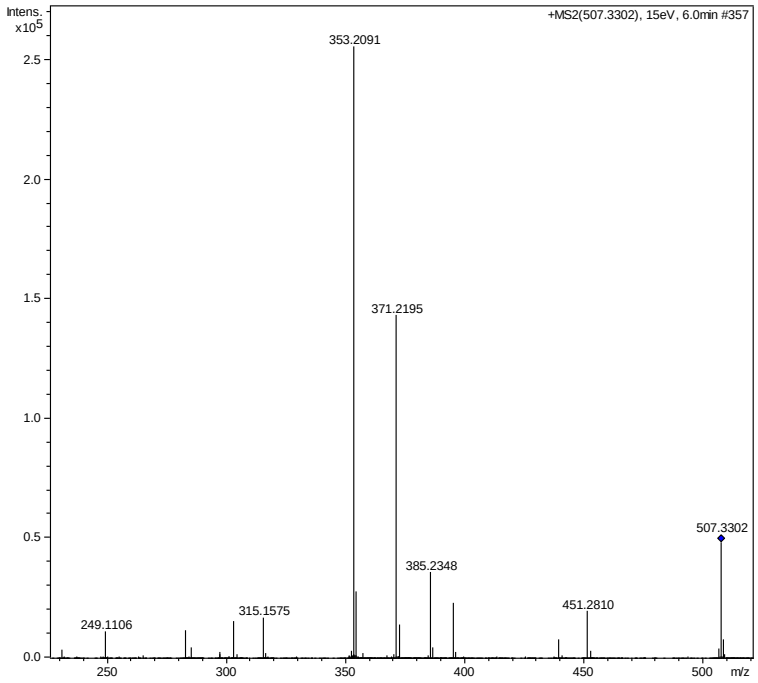


Figura 41 - Espectro de massas de ESI(+)-MS/MS da [**12**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TOF selecionando o íon precursor *m/z* 371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa forma, a distribuição dos íons fragmentos na curva de energia as espécies protonadas confirmaram que os processos de dissociação em fase gasosa são governados por particularidades na etapa de protonação. A origem desses efeitos pode ser correlacionada com características estruturais (p. ex.: o número, o tipo, a posição e o volume de um determinado substituinte), as quais influenciaram o caráter nucleofílico dos principais sítios de protonação. No entanto, o uso dos parâmetros termoquímicos calculados com base na DFT auxiliou na descrição de um padrão de fragmentação de cromanos naturais por ESI(+)-MS/MS.

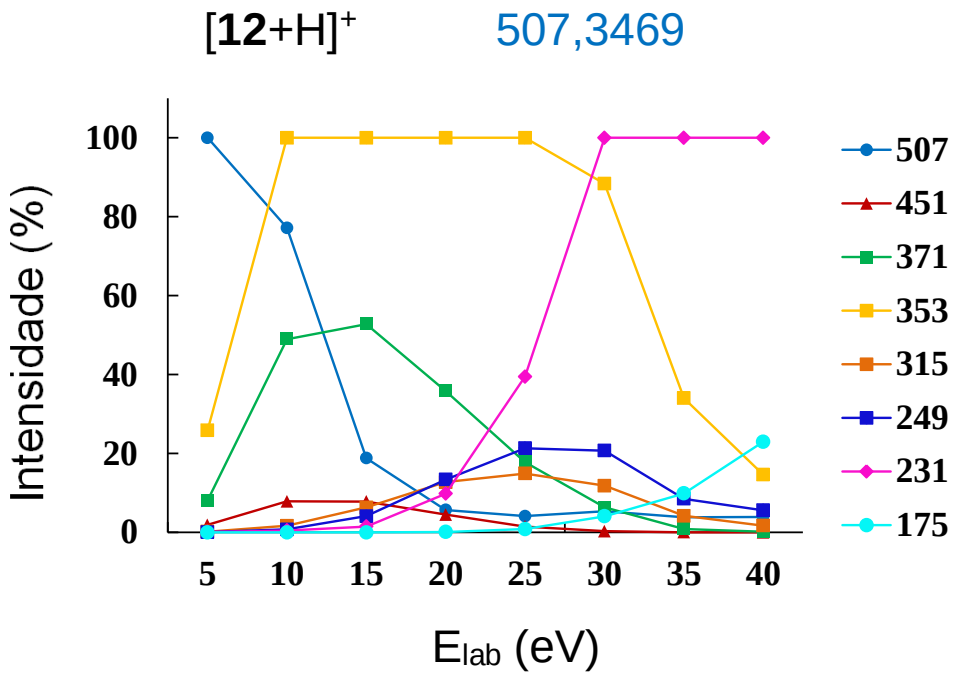
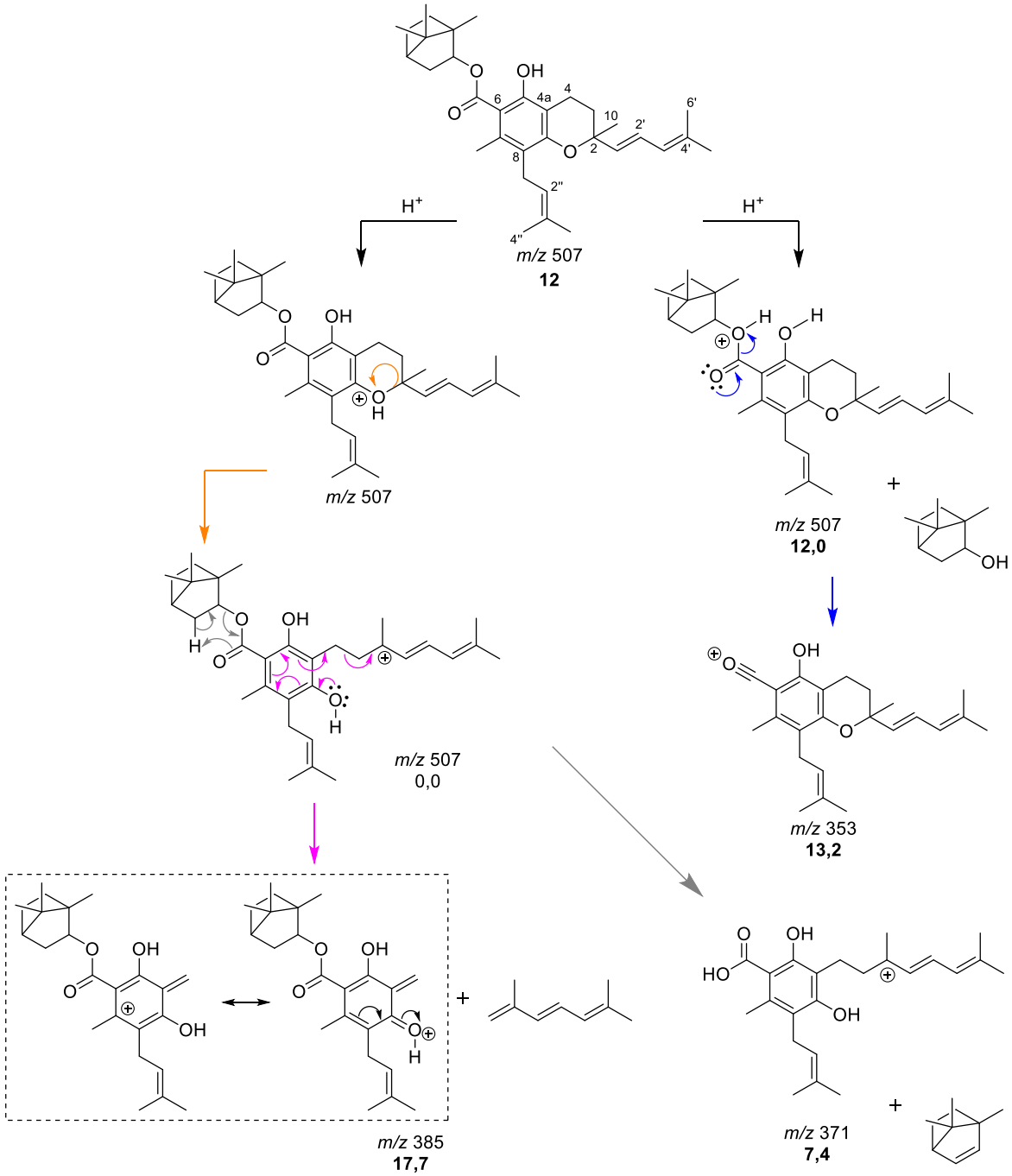


Figura 42 - Curva de energia do íon precursor *m/z* 507 obtida a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS. A faixa de ativação de íons variou de 5 a 40 eV. A *m/z* observada em alta resolução é mostrada na parte superior da curva de energia. Os experimentos foram adiquiridos em aparelho Q-TOF.

Fonte: Elaborada pelo autor.



* As setas coloridas representam tipos específicos de reações de fragmentação[36]: clivagem heterolítica da ligação C-C e abertura do anel pirano (laranja); clivagem induzida por assistência do heteroátomo (rosa); rearranjo do tipo McLafferty (cinza); clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente (azul). Algumas estruturas contribuintes de ressonância possíveis são mostradas para fins didáticos.

Figura 43 - Proposta de fragmentação para a [**12**+H]$^+$.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Estudo do processo de extração de espécies de *Piper*: rastreamento analítico do perfil metabólico por CLAE

O processo envolvido durante a(s) fase(s) de extração do metaboloma pode ser determinante para o desenvolvimento das etapas de aquisição e tratamento de dados, incluindo a intepretação dos resultados obtidos por meio de análises cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas[26]. Em geral, a extração com solventes orgânicos ou com solução hidroalcoólica é um método de referência para o preparo de extratos vegetais. No entanto, a eficiência ou capacidade de extração, a toxicidade e o custo são parâmetros fundamentais que precisam ser considerados durante a escolha do solvente ou solução hidroalcoólica de trabalho[16,26,33]. Diante do exposto e com a finalidade de estudar a química de fragmentação por ESI-MS/MS de benzopiranos em amostras complexas, extratos vegetais das espécies de *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* foram preparados e analisados por CLAE em modo reverso.

A Figura 44 ilustra as características chave do processo de preparo dos extratos vegetais das espécies de *Piper aduncum*, *Piper aboreum* e *Piper tuberculatum* por maceração com metanol (MeOH), etanol (EtOH) e acetona (AceO). Para interpretar os contrastes gerados na eficiência do processo por maceração com solventes foram determinados: o rendimento para cada extrato bruto (RmB%), o rendimento após preparo de amostra (RmPA%) e o número de bandas cromatográficas detectadas (nBCd) por CLAE.

Primeiramente, a análise dos RmB% calculados reforçou que a escolha do solvente é um parâmetro importante para o preparo do extrato, uma vez que a constituição da matriz vegetal associada a polaridade e a concentração dos analitos alvos podem influenciar na eficiência do processo de maceração. Em termos de rendimento, o MeOH foi eficiente para o preparo dos extratos vegetais das três espécies estudadas. Por exemplo, o RmB% do processo de maceração com MeOH para a espécie *P. aduncum* foi, aproximadamente, 75% superior aos extratos obtidos quando empregado EtOH e AceO (Figura 44A). Além disso, para as espécies *P. tuberculatum* e *P. arboreum*, os RmPA% calculados aumentaram aproximadamente cinco vezes em relação aos solventes EtOH e AceO (Figuras 44A e 44C).

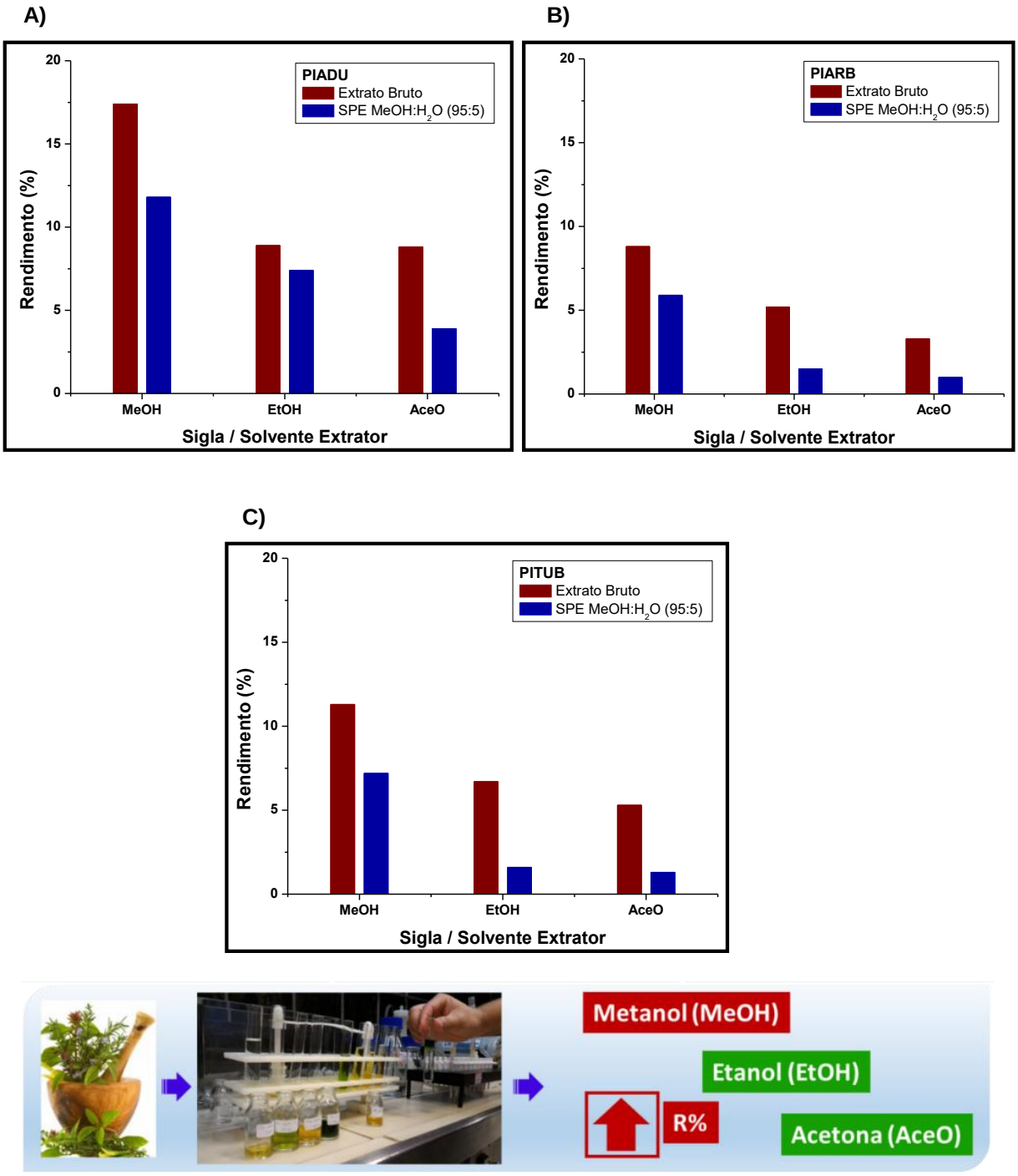
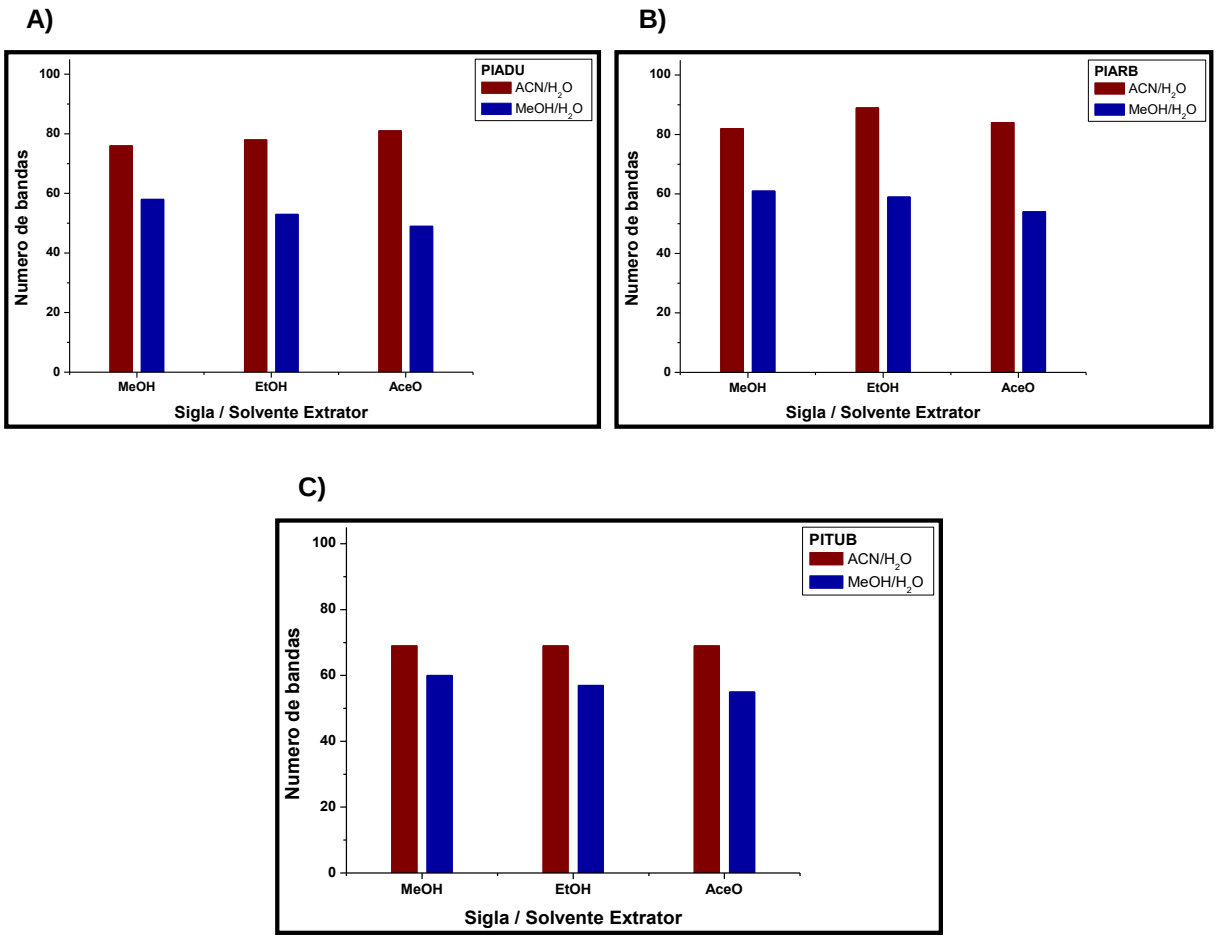


Figura 44 - Gráficos de rendimento em função do solvente de extração para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU), B) *Piper tuberculatum* (PIARB) e C) *Piper arboreum* (PITUB). Para cada espécie os rendimentos dos extratos brutos e daqueles após o preparo de amostra são indicados pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Desta forma, analisando apenas o parâmetro analítico rendimento, o MeOH pode ser utilizado para o preparo de extratos vegetais das espécies de *Piper* em questão. Por outro lado, as análises por CLAE indicaram que o EtOH e AceO também são potenciais solventes para o preparo de extratos vegetais por maceração. Em relação a espécie *P. aduncum*, os nBCd foram aproximadamente 80 e 60 para a fase móvel composta por ACN/H_2O e MeOH/H_2O, respectivamente (Figura 45A).

