UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização estrutural, atividade hepatoprotetora e
metabolismo *in vitro* de alcaloides 3-aminoespirostanos de
raízes de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae)**

Matheus Coutinho Gazolla

**Ribeirão Preto
2020**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização estrutural, atividade hepatoprotetora e
metabolismo *in vitro* de alcaloides 3-aminoespirostanos de
Solanum paniculatum L. (Solanaceae)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Matheus Coutinho Gazolla

Coorientador: Dr. Lucas Maciel Mauriz Marques

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 22/06/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

Gazolla, Matheus Coutinho

Caracterização estrutural, atividade hepatoprotetora e metabolismo *in vitro* de alcaloides 3-aminoespirostanos de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae). Ribeirão Preto, 2020.

56 p.; 30 cm.

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

Orientador: Lopes, Norberto Peporine

1. 3-aminoespirostando; 2. jurubidina; 3. espectrometria de massas; 4. atividade hepatoprotetora; 5. metabolismo *in vitro*;

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus Coutinho Gazolla

Caracterização estrutural, atividade hepatoprotetora e metabolismo *in vitro* de alcaloides 3-aminoespirostanos de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Coorientador: Dr. Lucas Maciel Mauriz Marques

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, Márcio Coutinho, que me ensinou a aprender.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e proteção constantes em todos os momentos.

Aos meus pais Júnior e Adriana e irmãos Victor e Bruno, que mesmo distantes foram fonte de incentivo e suporte, me permitindo correr atrás dos meus objetivos e realizar meus sonhos.

A todos os meus avós, tios e primos que sempre enviaram boas energias e se preocuparam com o andamento da pesquisa.

À Mariana, meu amor, pelo apoio, companheirismo, paciência e por estar sempre ao meu lado.

Ao Betão, pela grande oportunidade de crescimento e aprendizagem, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e pela paciência e confiança depositada durante minha trajetória.

Ao Lucas Maciel Mauriz Marques, por também aceitar a missão de me orientar e por todos os ensinamentos sobre metabolismo.

Ao Rodrigo Moreira da Silva, pela ajuda e ensinamentos nos experimentos de reações biomimética com catalisador de Jacobsen.

Ao Prof. Ricardo Vessecchi Lourenço, pela ajuda nos cálculos realizados por química computacional.

Ao Prof. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira por disponibilizar seu laboratório e ao aluno Icaro Salgado Perovani por toda ajuda na realização dos experimentos de metabolismo *in vitro* com microssomas hepáticos e todo o grupo do Laboratório de Metabolismo e Técnicas de Separação (LAB-METS).

Ao Prof. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, sua aluna Mariana Gama e Silva e todo o grupo do Núcleo de Estudos e Pesquisa de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) pela realização dos experimentos de atividade hepatoprotetora.

Aos técnicos Tomaz, Jacque e Cris por toda a paciência no ensinamento nas técnicas e pela amizade.

A todos os amigos do NPPNS, pela companhia diária, pelas discussões (nem sempre) científicas, conselhos e momentos de descontração.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) pelo grande conhecimento passado nas disciplinas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processos 2017/19330-1 e 2014/50265-3 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

EPÍGRAFE

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.”

Paulo Freire

RESUMO

GAZOLLA, M. C. **Caracterização estrutural, atividade hepatoprotetora e metabolismo *in vitro* de alcaloides 3-aminoespirostanos de raízes de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae).** 2020. 75 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A espécie *Solanum paniculatum* L. é popularmente conhecida como jurubeba e utilizada na medicina popular brasileira para tratamento de disfunções gástricas e prevenção de doenças hepáticas. A produção de alcaloides esteroidais é marcante nas plantas do gênero *Solanum* e nessa espécie destacam-se os 3-aminoespirostanos. Apesar de serem atribuídas diversas atividades biológicas a essa espécie, são raros os estudos que abordam a fitoquímica e as propriedades medicinais especificamente dos 3-aminoespirostanos. O conhecimento da toxicologia dessa classe também é escasso e modelos de ensaios *in vitro* tem sido aplicado de forma ampla. Quando associados a técnicas de determinação estrutural como a espectrometria de massas, esses modelos fornecem informações seguras a respeito dos possíveis produtos gerados. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e propor as principais vias de fragmentação em fase gasosa pro *electrospray* dos alcaloides esteroidais 3-aminoespirostanos, realizar ensaios de atividade hepatoprotetora *in vivo* e avaliar os possíveis metabólitos formados. Para observar a formação de metabólitos empregou-se reações que mimetizam o processo oxidativo do sistema citocromo P-450 utilizando catalisadores biomiméticos e pela biotransformação utilizando microssomas de rato. As raízes de jurubeba foram coletadas, secas e submetidas a maceração obtendo o extrato bruto (SP-EB). Foi realizada uma extração ácido-base, resultando na fração enriquecida de alcaloides (SP-FA). A partir dessa fração, foram identificados sete alcaloides esteroidais da classe 3-aminoespiroстано, sendo quatro ainda não relatados na literatura. Com o auxílio de química computacional, foi definido todo o perfil de fragmentação em fase gasosa dessa classe. SP-EB e SP-FA foram avaliados quanto a hepatoproteção *in vivo*, apresentando resultados promissores. Através de técnicas cromatográficas, foi realizado o isolamento da jurubidina, que ao ser analisada nos ensaios de metabolismo *in vitro* evidenciou a formação de um metabólito putativo. Esse trabalho proporcionou reportarmos a presença de quatro novos derivados de 3-aminoespirostanos e contribui para entendimento das reações de fragmentação desta classe em fase gasosa. Além disso, comprova a atividade hepatoprotetora dessa espécie e lança bases para uma melhor compreensão do metabolismo dos alcaloides esteroidais.

Palavras-chave: 3-aminoespiroстано; jurubidina; espectrometria de massas; atividade hepatoprotetora; metabolismo *in vitro*;

ABSTRACT

GAZOLLA, M. C. **Structural characterization, hepatoprotective activity and *in vitro* metabolism of 3-aminospirostanes alkaloids from roots of *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae).** 2020. 75 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The species *Solanum paniculatum* L. is popularly known as jurubeba and used in Brazilian folk medicine to treat gastric disorders and prevent liver disease. The production of steroidal alkaloids is remarkable in plants of the genus *Solanum* and in this species the 3-aminospirostanes stand out. Although several biological activities are attributed to this species, studies that address phytochemistry and medicinal properties specifically of 3-aminospirostanes are rare. Knowledge of the toxicology of this class is also scarce and *in vitro* test models have been widely applied and when associated with structural determination techniques such as mass spectrometry, they provide reliable information about the possible products generated. In this context, this work aimed to characterize and propose the main gas electrospray fragmentation pathways of steroidal alkaloids 3-aminospirostanes, perform tests of hepatoprotective activity *in vivo* and evaluate the possible metabolites formed through the reactions that mimic the oxidation by the system cytochrome P-450, using biomimetic catalysts and by biotransformation using rat microsomes. The jurubeba roots were collected, dried and submitted to maceration, obtaining the crude extract (SP-EB). An acid-base extraction was performed, resulting in the enriched fraction of alkaloids (SP-FA). From this fraction, seven steroidal alkaloids of the class 3-aminospirostane were identified, four of them unpublished. With the aid of computational chemistry, the entire gas-phase fragmentation profile of this class was defined. SP-EB and SP-FA were evaluated for hepatoprotection *in vivo*, showing promising results. Through chromatographic techniques, the isolation of jurubidine was performed, which when analyzed in *in vitro* metabolism assays showed the formation of a putative metabolite in the presence of iodozilbenzene. This work provided the discovery of four new substances and contributes to mass spectrometry studies for the class of 3-aminospirostanes. In addition, it proves the hepatoprotective activity of this species and lays the foundations for a better understanding of the metabolism of steroidal alkaloids.

Keywords: 3-aminospirostane; jurubidine; mass spectrometry; hepatoprotective activity; *in vitro* metabolism;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias com potencial terapêutico isoladas a partir de produtos naturais: (1) morfina; (2) codeína; (3) atropina; A salicilina (4) é a precursora do ácido salicílico (5) e do ácido acetilsalicílico (6).	2
Figura 2. Estrutura química da α -solasonina, indicando nomenclatura dos anéis e numeração dos átomos de alcaloides esteroidais.....	4
Figura 3. Estrutura base das três principais classes de alcaloides esteroidais: 3-aminoespirostano (1), solanidano (2) e espirossolano (3).....	4
Figura 4. Etapa inicial da síntese de alcaloides esteroidais	5
Figura 5. Proposta biossintética da formação de alcaloide espirossolano 22 <i>R</i> . Adaptado de Dewick, 2002.....	5
Figura 6. Proposta biossintética da formação de alcaloides solanidanos 22 <i>S</i> . Adaptado de Dewick, 2002.....	6
Figura 7. Proposta biossintética da formação de alcaloides solanidanos 22 <i>R</i> . Adaptado de Dewick, 2002.....	6
Figura 8. Proposta biossintética da formação de alcaloides espirostano. Organizada com base na figura publicado por Dewick, 2002.....	7
Figura 9. Jurubeba localizada no <i>campus</i> da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto/SP. Foto obtida pelo autor.	9
Figura 10. Representação do isolamento da fração microssomal hepática para utilização em estudo de metabolismo <i>in vitro</i> . Tradução de Sinz, 2012.....	16
Figura 11. Representação esquemática da extração ácido-base dos alcaloides.....	20
Figura 12. Valores séricos de ALT observados em cada grupo de animais. Os dados estão expressos como média $\pm$ d.p. ^a p < 0,05 quando comparado ao grupo controle e ^b p < 0,05 quando comparado com o grupo Vitamina E.	27
Figura 13. Valores séricos de AST observados em cada grupo de animais. Os dados estão expressos como média $\pm$ d.p.....	28

Figura 14. Análise histopatológica dos animais do grupo controle (A), controle negativo (B), controle positivo (C), SP-EB 100 mg/kg (D), SP-EB 200 mg/kg (E), SP-FA 100 mg/kg (F) SP- FA 200 mg/kg. CV: veia central; Hc: célula hepática; S: sinusoide. Kc: Célula de Kupffer (Aumento de 100 x).	29
Figura 15. Cromatograma da fração alcaloídica de <i>S. paniculatum</i>	30
Figura 16. Alcaloides esteroidais identificados na fração alcaloídica de <i>S. paniculatum</i>	31
Figura 17. Espectro de massas sequencial (MS ⁴) de jurubidina. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	32
Figura 18. Via de fragmentação da jurubidina suportada por química computacional. Valores de afinidade protônica (cima) e basicidade da fase gasosa (itálico). Valores abaixo das estruturas são dados em energia relativa de Gibbs e entalpias relativas, respectivamente. Todos os valores estão em kcal mol ⁻¹ e calculados usando o modelo B3LYP/6-31+G(d).....	33
Figura 19. Espectro de massas sequencial (MS ⁴) de jurubina. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	34
Figura 20. Proposta de fragmentação da jurubina	35
Figura 21. Espectro de massas sequencial (MS ⁵) de isojuripidina. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	36
Figura 22. Proposta de fragmentação da isojuripidina	36
Figura 23. Espectro de massas sequencial (MS ³) da substância 2. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	37
Figura 24. Proposta de fragmentação da substância 2	38
Figura 25. Espectro de massas sequencial (MS ⁴) da estrutura química 3. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	38
Figura 26. Espectro de massas sequencial (MS ⁴) da substância 4. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	39

