

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do metabolismo *in vitro* da budleína A e correlatos

Lucas Rossi Sartori

Ribeirão Preto
2014

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

Avaliação do metabolismo *in vitro* da budleína A e correlatos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Lucas Rossi Sartori

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 07/02/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sartori, Lucas Rossi

Avaliação do metabolismo *in vitro* da budleína A e correlatos.
Ribeirão Preto, 2013.

111 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine

1. Lactona sesquiterpênica. 2. Espectrometria de massas. 3. Metabolismo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Rossi Sartori

Avaliação do metabolismo *in vitro* da budleína A e correlatos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus amados afilhados Pedro e Helena.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao Prof. Norberto, pela oportunidade única de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Sua incansável vontade de contribuir para a ciência deste país, e a humanidade com que o faz é algo impressionante. Obrigado pelo apoio, companheirismo e as aulas de otimismo.

Não há escola alguma capaz de ensinar mais que uma família justa, correta e honesta. Pai, Vó e Angélica: eu sou transpiração. Vocês, inspiração.

À Jacqueline Tamae, meus sinceros agradecimentos pela compreensão, paciência e sabedoria.

Ao Prof. Ricardo Vessecchi pela estupenda contribuição para a execução e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. João Luis Callegari Lopes por me dar a honra de realizar o PAE sob sua batuta.

Ao Prof. Fernando Batista da Costa, grande especialista em lactonas sesquiterpênicas, que com sua visão detalhista e metódica é capaz de dirimir dúvidas aparentemente indissolúveis, contribuiu imensamente.

Ao Prof. Leonardo Gobbo Neto e sua esposa Rosemeire pelo apoio fundamental em meus primeiros dias de Alemanha.

Ao Prof. Hans-Ulrich Humpf pela oportunidade de realizar parte de meu projeto em seu instituto.

À Dra. Denise Brentan da Silva por todo apoio, companheirismo e solicitude.

Aos amigos José Carlos Tomaz, Cristina Turatti Jacqueline Nakau pelo suporte técnico em todas as instâncias dentro do laboratório.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP pela aquisição dos espectros de RMN.

Aos meus companheiros mais contemporâneos de pós-graduação, Dayana, Daniel Pavarini, Leandro, Eduardo, Madeleine, Maria Elvira, Michael Niehues e Arthur, um forte abraço e um muito obrigado. Contem comigo.

A todos os colegas de laboratório do Bloco J e também do Bloco M pelos momentos de estudo, debates, diversão e também o apoio nos momentos difíceis. Tudo isso sempre estará em nossas memórias e presentes em nossas vidas para sempre.

À Dra. Rejane Barbosa de Oliveira pelo auxílio na coleta do material vegetal.

Ao doutorando Johannes Gerding pela colaboração nos ensaios com microsomas hepáticos.

Aos colegas da Lychnoflora pelas trocas de experiência e interação no dia-a-dia.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Hans-Ulrich Humpf da Universidade de Münster na Alemanha pelo suporte em um dos momentos mais desafiadores da minha vida.

Aos colegas brasileiros com os quais compartilhei vários momentos enquanto estive em Münster.

Ao Centro Brasileiro da Universidade de Münster, especialmente ao Dr. Ricardo Schuch e ao Sr. Luciano Sales.

À Dra. Valéria Barros pelo auxílio na execução das reações biomiméticas.

À todos aqueles que em algum momento participaram de alguma forma deste projeto, meu sincero muito obrigado.

À FAPESP (Proc. N° 2010/07413-0) e ao CNPq (Proc. N° 201691/2011-6) pelas bolsas e auxílios financeiros concedidos.

“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas.”

Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

SARTORI, L. R. **Avaliação do metabolismo *in vitro* da budleína A e correlatos.** 2013. 111p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A busca por novos fármacos inspirados em substâncias de origem natural é uma estratégia conhecida e há tempos utilizada. As lactonas sesquiterpênicas (LST) são um grupo de substâncias amplo e diverso com várias atividades farmacológicas descritas, e cuja característica estrutural determinante é a de um esqueleto principal contendo 15 átomos de carbono e um anel lactônico. O mecanismo de ação das LST está intrinsecamente relacionado com reações de adição do tipo Michael frente a biomoléculas, provocando alquilações. Há na literatura estudos aprofundados sobre a química medicinal das LST, entretanto pouco há sobre o metabolismo desse grupo de substâncias em ambientes fisiológicos. Neste sentido, este trabalho é focado no estudo do metabolismo e também das vias de fragmentação por eletrospray da budleína A, que possui estrutura química do tipo furanoeliangolido, e pertence à classe dos germacranolidos. Foram realizados ensaios *in vitro* utilizando-se os modelos de oxidação biomimética com metaloporfirina, microssomas hepáticos e metabolismo pela microbiota intestinal de ceco de porco (*pig cecum model*), sendo nos dois últimos testado também o correlato 4 β ,5-dihidro-2',3'-epoxi-15-desoxigoyazensolido. O estudo de fragmentação também abordou a comparação entre budleína A e a centraterina - um estereoisômero que se diferencia apenas pela orientação α da cadeia lateral ligada ao C-8 - em espectrômetros distintos e com suporte de métodos computacionais para cálculos de energia (Gaussian 03 em base B3LYP/6-31G(d)). Nos estudos de fragmentação observou-se a diferença de intensidade dos sinais para íons fragmento comuns às duas LST (m/z 275, 257 e 83), além da presença do íon fragmento de m/z 293 apenas para a budleína A, permitindo a diferenciação destes isômeros por meio de espectrometria de massas com ionização por eletrospray, sem a necessidade de ressonância de magnética nuclear. Os produtos de oxidação detectados na reação com metaloporfirinas acusaram a epoxidação na cadeia lateral envolvendo C-2' e C-3' com a formação de diastereoisômeros. No ensaio com microssomas não foram detectados produtos para a budleína A, enquanto que para a substância correlata observou-se a abertura do epóxido na cadeia lateral e adição de uma hidroxila, formando um diol vicinal. No modelo de ceco de porco observaram-se a formação de adutos de LST com o aminoácido cisteína, os quais foram posteriormente degradados pela ação da microbiota intestinal, dando origem a diversos metabólitos compostos pela LST e partes de cisteína. Sendo assim, este trabalho lança bases para a maior compreensão do metabolismo de LST do tipo furanoeliangolido em modelos distintos e também contribui para os estudos de espectrometria de massas para este tipo de substância, além de descrever uma ferramenta analítica útil na diferenciação de dois estereoisômeros.

Palavras-chave: Lactona sesquiterpênic, budleína A, modelo do ceco de porco, estereoisômeros, microssomas, metaloporfirinas, metabolismo biomimético

ABSTRACT

SARTORI, L. R. **Evaluation of the in vitro metabolism of budlein A and correlates.** 2013. 111p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The search for new drugs inspired on compounds from natural products is a well-known strategy with several successful cases. Sesquiterpene lactones (STL) are a wide and diversified group of compounds which has already many pharmacological activities reported. Their fundamental moiety includes a skeleton containing 15 carbons and a lactone ring and the mechanism of action is related to Michael addition type reactions with biomolecules, promoting alkylation. There are a high amount of studies regarding the medicinal chemistry of the STL, however there are few information about the metabolism of these compounds under physiological environments. On this way, the aims of this work are focused on the study of the metabolism as well as the fragmentation pathways of budlein A, which is a furanoheliangolide and belongs to the germacranolides class. On this work the following experiments were carried out: in vitro oxidative metabolism with metalloporphyrin and microsomes; intestinal metabolism by using the pig cecum model (microbiota). For microsomes and intestinal metabolism the compound 4 β ,5-dihydro-2',3'-epoxy-15-deoxy-goyazensolide was also applied. Fragmentation studies compared the fragmentation patterns of budlein A and centratherin – which is a stereoisomer with α -orientation for the side chain bonded at C-8 – by using different spectrometers being supported by computational methods for energies calculations (Gaussian 03 at level B3LYP/6-31G(d)). For the fragmentation studies it was observed the difference of signal intensities for fragment ions which are common for both STL (m/z 275, 257 e 83), moreover the ion m/z 293 was detected only for budlein A, allowing the differentiation between these isomers by electrospray ionization mass spectrometry instead nuclear magnetic resonance. The reactions with metalloporphyrin yielded two diastereoisomers of the STL with an epoxide at the side chain between C-2' and C-3'. On the microsome assay any product was detected for budlein A, while for the correlated compound the epoxide ring was opened and a hydroxyl was added at C-3', forming a vicinal diol. On the pig cecum model it was observed the formation of adducts due to the reaction of the STL and the amino acid cysteine. These adducts were later degraded by the action of the microbiota yielding different metabolites composed by STL and residues of cysteine. Thus, this work may contribute to the improvement of the knowledge about the metabolism of STL furanoheliangolide type in different models as well as for the studies regarding the mass spectrometry of this type of compound. The development of a useful analytical tool for the differentiation of two isomers was also an important achievement.

Keywords: sesquiterpene lactone, budlein A, pig cecum model, stereoisomers, microsome, metalloporphyrin, biomimetic metabolism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural das substâncias dimetilalil difosfato (A) e isopentenil difosfato (B).....	3
Figura 2. Terpenos precursores das LST.	4
Figura 3. (A) Lactonização da cadeia lateral isopropil à partir do esqueleto germacrano e (B) formação do grupo α -metileno- γ -lactona.	5
Figura 4. Mecanismo de reação da adição de Michael.	6
Figura 5. Disposição tridimensional da budleína A (esquerda) e do aminoácido cisteína (direita).	7
Figura 6. Budleína A (BDL).	8
Figura 7. Estrutura central das metaloporfirinas.	11
Figura 8. Coleta da espécie vegetal <i>Viguiera robusta</i>	18
Figura 9. Isolamento da BDL por cromatografia líquida à vácuo.	20
Figura 10. Material cristalizado obtido após CLV.	22
Figura 11. Estrutura química da BDL e centraterina. Entre parênteses a numeração adotada para os átomos de oxigênio.	24
Figura 12. (a) FeTFPP e (b) <i>m</i> CPBA.	26
Figura 13. Placa de CCD preparativa utilizada no isolamento dos produtos de reação biomimética. (a) Amostra aplicada na placa e (b) após eluição.	28
Figura 14. Estrutura química das LST testadas no modelo de ceco de porco.	30
Figura 15. Câmara hermeticamente lacrada utilizada nos procedimentos do modelo de ceco de porco. Foto: Lucas R. Sartori.	31
Figura 16. Curva de calibração obtida para a BDL por CLAE-UV.	33
Figura 17. Curva de calibração obtida para a EPOXI por CLAE-UV.	33
Figura 18. Placa de CCD utilizada no agrupamento de frações contendo BDL.	37
Figura 19. Espectro de CG-EM obtido para a BDL.	37
Figura 20. Espectro IES-EM da BDL.	39
Figura 21. Espectros EM/EM da BDL (A:QqQ; C:QTOF) e centraterina (B:QqQ; D:QTOF). A Elab empregada foi de 10 eV em QqQ e 15 eV em QTOF. Os gases de colisão foram Ar em QqQ e N ₂ em QTOF respectivamente.	43
Figura 22. Perfil de fragmentação da BDL (A) e da centraterina (B) obtidos no Orbitrap XL a 15 eV no modo HCD. (C) e (D) apresentam as intensidades dos íons em função da variação de energia colisional para a BDL e a centraterina respectivamente.	44
Figura 23. Valores calculados de basicidade em fase gasosa para os átomos de oxigênio da BDL e centraterina utilizando-se a base B3LYP/6-31G(d).	45
Figura 24. Mecanismo de reação sugerido para a formação do íon fragmento de <i>m/z</i> 293.	46
Figura 25. Mecanismo de reação proposto para a formação do íon fragmento de <i>m/z</i> 275 à partir da BDL e da centraterina por IES-EM/EM. Os valores em itálico indicam a entalpia relativa a 298 K obtida por B3LYP/6-31G(d). Em negrito são apresentadas as energias relativas de Gibbs.	47
Figura 26. Vias de fragmentação em IES-EM/EM para a BDL e centraterina. Os íons destacados em caixas são observados nos espectrômetros descritos e podem ser utilizados como diagnósticos entre os isômeros.	48
Figura 27. Avaliação do perfil cinético da reação de oxidação da BDL utilizando-se <i>m</i> CPBA e FeTFPP.	49

Figura 28. Placa de CCD preparativa utilizada no isolamento dos produtos de reação biomimética, exposta à luz UV.	50
Figura 29. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) obtido para a BDL em CDCl_3	52
Figura 30. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) obtido para o produto de oxidação da BDL em CDCl_3	52
Figura 31. Cromatograma obtido por CLAE-EM para os produtos de oxidação biomimética. Abaixo os respectivos EM.	54
Figura 32. Diastereoisômeros formados por meio de reações biomiméticas.	55
Figura 33. EM obtido para o produto de metabolismo da EPOXI com microsomas hepáticos de porco.	56
Figura 34. Produto de metabolismo da EPOXI com microsomas hepáticos de porco e rato.	56
Figura 35. Curvas de degradação da BDL e da EPOXI obtidas após a incubação com inóculo.	57
Figura 36. Adutos formados pela reação entre a LST e cisteína.	59
Figura 37. Cromatograma obtido para os adutos de BDL e cisteína.	60
Figura 38. Espectros IES-EM/EM obtidos para os íons (A) 496,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e (B) 617,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$	61
Figura 39. Cromatograma obtido para a amostra incubada com material ativado (CA). (A) Aduto BDL + Cys; (B) íon de m/z 452,17; (C) íon de m/z 423,14; (D) íon de m/z 409,13.	62
Figura 40. Cromatograma obtido para a amostra incubada com material desativado (CD). (A) Aduto BDL + Cys; (B) íon de m/z 452,17; (C) íon de m/z 423,14; (D) íon de m/z 409,13.	62
Figura 41. Produtos de degradação da BDL + Cys detectados no modelo de ceco de porco.	63
Figura 42. Produtos de degradação da BDL + 2 Cys detectados no modelo de ceco de porco.	65
Figura 43. Espectro EM/EM do íon de m/z 441,10 $[\text{M}+\text{H}]^+$	67
Figura 44. Distribuição isotópica experimental (A) e teórica (B) para o íon de m/z 441,10 $[\text{M}+\text{H}]^+$	68
Figura 45. Espectro obtido por IES-EM para a substância EPOXI.	69
Figura 46. Cromatograma obtido com os isômeros do aduto de EPOXI + Cys.	70
Figura 47. Espectros IES-EM/EM obtidos para os quatro isômeros do aduto de EPOXI + Cys de m/z 484,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$. (A) Isômero 1, (B) Isômero 2, (C) Isômero 3 e (D) Isômero 4.	72
Figura 48. Produtos de degradação obtidos para a substância EPOXI no modelo de ceco de porco à partir do aduto de m/z 484,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$	73
Figura 49. Espectro obtido por IES-EM/EM para o produto de m/z 397,13 $[\text{M}+\text{H}]^+$	74
Figura 50. Espectro obtido por IES-EM/EM para o produto de m/z 411,14 $[\text{M}+\text{H}]^+$ com TR de 6,4 min.	74
Figura 51. Espectro obtido por IES-EM/EM para o produto de m/z 411,14 $[\text{M}+\text{H}]^+$ com TR de 11,4 min.	75
Figura 52. Produtos de metabolismo obtidos pelo modelo de ceco de porco para o aduto de m/z 605,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$	75
Figura 53. Cromatograma obtido para os produtos de degradação de m/z 546,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 516,13 $[\text{M}+\text{H}]^+$	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de reações envolvidas na biotransformação de fármacos (Gibson e Skett, 2001). ...	10
Tabela 2. Otimização do sistema reacional biomimético da BDL (volume de reação de 1,5 mL em acetonitrila, número de mols de FeTFPP = $3 \times 10E-8$, tempo de reação de 24 horas e temperatura de 25 °C).	26
Tabela 3. Resultado obtido por CG-EM para o material isolado por CLV.	38
Tabela 4. Dados de 1H -RMN obtidos para a BDL em 500 MHz e $CDCl_3$	40
Tabela 5. Sinais obtidos por CLAE-EM para o produto de oxidação biomimética.	53
Tabela 6. Espectros EM dos produtos de degradação do aduto BDL + Cys.	64
Tabela 7. Espectros EM dos produtos de degradação do aduto BDL + 2 Cys.	65
Tabela 8. Produtos de degradação obtidos no modelo de ceco de porco para a BDL.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ADME	Absorção, distribuição, metabolização e excreção
Ar	Argônio
BDL	Budleína A
CA	Inóculo ativo
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CD	Inóculo desativado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia Líquida à Vácuo
Cys	Cisteína
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DPR	Desvio Padrão Relativo
ELF	Extrato de Lavagem Foliar
EM	Espectrometria de Massas
EPOXI	4β,5-diidro-2',3'-epoxi-15-desoxigoyazensolido
FM	Fórmula Molecular
FTMS	Espectrometria de Massas por Transformada de Fourier
GB	Basicidade em Fase Gasosa
GSH	Glutathiona
HCD	Dissociação Induzida por Colisão de Alta Energia
IE	Ionização por elétrons
IES	Ionização por eletrospray
IPP	Difosfato de isopentenila
LST	Lactona Sesquiterpênica
<i>m</i> CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	massa/carga

OPP	Difosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PhIO	Iodosilbenzeno
QqQ	Triplo Quadrupolo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rf	Fator de Retenção
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	Tempo de vôo
TR	Tempo de Retenção
TRR	Tempo de Retenção Relativa
UFLC	Cromatografia Líquida Ultra-Rápida
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
<i>d</i>	<i>Dupleto</i>
<i>dd</i>	<i>Duplo dupleto</i>
<i>dt</i>	<i>Duplo tripleto</i>
eV	Eletron volt
γ	Gama
g	Gramma
HEX	<i>n</i> -Hexano
Hz	Hertz
kV	Kilovolt
L	Litro
MHz	Megahertz
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
<i>m</i>	<i>Multipleto</i>
N ₂	Gás nitrogênio
ppm	Parte por milhão
<i>qd</i>	<i>Quadruplo dubleto</i>
®	Marca Registrada
<i>s</i>	<i>Simpleto</i>
<i>sl</i>	<i>Simpleto largo</i>
TM	<i>Trademark</i>
<i>t</i>	<i>Tripleto</i>

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Registro junto ao IBAMA para coleta de material botânico.	89
Anexo 2. Autorização de acesso ao patrimônio genético (CNPq).....	90
Anexo 3. Método analítico utilizado em CG-MS.....	92

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Materiais	17
3.2. Coleta da espécie vegetal <i>Viguiera robusta</i>	17
3.3. Extração da budleína A	19
3.4. Isolamento da budleína A	19
3.5. Identificação da budleína A	22
3.5.1. <i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	22
3.5.2. <i>Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)</i>	23
3.5.3. <i>Espectrometria de massas com ionização por electrospray (IES-EM)</i>	23
3.5.4. <i>Ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN)</i>	24
3.6. Estudo das vias de fragmentação de furanoelíngolidos por IES-EM/EM	24
3.6.1. <i>Espectrômetros utilizados e condições experimentais</i>	24
3.6.2. <i>Métodos computacionais</i>	25
3.7. Ensaio de oxidação biomimética	26
3.7.1. <i>Isolamento dos produtos de oxidação biomimética</i>	27
3.7.2. <i>Identificação dos produtos de reação biomimética</i>	28
3.8. Ensaio de metabolização <i>in vitro</i> com microsomas hepáticos	29
3.9. Ensaio de metabolização <i>in vitro</i> pelo modelo de ceco de porco (pig cecum model)	30
3.9.1. <i>Animais utilizados e coleta do ceco de porco</i>	30
3.9.2. <i>Preparação do inóculo</i>	31
3.9.3. <i>Incubação das amostras – curvas de degradação</i>	32

3.9.4. Inativação do inóculo, preparo da amostra e análise cromatográfica	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Identificação da budleína A	36
4.1.1. <i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	36
4.1.2. <i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)</i>	37
4.1.3. <i>Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (IES-EM)</i>	39
4.1.4. <i>Ressonância magnética nuclear de próton (¹H-RMN)</i>	39
4.2. Estudo das vias de fragmentação de furanoeliangolidos por IES-EM/EM	40
4.2.1. <i>Resultados obtidos por IES-EM/EM</i>	41
4.2.2. <i>Sítios de protonação e reatividade em fase gasosa</i>	45
4.2.3. <i>Vias de fragmentação</i>	46
4.3. Ensaio de oxidação biomimética	49
4.3.1. <i>Isolamento dos produtos de oxidação biomimética</i>	50
4.3.2. <i>Identificação dos produtos de reação biomimética</i>	50
4.4. Ensaio de metabolização <i>in vitro</i> com microsomas hepáticos	55
4.5. Ensaio de metabolização <i>in vitro</i> pelo modelo de ceco de porco (pig cecum model)	56
4.5.1. <i>Curvas de degradação</i>	56
4.5.2. <i>Metabólitos gerados</i>	59
4.5.2.1. <i>Budleína A</i>	60
4.5.2.2. <i>4β,5-diidro-2',3'-epoxi-15-desoxigoyazensolido (EPOXI)</i>	69
5. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	80
ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

O emprego de produtos naturais na medicina popular remonta os ancestrais da espécie humana (Viegas, Bolzani e Barreiro, 2006), obviamente pela ausência de outros recursos mais sofisticados para o tratamento de enfermidades, restando-lhes apenas empirismo¹ e fé² (De Luca et al., 2012). O primeiro compêndio que aborda de forma mais detalhada e sistemática o uso racional de plantas e outros elementos de origem natural na medicina data do século I, sendo concebido pelo então médico militar grego Pedianos Dioscorides (40 d.C. – 90 d.C.), é conhecido atualmente como “De Materia Medica” (Dioscorides, 2000). Nesta obra estão contidos os registros feitos pelo autor sobre seus estudos e experiências práticas obtidas ao longo dos anos em que serviu ao exército em regiões diversas da Europa e Ásia, onde teve a possibilidade de avaliar os resultados obtidos frente às terapias por ele utilizadas. Podemos considerar o trabalho de Dioscorides como pioneiro na área de plantas medicinais, sendo durante muitos séculos adotado como referência. Entretanto, apenas em meados do século XVIII, à luz da química moderna, percebe-se o aprofundamento dos conhecimentos em química, física e biologia de tal modo a permitir, mesmo que primordialmente, a compreensão dos mecanismos de ação farmacológica ao nível molecular (Heinrich e Gibbons, 2001). Desde então, observa-se uma evolução exponencial das tecnologias que possibilitam o estudo dos produtos naturais. Dentre as técnicas de maior utilidade nessas pesquisas temos aquelas relacionadas com a química analítica, como métodos de separação de alta eficiência e identificação por espectroscopia na região do ultravioleta (UV), espectrometria de massas (EM) (Lisec et al., 2006; De Vos et al., 2007) e ressonância magnética nuclear (RMN) (Kim, Choi e Verpoorte, 2010; 2011), que atualmente proporcionam alto grau de confiabilidade nos resultados, mesmo que por vezes a concentração dos analitos seja baixa.

Utilizando-se destes recursos, grandes avanços são atualmente alcançados diariamente em várias áreas das ciências farmacêuticas. No caso dos produtos naturais, a fitoquímica moderna tem possibilitado a realização de grandes estudos metabolômicos (Zhao et al., 2013) e de classificações quimiotaxonômicas (Reynolds,

¹ Medicina que se orienta pela experiência, com desprezo por qualquer metodologia científica. (Dicionário Houaiss Eletrônico, 2009)

² Sistema de crenças religiosas. (Dicionário Houaiss Eletrônico, 2009)

2007), que por sua vez exercem influência determinante na racionalização dos processos de busca e desenvolvimento de novos fármacos ou protótipos de origem natural.

Considerando-se estas classificações baseadas na distribuição (ocorrência) dos metabólitos secundários em diversas famílias botânicas podemos destacar o grupo dos terpenóides, amplamente encontrados na família Asteraceae (Heinrich et al., 1998; Dewick, 2009). A rota biosintética deste tipo de substância é baseada majoritariamente nas vias do mevalonato e da desoxixilulose fosfato (Eisenreich, Rohdich e Bacher, 2001), que utiliza como precursores duas unidades C₅ (hemiterpenos) denominadas dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) (Figura 1), as quais se combinam para formar uma unidade C₁₀, também conhecidos como monoterpenos. Deste ponto em diante novas unidades C₅ podem ser adicionadas, dando origem aos sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀) e sesterterpenos (C₂₅). A combinação de cadeias maiores podem também originar os triterpenos (2 x C₁₅ = C₃₀) e tetraterpenos (2 x C₂₀ = C₄₀).

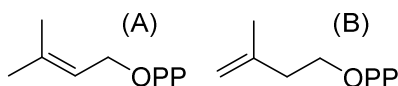


Figura 1. Fórmula estrutural das substâncias dimetilalil difosfato (A) e isopentenil difosfato (B).

Contudo, a grande variabilidade estrutural observada para os terpenóides advém da ação de enzimas capazes de realizar modificações diversas, como ciclizações, oxidações, alquilações entre outras (Sacchetti e Poulter, 1997). Estas reações proporcionam a formação de novos subgrupos de substâncias, e em especial as lactonas sesquiterpênicas (LST), que apresentam um número superior à 5000 estruturas dentro de um universo de aproximadamente 11000 sesquiterpenos, ou seja, aproximadamente metade das substâncias com esse esqueleto básico possuem ao menos um anel lactônico (Schmidt, 2006).

A importância das LST é de elevado destaque, pois além de se distribuírem amplamente pela natureza (especialmente na família Asteraceae) e possuírem grande diversidade estrutural, apresentam também atividades farmacológicas significativas em enfermidades distintas, embora a toxicidade seja um efeito colateral

que não deve ser negligenciado. A ocorrência em plantas utilizadas com finalidades alimentícias também é outro fator que justifica o interesse. Em suma, somando-se a alta ocorrência, a variabilidade estrutural, o potencial farmacológico, a presença na dieta humana e o desafio de superar o obstáculo da toxicidade, têm-se o porque em se aprofundar os conhecimentos sobre as LST.

Os fatores ecológicos aos quais as plantas estão submetidas em seus respectivos habitats são os principais responsáveis pela evolução genética das espécies (Baxter e Dilkes, 2012; Hines e Zahn, 2012), que é expressa pela complexidade dos sistemas enzimáticos que regulam a biossíntese das LST (e consequentemente ampliam o espectro de substâncias), as quais são úteis no aspecto ecológico ou ambiental, principalmente para a proteção frente aos predadores. Esta capacidade deterrente e por vezes inseticida é devida ao sabor amargo e também à toxicidade deste tipo de substância. Embora mais de 100 grupos distintos de sesquiterpenos sejam conhecidos, Schmidt (2006) demonstra em um levantamento realizado junto ao *Dictionary of Natural Products* (DNP, 2013) que apenas 7 destes grupos (Figura 2 e Figura 3) são os precursores de aproximadamente 87% de todas as LST cadastradas nesta mesma base de dados.

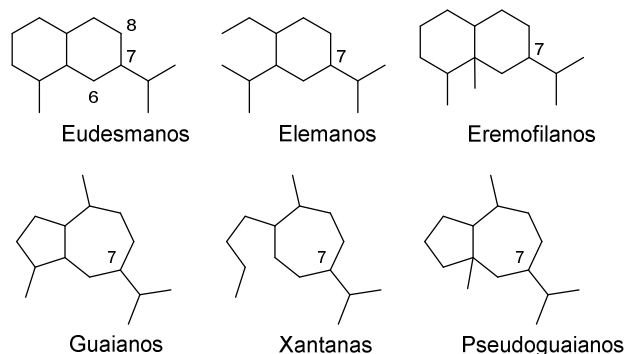


Figura 2. Terpenos precursores das LST.

Um ponto a se destacar é que todos os grupos apresentados na Figura 2 são derivados do esqueleto germacrano (Figura 3A), e podem ser biotransformados em LST por meio da lactonização da cadeia lateral isopropil, à qual pode envolver os átomos C-7 e C-8 ou C-6 e C-7 dando origem a uma γ -lactona (Figura 3A). Esta característica, associada à presença de uma dupla exocíclica em C-11 proveniente

do cátion germacril (Figura 3B) dão origem ao grupo α -metileno- γ -lactona, reconhecidamente um aceptor de Michael com alta afinidade para grupos tióis (Avonto et al., 2011). Este passa a ser então o principal grupo reativo responsável tanto pela atividade biológica quanto tóxica das LST, embora a presença de carbonila α,β -insaturada também forneça um sítio reativo em alguns casos (Schmidt et al., 1999; Schmidt, 1999; Avonto et al., 2011).

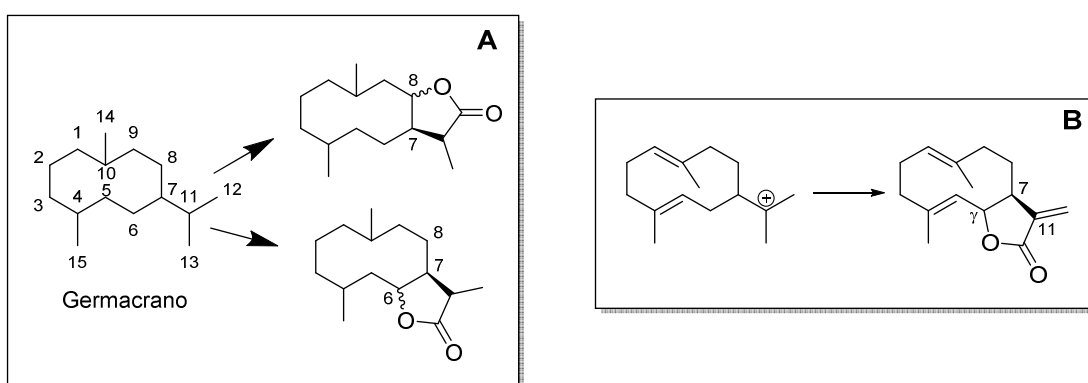


Figura 3. (A) Lactonização da cadeia lateral isopropil à partir do esqueleto germacrano e (B) formação do grupo α -metileno- γ -lactona.

O mecanismo da reação de adição de Michael envolvendo o grupo α -metileno- γ -lactona pode ser exemplificado pela interação deste sítio com o aminoácido cisteína (Figura 4), a qual propicia dois acontecimentos concomitantemente, sendo: (1) aproximação do grupo amino protonado e da carbonila, retirando elétrons do sistema conjugado, o que leva ao (2) aumento da reatividade do carbono β , o qual fica vulnerável ao ataque nucleofílico do grupo tiol do aminoácido.

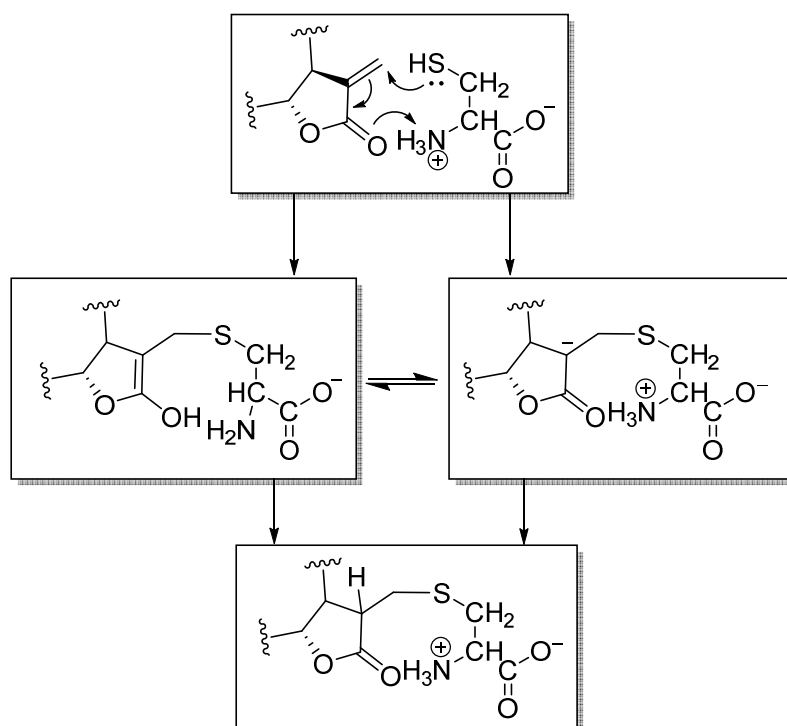


Figura 4. Mecanismo de reação da adição de Michael.