Consequentemente, a análise por CLAE indicou que a maceração com EtOH e AceO é eficiente em termos de número de metabólitos, independente do rendimento calculado. Por exemplo, para a espécie *P. tuberculatum*, os valores para o nBCd foram aproximadamente 70 e 60 para a fase móvel composta por ACN/H_2O e MeOH/H_2O, respectivamente (Figura 45C). A mesma analogia pode ser empregada para a espécie *P. arboreum* (Figura 45B), sendo os nBCd de 85 (fase móvel composta por ACN/H_2O) e 58 (fase móvel composta por MeOH/H_2O). Portanto, o estudo do processo de extração por maceração indicou que o etanol e a acetona podem ser empregados para o preparo de extratos vegetais de espécies de *Piper*. Ao considerar a toxicidade e a capacidade de extração dos solventes avaliados, o EtOH e a AceO são desejáveis para o desenvolvimento da etapa de extração.



* O valor atribuído ao nBCd é calculado a partir da média do número de bandas cromatográficas entre duas injeções (mesma amostra), sendo subtraído deste valor a média do número de bandas cromatográficas detectadas na análise cromatográfica controle. Os cromatogramas das análises por CLAE estão disponíveis no Apêndice C.

Figura 45 - Perfil do número de bandas cromatográficas detectadas (nBCd),* a 254 nm, para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU), B) *Piper tuberculatum* (PIARB) e C) *Piper arboreum* (PITUB). As fases móveis constituídas por ACN/H_2O e MeOH/H_2O são indicadas pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Estudo do processo de extração das espécies de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia*: rastreamento analítico do perfil metabólico por CLAE

O estudo do processo de extração apresentado na seção anterior mostrou que a escolha do solvente pode ser determinante na construção do perfil metabólico de espécies do gênero *Piper*. Com base nos resultados alcançados, um segundo processo de extração por maceração com solventes foi proposto e avaliado, uma vez que os benzopiranos são substâncias biossintetizadas por espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*. Nessa proposta, as espécies *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* foram selecionadas para o delineamento experimental, que avaliou a influência dos solventes orgânicos: butanol (BuOH), isopropanol (IsOH), acetato de etila (AcOEt), etanol (EtOH) e acetona (AceO). A interpretação dos dados foi realizada com os mesmos indicadores discutidos no item 4.3, exceto que nessa proposta as análises cromatográficas foram realizadas com um único sistema de fase móvel.

A comparação dos valores de rendimento (RmB% e RmPA%) indicou que o processo de solvatação apresenta variabilidade inter- e intraespécie. Essa variação aleatória no Rm% dos extratos pode ser correlacionada com a diversidade estrutural do metaboloma das espécies estudadas, associada a capacidade de maceração do solvente sobre o material vegetal. No geral, a análise dos rendimentos confere que o processo de extração por maceração é mais eficiente para o preparo de extratos a partir da espécie *P. aduncum*.

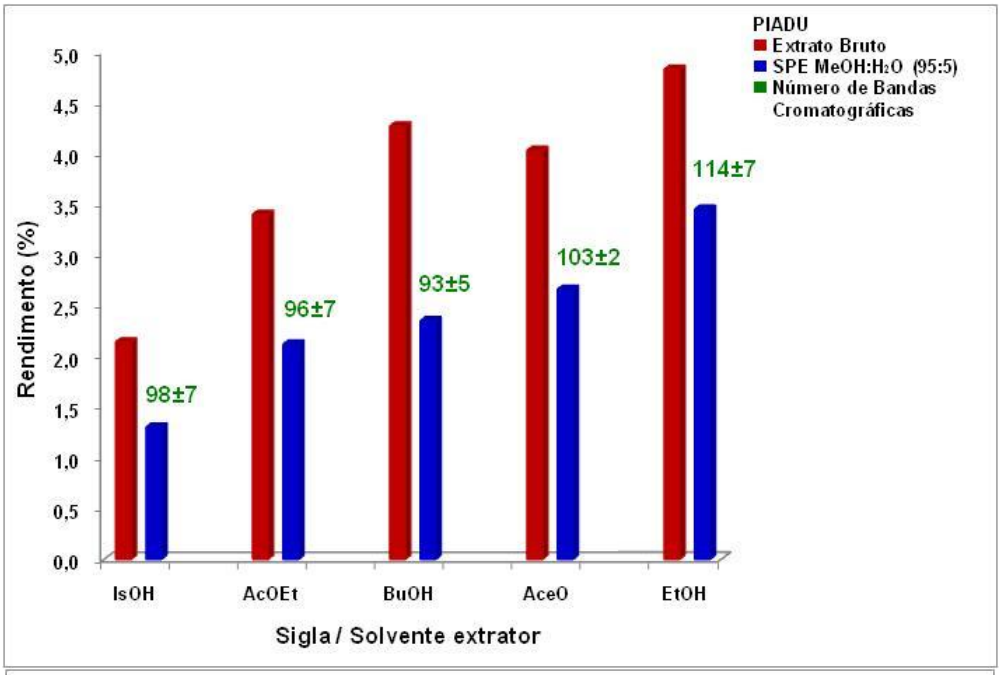
Nesse contexto, a eficiência do processo de extração com base na análise dos RmPA% calculados para os extratos de *P. aduncum* pode ser sistematizada na seguinte ordem: i - menor para o IsOH (1,3%); ii - intermediário para AcOEt (2,1%) e BuOH (2,3%); e iii - maior para AceO (2,7%) e EtOH (3,5%). Além disso, a comparação do perfil metabólico por CLAE associada ao nBCd (aproximadamente 100) são indicativas para o uso do EtOH e/ou AceO no preparo de amostras para as análises metabolômicas (Figura 46A).

Nesta mesma linha de discussão, para a espécie *Peperomia obtusifolia,* os rendimentos dos extratos vegetais foram similares para o uso de BuOH, AcOEt, EtOH e AceO, sendo os RmB% aproximadamente 2,0%. No entanto, a eficiência na extração foi reduzida à metade para o solvente IsOH em relação aos outros solventes.

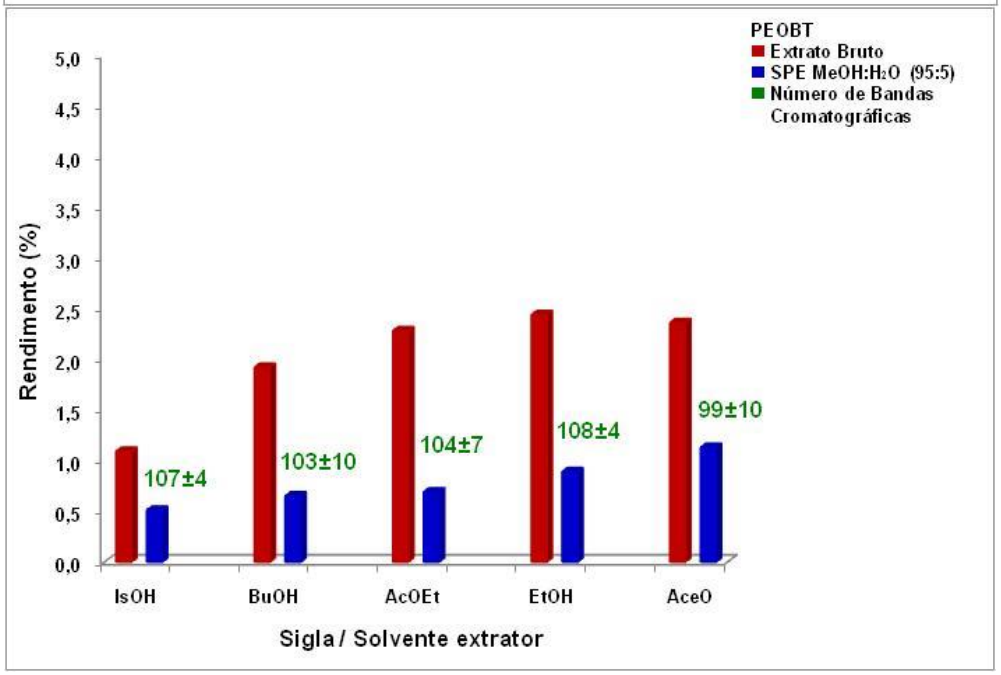
Em contrapartida, a análise dos RmB% e RmPA% usando o EtOH e a AceO ratificou que os solventes verdes são eficientes para o preparo de extratos vegetais. Concomitantemente, as análises por CLAE permitiu comparar o perfil metabólico e determinar o nBCd para cada extrato vegetal, sendo o nBCd calculado com mínimo e máximo variando entre 90 e 110 para a espécie *Peperomia obtusifolia* (Figura 46B).

Portanto, a análise global dos resultados obtidos na triagem do perfil metabólico das espécies de *Piper* e *Peperomia* corroborou que os solventes verdes, EtOH e/ou AceO, são eficientes para o desenvolvimento das etapas experimentais do estudo metabolômico proposto. Além disso, no cenário atual, desenvolver e aplicar metodologias que minimizem o impacto ao meio ambiente é um tema relevante em pesquisa e gestão organizacional.

A)



B)



* O valor atribuído ao nBCd é calculado a partir da média do número de bandas cromatográficas entre duas injeções (mesma amostra), sendo subtraído deste valor a média do número de bandas cromatográficas detectadas na análise cromatográfica controle.

Figura 46 - Gráficos de rendimento em função do solvente de extração para as espécies: A) *Piper aduncum* (PIADU) e B) *Peperomia obtusifolia* (PEOBT). Para cada espécie os rendimentos dos extratos brutos e daqueles após o preparo de amostra são indicados pelas barras vermelhas e azuis, respectivamente. O valor na cor verde é o número de bandas cromatográficas detectadas (nBCd) a 254 nm.*

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Identificação de 2*H*-cromenos e cromanos em extratos vegetais a partir dos dados obtidos nas análises por ESI(+)-MS/MS e química computacional

Os resultados alcançados indicaram que a combinação de métodos analíticos e computacionais são promissores para o desenvolvimento de abordagens eficientes e versáteis no estudo de PNs, incluindo propostas com escopos relacionados a análise metabolômica e a estudos biotecnológicos e de bioprospecção.

Na análise da influência do solvente orgânico para o preparo de extratos vegetais de *Piper* e *Peperomia*, o perfil metabólico por CLAE corroborou que os solventes verdes (EtOH e/ou AceO) podem ser utilizados para a triagem de extratos vegetais de espécies de Piperaceae. Em posse do perfil de extração por maceração e do modelo teórico/experimental investigado nos tópicos anteriores, extratos vegetais de *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* foram analisados por ESI(+)-MS/MS com a finalidade de detectar os benzopiranos em mistura. A aquisição de informação estrutural em amostras biológicas é peça fundamental para verificar a eficiência da estratégia e, consequentemente, viabilizar o uso de novas altenativas na busca de PNs de interesse.

Nesse contexto, a análise exploratória do extrato vegetal de *Piper aduncum* (após preparo em AceO) por ESI(+)-MS indicou a presença dos íons *m/z* 235,0965 e 219,1021. Após, análises por ESI(+)-MS/MS mostraram que o íon produto *m/z* 203 é o pico base do espectro de massas do íon precursor *m/z* 235, bem como o íon produto *m/z* 187 é o pico base do espectro de massas do íon precursor *m/z* 219 (Figura 47). A formação dos íons produtos *m/z* 203 e 187 é indicativa para perda de 32 *u* a partir dos íons precursores *m/z* 235 e 219, respectivamente.

Dessa forma, a análise das curvas de energia[113] permitiu estabelecer algumas tendências do processo de ativação de íons (Figura 48), incluindo: i - a intensidade relativa dos íons precursores *m/z* 235 e 219 é 100% para $E_{lab} \leq 10$ eV; ii - a intensidade relativa do íon produto *m/z* 203 formado a partir do íon *m/z* 235 é 100% para $15 \geq E_{lab} \leq 25$ eV. Observa-se que essa relação pode ser aplicada aos íons *m/z* 219 (íon precursor) e 187 (íon produto), sendo a faixa de energia de $15 \geq E_{lab} \leq 30$ eV; e iii) a intensidade relativa dos íons produtos *m/z* 175 e 161 formado a partir do íon *m/z* 235 é aproximadamente 70% para $E_{lab} = 30$ eV. Além disso, a intensidade relativa dos íons

produtos *m/z* 159 e 145, formados a partir do íon *m/z* 219, é > 60% para E_{lab} ≥ a 30 eV.

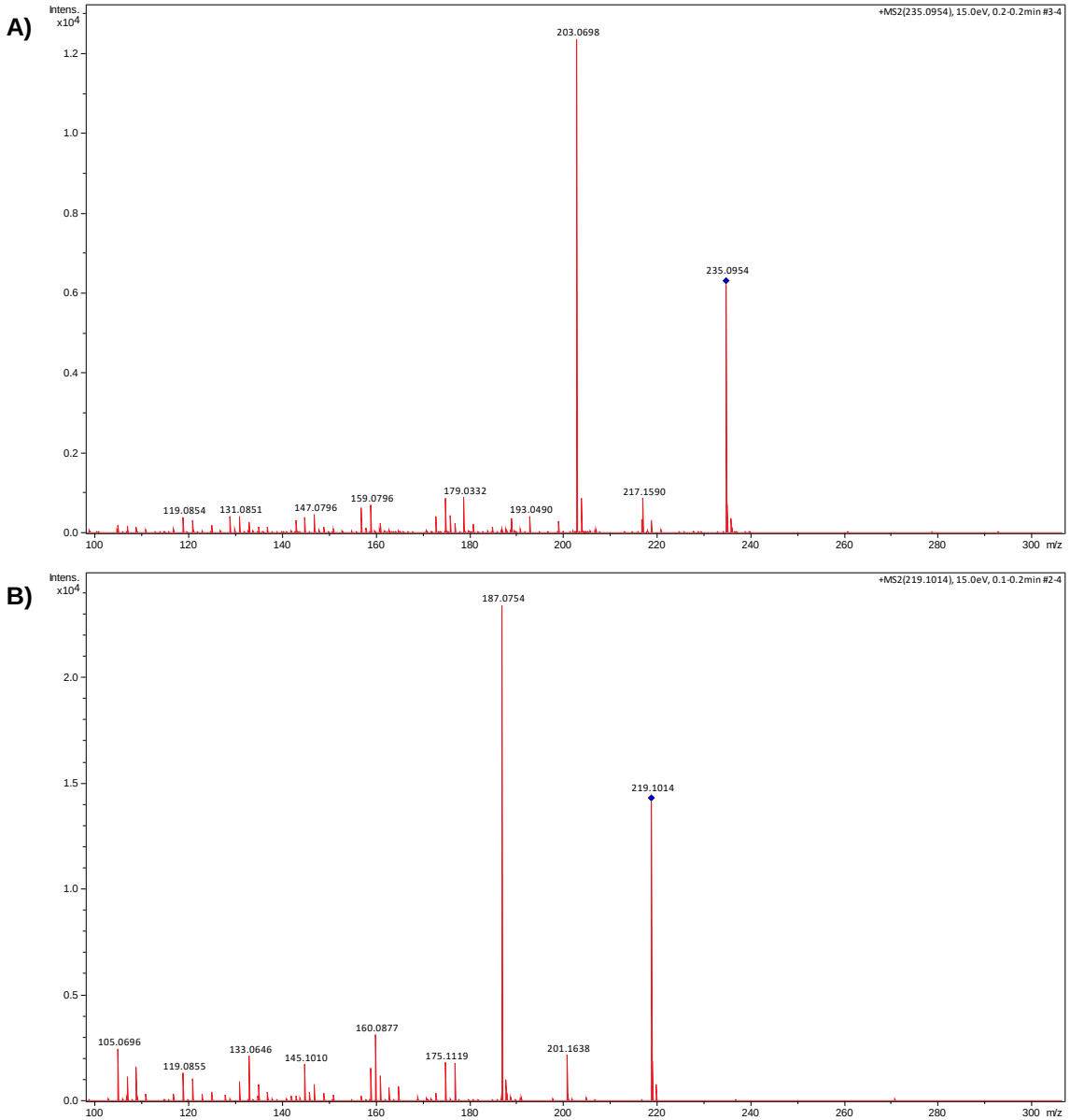


Figura 47 - Espectros de massas ESI(+)-MS/MS obtidos em um aparelho Q-TOF selecionando os íons precursores: A) *m/z* 235 e B) *m/z* 219. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