Figura 27. Espectro de massas sequencial (MS^5) da substância 6. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	39
Figura 28. Proposta de fragmentação da substância 3	39
Figura 29. Proposta de fragmentação da substância 4	40
Figura 30. Proposta de fragmentação da substância 6	40
Figura 31. Cromatograma da fração 22. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.....	41
Figura 32. Espectro de massas sequencial (MS^2) do sinal em 22,7 min da fração 22. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons	42
Figura 33. O sinal em 5,7 min corresponde a jurubidina; O sinal em 7,0 corresponde ao metabólito putativo majoritário; Controle (vermelho); Iodozilbenzeno (azul);	42
Figura 34. Espectro de massas sequencial (MS^5) do metabólito putativo formado. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons	43
Figura 35. Cromatogramas do experimento de metabolismo <i>in vitro</i> com microssomas hepáticos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente utilizado como fase móvel para análise das frações de SP-FA	24
Tabela 2. Peso corporal e hepático dos animais durante 7 dias antes da injeção intraperitoneal de CCl ₄	27
Tabela 3. Alcaloides esteroidais identificados na fração alcaloídica de <i>S. paniculatum</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
ALT	Alanina aminotransferase
AP	Afinidade protônica
AST	Aspartato aminotransferase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CV	Veia central
Da	Dalton
dp	Desvio padrão
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GB	Basicidade/Acidez em fase gasosa
HC	Célula hepática
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
KC	Célula de Kupffer.
MCPBA	Ácido Metacloroperbenzóico
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS ⁿ	<i>Multiple-stage mass spectrometry</i>
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NA-TFA	Ácido trifluoroacético sodiado
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
PhIO	Iodozilbenzeno
rpm	Rotações por minuto
S	Sinusoide
ESI	Electrospray
Sisgen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SP-EB	Extrato bruto de <i>Solanum paniculatum</i>

SP-FA	Fração alcaloídica de <i>Solanum paniculatum</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Produtos naturais como fonte de fármacos.....	1
1.2 Família <i>Solanaceae</i> e o gênero <i>Solanum</i>	3
1.3 Alcaloides esteroidais.....	3
1.4 <i>Solanum paniculatum</i> L.....	8
1.5 O metabolismo de xenobióticos	10
1.6 Estudos de metabolismo <i>in vitro</i>	11
1.6.1 Modelo oxidativo biomimético	12
1.6.1.1 Metaloporfirinas	13
1.6.1.2 Catalisador de Jacobsen	15
1.6.2 Modelo de microssoma hepático	15
1.7 A química computacional no contexto da espectrometria de massas	17
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção do material vegetal.....	19
3.2 Extração ácida e partição e obtenção da fração alcaloídica	19
3.3 Caracterização química por HRMS e MS/MS	20
3.4 Modelos computacionais utilizados para os estudos de fragmentação ..	21

3.5	Isolamento dos alcaloides de <i>S. paniculatum</i>	22
3.6	Efeito hepatoprotetor <i>in vivo</i> da fração alcaloídica e extrato bruto	22
3.7	Metabolismo <i>in vitro</i> com metaloporfirinas	24
3.8	Metabolismo <i>in vitro</i> com microssomas hepáticos	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Extrato bruto e fração enriquecida de alcaloides.....	26
4.2	Atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i>	26
4.3	Identificação dos alcaloides esteroidais e propostas de perfil de fragmentação.....	30
4.4	Isolamento de alcaloides.....	41
4.5	Ensaio de metabolismo <i>in vitro</i> com metaloporfirinas.....	42
4.6	Ensaio de metabolismo <i>in vitro</i> com microssomas hepáticos.....	43
5.	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS.....	46
6.	APÊNDICES.....	53
6.1	Artigo publicado no Rapid Communications in Mass Spectrometry	53
7.	ANEXOS	54
7.1	Cadastro no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - Sisgen	54
7.2	Aprovação de protocolo experimental nº 0013/021014, pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais como fonte de fármacos

Os produtos naturais oriundos de plantas são utilizados por milhares de anos para o tratamento de enfermidades. Os registros mais antigos são de 2.500 a.C. vindos da Mesopotâmia, que comprovam o uso de óleo de cedro (*Cedrus sp.*), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.), cápsula de papoula (*Papaver somniferum* L.), entre muitos outros derivados de drogas vegetais. (SNEADER, 2005)

Entretanto, a busca por componentes ativos em plantas medicinais foi alavancada a partir do século XIX com o isolamento da morfina (1) e codeína (2) da papoula, a atropina (3) de *Atropa belladonna* L. e digoxina de *Digitalis purpurea* L. O grande marco histórico no desenvolvimento da indústria farmacêutica ocorreu em 1832: a descoberta da salicilina (4) extraída das cascas de salgueiro branco (*Salix alba* L.). A partir desse composto foi possível obter o ácido salicílico (5) e posteriormente o ácido acetilsalicílico (6), fármaco mundialmente conhecido como aspirina. Essa foi a primeira patente de medicamento da história realizada pela *Bayer*® indústria farmacêutica. (SNEADER, 2005). (Figura 1).

Revisões feitas por Newman e Cragg (2000, 2007, 2012, 2016) mostram que cerca de 30% dos medicamentos presentes no mercado tem seu princípio ativo de origem natural, seja ele derivado, análogo, obtido por semissíntese ou pelo menos foi inspiração para a síntese de novas entidades químicas. (NEWMAN; CRAGG, 2007, 2012, 2014, 2016). É estimado que o mercado global apenas de fitoterápicos, que são os medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, tenha atingido 20 bilhões de dólares anuais. (DUTRA, 2016)

Em virtude dos avanços obtidos na seleção, isolamento e elucidação estrutural de compostos, é crescente o interesse pela pesquisa em produtos naturais. Além disso, a enorme biodiversidade mundial, sobretudo do Brasil que hospeda em torno de 45.000 espécies vegetais (20-26% do total existente planeta), também motiva pesquisas nesta área. Portanto, essa fonte é continuamente explorada na busca de substâncias bioativas candidatas a fármacos. (BARREIRO e BOLZANI, 2009), (ZAPPI, 2015)

Figura 1. Substâncias com potencial terapêutico isoladas a partir de produtos naturais: (1) morfina; (2) codeína; (3) atropina; A salicilina (4) é a precursora do ácido salicílico (5) e do ácido acetilsalicílico (6).

Contudo, todo esse potencial e a riqueza da flora brasileira podem acarretar um sério problema de saúde pública. Em virtude da cultura e da facilidade de acesso à chamada “medicina popular”, diversas espécies nativas são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e sem nenhum controle de qualidade. Apesar dos possíveis benefícios relatados, é importante ressaltar que efeitos tóxicos e interações medicamentosas não são exclusividade de medicamentos industrializados e também são frequentes em fitoterápicos. Dessa forma, o consumo de produtos naturais de procedência desconhecida muitas vezes coloca a saúde do usuário em risco. (VEIGA; ANGELO, 2005), (ROE, 2016) (EKAR, 2019)

1.2 Família *Solanaceae* e o gênero *Solanum*

A família *Solanaceae* compreende cerca de 115 gêneros e 2.400 espécies de angiospermas que estão distribuídas em todos os continentes, exceto a Antártica. (DUPIN, 2017), Esse clado é composto por várias espécies de interesse econômico, pois inclui culturas agrícolas importantes para a sociedade como a batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), pimentas (*Capsicum* spp.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), além de plantas ornamentais como as do gênero *Petunia* spp.. (HE, 2019) A semelhança entre proteínas encontradas nas espécies dessa família com a de protozoários e helmintos faz com que sejam utilizadas como modelo de muitos estudos de biologia molecular. (MAIA, 2011)

Algumas espécies do gênero *Solanum* se protegem contra insetos e herbivoria produzindo metabólitos secundários que são tóxicos, oferecendo risco para saúde humana dependendo da quantidade ingerida. (ROMANUCCI, 2018)

Com mais de 1.200 espécimes registrados e aceitos, as plantas pertencentes ao gênero *Solanum* representam mais da metade da família *Solanaceae*. O perfil químico é caracterizado pela presença flavonoides, esteroides, saponinas e principalmente alcaloides, terpenos e glicoalcaloides.

1.3 Alcaloides esteroidais

Uma importante classe de metabólitos secundários presente no gênero *Solanum* são os alcaloides esteroidais. Também chamada de saponinas esteroides básicas ou glicoalcaloides quando ligados a açúcar, funcionam como um marcador químico do gênero. Em linhas gerais, os alcaloides esteroidais observados na família *Solanaceae* são baseados em um esqueleto C-27 colestano e de acordo com as características do núcleo esteroidal, é possível dividir a classe em três principais grupos. (Figura 2). (DEWICK, 2002), (SIMÕES, et al., 2004)

Os compostos 3-aminoespirostanos (1) são derivados do espiroetano e possuem uma amina primária em C-3. Os compostos solanidanos (2) apresentam nitrogênio terciário entre os anéis E e F, sendo também conhecidos como indolizinas. Os

espirossolanos (3) como a solasodina e a tomatidina, possuem o nitrogênio secundário no anel F, caracterizando um sistema oxa-azaespirodecano. (DEWICK, 2002) (Figura 3).

Figura 2. Estrutura química da α -solasonina, indicando nomenclatura dos anéis e numeração dos átomos de alcaloides esteroidais

Figura 3. Estrutura base das três principais classes de alcaloides esteroidais: 3-aminoespirostano (1), solanidano (2) e espirossolano (3)

Estudos com incorporação de precursores marcados demonstram que assim como as saponinas, os alcaloides esteroidais são biossintetizados a partir do colesterol (via do acetato-mevalonato). O colesterol é hidroxilado em C-26, levando à formação do

26-hidroxicolesterol. Em seguida, ocorre uma transaminação na mesma posição, sendo inserida uma amina primária de vinda de uma L-arginina. (Figura 4)

Figura 4. Etapa inicial da síntese de alcaloides esteroidais

A etapa seguinte é decisiva na rota biossintética, pois de acordo com a estereoquímica de C-22 após uma hidroxilação, uma das classes de alcaloides esteroidais tem a formação favorecida. A conformação *22R* condiciona a via biossintética à formação de um *22R*-espirossolano como a solasodina. A conformação *22S* pode levar à biossíntese de um *22S*-espirossolano ou de um solanidano, conforme a descrição a seguir.

a) **22R-espirossolano:** A partir do 26-amino-22*R*-hidroxicolesterol, em uma substituição nucleofílica intramolecular, o grupo amina causa uma cicização com formação de anel piperidínico. Após uma hidroxilação em C-16, a amina secundária é oxidada a imina, permitindo uma adição nucleofílica da hidroxila, gerando um *22R* espirossolano como a solasodina (Figura 5).