A distância medida após a minimização de energia por MM2 entre os átomos de enxofre e nitrogênio (3,2 Å, ângulo diedro 68,2°) na cisteína e o carbono β e a carbonila do anel lactônico (2,8 Å, ângulo diedro 0,6°) nas LST (Figura 5) (Chem3D Pro[®]) são um forte indício de que a estereoquímica destes grupamentos é favorável à aproximação necessária para que a reação se inicie (Schmidt, 2006).

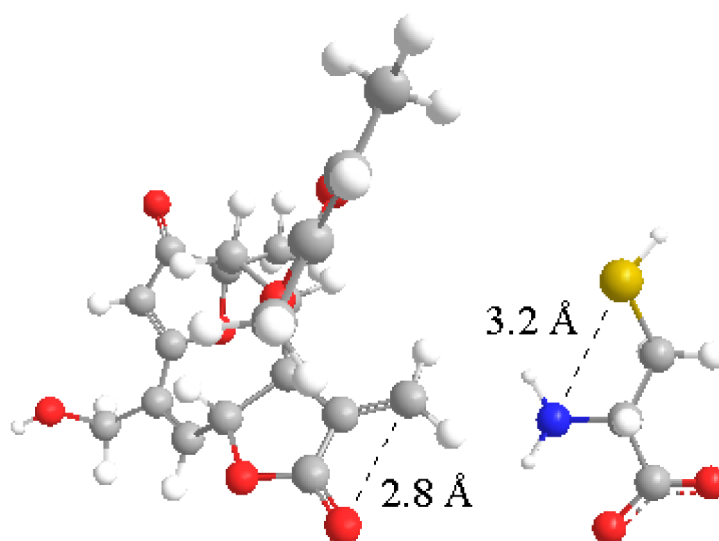


Figura 5. Disposição tridimensional da budleína A (esquerda) e do aminoácido cisteína (direita).

Portanto, esta característica inerente às LST lhes proporciona um importante potencial alquilante, especialmente frente à grupos tióis presentes em resíduos de cisteína em macromoléculas. Esta interação em proteínas específicas e em sítios específicos são os alvos explorados na busca de fármacos derivados de LST. Um grande número de estudos sugere que este mecanismo é capaz de inibir o processo de sinalização celular que culminaria na ativação de cascatas bioquímicas pró-inflamatórias (Merfort, 2011). Acredita-se que a influência sobre o NF- κ B, impedindo sua ativação no núcleo celular ou sua ligação ao DNA (Garcia-Pineros et al., 2001; Siedle et al. 2004; García-Piñeres, et al., 2004) seja a responsável pela efetividade do mecanismo de ação das LST. Por outro lado, a toxicidade observada para as LST também é resultado deste mecanismo, quando ocorre indiscriminadamente, sem a devida seletividade pelos tecidos, órgãos ou células alvo.

Neste contexto, a substância budleína A (BDL) apresenta potencial promissor devido às suas propriedades farmacológicas, como: analgésica (Valério et al., 2007), antiinflamatória (Valério et al., 2007; Arakawa et al., 2008; Nicolete et al., 2009), antimicrobiana (Da Costa et al., 1998), citotóxica (Arakawa, 2007), relaxante de musculatura lisa (Van Calsteren et al., 2008) e inibição da motilidade de espermatozóides (Huacuja et al., 1993). A atividade antiinflamatória desta substância, no entanto, mostra-se como uma das mais promissoras, o que tem motivado recentemente a elucidação da relação estrutura atividade existente, bem

como os mecanismos de ação envolvidos e sua relação com a sinalização celular destacada no processo inflamatório (Siedle, et al. 2004; Garcia-Pineros, et al., 2004; Lindenmeyer et al., 2006; Valerio et al., 2007; Nicolete, R. et al., 2009).

A BDL foi pioneiramente isolada e identificada à partir da espécie *Viguiera buddleiaeformis*, pertencente à família Asteraceae (De Vivar et al., 1976). Ocorre também em outras espécies do gênero *Viguiera* (Delgado, Devivar e Herz, 1982; Delgado, Alvarez e De Vivar, 1984; Delgado et al., 1984; Schmeda-Hirschmann et al., 1985; Spring et al., 2000), em espécies do gênero *Helianthus* (Ohno et al., 1981; Gershenzon e Mabry, 1984; Herz e Kulanthaivel, 1984; Spring, 1991; Spring e Schilling, 1991; Buschmann e Spring, 1995), *Calea villosa* (Bohlmann et al., 1982) e *Calea divaricata* (Ober, Fronczek e Fischer, 1985), espécies do gênero *Heliomeris* (Buschmann e Spring, 1997), *Ayapana elata* (Jakupovic, Castro e Bohlmann, 1987), *Tithonia longiradiata* (Perez, Lara e Devivar, 1992) e *Pappobolus* sp. (Spring, Vargas e Fischer, 1991).

O esqueleto principal da BDL (3,10-Epoxy-8,15-dihydroxy-1-oxo-2,4,11(13)-germacatrien-12,6-olide; (4E,6 α ,8 β ,10 β)-form, 8-Angeloyl, número CAS 59481-48-0) é classificado como um heliangolido (Seaman, 1982), que após a formação de uma ponte por um átomo de oxigênio entre os carbonos C-3 e C-10 do esqueleto sesquiterpênico, apresenta um anel furano, formando assim um furanoeliangolido. Possui também uma cadeia lateral do tipo angelato ligada ao C-8 em β -orientação (Figura 6). Apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{22}O_7$, peso molecular 374,14 u, ponto de fusão entre 106 e 108 °C e λ_{max} em 225 e 266 nm.

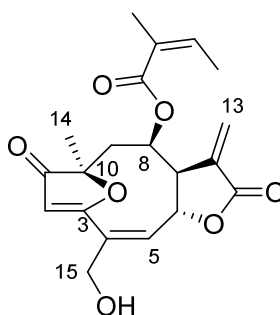


Figura 6. Estrutura química da Budleína A (BDL).

A determinação estrutural da BDL foi obtida por meio de RMN (De Vivar et al., 1976; Van Calsteren et al., 2008) e EM com ionização por elétrons (IE), a qual destaca principalmente os íons de m/z 274, 83 e 55, característicos do éster do tipo angelato (De Vivar et al., 1976), que compõe a cadeia lateral da BDL. Em relação à sua fragmentação quando submetida à ionização por eletrospray (IES) e posterior dissociação induzida por colisão (CID – Dissociação Induzida por Colisão) é possível encontrar na literatura apenas um trabalho discorrendo sobre os mecanismos de reação envolvidos (Crotti, Lopes e Lopes, 2005). Entretanto, os dados apresentados neste estudo, embora possuam grande valia, não são suficientes e acurados o bastante para a elucidação das vias de fragmentação da BDL.

O primeiro passo para a interpretação de espectros de massas de moléculas orgânicas ionizadas por eletrospray (IES-EM) deve ser relacionado à busca pelo sítio de reatividade desses compostos frente à protonação/desprotonação (Crotti et al., 2006; Vessecchi et al., 2008). Neste sentido, o grupo de pesquisa do Prof. Norberto Peporine Lopes, juntamente com o Prof. Dr. Ricardo Vessecchi tem demonstrado que a aplicação de modelos computacionais são de extrema valia para a obtenção desses dados. Além disso, o emprego da química computacional fornece detalhes sobre modificações estruturais e energéticas após o evento químico da ionização, sendo esses dados importantes para se elaborar os possíveis mecanismos de dissociação em fase gasosa (Vessecchi et al., 2008; Vessecchi et al., 2010).

Em recentes estudos, o uso da química computacional em combinação com os dados obtidos a partir das análises de espectrometria de massas tem fornecido mapas de fragmentação mais consolidados, facilitando assim, a caracterização de novos compostos obtidos a partir de reações de oxidação, que é um dos objetivos deste estudo (Pigatto et al., 2011; Andreo et al., 2012).

Embora a BDL tenha comprovada atividade biológica, não há relatos na literatura quanto à sua metabolização em modelos *in vitro*, bem como a determinação *in vivo* dos parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME).

O estudo do metabolismo de fármacos visa principalmente a determinação da estrutura química dos compostos gerados após a sua administração. O organismo vivo, através de reações químicas diversas, pode conduzir a transformação do

fármaco no trato gastrointestinal (antes de sua absorção) ou na passagem pelo fígado (fase 1) ou por reações de condensação (fase 2) de tal modo a torná-lo mais susceptível aos processos de eliminação do organismo por vias distintas de excreção, em especial pelo aumento da polaridade e conseqüentemente da solubilidade em água (Goodman et al., 2001). As principais reações químicas conhecidas são classificadas em dois tipos conforme descreve a Tabela 1.

Tabela 1. Tipos de reações envolvidas na biotransformação de fármacos (Gibson e Skett, 2001).

Fase 1	Fase 2
Hidrólise	Glicuronidação
Redução	Sulfatação
Oxidação	Metilação
Isomerização	Acetilação
Hidratação	Conjugação com aminoácidos, glutatona ou ácidos graxos

Entretanto, a ocorrência destas reações está diretamente relacionada com as características do fármaco (substrato) e as modificações necessárias para torná-lo mais polar. As reações de fase 1 e fase 2 podem ocorrer tanto sequencialmente como simultaneamente. No primeiro caso, a molécula sofre inicialmente uma reação de fase 1 seguida de uma reação de fase 2, e, no segundo caso, o composto pode sofrer tanto reações de fase 1 como também de fase 2 diretamente, de forma competitiva. Deve-se ressaltar também que a biotransformação de fármacos pelo organismo em muito se assemelha aos processos bioquímicos fisiológicos, que ocorrem a todo o momento e, em geral, mediados por enzimas. Tal similaridade entre os processos deve-se à semelhança existente entre o fármaco e compostos endógenos (Gibson e Skett, 2001).

As reações de oxidação são as que despertam maior interesse na pesquisa de produtos de biotransformação de fármacos, visto que a grande maioria destes possui grupos funcionais expostos e altamente susceptíveis a este tipo de reação. Os produtos destas reações podem também, em muitos casos, produzir metabólitos

tóxicos ou com maior atividade terapêutica, alterando assim os parâmetros de segurança e eficácia inicialmente previstos para um fármaco (Oesch, 2009). Estes fatos corroboram a necessidade de conhecimento das vias e produtos de metabolismo de cada nova molécula com potencial para atingir estágios de ensaio clínico (Bernadou e Meunier, 2004), o que é o caso da BDL.

Diante das necessidades citadas, várias metodologias experimentais têm sido empregadas na busca das respostas desejadas, com grande destaque para as técnicas *in vivo*, que utilizam animais (ensaios pré-clínicos) ou seres humanos (ensaios clínicos) (Blech et al., 2010), e *in vitro*, que podem ser realizadas tanto com enzimas naturais (microsomas hepáticas animais ou humanas) (Shu et al., 2010) ou por meio de catalisadores biomiméticos, como por exemplo as metaloporfirinas (Figura 7) (Chorghade et al., 1996; Bernadou e Meunier, 2004; Mansuy, 2007; Lohmann e Karst, 2008).

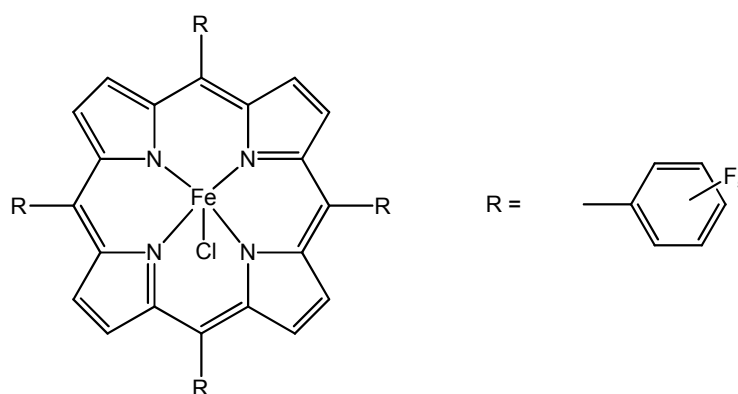


Figura 7. Estrutura central das metaloporfirinas.

Os métodos biomiméticos utilizando metaloporfirinas são inspirados na existência de grupos heme em sua estrutura (Gunter e Turner, 1991), similar ao observado nas enzimas produzidas por proteínas do tipo citocromo P450 (Nelson et al., 1996) que atuam como grupos prostéticos na catálise de reações de oxidação de fármacos em processos de biotransformação. Os avanços recentes em síntese química também favorecem o desenvolvimento de metaloporfirinas mais apropriadas para cada tipo de estudo, elevando assim a eficiência do sistema. Entretanto, a regioseletividade (Lupac, 1997) reduzida das metaloporfirinas configura um potencial revés na extrapolação dos resultados para comparação com técnicas *in vitro* que

utilizam enzimas naturais ou *in vivo*, visto que há a possibilidade de formação de produtos distintos entre elas conforme a posição da molécula onde ocorrerá a reação. Porém, ainda assim são capazes de direcionar a pesquisa sobre os principais possíveis metabólitos que podem ser encontrados para uma determinada substância (Akagah et al., 2008; MacLeod et al., 2008). Outra possibilidade viabilizada por essa estratégia é a síntese em grande escala de metabólitos de um candidato a fármaco para utilização em testes farmacológicos e toxicológicos (Akagah et al., 2008).

O estudo de metabolismo intestinal *in vitro* apresenta-se como um desafio, visto a dificuldade em correlacionar os resultados com as condições *in vivo* devido à quase impossibilidade em se obter o material fecal contendo a microbiota intestinal em condições anaeróbicas. A utilização de linhagens bacterianas isoladas também não apresentam resultados que possam ser extrapolados para o todo, pois a alta complexidade da microbiota intestinal com todas as interações simbióticas existentes provém a este meio reacional comportamento único, variando inclusive entre animais da mesma espécie criados simultaneamente sob o mesmo regime.

Desta forma, uma alternativa possível é a utilização da microbiota intestinal de porcos, que apresentam características tais como tamanho, tipo de dieta, volume e frequência de alimentação semelhantes aos humanos, o que torna-os os animais mais adequados a serem utilizados em modelos que simulem o metabolismo intestinal humano. Em relação à composição da microbiota de porcos quando comparada a de humanos, é possível verificar alguma similaridade considerando-se alguns gêneros, como por exemplo *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Clostridium*. Entretanto, em testes realizados com o objetivo de quantificar estes microorganismos, foi verificada variação estatística considerável mesmo entre os indivíduos da mesma espécie e obviamente maior ainda quando se comparando porcos e humanos. A única distinção confirmada entre as espécies é a presença em porcos e ausência em humanos de espécies do gênero *Lactobacillus*, o que pode ser explicado pela diferença de pH estomacal entre ambos (Van't Slot et al., 2012).

Outro fator de grande valia quando da utilização de porcos é a possibilidade de se utilizar o material fresco mantido em atmosfera anaeróbia desde o abate do

animal e durante todo o processo de preparo e incubação das amostras. Para tanto, utiliza-se a parte do intestino do animal denominada ceco, a qual pode ser obstruída em ambos orifícios por meio de ligadura antes da remoção cirúrgica do restante do intestino. Este modelo é portanto denominado “Modelo do Ceco de Porco” ou “*Pig Cecum Model*” (Van’t Slot et al., 2012).

2. OBJETIVOS

Isolar em grande quantidade a lactona sesquiterpênica budleína A utilizando como fonte a espécie vegetal *Viguiera robusta*.

Estudar os mecanismos de fragmentação da budleína A e da centraterina por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (IES-EM/EM).

Realizar os estudos de oxidação biomimética da budleína A e correlatos e determinar os possíveis produtos formados;

Realizar os ensaios de metabolização *in vitro* com microsomas hepáticas da budleína A e correlatos e determinar os possíveis produtos formados;

Realizar os ensaios de metabolização *in vitro* no modelo de ceco de porco (*pig cecum* model) da budleína A e correlatos e determinar os possíveis produtos formados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

Nos processos de extração, isolamento e análise foram utilizados os solventes: acetona comercial (CHEMCO), acetato de etila PA e hexano PA (QHEMIS), metanol e acetonitrila (J.T. BAKER), CDCl_3 (SIGMA-ALDRICH) e éter dietílico (VETEC). Para as técnicas cromatográficas (CLV e CCD) utilizou-se como fase estacionária a sílica gel 60H e sílica gel 60 GF₂₅₄ (MERCK) respectivamente. Nas reações oxidativas utilizou-se ácido m-cloroperbenzóico (mCPBA), iodossilbenzeno (PhIO) e a metaloporfirina cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina de ferro III (FeTFPP). Tampão fosfato (PBS – MERCK) foi utilizado no modelo de ceco de porco.

Para as análises das reações biomiméticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizadas as colunas (analítica e preparativa) marca Phenomenex (modelo Luna C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μm). Nas análises de cromatografia em fase gasosa foi utilizada a coluna capilar Phenomenex Zebron™ ZB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e hélio como gás de arraste. Nas análises de CLAE realizadas com as amostras do modelo de ceco de porco foram utilizadas as colunas Nucleodur C18 ISIS, 5 μm , 150 x 2 mm (Macherey-Nagel) (para análises de quantificação) e Gemini C18, 5 μm , 150 x 2 mm, 110 Å (Phenomenex) (para as análises acopladas em espectrometria de massas).

3.2. Coleta da espécie vegetal *Viguiera robusta*

Previamente à realização das coletas foi realizado o cadastro junto ao IBAMA-SISBIO (n° 26468-1) para obtenção de registro para coleta de material vegetal (Anexo 1) e também a solicitação de acesso ao patrimônio genético junto ao CNPq n° 010174/2011-7 (Anexo 2). O local da coleta situa-se no município de Altinópolis, rodovia Batatais-Altinópolis (SP-351 – Rodovia Altino Arantes) na altura do km 36, onde encontram-se algumas populações da espécie *V. robusta* distribuídas às margens da rodovia, ao longo de uma extensão de aproximadamente 1,5 km. Foram realizadas duas coletas nos meses de abril e maio de 2011, com intervalo de aproximadamente 25 dias, atentando-se para o fato de que este é o único período

do ano em que a espécie apresenta folhas em grande quantidade (Figura 8). Foram coletados aproximadamente 5,0 kg de material vegetal fresco (folhas, flores e caule) somando-se as duas etapas.



Figura 8. Coleta da espécie vegetal *Viguiera robusta*.

Após a coleta (Figura 8) o material vegetal foi trazido para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e imediatamente submetido ao processo de estabilização em estufa de ar circulante, mantida à temperatura constante de 30°C por aproximadamente 72 horas, realizando-se aleatoriamente a movimentação do material para que a secagem ocorresse de maneira uniforme. Após esse período o material foi retirado da estufa e preparado para a extração, que é feita somente utilizando-se as folhas. O restante do material (caules e flores) foi separado e descartado. Vale ressaltar que uma exsicata foi preparada com o material ainda fresco e foi posteriormente depositada no herbário da UNICAMP sob o código FBC # 94.

3.3. Extração da budleína A

Para a extração foi utilizada a técnica de lavagem foliar, pois sabe-se que a BDL é o componente majoritário das estruturas denominadas tricomas glandulares, que estão posicionados na superfície das folhas. Estas estruturas podem ser facilmente rompidas quando em contato com solventes de média polaridade, como acetona e diclorometano. Devido aos impactos ambientais causados por solventes clorados, optou-se por realizar a extração em acetona comercial.

As folhas devidamente secas e limpas após remoção de resíduos de terra foram colocadas em porções em um percolador contendo aproximadamente 5,0 litros de acetona, sendo mantidas em contato e agitação manual por aproximadamente 60 segundos. Em seguida o solvente foi esgotado do percolador através da válvula na base do recipiente e as folhas retiradas manualmente. Na sequência o mesmo solvente utilizado foi recolocado no percolador e repetiu-se o procedimento com uma nova porção de folhas e assim sucessivamente com todo o material.

Ao final desta etapa o extrato de lavagem foliar (ELF) obtido foi filtrado em papel filtro e levado ao rota-evaporador para remoção da acetona. Foram obtidos respectivamente 4,9 e 12,7 g de extrato seco para cada coleta.

3.4. Isolamento da budleína A

As porções de extrato seco obtidas foram submetidas ao processo de isolamento separadamente. Para tanto, o extrato foi ressuspenso em uma solução MeOH:H₂O (8:2) e em seguida particionado com hexano (3x) e diclorometano (3x) (Fluxograma 1). A fração diclorometano, após a evaporação do solvente foi incorporada em sílica gel 60 H e submetida à separação por CLV (Coll e Bowden, 1986; Pelletier, Chokshi e Desai, 1986). A eluição da CLV (Figura 9) foi realizada aumentando-se a polaridade da mistura eluente (Hex:AcOEt), conforme demonstrado no fluxograma 1.

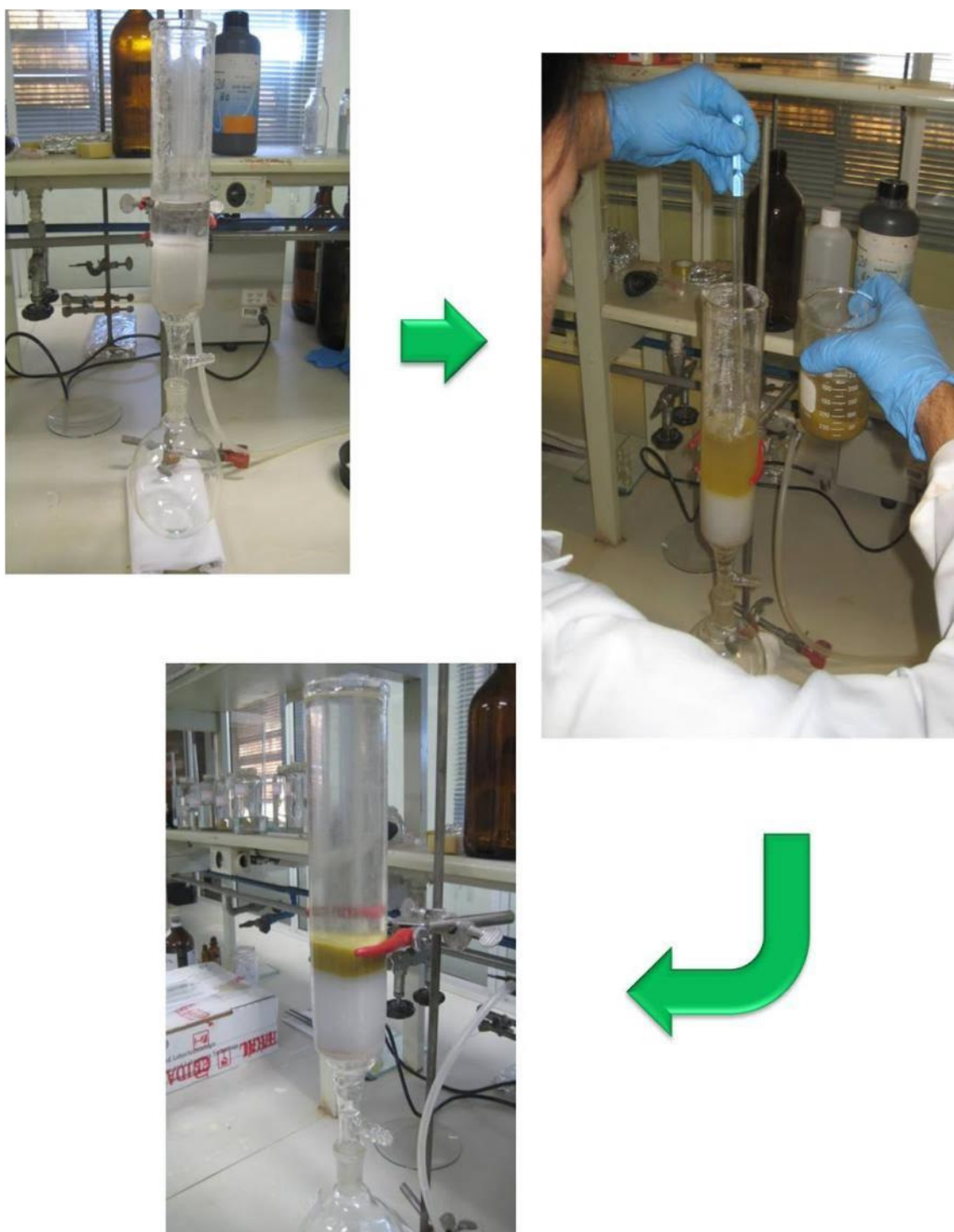
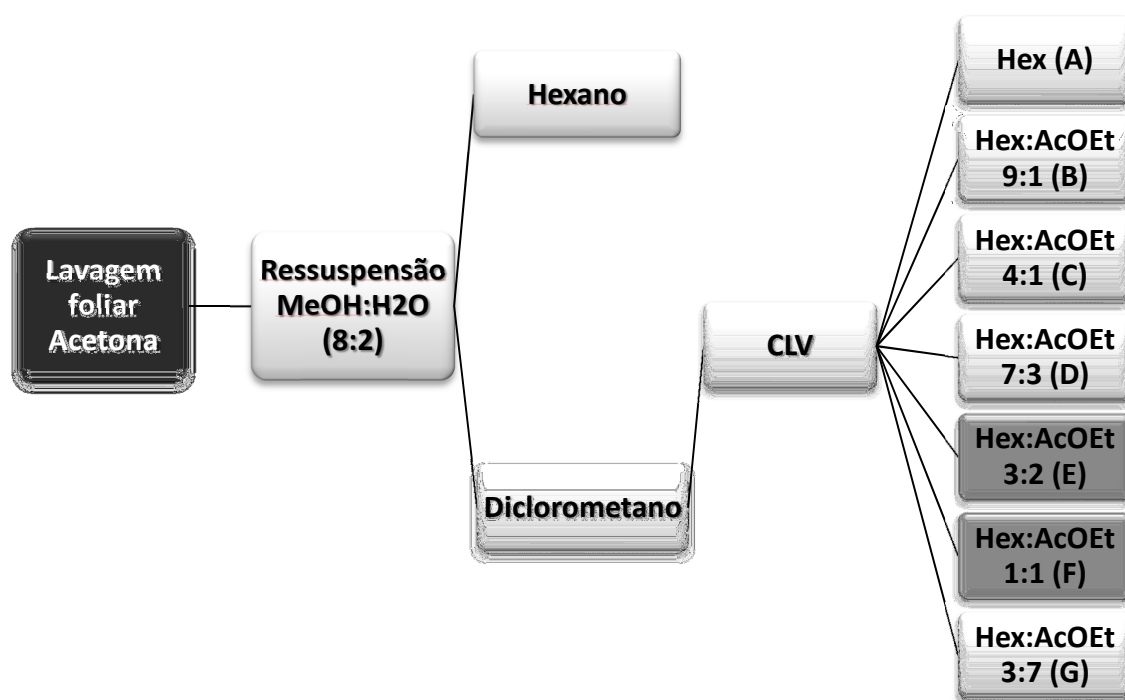


Figura 9. Isolamento da BDL por cromatografia líquida à vácuo.

Após a realização da CLV as porções com fases móveis de diferentes polaridades foram submetidas à secagem para completa evaporação dos solventes. Após esta etapa, as frações **E** e **F** (Fluxograma 1) apresentaram a maior massa de resíduo (análise visual) e também indícios da formação de cristais brancos, que

poderiam sugerir a presença de BDL, conforme indica o trabalho de Valério *et al.*, 2007. Logo, o trabalho de isolamento ficou restrito à estas frações.



Fluxograma 1. Processo extrativo utilizado para obtenção de BDL.

Após completamente secas, as frações E e F foram solubilizadas em MeOH, obtendo-se uma solução límpida e de cor amarelo-esverdeada. Em seguida os frascos foram devidamente acomodados em capela com exaustão até a completa volatilização do solvente. Este procedimento foi realizado à temperatura ambiente e sem nenhum tipo de auxílio que forçasse a secagem, para que a possível cristalização dos compostos presentes em solução pudesse ocorrer de forma lenta. Esta medida também evita a condensação de água na amostra, que pode ocorrer devido ao resfriamento do solvente caso seja utilizado um fluxo de ar na secagem.

Conforme o esperado, após a completa secagem do solvente foi possível observar a formação de cristais brancos no fundo do frasco, recobertos por uma camada de cor amarelo-esverdeada. Optou-se nesse momento por realizar a

lavagem destes sólidos com éter dietílico gelado (VETEC), no qual a solubilidade da BDL é baixa. Foram realizadas várias lavagens sucessivas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, sendo possível obter o produto final na forma de cristais brancos (Figura 10).



Figura 10. Material cristalizado obtido após CLV.

Entretanto, durante o procedimento de lavagem os cristais são fragmentados, e aqueles de menor tamanho, muitas vezes microscópicos, são levados em suspensão com o éter, forçando-nos a repetir o procedimento nos frascos subsequentes, entretanto a maior quantidade permanece no frasco inicial. Como resultado deste procedimento, após diversas lavagens e agrupamento dos resíduos de cristais brancos presentes nos demais frascos, foi possível obter aproximadamente 1,5 g (0,5 + 1,0) do material que supostamente seria BDL.

3.5. Identificação da budleína A

3.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A primeira iniciativa no sentido de identificar o composto isolado nas etapas anteriores, bem como verificar a sua pureza, foi a realização de cromatografia em camada delgada. Foram utilizadas placas cromatográficas analíticas preparadas no próprio laboratório com sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) e solventes grau PA destilados (hexano e acetato de etila). Para revelação da placa foi empregada luz ultra-violeta (UV) ou solução de vanilina:ácido sulfúrico em metanol seguida por aquecimento em chapa quente.

3.5.2. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas em um equipamento da marca Shimadzu modelo CG-2010, acoplado a um espectrômetro de massas do mesmo fabricante, modelo GCMS-QP2010. Foi utilizada coluna capilar, marca Phenomenex Zebron™ ZB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25µm). O método analítico utilizado encontra-se no Anexo 3. A amostra foi diluída em metanol na concentração aproximada de 1,0 mg.mL⁻¹.

3.5.3. Espectrometria de massas com ionização por electrospray (IES-EM)

Dando continuidade à identificação da composto isolado e considerando-se o forte indício observado pela análise de CG-EM de que trata-se da budleína A, foram realizados os testes de espectrometria de massas em meio líquido com ionização por eletrospray.

Foi utilizado nesse experimento um espectrômetro de massa marca Bruker Daltonics, modelo microTOFII – ESI-TOF, em modo positivo. A amostra foi inserida por infusão direta e utilizou-se como solvente a mistura MeOH:H₂O (1:1). Os parâmetros do equipamento foram: voltagem do capilar em 4kV, gás nebulizador N₂ à pressão de 0,4 bar e à temperatura de 180 °C. O gás de sacagem foi ajustado ao fluxo de 4,0 L.min⁻¹.

3.5.4. Ressonância magnética nuclear de próton (^1H RMN)

Os espectros de RMN foram adquiridos no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, utilizando-se um espectrômetro Bruker-Advance DRX 500. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Sigma-Aldrich[®]) e tubos de 175 x 5 mm Sigma-Aldrich[®].

3.6. Estudo das vias de fragmentação de furanoeliangolidos por IES-EM/EM

Neste estudo foram utilizadas as substâncias budleína A (obtida conforme descrito nas etapas anteriores) e centraterina (Sakamoto et al., 2003) (Figura 11), obtida junto ao banco de padrões do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS). As soluções contendo estas substâncias foram preparadas na concentração de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizando-se como solvente a mistura $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Estas soluções foram então diluídas até a concentração final de $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em MeOH contendo 1% de ácido fórmico.