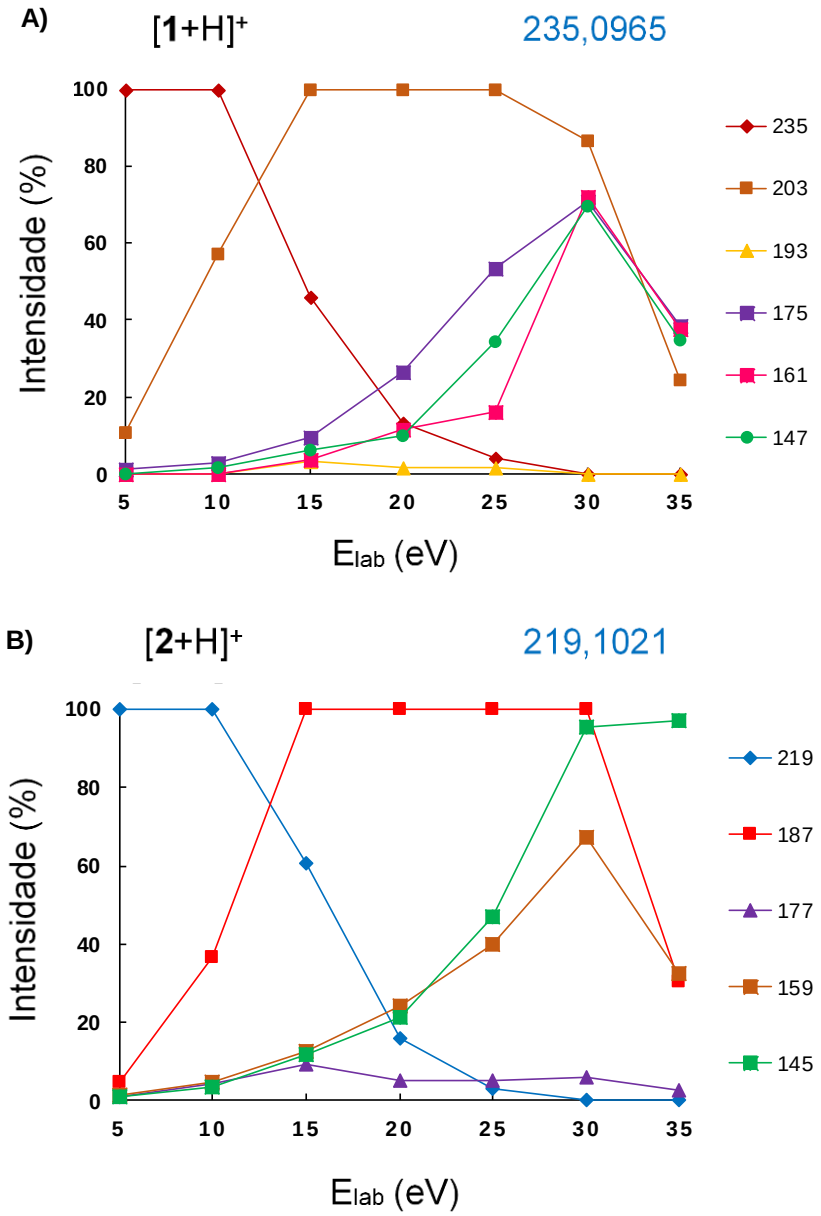


Figura 48 - Curvas de energia obtidas a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS para os íons precursores: A) *m/z* 235 e B) *m/z* 219. A faixa de ativação de íons utilizada foi de 5 a 35 eV. A *m/z* observada em alta resolução para cada íon precursor é mostrada na parte superior da curva de energia. O experimento foi adquirido em um aparelho Q-TOF.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Notadamente, os resultados das análises em mistura estão em acordo com o modelo de fragmentação apresentado para os 2*H*-cromenos **1**-**3**. Dessa maneira, a proposta de identificação estrutural dos íons *m/z* 235 e 219 envolveu o uso dos dados obtidos por ESI(+)-MS/MS, associado aos cálculos de grandezas termoquímicas com base na DFT.

Primeiramente, é importante destacar que os resultados obtidos com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p) indicaram que a etapa de protonação dos 2*H*-cromenos deve ocorrer preferencialmente na carboxila. Por exemplo, o sentido da etapa de protonação do 2*H*-cromeno **2** deve estar deslocado para a subunidade acila (BG = 207,0 kcal/mol)[111] e, a seguir, para a região do anel pirano (BG = 186,3), como esboçado na Figura 15.

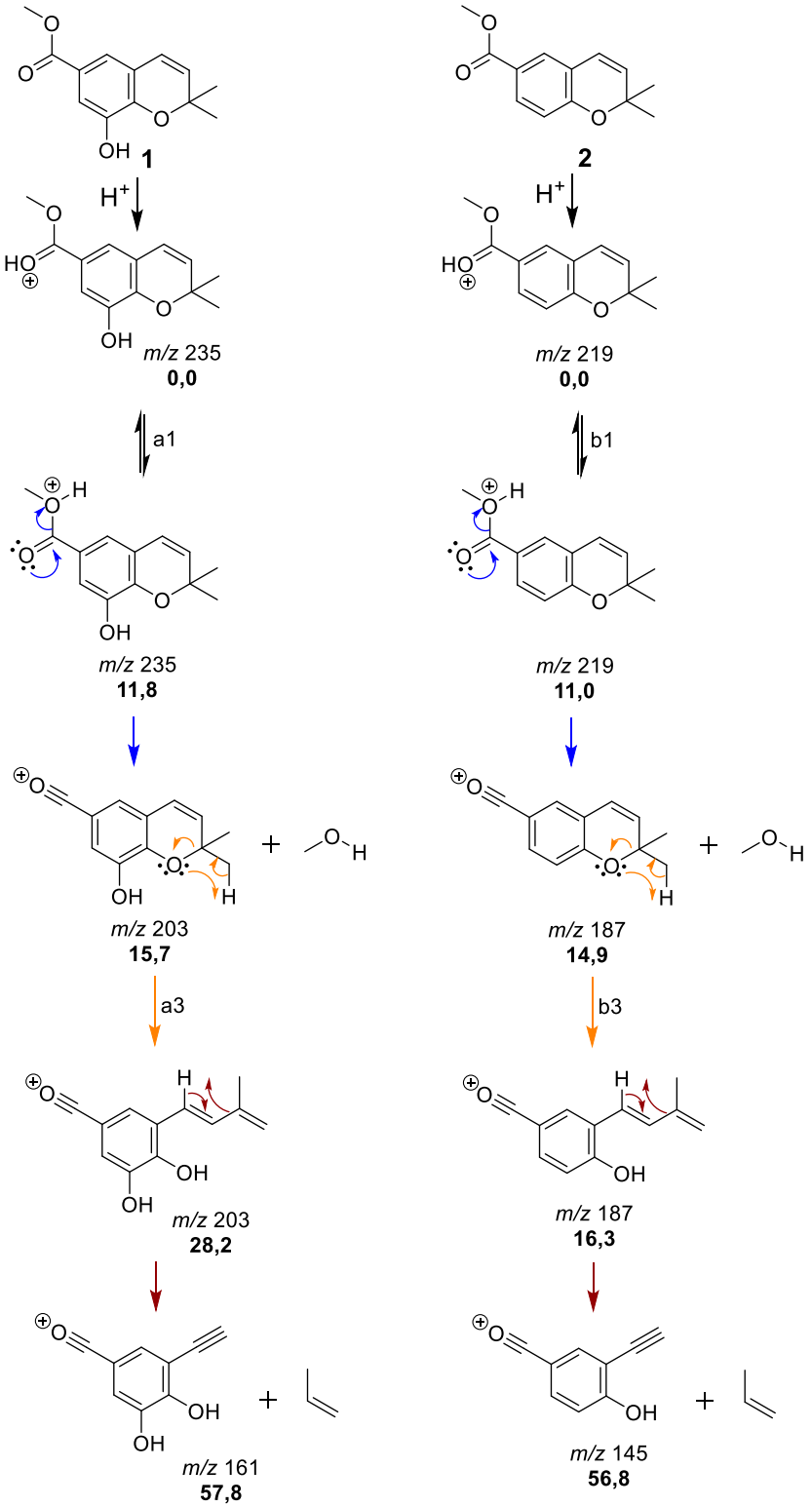
Nessa perpectiva, a descrição dos potenciais sítios de protonação reforçou a ocorrência preliminar de um equilíbrio tautomérico entre os átomos de oxigênio. Essa transferência do próton favorece a perda de MeOH (32 *u*) via clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente, indicando a formação de um possível íon acílio *m/z* 203 ou 187. Essa proposta pode ser corroborada com base no fenômeno de transferência de energia em colisões simples com o gás N_2. Assim, o equilíbrio tautomérico e a clivagem induzida são favorecidos durante a ativação dos íons precursores *m/z* 235 e 219 para $E_{lab} \geq 5$ eV. É importante notificar que as intensidades relativas dos íons *m/z* 235 e 203 tem um ponto de intersecção na curva de energia no intervalo $10 \geq E_{lab} \leq 15$ eV[36,111–113]. Essa observação também pode ser aplicada aos íons *m/z* 219 e 203 (Item 4.1).

Em geral, o estudo da química de fragmentação de substâncias naturais por ESI-MS/MS permite correlacionar a formação de íons produtos acílios com a perda consecutiva de 28 *u* (CO). Assim, na próxima etapa elementar, a fragmentação do íon *m/z* 203 via clivagem direta pode gerar o íon *m/z* 175 após a perda de CO, bem como a dissociação em fase gasosa do íon *m/z* 187 pode produzir o íon *m/z* 159 após a perda de CO[36]. Nesse ponto, o conteúdo de energia adicional obtido em condições de $E_{lab} \geq$ a 30 eV pode justificar a fragmentação dos íons precursores *m/z* 235 e 219, formando os íons produtos *m/z* 175 e 159, respectivamente[112]. A análise da distribuição relativa dos íons produtos, na curva de energia (Figura 48) [113] de cada espécie protonada, mostrou uma correlação equilibrada com o perfil termodinâmico obtido para os 2*H*-cromenos **1** e **2** (Figuras 17 e 21).

Consequentemente, a formação dos íons *m/z* 177 e 145 a partir do íon *m/z* 219,1021 corresponde as perdas de 42 e 32 *u*, respectivamente. Em condições de CID(+)-MS/MS, o íons produtos *m/z* 177 e 145 podem ser formados a partir de um íon precursor isomérico *m/z* 219. Similar a rota de fragmentação esboçada na Figura 21, essa dissociação em fase gasosa requer uma etapa de abertura do anel pirano a partir do íon *m/z* 219 de menor energia. Na próxima etapa elementar, um rearranjo intramolecular explica a transferência de um hidrogênio alílico para o átomo de oxigênio, gerando o íon precursor isomérico *m/z* 219. Assim, a perda de 42 *u*, via eliminação intramolecular do tipo 1,2, explica a formação do íon produto *m/z* 193. Na última etapa, uma clivagem induzida por assistência do heteroátomo adjacente justifica a obtenção do íon produto *m/z* 145[36]. Além disso, as etapas elementares que alicerçaram as perdas consecutivas de 42 e 32 *u* a partir do íon *m/z* 219 podem ser extrapoladas para explicar a identidade dos íons produtos *m/z* 193 e 161, gerados a partir do íon precursor *m/z* 235 (Figura 17).

Baseado no conhecimento prévio sobre as substâncias biossintetizadas em *Piper aduncum* e no modelo de dissociação em fase gasosa descrito para os benzopiranos, uma terceira rota de fragmentação foi proposta para explicar a formação do íon produto *m/z* 145 a partir do íon precursor *m/z* 219. É importante destacar que os mecanismos de fragmentação discutidos a seguir podem ser aplicados para justificar a formação do íon produto *m/z* 161, gerado a partir da dissociação em fase gasosa do íon precursor *m/z* 235 (Figura 49).

Em condições de CID(+)-MS/MS, o íon acílio *m/z* 187 é isomerizado via abertura do anel pirano e rearranjo intramolecular de hidrogênio. Na última etapa, o íon produto *m/z* 145 é formado após a perda de prop-1-eno (C_3H_6, 42 *u*), via eliminação intramolecular do tipo 1,2[36]. Nesse contexto, a obtenção da forma isomérica do íon *m/z* 187 é a etapa chave para justificar a detecção do íon produto *m/z* 145 (ΔG = 56,8 kcal/mol).



* As setas coloridas seguem as indicações anteriores. No esquema é apresentado uma terceira proposta com o índice 3 (p. ex.: a3 e b3).

Figura 49 - Proposta de fragmentação para os íons *m/z* 235 e 219.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nessa perspectiva, a análise do perfil termodinâmico indicou que o íon produto *m/z* 187 (ΔG = 14,9 kcal/mol) deverá ser detectado em maior intensidade no espectro. Por outro lado, o aumento gradativo da energia de colisão pode favorecer a fragmentação do íon *m/z* 219, gerando os íons produtos *m/z* 187, 177, 159 e 145 (Figura 49)[112,113]. Consequentemente, ao considerar a aproximação o fenômeno de transferência de energia em colisões simples, a energia transferida para o íon *m/z* 219 quando E_{lab} = 25 eV equivale a 61,38 kcal/mol. Com base nessa predição, a rota de fragmentação 3 pode estar ativa quando $E_{lab} \geq 25$ eV (Figura 48)[112,113]. Além disso, essa afirmação corroborou com a curva de energia e o perfil termodinâmico calculado no modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Portanto, o uso de química computacional combinado as análises por ESI(+)-MS/MS mostrou que as propostas de identificação estrutural dos íons precursores *m/z* 235,0965 e 219,1021 são coerentes com a estrutura química dos 2*H*-cromenos **1** e **2**, ambos detectados no extrato bruto de *Piper aduncum* (Figura 12).

Ao ampliar a intepretação dos dados de fragmentação, a análise exploratória do extrato vegetal da espécie *Peperomia obtusifolia* (após preparo em AceO) por ESI(+)-MS indicou a presença dos íons *m/z* 327,2319 e 371,2217. Após, as análises por ESI(+)-MS/MS dos respectivos íons precursores (*m/z* 327 e 371) mostraram que os íons produtos *m/z* 205 e 231 são os picos base dos espectros de massas, repectivamente (Figura 50). O íon produto *m/z* 205 é formado a partir do íon *m/z* 327 após a perda de 122 *u*. Por outro lado, a formação do íon produto *m/z* 231 é indicativa para as perdas de 18 e 122 *u*. Dessa forma, a análise da curva de energia permitiu estabelecer algumas tendências da química de fragmentação do íon *m/z* 327 (Figura 51)[112], incluindo:

i) a intensidade relativa do íon precursor *m/z* 327: 100% para $E_{lab} \leq$ a 5 eV;
ii) a intensidade relativa do íon produto *m/z* 205: 100% para $10 \geq E_{lab} \leq$ 20 eV;
iii) a intensidade relativa dos íons produtos *m/z* 205 e 271: 50 e 38%, respectivamente, para E_{lab} = 5 eV; e
iv) a intensidade relativa do íon produto *m/z* 149: 100% para $E_{lab} \geq 25$ eV.

Com relação a curva de energia do íon *m/z* 371 (Figura 50)[112], as tendências de maior relevância incluem:

i) a intensidade relativa do íon precursor *m/z* 371: 100% para $E_{lab} \leq$ a 10

eV;

ii) a intensidade relativa do íon produto *m/z* 353: 100% para E_{lab} = 15 eV;

iii) a intensidade relativa do íon produto *m/z* 231: 100% para 15 ≥ E_{lab} ≤ 25 eV;

iv) a intensidade relativa do íon produto *m/z* 175: 100% para E_{lab} ≥ 30 eV; e

v) a intensidade relativa dos íons produtos *m/z* 315 e 249: dada por aproximadamente 60% para E_{lab} = 15 eV.

Os resultados das análises em mistura estão em acordo com o modelo de fragmentação descrito para os cromanos **10**-**12** (Item 4.2) e a proposta de identificação estrutural baseada nos íons *m/z* 327,2319 e 371,2217 foi realizada com base nos dados de ESI(+)-MS/MS, associado com a predição de grandezas termoquímicas com base na DFT.

É importante salientar que os resultados obtidos no modelo B3LYP/6-311++G(d,p) corroboraram que a etapa de protonação dos cromanos **4**-**12** deve ocorrer preferencialmente no átomo de oxigênio do anel pirano. Por exemplo, para o cromano **4** (Figura 32), o sentido da etapa de protonação deve estar deslocado para o átomo de oxigênio do anel pirano (BG = 201,1 kcal/mol) e, a seguir, para o grupo hidroxila (BG = 180,4 kcal/mol). Além disso, a etapa de protonação na região do anel pirano é favorecida nas condições de ESI-MS/MS, uma vez que a reação converte a espécie protonada inicial em um carbocátion terciário via clivagem heterolítica da ligação O-C2.