Figura 5. Proposta biossintética da formação de alcaloide espirossolano 22*R*. Adaptado de Dewick, 2002

b) 22S-espirossolano: O 26-amino-22S-hidroxicolesterol sofre uma substituição nucleofílica da hidroxila pela amina gerando o anel piperidínico, seguida de uma hidroxilação em C-16. A amina é oxidada e ocorre permitindo uma adição nucleofílica com formação, gerando um 22S-espirossolano como a tomatidina. (Figura 6)

Figura 6. Proposta biossintética da formação de alcaloides solanidanos 22S. Adaptado de Dewick, 2002.

c) 22R-Solanidano: assim como um 22S-espirossolano, a formação de um alcaloide solanidano parte do 26-amino-22S-hidroxicolesterol, seguida de substituição nucleofílica com ciclização e hidroxilação em C-16. A grande diferença é uma nova substituição nucleofílica que parte da amina secundária, levando a formação de um sistema indolizínico, em que dois anéis condensados compartilham o nitrogênio. (Figura 7)

Figura 7. Proposta biossintética da formação de alcaloides solanidanos 22R. Adaptado de Dewick, 2002.

Os compostos com núcleo espirossolano podem existir na configuração $22R$, $25R$ como a solasodina ou $22S$, $25S$ como a tomatidina. Nos compostos com núcleo solanidano, o nitrogênio pertence aos dois anéis E e F, simultaneamente, sendo também conhecidos como indolizinas. Os solanidanos tem a configuração $22R$, $25S$ estando a metila do carbono 25 em posição equatorial. (SCHENKEL in SIMÕES, 2004)

A toxicidade de alcaloides esteroidais como a α -solanina e α -chaconina, que são derivados glicosilados da solanidina, gera preocupação pois diversas plantas que acumulam esses metabólitos são consumidas como alimento. Os alcaloides inibem a acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, rompendo membranas celulares causando sintomas de vômito e sialorreia. As maiores concentrações são encontradas em flores e nos brotos, seguido pelas folhas e em baixas quantidades nos caules, raízes e tubérculos. Isso justifica a sabedoria popular que recomenda não consumir batatas quando estão com coloração esverdeada, pois isso revela uma alta produção não só de clorofila, mas também de solanina em virtude de novos brotamentos.

Figura 8. Proposta biossintética da formação de alcaloides espirostanos. Organizada com base na figura publicado por Dewick, 2002.

A sub-classe dos 3-aminoespirostanos ou derivados da jurubidina, são as menos frequentes na família *Solanaceae*, mas são marcadores na espécie *S.paniculatum* L. A biossíntese também se baseia no esqueleto C27 colestano que sofre uma série de reações de oxigenação, causando a hidroxilação em C-16 e em seguida produzindo uma cetona em C-22. (Figura 8) Ainda não é evidente a forma em que a amina é posicionada em C-3, mas acredita-se que o grupo funcional seja proveniente de um aminoácido. (DEWICK, 2002)

1.4 *Solanum paniculatum* L.

Solanum paniculatum L., é uma espécie popularmente conhecida no Brasil como jurubeba. Planta nativa da América do Sul, é empregada de diversas formas na medicina popular. Os estudos sobre os benefícios da jurubeba foram compilados por naturalistas europeus desde o século XIX, incluindo o famoso botânico alemão C.F.P. von Martius. (BREITBACH, et. al., 2013)

A espécie é reconhecida pelo Ministério da Saúde como erva prioritária a ser explorada no contexto farmacológico, especialmente pelas preparações utilizando raízes e caules que são indicadas para o tratamento de distúrbios digestivos e hepáticos. (RENISUS, 2017) Estudos etnofarmacológicos também revelam que diferentes partes de *S. paniculatum* são utilizadas no tratamento de anemia, tuberculose, malária, hipertensão e distúrbios renais, e um agente antifebril (RIOS, et al., 2017) (AGRA, et al., 2007) (ALBUQUERQUE, et al., 2007).

Investigações fitoquímicas anteriores das raízes de *S. paniculatum* mostraram predominância de esteroides, saponinas e alcaloides. (MESIA-VELA, et al., 2002) Os principais alcaloides esteroidais relatados foram jurubidina, jurubina e solanina. (SCHREIBER, et al., 1965) (VIEIRA, et al., 2013) Estudos farmacológicos indicam que o extrato de raízes de *S. paniculatum* foi capaz de inibir a secreção gástrica em camundongos ligados ao piloro, além de ser eficaz contra úlcera induzida por estresse em camundongos, atividades relacionadas à alta concentração de alcaloides esteroidais de 3-aminospiroetano. (MESIA-VELA, et al., 2002) Outras atividades biológicas como

antiviral, anti-inflamatório e cinco diferentes efeitos anticarcinogênicos foram descritos. (VALADARES, et al., 2010) (RIOS, et al., 2017) (ENDRINGER, et al., 2010)

Mesmo com todo o potencial farmacológico, a composição química de *S. paniculatum* ainda não é totalmente conhecida, mas é destaque a presença de alcaloides esteroidais nas raízes tanto como agliconas quanto associados a açúcares formando glicoalcaloides (RIOS et al., 2017). Essas substâncias têm função importante na defesa natural das plantas pois são capazes de desestabilizar membranas biológicas e proteger o vegetal de bactérias e fungos (DAHLIN et al., 2017). Apesar do amplo uso popular dessa espécie para tratamento de disfunções hepáticas, ainda não existem comprovações científicas dessa atividade farmacológica, tampouco estudos que incluem os ensaios de absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Figura 9. Jurubeba localizada no *campus* da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto/SP. Foto obtida pelo autor.

1.5 O metabolismo de xenobióticos

O metabolismo ou biotransformação compreende uma série de reações bioquímicas catalisadas por enzimas inespecíficas, as quais promovem alterações na estrutura química da substância, dentro do organismo (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008). As alterações na estrutura química têm como intuito a eliminação da substância do organismo, através de líquidos corpóreos, tais como bile, urina e suor. O processo de metabolização torna a substância mais polar e hidrofílica, favorecendo sua eliminação (JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005; LAINE, 2008).

As reações de metabolização são divididas em duas fases:

- Fase I: compreendem as reações de oxidação, redução e hidrólise, as quais tornam as substâncias mais polares através da inserção de grupamentos hidroxilas, sulfidrilas, aminas ou carboxilas (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008).
- Fase II: compreendem as reações de conjugação (glicuronidação, metilação, acetilação), nas quais ocorrem a incorporação de cofatores endógenos às substâncias que já passaram pela etapa de Fase I de biotransformação (JANCOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2010).

As reações de fases I e II podem ocorrer em vários tecidos do organismo, como rim, pulmão, intestino delgado e pele, entretanto, o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo no organismo (THUMMEL; KUNZE; SHEN, 1997).

Nas reações de fase I existem várias enzimas responsáveis pela biotransformação de substâncias, todavia as enzimas do sistema citocromo P-450 são as principais enzimas envolvidas nesta fase de metabolização (LOHMANN; KARST, 2008). Através da utilização de oxigênio molecular, as enzimas do CYP 450 catalisam a inserção de um átomo de oxigênio em um substrato e a formação de água a partir do outro átomo de oxigênio (LOHMANN; KARST, 2008). Além de participar da biotransformação, as enzimas do CYP 450 participam ainda da biossíntese de hormônios esteroides e prostaglandinas (COSTAS, 2011).

A reação de oxidação realizada pelas enzimas do CYP 450 é responsável pela desintoxicação de diversos xenobióticos do organismo, os quais são compostos químicos estranhos ao organismo, tais como medicamentos, pesticidas, poluentes, dentre outros (SANTOS, et al, 2011) (REEDIJK; BOUWMAN, 1999); (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997):

As reações de fase II também são importantes para a biotransformação de substâncias endógenas e xenobióticos, as quais são responsáveis pela inativação metabólica da ação farmacológica. Além disso, nesta etapa de biotransformação, os xenobióticos normalmente tornam-se substâncias mais hidrofílicas devido à reação de conjugação com moléculas endógenas, como ácido glicurônico e ácido sulfúrico. Consequentemente, após a conjugação, os xenobióticos são mais facilmente excretados do organismo. (JANCOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2010).

A enzima de maior participação nas reações de fase II é a glicuroniltransferase, responsável pela conjugação do ácido glicurônico com substrato, seguida da sulfotransferase, responsável pela conjugação do ácido sulfúrico com substrato (EVANS; RELLING, 1999). Além destas enzimas, podemos citar N-acetiltransferase (acetilação) e glutathione-S-transferase (conjugação com glutathione) (JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005).

1.6 Estudos de metabolismo *in vitro*

Várias metodologias foram desenvolvidas com o objetivo de mimetizar as reações de fase I e II que são promovidas no fígado, sendo que os principais modelos biológicos são os microsomas hepáticos, fração citosólica de fígado e fração S9 de fígado (SINZ, 2012).

Outra metodologia utilizada para mimetizar as reações de fase I envolve a utilização de catalisadores organometálicos como metaloporfirinas e/ou catalisador de Jacobsen e de agentes oxidantes. Este modelo, denominado modelo oxidativo biomimético do sistema citocromo P-450, merece destaque, pois diversos protocolos já utilizados, demonstraram a possibilidade de obtenção de possíveis metabólitos também formados *in vivo* (LOHMANN; KARST, 2008; COSTAS, 2011).

Ensaio de metabolismo *in vitro* devem ser avaliados e estudados anteriormente aos ensaios clínicos para obtenção de dados farmacocinéticos, como distribuição, metabolismo e excreção e informações referentes às possíveis interações e atividades biológicas da substância a ser testada. Estas informações prévias são importantes para conhecimento toxicológico da substância e de seus possíveis metabólitos para verificar a viabilidade de sua utilização como medicamento e para condução adequada dos ensaios clínicos com seres humanos, os quais são normalmente longos e dispendiosos (GESEF; ANVISA, 2013).

Durante o desenvolvimento de um novo medicamento, os estudos de metabolismo podem auxiliar na identificação de grupos funcionais da estrutura do fármaco que possam ser vulneráveis às reações de metabolização, estabelecer a identidade química e toxicidade de possíveis metabólitos, além de fornecer produtos com maior atividade do que o próprio fármaco (PEARSON; WIENKERS, 2008).

Uma ferramenta bastante útil utilizada nos estudos de metabolismo é a espectrometria de massas, pois esta técnica auxilia na identificação dos produtos formados na metabolização do xenobiótico, além de apresentar sensibilidade e especificidade. Com esta técnica é possível pesquisar na amostra analisada, compostos prováveis de ocorrerem na metabolização, como por exemplo produtos oxidados ou hidratados; realizar a identificação do metabólito através da comparação dos perfis de fragmentação e da avaliação da acurácia de massas (PRASAD, et al, 2011).

1.6.1 Modelo oxidativo biomimético

As reações oxidativas envolvendo o uso de metaloporfirinas e/ou ligantes de Salen como catalisadores organometálicos podem simular reações de Fase I de biotransformação catalisadas pelo CYP 450. Por esta razão são utilizadas como modelo *in vitro* para avaliação do metabolismo e denominadas de reações oxidativas biomiméticas ou modelo oxidativo biomimético (ROCHA, et al, 2014; NIEHUES, et al, 2012; COSTAS, 2011).

A principal vantagem deste modelo, quando comparado com modelos biológicos, é o maior rendimento de metabólitos oxidados, o que facilita o isolamento em maior

escala e a identificação estrutural. Outros pontos favoráveis deste modelo são a reprodutibilidade das reações, a redução da utilização de animais e menor custo (BERNADOU; MEUNIER, 2004).

Como o isolamento de enzimas do sistema citocromo P-450 possui um custo elevado, a utilização de modelos sintéticos, como metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen, é uma alternativa interessante para o estudo do processo de oxidação de diversos xenobióticos (SANTOS, et al, 2011).