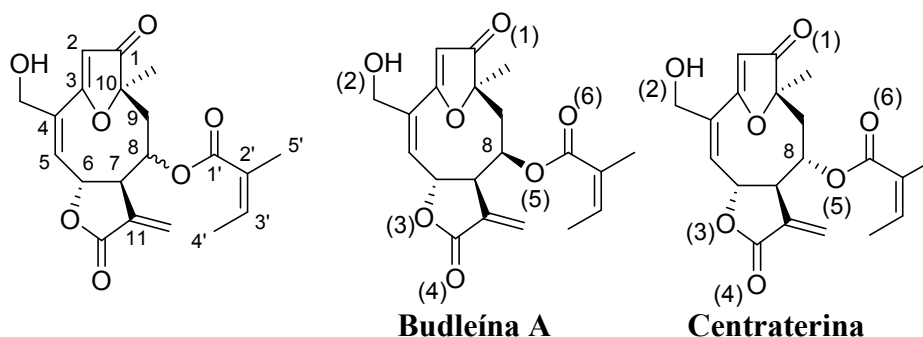


Figura 11. Estrutura química da BDL e centraterina. Entre parênteses a numeração adotada para os átomos de oxigênio.

3.6.1. Espectrômetros utilizados e condições experimentais

Para os estudos de espectrometria de massas e elucidação das vias de fragmentação da budleína A e centraterina foram utilizados quatro espectrômetros distintos, sendo eles: (A) Waters ACQUITY[®] TQD triplo quadrupolo (QqQ, CID, argônio); (B) AB Sciex API 4000 QTrap[®](QqQ, CID, N_2); (C) Bruker Daltonics micrOTOF[™]-Q II (QTOF, CID, N_2); e (D) Thermo Scientific Linear Ion Trap Orbitrap

(LTQ Orbitrap XL) – FTMS (Espectrometria de Massas por Transformada de Fourier) (Orbitrap-HCD, hélio). As informações entre parênteses descrevem respectivamente o tipo de analisador, tipo de ativação (CID ou Dissociação Induzida por Colisão de Alta Energia – HCD) e gás de colisão empregado.

As condições experimentais utilizadas para cada espectrômetro foram: (a) voltagem da fonte de 3.5 kV, temperatura da fonte em 150 °C e temperatura de dessolvatação de 350 °C; (b) voltagem da fonte de 4.2 kV, temperatura da fonte de 350 °C; (c) voltagem do capilar de 3.5 kV, temperatura da fonte e de dessolvatação de 180 °C; (d) voltagem da fonte em 3.5 kV e temperatura do capilar em 275 °C.

Foram construídos gráficos de energia resolvida com os resultados obtidos no espectrômetro (d) variando-se a energia entre 0 e 35 eV com incrementos de 5 eV.

Visando a obtenção de dados acurados, foi realizada a calibração externa do espectrômetro (c) utilizando-se o padrão de $[TFA+Na]^+$, enquanto que para o espectrômetro (d) foi utilizada a solução padrão marca Thermo Scientific denominada *LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution*, que consiste numa mistura de N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) e Ultramark 1621. Todas as análises foram realizadas em modo positivo.

3.6.2. Métodos computacionais

Estudos computacionais para a obtenção dos possíveis sítios de protonação da BDL e da centraterina foram conduzidos sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Vesecchi (FFCLRP-USP), nos quais foram obtidas as energias relativas para as possíveis formas protonadas, a fim de se interpretar os resultados obtidos pelas análises IES-EM/EM nos diferentes equipamentos.

Inicialmente, realizou-se uma busca conformacional no programa Chem3D e as estruturas com menor energia tiveram suas geometrias, energias relativa e vias de fragmentação obtidas empregando o modelo computacional B3LYP/6-31G(d)(Dewar et al., 1985; Lee, Yang e Parr, 1988; Becke, 1993) utilizando o programa Gaussian 03 (Frisch, 2006) . Estudos prévios com lactonas e outros produtos naturais por espectrometria de massas em combinação com a química

computacional tem demonstrado que tal modelo é o mais indicado para a avaliação da reatividade e vias de fragmentação desses compostos (Vessecchi e Galembeck, 2008; Vessecchi et al., 2008).

3.7. Ensaios de oxidação biomimética

As reações de oxidação foram realizadas utilizando-se a metaloporfirina FeTFPP (Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina de ferro III) (Figura 12a) como catalisador na concentração de $3,0 \times 10^{-8}$ M. Foram testados como oxidantes o iodosilbenzeno (PhIO) e o ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*CPBA) (Figura 12b) nas concentrações descritas na Tabela 2. Para todas as reações empregou-se acetonitrila como solvente do meio reacional no volume final de 1,5 mL.

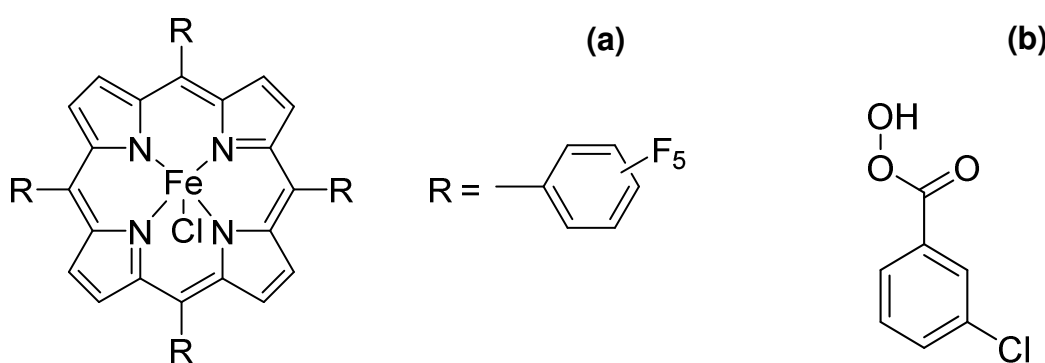


Figura 12. (a) FeTFPP e (b) *m*CPBA.

Para a definição do comportamento das reações realizou-se um estudo de otimização variando-se as proporções de catalisador:substrato:oxidante (Tabela 2) e verificou-se via CG-MS a formação de possíveis produtos de reação e seus respectivos rendimentos. O sistema R3 foi selecionado como o mais adequado para a realização do experimento.

Tabela 2. Otimização do sistema reacional biomimético da BDL (volume de reação de 1,5 mL em acetonitrila, número de mols de FeTFPP = 3×10^{-8} , tempo de reação de 24 horas e temperatura ambiente).

	ID	SISTEMA	PROPORÇÃO
mCPBA	R1	FeTFPP:BDL:mCPBA	1:40:30
	R2	FeTFPP:BDL:mCPBA	1:40:40
	R3	FeTFPP:BDL:mCPBA	1:40:60

	R4	FeTFPP:BDL:mCPBA	1:40:200
PhIO	R5	FeTFPP:BDL:PhIO	1:40:30
	R6	FeTFPP:BDL:PhIO	1:40:40
	R7	FeTFPP:BDL:PhIO	1:40:60
	R8	FeTFPP:BDL:PhIO	1:40:200
	R9	FeTFPP + mCPBA	1:40
BRANCOS	R10	FeTFPP + PhIO	1:40
	R11	FeTFPP + BDL_sem oxidante	1:40
	R12	BDL + mCPBA_sem FeTFPP	1:40
	R13	BDL + PhIO_sem FeTFPP	1:40

3.7.1. Isolamento dos produtos de oxidação biomimética

Utilizou-se a técnica de cromatografia em camada delgada preparativa em modo normal, ou seja, utilizando-se sílica gel como fase estacionária e solventes com característica apolares (HEX e acetato de etila) como fase móvel. Foram utilizadas placas com dimensões de 20 x 20 cm e luz ultravioleta (UV em 254 nm) como revelador. As amostras foram diluídas em acetato de etila e aplicadas com o auxílio de capilar de vidro. Utilizou-se como fase móvel a mistura de solventes hexano (HEX):acetato de etila (AcOEt) (7:3) em cuba de vidro com tampa e previamente saturada. A eluição completa da(s) placa(s) cromatográfica(s) (15 cm) ocorreu em aproximadamente 50 minutos, sendo imediatamente removida(s) da cuba de eluição (Figura 13). As bandas separadas foram raspadas, coletadas, extraídas com AcOEt e filtradas à vácuo em funil de Buchner com placa porosa. O filtrado, agora contendo o composto presente na cromatoplaça, foi levado à evaporação do solvente para posterior análises de identificação.

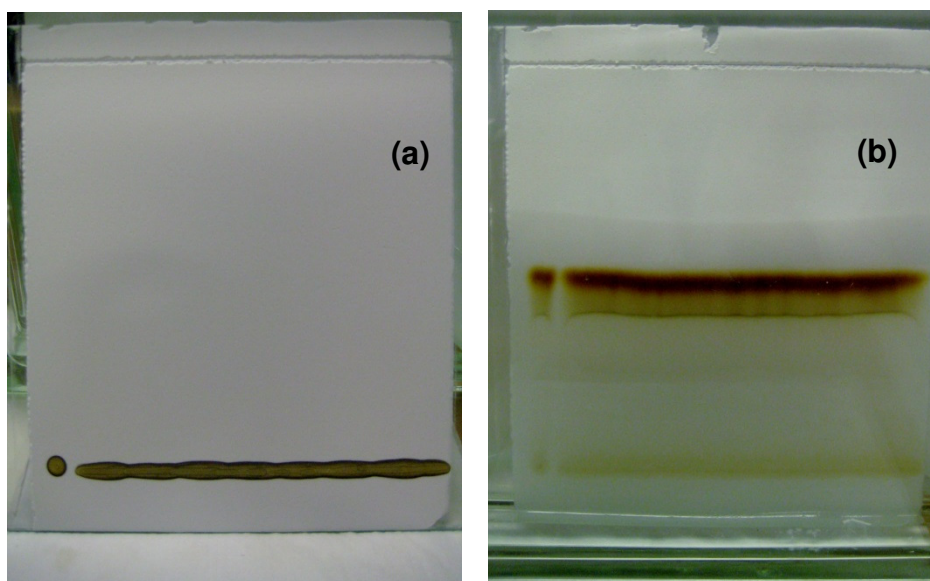


Figura 13. Placa de CCD preparativa utilizada no isolamento dos produtos de reação biomimética. (a) Amostra aplicada na placa e (b) após eluição.

3.7.2. Identificação dos produtos de reação biomimética

Foram empregadas na identificação dos produtos de reação biomimética da BDL as técnicas IES-EM (infusão direta), CLAE-IES-EM e $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3). A calibração do espectrômetro de massas marca Bruker Daltonics modelo microTOFII – ESI-TOF foi realizada utilizando-se $[\text{TFA}+\text{Na}]^+$ para a obtenção de massas acuradas (Vessecchi et al., 2011). Foi utilizado como solvente na técnica de EM a mistura MeOH:Água (1:1). para todas as amostras. Os parâmetros do equipamento aplicados na análise de CLAE-IES-EM foram: voltagem do capilar em 4kV, gás nebulizador N_2 à pressão de 4,5 bar e à temperatura de 220 °C. O gás de sacagem foi ajustado ao fluxo de $7,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Foi verificado na análise de RMN que a amostra ainda possuía algumas impurezas, provenientes dos reagentes empregados na reação. Portanto, realizou-se a purificação desta amostra utilizando-se para este fim um HPLC Shimadzu e um kit de colunas cromatográficas (analítica e preparativa) marca Phenomenex (modelo Luna C-18 de dimensões 250 x 4,6 mm, 5 μm e 250 x 20 mm, 5 μm respectivamente). Utilizou-se como fase móvel MeOH:água (1:1) em fluxos de 1,0 e

9,0 mL.min⁻¹, respectivamente para a coluna analítica (desenvolvimento do método analítico) e preparativa (isolamento).

3.8. Ensaio de metabolização *in vitro* com microsomas hepáticos

Os ensaios de metabolização com microsomas hepáticos foram realizados no Instituto de Química de Alimentos (Institut für Lebensmittelchemie) da Universidade de Münster, Alemanha, seguindo protocolo descrito na literatura (Sohl, Cheng e Guengerich, 2009) com algumas modificações. Foram empregados microsomas de porco e rato obtidos conforme descrito na literatura (Omura e Sato, 1964).

Foram utilizadas as seguintes soluções: (A) glicose-6-fosfato (0,1 M em água), (B) glicose-6-fosfato desidrogenase 10³ IU mL⁻¹ (1 mg.mL⁻¹ em tampão Tris-acetato (pH7,4) contendo 1 mM EDTA e 20% glicerol (v/v)), (C) NADP⁺ (10 mg.mL⁻¹ em água), (D) fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e dibásico (K₂HPO₄) 0.1 M (pH 7,4, 2,59 g de KH₂PO₄ e 14,1 g de K₂HPO₄ em 1000 mL de água purificada) e soluções estoque de LST a 5 mM. O sistema regenerador NADPH foi preparado no momento do uso seguindo as seguintes proporções: 50 (A):25 (C):1 (B). As soluções tampão (D) (320 µL), sistema regenerador NADPH (recém preparado, 100 µL) e estoque de LST (5 µL) foram adicionadas em vial de 5 mL com tampa e pré-incubadas em plataforma aquecida à 37°C por 3 minutos. A suspensão contendo os microsomas foi incubada em paralelo sob as mesmas condições, sendo em seguida adicionada (75 µL) ao vial contendo as demais soluções. O tempo de incubação à partir deste momento foi de 30 minutos e em seguida adicionou-se diclorometano (CH₂Cl₂) para precipitar as proteínas e encerrar as reações. Levou-se a mistura ao vortex por 10 segundos e em seguida, após a separação de fases, coletou-se a fração orgânica com o auxílio de uma micropipeta. A fração coletada foi submetida ao fluxo de N₂ para remoção do solvente orgânico. O resíduo seco foi posteriormente dissolvido em mistura de MeOH:Água (1:1) e analisado por CLAE-IES-EM/EM.

Nas análises de identificação dos produtos de metabolismo utilizou-se um CLAE (Accela 1250, Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas (EM) marca Thermo Scientific modelo LTQ Orbitrap XL. Foi utilizada coluna

cromatográfica de fase reversa Gemini C18, 5 μm , 150 x 2 mm, 110 Å (Phenomenex) e fluxo de 0,25 mL.min⁻¹. Utilizou-se fase móvel composta por água (A):metanol (B) (ambos contendo ácido fórmico na concentração de 0.1%) e o seguinte gradiente de eluição: 0 – 2 min (10% B), 2 – 12 min (10 \rightarrow 100 % B), 12 – 14 min (100 % B), 14 – 17 min (100 \rightarrow 10% B), sempre mantendo um tempo de equilíbrio de 3 minutos entre as análises.

3.9. Ensaio de metabolização *in vitro* pelo modelo de ceco de porco (pig cecum model)

Estes experimentos foram realizados no Instituto de Química de Alimentos (Institut für Lebensmittelchemie) da Universidade de Münster, Alemanha. Foram analisadas a BDL e a substância correlata 4 β ,5-dihidro-2',3'-epoxi-15-desoxigoyazensolido (EPOXI) (Figura 14).

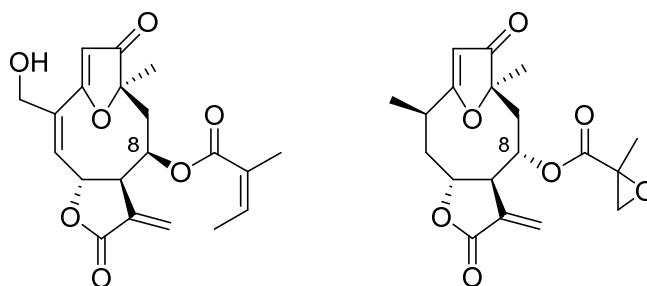


Figura 14. Estrutura química das LST testadas no modelo de ceco de porco.

3.9.1. Animais utilizados e coleta do ceco de porco

Os animais utilizados (tipo German Landrace ou Angler Sattel x Pietrain, 10-12 meses, 120-150 kg) foram criados sob o modelo de fazenda biodinâmica, não havendo adição de antibióticos na dieta dos mesmos. A fim de garantir que o material fecal permanecesse em condições anaeróbicas, após o abate do animal, realizou-se a ligadura dos orifícios de entrada e saída do ceco antes de sua completa remoção. Para o transporte do material até o laboratório utilizou-se uma jarra hermeticamente lacrada contendo Anaerocult A[®] (Merck).

3.9.2. Preparação do inóculo

Todos os procedimentos de preparação do inóculo foram realizados no interior de uma câmara hermeticamente lacrada saturada com CO₂ (Figura 15). Todos os frascos e soluções utilizados foram previamente purgados com uma mistura de N₂ e CO₂ (5:1, v/v). Para a remoção do material fecal do interior do ceco realizou-se uma incisão com o auxílio de um bisturi e em seguida o material foi coletado em um béquer de 500 mL. O conteúdo obtido foi fracionado em porções de 20 g (± 1.0 g) em tubos tipo BD Falcon™ (n=6). Metade destes tubos (n=3) foi então submetida a autoclavagem (121 °C por 15 min a 1.1 bar utilizando uma autoclave AMB240, Astell, Kent, U.K.) para esterilização e posterior utilização como grupo controle negativo (inativado). Para a preparação do inóculo adicionou-se 20 mL de solução tampão fosfato (PBS) 0,15 M pH 6,4 contendo uma solução de elementos traço na concentração final de 0,0125% (13.2 g CaCl₂ x 2 H₂O, 10.0 g MnCl₂ x 4 H₂O, 1.0 g CoCl₂ x 6 H₂O e 8.0 g FeCl₃ x 6 H₂O, todos eles dissolvidos em 100 mL de água deionizada autoclavada). A suspensão obtida foi então filtrada para remoção de grandes partículas sólidas.

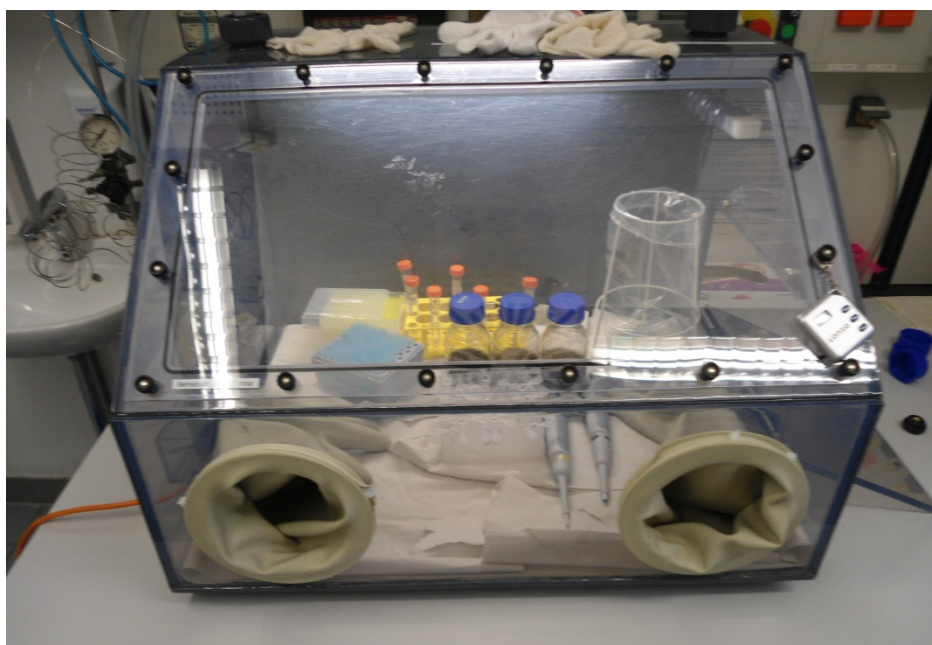


Figura 15. Câmara hermeticamente lacrada utilizada nos procedimentos do modelo de ceco de porco. Foto: Lucas R. Sartori

3.9.3. Incubação das amostras – curvas de degradação

Em tubos do tipo Eppendorf® com capacidade de 2 mL adicionou-se 100 µL da solução teste (contendo a lactona sesquiterpênica) a 1,0 mM em metanol e 900 µL do inóculo. As amostras foram preparadas sempre em duplicata e incubadas nos tempos de 20, 40, 60, 120, 240 e 480 minutos a 37 °C sob agitação. Utilizou-se como controle negativo o inóculo desativado (autoclavado) e como controle positivo utilizou-se solução de quercetina 1,0 mM incubado com inóculo ativo (não autoclavado). Foram utilizados nestes experimentos 4 cecos provenientes de animais distintos de modo a considerar as possíveis diferenças entre a microbiota dos animais.

3.9.4. Inativação do inóculo, preparo da amostra e análise cromatográfica

Após atingir o tempo de incubação determinado as amostras foram imediatamente armazenadas em freezer à temperatura de -80 °C, paralisando assim as possíveis reações em andamento. Para o preparo das amostras, procedeu-se o descongelamento do material em banho-maria a 37 °C e adicionou-se imediatamente 1,0 mL de solução de ácido clorídrico em metanol (1% v/v). Os frascos foram então submetidos ao banho de ultrassom por 15 minutos e logo em seguida centrifugados a 20 °C e 12000 r.p.m. por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma micropipeta e submetido as análises cromatográficas pertinentes. Para as análises de quantificação utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) marca Jasco XLC™ equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), coluna cromatográfica de fase reversa Nucleodur C18 ISIS, 5 µm, 150 x 2 mm (Macherey-Nagel) e fluxo de 0,4 mL.min⁻¹. Para a realização dos cálculos de concentração utilizou-se os valores de absorvância obtidos no comprimento de onda de 254 nm. Foram obtidas curvas de calibração na faixa entre 10 e 200 µM para a budleína A (r=0,9998) (Figura 16) e EPOXI (r=0,9999) (Figura 17).

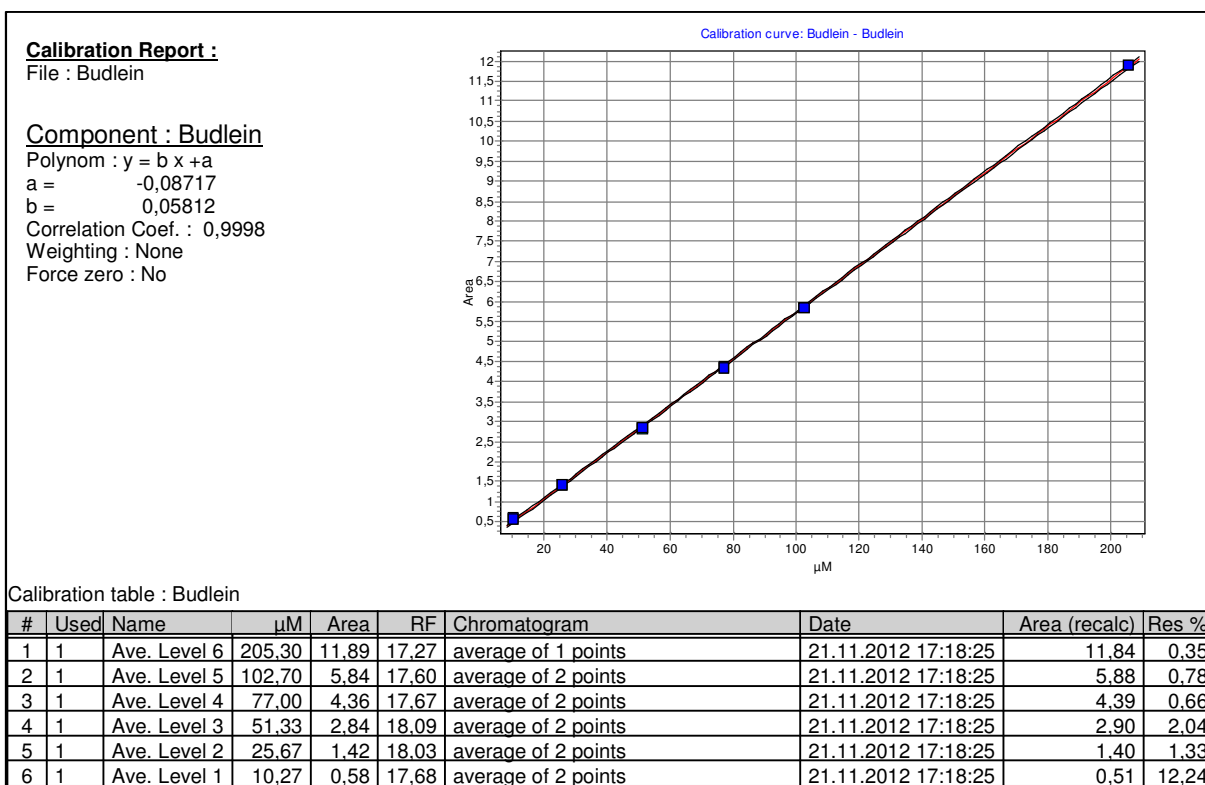


Figura 16. Curva de calibração obtida para a BDL por CLAE-UV.

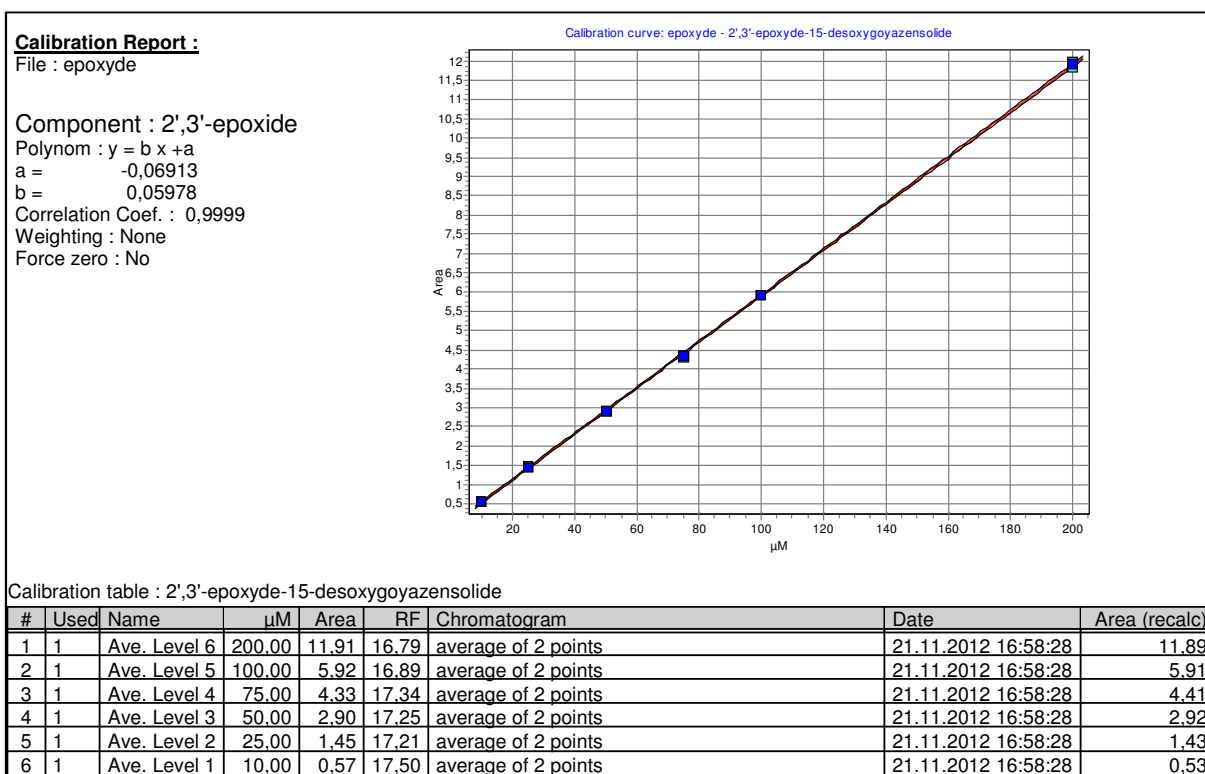


Figura 17. Curva de calibração obtida para a EPOXI por CLAE-UV.

Nas análises de identificação dos produtos de metabolismo utilizou-se um CLAE (Accela 1250, Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas (EM) marca Thermo Scientific modelo LTQ Orbitrap XL. Foi utilizada coluna cromatográfica de fase reversa Gemini C18, 5 μm , 150 x 2 mm, 110 Å (Phenomenex) e fluxo de 0,25 mL.min⁻¹. Em ambos os equipamentos utilizou-se fase móvel composta por água (A):metanol (B) (ambos contendo ácido fórmico na concentração de 0.1%) e o seguinte gradiente de eluição: 0 – 2 min (10% B), 2 – 12 min (10 \rightarrow 100 % B), 12 – 14 min (100 % B), 14 – 17 min (100 \rightarrow 10% B), sempre mantendo um tempo de equilíbrio de 3 minutos entre as análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação da budleína A

Visando identificar quimicamente os cristais que foram isolados na etapa anterior, foram realizados testes cromatográficos, espectrofotométricos, espectrométricos e espectroscópicos. Dentre eles: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), espectrometria de massas com ionização por electrospray em modo negativo e positivo (IES-EM/EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN).

4.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

O resultado desta análise na identificação do composto foi em parte prejudicado pela ausência de um padrão de comparação, pois não dispunhamos do mesmo. Entretanto, foi útil no sentido de agruparmos os resíduos dos frascos utilizados na lavagem do material, conforme pode ser observado na Figura 18. Apesar do baixo valor de R_f obtido, foi observado perfil semelhante para todos os frascos. Pôde-se observar também que as manchas estão bastante intensas, o que é devido à alta concentração da amostra. Optou-se por fazer desta forma, no intuito de observarmos possíveis impurezas presentes em baixa concentração na amostra, o que não foi verificado de forma expressiva em ambas as revelações. Apenas manchas de pouca intensidade foram observadas para possíveis impurezas. Sendo assim, partiu-se para a análise de CG-EM.

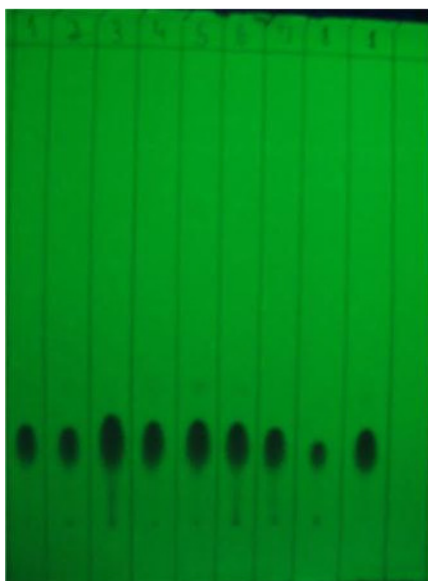


Figura 18. Placa de CCD utilizada no agrupamento de frações contendo BDL.

4.1.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

O cromatograma obtido apresentou como sinal majoritário em 23,1 min a m/z de 374, ou seja, compatível com a m/z da BDL (Figura 19).

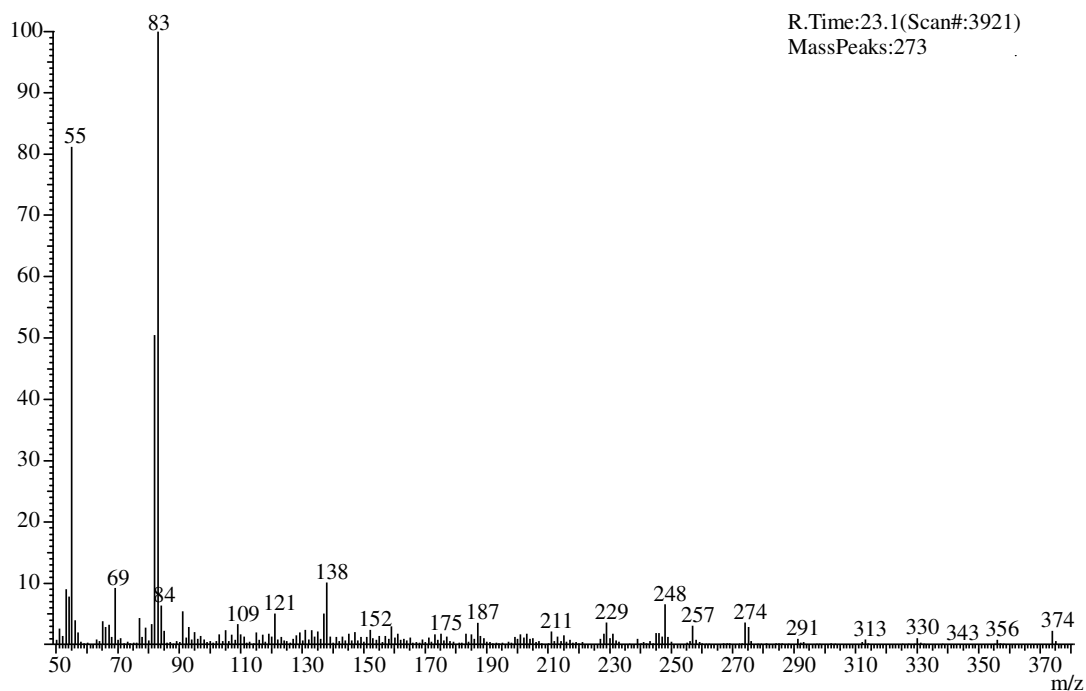


Figura 19. Espectro de CG-EM obtido para a BDL.

