

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

**Estratégias baseadas em espectrometria de massas
para a elucidação estrutural de produtos naturais e
sintéticos**

Antônio Eduardo Miller Crotti

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Estratégias baseadas em espectrometria de massas para a elucidação estrutural de produtos naturais e sintéticos

Antônio Eduardo Miller Crotti

Texto que sistematiza parte da obra do candidato, apresentado à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para inscrição no concurso de Livre Docência, junto ao Departamento de Química.

Ribeirão Preto

2020

À Débora, amada esposa, fiel companheira, amiga sincera e presença inspiradora, e aos meus filhos Miguel e Alice, pequenos anjos que me trazem luz, alegria, energia e esperança. Cada palavra deste texto foi escrita por vocês...

Agradecimentos

Aos alunos de iniciação científica, de mestrado e de doutorado, pela valiosa contribuição científica e pelo estímulo que representam;

Aos colegas Carlos Henrique Gomes Martins, Lizandra Guidi Magalhães, Denise Crispim Tavares, Edson Luiz Lopes Baldin, Eduardo José Crevelin, Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Paulo Marcos Donate, Ricardo Vessecchi, Renato Luis Tame Parreira, Paul Gates e Norberto Peporine Lopes, pela parceria científica e inestimável contribuição;

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FAPESP, CNPq e CAPES, pelas oportunidades concedidas;

Aos colegas de trabalho, docentes e funcionários, pelo apoio e suporte no desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa.

“Ninguém nasce humilde nem predestinado a vencer. As vitórias, por menores que sejam, requerem dedicação, foco, paciência e resignação, um preço alto que nem todos estão dispostos a pagar. A humildade, por sua vez, é uma virtude que se adquire com as derrotas que nos abatem em nossa jornada rumo à vitória. Por mais que se dediquem, nem todos alcançam as vitórias que tanto buscam. Da mesma forma, por mais derrotas que tenham sofrido, nem todos aqueles que alcançam a vitória tornam-se humildes. Ao final de cada experiência, a humildade é um aprendizado muito mais valioso que a vitória em si, pois somente ela pode levar à gratidão. Sem humildade e gratidão, aos “vitoriosos” só restam a arrogância, a soberba e o ego.”

(O autor)

Resumo

Neste texto encontra-se sistematizada a obra do candidato referente ao período de 2005 a 2020. Neste período, o potencial da espectrometria de massas para a identificação de diferentes classes de compostos orgânicos naturais e sintéticos e para a elucidação do mecanismo de uma reação multicomponentes (MCR) foi explorado. A composição química de vários óleos essenciais foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Estudos sobre as reações de fragmentação em fase gasosa de vários compostos ionizados por eletrospray (ESI) foram realizados a partir de dados de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e de múltiplos estágios (MSⁿ), dados de massas acuradas e de dados termoquímicos estimados por Química Computacional. Dentre os compostos investigados, merecem destaque as neolignanas diidrobenzofurânicas (DBNs), os diterpenos labdânicos, os curcuminoides monocetônicos (MKCs) e a cocaína. Os estudos levaram à elucidação das vias de fragmentação desses compostos e, no caso da cocaína e dos MKCs, ao esclarecimento de algumas etapas da fragmentação previamente reportadas. Estratégias baseadas em espectrometria de massas foram também desenvolvidas para a identificação de alcaloides indólicos plumerânicos, de macrotetrolídeos e de diterpenos labdânicos diretamente de extratos. O estudo mecanístico da reação MCR catalisada por cobalto(II) levou à detecção de um subproduto formado por uma reação de hidrodessalogenação de haletos de arila promovida por cobalto(II) que não havia sido previamente reportada. Ensaios biológicos para avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária, inseticida e citotóxica de óleos essenciais, compostos benzofurânicos e MKCs foram também realizados. Os óleos essenciais de *Plectranthus neochilus* e *Tetradenia riparia* apresentaram as atividades antimicrobianas mais promissoras frente a *Streptococcus mutans*, a principal bactéria causadora da cárie. A curcumina A foi mais ativa frente a esta bactéria que a curcumina, cuja atividade contra *S. mutans* é bastante investigada na literatura. Vários óleos essenciais mostraram atividade esquistosomicida *in vitro* contra *Schistosoma mansoni*, até então pouco explorada na literatura. O óleo essencial de *Pelargonium graveolens*, os monoterpênicos geraniol e citronelol e algumas neolignanas apresentaram atividade inseticida, repelente e deterrente de oviposição frente à mosca branca (*Bemisia tabaci* biotipo B), sendo mais ativos que os inseticidas comerciais empregados no manejo da mosca branca utilizados como controle positivo nos ensaios.