As reações oxidativas biomiméticas possuem os seguintes constituintes: o substrato (substância a ser avaliada), um agente oxidante (por exemplo, ácido cloroperbenzóico, iodosilbenzeno) e o catalisador (metaloporifina ou ligante de Salen) (MEUNIER; BERNADOU, 2002; LOHMANN; KARST, 2008).

Estudos realizados por nosso grupo (NPPNS – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos) demonstraram correlação entre os metabólitos obtidos em diferentes ensaios *in vitro*, como modelo biomimético com metaloporifirina e ensaio de microssomas hepáticos (SANTOS; LOPES, 2008; GOUVEA, 2013), além da correlação entre metabólito obtido em ensaios *in vitro* e posteriormente em ensaio *in vivo* (NIEHUES, et al., 2012; DE SANTIS FERREIRA, et al., 2012), reforçando, desta maneira, a importância da utilização de modelos *in vitro*, para avaliação da rota de metabolismo de um composto.

1.6.1.1 Metaloporfirinas

As metaloporfirinas são utilizadas nos modelos biomiméticos de reação de oxidação de xenobióticos, pois apresentam estrutura química similar à ferroportofirina IX, a qual está presente no sítio ativo das enzimas do CYP 450, local em que acontece a ligação do oxigênio molecular, posteriormente utilizado na oxidação dos xenobióticos (COSTAS, 2011; LOHMANN; KARST, 2008).

As metaloporfirinas são constituídas por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metileno e possuem em seu centro um metal, que pode ser ferro (Fe), manganês (Mn) ou rutênio (Ru) em substituição aos dois átomos centrais de hidrogênio do anel

porfirínico. O tamanho do átomo do metal influencia na conformação do anel e na estabilidade da metaloporfirina (SCHAAB, 2008).

A primeira geração de metaloporfirinas possui o substituinte fenil na posição meso-arílica, representada como tetrafenil-porfirina (TPP) (Groves et al., 1979). Entretanto, uma desvantagem destas metaloporfirinas é a rápida degradação oxidativa no meio reacional proporcionando um número limitado de sítios catalíticos para as reações (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; LOHMANN; KARST, 2008).

A segunda geração destes catalisadores contém adicionalmente grupamentos retiradores de elétrons ou átomos eletronegativos, como cloro e flúor, ligados ao substituinte fenil das posições meso-arílicas do anel porfirínico. As substâncias meso-tetrakis (2,6-diclorofenil) manganês-porfirina (MnTDCPP) e cloreto de meso-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina-ferro (FeTFPPCl) são exemplos de metaloporfirinas de segunda geração. Esta modificação proporcionou redução da degradação destes catalisadores e aumento da sua reatividade (COSTAS, 2011).

Nas metaloporfirinas de terceira geração há ainda a inserção de átomos de halogênios nas posições β -pirrólicas como, por exemplo, meso-tetrakis (2,6- diclorofenil)-octabromo porfirina (Br8TDCPP), meso-tetrakis (2,6-diclorofenil)- β -octacloro porfirina (Cl8TDCPP) e meso-tetrakis (pentafluorofenil)-octafluor porfirina (F8TPFPP). O elevado grau de halogenação nestes catalisadores promove largas mudanças positivas no par redox Fe (III)/(II), proteção da porfirina contra danos oxidativos, além de selar a estrutura macrolítica (COSTAS, 2011).

A porfirina ferro (metaloporfirina com átomo de ferro no centro) tem papel importante como catalisador eficaz em reações de redução-oxidação. As porfirinas ferro contendo substituintes halogenados, como a metaloporfirina utilizada neste estudo – cloreto de 5,10,15,20 Tetrakis (pentafluorofenil) porfirina-ferro (FeTFPPCl), são particularmente eficientes para reações de hidroxilação e epoxidação (KACZMARZYK et al., 2014).

1.6.1.2 Catalisador de Jacobsen

O composto denominado catalisador de Jacobsen também é utilizado em modelos biomiméticos de reação de oxidação de xenobióticos (MAC LEOD, 2005). Apesar de apresentar estrutura química diferente das metaloporfirinas, é similar quanto à estrutura eletrônica e atividade catalítica (MAC LEOD, 2008).

Este catalisador organometálico apresenta estrutura tetradentada e possui como ligantes dois nitrogênios e dois oxigênios. Apresenta ainda, os substituintes terc-butil e cicloexil (WECK, HOLBACH, 2006)

O fato do metal estar próximo ao centro estereogênico do complexo, possibilita que o catalisador de Jacobsen atue como um modelo para reações assimétricas, ou seja, para reações enantiosseletivas que possam gerar produtos estereoisômeros (enantiômeros e diastereoisômeros) em quantidades desiguais (VENKATARAMANAN, KUPPURAJ, RAJAGOPAL, 2005). Esta reação favorece a formação de um estereoisômero específico.

As vantagens deste catalisador quando comparado com as metaloporfirinas são estabilidade do complexo, obtenção por síntese em larga escala e de baixo custo. Este catalisador é utilizado na obtenção de epoxidação enantiosseletiva de oleofinas (WECK, HOLBACH, 2006).

A epoxidação que ocorre quando utilizado o catalisador de Jacobsen está relacionada com a estereoquímica do complexo e com a formação de um oxo complexo $MnV=O$ (GILHEANY, MCGARRIGLE, 2004). Desta maneira, a utilização deste catalisador é interessante para a obtenção de produtos epóxidos.

1.6.2 Modelo de microssoma hepático

O estudo de metabolismo *in vitro* pode ser também avaliado através da catálise biológica utilizando microssomas hepáticos. Este estudo é realizado através da incubação do substrato com o precipitado de microssoma ressuspendido em tampão, na presença de cofatores (BRANDON, et al., 2003).

O precipitado microssomal é obtido através da homogeneização de tecido do fígado e posterior centrifugação diferencial, conforme demonstrado na Figura 10. Resumidamente, inicia-se o procedimento com arrefecimento do fígado excisado com tampão, à temperatura de 4 °C, para assegurar a estabilidade das enzimas. O fígado então é homogeneizado em tampão com banho de gelo e centrifugado para remoção de células inteiras, restos celulares e núcleos. Posteriormente o sobrenadante é centrifugado para separação de organelas indesejáveis, como mitocôndrias e lisossomos. Após nova centrifugação é possível obter um precipitado, correspondente à fração de microssomas (SINZ, 2012).

Figura 10. Representação do isolamento da fração microssomal hepática para utilização em estudo de metabolismo *in vitro*. Tradução de Sinz, 2012

O precipitado microssomal é a fração sub-celular mais utilizada para a avaliação o metabolismo *in vitro* de fármacos, pois neste modelo há presença das enzimas

envolvidas nas reações de Fase I e II, tais como as enzimas do sistema citocromo P-450 e glicuroniltransferase (SINZ, 2012).

O modelo de microssoma hepático é considerado um dos melhores sistemas *in vitro* para avaliação da biotransformação de fármacos, especialmente por fornecer informações relevantes sobre os possíveis metabólitos a serem formados e avaliados em estudos *in vivo*, os quais são onerosos e demorados (BRANDON, et al., 2003).

1.7 A química computacional no contexto da espectrometria de massas

Desde a década de 80, diversos métodos experimentais foram utilizados para a determinação dos valores de basicidade ou acidez em fase gasosa (GB) e afinidade protônica (AP), como por exemplo, calorimetria, métodos de equilíbrio, método cinético e a ressonância ciclotrônica de íons. As grandes limitações dessas análises experimentais, são as propriedades físico-químicas das moléculas estudadas, como a termolabilidade e isomerização, além da possibilidade de presença de impurezas, ou estados onde não há equilíbrio. (FATTAHI, 2006)

Em virtude dessas limitações, os métodos computacionais vem sendo cada vez mais aplicados para obtenção de tais parâmetros, através de modelos que fornecem dados termoquímicos cada vez mais próximos dos experimentais. (ZHAO, 2008) O emprego de modelos teóricos fornece informações em nível molecular que contribuem para melhor interpretação e refinamento dos resultados experimentais.

A aplicação da química computacional na obtenção de grandezas termoquímicas para os estudos de espectrometria de massas vem sendo uma ferramenta praticamente indispensável. A combinação entre as diferentes técnicas de espectrometria e cálculos teóricos possibilitou estudos na caracterização de novas estruturas, predição de isômeros estáveis, estimativa das energias relativas formulação dos possíveis mecanismos de reação, obtenção das entalpias de formação dos intermediários em cada etapa do possível mecanismo, dentre outras grandezas termoquímicas. Dessa forma, os modelos computacionais teóricos servem como suporte na interpretação dos sítios de protonação e nas proposições das diferentes reações que ocorrem em sistemas de ionização por eletrospray.

2. OBJETIVOS

Inicialmente, o objetivo inicial desse estudo foi avaliar de maneira detalhada o metabolismo *in vitro* dos alcaloides esteroidais de *Solanum paniculatum* L. Contudo, durante o desenvolvimento do projeto foi perceptível a carência de informações de outros aspectos relativos à espécie como por exemplo o perfil químico das raízes de jurubeba, a compreensão das reações em fase gasosa dos alcaloides esteroidais e sua aplicação na identificação de homólogo. Além disso ficou clara a necessidade da comprovação da atividade hepatoprotetora *in vivo*. Ao final, optamos por tornar o objetivo mais amplo e abrindo perspectivas para a maior compreensão do uso dessa espécie medicinal.

Dessa forma, os objetivos específicos deste estudo foram:

- a.** Identificar os alcaloides esteroidais presentes nas raízes de *Solanum paniculatum* L.;
- b.** Analisar as reações em fase gasosa dos alcaloides esteroidais por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) e sua aplicação na identificação estrutural;
- c.** Avaliar a atividade hepatoprotetora *in vivo* do extrato bruto e dos alcaloides esteroidais presentes nessa espécie;
- d.** Isolar e determinar a estrutura dos alcaloides esteroidais majoritários presentes no extrato;
- e.** Realizar os ensaios de oxidação biomimética e microssomas hepáticos dos alcaloides isolados e determinar os possíveis produtos formados;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As raízes de *Solanum paniculatum* foram coletadas nos arredores da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP) da Universidade de São Paulo (21°10'30" S 47° 50' 49" W). Uma exsicata foi confeccionada e depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP) sob o número SPFR 17669. A permissão de acesso e pesquisa ao patrimônio genético foi obtida através do cadastro no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (Apêndice 1).

Após a coleta, as raízes foram lavadas com água corrente para a remoção da terra aderida e posteriormente colocadas para secagem em estufa de ar circulante a 45 °C durante 7 dias. Após secagem, as raízes foram trituradas em moinho de facas (Solab, modelo SL-32) e submetidas a extrações exaustivas por maceração com solução de MeOH:H₂O na proporção 8:2 (v/v). Após a evaporação dos solventes sob pressão reduzida em aparelhos de rota-evaporação (Buchi modelo R-124), foi obtido o extrato bruto de *S. paniculatum*.