A pureza do material, considerando-se a somatória das áreas dos sinais integrados no cromatograma equivale a aproximadamente 97 % (Tabela 3) do total para o sinal em 23,1 min. Vale ressaltar que os parâmetros utilizados para detecção e integração dos sinais foram mantidos nos valores mais permissivos possíveis, ou seja, só não foram detectados os sinais que realmente não foram diferenciados do ruído.

Tabela 3. Resultado obtido por CG-EM para o material isolado por CLV.

Tempo de retenção (TR)	Área	Área%
19,950	264058	0,24
21,692	688171	0,63
22,709	1707498	1,56
23,161	106844594	97,3
23,393	298897	0,27

Em relação ao espectro de massas referente ao sinal em 23,1 min (Figura 19), apresentou $M^{+\bullet}$ de m/z 374 e pico base de m/z 83, o que é compatível com a descrição da literatura para a budleína A, que também destaca a presença dos fragmentos de m/z 274 (eliminação do éster da cadeia lateral, $M^{+\bullet}-100$) e de m/z 55 (De Vivar et al., 1976). Os demais sinais observados no cromatograma apresentaram espectros de massas com relativa semelhança àquele em 23,1 min, principalmente com a presença dos íons de m/z 83 (pico base) e 55, porém em nenhum dos casos foi observado $M^{+\bullet}$ próximo a 374. Esses dados podem sugerir que as impurezas presentes possuem estrutura molecular semelhante à budleína A, havendo apenas pequenas variações nas cadeias laterais, que podem ser do tipo tiglato, angelato ou metacrilato (Da Costa et al., 2001). Há também de se considerar que a co-existência de outras lactonas sesquiterpênicas de estrutura similar à budleína A é perfeitamente aceitável, pois considerando-se que as rotas biosintéticas estão em fases distintas na formação das lactonas sesquiterpênicas, ou seja, no momento em que a planta foi estabilizada existiam no tricoma glandular vários precursores das moléculas mais complexas.

Em síntese, os dados obtidos por CG-EM apontaram uma grande possibilidade de se confirmar o produto isolado como sendo o composto budleína A com elevado grau de pureza, considerando-se tratar de um produto natural, e que é compatível com o valor encontrado na literatura (Nicolete et al., 2009).

4.1.3. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (IES-EM)

No estudo realizado em modo positivo foi possível verificar a presença da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 375,1436, que é coerente com a massa molecular da budleína A protonada (Figura 20). No espectro de EM obtido é possível observar também alguns fragmentos característicos da BDL gerados por dissociação induzida por colisão na fonte de ionização.

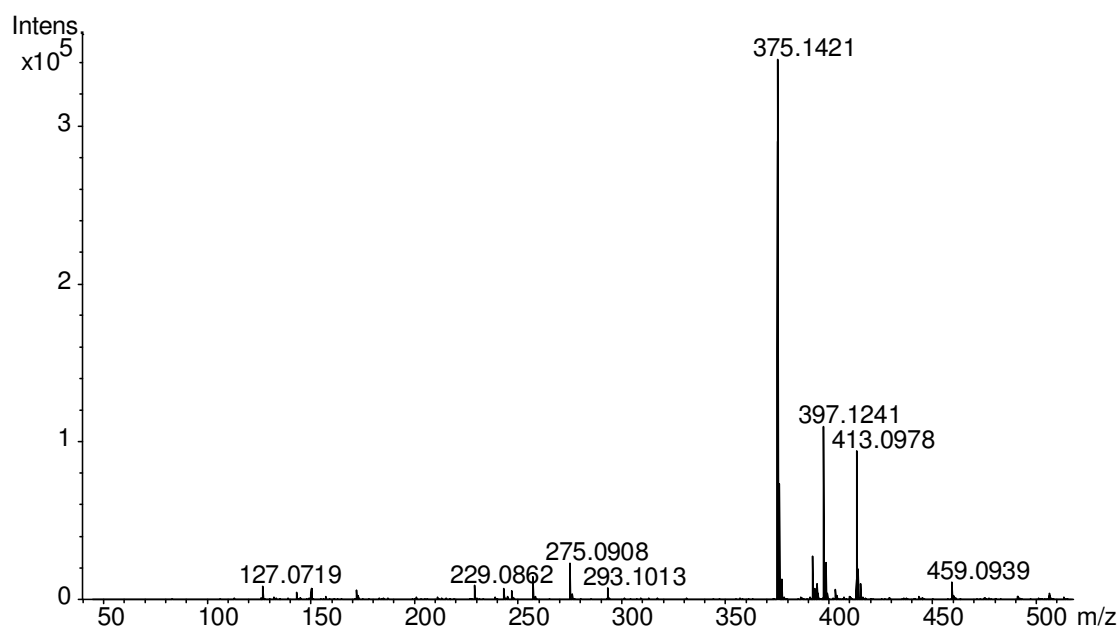


Figura 20. Espectro IES-EM da BDL.

Finalizadas as análises de CCD, CG-EM e IES-EM pôde-se sugerir que a substância em análise é realmente a budleína A com pureza elevada. A confirmação desta conclusão veio à seguir com a análise de ressonância magnética nuclear (^1H RMN).

4.1.4. Ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN)

Os dados obtidos (Tabela 4) foram comparados com a literatura (Romodevivar et al., 1976; Van Calsteren et al., 2008), sendo confirmada a fórmula e estrutura química do composto isolado como sendo budleína A.

Tabela 4. Dados de ^1H -RMN obtidos para a BDL em 500 MHz e CDCl_3 .

Próton	Dados experimentais		Van Calsteren, 2008	
	Deslocamento (δ ppm)	Constante de acoplamento (Hz)	Deslocamento (δ ppm)	Constante de acoplamento (Hz)
H ₂	5,69 (s)		5,68 (s)	
H ₅	6,22 (m)		6,22 (dt)	$^3J_{5,6} = 4,2$
H ₆	5,38 (t)	$^3J_{6,7} = 4,15$	5,38 (m)	$^3J_{6,7} = 4,4$
H ₇	3,76 (dd)	$^3J_{7,8} = 2,08$	3,76 (m)	$^3J_{7,8} = 2,2$
H ₈	5,26 (m)	$^3J_{8,9\alpha} = 3,5$	5,27 (m)	$^3J_{8,9\alpha} = 3,5$
H _{9\alpha}	2,33 (dd)	$^2J_{9\alpha,9\beta} = 15,31$	2,32 (dd)	$^2J_{9\alpha,9\beta} = 15,2$
H _{9\beta}	2,55 (dd)	$^3J_{8,9\beta} = 5,45$	2,55 (dd)	$^3J_{8,9\beta} = 5,6$
H _{13a}	6,37 (d)		6,37 (d)	$^2J_{13a,13b} < 1$
H _{13b}	5,71 (d)		5,71 (d)	$^4J_{7,13b} = 2,4$
H ₁₄ (3H)	1,50 (s)		1,50 (s)	
H ₁₅ (2H)	4,41 (sl)		4,41 (t)	$^5J_{6,15} = 1,9$
H _{3'}	6,12 (qd)	$^3J_{3',4'} = 7,22$	6,12 (qq)	$^3J_{3',4'} = 7,3$
H _{4'} (3H)	1,94 (dd)	$^5J_{4',5'} = 1,30$	1,94 (dq)	$^5J_{4',5'} = 1,5$
H _{5'} (3H)	1,80 (m)		1,80 (quinteto)	$^4J_{3',5'} = 1,5$

4.2. Estudo das vias de fragmentação de furanoeliangolidos por IES-EM/EM

Na fragmentação de LST em analisadores do tipo triplo-quadrupolares foi observada uma diferença na intensidade dos íons fragmento da BDL e da centraterina (Crotti, Lopes e Lopes, 2005), entretanto neste trabalho não foram abordados os aspectos intrínsecos responsáveis por esta variação.

No decorrer do desenvolvimento dos trabalhos desta tese diferentes espectrômetros foram utilizados nas análises da BDL. A análise conjunta tornou evidente que os diferentes equipamentos, dotados de analisadores distintos, forneciam espectros ligeiramente distintos para a mesma substância. Este fato,

associado aos dados documentados por Crotti et al. (2005), motivaram a busca por detalhamentos que fundamentassem o fenômeno observado na fragmentação destes furanoelíngolidos em diferentes espectrometros de massas.

Para tanto, foi realizado um estudo no qual verificaram-se as vias de fragmentação da BDL e de seu isômero centraterina (Figura 11), as quais diferem apenas na orientação da cadeia lateral (angelato) no C-8, sendo esta α na centraterina e β na BDL. A comparação dos resultados adquiridos em equipamentos que possuem analisadores baseados em princípios distintos de detecção e fragmentação, associados àqueles obtidos por métodos computacionais, forneceram resultados conclusivos que permitem distinguir estes isômeros utilizando apenas dados provenientes da EM.

4.2.1. Resultados obtidos por IES-EM/EM

Os resultados da análise seqüencial por espectrometria de massas obtidos em analisadores triplo-quadrupolares (QqQ) (A e B) foram compatíveis entre si e também com os resultados anteriormente publicados por Crotti et al. (2005) em relação a intensidade dos sinais observados para ambos os isômeros (Figura 21A e 21B). Porém um fato novo foi observado, pois foi possível detectar um íon-fragmento de m/z 293 para a BDL, o qual não havia sido relatado anteriormente. Em suma, os resultados obtidos por QqQ em 15 eV (Ar) foram:

- BDL: presença do íon de m/z 293, sinal muito intenso para o íon de m/z 83 e sinal pouco intenso para o íon de m/z 375 $[M+H]^+$;
- Centraterina: ausência do íon m/z 293, sinal com intensidades similares para os íons de m/z 83 e m/z 375 $[M+H]^+$.

Vale ressaltar que os espectrômetros utilizados nestes experimentos, embora utilizando gases de colisão distintos, forneceram resultados semelhantes, o que permite concluir que a quantidade de energia transferida não é o fator de influência determinante no balanço das reações de fragmentação destes isômeros.

Nos espectros obtidos no espectrômetro do tipo QTOF (C) observou-se de forma pronunciada a presença do íon fragmento de m/z 293,1028 ($C_{15}H_{17}O_6^+$) para a BDL, enquanto que para a centraterina este não foi detectado (Figura 21C e 21D).

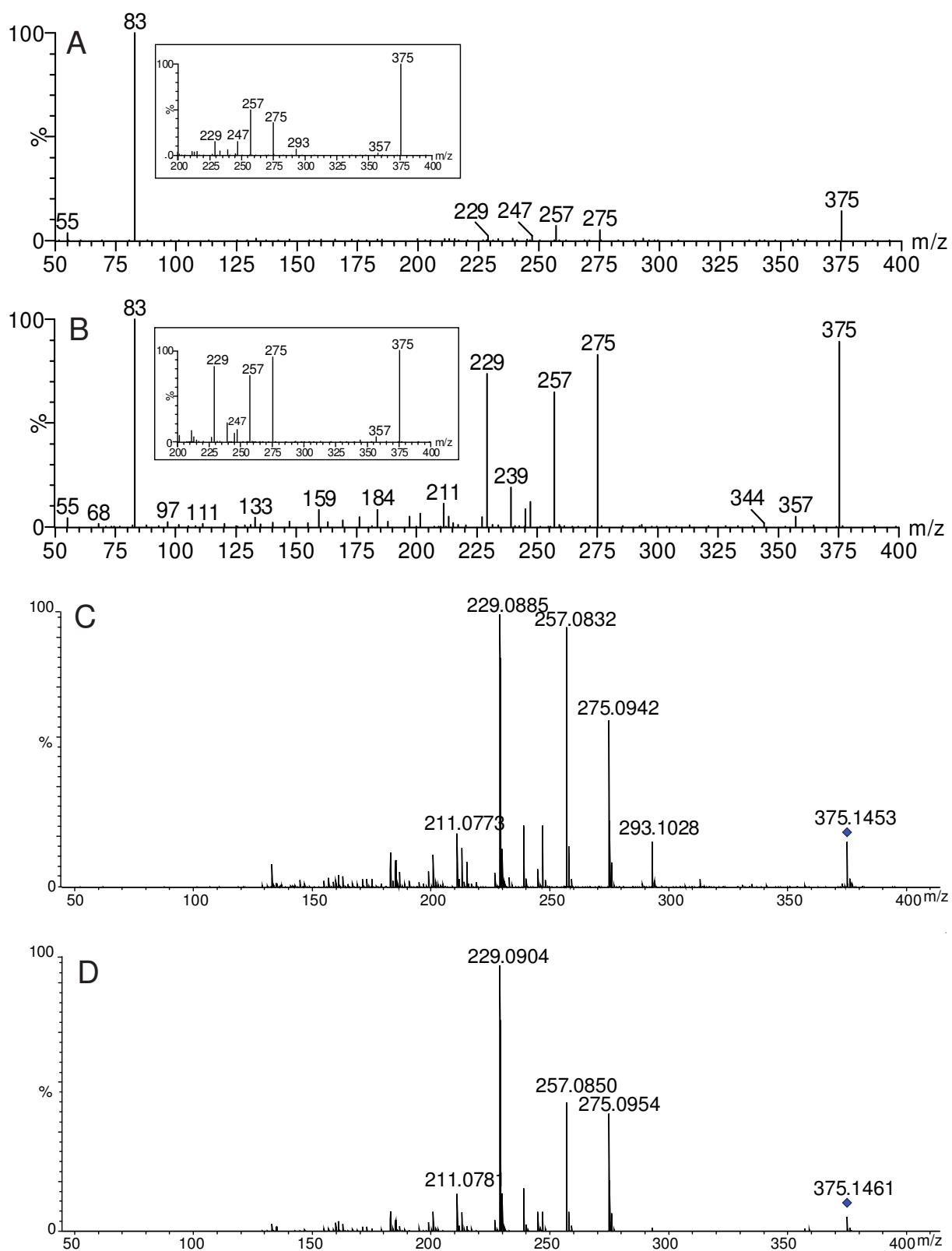


Figura 21. Espectros EM/EM da BDL (A:QqQ; C:QTOF) e centraterrina (B:QqQ; D:QTOF). A Elab empregada foi de 10 eV em QqQ e 15 eV em QTOF. Os gases de colisão foram Ar em QqQ e N₂ em QTOF respectivamente.

Nas análises realizadas no espectrômetro do tipo Orbitrap-HCD a diferença mais significativa entre os isômeros foi a presença do íon fragmento de m/z 83,0487 nos espectros da BDL (Figura 22A), mesmo empregando-se energia de colisão muito baixa, e cuja intensidade de sinal é incrementada com o aumento da energia de colisão, como observado na Figura 22C. Por outro lado, o espectro de EM/EM da centraterina não apresentou o íon fragmento de m/z 83,0487 em nenhuma das energias de colisão empregadas (figuras 22B e 22D).

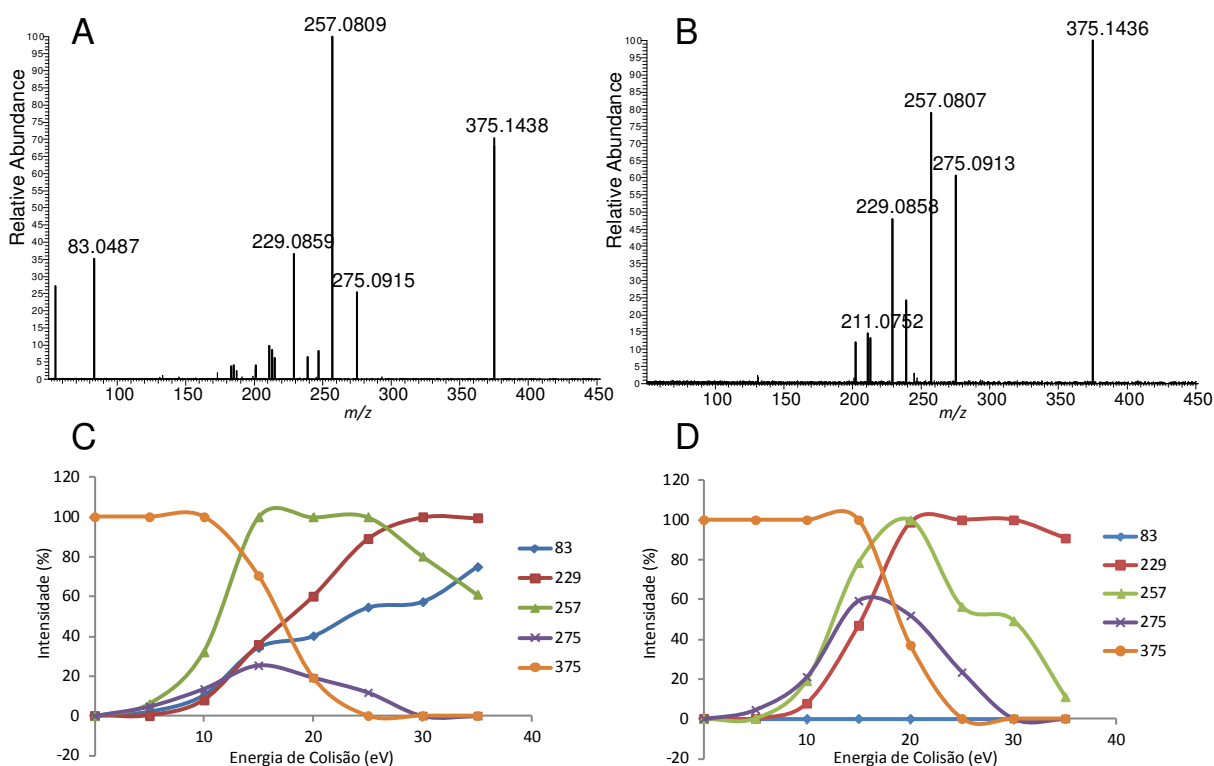


Figura 22. Perfil de fragmentação da BDL (A) e da centraterina (B) obtidos no Orbitrap XL a 15 eV no modo HCD. (C) e (D) apresentam as intensidades dos íons em função da variação de energia colisional para a BDL e a centraterina respectivamente.

Frente aos resultados obtidos duas questões surgiram: (a) Os sítios de protonação da BDL e da centraterina influenciam no perfil da fragmentação? (b) A estereoquímica é a responsável por governar as vias de fragmentação e o balanço das intensidades dos íons? Para responder tais questões, a termoquímica computacional foi empregada no presente estudo, possibilitando calcular com precisão elevada a reatividade das substâncias em questão.

4.2.2. Sítios de protonação e reatividade em fase gasosa

Os valores de basicidade em fase gasosa (GB) calculados utilizando-se o modelo B3LYP/6-31G(d) sugeriram que os sítios de maior basicidade, em ordem decrescente, foram: O1>O4>O6 (BDL) e O4>O1>O6 (centraterina) (verificar Figura 11). A Figura 23 apresenta os valores obtidos, podendo-se observar que para a centraterina estes valores são bastante próximos entre si e também compatíveis com os valores experimentais registrados na base de dados do NIST webbook para a butirolactona (193,1 kcal.mol⁻¹) e metil-metacrilato (191,4 kcal.mol⁻¹). Portanto, considerando-se que a probabilidade em se ocorrer a protonação em um determinado sítio é diretamente proporcional ao seu valor de GB, pode-se afirmar que a BDL apresenta uma maior tendência de protonação no O1, seguida por O4, enquanto que para a centraterina a tendência é de homogeneidade na distribuição das probabilidades de protonação em cada sítio. Estas diferenças de GB, proporcionadas pelas particularidades estéricas de cada isômero, são portanto suficientes para gerar estruturas com reatividades distintas, o que por sua vez influencia de forma determinante nas vias de fragmentação por IES-EM/EM.

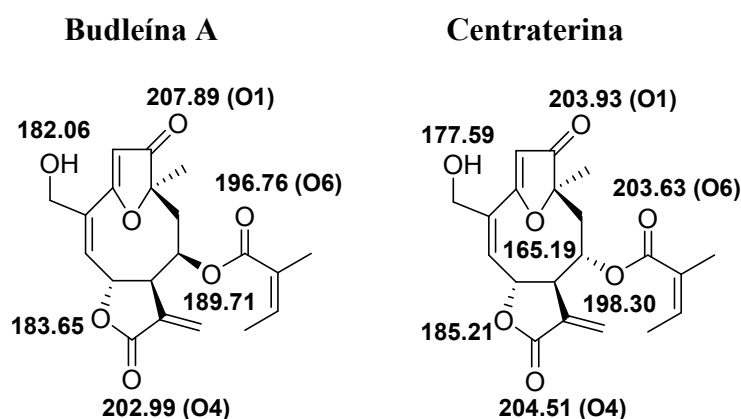


Figura 23. Valores calculados de basicidade em fase gasosa para os átomos de oxigênio da BDL e centraterina utilizando-se a base B3LYP/6-31G(d).

Considerando-se a geometria das estruturas foi possível verificar a distância entre os sítios de protonação, o que revelou a possibilidade de interação entre O1 e O6 na BDL por meio do compartilhamento do próton devido à proximidade da ordem de 1,7 Å entre O1-[H]⁺--O6. Esta possibilidade, entretanto, não foi observada para a centraterina. Tal modelo tem sido utilizado na literatura para explicar a migração

(transferência) do próton entre diferentes sítios de protonação, em uma mesma molécula (Maclennan, Sutherland e Orlova, 2007).

4.2.3. Vias de fragmentação

Dentre os íons observados nos espectros de IES-EM/EM da BDL e da centraterina protonadas, especial atenção deve ser voltada para os de m/z 293, 275, 257, 247, 229 e 83, além da intensidade das molécula protonadas (m/z 375 $[M+H]^+$).

O íon de m/z 293 foi observado apenas para a BDL e em todos os espectrômetros testados, como descrito na seção 4.2.1. A justificativa plausível para a formação deste íon fragmento está relacionada com a interação do próton com os sítios O1 e O6 descrita, a qual proporcionaria a eliminação de parte da cadeia lateral como um fragmento neutro, por meio de um rearranjo sigmatrópico através da formação de um anel de seis membros (Sykes, 1985), envolvendo os átomos O5-C1'-C2'-C3'-C4'-H (Figura 24).

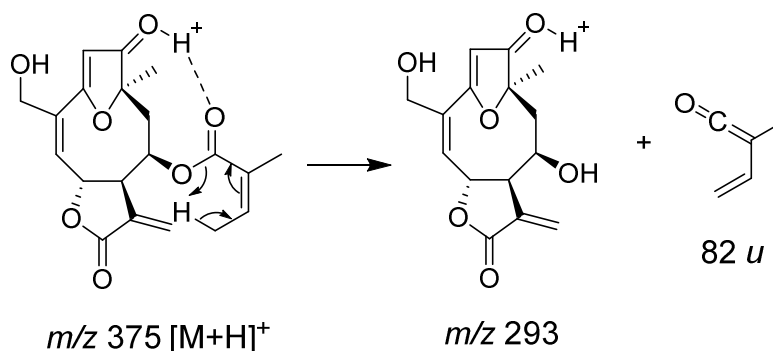


Figura 24. Mecanismo de reação sugerido para a formação do íon fragmento de m/z 293.

Em relação ao íon fragmento de m/z 275, observado tanto para a BDL quanto para a centraterina, este é formado pela eliminação de 100 u, que pode ser atribuída à cadeia lateral como fragmento neutro. O mecanismo desta reação envolve os hidrogênios ligados ao C9, os quais apresentam caráter ácido aumentado após a protonação adjacente em O1, favorecendo desta forma a migração 1,2-H (Figura 25) (Bouchoux, 2013). No caso da BDL o íon m/z 275 pode também ser gerado por meio da desidratação do íon m/z 293.

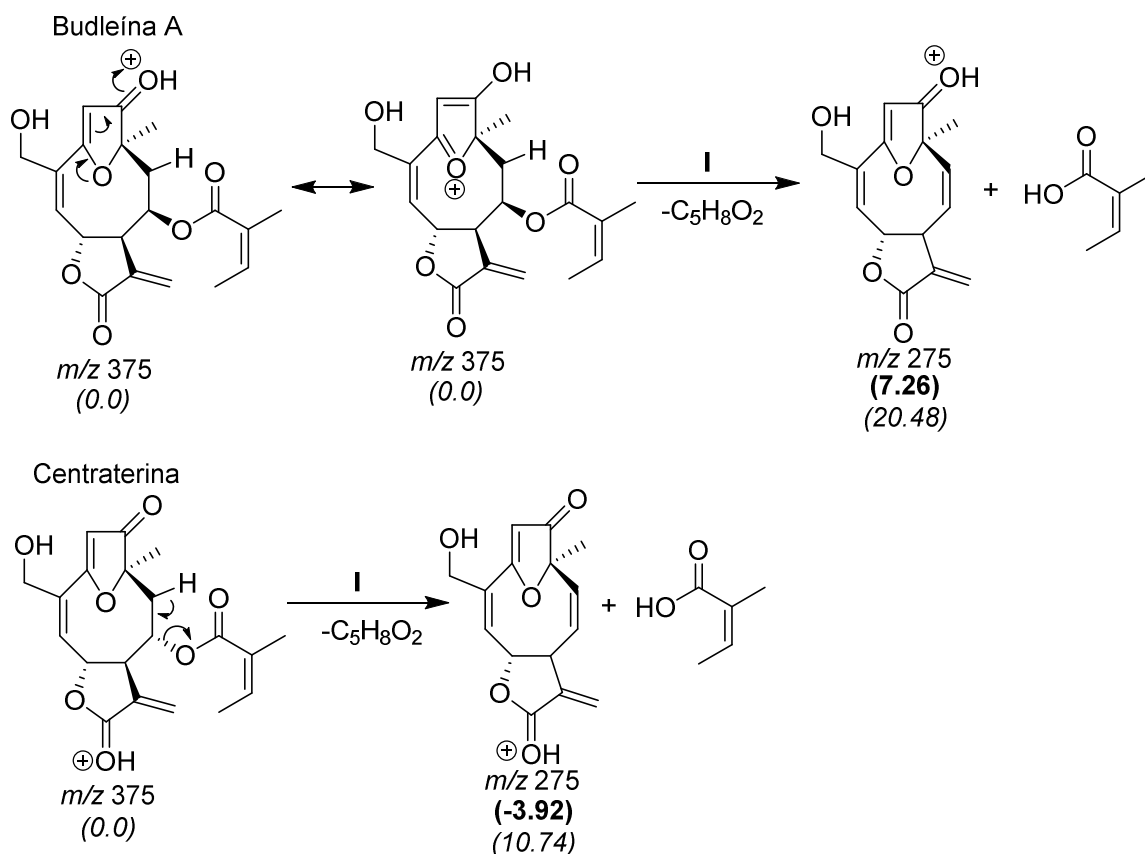


Figura 25. Mecanismo de reação proposto para a formação do íon fragmento de *m/z* 275 à partir da BDL e da centraterina por IES-EM/EM. Os valores em *itálico* indicam a entalpia relativa a 298 K obtida por B3LYP/6-31G(d). Em **negrito** são apresentadas as energias relativas de Gibbs.

A formação dos íons fragmento de *m/z* 257, 247 e 229 em ambas substâncias são devidas à eliminação consecutiva de H₂O e CO à partir do íon de *m/z* 275, sendo estas reações características quando da protonação no anel lactônico (Bouchoux et al., 1997; Crotti et al., 2004).

O íon fragmento de *m/z* 83 pode ser gerado por meio da protonação direta em O6 ou pela protonação em O1, a qual pode proporcionar o compartilhamento do próton com O6, conforme descrito anteriormente. Independente da origem do próton, este pode migrar e resultar na formação de um íon acílio, neste caso com *m/z* 83. Estes mecanismos justificam a maior intensidade relativa deste íon na fragmentação da BDL em comparação com a centraterina, pois ela é favorecida principalmente pela sinergia dos dois mecanismos na BDL (protonação em O1 e O6), enquanto que na centraterina ela é viável apenas quando a protonação ocorre diretamente em O6 (Figura 26). Um esquema geral, para a interpretação dos principais íons fragmentos

formados durante as análises de espectrometria de massas da BDL e centraterina é apresentado na Figura 26, sendo de extrema importância para usuários de EM.

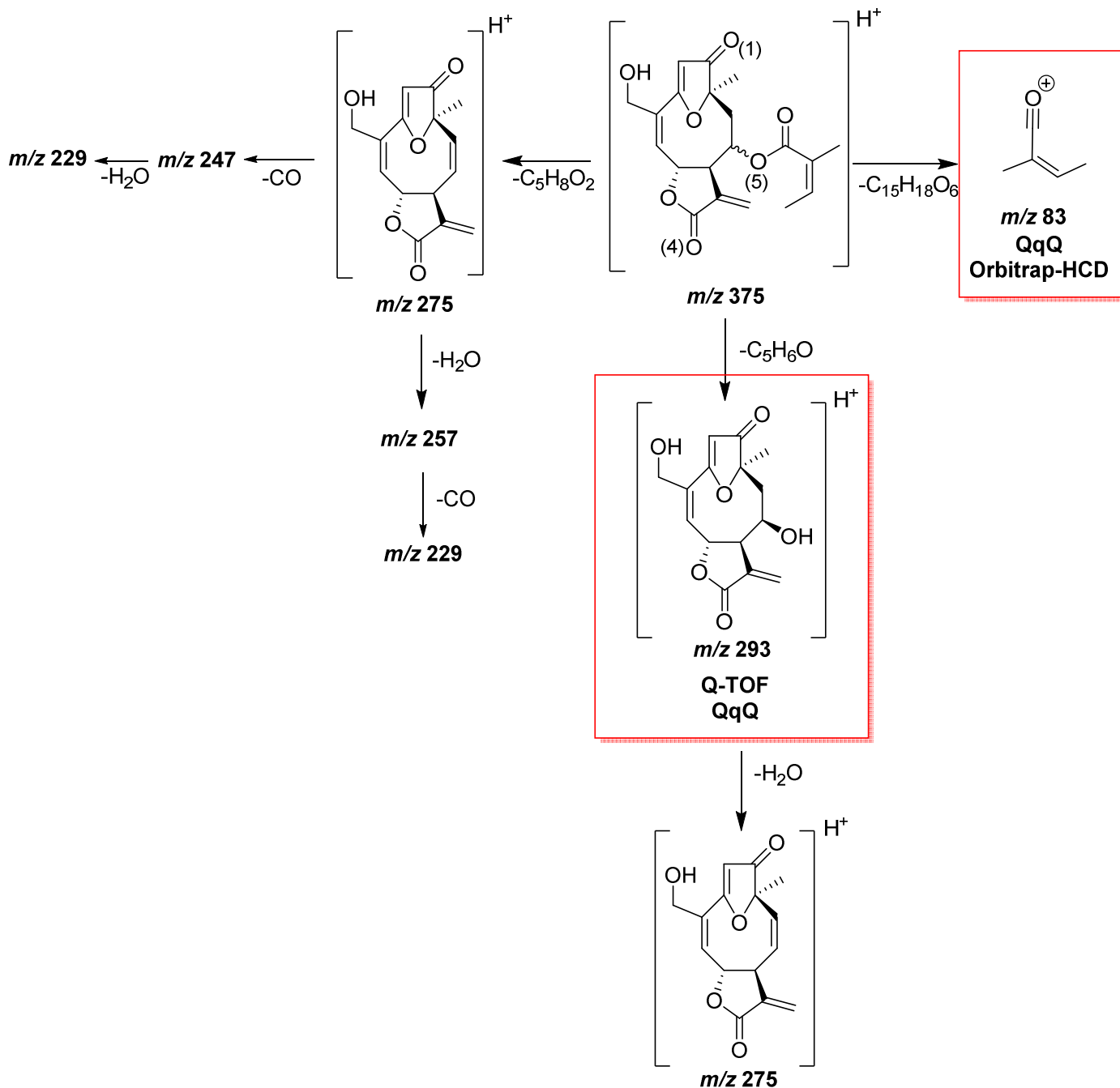


Figura 26. Vias de fragmentação em IES-EM/EM para a BDL e centraterina. Os íons destacados em caixas são observados nos espectrômetros descritos e podem ser utilizados como diagnósticos entre os isômeros.