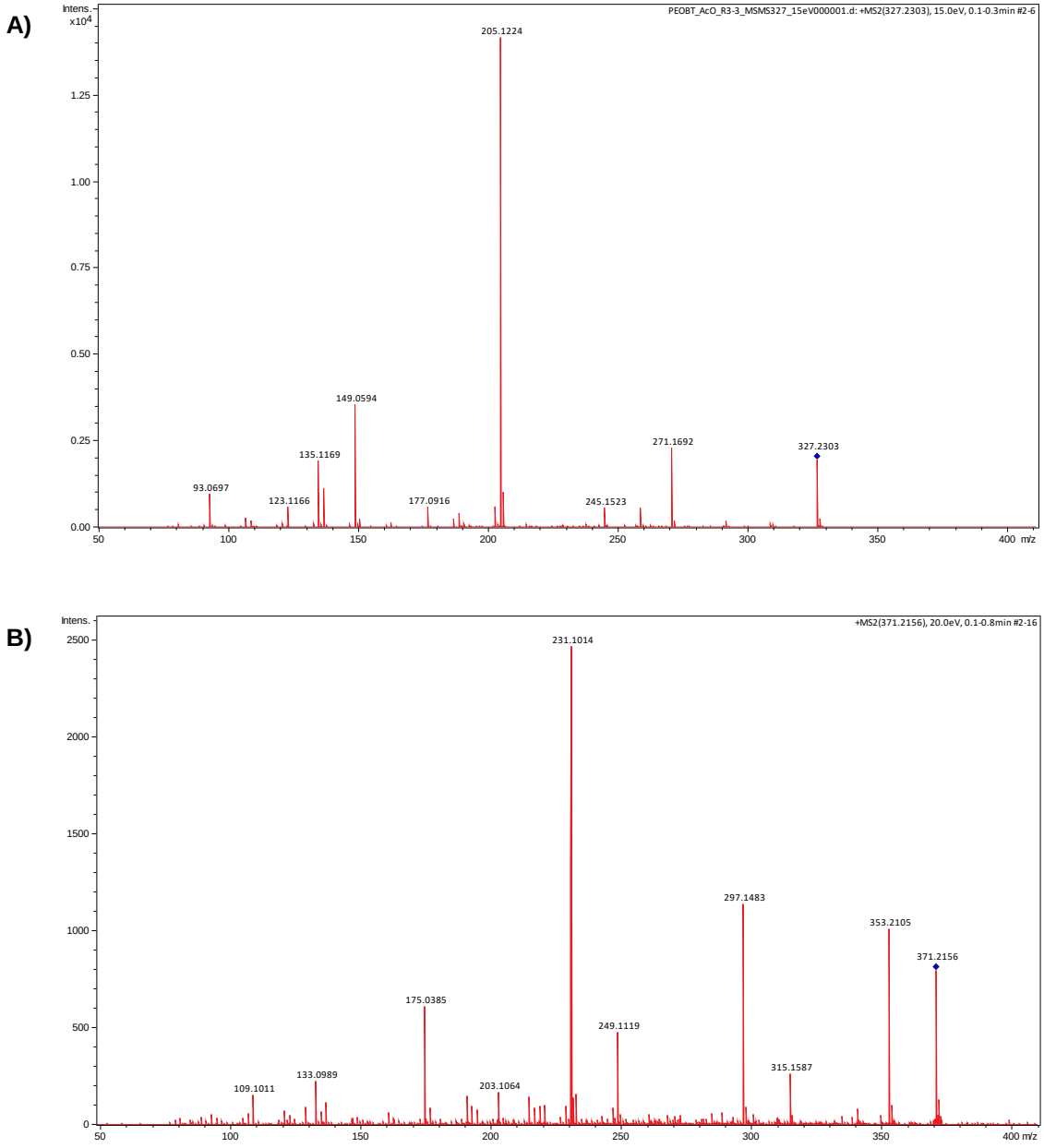


Figura 50 - Espectros de massas ESI(+)-MS/MS obtidos em um aparelho Q-TOF selecionando os íons precursores: A) *m/z* 327 e B) *m/z* 371. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 15 eV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

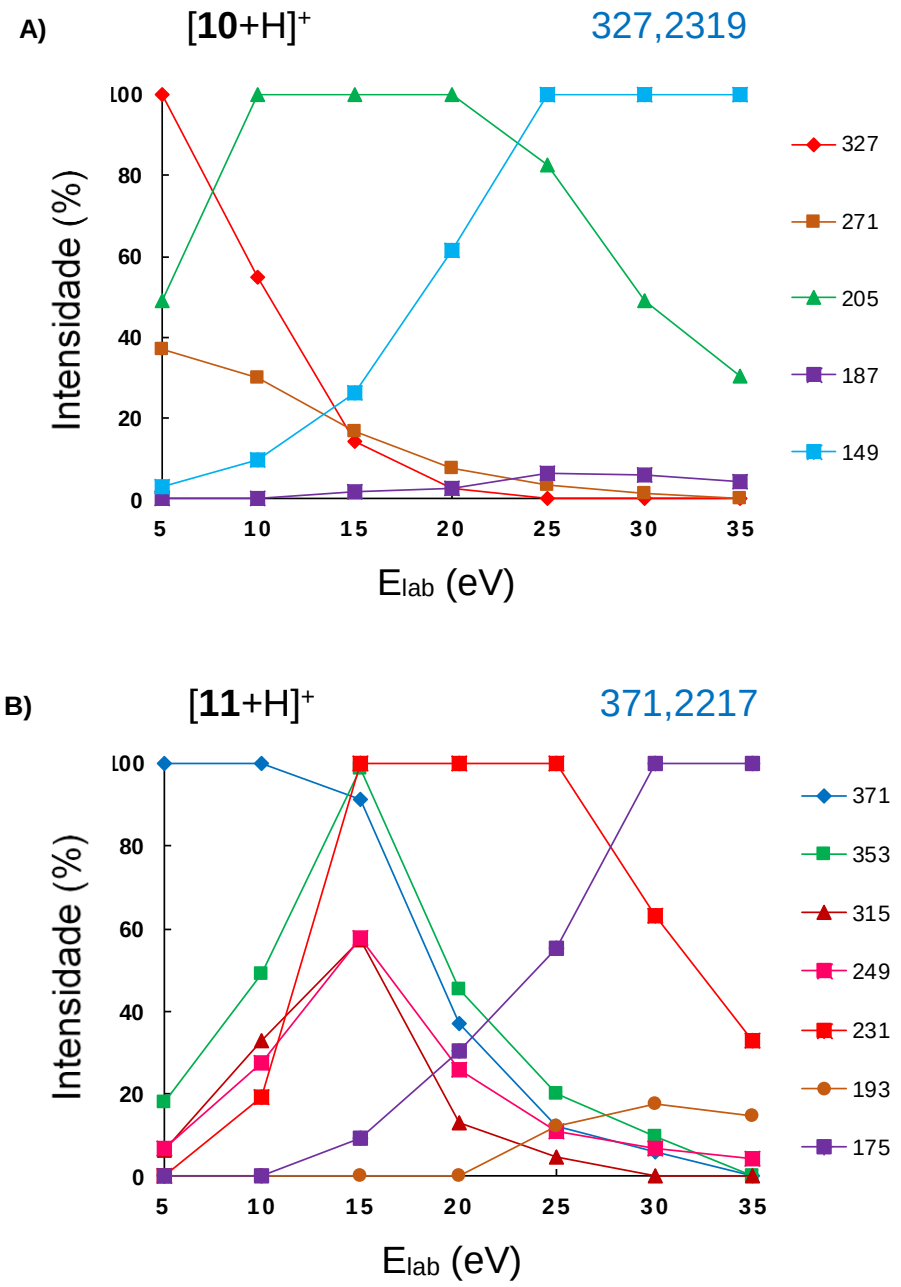


Figura 51 - Curvas de energia obtidas a partir dos dados de ESI(+)-MS/MS para os íons precursores: A) *m/z* 327 e B) *m/z* 371. A faixa de ativação de íons utilizada foi de 5 a 35 eV. A *m/z* observada em alta resolução para cada íon precursor é mostrada na parte superior da curva de energia. O experimento foi adquirido em um aparelho Q-TOF.

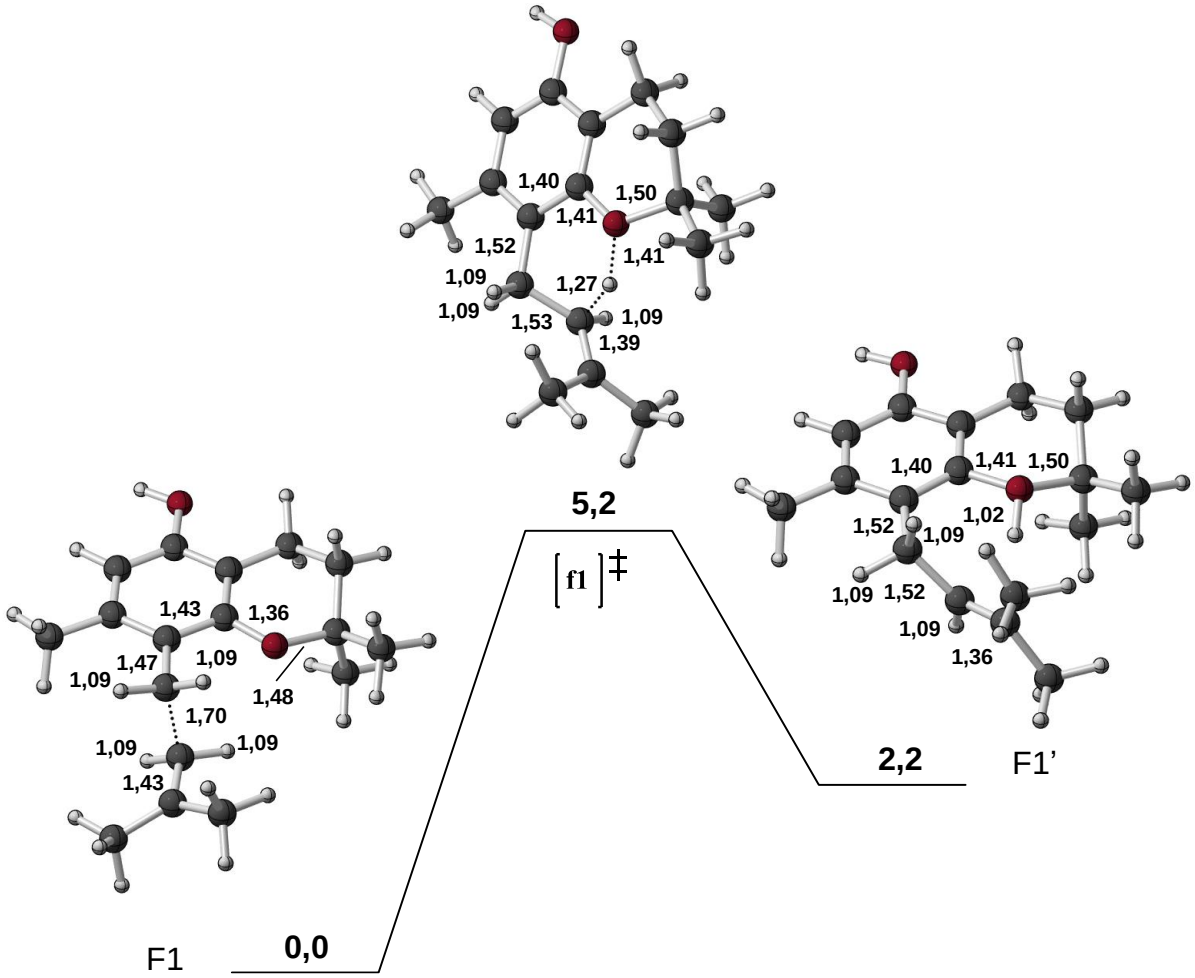
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nessa perspectiva, a análise dos dados experimentais e teóricos sinaliza para uma clivagem heterolítica de uma ligação C-C após a etapa de adição do próton no anel pirano. Essas etapas elementares favorecem a perda de 122 *u* via clivagem induzida por assistência do heteroátomo, originando o possível íon produto *m/z* 205 a

partir do íon precursor *m/z* 327 (Figura 37). Além disso, a clivagem heterolítica de uma ligação C-C é indicativa para a formação do íon produto *m/z* 249 a partir do íon precursor *m/z* 371 (Figura 40)[36]. Em suma, a clivagem heterolítica da ligação C-C nos íons precursores *m/z* 327 e 371 é favorecida quando E_{lab} ≥ 5 eV, uma vez que a energia máxima transferida no processo de ativação corresponde a E_{lab} ≥ a 9,09 e 8,09 kcal/mol, respectivamente [112]. É importante notar que as intensidades relativas dos íons *m/z* 327 e 205 apresentaram um ponto de intersecção na curva de energia no intervalo 5 ≥ E_{lab} ≤ 10 eV (Figura 51)[113].

Para entender essa observação experimental, é preciso considerar a etapa elementar que envolve a transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano, com base em um estado de transição constituído por 6 membros. Em outras palavras, as curvas de energia corroboraram com a etapa de protonação estudada para o 2*H*-cromeno **3** (Figura 24) no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Diante do exposto, a possível transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano foi investigada para o cromano **6** (Figura 52) usando o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

A Figura 52 mostra as características chave do diagrama de energia da coordenada de reação calculado para a transferência intramolecular do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano, considerando o estado de transição constituído por 6 membros. A análise do diagrama de energia da coordenada da reação indicou que a barreira de energia entre as duas espécies protonadas de menor energia, F1 e F1', é 5,2 kcal/mol. No primeiro evento químico (sentido da reação: esquerda), a adição do próton na ligação dupla da unidade prenila favorece a formação de um carbocátion terciário estabilizado por interações hiperconjugativas [105,106,115–118]. Além disso, a distância de ligação C1'-C2' na estrutura F (1,70 Å) é significativamente maior que na estrutura F' (1,52 Å). No segundo evento químico (sentido da reação: direita), a transferência intramolecular do próton pode ocorrer associada com a abertura do anel pirano, dependendo dos substituintes ligados ao C2. Esses resultados indicaram a existência de duas espécies protonadas sob as condições brandas de ESI(+)-MS/MS, incluindo experimentos começando com E_{lab} = 5 eV.



* As geometrias otimizadas das estruturas protonadas e do estado de transição (com distâncias de ligação selecionadas em Å), bem como as energias relativas de Gibbs (kcal/mol, energias relativas a energia de Gibbs da estrutura **F1**; B3LYP/6-31+G(d,p)) são mostradas no diagrama de energia. A energia de Gibbs (absoluta) para a estrutura do estado de transição é -812,785164 hartree. As energias de Gibbs (absolutas) para C1 e C1' são -812,793493 e -812,789940 hartree, respectivamente.

Figura 52 - Diagrama de energia para a etapa de transferência do próton entre a unidade prenila e o átomo de oxigênio do anel pirano produzindo duas formas protonadas da substância **6** (**F1** e **F1'**).*

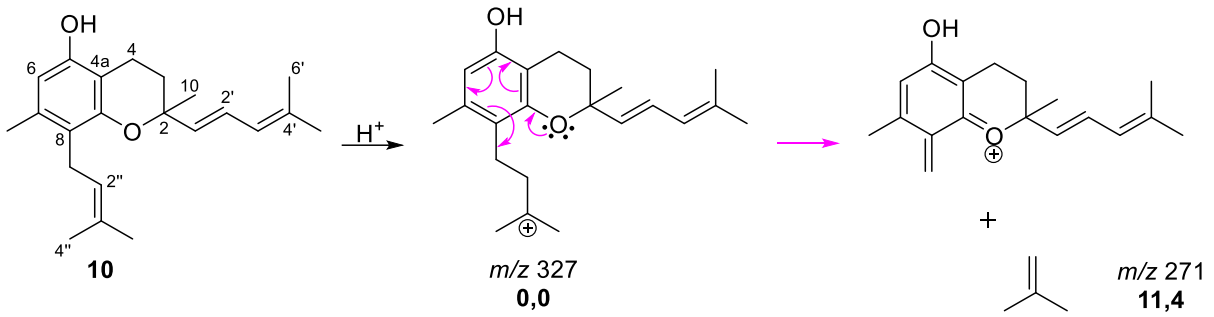
Fonte: Elaborada pelo autor.

Consequentemente, similar a rota de fragmentação esboçada na Figura 37, o íon *m/z* 205 é formado a partir do íon *m/z* 327,2319 após a perda neutra de 122 *u*, via clivagem induzida por assistência do heteroátomo[36]. Na próxima etapa, a reação do tipo retro-heteroeno justifica a formação do íon *m/z* 149 (ΔG = 35,1 kcal/mol) após a perda neutra de 56 *u* (eliminação neutra de 2-metilpropeno). A análise do perfil da curva de energia para a [**10**+H]$^+$ e a distribuição relativa dos íons produtos (Figura 51) mostraram uma correlação com o perfil termodinâmico obtido para o cromano **10**.

Além disso, a formação do íon *m/z* 205 pode ser justificada via mecanismo rDA[36,112,113].

Com base no conhecimento prévio sobre as substâncias biossintetizadas em *Peperomia obtusifolia* e no modelo de dissociação em fase gasosa descrito para os benzopiranos, uma terceira rota de fragmentação foi proposta para explicar a formação do íon produto *m/z* 271 a partir do íon precursor *m/z* 327. O mecanismo proposto é baseado na perda neutra de 56 *u* via clivagem heterolítica da ligação C-C. Essa proposta reacional é assistida pela protonação na unidade prenila[36,47] (Figura 53).

Como esboçado no diagrama de energia da coordenada de reação, a barreira de energia requerida para a transferência do próton é a etapa limitante para essa fragmentação. Portanto, o estudo teórico e experimental permitiu inferir que o próton se encontra topograficamente armadilhado entre a unidade prenila e o anel pirano (Figura 52). Do ponto de vista energético, o perfil termodinâmico calculado para os íons produtos *m/z* 271, 205 e 149 estão em acordo com a proposta de identificação estrutural do cromano **10**.



* As cores das setas seguem as indicações anteriores.

Figura 53 - Proposta de fragmentação para o íon *m/z* 327. No esquema é apresentado uma terceira proposta para a química de fragmentação do cromano **10**.*

Fonte: Elaborada pelo autor.