3.2 Extração ácida e partição e obtenção da fração alcaloídica

A obtenção da fração enriquecida de alcaloides foi realizada através da extração ácido-base do extrato bruto, conforme ilustrado na figura 10 (CHEENPRACHA *et al.*, 2016). O extrato foi solubilizado em solução de ácido clorídrico 1% e adicionado o solvente orgânico acetato de etila (AcOEt) em funil de separação. Após agitação do sistema, a solução aquosa foi recolhida e em seguida alcalinizada com solução de NH₄OH até atingir o pH 10, aferido por papel indicador universal. Em seguida, foi novamente adicionado AcOEt e realizada uma nova extração, sendo recolhida a fase orgânica. A fim de remover qualquer resíduo de água, foi utilizado Na₂SO₄ anidro, obtendo-se a fração enriquecida de alcaloides após filtração. (Figura 11)

Figura 11. Representação esquemática da extração ácido-base dos alcaloides.

3.3 Caracterização química por HRMS e MS/MS

O extrato bruto e a fração enriquecida de alcaloides foram submetidos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas (HPLC-MS). Cerca de 2 mg de cada amostra foi solubilizada em 2 mL de MeOH, obtendo-se a concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 1 mL foi retirada com auxílio de seringa, filtrada em microfiltro de acetato de celulose 0,45 μm (Millipore) e transferida para um frasco de vidro.

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento de HPLC (Shimadzu), composto por bombas de alta pressão modelo LC-20AD, degaseificador DGU-20A5, módulo de comunicação CBM-20A e forno para coluna modelo CTO-20A. As injeções foram realizadas automaticamente (10 μL). Utilizou-se a coluna cromatográfica Luna C18 100 Å (250 mm x 4.6 mm, 5 μm , *Phenomenex*). A fase móvel

utilizada foi um gradiente de ACN e água, ambos com 1% de ácido fórmico (v/v), que iniciava com 5% de MeOH e atingia 100% em 40 minutos, a uma vazão de 1 mL min⁻¹.

Para as análises em alta resolução, o espectrômetro de massas utilizado foi o modelo micrOTOF QII-IES-TOF (Bruker Daltonics). Uma solução de Na-TFA (ácido trifluoroacético sodiado) na concentração de 10 mg mL⁻¹ foi empregada como calibrante. Os espectros foram adquiridos operando em modo positivo, sendo utilizadas as seguintes condições de análise: voltagem do capilar 3,5 kV, voltagem do cone 450 V, temperatura da fonte e dessolvatação 220 °C, a uma vazão de 9,0 L min⁻¹ e pressão de 4,5 bar. Foi utilizado gás nitrogênio, tanto para nebulização como para secagem, com energia de colisão entre 25-62,5 eV.

Nas análises por espectrometria de massas de múltiplos estágios (MSⁿ), os espectros foram adquiridos no equipamento amaZon-SL (Bruker Daltonics), com analisador de armadilha de íons também em modo positivo. Os parâmetros ESI-MS/MS foram: voltagem do capilar de 3,5 kV; temperatura da fonte de dessolvatação de 330 °C; fluxo de gás 2,0 L min⁻¹. Os espectros foram analisados até o quinto estágio de fragmentação (MS⁵) a partir de um método não direcionado foi empregado, em que o analisador selecionava os três íons mais intensos para fragmentação com 0,8 V de amplitude.

A faixa de análise escolhida foi de 50 a 1300 *m/z* em ambos equipamentos. O processamento dos espectros adquiridos foi realizado no *software* Bruker Compass DataAnalysis 4.3.

3.4 Modelos computacionais utilizados para os estudos de fragmentação

Estudos computacionais são uma importante ferramenta que combinada aos resultados obtidos em IES-EM/EM, colaboram na proposição do sítio de protonação e das reações em fase gasosa. Os mecanismos de dissociação dos alcaloides foram propostos, assim como as principais vias de fragmentação com base em conceitos de reatividade química e descritores químico-quânticos de algumas propriedades intrínsecas aos estudos de espectrometria de massas (VESSECCHI et al., 2008). Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Vessecchi do

Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP).

Os sítios de protonação foram sugeridos através do cálculo de afinidade protônica e basicidade em fase gasosa no modelo B3LYP/6-31+G(d,p) utilizando o *software* Gaussian 03. (BECKE, et al., 1996 e KORN et al. 1998). Os mecanismos de fragmentação da jurubidina foram computados no mesmo modelo.

3.5 Isolamento dos alcaloides de *S. paniculatum*

A fração alcaloídica obtida a partir do extrato bruto foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD), fazendo uso de diferentes fases móveis contendo hexano, acetato de etila, clorofórmio e acetona, buscando a condição que proporcionaria a melhor separação dos metabólitos após a eluição. As placas contendo sílica como fase estacionária foram analisadas em UV (254 e 365 nm), além do uso de reveladores universais a base de vanilina e anisaldeído sulfúrico.

Uma alíquota da fração alcaloídica (1,0 mg) foi submetida à cromatografia líquida em coluna clássica de vidro com 100 mm de diâmetro, preenchida sílica gel Sigma-Aldrich (60-230 µm). A fase móvel de escolha foi a mistura de clorofórmio e metanol em grau crescente de polaridade e foi coletada 100 mL de cada fração.

Após a coleta, as frações obtidas foram analisadas por CCD e reunidas conforme a semelhança do perfil apresentado e em seguida analisadas por HPLC-MS/MS.

3.6 Efeito hepatoprotetor *in vivo* da fração alcaloídica e extrato bruto

Buscando comprovar o uso popular de jurubeba para prevenção e tratamento de doenças hepáticas, foi realizado o efeito hepatoprotetor *in vivo* da fração enriquecida de alcaloides e do extrato bruto das raízes. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva na Universidade do Vale do São Francisco (UNIVASF), em Petrolina/PE.

Foram utilizados trinta e cinco camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos (6-8 semanas, 30-40 g) no Biotério da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura

controlada (22 ± 2 °C). Os animais tiveram acesso livre à água e a ração foi retirada após a administração do tetracloreto de carbono (CCl_4). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIVASF sob número de protocolo 0013/021014. (Apêndice 2)

Os animais foram divididos em 7 grupos com 5 animais cada:

- Grupo 1 - controle: animais sem qualquer tratamento, com livre acesso a ração e água
- Grupo 2 – controle negativo: os animais receberam somente o veículo (solução fisiológica) (10 mL/kg, via oral - v.o.) diariamente durante 7 dias.
- Grupo 3 – controle positivo: os animais foram tratados com vitamina E (100 mg/kg (v.o.) diariamente durante 7 dias antes da intoxicação por CCl_4 .
- Grupo 4 e 5: os animais foram tratados diariamente com as doses de 100 e 200 mg/kg (v.o.) do extrato bruto
- Grupo 5 e 6: os animais foram tratados diariamente com as doses de 100 e 200 mg/kg (v.o.) da fração alcaloídica

Após os sete dias de tratamento, o grupo 1 recebeu uma injeção intraperitoneal de azeite de oliva (10 mL/kg) e os grupos 2 ao 7 receberam uma solução de 10% de CCl_4 em azeite de oliva (10 mL/kg). Após o procedimento, os animais foram submetidos a jejum de 18 h com livre acesso à água.

Após esse período, os animais foram pesados e sacrificados por meio de anestesia com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e coleta de sangue mediante ruptura do plexo braquial. O soro foi obtido através de centrifugação do sangue coletado a 3000 rpm durante 10 minutos e acondicionado a 4 °C para avaliação sérica das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase).

Após a coleta de sangue, o fígado dos animais foi imediatamente removido, pesado e, em seguida, uma porção do lobo direito colocada em solução de formalina a 10% durante 24 h para as análises histopatológicas (TOLOSA et al., 2003). Posteriormente, esses órgãos foram embebidos em parafina, seccionados e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina para análise em microscopia óptica.

Os dados obtidos foram avaliados utilizando o software *Graph Pad Prism* versão 6.0 (San Diego, CA, EUA) por análise variância (ANOVA) one-way seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.7 Metabolismo *in vitro* com metaloporfirinas

As reações de oxidação foram realizadas em frascos de vidro âmbar de 4,5 mL de capacidade. Para cada reação, utilizou-se o PhIO (iodozilbenzeno) e o mCPBA (ácido metacloroperbenzóico) como doadores de oxigênio. Em frascos separados, foram pesados o catalisador e o agente oxidante. Posteriormente, no frasco de 4,5 mL contendo o substrato, foi adicionado o catalisador, completou-se o volume para 4 mL e efetuou-se a adição do respectivo doador de oxigênio. O frasco então foi vedado e a reação se processou por 24 h sob agitação magnética.

Também foram realizados os controles, com as mesmas condições que as reações de oxidação biomimética, porém sem a presença do catalisador e os brancos reacionais, que continham o sistema reacional sem o substrato.

A proporção dos reagentes utilizados nas reações foi de 1:30:30 (NIEHUES et al., 2012) ou seja, 1 μ mol de catalisador ([Fe(TPP)Cl], 30 μ mol de oxidante (PhIO ou mCPBA) e 30 μ mol de jurubidina.

As reações foram realizadas e então analisadas por HPLC-MS/MS em coluna cromatográfica Luna C18 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 μ L. A fase móvel utilizada foi um gradiente de ACN e H₂O acidificadas com ácido fórmico. (Tabela 1).

Tabela 1. Gradiente utilizado como fase móvel para análise das frações de SP-FA

Tempo (min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
0	5	95
5	30	70
30	60	40
35	100	0
40	5	95

3.8 Metabolismo *in vitro* com microssomas hepáticos

Os ensaios de metabolismo *in vitro* com microssomas hepáticos foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP).

O meio microssomal foi composto por 0,003 mg e 0,009 mg de jurubidina, 50 μL da fração microssomal do fígado de rato a 4 mg mL^{-1} e 50 μL de sistema de geração de NADPH contendo 2,5 mmol L^{-1} , 50 mmol L^{-1} e 8,0 U mL^{-1} de NADP^+ , glicose-6-fosfato de sódio e glicose-6-fosfato desidrogenase respectivamente. O volume do meio de incubação foi completado com solução tampão fosfato (pH 7,4; 100 mmol L^{-1}) para 200 μL em frascos do tipo eppendorf.

A incubação foi realizada a 37 °C, em banho-maria, modelo SL 157 (Solab) durante 90 minutos. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi encerrada ao adicionar-se 600 μL do solvente orgânico extrator acetato de etila. A extração foi realizada com auxílio de agitador orbital durante 20 minutos a 1000 rpm. Após esta etapa, centrifugaram-se os eppendorfs a 1000 g durante 30 minutos a 5 °C. Após essa etapa, 500 μL do sobrenadante foi retirado e transferido para outro eppendorf. Por fim, as amostras foram evaporadas até secagem sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos secos foram ressuspensos em 100 μL de fase móvel e levados para análise por HPLC-MS/MS.

Amostras controles foram preparadas contendo microssomas inativos e sem o sistema de regeneração de NADPH, amostras-branco também foram realizadas sem adição de jurubidina. Ambas foram submetidas ao mesmo procedimento de incubação anteriormente descrito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extrato bruto e fração enriquecida de alcaloides

Após secagem em estufa, as raízes de *S. paniculatum* foram pesadas, totalizando 500 g. Em seguida, foi realizada a extração por maceração, que resultou em 12,5 g de extrato bruto (SP-EB) após a remoção de solvente. O rendimento alcançado foi de 2,5 % (m/m).