4.3. Ensaios de oxidação biomimética

Dentre os sistemas testados o R3 (Tabela 2) apresentou-se como o mais promissor, uma vez que pôde-se observar o consumo do material de partida (BDL) e a presença de pelo menos dois novos sinais importantes no cromatograma, que indicariam a formação de produtos, embora não tenha sido possível identificá-los por CG-EM. Deve-se ressaltar que a sugestão de formação de produtos é embasada na comparação com os sistemas R9-R13, nos quais não foram observados os sinais para os possíveis produtos.

Optou-se assim por repetir a reação R3 monitorando-a nos intervalos de 1, 3, 5, 7 e 24 h de reação via CG-EM. Observou-se neste experimento que a formação dos possíveis produtos sofreu variações significativas até a sétima hora de reação, permanecendo praticamente estável até a finalização da reação (24h). A Figura 27 apresenta os resultados obtidos.

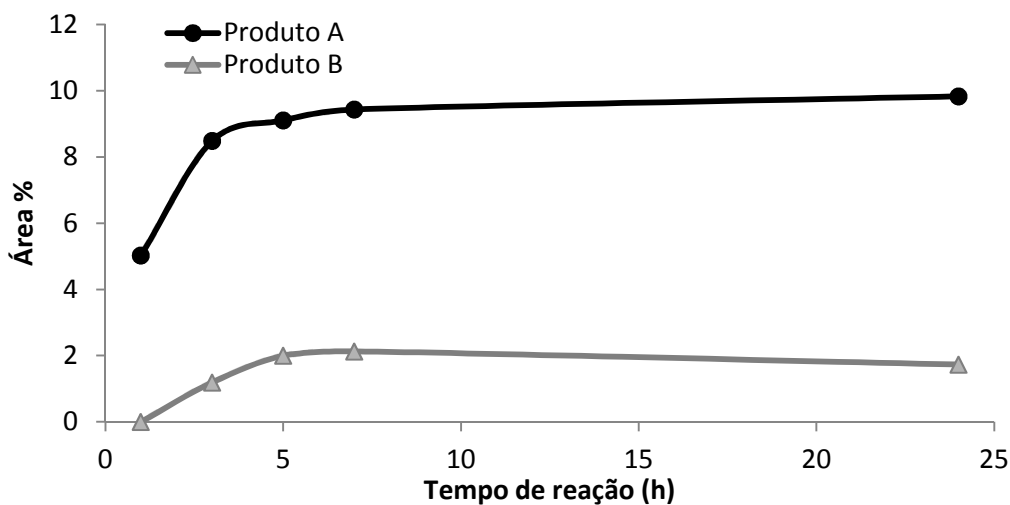


Figura 27. Avaliação do perfil cinético da reação de oxidação da BDL utilizando-se *m*CPBA e FeTFPP.

Uma alternativa para obter um maior rendimento seria o aumento na concentração de reagentes oxidante e catalisador, conforme R4, por exemplo. Entretanto, este recurso foi descartado, pois neste caso a concentração de substrato torna-se muito baixa em relação aos demais reagentes, o que praticamente inviabiliza o isolamento e identificação dos possíveis produtos de reação. Pôde-se concluir neste caso que apesar de se utilizar a condição reacional otimizada o rendimento da reação é baixo.

Em posse destes dados foi possível ampliar a escala da reação de tal modo a possibilitar, embora com grau de dificuldade elevado, o isolamento e identificação dos possíveis produtos de reação formados. Utilizou-se neste procedimento uma quantidade aproximada de 100 mg (aproximadamente 10 mg por frasco) de BDL sob as mesmas condições do sistema R3 por um período de 7 horas, sob agitação magnética e protegido da luz. Após este período procedeu-se a remoção do solvente do meio reacional por evaporação em atmosfera de nitrogênio.

4.3.1. Isolamento dos produtos de oxidação biomimética

Após a secagem, em uma câmara reveladora e com o auxílio de luz UV foi possível visualizar quatro manchas de Rf distintos (Figura 28), que foram designadas respectivamente, em ordem crescente de valor, como Rf1, Rf2, Rf3 e Rf4. Realizou-se em paralelo uma TLC analítica com a amostra de reação e o padrão de BDL, no intuito de verificar a presença de material de partida, bem como o seu valor de Rf. Constatou-se deste modo que o Rf2 é devido à presença de BDL não consumida durante a reação, fato confirmado pela análise de CG-EM (m/z 374).

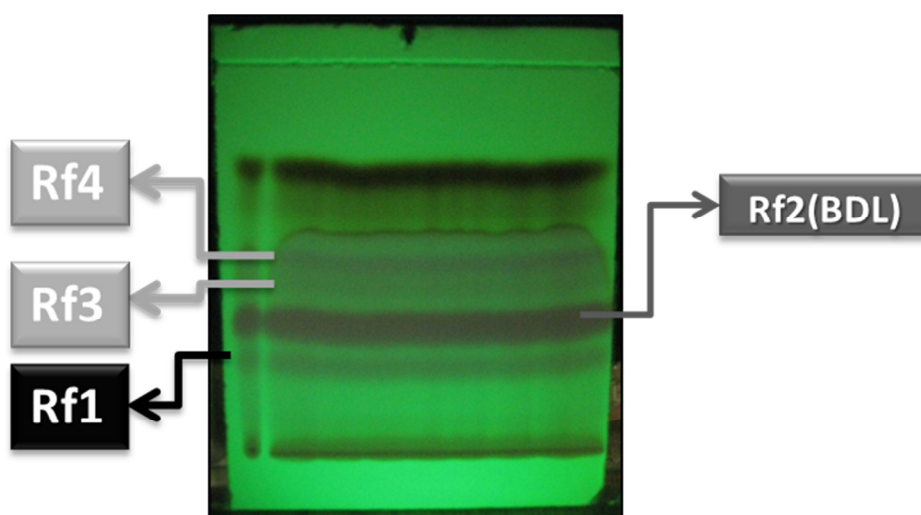


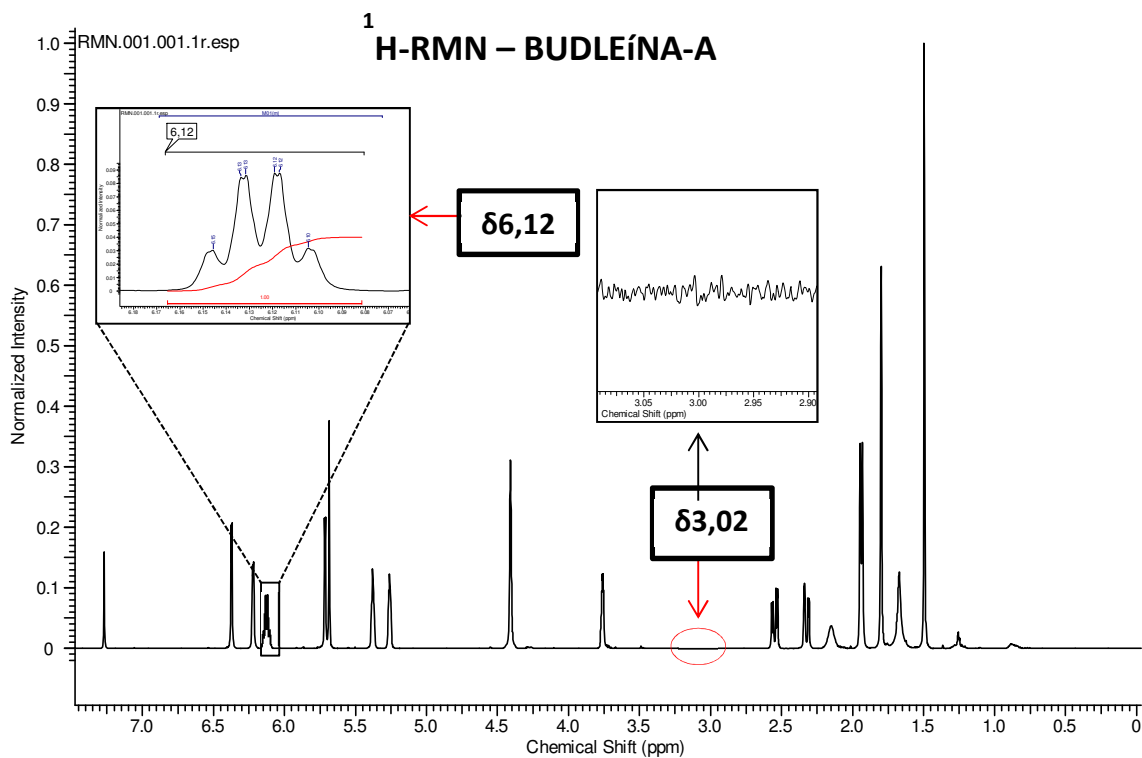
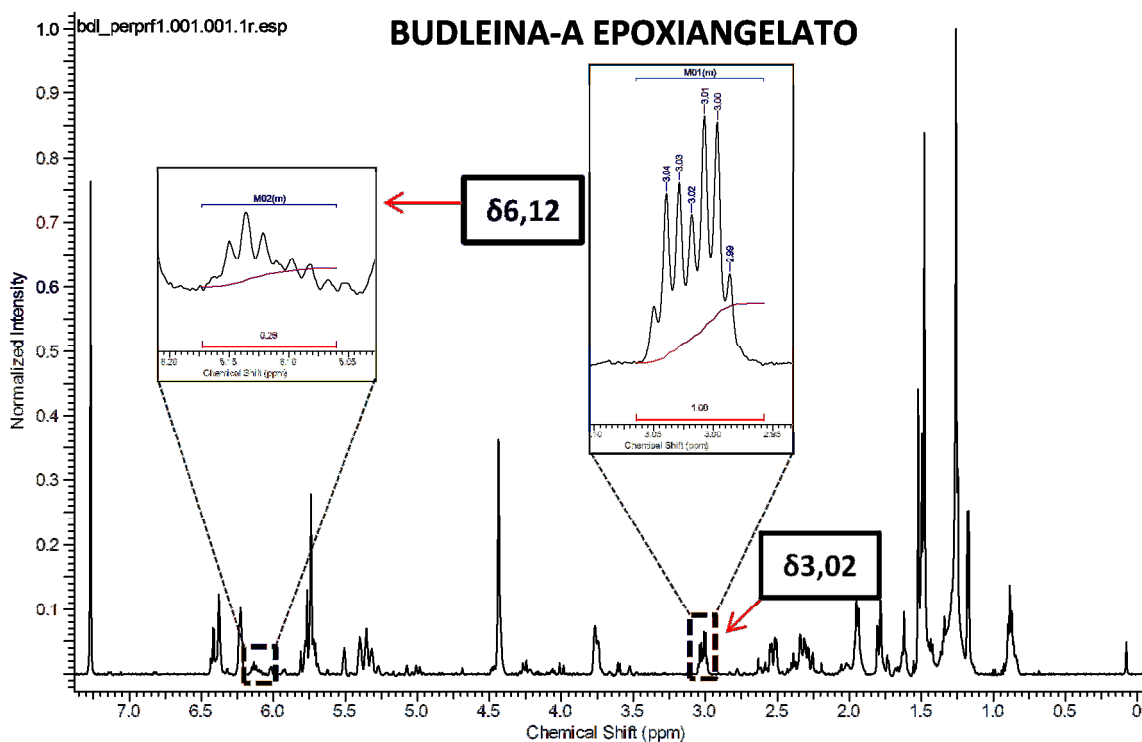
Figura 28. Placa de CCD preparativa utilizada no isolamento dos produtos de reação biomimética, exposta à luz UV.

4.3.2. Identificação dos produtos de reação biomimética

Utilizando-se a técnica de IES-EM (infusão direta) foram analisadas as amostras referentes ao Rf1, Rf3 e Rf4. Após esta análise constatou-se que apenas a amostra Rf1 apresentava características semelhantes à BDL, como a presença do íon-fragmento de m/z 275,09 gerado por fragmentação na fonte, o que indicaria se tratar de um produto da mesma. As demais amostras (Rf3 e Rf4) não forneceram informações suficientes que justificassem o aprofundamento dos estudos sobre elas. Sugere-se que tais compostos sejam derivados da decomposição da FeTFPP e/ou do mCPBA.

Apresentando-se a amostra Rf1 como promissora na busca por produtos de reação da BDL, esta foi submetida à análise de $^1\text{H-NMR}$ em CDCl_3 .

O espectro obtido nesta análise demonstrou que apesar do processo de isolamento ter sido cuidadosamente conduzido e aparentemente bem sucedido, a amostra Rf1 ainda apresentou-se como uma mistura. Entretanto, mesmo nessas condições, foi possível verificar uma grande semelhança com os deslocamentos químicos da BDL. Uma diferença significativa foi a presença de um sinal com deslocamento (δ) de 3,02 ppm (1H) e a drástica redução do sinal em δ 6,12, relativo ao H-3' (Figuras 29 e 30). Este comportamento indica, conforme a literatura (Torres-Valencia et al., 1998; Torres-Valencia, Cerda-Garcia-Rojas e Joseph-Nathan, 1999), a presença de um epoxiangelato na cadeia lateral.

Figura 29. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) obtido para a BDL em CDCl_3 .Figura 30. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) obtido para o produto de oxidação da BDL em CDCl_3 .

Para a comprovação deste dado, optou-se pela purificação da amostra submetida à análise de NMR por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa (CLAE-Prep) em modo reverso. Após esta etapa, a fração coletada foi concentrada e submetida à análise de CLAE-IES-EM, para confirmação tanto da pureza como da identidade do composto isolado. No cromatograma obtido neste experimento foram observados dois sinais com boa resolução de separação (tempos de retenção em 5,7 e 6,6 min), porém apresentando os mesmos íons (Tabela 5).

Tabela 5. Sinais obtidos por CLAE-EM para o produto de oxidação biomimética.

	Tempo de retenção		Teórico	Erro (ppm)*	$\Delta\%$ (desvio)
	5,7	6,6			
[M+H]⁺	391,13791	391,13707	391,138744	2,1	0,00021
[M+Na]⁺	413,12029	413,11935	413,120689	1,0	0,00023
[M+K]⁺	429,09446	429,09357	429,094626	0,4	0,00021

O resultado apresentado na Tabela 5 demonstra que foi possível isolar os produtos da reação por CLAE-prep e também corroborar o resultado observado no espectro de ¹H-NMR, de que este trata-se da BDL-epoxiangelato, pois todos os íons apresentam alta acurácia das massas em relação ao valor teórico para a fórmula molecular C₂₀H₂₂O₈.

A presença de dois sinais idênticos no cromatograma sugere que houve a formação de diastereoisômeros (Figura 31), o que é totalmente aceitável considerando-se o mecanismo da reação de epoxidação do grupo angelato, passível da formação dos isômeros (2*R*,3*R*) e (2*S*,3*S*) devido aos mecanismos sin e anti (Torres-Valencia et al., 1998; Torres-Valencia, Cerda-Garcia-Rojas e Joseph-Nathan, 1999; Tada et al., 2010). Sabe-se também que a separação de diastereoisômeros por cromatografia em fase reversa é possível, pois eles possuem propriedades físicas distintas, como polaridade, por exemplo (Bombarda et al., 1996; Bombarda et al., 2001).

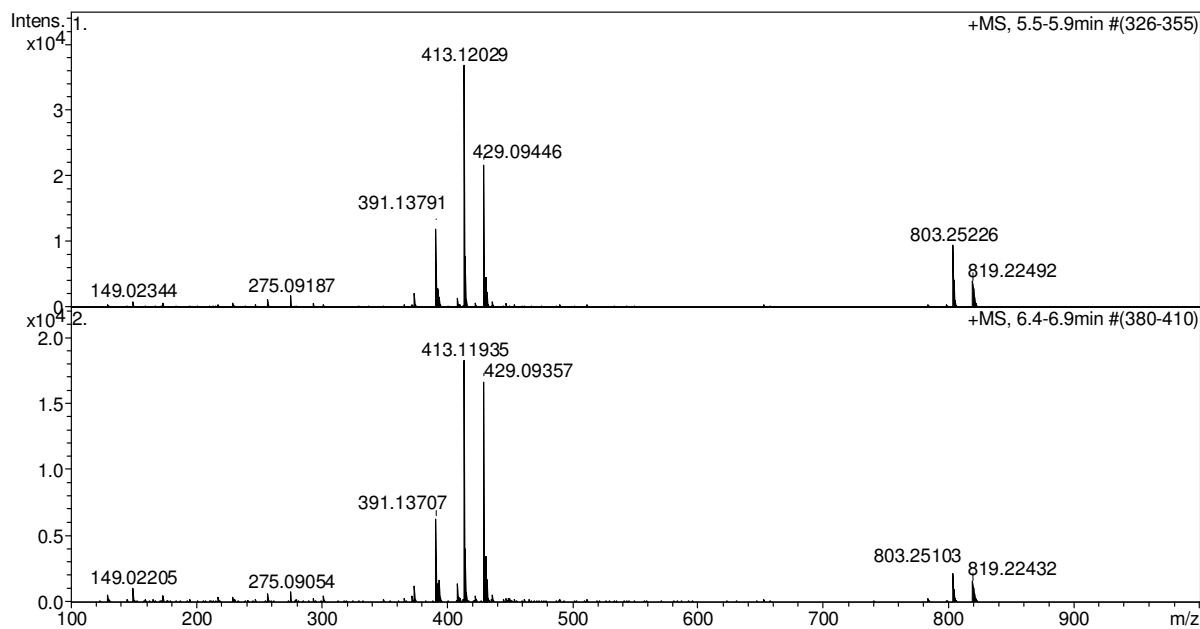
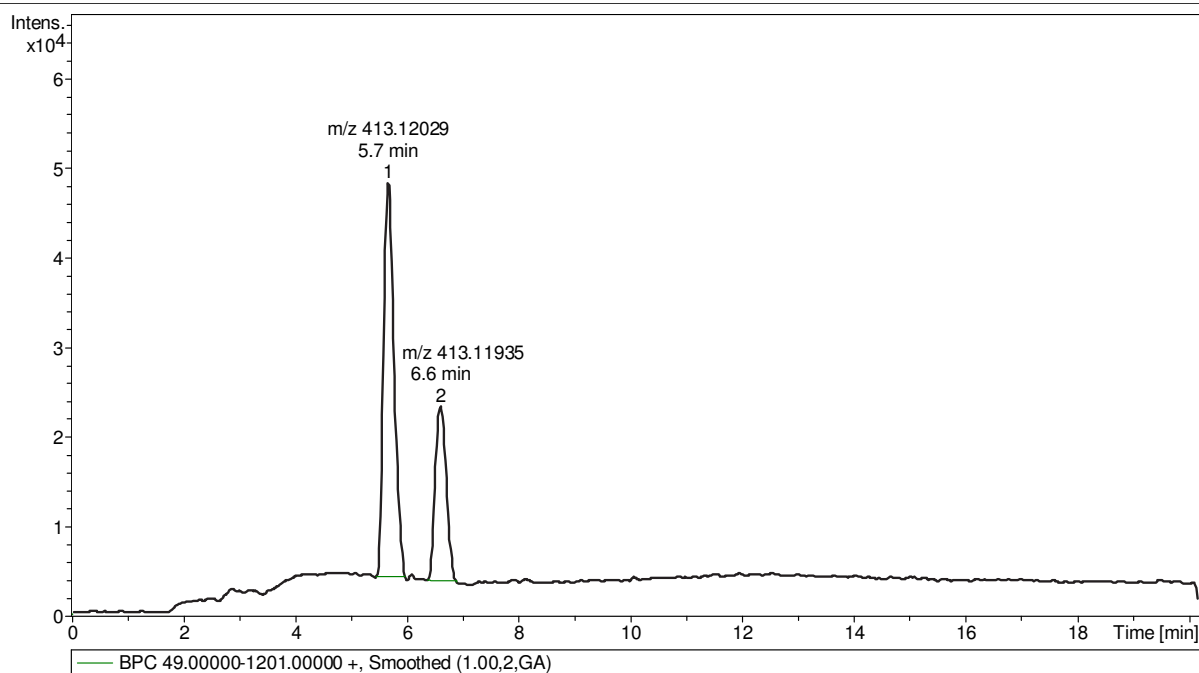
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\LUCAS_QO\bdl_epoxide_1-1_01_534.d
Method tune_low_lucas1200_pos.m
Sample Name bdl_epoxide
Comment

Acquisition Date 3/13/2012 10:29:23 AM

Operator Jose Carlos Tomaz
Instrument micrOTOF



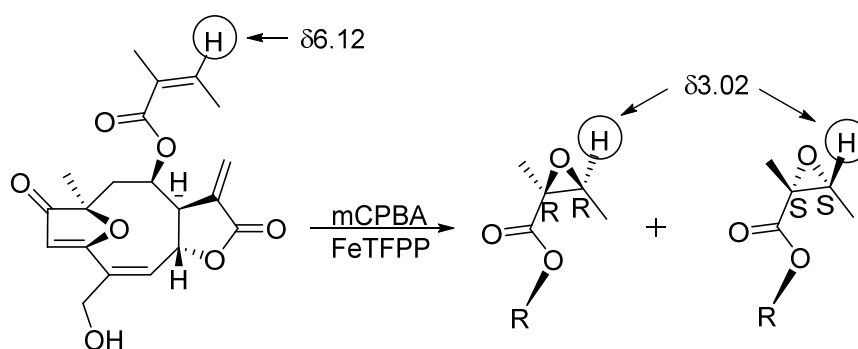


Figura 32. Diastereoisômeros formados por meio de reações biomiméticas.

Entretanto, a comprovação das configurações absolutas das substâncias de cada sinal apresentam-se como um desafio, uma vez que a recuperação destes produtos na matriz reacional é laboriosa e de baixo rendimento. Conforme os dados reportados a determinação da configuração absoluta destes isômeros pode ser realizada apenas com a avaliação detalhada dos dados de deslocamento dos grupos metila Me-4' e Me-5', que possui $\Delta\delta_{5'-4'} = 0,22$ para a configuração 2'R,3'R e $\Delta\delta_{5'-4'} = 0,28$ para a configuração 2'S,3'S (Torres-Valencia et al., 1998; Torres-Valencia et al., 1999).

4.4. Ensaio de metabolização *in vitro* com microsomas hepáticos

Não foram detectados neste modelo produtos de metabolismo oxidativo para a BDL para ambos os tipos de microsoma utilizados. Estes resultados corroboram aqueles obtidos no modelo de oxidação biomimética, no qual foi necessária a utilização de grande concentração de agente oxidante e também de catalisador (metaloporfirina), além de um período de incubação bastante prolongado (7 h) para que fossem gerados produtos. Pode-se concluir que o esqueleto da BDL é bastante estável em modelos de metabolismo oxidativo.

Por outro lado, a substância EPOXI apresentou um produto de metabolismo de m/z 381,15 $[M+H]^+$ (Figura 33) para ambos os tipos de microsoma, o qual corresponde à abertura do epóxido com posterior adição de uma hidroxila ao C-3', formando um diol vicinal (Figura 34).

C:\Users\...\131022\131022_Lucas_MICS_02

10/22/2013 5:50:08 PM

Budlein Epoxide Pig

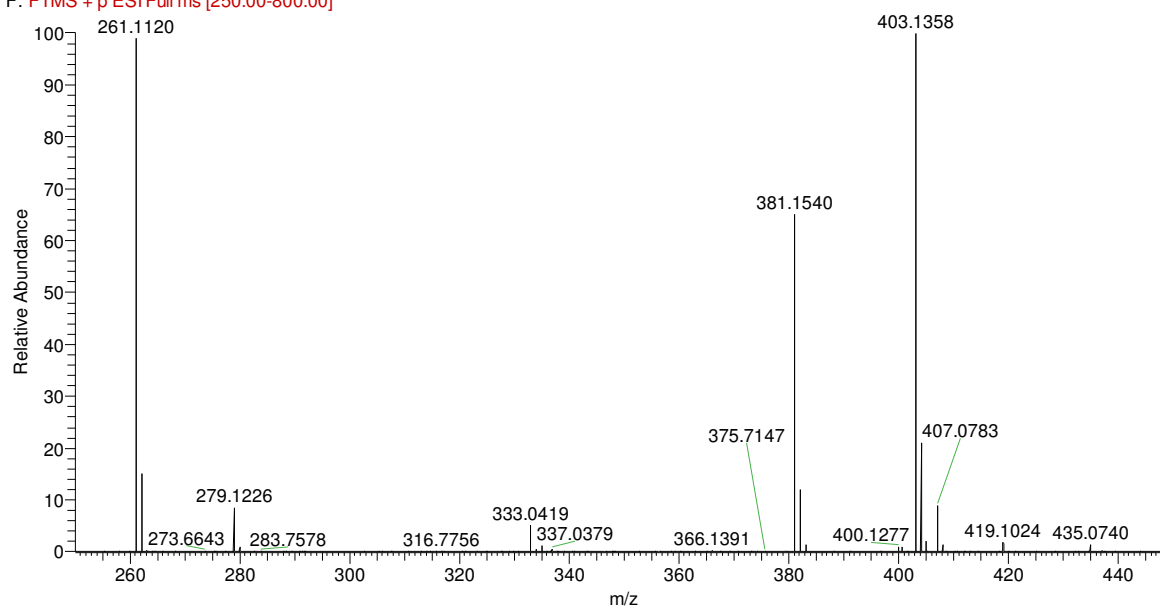
131022_Lucas_MICS_02 #960-978 RT: 9.31-9.52 AV: 7 NL: 1.97E6
F: FTMS + p ESI Full ms [250.00-800.00]

Figura 33. EM obtido para o produto de metabolismo da EPOXI com microsomas hepáticos de porco.

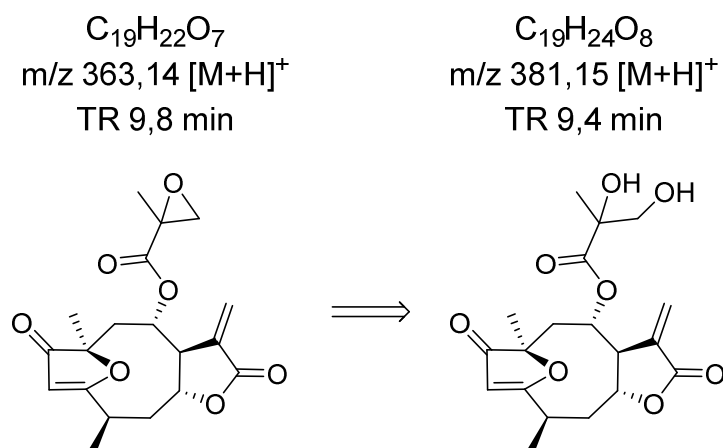


Figura 34. Produto de metabolismo da EPOXI com microsomas hepáticos de porco e rato.

4.5. Ensaio de metabolização *in vitro* pelo modelo de ceco de porco (pig cecum model)

4.5.1. Curvas de degradação

Os resultados quantitativos obtidos após a incubação das LST com o inóculo são apresentados em forma de curvas de degradação (Figura 35) e representam o

consumo dos compostos devido a reações químicas e/ou enzimáticas provocadas pela microbiota intestinal.

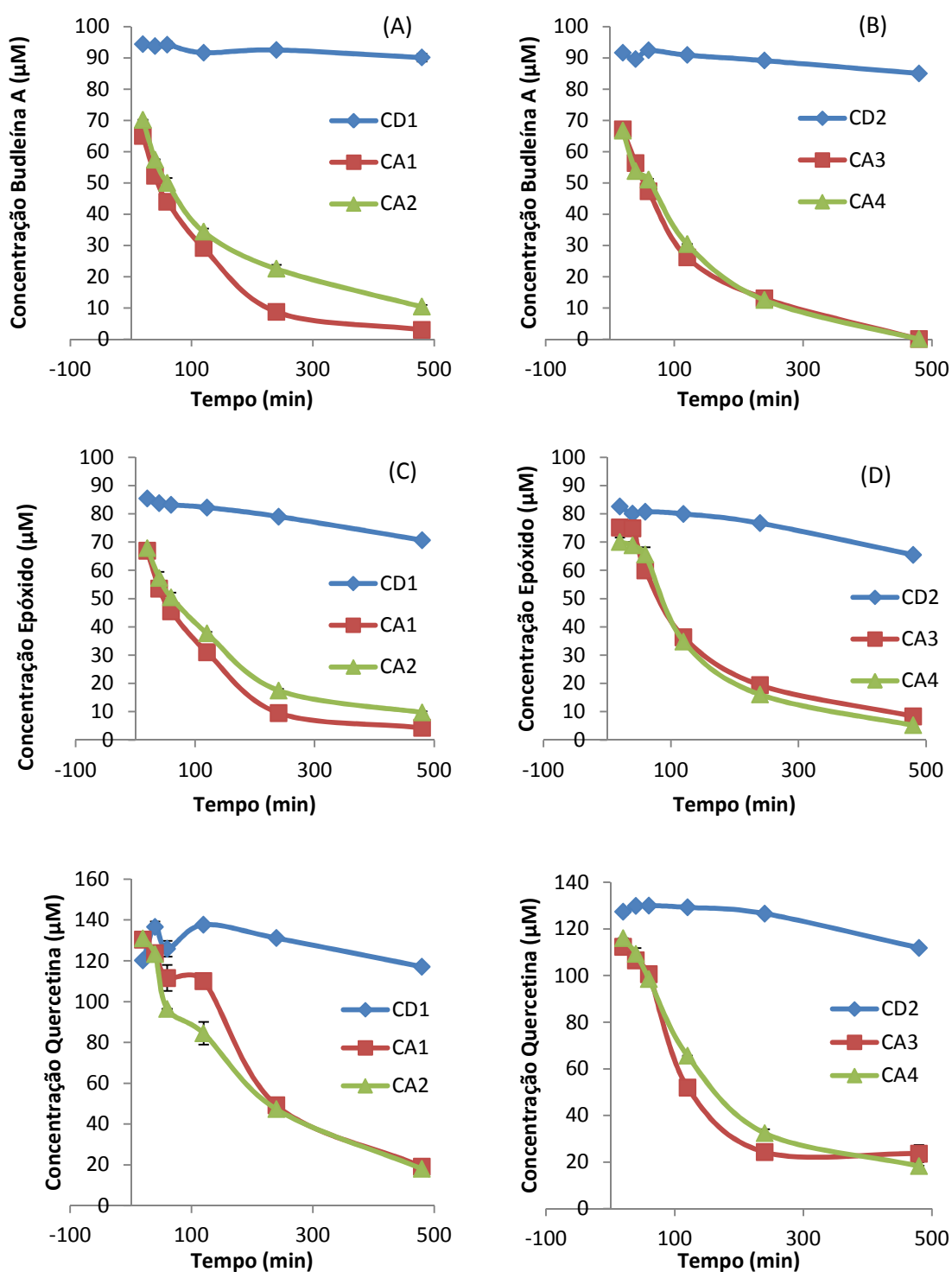


Figura 35. Curvas de degradação da BDL e da EPOXI obtidas após a incubação com inóculo.

Nos experimentos realizados (n=4) com o inóculo ativo (CA) observou-se o consumo de praticamente todo o conteúdo de ambas as LST após 8 horas de incubação, enquanto que nas amostras de controle negativo (CD) a concentração permaneceu praticamente constante após 8 horas de incubação com o material autoclavado. O desvio padrão relativo (DPR) para todas as amostras foi $\leq 5\%$, o que demonstra a repetitividade do sistema reacional e também da metodologia analítica utilizada. O perfil da curva demonstrou um perfil semelhante para os quatro experimentos realizados (grupos CD e CA), o que comprova a reprodutibilidade do procedimento. Vale ressaltar que devido à impossibilidade de preparo e também à indisponibilidade (número de animais abatidos por dia) de mais de dois cecos por dia de experimento, as curvas de degradação apresentadas na Figura 35 foram obtidas em dias distintos (Dia 1: CD1, CA1 e CA2; Dia 2: CD2, CA3 e CA4). Os resultados obtidos com quercetina (controle positivo) comportaram-se conforme o previsto para CD e CA e validaram os experimentos.