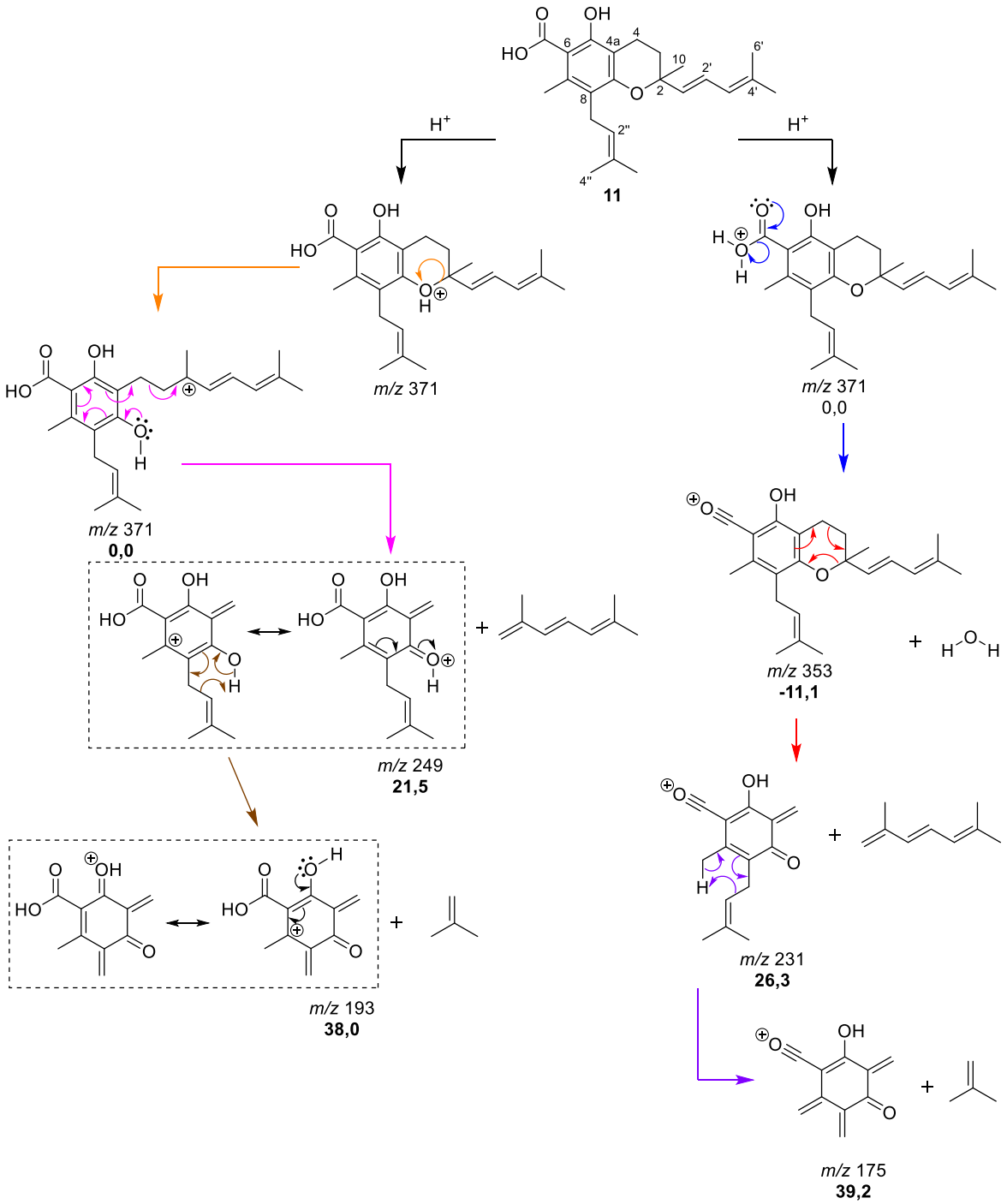
Tendo em vista a proposta de fragmentação do íon *m/z* 327,2319, a interpretação do espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon precursor *m/z* 371,2217 foi esboçada na Figura 54, uma vez que as etapas elementares discutidas anteriormente também alicerçam as identidades dos íons produtos *m/z* 315, 249 e 193.

Por outro lado, a curva de energia confirmou que a distribuição do íon *m/z* 249 foi significativamente distinta em relação ao íon *m/z* 205. Consequentemente, a dissociação em fase gasosa do íon *m/z* 371 pode ser justificado pela ocorrência de outra espécie protonada. Assim, a segunda espécie protonada *m/z* 371 pode ser justificada com base no perfil de distribuição dos íons produtos *m/z* 353, 231 e 175, corroborando com as perdas neutras consecutivas de 18, 122 e 56 *u*, respectivamente (Figura 51).

Dessa maneira, a ativação do íon precursor *m/z* 371 é indicativa para a formação de um íon acílio *m/z* 353 após a perda neutra de água. Na próxima etapa, o mecanismo retro Diels-Alder corrobora com a formação do íon acílio *m/z* 231 com a perda neutra de um alqueno. Na terceira etapa, o íon acílio *m/z* 175 (ΔG = 39,22 kcal/mol) é gerado após a eliminação de 2-metilpropeno via fragmentação do tipo retro-eno[36] (Figura 54).

A característica chave da química de fragmentação do íon *m/z* 371 tem origem na protonação da carboxila, que favorece a fomação do íon acílio *m/z* 353 mesmo em condições brandas de ativação de íons (E_{lab} = 5 eV)[111,112]. Do ponto de vista energético, as estruturas químicas dos íons acílios *m/z* 353, 231 e 175, bem como dos íons *m/z* 249 e 193 estão de acordo com os dados experimentais e com perfil de energia mensurado no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p) (Figura 54).

Portanto, os padrões de fragmentação dos íons *m/z* 327,2319 e 371,2217, detectadas no extrato bruto de *Peperomia obutsifolia*, foram coerentes com as propostas de identificação estrutural dos cromanos **10** e **11**, respectivamente.



* As setas coloridas seguem as indicações anteriores. Algumas estruturas contribuintes de ressonância possíveis são mostradas para fins didáticos.

Figura 54 - Proposta de fragmentação para o íon *m/z* 371.* As energias relativas de Gibbs (em negrito) são indicadas em kcal/mol e foram calculadas com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

(1) BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

(2) BERLINCK, R. G. S.; DE BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

(3) BOLZANI, V. DA S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS, C. Natural products from brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 2012.

(4) PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. Supl. 1, p. 45–61, 2002.

(5) VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

(6) YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perpectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: _____ (Org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna Farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016, Cap. 1, pp. 11-39.

(7) CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

(8) CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.

(9) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215–234, 2000.

(10) BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

(11) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

(12) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

(13) PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446–1455, 2007.

(14) BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J.-L. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.

(15) CANUTO, G. A. B.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L. R.; DE SOUZA, A. R. L.;

FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

(16) FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; DA SILVA BOLZANI, V. Metabolômica, Uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

(17) WOLFENDER, J.-L.; RUDAZ, S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1056–1090, 2013.

(18) ROCHFORT, S. Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813–1820, 2005.

(19) VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 53–56, 2005.

(20) KLUGER, B.; BUESCHL, C.; NEUMANN, N.; STÜCKLER, R.; DOPPLER, M.; CHASSY, A. W.; WATERHOUSE, A. L.; RECHTHALER, J.; KAMPLEITNER, N.; THALLINGER, G. G.; ADAM, G.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Untargeted profiling of tracer-derived metabolites using stable isotopic labeling and fast polarity-switching LC-ESI-HRMS. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11533–11537, 2014.

(21) WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; FERREIRA QUEIROZ, E. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11533–11537, 2014.

(22) ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VÊNCIO, R. Z. N.; LOPES, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 784–806, 2014.

(23) BERTRAND, S.; AZZOLLINI, A.; NIEVERGELT, A.; BOCCARD, J.; RUDAZ, S.; CUENDET, M.; WOLFENDER, J. L. Statistical correlations between HPLC activity-based profiling results and NMR/MS microfraction data to deconvolute bioactive compounds in mixtures. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 259, 2016.

(24) SPICER, R.; SALEK, R. M.; MORENO, P.; CAÑUETO, D.; STEINBECK, C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. **Metabolomics**, v. 13, n. 9, p. 1–16, 2017.

(25) FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J.-L.; SILVA, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167–178, 2012.

(26) MUSHTAQ, M. Y.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; WILSON, E. G. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 291–306, 2014.

(27) YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Comprehensive

extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 17, p. 6902–6906, 2011.

(28) FERREIRA, V. G.; LEME, G. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FUNARI, C. S. Online extraction coupled to liquid chromatography analysis (OLE-LC): eliminating traditional sample preparation steps in the investigation of solid complex matrices. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 17, p. 8421–8427, 2016.

(29) KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; LUIJENDIJK, T. J. C.; ROCHA, R. A. V.; VERPOORTE, R. Comparison of extraction methods for secologanin and the quantitative analysis of secologanin from *Symphoricarpos albus* ^{1}H-NMR. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 257–261, 2004.

(30) KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 4–13, 2010.

(31) PILON, A. C.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R. T.; CARDOSO, P.; CARNEIRO, R. L.; DA SILVA BOLZANI, V.; CASTRO-GAMBOA, I. Partial least squares model and design of experiments toward the analysis of the metabolome of *Jatropha gossypifolia* leaves: extraction and chromatographic fingerprint optimization. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1023–1030, 2016.

(32) BUENO, P. C. P.; PEREIRA, F. M. V.; TORRES, R. B.; CAVALHEIRO, A. J. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 10, p. 1649–1656, 2015.

(33) YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 157–169, 2011.

(34) SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Mass spectrometry. In SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometry identification of organic compounds**. 6th ed. New York: John Wiley, 1998. Chap. 2, pp 2–70.

(35) VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 840–853, 2008.

(36) DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

(37) JARMUSCH, A. K.; COOKS, R. G. Emerging capabilities of mass spectrometry for natural products. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 730–738, 2014.

(38) YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; DE FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.

(39) DA SILVA-JUNIOR, E. A.; PALUDO, C. R.; GOUVEA, D. R.; KATO, M. J.; FURTADO, N. A. J. C.; LOPES, N. P.; VESSECCHI, R.; PUPO, M. T. Gas-phase fragmentation of protonated piplartine and its fungal metabolites using tandem mass spectrometry and computational chemistry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 8, p. 517–525, 2017.

(40) DA CUNHA PINTO, A.; VESSECCHI, R.; DA SILVA, C. G.; AMBRÓSIO, D. L.; DOS SANTOS JÚNIOR, H. M.; REZENDE, M. J. C.; GATES, P. J.; REZENDE, C. M.; LOPES, N. P. Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of isopimarane diterpenes from Velloziaceae. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 1, p. 61–68, 2016.

(41) GUARATINI, T.; FEITOSA, L. G. P.; SILVA, D. B.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; VESSECCHI, R. Gas-phase dissociation study of erythrinian alkaloids by electrospray ionization mass spectrometry and computational methods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 9, p. 571–579, 2017.

(42) CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

(43) VESSECCHI, R.; EMERY, F. S.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. Gas-phase reactivity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones: a computational and mass spectrometry study of lapachol congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 12, p. 1648–1659, 2012.

(44) MARTÍNEZ-CIFUENTES, M.; CLAVIJO-ALLANCAN, G.; ZUÑIGA-HORMAZABAL, P.; ARANDA, B.; BARRIGA, A.; WEISS-LÓPEZ, B.; ARAYA-MATURANA, R. Protonation sites, tandem mass spectrometry and computational calculations of *o*-carbonyl carbazolequinone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1071, 2016.

(45) VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E. Evaluation of the enthalpy of formation, proton affinity, and gas-phase basicity of γ-butyrolactone and 2-pyrrolidinone by isodesmic reactions. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 17, p. 4060–4066, 2008.

(46) HYLA-KRYSPIN, I.; GRIMME, S.; BÜKER, H. H.; NIBBERING, N. M. M.; COTTET, F.; SCHLOSSER, M. The gas phase acidity of oligofluorobenzenes and oligochlorobenzenes: about the additivity or non-additivity of substituent effects. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 4, p. 1251–1256, 2005.

(47) VESSECCHI, R.; EMERY, F. S.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P. Fragmentation studies and electrospray ionization mass spectrometry of lapachol: protonated, deprotonated and cationized species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 14, p. 2101–2108, 2010.

(48) VESSECCHI, R.; JULIÃO ZOCOLO, G.; RUBIO GOUVEA, D.; HÜBNER, F.; CRAMER, B.; RODRIGUES DE MARCHI, M. R.; HUMPF, H. U.; LOPES, N. P. Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 14, p. 2020–2026, 2011.

(49) SARTORI, L. R.; VESSECCHI, R.; HUMPF, H. U.; DA COSTA, F. B.; LOPES, N. P. A

systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 7, p. 723–730, 2014.

(50) TANTILLO, D. J. Walking in the woods with quantum chemistry-applications of quantum chemical calculations in natural products research. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 8, p. 1079–1086, 2013.

(51) BUTLER, M.; MICHAEL SIU, K. W.; HOPKINSON, A. C. Transnitrosylation products of the dipeptide cysteinyl-cysteine: an examination by tandem mass spectrometry and density functional theory. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 8, p. 6047–6052, 2016.

(52) LODEWYK, M. W.; SIEBERT, M. R.; TANTILLO, D. J. Computational prediction of ^{1}H and ^{13}C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 3, p. 1839–1862, 2012.

(53) KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529–538, 2007.

(54) LÓPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA, J. M.; FLAUSINO, O.; BOLZANI, V. DA S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4251–4260, 2010.

(55) GUTIERREZ, Y. V.; YAMAGUCHI, L. F.; DE MORAES, M. M.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 6, p. 1009–1033, 2016.

(56) WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 477–497, 2007.

(57) SAMAIN, M. S.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; JIMÉNEZ RODRÍGUEZ, F.; STOLL, A.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of botany**, v. 105, n. 5, p. 677–688, 2010.

(58) FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; HE, Y.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. VCD to determine absolute configuration of natural product molecules: secolignans from *Peperomia blanda*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 21, p. 4208–4214, 2012.

(59) MOTA, J. D. S.; LEITE, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M. Isoswertisin flavones and other constituents from *Peperomia obtusifolia*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2011.

(60) FACUNDO, V. A.; BÁLICO, L. J.; LIMA, D. K. S.; SANTOS, A. R. S.; MORAIS, S. M.; DA SILVA, G. V. J.; MILITÃO, J. S. L. T. Non-substituted B-ring flavonoids and an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 206–208, 2012.

(61) LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. D. A.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M.;

GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004.

(62) COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; DA SILVA BOLZANI, V.; DEBONSI, H. M.; DUÓ PASSERINI, G.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703–711, 2009.

(63) VASQUES DA SILVA, R.; DEBONSI NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. DA S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521–527, 2002.

(64) NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621–626, 2000.

(65) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; NAFIE, L. A.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 1154–1160, 2011.

(66) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LÓPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 45, p. 6051–6054, 2012.

(67) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; MOTA, J. S.; CASS, Q. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FREEDMAN, T. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Structure elucidation and absolute stereochemistry of isomeric monoterpene chromane esters. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 2603–2612, 2011.

(68) DA SILVA MOTA, J.; LEITE, A. C.; BATISTA, J. M.; LÓPEZ, S. N.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, v. 75, n. 6, p. 620–623, 2009.

(69) BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; CASS, Q. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; NAFIE, L. A. Absolute configuration reassignment of two chromanes from *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae) Using VCD and DFT calculations. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 21, n. 19, p. 2402–2407, 2010.

(70) MORANDIM, A. DE A.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. DA S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 4, p. 282–286, 2005.

(71) FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; DE LIMA, M. E. F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208–224, 2012.

(72) MATOS T. S.; NASCIMENTO, E. C.; GENUNCIO, G. C.; NEITZKE, R. S. **Perspectivas e potencialidades do mercado de pimentas**. Disponível em:

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

(73) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa Nº 02, de 13 de maio de 2014**. Publica a "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2014. 32 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 12 set. 2018.

(74) JUSTO, S. C.; SILVA, C. M. *Piper methysticum* G. Forster (Kava-Kava): uma abordagem geral. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 73–82, 2008.

(75) BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century european naturalists and in the official pharmacopoeia. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 73–82, 2008.

(76) TANG, Y.; WEI, J.; ZHONG, W.; LIU, X. Synthesis and characterization of chroman-containing compounds and their preliminary assessment of cytotoxicity toward two human cancer cell lines. **Heteroatom Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 423–429, 2010.

(77) VAN OTTERLO, W. A. L.; NGIDI, E. L.; KUZVIDZA, S.; MORGANS, G. L.; MOLEELE, S. S.; DE KONING, C. B. Ring-closing metathesis for the synthesis of 2*H*- and 4*H*-chromenes. **Tetrahedron**, v. 61, n. 42, p. 9996–10006, 2005.

(78) NAJAFI, M.; NAZARPARVAR, E.; MOOD, K. H.; ZAHEDI, M.; KLEIN, E. DFT/B3LYP study of the substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies of chroman derivatives in the gas phase and solvent environment. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 965, n. 1, p. 114–122, 2011.

(79) NICOLAOU, K. C.; PFEFFERKORN, J. A.; ROECKER, A. J.; CAO, G. Q.; BARLUENGA, S.; MITCHELL, H. J. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. general principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 41, p. 9939–9953, 2000.

(80) NICOLAOU, K. C. Advancing the drug discovery and development process. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 35, p. 9128–9140, 2014.

(81) NICOLAOU, K. C.; HALE, C. R. H.; NILEWSKI, C.; IOANNIDOU, H. A. Constructing molecular complexity and diversity: total synthesis of natural products of biological and medicinal importance. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 15, p. 5185–5238, 2012.