A partir da obtenção de SP-EB, foi definido o método de extração que priorizasse a seleção dos alcaloides presentes no extrato. A presença de um átomo de nitrogênio com par de elétrons desemparelhados, atribui diferentes solubilidades a essa classe de metabólitos de acordo com o pH do meio em que se encontram. Em pH alcalino, apresentam-se na forma livre, sendo solúveis em solventes orgânicos de média ou baixa polaridade como clorofórmio, diclorometano e acetato de etila. Por outro lado, em pH ácido os alcaloides protonam e formam sais, passando a ser solúveis em solventes polares como a água (KUKULA-KOCH; WIDELSKI, 2017).

Após a extração ácida e partição, foram obtidos 118,2 mg de fração alcaloídica (SP-FA), alcançando um rendimento de 0,95 % a partir do extrato bruto. Isso corrobora com o exposto por Mesia-Vela e colaboradores (2002), que destacam o alto rendimento de alcaloides nas raízes (0,98 %), quando comparado com as outras partes da planta como caule (0,28 %) e folhas (0,20%).

4.2 Atividade hepatoprotetora *in vivo*

Em todos grupos de animais conduzidos no experimento, não foram observadas alterações significativas no peso corporal e hepático ao longo dos sete dias que precederam a intoxicação com o CCl₄. (Tabela 2).

Os animais que receberam tratamento com SP-EB e SP-FA, apresentaram nível de ALT inferior comparado ao grupo controle. A redução foi ainda mais significativa no grupo tratado com SP-EB 200 mg/kg, alcançando resultado melhor do que o observado no grupo 3, tratado com Vitamina E. (Figura 12)

Tabela 2. Peso corporal e hepático dos animais durante 7 dias antes da injeção intraperitoneal de CCl_4

Grupo	Tratamento	Peso do animal (g)*	Peso do fígado (g)*
1	Controle	33,00 $\pm$ 1,30	1,48 $\pm$ 0,11
2	CCl_4	32,60 $\pm$ 2,11	1,77 $\pm$ 0,06
3	Vitamina E + CCl_4	30,20 $\pm$ 0,96	1,63 $\pm$ 0,07
4	SP-EB 100 mg/kg + CCl_4	31,00 $\pm$ 1,87	1,79 $\pm$ 0,09
5	SP-EB 200 mg/kg + CCl_4	31,75 $\pm$ 0,25	1,71 $\pm$ 0,04
6	SP-FA 100 mg/kg + CCl_4	31,00 $\pm$ 1,51	1,53 $\pm$ 0,16
7	SP-FA 200 mg/kg + CCl_4	32,20 $\pm$ 0,66	1,61 $\pm$ 0,05

*Valores expressos como média $\pm$ d.p. para cinco camundongos por grupo

Figura 12. Valores séricos de ALT observados em cada grupo de animais. Os dados estão expressos como média $\pm$ d.p. ^ap < 0,05 quando comparado ao grupo controle e ^bp < 0,05 quando comparado com o grupo Vitamina E.

O tetracloreto de carbono vem sendo largamente utilizado para induzir hepatotoxicidade em modelos experimentais com animais (RAO et al., 2003). As alterações associadas à lesão hepática são semelhantes às causadas pela hepatite aguda, ocorrendo a formação do radical livre $\text{CCl}_3^{\bullet}$, capaz de alquilar proteínas celulares e outras macromoléculas para produzir lipídios peróxidos na presença de oxigênio, levando a danos no fígado (BISHAYEE et al., 1995).

Os níveis aumentados de AST e ALT são indicadores convencionais de lesão hepática. A enzima ALT está presente dentro das células do fígado e, por isso, quando existe alguma lesão provocada por substâncias tóxicas como o CCl_4 , é comum que seja

liberada para a corrente sanguínea, levando a um aumento dos seus níveis no exame de sangue.

A vitamina E tem um papel antioxidante muito conhecido, fundamental na proteção do organismo contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (EROS) que são formadas metabolicamente ou encontradas no ambiente.

Os valores de AST não sofreram alterações significativas entre os grupos tratados ou não. (Figura 13).

Figura 13. Valores séricos de AST observados em cada grupo de animais. Os dados estão expressos como média $\pm$ d.p

A análise histopatológica dos animais do grupo controle (Figura 14A) mostrou arquitetura lobular preservada, com hepatócitos regularmente dispostos em cordões de células direcionados para as veias centrolobulares. No grupo em que não houve qualquer tratamento, a administração de CCl₄ provocou degeneração hepatocelular e abundantes áreas de vacuolização citoplasmática no grupo controle negativo (Figura 14B), evidenciando o estabelecimento do dano hepático. No grupo tratado com Vitamina E (Figura 14C) observou-se uma normalização do tecido hepático, sem alterações significantes.

Nos grupos tratados com o SP-EB e SP-FA, a degeneração hepática foi menor do que comparada ao grupo controle, embora vacuolização citoplasmática ainda fosse evidente. A redução do dano foi observada principalmente na dose mais alta dos tratamentos (200 mg/kg), ou seja, uma resposta dose-dependente do tratamento.

Figura 14. Análise histopatológica dos animais do grupo controle (A), controle negativo (B), controle positivo (C), SP-EB 100 mg/kg (D), SP-EB 200 mg/kg (E), SP-FA 100 mg/kg (F) SP-FA 200 mg/kg. CV: veia central; Hc: célula hepática; S: sinusoide. Kc: Célula de Kupffer. (Aumento de 100 x)

4.3 Identificação dos alcaloides esteroidais e propostas de perfil de fragmentação

Os sete alcaloides esteroidais majoritários presentes na fração alcaloídica SP-FA foram identificados baseados na relação massa/carga (m/z) em alta resolução e nas reações de fragmentação em fase gasosa.

Figura 15. Cromatograma da fração alcaloídica de *S. paniculatum*

Tabela 3. Alcaloides esteroidais identificados na fração alcaloídica de *S. paniculatum*

Sinal	Tr (min)	Fórmula molecular [M+H] ⁺	[M+H] ⁺ observada	Erro (ppm)	Fragmentos majoritários (ESI ⁺)	Substância
1	8.3	C ₃₃ H ₅₈ NO ₈	596,4156	-1.0	561, 399, 381, 285, 255	jurubina
2	9.3	C ₃₃ H ₅₆ NO ₈	594,3980	-3.4	397, 379, 285, 255	-
3	15.5	C ₃₂ H ₅₄ NO ₇	564,3868	-4.8	547, 415, 397, 379, 271, 253	-
4	16.6	C ₃₃ H ₅₆ NO ₇	578,4043	-1.4	561, 415, 397, 271, 253	-
5	16.9	C ₂₇ H ₄₆ NO ₃	432,3461	-3.7	415, 397, 379, 271, 253	isojuripidina
6	17.1	C ₃₈ H ₆₄ NO ₁₁	710,4453	-3.7	578, 432, 415, 397, 379, 271, 253	-
7	22.2	C ₂₇ H ₄₆ NO ₂	416,3523	-1.2	399, 381, 273, 285, 255	jurubidina

Figura 16. Alcaloides esteroidais identificados na fração alcaloídica de *S. paniculatum*

A identificação dos alcaloides esteroidais presentes nas raízes de *S. paniculatum* iniciou-se a partir da jurubidina (7), que apresenta a estrutura química base da subclasse 3-aminoespirostano. Em virtude disso, alguns autores denominam as substâncias dessa subclasse como “tipo jurubina”.

O primeiro passo foi a realização de um estudo sistemático dos mecanismos de reação em fase gasosa por química computacional. Os dados confirmaram que o local mais básico é o grupo cetol e os cálculos de ΔG e ΔH , suportaram a definição do mecanismo correto de fragmentação proposto a partir dos espectros de massas.

Figura 17. Espectro de massas sequencial (MS⁴) de jurubidina. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons.

A primeira reação em fase gasosa que é possível observar pelo espectro de massas gera uma perda de 17 Da (m/z 416 → 399), sugerindo a saída de amônia através de um rearranjo clássico de hidrogênio seguido de uma eliminação 1,2 em C-3. A carga no grupo cetol permite uma assistência anquimérica que causa a abertura do anel espirostano. A consequente exposição da hidroxila, leva a perda de 18 Da (m/z 399 → 381) por desidratação e um novo rearranjo que resulta na perda completa do anel espirostano (m/z 381 → 255). Portanto, dessa forma é possível sugerir a principal via de fragmentação (m/z 416 → 399 → 381 → 255). (Figuras 17 e 18).

A estabilidade estrutural herdada dos esteroides dificulta a fragmentação dessa substância e seus derivados. Assim, poucos íons são formados após as experiências com MS/MS e muitos deles são inespecíficos para sua determinação estrutural. O uso da química computacional é uma ferramenta imprescindível nessa tarefa e confere maior

segurança e assertividade nas propostas, uma vez que confirmam a protonação em fase gasosa do grupo cetil e não da amina como normalmente ocorreria em fase líquida.

Figura 18. Via de fragmentação da jurubidina suportada por química computacional. Valores de afinidade protônica (cima) e basicidade da fase gasosa (itálico). Valores abaixo das estruturas são dados em energia relativa de Gibbs e entalpias relativas, respectivamente. Todos os valores estão em kcal mol⁻¹ e calculados usando o modelo B3LYP/6-31+G(d).

Além dessa via principal, foi possível propor vias secundárias que ocorrem em menor proporção ao observar os fragmentos minoritários nos espectros. A proposta de sítio de protonação no anel E, tem a decorrente abertura desse mesmo anel e eliminação do anel espirostando F (m/z 399 $\rightarrow$ 273). A presença do íon de m/z 398 envolve a mesma desidratação que ocorre na via principal, porém ocorre antes da saída da amônia e não é seguida de rearranjo. A perda de NH_3 ocorre na etapa seguinte (m/z 381), que após uma eliminação origina o íon m/z 255. (Figura 18).

A segunda molécula a ser estudada foi a jurubina (1). Apesar da grande semelhança estrutural com a jurubidina, apresenta o anel espirostando F aberto, que serve como ponte para uma glicose.

Figura 19. Espectro de massas sequencial (MS^4) de jurubina. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

A primeira etapa dessa fragmentação é comum às principais vias de fragmentação propostas para jurubina, que é sinalizada pela conhecida perda de amônia (17 Da) e a eliminação da glicose (180 Da), que ocorrem de maneira simultânea (m/z 596 $\rightarrow$ 399). Em seguida, ocorre uma desidratação (18 Da) em que a posição e o rearranjo subsequente são definidos pelo sítio de protonação inicial, formando diferentes configurações de m/z 381. Em virtude disso, podem ser formados os íons m/z 285 e m/z 255, cuja presença é marcante na maioria das vias de fragmentação das substâncias caracterizadas a seguir. (Figuras 19 e 20).

Figura 20. Proposta de fragmentação da jurubina

A isojuripidina (5) é outra molécula conhecida cuja via de fragmentação foi proposta nesse estudo. Derivada da jurubidina, apresenta a diferença sutil de uma hidroxila na estrutura química, mas que se torna muito relevante nas reações em fase gasosa. A fragmentação inicial é a perda de amônia, que é comum a todas as vias propostas (m/z 432 $\rightarrow$ 415). Assim, como na jurubidina, ocorre a abertura do anel espiro e a partir disso é possível propor três produtos. No caminho A, ocorre a desidratação no resíduo do anel espiro seguido de rearranjo com perda de toda a

cadeia (m/z 415 $\rightarrow$ 271). O caminho B, ocorrem desidratações em C-6 e no resíduo do anel F de maneira simultânea, levando a perda de 36 Da (m/z 415 $\rightarrow$ 379). A terceira via ocorre apenas a desidratação da hidroxila do anel F, caracterizada pelo decréscimo de 18 Da (m/z 415 $\rightarrow$ 397). A terceira reação em sequência (MS^3) segue a via de fragmentação A, com a perda tardia da hidroxila em C-6, com formação de m/z 253. (Figuras 21 e 22).