Em um primeiro momento acreditou-se que a degradação das LST havia ocorrido devido às reações enzimáticas e/ou pela atividade dos microorganismos presentes no inóculo, uma vez que a degradação não fora observada para o grupo controle negativo. Entretanto, ficou comprovado que a reação de adição do aminoácido cisteína nas LST (Figura 36), gerando adutos, foi a responsável pelo consumo da LST.

A cisteína é um aminoácido presente na dieta dos animais, portanto permanece nas fezes. O motivo pelo qual esta reação não foi observada no controle negativo se deve à transformação da cisteína em cistina por processos oxidativos na etapa de autoclavagem, conforme observado em outro estudo (Bao et al., 2007). Portanto, no intuito de comprovar esta teoria, foram realizados testes nos quais incubou-se as LST com o material desativado (CD) enriquecido com cisteína (concentração final de 100 μM), sendo observado nestas amostras o consumo das LST com perfil similar ao obtido nas amostras com material ativado (CA).

Apesar da constatação de que a formação de adutos com cisteína é a responsável pelo consumo das LST quando incubadas juntamente com a microbiota intestinal, as análises acuradas de CLAE-EM acusaram a formação de outros

produtos, estes sim gerados por meio da ação enzimática e/ou dos microorganismos sobre os adutos com cisteína formados na primeira etapa.

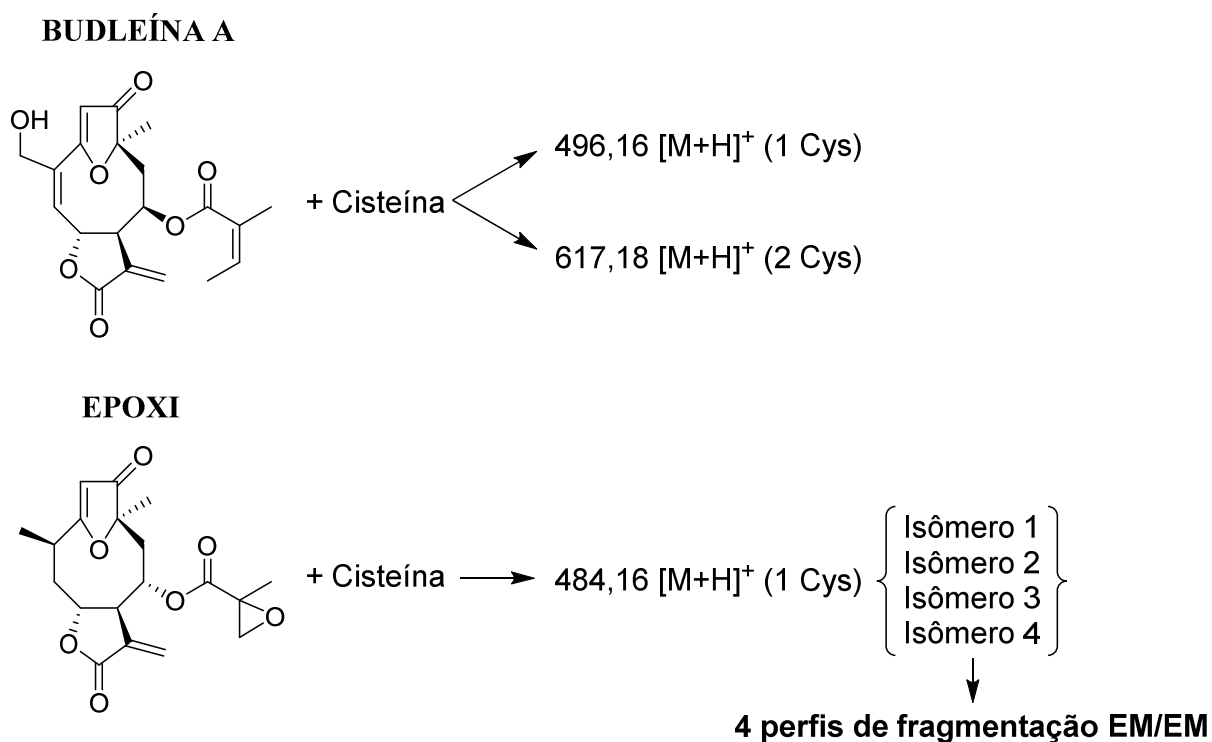


Figura 36. Adutos formados pela reação entre a LST e cisteína.

4.5.2. Metabólitos gerados

Para ambas as LST incubadas com o inóculo foram observados produtos de metabolismo gerados em duas etapas distintas. A primeira delas é a reação de adição de Michael, na qual as substâncias em teste formam adutos com o aminoácido cisteína. Na segunda etapa foi observada a degradação destes adutos pela atividade da microbiota, gerando produtos contendo partes distintas do aminoácido em posições diferentes.

A eliminação de CO₂ dos adutos pela atividade microbiana foi comum para ambas substâncias e é condizente com estudos realizados com linhagens de bactérias isoladas de intestino de porco, sendo inclusive a quantidade de CO₂ produzida utilizada para quantificar o metabolismo das diferentes culturas (Dai et al., 2012).

A baixa concentração destes produtos de metabolismo na amostra, bem como a complexidade da matriz do inóculo, não permitiram o isolamento destas substâncias, não sendo desta forma possível a obtenção de dados por RMN para a identificação dos mesmos. Entretanto, a elevada acurácia dos resultados obtidos com o sistema Thermo Scientific modelo LTQ Orbitrap permitiram sugerir as fórmulas moleculares de todos os produtos de metabolismo detectados. Os dados de EM/EM obtidos nestas análises também foram fundamentais na identificação das prováveis posições as quais foram adicionadas moléculas de cisteína.

4.5.2.1. *Budleína A*

Foram detectados dois adutos distintos formados pela adição do aminoácido cisteína à BDL, sendo estes identificados pelas respectivas massas acuradas de m/z 496,1633 $[M+H]^+$ (BDL+Cys) e m/z 617,1835 $[M+H]^+$ (BDL + 2 Cys) (Figura 37). Os tempos de retenção relativa (TRR) destes íons em 0,86 e 0,71, respectivamente, também corroboram a polaridade aumentada dos adutos em relação à BDL, pois em se tratando de cromatografia líquida em modo reverso, o tempo de retenção de uma determinada substância é inversamente proporcional à sua polaridade.

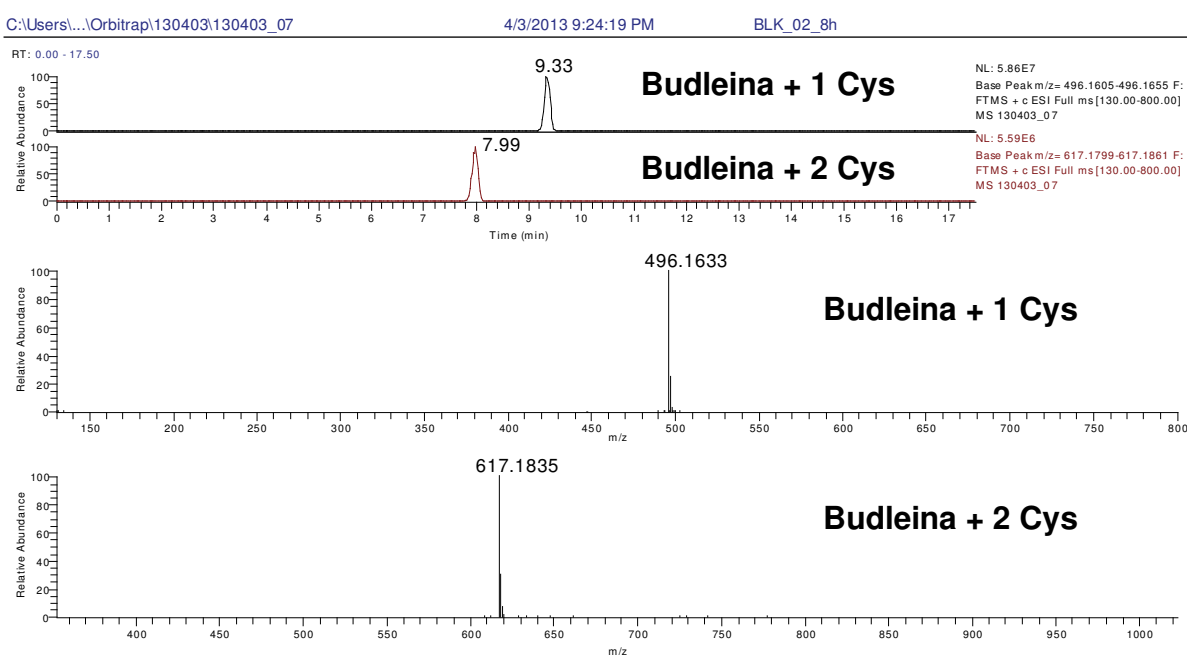


Figura 37. Cromatograma obtido para os adutos de BDL e cisteína.

Os espectros de IES-EM/EM dos íons de m/z 496,1633 $[M+H]^+$ (Figura 38A) e m/z 617,1835 $[M+H]^+$ (Figura 38B) auxiliaram na confirmação dos resultados, pois apresentam os íons fragmento de m/z 375,14, m/z 275,09 e m/z 257,08, característicos da fragmentação da BDL conforme descrito no tópico 4.2. Embora estes sinais sejam pouco intensos na Figura 38B – pois não há energia colisional suficiente para formá-los por EM/EM, é possível observar a presença do íon fragmento de m/z 496,16 (BDL+Cys), originado pela eliminação de uma molécula de cisteína.

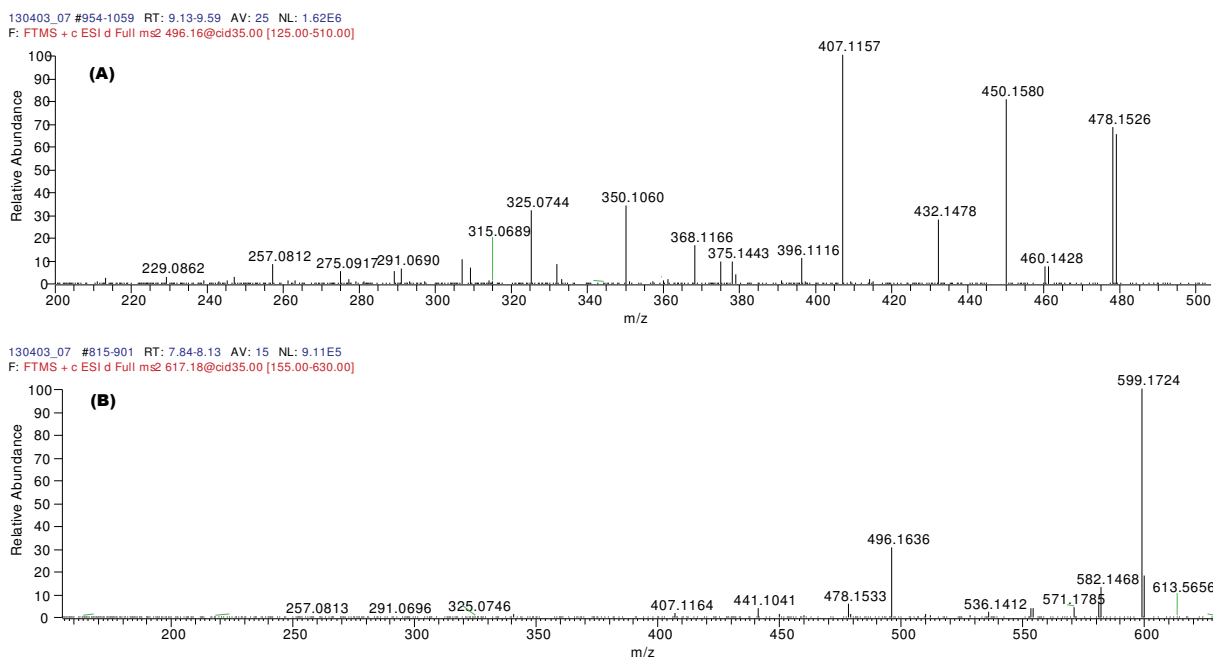


Figura 38. Espectros IES-EM/EM obtidos para os íons (A) 496,16 $[M+H]^+$ e (B) 617,18 $[M+H]^+$.

A atividade da microbiota intestinal sobre os dois adutos pôde ser observada com a detecção de íons contendo o esqueleto da BDL e resíduos da molécula de cisteína apenas nos grupos incubados com material ativado (CA) (Figura 39), o que indica que a degradação dos adutos ocorreu somente na porção adicionada à LST, ou seja, o aminoácido. Pode-se afirmar também que esta atividade é dependente da viabilidade biológica do inóculo, visto que os grupos controle negativo (CD) não apresentaram tais íons, mesmo quando enriquecidos com cisteína (100 μ M) (Figura 40).

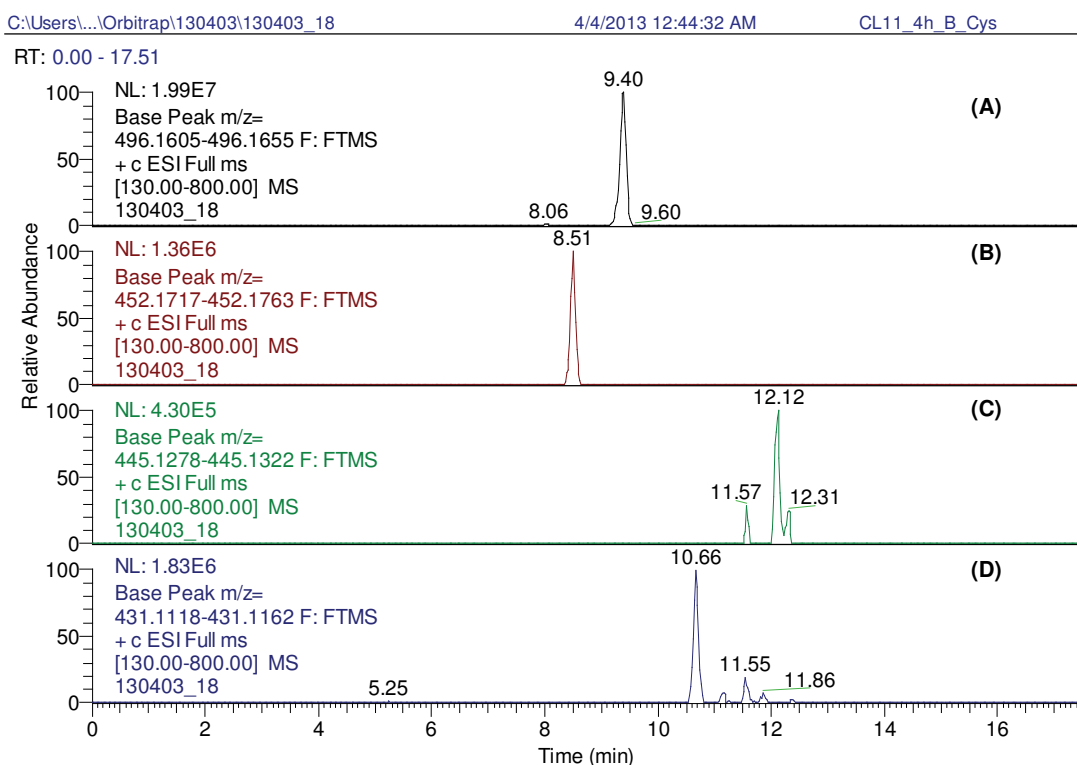


Figura 39. Cromatograma obtido para a amostra incubada com material ativado (CA). (A) Aduto BDL + Cys; (B) íon de m/z 452,17; (C) íon de m/z 423,14; (D) íon de m/z 409,13.

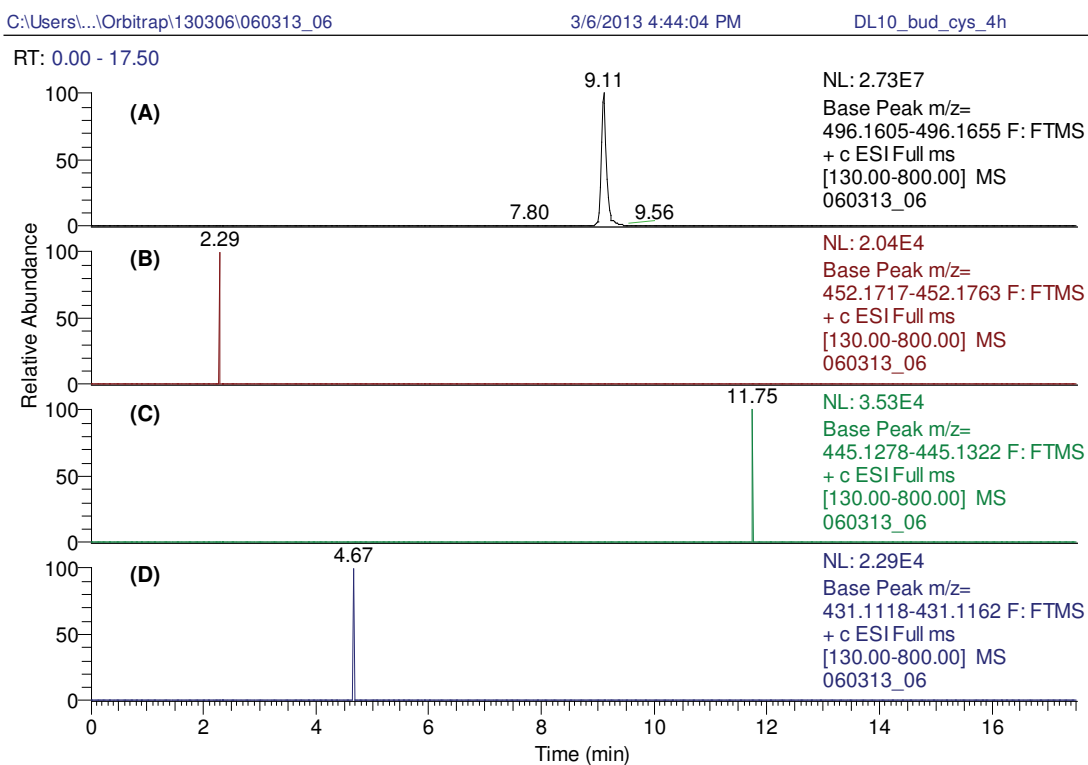


Figura 40. Cromatograma obtido para a amostra incubada com material desativado (CD). (A) Aduto BDL + Cys; (B) íon de m/z 452,17; (C) íon de m/z 423,14; (D) íon de m/z 409,13.

Os principais produtos da degradação dos adutos de BDL com cisteína são apresentados na Figuras 41 (BDL + Cys) e na Figura 42 (BDL + 2 Cys). Os respectivos EM para cada um dos produtos detectados estão dispostos nas Tabelas 6 e 7.

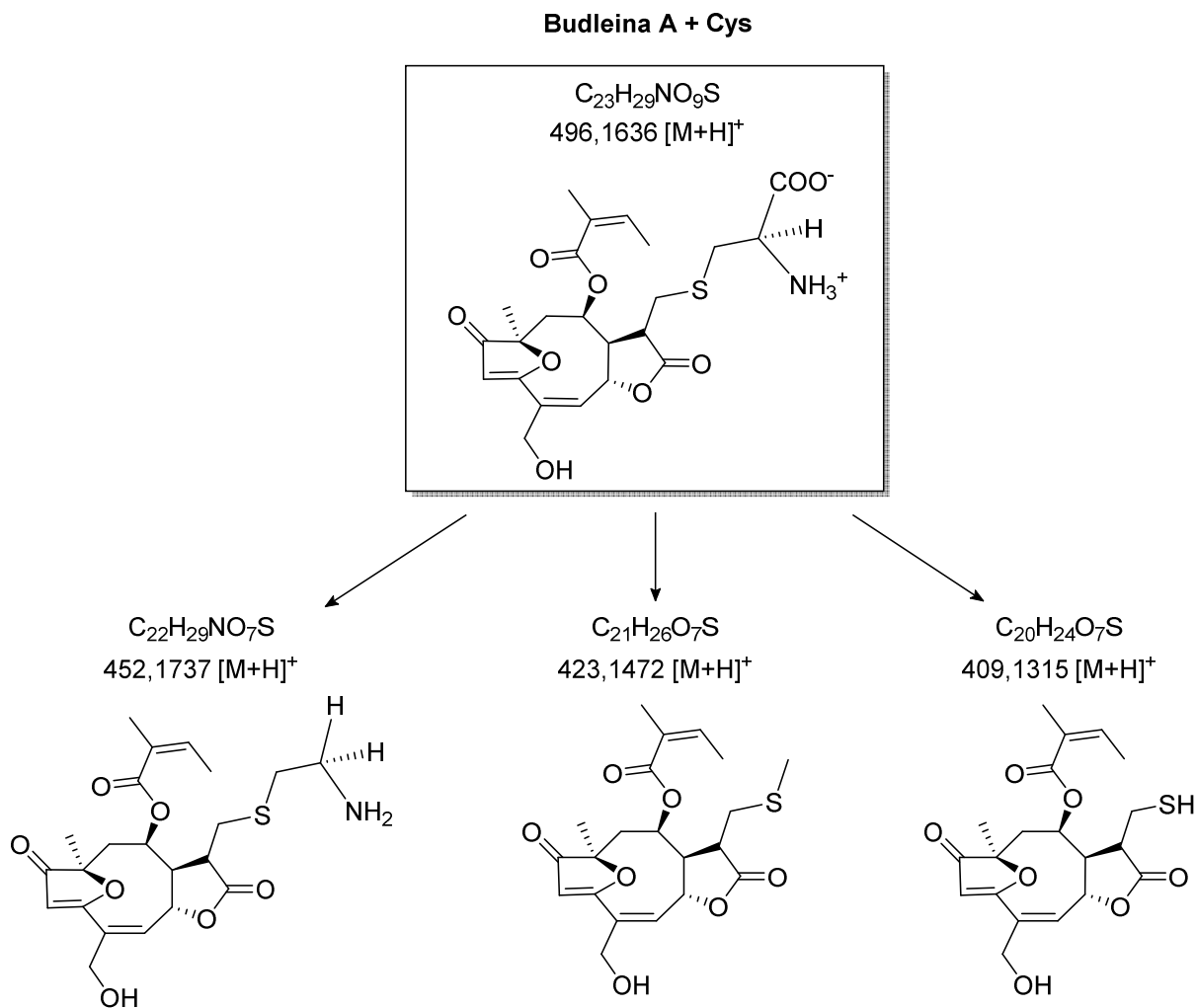
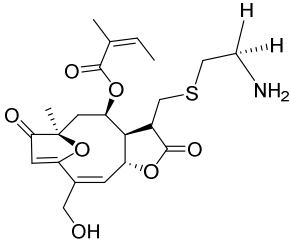
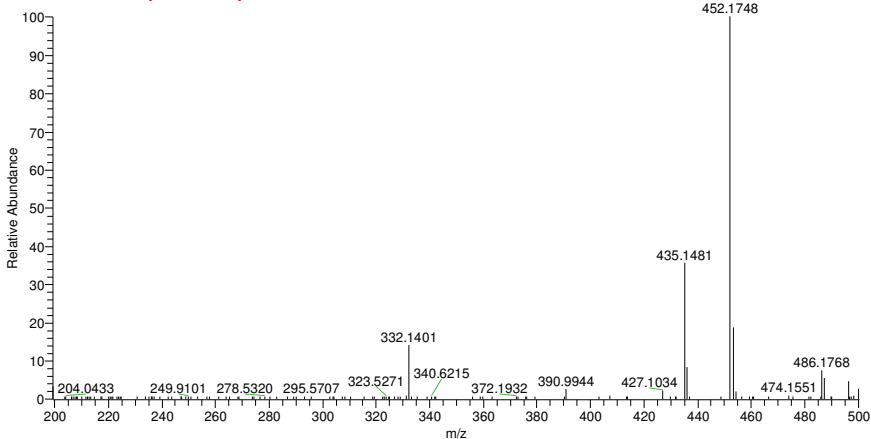
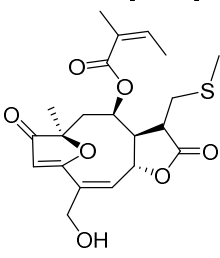
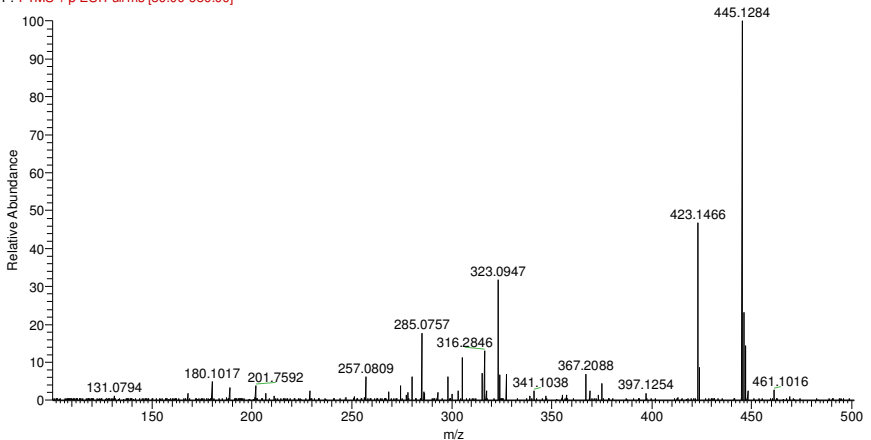
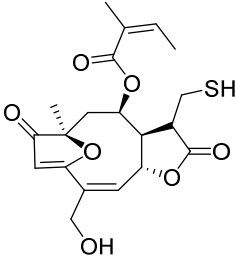
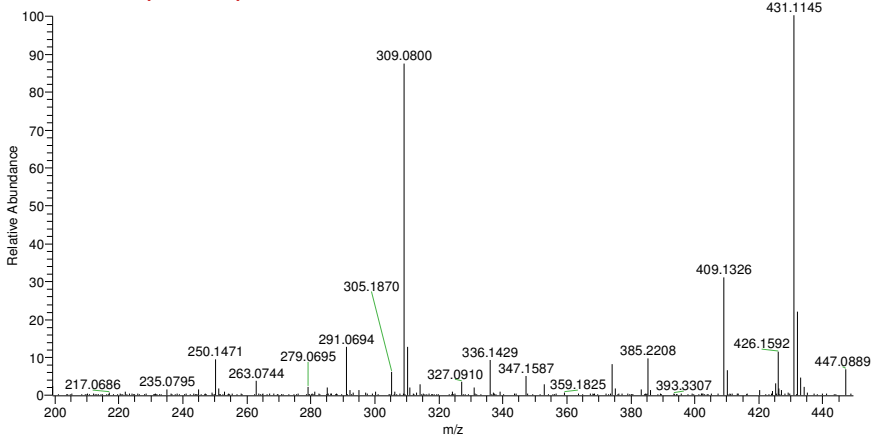


Figura 41. Produtos de degradação da BDL + Cys detectados no modelo de ceco de porco.

Tabela 6. Espectros EM dos produtos de degradação do aduto BDL + Cys.

Substância	Espectro EM
<p data-bbox="295 472 448 501">$C_{22}H_{29}NO_7S$</p> <p data-bbox="268 512 475 542">452,1737 [M+H]⁺</p> 	<p data-bbox="555 398 900 427">130403_19 #867-875 RT: 8.40-8.48 AV: 5 NL: 8.52E5 F: FTMS + c ESI Full ms [130.00-800.00]</p> 
<p data-bbox="301 981 445 1010">$C_{21}H_{26}O_7S$</p> <p data-bbox="268 1021 475 1050">423,1472 [M+H]⁺</p> 	<p data-bbox="555 898 928 927">121108_18 #1322-1336 RT: 12.07-12.17 AV: 5 NL: 9.10E5 F: FTMS + p ESI Full ms [50.00-650.00]</p> 
<p data-bbox="301 1464 445 1494">$C_{20}H_{24}O_7S$</p> <p data-bbox="268 1505 475 1534">409,1315 [M+H]⁺</p> 	<p data-bbox="555 1413 936 1442">130403_19 #1076-1096 RT: 10.51-10.69 AV: 10 NL: 1.08E6 F: FTMS + c ESI Full ms [130.00-800.00]</p> 