(82) GACH, K.; SZYMAŃSKI, J.; POMORSKA, D.; DŁUGOSZ, A.; MODRANKA, J.; JANECKI, T.; JANECKA, A. Combined effects of anticancer drugs and new synthetic α-methylene-δ-lactones on MCF-7 cells. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 5971–5977, 2015.

(83) BINGI, C.; NARENDER REDDY, E.; CHENNAPURAM, M.; POORNACHANDRA, Y.; KUMAR, C. G.; JAGADEESH BABU, N.; ATMAKUR, K. One-pot catalyst free synthesis of novel kojic acid tagged 2-aryl/alkyl substituted-4*H*-chromenes and evaluation of their antimicrobial and anti-biofilm activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 9, p. 1915–1919, 2015.

(84) MLADENOVIĆ, M.; STANKOVIĆ, N.; MATIĆ, S.; STANIĆ, S.; MIHAILOVIĆ, M.; MIHAILOVIĆ, V.; KATANIĆ, J.; BOROJA, T.; VUKOVIĆ, N. Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize the *in vivo* DNA damage induced by alkylation through the inhibition of topoisomerase IIα: a story behind the molecular modeling approach. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 1, p. 243–266, 2015.

(85) BATISTA, A. N. L.; SANTOS-PINTO, J. R. A. D.; BATISTA, J. M.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; SANTONI, M. M.; ZANELLI, C. F.; KATO, M. J.; LÓPEZ, S. N.; PALMA, M. S.; FURLAN, M. The combined use of proteomics and transcriptomics reveals a complex secondary metabolite network in *Peperomia obtusifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1275–1286, 2017.

(86) BATISTA, A. N. L.; VALENTINI, S. R.; KATO, M. J.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Biosynthetic Insights into *p*-Hydroxybenzoic Acid-Derived Benzopyrans in *Piper gaudichaudianum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 1105–1114, 2018.

(87) BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538–540, 2008.

(88) SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J; DOLAN, J. W. Gradient elution. In SNYDER, L. R. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3th ed. New Jersey: Wiley, 2010. Chap. 9, pp 403–471.

(89) Gaussian 03, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A. JR.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, B.; MENNUCCI, M.; COSSI, G.; SCALMANI, N.; REGA, G. A.; PETERSSON, H.; NAKATSUJI, M.; HADA, M.; EHARA, K.; TOYOTA, R.; FUKUDA, J.; HASEGAWA, M.; ISHIDA, T.; NAKAJIMA, Y.; HONDA, O.; KITAO, H.; NAKAI, M.; KLENE, X.; LI, J.; KNOX, E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A. ; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

(90) Gaussian 09, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A. ; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A. JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.;

YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

(91) Spartan'10, Wavefunction, Ind.: Irvine, CA, USA, 2010.

(92) LEGAULT, C. Y. CYLview BETA 1.0. University of Sherbrooke, Canada 2009.

(93) DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 54, n. 2, p. 724–728, 1971.

(94) LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 1988.

(95) BECKE, A. D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 2, p. 1372–1377, 1993.

(96) ALEM, K. VAN; SUDHÖLTER, E. J. R.; ZUILHOF, H. Quantum chemical calculations on α-substituted ethyl cations: a comparison between B3LYP and post-HF methods. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 102, n. 52, p. 10860–10868, 1998.

(97) BURK, P.; KOPPEL, I. A.; KOPPEL, I.; LEITO, I.; TRAVNIKOVA, O. Critical test of performance of B3LYP functional for prediction of gas-phase acidities and basicities. **Chemical Physics Letters**, **2000**, v. 323, n. 5-6, p. 482–489, 2000.

(98) SINGH, U. C.; KOLLMAN, P. A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 129–145, 1984.

(99) DEAKYNE, C. A. Proton affinities and gas-phase basicities: theoretical methods and structural effects. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 227, n. 3, p. 601–616, 2003.

(100) ABBOUD, J. L. M.; FOCES-FOCES, C.; NOTARIO, R.; TRIFONOV, R. E.; VOLOVODENKO, A. P.; OSTROVSKII, V. A.; ALKORTA, I.; ELGUERO, J. Basicity of N-H- and N-methyl-1,2,3-triazoles in the gas phase, in solution, and in the solid state - an experimental and theoretical study. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, n. 16, p. 3013–3024, 2001.

(101) TORRENT-SUCARRAT, M.; DE PROFT, F.; AYERS, P. W.; GEERLINGS, P. On the applicability of local softness and hardness. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 5, p. 1072–1080, 2010.

(102) MAYHAN, C. M.; KUMARI, H.; MCCLURE, E. M.; LIEBMAN, J. F.; DEAKYNE, C. A. Proton affinity and gas-phase basicity of hydroxyquinol: a computational study. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 73, p. 171–177, 2014.

(103) HUNTER, E. P. L.; LIAS, S. G. Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: an update. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 27, n. 3, p. 413–656, 1998.

(104) DECOUZON, M.; GAL, J.-F.; HERREROS, M.; MARIA, P.-C.; MURRELL, J.; TODD, J. F. J. On the use of the kinetic method for the determination of proton affinities by

fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 10, n. 2, p. 242–245, 1996.

(105) HONG, Y. J.; TANTILLO, D. J. Quantum chemical dissection of the classic terpinyl/pinyl/bornyl/camphyl cation conundrum - the role of pyrophosphate in manipulating pathways to monoterpenes. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 20, p. 4589–4600, 2010.

(106) HONG, Y.; TANTILLO, D. Branching out from the bisabolyl cation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 2450–2463, 2014.

(107) MACLENNAN, M. S.; SUTHERLAND, K. N.; ORLOVA, G. Fragmentations and proton-transfer mechanisms of gaseous radical-cationic tryptophan: a theoretical study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 822, n. 1–3, p. 21–27, 2007.

(108) GAL, J.-F.; MARIA, P.-C.; RACZYNSKA, E. D. Thermochemical aspects of proton transfer in the gas phase. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 7, p. 699–716, 2001.

(109) GONZALEZ, C.; SCHLEGEL, H. B. Reaction path following in mass-weighted internal coordinates. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 94, n. 14, p. 5523–5527, 1990.

(110) FUKUI, K. The path of chemical reactions - the IRC approach. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, n. 12, p. 363–368, 1981.

(111) BOUCHOUX, G. Gas-phase basicities of polyfunctional molecules. Part 1: theory and methods. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 775–835, 2007.

(112) MCLUCKEY, S. A. Principles of collision activation in analytical mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 3, p. 599–614, 1992.

(113) KENTTAMAA, H. I.; COOKS, R. G. Tautomer characterization by energy resolved mass spectrometry. Dimethyl phosphite and dimethyl phosphonate ions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 7, p. 1881–1886, 1985.

(114) HARRISON, A. G. Energy-resolved mass spectrometry: a comparison of quadrupole cell and cone-voltage collision-induced dissociation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 16, p. 1663–1670, 1999.

(115) CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Chemical bonding and molecular structure. In: _____. **Advanced organic chemistry**. 5th ed. New York: Springer, 2007. Part A, chap. 1, pp 1–117.

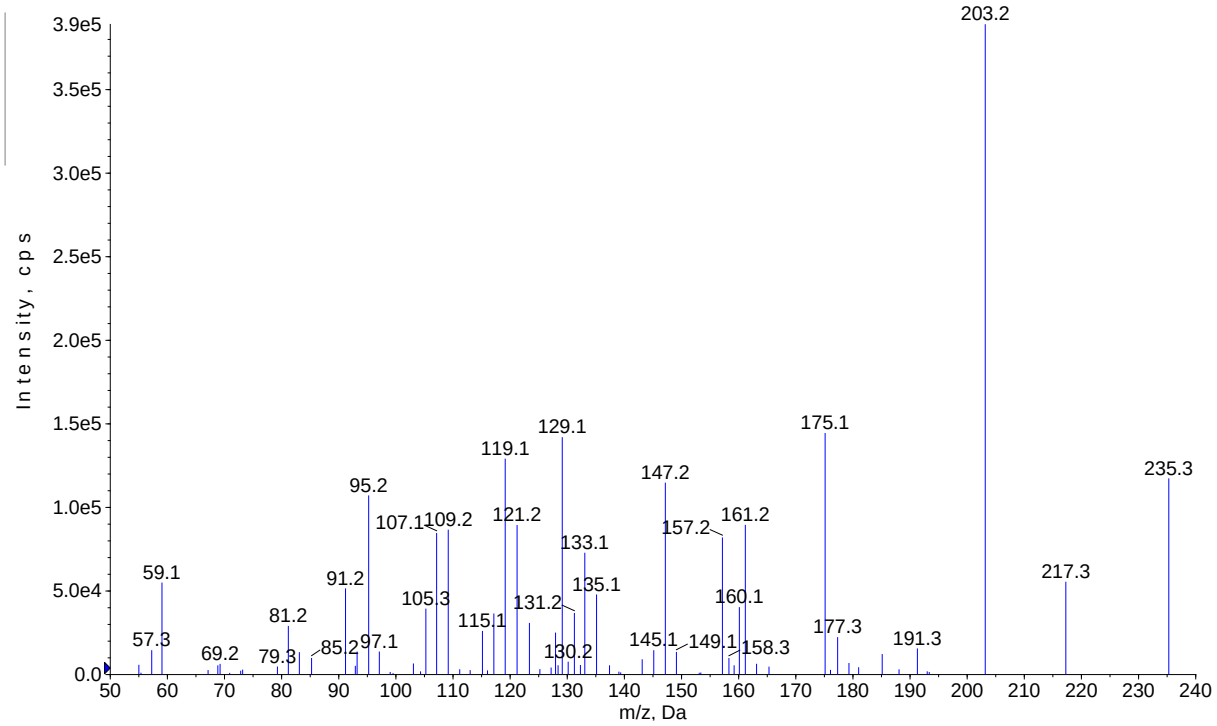
(116) CHOI, S. R.; BREUGST, M.; HOUK, K. N.; POULTER, C. D. δ-Deuterium isotope effects as probes for transition-state structures of isoprenoid substrates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 8, p. 3572–3580, 2014.

(117) GATTO, N.; VATTEKKATTE, A.; KÖLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BOLAND, W. Isotope sensitive branching and kinetic isotope effects to analyse multiproduct terpenoid synthases from *Zea Mays*. **Chemical Communications**, v. 51, n. 18, p. 3797–3800, 2015.

(118) VATTEKKATTE, A.; GATTO, N.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BOLAND, W. Substrate geometry controls the cyclization cascade in multiproduct terpene synthases from *Zea Mays*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 6021–6030, 2015.

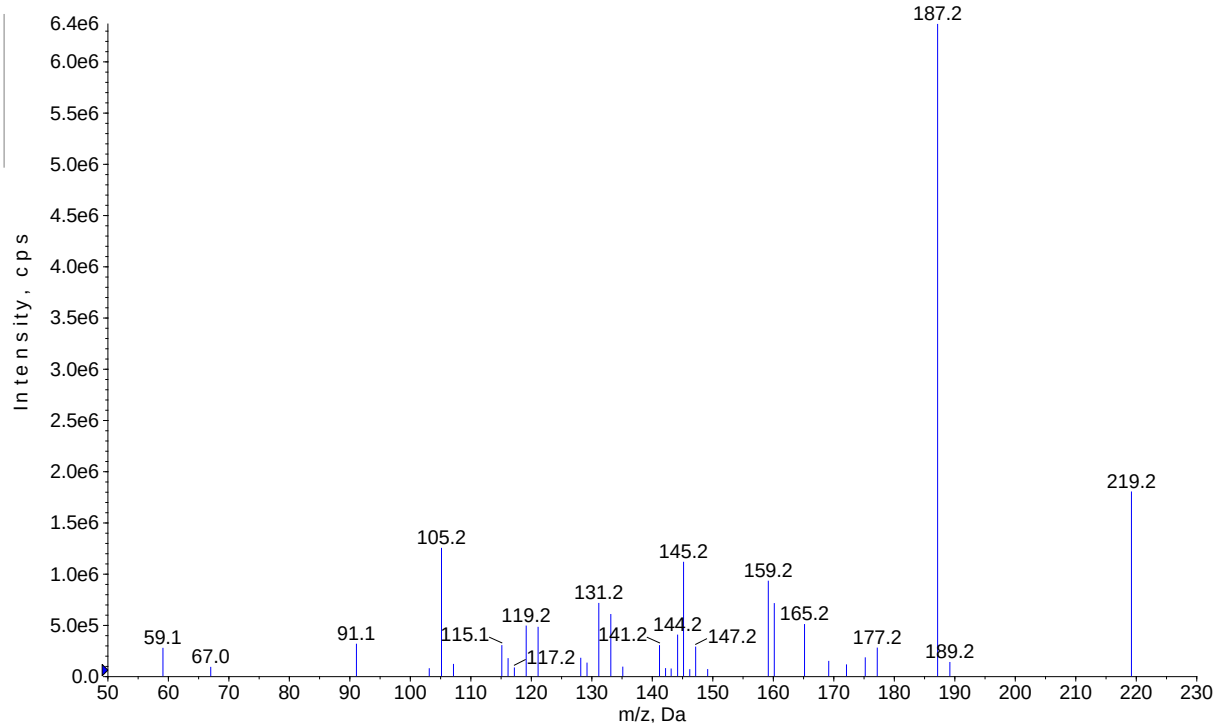
APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS

Figura A1 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**1**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TRAP selecionando o íon precursor *m/z* 235. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 30 eV.



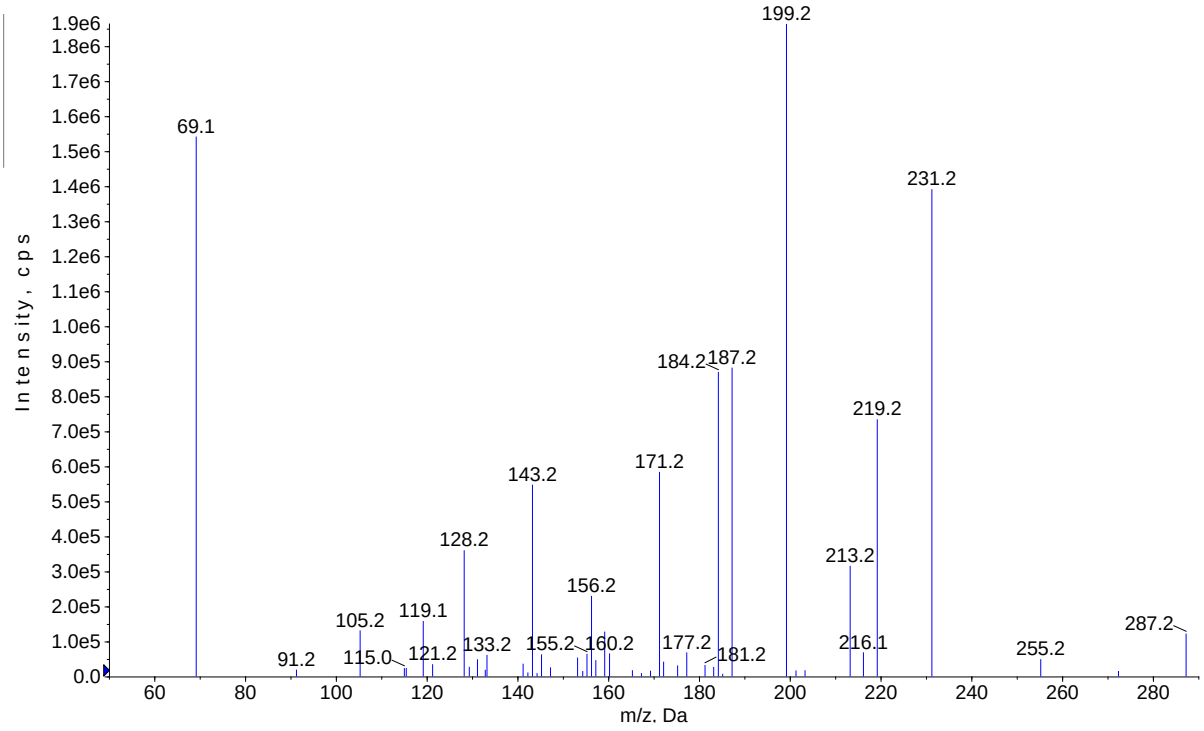
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura A2 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**2**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TRAP selecionando o íon precursor *m/z* 219. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 30 eV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura A3 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da [**3**+H]$^+$ obtido em um aparelho Q-TRAP selecionando o íon precursor *m/z* 287. A energia de ativação por colisão empregada no experimento foi de 30 eV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE B – GRANDEZAS TERMOQUÍMICAS

Tabela B1 - Energias calculadas para a espécie neutra do 2*H*-cromeno **1**. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.247093
Thermal correction to Energy	0.263074
Thermal correction to Enthalpy	0.264018
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.203964
Sum of electronic and zero-point Energies	-804.695584
Sum of electronic and thermal Energies	-804.679603
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-804.678659
Sum of electronic and thermal Free Energies	-804.738713

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B2 - Energias calculadas para a espécie neutra do 2*H*-cromeno **2**. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.242546
Thermal correction to Energy	0.257409
Thermal correction to Enthalpy	0.258353
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.200455
Sum of electronic and zero-point Energies	-729.451738
Sum of electronic and thermal Energies	-729.436874
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-729.435930
Sum of electronic and thermal Free Energies	-729.493829

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B3 - Energias calculadas para a espécie neutra do 2*H*-cromeno **3**. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.359158
Thermal correction to Energy	0.380979
Thermal correction to Enthalpy	0.381923
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.306500
Sum of electronic and zero-point Energies	-924.729504
Sum of electronic and thermal Energies	-924.707683
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-924.706739
Sum of electronic and thermal Free Energies	-924.782162