Figura 21. Espectro de massas sequencial (MS^5) de isojuripidina. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

Figura 22. Proposta de fragmentação da isojuripidina

As propostas de reação em fase gasosa para as três substâncias conhecidas, somadas à informação massa molecular em alta resolução, viabilizou a elucidação estrutural de outras quatro substâncias ainda não descritas.

A substância (2), apresentou uma rota de fragmentação com perdas de massa com o mesmo padrão observado para jurubina, porém o íon protonado apresentava m/z da fórmula molecular $C_{33}H_{56}NO_8$, ou seja, com dois hidrogênios a menos. Essa diferença sugeria a presença de uma insaturação, que, observando a rota fragmentação sequencial, nos permitiu afirmar que era posicionada na cadeia aberta do anel F. Essa conclusão foi feita ao verificar que os íons formados m/z 397 e 379 eram equivalentes aos íons m/z 399 e 381 da jurubina, ou seja, a diferença estrutural estava relacionada às fragmentações finais. Outro motivo que reforça ainda mais essa proposição foi o íon final apresentar a mesma m/z 255 que a jurubina, indicando a perda da cadeia com insaturação. Em vista disso, a insaturação foi atribuída a única posição quimicamente possível na cadeia lateral. (Figuras 23 e 24).

Figura 23. Espectro de massas sequencial (MS^3) da substância 2. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

As substâncias (2), (4) e (6) apresentaram o perfil de fragmentação muito

Figura 26. Espectro de massas sequencial (MS^4) da substância 4. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

Figura 27. Espectro de massas sequencial (MS^5) da substância 6. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

Figura 28. Proposta de fragmentação da substância 3

Figura 29. Proposta de fragmentação da substância 4

Figura 30. Proposta de fragmentação da substância 6

A reação de eliminação perdendo 144 Da ($397 \rightarrow 253$ e $399 \rightarrow 255$) é muito importante no contexto dos 3-aminoespirostanos. Em conjunto com a saída de amônia, as reações podem ser consideradas perdas diagnósticas para essa subclasse de alcaloides esteroidais.

Ao contrário de outros trabalhos que relataram fragmentação com o átomo de hidrogênio em C-22 movendo-se em direção ao átomo de oxigênio no anel F por meio de um rearranjo, a proposta principal de fragmentação elaborada inicia-se no oxigênio no anel E. A estabilidade do íon m/z 255 publicada nos trabalhos de Li, et al. (2006) e Liang, et al. (2002) é consideravelmente baixa. Outro ponto importante observado é a presença de substituintes em C-6. Seja por uma hidroxila ou açúcar, a presença de um radical nessa posição é crucial para a via de fragmentação, pois, ao fim do processo, sua eliminação resultará no íon m/z 253 como na isojuripidina em vez de m/z 255 como na jurubina e jurubidina.

4.4 Isolamento de alcaloides

O fracionamento de 1,0 g de SP-FA resultou na coleta de 97 frações de 100 mL cada. As amostras foram reunidas de acordo com a similaridade de perfil cromatográfico apresentado em CCD e passaram a ser 24 amostras. Essas amostras foram analisadas por HPLC-MS/MS e o cromatograma da fração 22 apresentou sinal único com perfil de fragmentação compatível com a jurubidina. (Figuras 31 e 32). A amostra foi analisada por HRMS, confirmando a m/z em alta resolução da jurubidina. O método foi capaz de isolar 12 mg da substância, atingindo um rendimento de 1,2 % (m/m).

Figura 31. Cromatograma da fração 22. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

Figura 32. Espectro de massas sequencial (MS²) do sinal em 22,7 min da fração 22. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

4.5 Ensaios de metabolismo *in vitro* com metaloporfirinas

Conforme descrito no item 3.7, foram utilizados dois agentes oxidantes (mCPBA e PhiO) no modelo biomimético para oxidação da jurubidina. A reatividade da jurubidina foi eficaz com o oxidante PhiO, tanto na redução do substrato quanto na formação do metabólito putativo majoritário, conforme demonstrado na Figura 33. Os experimentos realizados com mCPBA não foram capazes de gerar outros metabólitos.

Figura 33. O sinal em 5,7 min corresponde a jurubidina; O sinal em 7,0 corresponde ao metabólito putativo majoritário; Controle (vermelho); Iodozilbenzene (azul);

O metabólito putativo formado apresentou m/z 431 em modo positivo. O valor ímpar obtido sugere um número par de nitrogênios da estrutura química. A primeira impressão seria da perda do grupo amina assim como observado nas vias de fragmentação dos 3-aminoespirostanos, entretanto, ao observar o espectro de MS^2 , é possível observar uma perda de 17 Da ($431 \rightarrow 414$), sugerindo a presença da amina na substância. Portanto, pode-se inferir que o metabólito formado possui outro nitrogênio além da amina em C-3. Esse comportamento seria atípico, uma vez que as reações com metaloporfirinas em geral favorecem oxidações na molécula.

A analisar por espectrometria de massas em alta resolução, não foi possível identificar um metabólito compatível com a m/z observada.

Figura 34. Espectro de massas sequencial (MS^5) do metabólito putativo formado. Dados obtidos a partir de análise em LC-MS/MS com analisador de armadilha de íons

4.6 Ensaios de metabolismo *in vitro* com microssomas hepáticos

A jurubidina foi submetida à metabolização utilizando microssomas hepáticos isolados de fígado de ratos, a fim de estabelecer correlação entre produtos formados nas reações biomimética com as reações de biotransformação mediada pelo CYP 450.

O cromatograma da condição teste, branco e controle estão demonstrados na Figura 35. Três tentativas foram realizadas variando a proporção de jurubidina, microssoma e cofatores, mas não houve a formação de um produto.

Figura 35. Cromatogramas do experimento de metabolismo *in vitro* com microsomas hepáticos. Branco (vermelho); Controle (azul); Teste Jurubidina 0,045 mg/mL

5. CONCLUSÃO

Os estudos realizados por espectrometria de massas alcançaram resultados importantes sobre as vias de fragmentação dos alcaloides esteroidais 3-aminoespirostanos. Pela primeira vez foram descritas propostas de fragmentação para a jurubidina, jurubina, isojuripidina, além das quatro outras moléculas inéditas.

Os dados obtidos por química computacional proporcionaram o maior entendimento sobre os mecanismos e vias de fragmentação dos alcaloides esteroidais, especialmente dos 3-aminoespirostanos. Por meio destes resultados, foi possível sugerir uma alternativa à identificação dessa classe de metabólitos utilizando apenas espectrometria de massas.

Os ensaios de oxidação biomimética da jurubidina utilizando metaloporfirinas como catalisador promoveram a formação de apenas um metabólito. Este resultado demonstra a baixa susceptibilidade da jurubidina frente às reações de metabolização. Não foi detectado nenhum produto de metabolização da jurubidina nos ensaios utilizando-se microssomas hepáticos de ratos.

Nos experimentos de hepatoproteção *in vivo* obteve-se resultados promissores, evidenciando a capacidade hepatoprotetora do extrato e da fração alcaloídica de *S. paniculatum*, corroborando com o uso popular dessa espécie.

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 nos trabalhos relacionados ao metabolismo de alcaloides esteroidais. Em consequência da relevância dos resultados apresentados, este trabalho foi publicado em forma de artigo em uma reconhecida revista da área de espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K., et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraibano, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S., et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology** v. 114, p. 325–354, 2007.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos**. Quím. Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009
- BECKE A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**. 38(6):3098-3100, 1988.
- BISHAYEE A, SARKAR A, CHATTERJEE M. The hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. **Journal of Ethnopharmacology** 47:69–74, 1995.
- BRANDON, E.F.A. et al. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 189, p. 233-246, 2003.
- BREITBACH, U. B.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P.; FARIA J. E. Q.; BRANDÃO, M. G. L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013;147:180-189
- CHEENPRACHA, S.; JITONNOM, J.; KOMEK, M., et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of steroidal alkaloids from *Holarrhena pubescens* barks. **Steroids**, v. 108, p. 92–98, 2016.
- COSTAS, M. Selective C-H oxidation catalysed by metalloporphyrins. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 255, p. 2912-2932, 2011.
- DAHLIN, P.; MULLER, M. C.; EKENGREN, S., et al. The Impact of Steroidal Glycoalkaloids on the Physiology of *Phytophthora infestans*, the Causative Agent of

Potato Late Blight. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 7, p. 531–542, 2017.

DE SANTIS FERREIRA, L. S.; CALLEJON, D. R.; ENGEMANN, A., et al. *In vitro* metabolismo of grandisin, a lignan with anti-chagasic activity. **Planta Medica**. v. 78, p. 1939-1941, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T.G.; XIE, L.Y. Polyhaloporphyrins: unusual ligands for metals and metal-catalyzed oxidations. **Accounts of Chemical Research**. v. 30, n. 6, p. 251-259, 1997.

DUPIN, J.; MATZKE, N.; SÄRKINEN, T.; KNAPP, S.; et al. Bayesian estimation of the global biogeographical history of the Solanaceae. **Journal of Biogeography**. vol. 44, 2017

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.112, p.4-29, 2016.

EKAR, T.; KREFT, S. Common risks of adulterated and mislabeled herbal preparations. **Food and Chemical Toxicology**, 123, 288-297, 2019.

ENDRINGER, D. C.; VALADARES, Y. M.; CAMPANA, P. R. V., et al. Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets *in vitro*. **Phytoterapy Research** v. 24, n. 6, p. 928–933, jun. 2010.

FATTAHI, A.; LIZ, L.; THIAN, Z.; KASS, S. R. The heat of formation of cyclobutadiene. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 45, 4984-4988, 2006.

GOUVEA, D.R. Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart. (Asteracea: Vernonieae). Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

HE, H.; LI, Y.; HE, L. Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. **South African Journal of Botany**, 123, 23-29, 2019.

HOLBACK, M.; WECK, M. Modular approach for the development of supported, monofunctionalized, Salen catalysts. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 71, n. 5, p. 1825-1836, 2006.

JANCOVA, P.; ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Phase II drug metabolizing enzymes. **Biomedical Papers**. v. 154, n. 2., p. 103-116, 2010.

JOSEPHY, P.D.; GUENGERICH, F.P.; MINERS, J.O. "Phase I" and "Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out?. **Drug Metabolism Review**. v. 37, p. 575-580, 2005.

KACZMARZYK, T., et al. Mössbauer study of a tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin iron (III) chloride in comparison with the fluorine unsubstituted analogue. **Nukleonika**. v. 60, n. 1, p. 57-61, 2015.

KOHN W, BECKE AD, PARR RG. Density functional theory of electronic structure. **The Journal of Physical Chemistry A**. 100(31):12974–12980, 1996.

KUKULA-KOCH, W. A.; WIDELSKI, J. Alkaloids. In: McCreath, S. B.; DELGODA, R. **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies**, p. 163–198, 2017.

LEOD, T.C.O.; BARROS, V. P.; FARIA, A. L., et al. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v. 273, n. 1-2, p. 259-264, 2007.