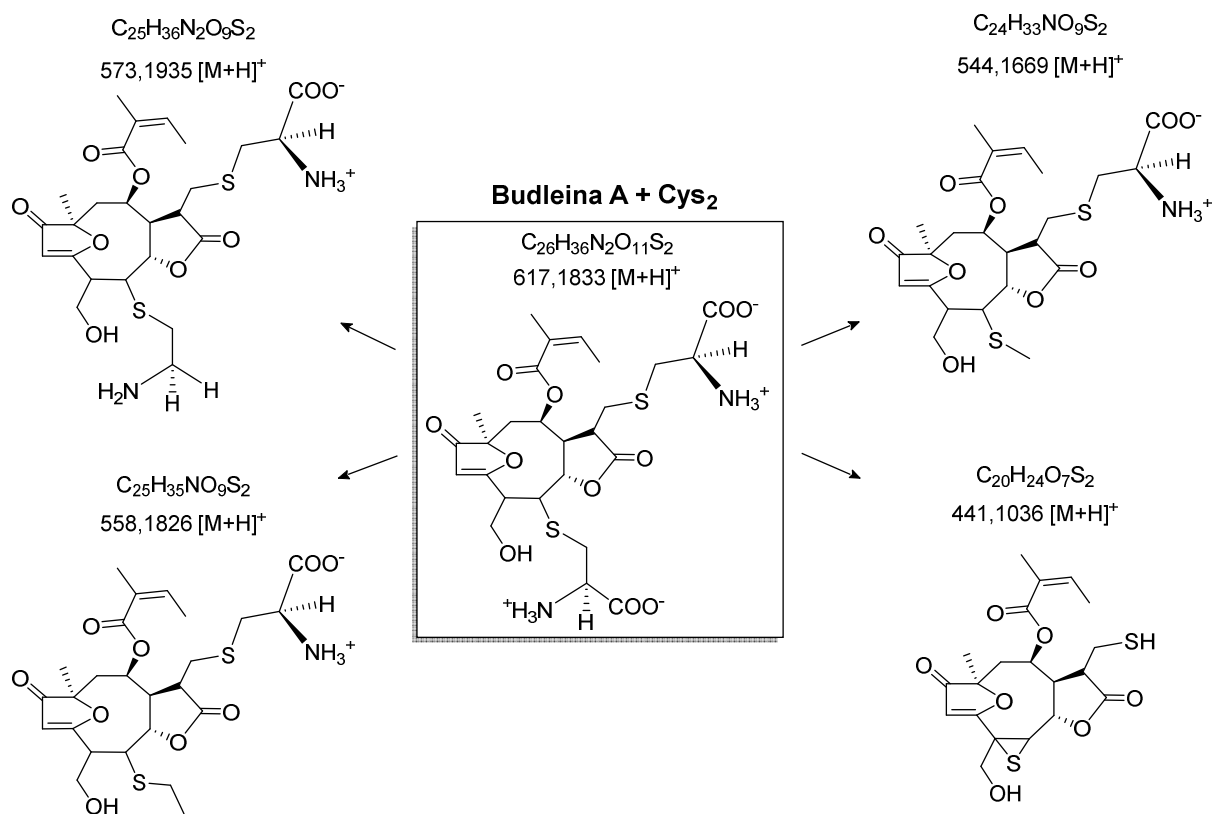
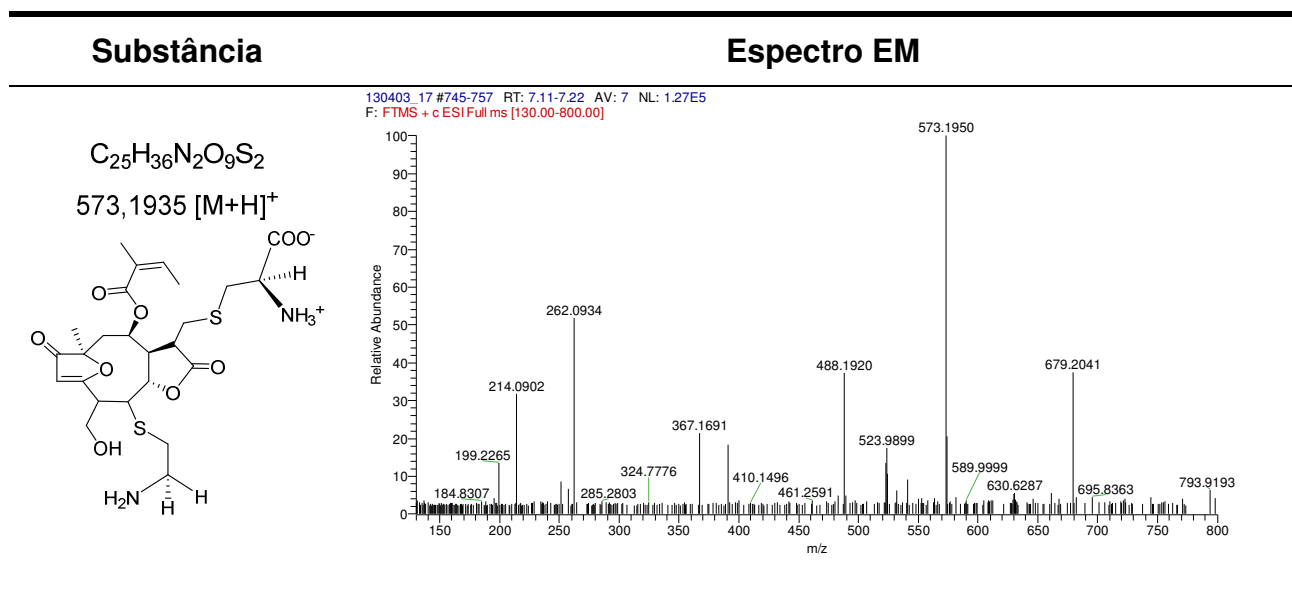
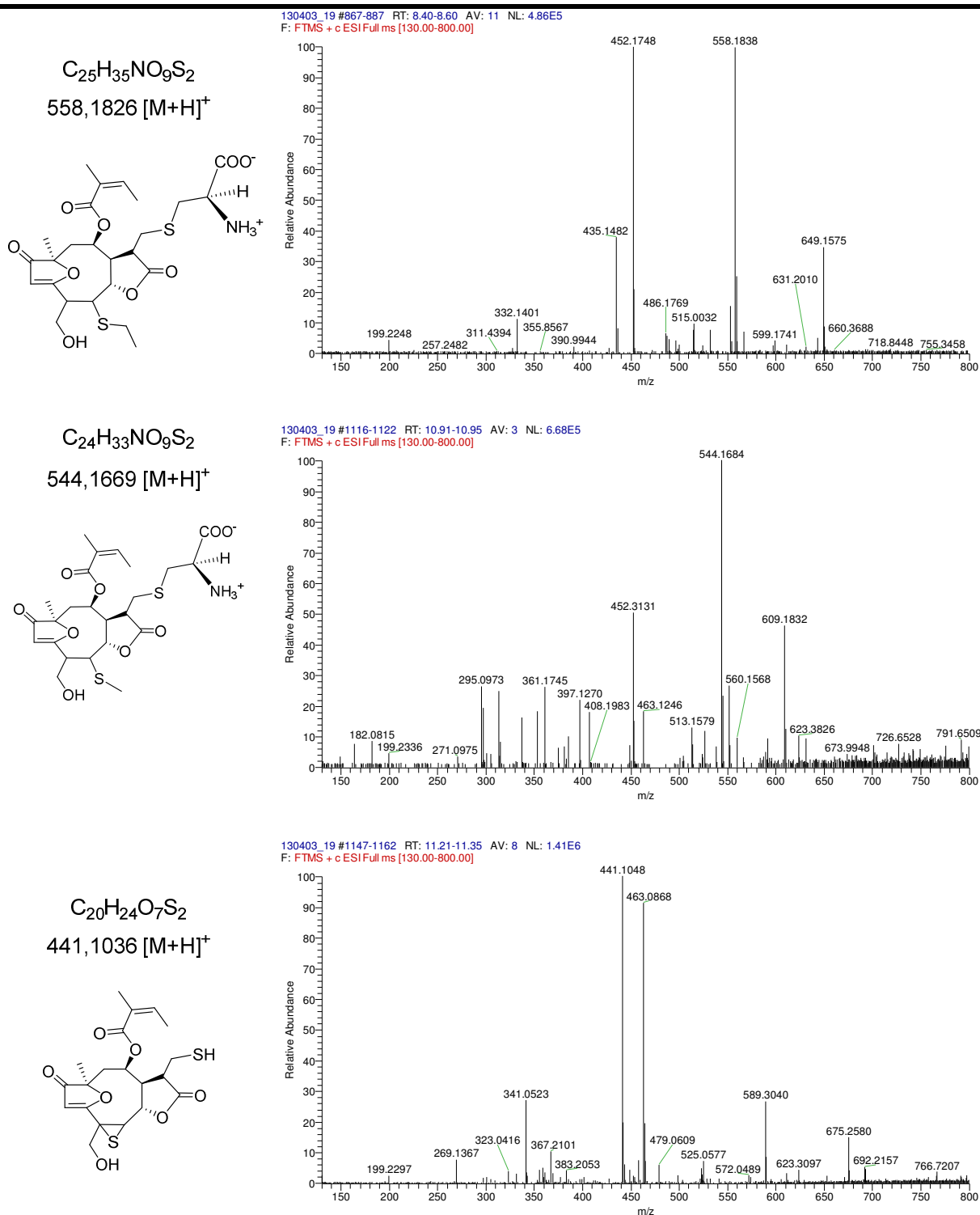


Figura 42. Produtos de degradação da BDL + 2 Cys detectados no modelo de ceco de porco.

Tabela 7. Espectros EM dos produtos de degradação do aduto BDL + 2 Cys.





A posição de adição das cisteínas na BDL (C13 e C5) são sugeridas pela fragmentação dos produtos, nos quais foi possível verificar, em alguns casos, a

perda da cadeia lateral ($C_5H_8O_2$) na forma neutra (100,05 *u*) e a permanência dos átomos de enxofre no íon fragmento, conforme pode ser observado no EM do produto $C_{20}H_{24}O_7S_2$ (m/z 441,1048 $[M+H]^+$) (Tabela 7), o qual sofre dissociação induzida por colisão na fonte de ionização gerando o íon fragmento de m/z 341,05 (1,5 ppm), cuja fórmula molecular é $C_{15}H_{16}O_5S_2$. Este fragmento foi confirmado pela análise de EM/EM, conforme demonstrado na Figura 43. Esta perda correspondente à cadeia lateral (100,05 *u*) é também observada para os outros produtos nos quais o grupo NH_2 já fora removido pelas reações de degradação, o que é o caso dos íons de m/z 423,14 (\rightarrow 323,09) e m/z 409,13 (\rightarrow 309,08).

Não foi observado para nenhum íon a perda da cadeia lateral adicionada de uma cisteína (221,07 *u*), o que levaria à formação do íon fragmento de m/z 275,09, característico do esqueleto sesquiterpênico da BDL. Esta dado indica que a cisteína não reagiu com a cadeia lateral.

130403_19 #1050-1213 RT: 11.24-11.32 AV: 5 NL: 8.05E5
F: FTMS + c ESI d Full ms2 441.10@cid35.00 [110.00-455.00]

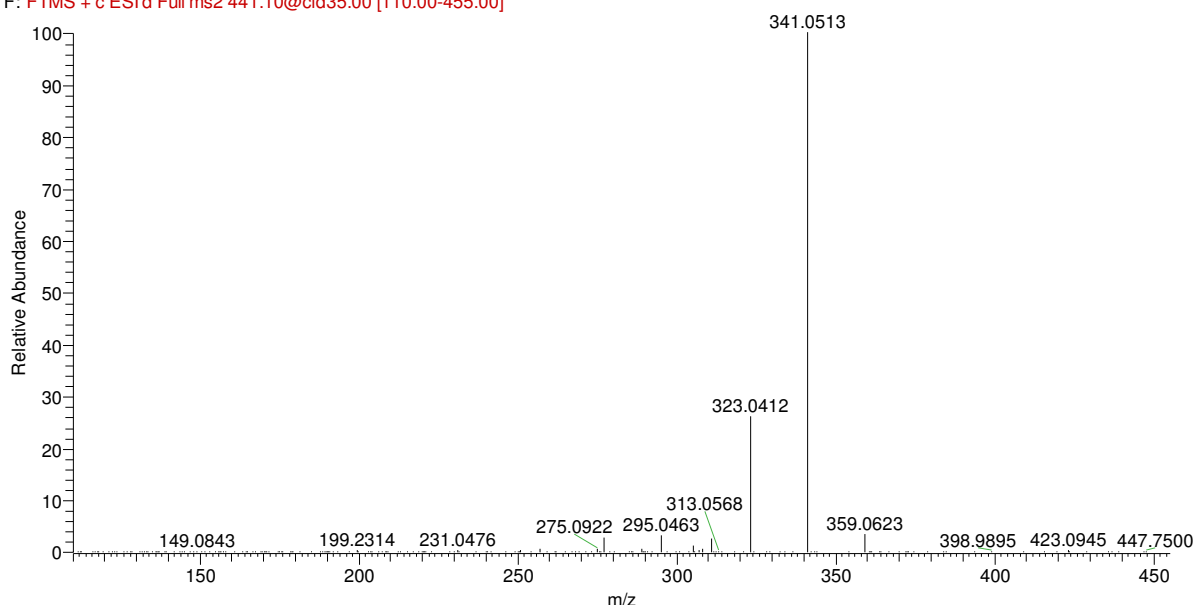


Figura 43. Espectro EM/EM do íon de m/z 441,10 $[M+H]^+$.

A distribuição isotópica dos íons observados para os produtos formados foi outro fator considerado na confirmação das fórmulas moleculares das substâncias, pois apresentaram grande similaridade de perfil. Como exemplo, a Figura 44 mostra a comparação entre a distribuição obtida experimentalmente e a teórica simulada

pelo software Xcalibur 2.0.7 para o íon de m/z 441,1048 $[M+H]^+$, sendo observada grande semelhança nas intensidades dos isótopos.

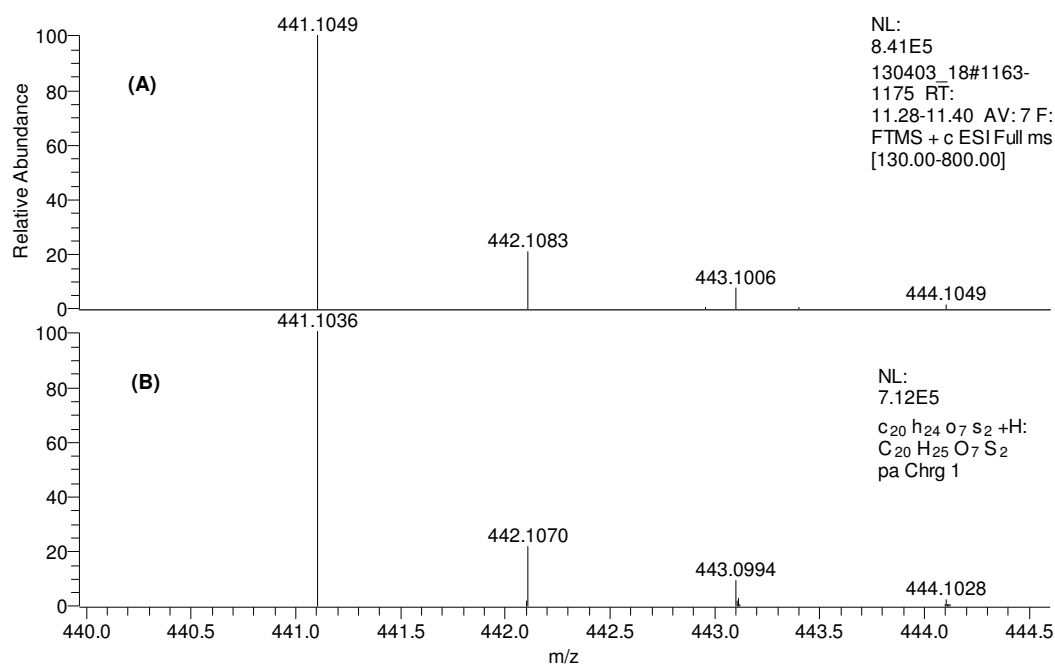


Figura 44. Distribuição isotópica experimental (A) e teórica (B) para o íon de m/z 441,10 $[M+H]^+$.

A Tabela 8 apresenta um resumo de todos os metabólitos encontrados e também os valores de TRR, que demonstra a diferença de polaridade entre as substâncias detectadas.

Tabela 8. Produtos de degradação obtidos no modelo de ceco de porco para a BDL.

LST	FM	TR	Aduto $[M+H]^+$	TRR	Metabólito $[M+H]^+$	FM	TRR
Budleína A	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	11,0	496,16 (1 Cys)	0,855	409,1315	C ₂₀ H ₂₄ O ₇ S	0,964
					423,1472	C ₂₁ H ₂₆ O ₇ S	1,091
					452,1737	C ₂₂ H ₂₉ O ₇ NS	0,773
					441,1048	C ₂₀ H ₂₄ O ₇ S ₂	1,027
					544,1669	C ₂₄ H ₃₃ O ₉ NS ₂	0,991
					558,1825	C ₂₅ H ₃₅ O ₉ NS ₂	0,773
			573,1935	C ₂₅ H ₃₆ O ₉ N ₂ S ₂	0,673		

4.5.2.2. 4 β ,5-dihidro-2',3'-epoxi-15-desoxigoyazensolido (EPOXI)

O espectro de massas da substância 4 β ,5-dihidro-2',3'-epoxi-15-desoxigoyazensolido (Figura 14) apresenta como íon mais intenso o m/z 261,11. Este é formado por meio da eliminação da cadeia lateral composta por um éster com orientação α na posição C-8. Esta reação não demanda grande elevação da energia interna do composto, visto que é bastante favorecida na fonte de ionização, conforme mostra o espectro em *Full Scan* (EM) (Figura 45). Na etapa seguinte provavelmente ocorre a abertura do anel lactônico e a perda de CO₂, gerando o íon de m/z 215,10. Seu íon protonado é o de m/z 363,14 [M+H]⁺ e também apresenta o íon sodiado com grande intensidade (m/z 385,12 [M+Na]⁺).

121018_32 #1278-1306 RT: 10.50-10.72 AV: 10 NL: 9.90E6
F: FTMS + p ESI Full ms [50.00-400.00]

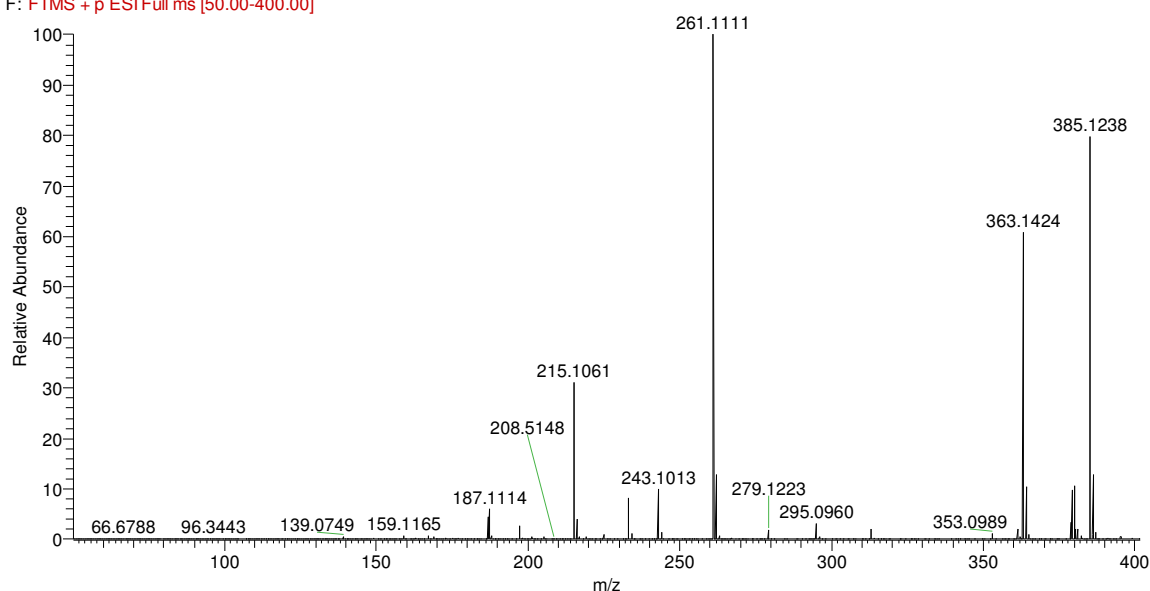


Figura 45. Espectro obtido por IES-EM para a substância EPOXI.

Quando da incubação da substância EPOXI com o inóculo, observou-se também a formação de adutos com cisteína, sendo detectados os adutos de m/z 484,16 [M+H]⁺ (EPOXI + Cys) e m/z 605,18 [M+H]⁺.

No caso do aduto composto por EPOXI + Cys, a adição ocorreu em posições e/ou orientações distintas da molécula, visto que ao menos quatro isômeros foram detectados para o aduto contendo uma molécula de cisteína. Estes apresentaram-se

com a mesma massa molecular porém com TR e espectros IES-EM/EM distintos, conforme apresentado nas Figuras 46 e 47.

A grande variação nos TR de cada isômero é um indicativo de que a simples modificação da posição e/ou orientação à qual a cisteína é adicionada é capaz de influenciar fortemente na polaridade do aduto formado.

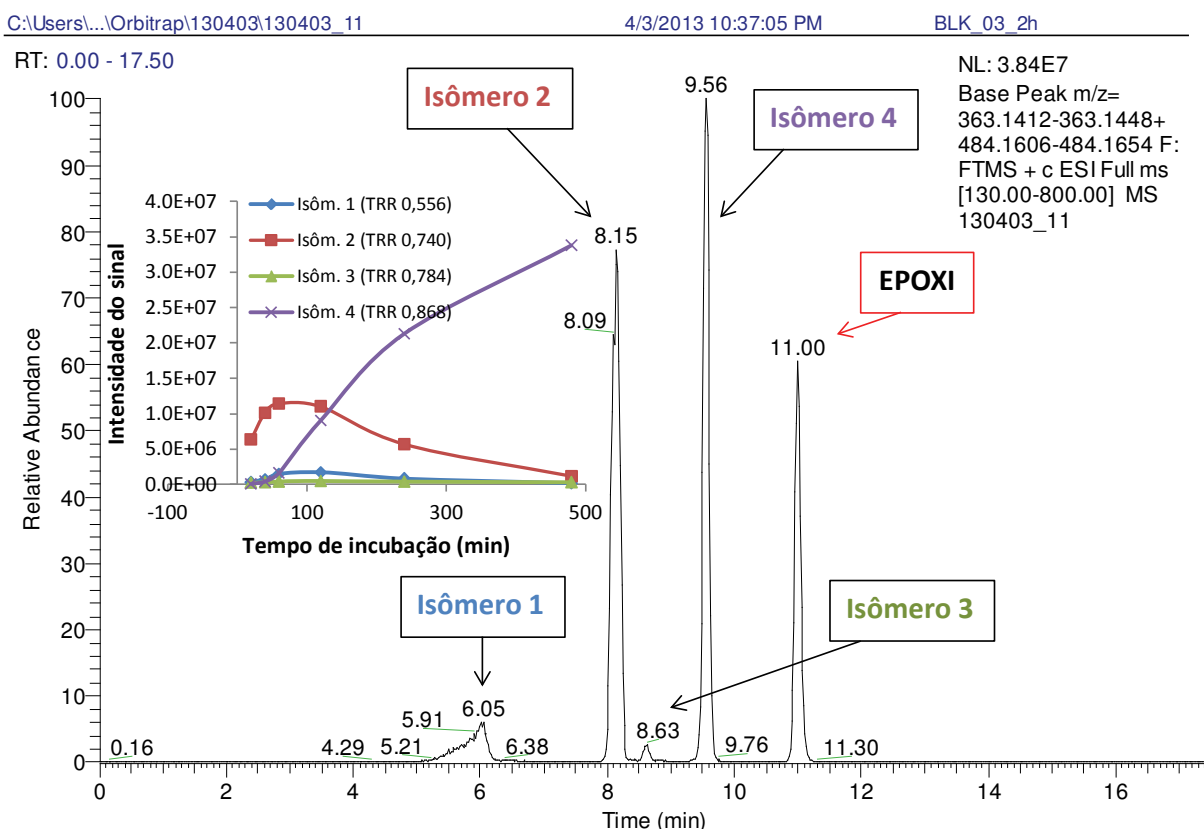


Figura 46. Cromatograma obtido com os isômeros do aduto de EPOXI + Cys.

Embora não seja um dado quantitativo com significância estatística, o gráfico inserido na Figura 46 mostra a intensidade absoluta dos íons relativos a cada isômero em função do tempo de incubação, sendo nítida a maior tendência de formação do isômero 4 em relação aos demais, o que indica que a adição do aminoácido à cadeia lateral (C-3') por meio de ataque nucleofílico é o mecanismo de maior probabilidade.

Levando-se em consideração que o mecanismo de reação de adição do aminoácido nesta LST é do tipo Michael na formação dos quatro adutos, é possível afirmar que existem nesta substância sítios reativos distintos e todos com potencial para interagir com biomoléculas que possuam resíduos de cisteína, havendo também a possibilidade de que estas interações ocorram em ambientes estericamente distintos. Em estudo realizado por Schmidt é relatada a formação de adutos da LST helenalina com cisteína e glutathione (GSH) (Schmidt, 1997), entretanto não foram encontrados isômeros

As fragmentações obtidas por IES-EM/EM fornecem indícios sobre a posição na molécula onde ocorreu a adição em cada isômero, e sugerem que: (i) para os isômeros 1 a 3 (Figuras 47A, 47B e 47C) a reação ocorreu no esqueleto principal da LST, provavelmente na ligação dupla exocíclica (C13), que é o sítio mais vulnerável neste caso; e (ii) que para o isômero 4 (Figura 47D) a adição ocorreu na cadeia lateral, provavelmente em C-3' após a abertura do epóxido.

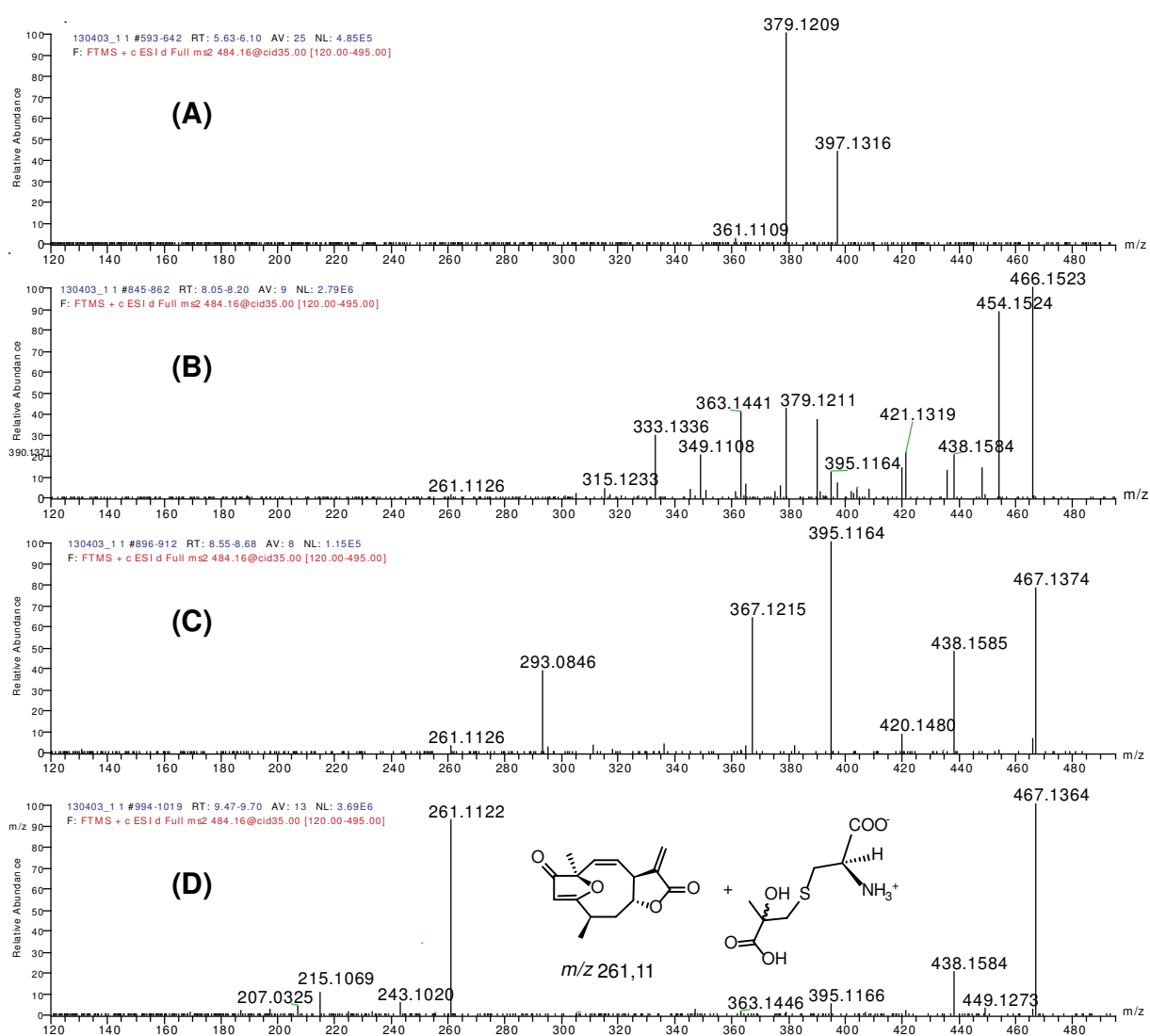


Figura 47. Espectros IES-EM/EM obtidos para os quatro isômeros do aduto de EPOXI + Cys de m/z 484,16 $[M+H]^+$. (A) Isômero 1, (B) Isômero 2, (C) Isômero 3 e (D) Isômero 4.

Estas deduções são feitas principalmente pela presença ou não do íon de m/z 261,11 nos espectros de EM/EM, o qual indica e perda na forma neutra da cadeia lateral adicionada da cisteína. Nos espectros os quais este íon é ausente ou de intensidade muito baixa observa-se um perfil de fragmentação mais complexo, e que é devido à fragmentação da cisteína ligada à LST. Nos casos em que o aminoácido está ligado ao esqueleto principal da LST observa-se que a energia colisional é direcionada de tal modo a favorecer a via de dissociação do aminoácido e não para a eliminação da cadeia lateral, que é o principal mecanismo de fragmentação tanto

da BDL (m/z 375 \rightarrow 275) quanto da EPOXI (m/z 363 \rightarrow 261). Pôde-se observar também que uma vez eliminados os grupos $-\text{COO}^-$ e $-\text{NH}_3^+$ dos adutos (por ação da microbiota) a via de dissociação preferencial para estas substâncias volta a ser a eliminação da cadeia lateral, mesmo que ainda permaneçam na molécula átomos de enxofre ou o grupo $-\text{SCH}_3$.

Os prováveis produtos de metabolismo derivados da ação da microbiota sobre os adutos de EPOXI com uma cisteína estão dispostos na Figura 48. Os respectivos espectros EM são mostrados nas Figuras 49, 50 e 51. Vale lembrar que estas substâncias não foram detectadas nas amostras controle negativo (CD).

4B,5-dihydro-2',3'-epoxy-15-deoxy-goyazensolide + Cys

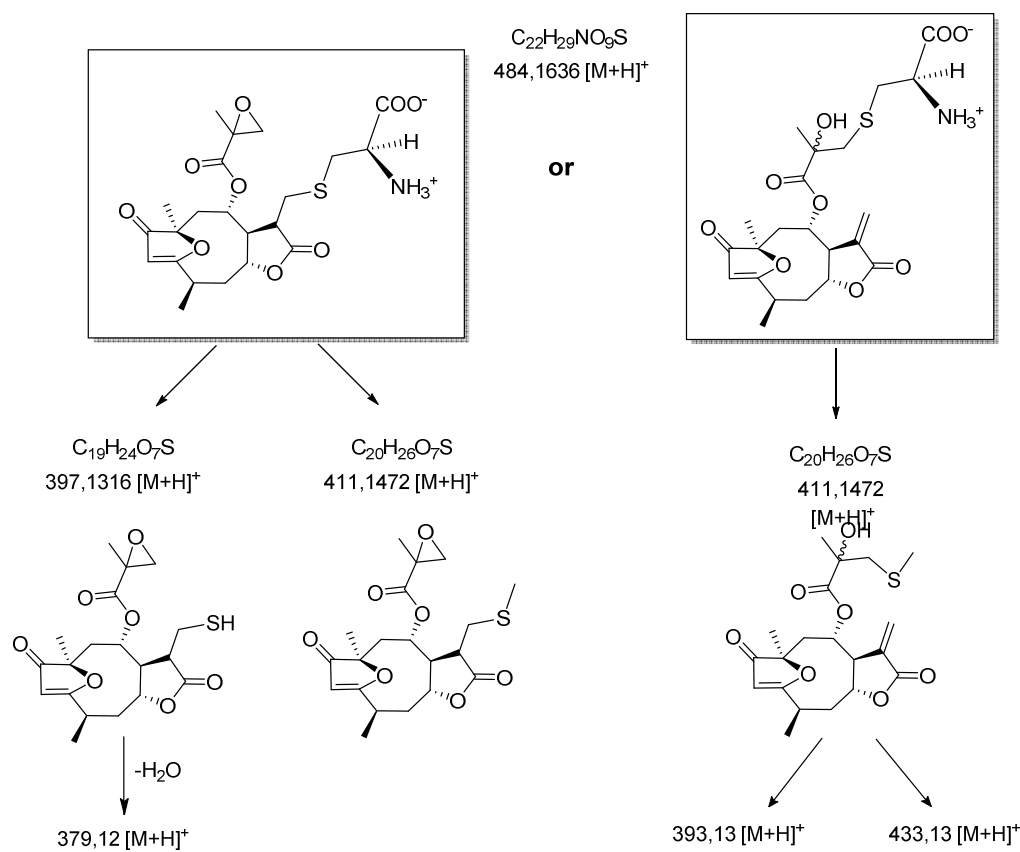


Figura 48. Produtos de degradação obtidos para a substância EPOXI no modelo de ceco de porco à partir do aduto de m/z 484,16 [M+H]⁺

C:\Users\...\Orbitrap\130403\130403_25

4/4/2013 2:52:05 AM

CL11_8h_E_Cys

130403_25 #1131-1140 RT: 10.99-11.06 AV: 5 NL: 2.31E7
F: FTMS + c ESI Full ms [130.00-800.00]

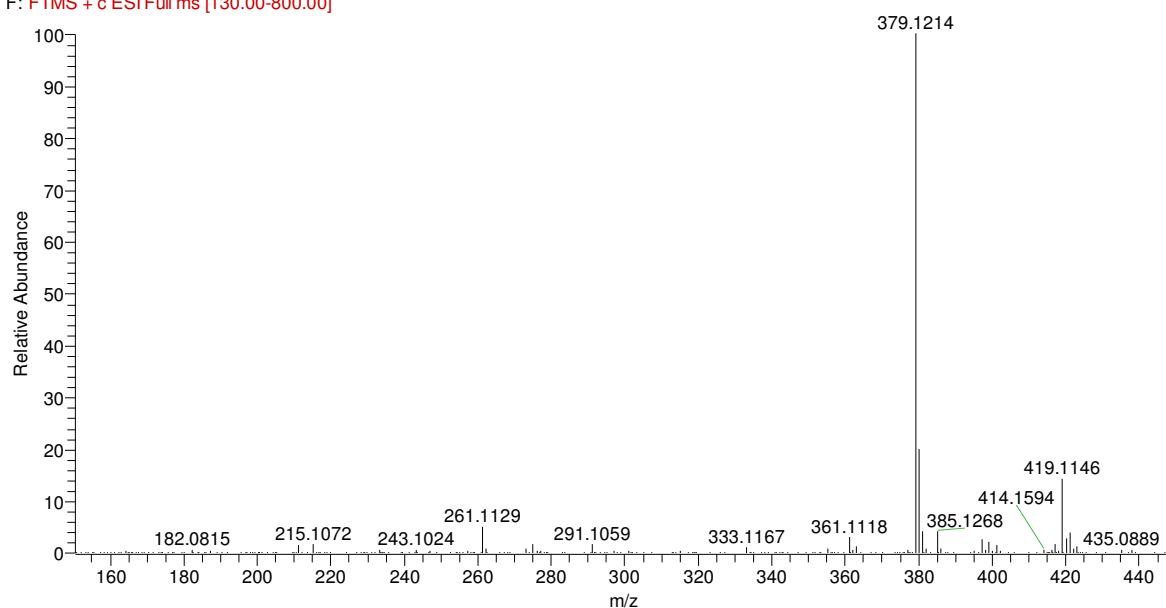


Figura 49. Espectro obtido por IES-EM/EM para o produto de m/z 397,13 $[M+H]^+$.