Palavras-chave: desreplicação, eletrospray, mecanismo de reação, reações de fragmentação

Abstract

This text is systematized as a reference work for a period from 2005 to 2020. In this period, the potential of mass spectrometry to identify different classes of organic and synthetic compounds and to elucidate the multicomponent reaction (MCR) mechanism was exploited. The chemical composition of several essential oils was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Studies on the gas-phase fragmentation reactions of various compounds ionized by electrospray (ESI) were performed on the basis of tandem (MS/MS) and multiple-stage (MSⁿ) mass spectrometry data, accurate-mass data, and thermochemical data estimated by Computational Chemistry. Dihydrobenzofuran neolignans (DBNs), labdane-type diterpenes, monoketone curcuminoids (MKCs), and cocaine are among the investigated compounds. The studies led to the elucidation of the fragmentation pathways of these compounds and to the clarification of some previously reported steps in the fragmentation of cocaine and MKCs. Mass spectrometry-based strategies were also developed for the structural identification of plumeran-type indole alkaloids, macrotetrolides, and labdane-type diterpenes directly from extracts without the need of isolation. The mechanistic investigation of the cobalt(II)-catalyzed MCR allowed for the detection of a byproduct formed by means of a cobalt(II)-promoted aryl halide hydrodehalogenation, which has not been previously reported for this MCR. Biological assays to evaluate the antimicrobial, antiparasitic, insecticidal, and cytotoxic activities of essential oils, benzofuran compounds, and MKCs were also carried out. The essential oils of *Plectranthus neochilus* and *Tetradenia riparia* showed the most promising antimicrobial activities against *Streptococcus mutans*, the main bacteria causative of caries. The MKC curcumin A was more active against *S. mutans* than curcumin, whose antimicrobial activity is well known. Several essential oils displayed *in vitro* antischistosomal activity against *Schistosoma mansoni*, hitherto little exploited in the literature. The essential oil of *Pelargonium graveolens*, the monoterpenes geraniol and citronellol, and some dihydrobenzofuran neolignans displayed insecticidal, repellent, and oviposition deterrent effects against silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci* biotype B), being more active as compared to commercial insecticides used in the silverleaf whitefly management, which were used as a positive control in the assays.

Keywords: dereplication, electrospray, reaction mechanism, fragmentation reaction

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Formação dos íons produtos B, C, D, E e F dos alcaloides indólicos protonados 12 e 15	20
Esquema 2	Síntese das neolignanas diidrobenzofurânicas 20-23	38
Esquema 3	Formação dos íons produtos de m/z 182, 122 e 82 da cocaína protonada (A , m/z 304).	42
Esquema 4	Formação dos íons produtos dos diterpenos desprotonados 24 (m/z 303), 25 (m/z 319), 26 (m/z 361) e 27 (m/z 333).	45
Esquema 5	Reações de redução dos íons cobre(II) a cobre(I) em fase gasosa e formação dos íons elétron-ímpares B e D e dos íons acílios C e E a partir dos macrotetrolídeos isodinactina (30), trinactina (31) e tetranactina (32).	48
Esquema 6	Formação dos íons produtos B, C e E , comuns aos eudesmanoídeos 33 e 34 , e do íon produto G , diagnóstico para o composto 33	56
Esquema 7	Síntese dos compostos 35-45	57
Esquema 8	Síntese dos compostos 2-aroilbenzofuranos 46-50	57
Esquema 9	Mecanismo proposto para o acoplamento oxidativo de fenilpropanoídeos promovido pelo óxido de prata(I) utilizado para a síntese de neolignanas diidrobenzofurânicas.	58
Esquema 10	Formação dos íons B, C, D, E, F e G dos 2-aroilbenzofuranos 46-50 protonados.	63
Esquema 11	Formação dos íons produtos B, C, D e E para as neolignanas diidrobenzofurânicas 35-37 protonadas.	66
Esquema 12	Formação dos íons produtos B, C, D e E para a neolignana benzofurânica 44 protonada.	66
Esquema 13	Formação do íon produto G diagnóstico da neolignana benzofurânica 45 protonada (m/z 355).	67
Esquema 14	Formação dos íons produtos D, E e F diagnósticos das neolignanas benzofurânicas 44 e 45	69
Esquema 15	Formação do íon produto R , diagnóstico da neolignana diidrobenzofurânica 37	70
Esquema 16	Síntese dos curcuminoídeos monocetônicos (MKCs) e de seus derivados.....	74