LI, R.; ZHOU, Y.; WU, Z. et al. ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. **Journal of Mass Spectrometry** 41(1):1–22, 2006.

LIANG, F.; LI, L. J.; ABLIZ, Z. et al. Structural characterization of steroidal saponins by electrospray ionization and fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 16(12):1168–1173, 2002.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism.

Analytical and Bioanalytical Chemistry. v. 391, n. 1, p. 79-96, 2008.

MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; et. al. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, 35: 1057-1065, 2011.

McGARREGLE, E.M.; GILHEANY, D.G. Chromium- and manganese-salen promoted epoxidation of alkenes. **Chemical Reviews**. v. 105, n. 5, p. 1564-1598, 2005.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M. T.; SOUCCAR, C., et al. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 508–514, 2002.

MEUNIER, B.; BERNADOU, J. Metal-oxo species in P450 enzymes and biomimetic models. Oxo-hydroxo tautomerism with water-soluble metalloporphyrins. **Topics in Catalysis**. v. 21, n. 1-3, p. 47-54, 2002.

Ministério da Saúde. GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, versão 2, 2013.

Ministério da Saúde. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS 2009. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf>. Acesso em 2 de agosto de 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461–77, mar. 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 2016.

NIEHUES, M.; BARROS, V. P.; EMERY, F.S., et al. Biomimetic in vitro oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the in vivo phase I metabolism of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 804-812, 2012.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed. Atheneu Editora São Paulo LTDA, 2008.

PEARSON, P.G.; WIENKERS, L.C. **Handbook of Drug Metabolism**. 2ed. Informa Healthcare USA, 2008.

PRASAD, B.; GARG, A.; TAKWANI H. et al. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 30, n. 2, p. 360-337, 2011.

REEDIJK, J.; BOUWMAN, E. **Bioinorganic Catalysis**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 1999.

RIOS, R.; SILVA, H. B. F.; CARNEIRO, N. V. Q., et al. *Solanum paniculatum* L. decreases levels of inflammatory cytokines by reducing NFkB, TBET and GATA3 gene expression *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, n. junho, p. 32–40, 2017.

ROCHA, B. A.; DE OLIVEIRAM A. R. M.; PAZIN, R., et al. Jacobsen catalyst as a cytochrome P450 biomimetic model for the metabolism of a monensin A. **BioMed Research International**. v. 2014, p.1-8, 2014.

ROE, A. L.; PAINE, M. F.; GURLEY, B.; BROUWER, K.; JORDAN, S.; GRIFFITHS, J. Assessing Natural Product-Drug Interactions: An End-to-End Safety Framework. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 76. n. 10, 2016

ROMANUCCI, V.; FABIO, G.; DI MARINO, C.; et al. Evaluation of new strategies to reduce the total content of α -solanine and α -chaconine in potatoes. **Phytochemistry Letters**. 23. 116-119, 2018

SANTOS, J.S., et al. Biomimetic simazine oxidation catalyzed by metalloporphyrins. **Applied Catalysis A: General**. v. 408, n. 1-2p. 163-170, 2011.

SCHAAB, E.H. Estudos oxidativos biomiméticos com os produtos naturais piperina e

piplartina. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2008.

SCHENKEL E. P.; GOSMANN G., PETROVIC P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. MELLO, J.CP; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora UFSC, Capítulo 15, p. 301-332, 2001.

SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H.; BUDZIKIEWICZ, H. (22R:25S)-3 β -amino-5 α -spirostan, ein Steroidalkaloid neuartigen Strukturtyps aus *Solanum paniculatum* L. **Tetrahedron Letters** 45: 3999–4002, 1965.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

SINZ, M.A. In vitro and in vivo models of drug metabolism. In LYUBIMOV, A.V. **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1 ed, John Wiley & Sons, 2012.

SNEADER W. **Drug discovery**. A history. Chichester, England: John Wiley and Sons, Ltd, 2005.

THUMMEL, K.E.; KUNZE, K.L.; SHEN, D.D. Enzyme-catalized processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 27, p. 99-127, 1997.

TOLOSA E. M. C. et al. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2ª ed. Manole, São Paulo, p.331, 2003.

VALADARES, Y. M.; BRANDÃO, G. C.; KROONB, E. G. et al. Antiviral Activity of *Solanum paniculatum* Extract and Constituents. **Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences** v. 64c, 813 – 818, 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005 .

VENKATARAMANAN, N.S.; KUPPURAJ, G.; RAJAPOGAL, S. Metal–salen complexes as efficient catalysts for the oxygenation of heteroatom containing organic compounds—synthetic and mechanistic aspects. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 249, p. 1249-1268, 2005.

VESSECCHI, R. A utilização da química computacional em processos químicos relacionados à ionização por electrospray 2009. 295 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

VIEIRA, P. M.; MARINHO, L. P. M.; FERRI, S. C. S., et al. Protective effects of steroidal alkaloids isolated from *Solanum paniculatum* L. against mitomycin cytotoxic and genotoxic actions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 553–560, 2013.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015

ZHAO, Y.; TRHULAR, D. G. Density functionals with broad applicability in chemistry. **Accounts of Chemical Research** 41(2), 157-167, 2008.

6. APÊNDICES

6.1 Artigo publicado no Rapid Communications in Mass Spectrometry

Received: 4 October 2019 | Revised: 2 December 2019 | Accepted: 10 December 2019
DOI: 10.1002/rcm.8705

SPECIAL ISSUE RESEARCH ARTICLE

WILEY

Characterization of 3-aminospirostane alkaloids from roots of *Solanum paniculatum* L. with hepatoprotective activity

Matheus Coutinho Gazolla¹ | Lucas Maciel Mauriz Marques¹ |
Mariana Gama e Silva² | Maria Taís Moura Fontes Araújo² |
Rosemairy Luciane Mendes² | Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida² |
Ricardo Vessecchi³ | Norberto Peoporine Lopes¹

¹Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Departamento de Ciências BioMoleculares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Núcleo de Estudos e Pesquisa de Plantas Medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina, PE, Brazil

³Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence

N. P. Lopes, Departamento de Ciências BioMoleculares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil.
Email: npelopes@gmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2014/50265-3, 2017/19330-1 (M.C.G.), 2014/23604-1 (R.V.), 2014/50265-3 (N.P.L.); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 1747490

Rationale: *Solanum paniculatum* L., popularly known as jurubeba, has traditionally been used in Brazilian folk medicine for liver diseases. However, there is a lack of knowledge about the chemical characterization of 3-aminospirostane alkaloids, an important class related to pharmacological activities. This work aimed to characterize the alkaloids using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) supported by molecular networking and theoretical calculations as well as to evaluate the contribution to hepatoprotective activity.

Methods: *S. paniculatum* roots were collected and macerated with MeOH/H₂O (8:2) obtaining the crude extract (SP-CE). From this, partition using EtOAc with pH variation yielded the alkaloidic fraction (SP-AF). Both were evaluated in an acute liver injury model (100 and 200 mg/kg), after intraperitoneal administration of carbon tetrachloride (CCl₄) in mice. AST (aspartate transaminase) and ALT (alanine transaminase) serum levels were investigated, as well as the histopathological characteristics. The SP-CE and SP-AF were analyzed by LC/MS/MS, using quadrupole/time-of-flight and ion-trap systems. The alkaloids annotated by the GNPS molecular network had their structures defined using gas-phase ionization and fragmentation reaction supported by theoretical calculations.

Results: The SP-CE and SP-AF decreased the ALT serum levels compared with the negative control. The group treated with the SP-CE (at the highest dose) demonstrated a significant decrease of ALT. Hepatic cell degeneration decrease was observed mainly at the highest dose of the treatment. Detailed electrospray ionization MS/MS data allowed us to identify alkaloids not previously reported, to propose their gas-phase reactions and to redefine the initial open ring fragmentation mechanism of the steroidal alkaloids with the jurubidine moiety.

Conclusions: The results allowed us to identify seven steroidal alkaloids from jurubeba and redefine the initial mechanism of fragmentation. A significant hepatoprotective effect was also demonstrated, corroborating its traditional use.

7. ANEXOS

7.1 Cadastro no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - Sisgen

**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AD8CDB5

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AD8CDB5**
 Usuário: **Norberto Peporine Lopes**
 CPF/CNPJ: **099.034.918-75**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Solanum paniculatum

Título da Atividade: **Metabolismo in vitro dos alcaloides esteroidais de Solanum paniculatum L. (Solanaceae)**

Equipe

Norberto Peporine Lopes **Universidade de São Paulo**
Matheus Coutinho Gazolla **Universidade de São Paulo**

Data do Cadastro: **24/11/2017 15:22:06**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **21:31** de **12/11/2018**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

7.2 Aprovação de protocolo experimental nº 0013/021014, pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUISAS - CEDEP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação das atividades antitumoral, antinociceptiva e anti- inflamatória de extratos vegetais e produtos de síntese *in vivo* e *in vitro***”, Protocolo nº **0013/021014**, que utilizam 672 animais da espécie *Mus musculus*, sob a responsabilidade de **Rosemairy Luciane Mendes**, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled “**Evaluation of the antitumor activity, antioxidant, anti-nociceptive and anti-inflammatory plant extracts and synthetic products *in vivo* and *in vitro***”, protocol number **0013/021014**, utilizing 672 animals species *Mus musculus*, under the responsibility **Rosemairy Luciane Mendes**, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Committee of Ethics and Deontology Studies and Research at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 02 de outubro de 2014.

Profa. Márcia Bento Moreira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVASF

Prof. Alexandre H. Reis
Coordenador do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
REITORIA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

FORMULARIO DE SOLICITAÇÃO DE ALTERAÇÃO DE METODOLOGIA E/OU TECNINAS DESCRITAS EM
PROJETO VIGENTE E APROVADO PELO CEUA

Ilma. coordenadora Karine Vieira Antunes

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso Animais da UNIVASF

Prezada,

Solicito à CEUA-UNIVASF a seguinte alteração metodológica e/ou tecnológica no uso de animais do projeto sob protocolo nº **0013/021014**, intitulado: **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL, ANTINOCICEPTIVA E ANTI- INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS VEGETAIS E PRODUTOS DE SÍNTESE IN VIVO E IN VITRO**, e aprovado em 02/10/2014 sob minha responsabilidade.

Descrever modificação/ alteração no protocolo do projeto:

Recebemos o convite da revista científica "Journal of Ethnopharmacology" para contribuir com um manuscrito em um número especial que deve ser submetido até o mês de novembro. Dessa forma, solicitamos a inclusão nesse projeto do extrato bruto e da fração alcaloídica de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae), conhecida popularmente como "Jurubeba" para que o protocolo experimental de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono, já aprovado, possa ser realizado também utilizando essas amostras. Para isso, precisamos também do acréscimo de 42 camundongos além do que já havia sido anteriormente autorizado.

O professor Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida já era colaborador do projeto. Peço a gentileza da inclusão do nome da Farmacêutica Mestre em Recursos Naturais, a doutoranda Marina Gama e Silva que será colaboradora também no artigo.

Declaro que não realizei nenhum procedimento empregando a metodologia experimental ou técnica alterada no projeto vigente, previamente a esta solicitação.

Declaro que não haverá qualquer outra alteração no protocolo na referida licença.

Petrolina, 24/10/2018

Pesquisador responsável