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B4 - Energias calculadas para a [**1**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio carbonílico. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.259118
Thermal correction to Energy	0.275699
Thermal correction to Enthalpy	0.276644
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.214103
Sum of electronic and zero-point Energies	-805.033845
Sum of electronic and thermal Energies	-805.017263
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-805.016319
Sum of electronic and thermal Free Energies	-805.078860

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B5 - Energias calculadas para a [**1**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio carboxílico. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.255749
Thermal correction to Energy	0.274254
Thermal correction to Enthalpy	0.275198
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.206591
Sum of electronic and zero-point Energies	-805.010859
Sum of electronic and thermal Energies	-804.992355
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-804.991410
Sum of electronic and thermal Free Energies	-805.060017

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B6 - Energias calculadas para a [**1**+H]$^+$. Espécie protonada na hidroxila fenólica. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.258532
Thermal correction to Energy	0.275024
Thermal correction to Enthalpy	0.275968
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.214622
Sum of electronic and zero-point Energies	-804.989311
Sum of electronic and thermal Energies	-804.972819
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-804.971874
Sum of electronic and thermal Free Energies	-805.033220

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B7 - Energias calculadas para a [**1**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio do anel pirano carboxílico. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.258288
Thermal correction to Energy	0.274975
Thermal correction to Enthalpy	0.275920
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.214597
Sum of electronic and zero-point Energies	-805.005606
Sum of electronic and thermal Energies	-804.988918
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-804.987974
Sum of electronic and thermal Free Energies	-805.049297

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B8 - Energias calculadas para a [**2**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio carbonílico. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.254849
Thermal correction to Energy	0.270272
Thermal correction to Enthalpy	0.271216
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.210770
Sum of electronic and zero-point Energies	-729.789671
Sum of electronic and thermal Energies	-729.774249
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-729.773304
Sum of electronic and thermal Free Energies	-729.833751

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B9 - Energias calculadas para a [**2**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio carboxílico. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.251524
Thermal correction to Energy	0.268850
Thermal correction to Enthalpy	0.269795
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.203492
Sum of electronic and zero-point Energies	-729.768122
Sum of electronic and thermal Energies	-729.750795
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-729.749851
Sum of electronic and thermal Free Energies	-729.816154

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B10 - Energias calculadas para a [**2**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio do anel pirano. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.254394
Thermal correction to Energy	0.269710
Thermal correction to Enthalpy	0.270654
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.212233
Sum of electronic and zero-point Energies	-729.758569
Sum of electronic and thermal Energies	-729.743252
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-729.742308
Sum of electronic and thermal Free Energies	-729.800729

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B11 - Energias calculadas para a [**3**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio carbonílico. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.371576
Thermal correction to Energy	0.393876
Thermal correction to Enthalpy	0.394820
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.317342
Sum of electronic and zero-point Energies	-925.071948
Sum of electronic and thermal Energies	-925.049648
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-925.048704
Sum of electronic and thermal Free Energies	-925.126182

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B12 - Coordenadas cartesianas para a [**3**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio carboxílico. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.368102
Thermal correction to Energy	0.392382
Thermal correction to Enthalpy	0.393326
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.308620
Sum of electronic and zero-point Energies	-925.051213
Sum of electronic and thermal Energies	-925.026933
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-925.025989
Sum of electronic and thermal Free Energies	-925.110695

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B13 - Energias calculadas para a [**3**+H]$^+$. Espécie protonada no grupo prenila. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.369792
Thermal correction to Energy	0.391816
Thermal correction to Enthalpy	0.392760
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.318483
Sum of electronic and zero-point Energies	-925.060407
Sum of electronic and thermal Energies	-925.038383
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-925.037439
Sum of electronic and thermal Free Energies	-925.111716

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B14 - Energias calculadas para a [**3**+H]$^+$. Espécie protonada no átomo de oxigênio do anel pirano. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-311++G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.370699
Thermal correction to Energy	0.392587
Thermal correction to Enthalpy	0.393531
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.319800
Sum of electronic and zero-point Energies	-925.054661
Sum of electronic and thermal Energies	-925.032773
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-925.031829
Sum of electronic and thermal Free Energies	-925.105560

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B15 - Energias calculadas para a [**3**+H]$^+$, **C1**. Estudo da etapa de transferência do próton entre o átomo de oxigênio do anel pirano e o grupo prenila. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.370944
Thermal correction to Energy	0.393323
Thermal correction to Enthalpy	0.394267
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.318149
Sum of electronic and zero-point Energies	-924.868279
Sum of electronic and thermal Energies	-924.845900
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-924.844956
Sum of electronic and thermal Free Energies	-924.921074

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B16 - Energias calculadas para a estrutura do estado de transição, [**c1**]‡. Estudo da etapa de transferência do próton entre o átomo de oxigênio do anel pirano e o grupo prenila. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.367001
Thermal correction to Energy	0.388579
Thermal correction to Enthalpy	0.389523
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.316260
Sum of electronic and zero-point Energies	-924.861872
Sum of electronic and thermal Energies	-924.840294
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-924.839350
Sum of electronic and thermal Free Energies	-924.912613

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B17 - Energias calculadas para a [**3**+H]$^+$, **C1'**. Estudo da etapa de transferência do próton entre o átomo de oxigênio do anel pirano e o grupo prenila. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.372036
Thermal correction to Energy	0.393871
Thermal correction to Enthalpy	0.394815
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.321282
Sum of electronic and zero-point Energies	-924.864623
Sum of electronic and thermal Energies	-924.842788
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-924.841844
Sum of electronic and thermal Free Energies	-924.915377

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B18 - Energias calculadas para a [**3**+H]$^+$, **C2**. Estudo da etapa de perda neutra de 3-metilbuta-1,2-dieno. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.372658
Thermal correction to Energy	0.394980
Thermal correction to Enthalpy	0.395924
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.319020
Sum of electronic and zero-point Energies	-924.884063
Sum of electronic and thermal Energies	-924.861742
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-924.860798
Sum of electronic and thermal Free Energies	-924.937702

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B19 - Energias calculadas para a estrutura do estado de transição, [**c2**]‡. Estudo da etapa de perda neutra de 3-metilbuta-1,2-dieno. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.365615
Thermal correction to Energy	0.389033
Thermal correction to Enthalpy	0.389977
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.309439
Sum of electronic and zero-point Energies	-924.746869
Sum of electronic and thermal Energies	-924.723451
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-924.722507
Sum of electronic and thermal Free Energies	-924.803045

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela B20 - Energias calculadas para o íon produto **C2'**. Estudo da etapa de perda neutra de 3-metilbuta-1,2-dieno. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.255927
Thermal correction to Energy	0.271249
Thermal correction to Enthalpy	0.272193
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.212891
Sum of electronic and zero-point Energies	-729.636058
Sum of electronic and thermal Energies	-729.620736
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-729.619792
Sum of electronic and thermal Free Energies	-729.679094

Fonte: Elaborada pelo autor.

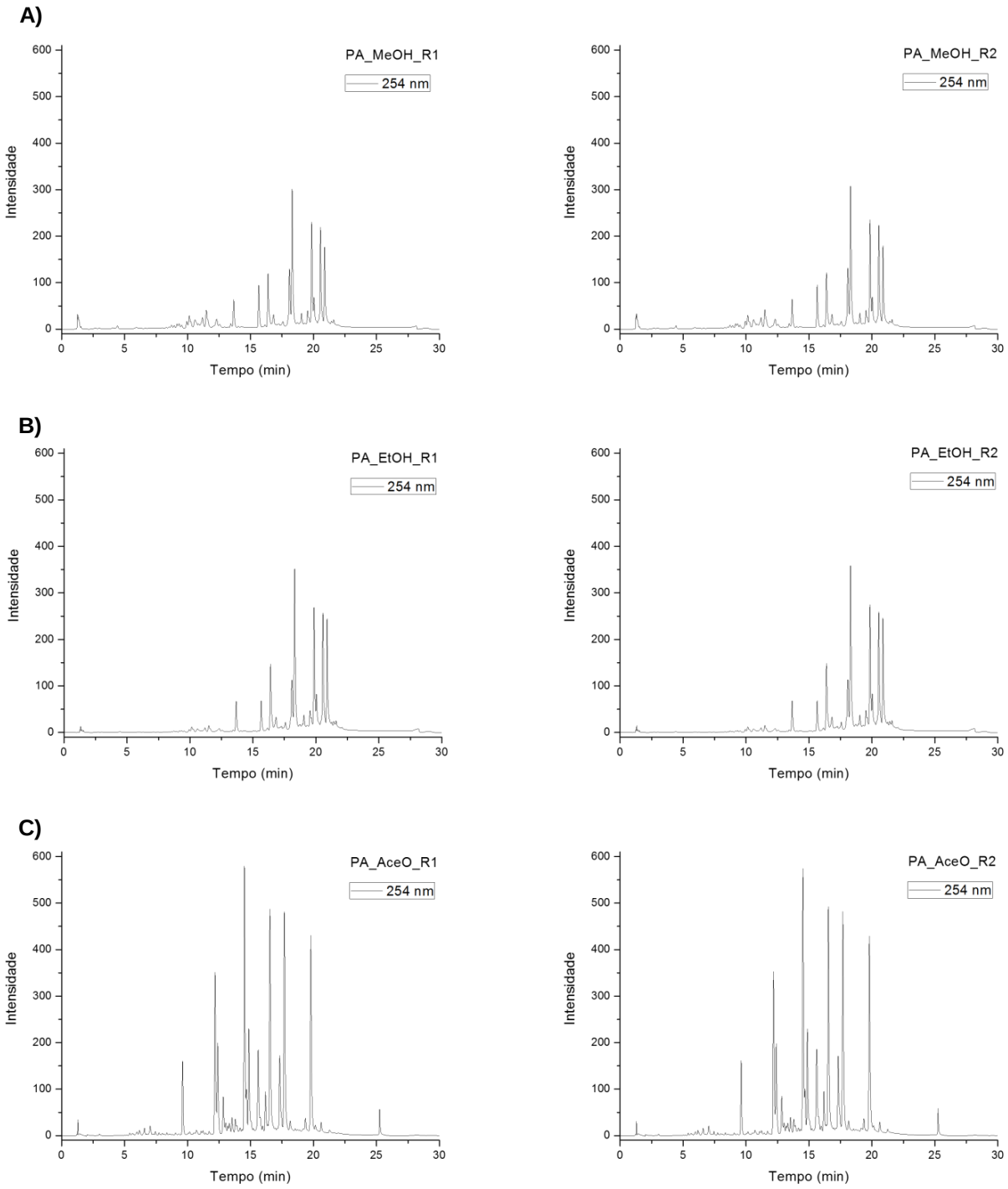
Tabela B21 - Energias calculadas para a espécie neutra **C2''**. Estudo da etapa de perda neutra de 3-metilbuta-1,2-dieno. O cálculo foi obtido com o modelo B3LYP/6-31+G(d,p).

	Hartree
Zero-point correction	0.112080
Thermal correction to Energy	0.118492
Thermal correction to Enthalpy	0.119437
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.082885
Sum of electronic and zero-point Energies	-195.202133
Sum of electronic and thermal Energies	-195.195721
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-195.194776
Sum of electronic and thermal Free Energies	-195.231328

Fonte: Elaborada pelo autor.

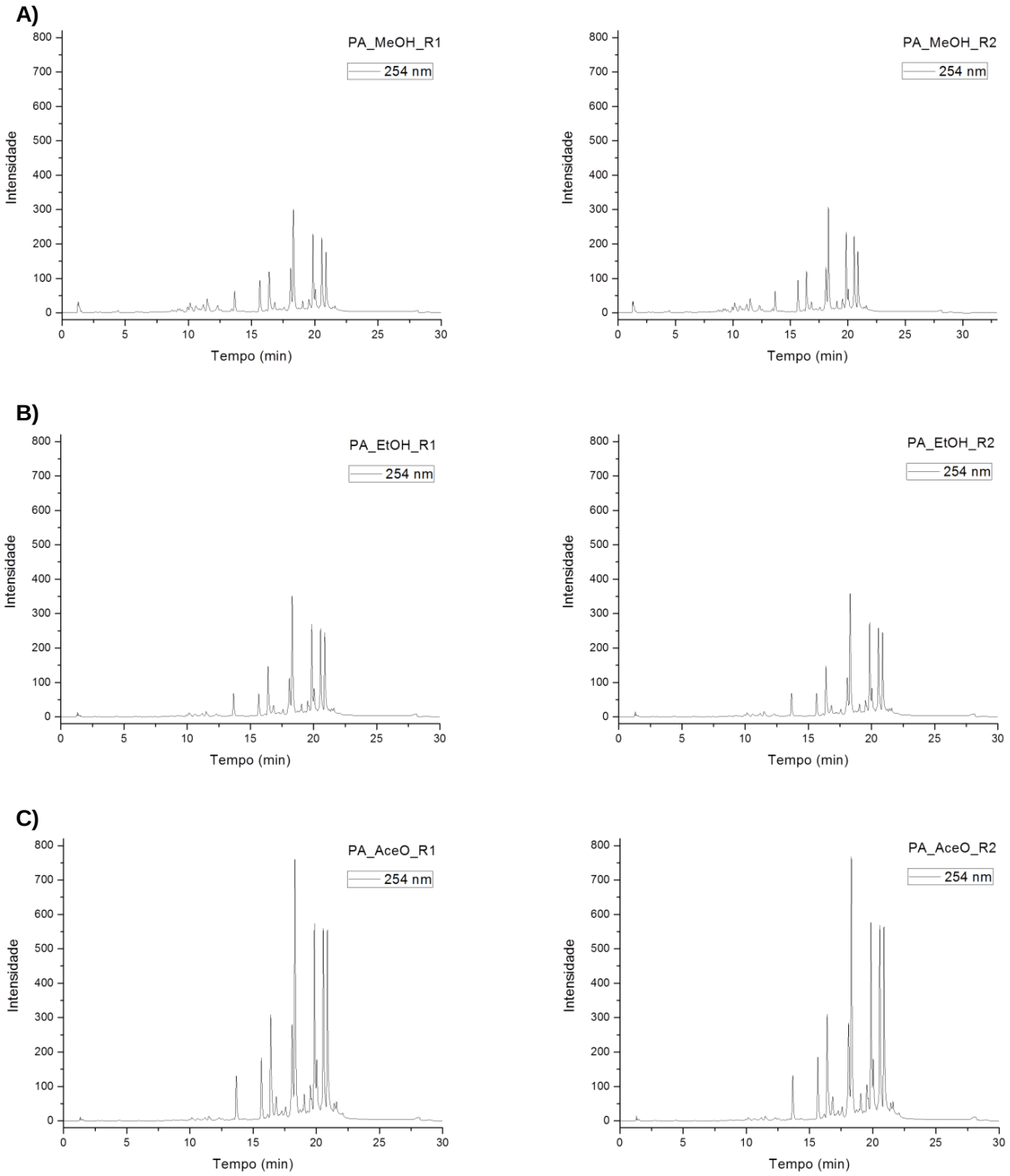
APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES POR CLAE

Figura C1 - Cromatogramas das análises por CLAE para a espécie *Piper aduncum* com fase móvel composta por ACN/H_2O. Os solventes utilizados no preparo do extrato foram: A) MeOH, B) EtOH e C) AceO. Para cada amostra foram realizadas duas análises: n = 2.



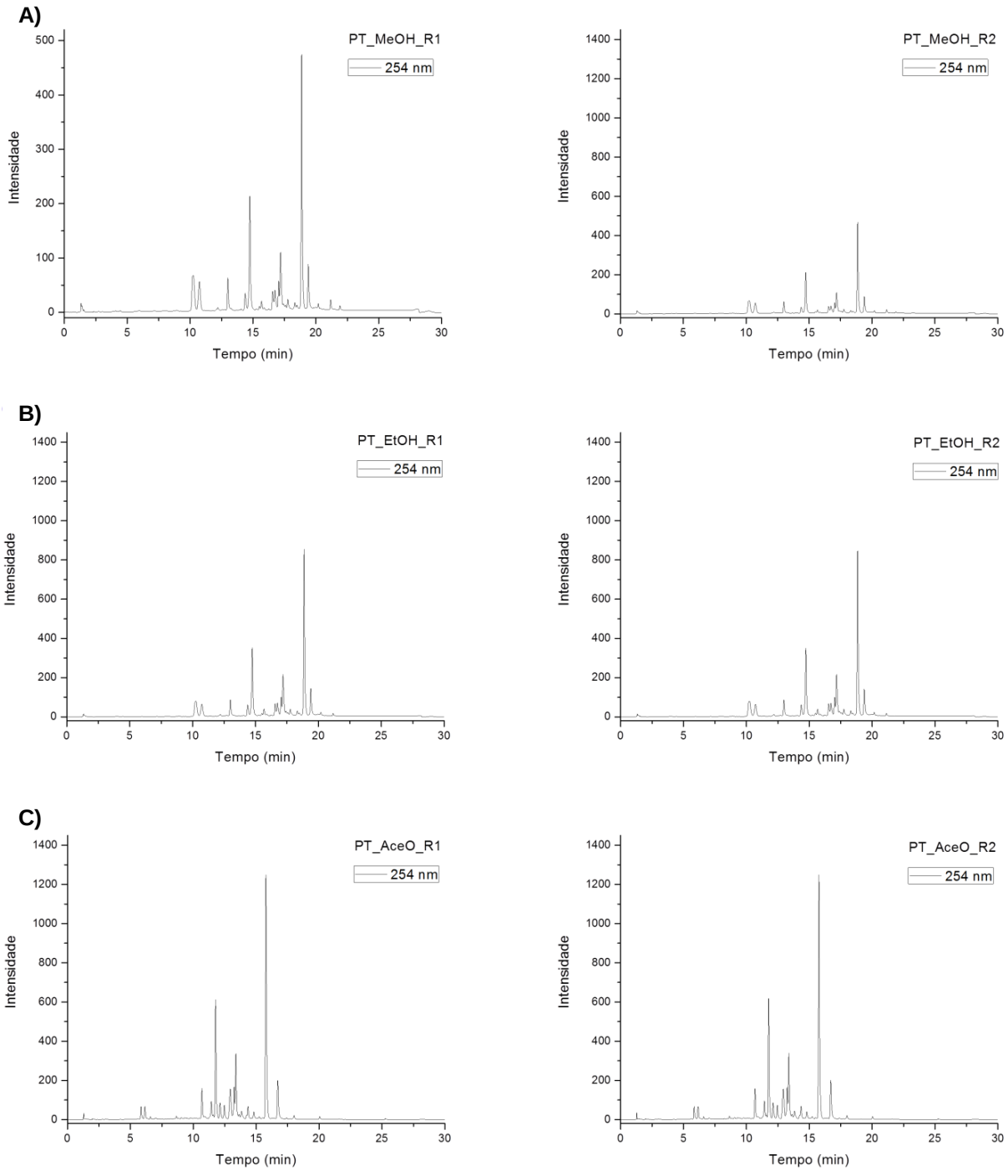
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura C2 - Cromatogramas das análises por CLAE para a espécie *Piper aduncum* com fase móvel composta por MeOH/H_2O. Os solventes utilizados no preparo do extrato foram: A) MeOH, B) EtOH e C) AceO. Para cada amostra foram realizadas duas análises: n = 2.