C:\Users\...\Orbitrap\130403\130403_25

4/4/2013 2:52:05 AM

CL11_8h_E_Cys

130403_25 #652-692 RT: 6.21-6.60 AV: 20 NL: 1.10E5
F: FTMS + c ESI Full ms [130.00-800.00]

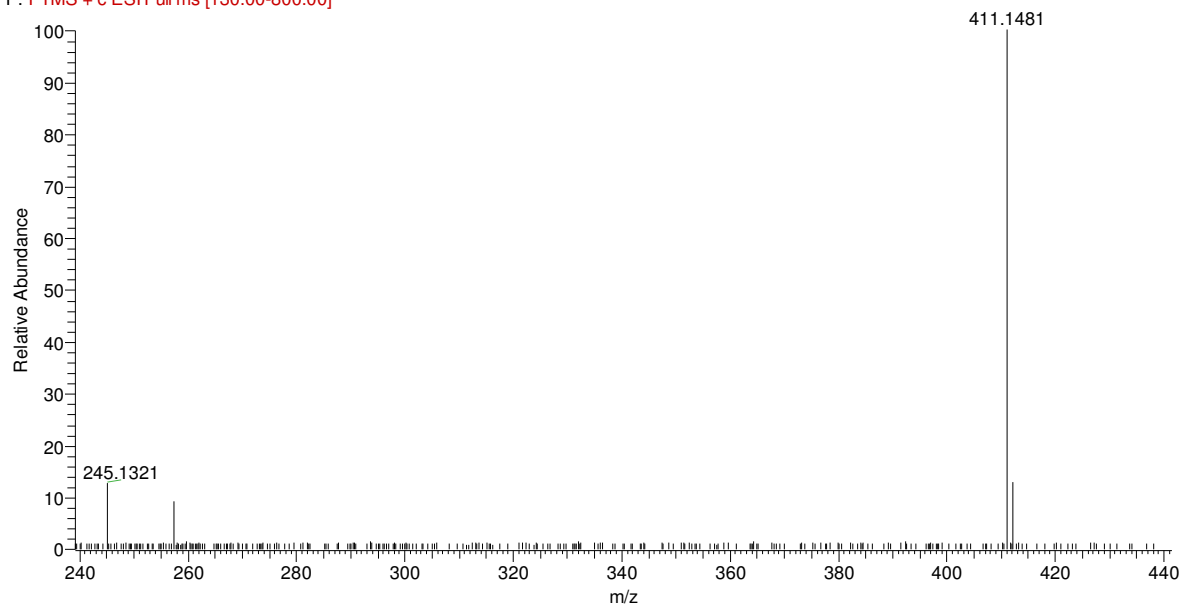


Figura 50. Espectro obtido por IES-EM/EM para o produto de m/z 411,14 $[M+H]^+$ com TR de 6,4 min.

C:\Users\...\Orbitrap\130403\130403_25

4/4/2013 2:52:05 AM

CL11_8h_E_Cys

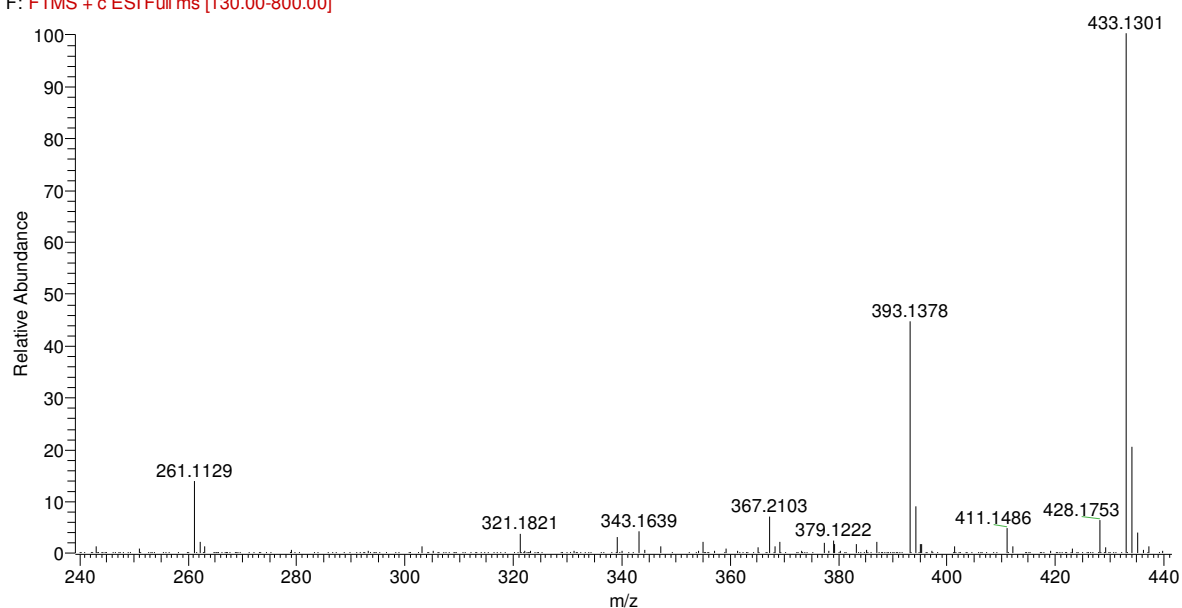
130403_25 #1163-1186 RT: 11.30-11.53 AV: 12 NL: 3.21E6
F: FTMS + c.ESI Full ms [130.00-800.00]

Figura 51. Espectro obtido por IES-EM/EM para o produto de m/z 411,14 $[M+H]^+$ com TR de 11,4 min.

O metabolismo do aduto de EPOXI com duas unidades de cisteína gerou duas substâncias cujas fórmulas moleculares estão apresentadas na Figura 52.

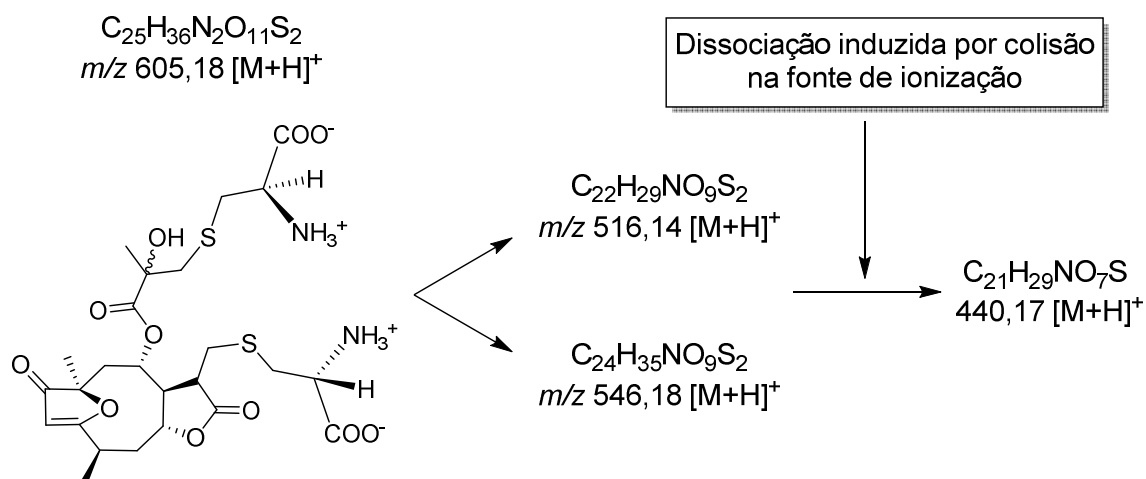


Figura 52. Produtos de metabolismo obtidos pelo modelo de ceco de porco para o aduto de m/z 605,18 $[M+H]^+$

Estes adutos por sua vez sofrem dissociação induzida por colisão na fonte de ionização, tendo ambos como íon fragmento o de m/z 440,17 (Figura 53). Pode-se

concluir que tratam-se de dois metabólitos distintos devido a diferença de TR entre eles, indicativa da diferença de polaridades.

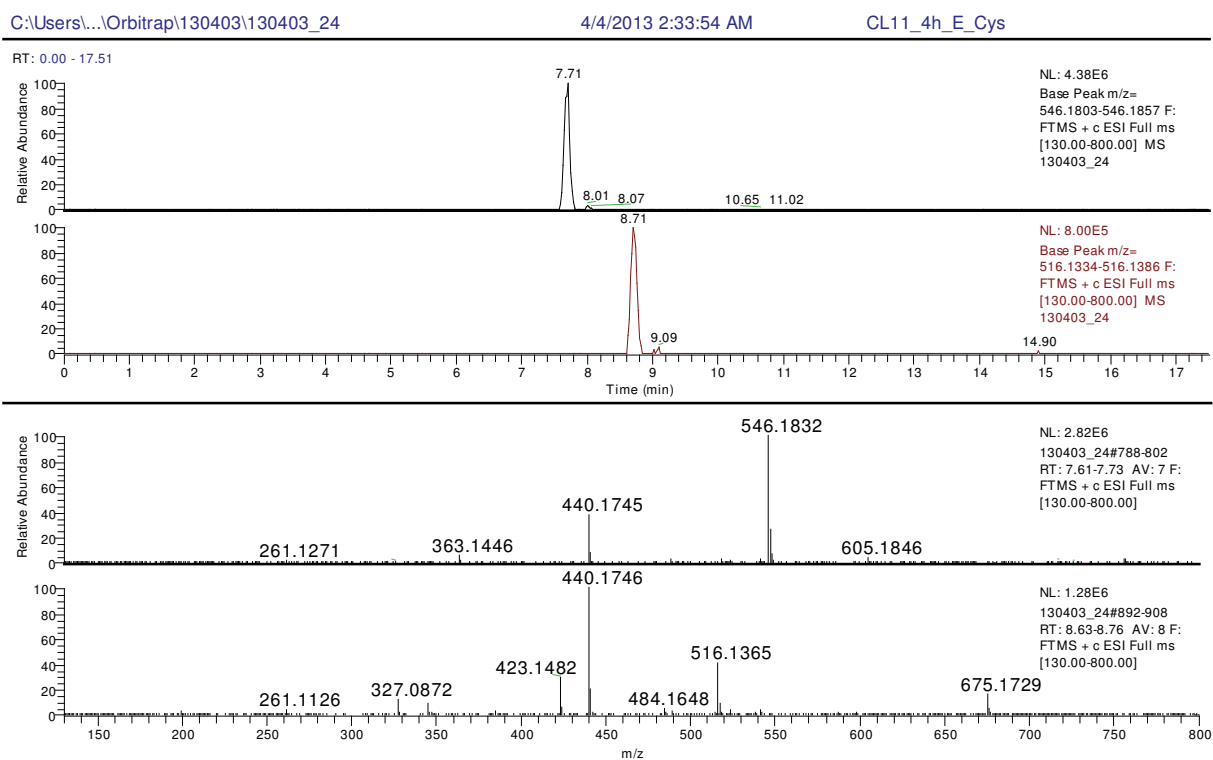


Figura 53. Cromatograma obtido para os produtos de degradação de m/z 546,18 $[M+H]^+$ e m/z 516, 13 $[M+H]^+$

5. CONCLUSÕES

A etapa de extração e isolamento foi realizada com sucesso, obtendo-se rendimento superior à escala de grama para a budleína A com alto grau de pureza, a qual foi devidamente identificada por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

Nos estudos realizados por espectrometria de massas foram obtidos resultados importantes sobre as vias de fragmentação da budleína A, bem como de seu estereoisômero centraterina. A comparação de resultados obtidos em espectrômetros que utilizam fundamentos distintos, aliada aos dados obtidos por métodos computacionais proporcionaram o maior entendimento sobre os mecanismos que governam algumas vias características de lactonas sesquiterpênicas do tipo furanoeliangolido. Vale ressaltar que por meio destes resultados foi possível sugerir uma alternativa à identificação destes isômeros utilizando apenas espectrometria de massas, sem a necessidade de outras técnicas espectroscópicas.

Os ensaios de oxidação biomimética da budleína utilizando metaloporfirina como catalisador promoveram a epoxidação envolvendo os carbonos C-2' e C-3', sendo possível a detecção de dois diastereoisômeros. Entretanto, esta reação mostrou-se lenta, embora a concentração de agente oxidante e catalisador fossem elevadas. Este resultado demonstra a baixa susceptibilidade da budleína A frente a este tipo de reação.

Não foi detectado nenhum produto de metabolização fase 1 da budleína A utilizando-se microssomas hepáticos de ratos e porcos, o que corrobora os resultados obtidos por oxidação biomimética e a indicação de estabilidade da budleína A. Por outro lado, os resultados obtidos neste ensaio para a substância 4 β ,5-dihidro-2',3'-epoxi-15-desoxi-goyazensolido demonstraram a formação de um diol vicinal na cadeia lateral devido a abertura do anel epóxido.

Para os experimentos de metabolização intestinal obteve-se resultados interessantes, pois além de se observar claramente a formação de adutos entre as lactonas sesquiterpênicas utilizadas e o aminoácido cisteína, constatou-se que a microbiota intestinal foi capaz de degradar estes adutos eliminando partes distintas do aminoácido conjugado à molécula de lactona sesquiterpênica, dando origem a

vários produtos de metabolismo, os quais foram detectados por espectrometria de massas.

Desta forma, pode-se afirmar que os objetivos propostos foram atingidos, e que os resultados obtidos poderão contribuir de forma significativa tanto nos estudos relacionados à espectrometria de massas quanto do metabolismo de lactonas sesquiterpênicas.

REFERÊNCIAS

- AKAGAH, B. et al. Oxidation of antiparasitic 2-substituted quinolines using metalloporphyrin catalysts: scale-up of a biomimetic reaction for metabolite production of drug candidates. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 24, p. 4494-4497, 2008.
- ANDREO, M. A. et al. Systematic uplc-esi-ms/ms study on the occurrence of staurosporine and derivatives in associated marine microorganisms from *Eudistoma vancouveri*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 335-343, 2012.
- ARAKAWA, N. S. **Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae)**. 2007. 141 p. (Doutorado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.
- ARAKAWA, N. S. et al. Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: Inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 63, n. 7-8, p. 533-538, 2008.
- AVONTO, C. et al. An NMR spectroscopic method to identify and classify thiol-trapping agents: revival of michael acceptors for drug discovery? **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 50, n. 2, p. 467-471, 2011.
- BAO, H. et al. Shape-controlled assembly of luminescent dumbbell-like CdTe-cystine nanocomposites. **Nanotechnology**, v. 18, n. 45, 2007.
- BAXTER, I.; DILKES, B. P. Elemental profiles reflect plant adaptations to the environment. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1661-1663, 2012.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry . 3. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, 1993.
- BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 346, n. 2-3, p. 171-184, 2004.
- BLECH, S. et al. The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 4, p. 667-678, 2010.
-

BOHLMANN, F. et al. Three furanoheliangolides from *Calea villosa*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2593-2595, 1982.

BOMBARDA, I. et al. Sesquiterpene epoxidation: rearrangement of (+)-ledene epoxy compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1840-1846, 1996.

_____. Spectrometric identifications of sesquiterpene alcohols from niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) essential oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 447, n. 1-2, p. 113-123, 2001.

BOUCHOUX, G. From the mobile proton to wandering hydride ion: mechanistic aspects of gas-phase ion chemistry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 4, p. 505-518, 2013.

BOUCHOUX, G. et al. Structural effects on the intrinsic basicities of alpha,beta-unsaturated lactones and ketones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 24, p. 8439-8448, 1997.

BUSCHMANN, H.; SPRING, O. Sesquiterpene lactones as a result of interspecific hybridization in *Helianthus* species. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 367-371, 1995.

_____. Sesquiterpene lactones of three *Heliomeris* species (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 969-972, 1997.

CHORGHADE, M. S. et al. Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 systems. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 753-756, 1996.

COLL, J. C.; BOWDEN, B. F. The application of vacuum liquid-chromatography to the separation of terpene mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 934-936, 1986.

CROTTI, A. E. M. et al. The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 232, n. 3, p. 271-276, 2004.

CROTTI, A. E. M.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 8, p. 1030-1034, 2005.

CROTTI, A. E. M. et al. Electrospray ionization mass spectrometry: Chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DA COSTA, F. B. et al. Constituents of *Viguiera* species with antibacterial activity. **Fitoterapia**, v. 69, n. 1, p. 86-87, 1998.

_____. Intraspecific variation in the chemistry of glandular trichomes of two brazilian *Viguiera* species (Heliantheae; Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 3, p. 403-407, 2001.

DAI, Z.-L. et al. Metabolism of select amino acids in bacteria from the pig small intestine. **Amino Acids**, v. 42, n. 5, p. 1597-1608, 2012.

DE LUCA, V. et al. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1658-1661, 2012.

DE VIVAR, A. R. et al. The germacranolides of *Viguiera buddleiaeformis* structures of budlein-A and -B. **Phytochemistry**, v. 15, n. 4, p. 525-527, 1976.

DE VOS, R. C. H. et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 778-791, 2007.

DELGADO, G.; ALVAREZ, L.; DE VIVAR, A. R. Terpenoids and a flavan-3-ol from *Viguiera quinqueradiata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 675-678, 1984.

DELGADO, G. et al. Terpenoids from *Viguiera excelsa* and *Viguiera oaxacana*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1042-1045, 1984.

DELGADO, G.; DEVIVAR, A. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones from *Viguiera* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1305-1308, 1982.

DEWAR, M. J. S. et al. The development and use of quantum-mechanical molecular-models .76. Am1 - a new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Wiley, 2009.

DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS. Disponível em :
<http://dnp.chemnetbase.com/intro/index.jsp>. Acesso em 25 Jul. 2013.

DIOSCORIDES, P. **Dioscorides de materia medica: being an herbal with many other medicinal materials : written in Greek in the first century of the common era**. Joanesburgo: Ibdis Press, 2000. 939 p.

EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 78-84, 2001.

FRISCH, M. J. Optimizing large molecules with Gaussian 03. **Chemicke Listy**, v. 100, n. 4, p. A9-A9, 2006.

GARCIA-PINERES, A. et al. Cysteine 38 in p65/NF-kappa B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39713-39720, 2001.

GARCIA-PINERES, A.; LINDENMEYER, M.; MERFORT, I. Role of cysteine residues of p65/NF-kappa B on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and-N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. **Life Sciences**, v. 75, n. 7, p. 841-856, 2004.

GERSHENZON, J.; MABRY, T. J. Furanoheliangolides from *Helianthus schweinitzii*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2557-2559, 1984.

GIBSON, G. G.; SKETT, P. **Introduction to drug metabolism**. Nelson Thornes, 2001.

GOODMAN, L. S. et al. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. McGraw-Hill, 2001.

GUNTER, M. J.; TURNER, P. Metalloporphyrins as models for the cytochromes P-450. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 108, n. 2, p. 115-161, 1991.

HEINRICH, M.; GIBBONS, S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 425-432, 2001.

HEINRICH, M. et al. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 539-565, 1998.

HERZ, W.; KULANTHAIVEL, P. Ent-pimaranes, ent-kauranes, heliangolides and other constituents of 3 *Helianthus* species. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1453-1459, 1984.

HINES, P. J.; ZAHN, L. M. Green pathways introduction. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1657-1657, 2012.

HUACUJA, R. L. et al. Inactivation of SH groups with sesquiterpene lactones: effects on nuclear decondensation pattern/motility induced by heparin in human

spermatozoa. **Advances in Contraceptive Delivery Systems**, v. 9, n. 2-3, p. 97-106, 1993.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")**. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. PUBLICATIONS, B. S. Oxford: IUPAC 1997.

JAKUPOVIC, J.; CASTRO, V.; BOHLMANN, F. Further sesquiterpene lactones from Costa Rican Eupatorieae. **Phytochemistry**, v. 26, n. 2, p. 451-455, 1987.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 536-549, 2010.

_____. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 267-275, 2011.

LEE, C. T.; YANG, W. T.; 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.

LINDENMEYER, M. et al. Sesquiterpene lactones as inhibitors of IL-8 expression in HeLa cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 2487-2497, 2006.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387-396, 2006.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 79-96, 2008.

MACLEOD, T. C. O. et al. Primidone oxidation catalyzed by metalloporphyrins and Jacobsen catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, v. 296, n. 1-2, p. 54-60, 2008.

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.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, v. 10, n. 4-5, p. 392-413, 2007.

MERFORT, I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 11, p. 1560-1573, 2011.

NELSON, D. R. et al. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1-42, 1996.

NICOLETE, R. et al. Budlein A from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 904-915, 2009.

NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em 27 nov. 2013.

OBER, A. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Sesquiterpene lactones of *Calea divaricata* and the molecular-structure of leptocarpin acetate. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 302-306, 1985.

OESCH, F. Importance of knowledge on drug metabolism for the safe use of drugs in humans. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 3, p. 298-300, 2009.

OHNO, N. et al. Diterpene carboxylic acids and a heliangolide from *Helianthus angustifolius*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 10, p. 2393-2396, 1981.

OMURA, T.; SATO, R. Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes:.I. Evidence for its hemoprotein nature. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 7, p. 2370-2378, 1964.

PELLETIER, S. W.; CHOKSHI, H. P.; DESAI, H. K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid-chromatography. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 892-900, 1986.

PEREZ, A. L.; LARA, O.; DEVIVAR, A. R. Sesquiterpenoids and diterpenoids from *Tithonia longiradiata*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4227-4231, 1992.

PIGATTO, M. C. et al. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4245-4251, 2011.

REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2887-2895, 2007.

SACCHETTINI, J. C.; POULTER, C. D. Biochemistry - creating isoprenoid diversity. **Science**, v. 277, n. 5333, p. 1788-1789, Sep 19 1997.

SAKAMOTO, H. T. et al. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 693-695, 2003.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Further sesquiterpene lactones from *Calea* and *Viguiera* species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 9, p. 2019-2022, 1985.

SCHMIDT, T. et al. Helenanolide type sesquiterpene lactones. Part 5: The role of glutathione addition under physiological conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 12, p. 2849-2855, 1999.

SCHMIDT, T. J. Helenanolide-type sesquiterpene lactones .3. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 645-653, 1997.

_____. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 577-608, 1999.

_____. Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. In: ATTA-UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. 33, Part M, p.309-392, 2006.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae. **Botanical Review**, v. 48, n. 2, p. 121-595, 1982.

SHU, X.-H. et al. Identification of metabolic pattern and bioactive form of resveratrol in human medulloblastoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 10, p. 1516-1525, 2010.

SIEDLE, B. et al. Quantitative structure - activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappa B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 24, p. 6042-6054, 2004.

SOHL, C. D.; CHENG, Q.; GUENGERICH, F. P. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. **Nature Protocols**, v. 4, n. 9, p. 1252-1257, 2009.

SPRING, O. Sesquiterpene Lactones from *Helianthus tuberosus*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 519-522, 1991.

SPRING, O.; SCHILLING, E. E. The sesquiterpene lactone chemistry of *Helianthus* sect. *Atrorubentes* (Asteraceae: Heliantheae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 1, p. 59-79, 1991.

SPRING, O.; VARGAS, D.; FISCHER, N. H. Sesquiterpene lactones and benzofurans in glandular trichomes of 3 *Pappobolus* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 1861-1867, 1991.

SPRING, O. et al. Sesquiterpene lactones in *Viguiera eriophora* and *Viguiera puruana* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 55, n. 3, p. 255-261, 2000.

SYKES, P. **A guidebook to mechanism in organic chemistry**, John Wiley & Sons: New York, 1985.

TADA, M. et al. Alternative selective oxidation pathways for aldehyde oxidation and alkene epoxidation on a SiO₂-supported Ru-monomer complex catalyst. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 2, p. 713-724, 2010.

TORRES-VALENCIA, J. M. et al. Absolute configuration of longipinenyl epoxyangelates from three *Stevia* species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2569-2572, 1998.

TORRES-VALENCIA, J. M.; CERDA-GARCIA-ROJAS, C. M.; JOSEPH-NATHAN, P. Stereochemical assignment of 2,3-epoxy-2-methylbutanoate esters in natural products. **Phytochemical Analysis**, v. 10, n. 5, p. 221-237, 1999.

VALÉRIO, D. A. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, n. 1-2, p. 155-163, 2007.

VAN CALSTEREN, M. R. et al. X-ray and high-resolution¹H and¹³C NMR of smooth muscle relaxant sesquiterpene lactones. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 86, n. 12, p. 1077-1084, 2008.

VAN'T SLOT, G. et al. The pig cecum model – a powerful tool for studying the intestinal metabolism of flavonoids. In: PATIL, B. et al. **Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease**. American Chemical Society, 2012, v. 1093, cap. 27, p. 463-486

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. Evaluation of the enthalpy of formation, proton affinity, and gas-phase basicity of gamma-butyrolactone and 2-pyrrolidinone by isodesmic reactions. **Journal of Physical Chemistry a**, p. 4060-4066, 2008.

VESSECCHI, R. et al. Application of computational quantum chemistry to chemical processes involved in mass spectrometry. **Quimica Nova**, p. 840-853, 2008.

VESSECCHI, R. et al. Fragmentation studies and electrospray ionization mass spectrometry of lapachol: protonated, deprotonated and cationized species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, p. 2101-2108, 2010.

VESSECCHI, R. et al. Mass spectrometry nomenclature in portuguese language. **Quimica Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. D.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

ZHAO, N. et al. Studying plant secondary metabolism in the age of genomics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, n. 6, p. 369-382, 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Registro junto ao IBAMA para coleta de material botânico.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 26468-1		Data da Emissão: 01/12/2010 15:44
Dados do titular		
Registro no Ibama: 5153734	Nome: LUCAS ROSSI SARTORI	CPF: 048.524.476-40

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
FAMILIA	Compositae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 52869529

Página 1/1

Anexo 2. Autorização de acesso ao patrimônio genético (CNPq).

2770134586466519

**AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO
PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010174/2011-7**

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO - USP

CNPJ: 630.255.300/0001-04

Representante Legal: MARCO ANTONIO ZAGO

Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa

CPF: 348.967.088-49 **RG:** 3579713

Projeto: Desenvolvimento de uma plataforma para o estudo do metabolismo *in vivo* e *in vitro* de produtos naturais

Coordenador do Projeto: Norberto Peporine Lopes

CPF: 099.034.918-75 **RG:** 173554180 - SSP / SP

Finalidade do projeto: Estudo do metabolismo de produtos naturais: ferramenta para auxiliar na compreensão e definição de efeitos benéficos e tóxicos.

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): *Actinocephalus aggregates*, *Actinocephalus bongardii*, *Actinocephalus cabralensis*, *Actinocephalus ciliatus*, *Actinocephalus denudatus*, *Actinocephalus divaricatus*, *Acritopappus longifolius*, *Actinocephalus herzogii*, *Actinocephalus polyanthus*, *Actinocephalus ramosus*, *Ageratum fastigiatum*, *Bidens* sp, *Blastocaulon prostratum*, *Blastocaulon scirpeum*, *Crotalaria micans*, *Crotalaria pallida*, *Eremanthus* sp, *Eupatorium* sp, *Eythrina mulungu*, *Ipomoea chiliantha*, *Indigofera truxillensis*, *Leiothrix schlechtendalii*, *Lychnophora* sp, *Mikania* sp, *Orquidaceae* sp, *Piper* sp, *Paepalanthus ater*, *Paepalanthus bromelioides*, *Paepalanthus distichophylus*, *Paepalanthus graomogolensis*, *Paepalanthus leucocephalus*, *Paepalanthus rigidulus*, *Paepalanthus scleranthus*, *Peterocaulon* sp., *Picrolemma sprucei*, *Philodice offmannseggii*, *Riedeliella graciliflora*, *Syngonanthus dealbatus*, *Syngonanthus elegantulus*, *Syngonanthus vernonioides*, *Senna* sp, *Solidago chilensis*, *Trichilia catiguá*, *Tabebuia* sp, *Wedelia* sp, *Vernonia* sp, *Viguera Robusta*, *Virola surinamensis*.

Tipo de material/quantidade de amostras: Espécies comercialmente cultivadas serão adquiridas diretamente dos produtores como por exemplo ou comprá-las de produtores, como por exemplo espécies de *Piper*, *Mikania*, *Trichilia catiguá* e *Eythrina mulungu*. Quando não houver essa possibilidade as coletas serão em torno de meio quilo de material.

Local de depósito de subamostra: DEPARTAMENTO DE BOTANICA

Equipe do projeto: NORBERTO PEPORINE LOPES / CPF 099.034.918-75

JOAO LUIS CALLEGARI LOPES / CPF 242.694.688-15

LEONARDO GOBBO NETO / CPF 260.985.118-96

JOAO SEMIR / CPF 416.569.038-49

DIONEIA CAMILO RODRIGUES DE OLIVEIRA / CPF 244.653.721-91

JOSE NORBERTO CALLEGARI LOPES / CPF 015.379.628-68

THAIS GUARATINI / CPF 278.586.568-56

ADRIAN MARTIN POHLIT / CPF 148.079.648-44

LUIZ ELIDIO GREGORIO / CPF 267.891.418-63

CARLOS ALEXANDRE CAROLLO / CPF 931.181.121-15

DANIEL ROBERTO CALLEJON / CPF 276.102.618-74

GISELE BARALDI MESSIANO / CPF 289.234.958-32

DAYANA RUBIO GOUVEA / CPF 326.851.028-09

MICHAEL NIEHUES / CPF 234.471.638-60
LUCAS ROSSI SARTORI / CPF 048.524.476-40
DENISE BRENTAN DA SILVA / CPF 936.622.971-91
FERNANDA PERES FERREIRA / CPF 060.873.946-48

Validade da Autorização: 26/04/2011 a 15/04/2015

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010174/2011-7. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 26 de Abril de 2011

Paulo Sergio Lacerda Beirao
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 2770134586466519 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

Anexo 3. Método analítico utilizado em CG-MS.

NPPNS - Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP/USP



Method

[Comment]

===== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

Column Oven Temp. :120.0 °C
 Injection Temp. :250.00 °C
 Injection Mode :Split
 Flow Control Mode :Linear Velocity
 Pressure :91.8 kPa
 Total Flow :15.4 mL/min
 Column Flow :1.12 mL/min
 Linear Velocity :39.8 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :10.0
 High Pressure Injection :OFF
 Carrier Gas Saver :ON
 Carrier Gas Saver Split Ratio :5.0
 Carrier Gas Saver Time :1.00 min
 Splitter Hold :OFF
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	120.0	5.00
10.0	300.0	25.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes

< Ready Check APC Flow >

< Ready Check Detector APC Flow >

External Wait :No
 Equilibrium Time :2.0 min

[GCMS-QP2010]

IonSourceTemp :250.00 °C
 Interface Temp. :290.00 °C
 Solvent Cut Time :3.00 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :0.00 kV
 Threshold :1000

[MS Table]

Group : 1
 Start Time :3.50min
 End Time :48.00min
 ACQ Mode :Scan
 Interval :0.30sec
 Scan Speed :1250
 Start m/z :50.00
 End m/z :400.00

Sample Inlet Unit☒ :GC