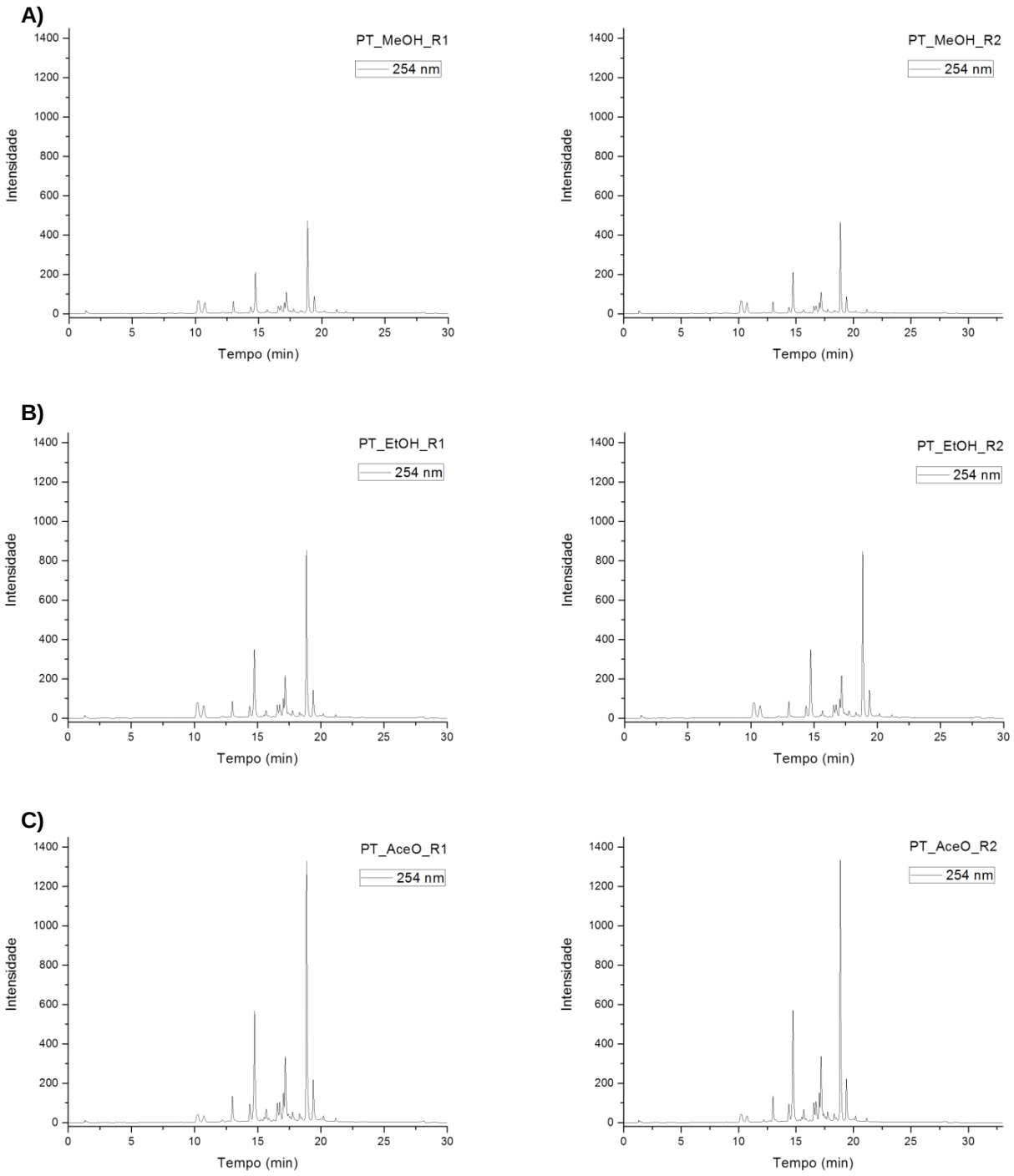
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura C3 - Cromatogramas das análises por CLAE para a espécie *Piper tuberculatum* com fase móvel composta por ACN/H_2O. Os solventes utilizados no preparo do extrato foram: A) MeOH, B) EtOH e C) AceO. Para cada amostra foram realizadas duas análises: n = 2.



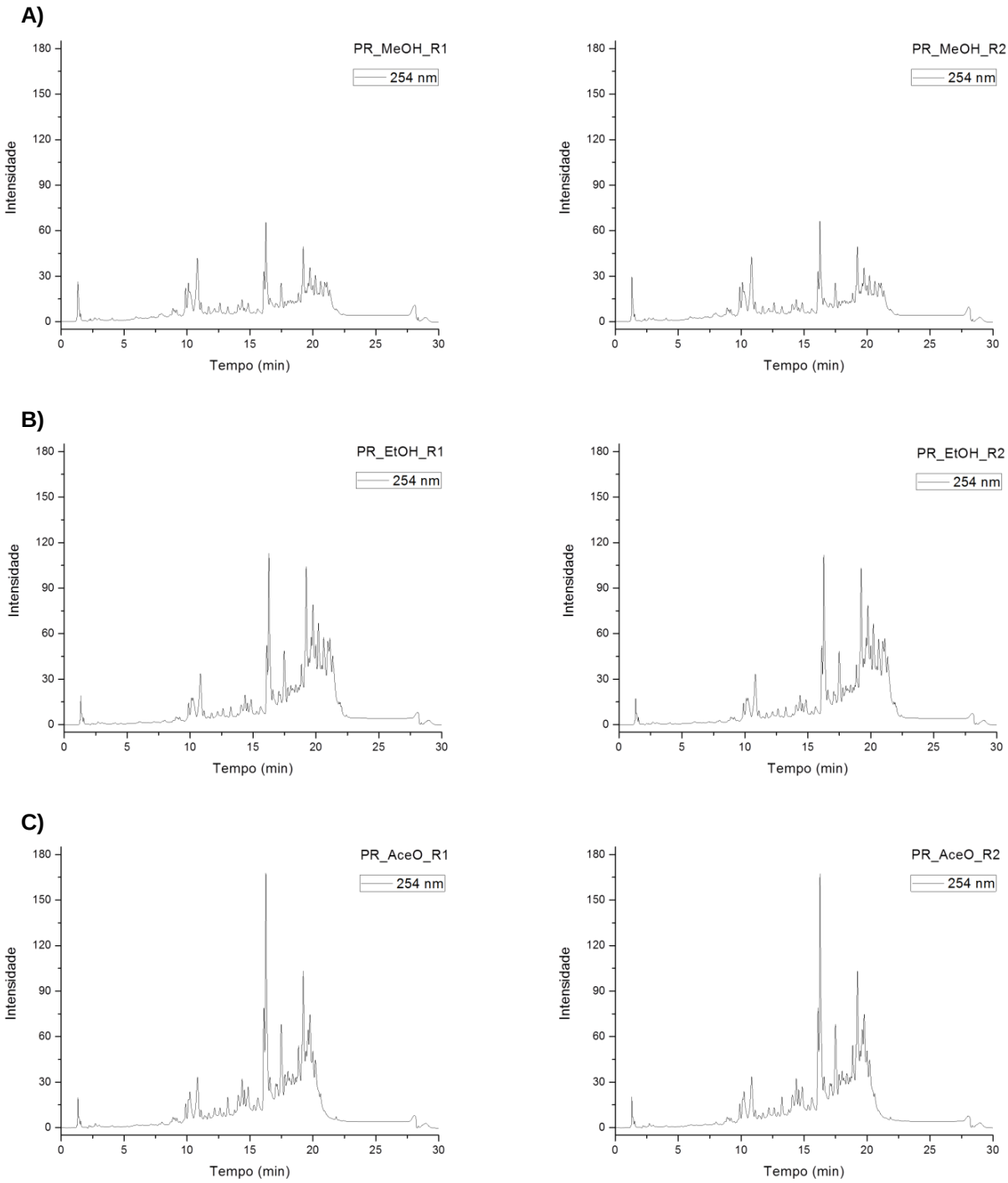
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura C4 - Cromatogramas das análises por CLAE para a espécie *Piper tuberculatum* com fase móvel composta por MeOH/H_2O. Os solventes utilizados no preparo do extrato foram: A) MeOH, B) EtOH e C) AceO. Para cada amostra foram realizadas duas análises: n = 2.



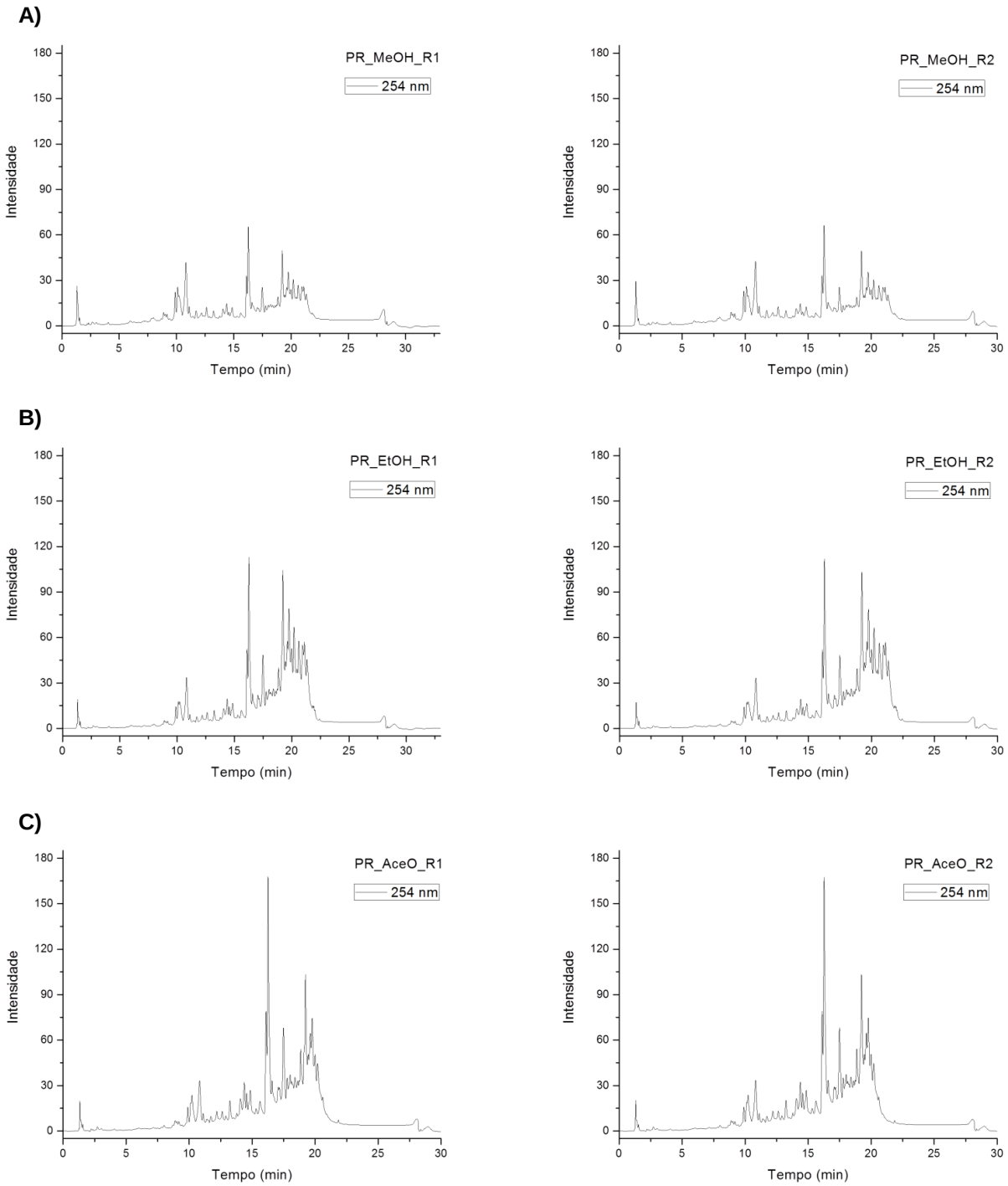
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura C5 - Cromatogramas das análises por CLAE para a espécie *Piper arboreum* com fase móvel composta por ACN/H_2O. Os solventes utilizados no preparo do extrato foram: A) MeOH, B) EtOH e C) AceO. Para cada amostra foram realizadas duas análises: n = 2.



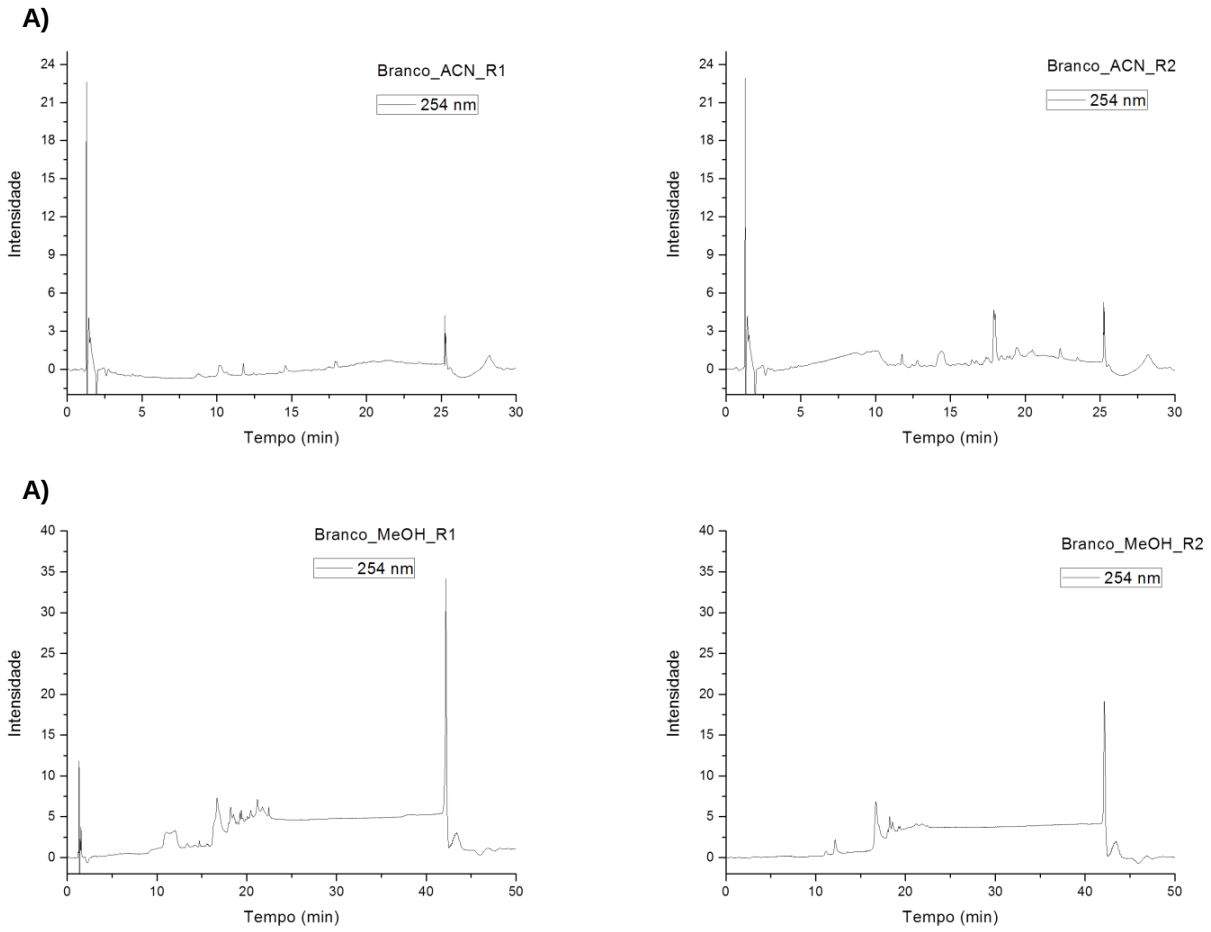
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura C6 - Cromatogramas das análises por CLAE para a espécie *Piper arboreum* com fase móvel composta por MeOH/H_2O. Os solventes utilizados no preparo do extrato foram: A) MeOH, B) EtOH e C) AceO. Para cada amostra foram realizadas duas análises: n = 2.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura C7 - Cromatogramas das análises por CLAE para o branco analítico com fase móvel: A) ACN/H_2O e B) MeOH/H_2O. Para cada branco analítico: n = 2.



Fonte: Elaborada pelo autor.