Esquema 17	Ciclização de Nazarov em fase gasosa e eliminação de ceteno e de fenol/anisol a partir dos compostos 67 e 68 protonados.	77
Esquema 18	Ciclização de Nazarov e formação dos íons produtos $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-C_6H_6]^+$, $[M+H-CO]^+$, $[M+H-C_2H_2O]^+$ do MKC 56 protonado.	78
Esquema 19	Reação de Nazarov e fragmentação dos MKCs 65 e 66 protonados.	79
Esquema 20	Síntese da γ -lactona 69 e dos reagentes (haletos arílicos) etiquetados 70 e 71	83
Esquema 21	Visão geral dos produtos (A) e subprodutos (B e C) da MCR promovida por cobalto(II), adicionada da reação lateral de hidrodesalogenação (D).	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número total de publicações na área de espectrometria de massas por década.....	3
Figura 2	Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray em um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ) operando no modo de varredura de íons produtos (do inglês <i>product ion scan mode</i>).....	4
Figura 3	Representação da técnica PSI.....	10
Figura 4	Estruturas dos sesquiterpenos e dos esteroides da fração AS₁ de <i>A. sellowiana</i> identificados por GC-MS.....	15
Figura 5	Estrutura química de algumas LSTs isoladas de <i>M. alpestris</i>	16
Figura 6	Espectro de ESI-MS do extrato metanólico da casca do caule de <i>Aspidosperma spruceanum</i>	19
Figura 7	Estruturas dos constituintes químicos majoritários nos óleos essenciais descritos neste texto.....	25
Figure 8	Curva de tempo de morte obtida para o óleo essencial de <i>T. riparia</i> (TR-EO) contra <i>S. mutans</i> (5×10^5 CFU/mL).....	26
Figura 9	Índice de repelência (RI) e classificação dos óleos essenciais após 6, 12 e 24 h de infestação por <i>B. tabaci</i> biotipo B.....	33
Figura 10	Índice de deterrência de oviposição (ODI) e classificação dos óleos essenciais após 24h de infestação por <i>B. tabaci</i> biotipo B.....	33
Figura 11	Porcentagem de mortalidade de <i>Bemisia tabaci</i> biotipo B exposta ao óleo essencial (PG-EO) e seus monoterpenos geraniol (16f), linalool (16c) e citronellol (16d) em diferentes concentrações após 24h.....	36
Figura 12	Índice de repelência (RI) e classificação de PG-EO e seus monoterpenos majoritários geraniol, linalol e citronelol após 3, 6, 12 e 24 h de infestação por <i>B. tabaci</i> biotipo B.....	36
Figura 13	Valores dos índices de deterrência de oviposição (ODI) e classificação de PG-EO e monoterpenos obtidos após 24 h de infestação por <i>B. tabaci</i> biotipo B.....	37
Figura 14	Estruturas químicas do ácido (-)- <i>ent</i> -copálico (24), ácido (-)- <i>ent</i> -3 β -hidroxycopálico (25), (-)- <i>ent</i> -3 β -acetoxycopálico (26), ácido (-)- <i>ent</i> -agático (27), ácido 8,17-diidro- <i>ent</i> -agático (28) e ácido 3-ceto- <i>ent</i> -copálico (29).....	43
Figura 15	Cromatograma de TIC (do inglês <i>Total Ion Current</i>) obtido do scan do íon precursor (íon produto de m/z 99).....	46

Figura 16	a) Cromatograma TIC (do inglês <i>Total Ion Current chromatogram</i>) de uma amostra desconhecida obtida de <i>Streptomyces</i> sp. AMC-23. b-e) Cromatograma de íons extraídos obtidos dos experimentos de varredura do íon precursor (íons acílios de m/z 181, 199, 185 e 167, respectivamente).....	50
Figura 17	Expansões dos espectros de RMN das neolignananas diidrobenzofurânicas 20 e 21 obtidos em $CDCl_3$ e acetona- d_6	53
Figura 18	Principais correlações observadas no espectro de NOESY	54
Figura 19	Estruturas químicas dos eudesmanolídeos 33 (1 α -(4-hidroximetacrilóiloxi)-3 α ,4 α -epoxi-8 α -hidroxieudesm-11(13)-6 α ,12-olídeo) e 34 (1 α -(2,3-epoxiangeloiloxi)-4 α ,15-epoxi-8 α -hidroxieudesm-11(13)-6 α ,12-olídeo)	54
Figura 20	Estrutura da licarina A (51) e da conocarpana (52).....	61
Figura 21	Estruturas químicas da curcumina (53), demetoxicurcumina (54) e <i>bis</i> -demetoxicurcumina (55) e estruturas básicas de curcuminoides monocetônicos (I), 4-hidroximetilênicos (II) e 4-arilidênicos (III).	73
Figura 22.	Variação do número de publicações por ano (a) e da média dos fatores de impacto das publicações de nosso grupo de pesquisa (b).....	81
Figure 2	Espectro de ESI-MS da mistura reacional em $t = 10$ min em duas condições reacionais usando os haletos etiquetados 70 (a) e 71 (b) como co-reagentes.....	85
Figura 24	Mudanças nas intensidades relativas normalizadas de m/z 270 e m/z 192 (a) e m/z 214 e 136 (b) com o tempo, monitoradas por PSI-ESI-MS.....	86

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Atividade antimicrobiana (CIM, em $\mu\text{g/mL}$) de <i>A. sellowiana</i> determinada pelo método de microdiluição em caldo.....	14
Tabela 2	Atividade antimicrobiana (CIM, em $\mu\text{g/mL}$) do extrato diclorometânico das raízes de <i>M. alpestris</i> e de suas frações e do 15-desoxigoiazensolídeo (7) determinada pelo método de microdiluição em caldo.....	17
Tabela 3	Atividade antimicrobiana (CIM, em $\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais avaliados frente a um painel representativo de bactérias cariogênicas, determinada pelo método de microdiluição em caldo.....	24
Tabela 4	Atividade antimicrobiana (CIM, em $\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial de <i>P. neochilus</i> (PN-EO), de seus compostos majoritários 16t , 16s , 17f e 17h e da mistura 16t+16s+17f+17h contra bactérias cariogênicas selecionadas, determinada pelo método de microdiluição em caldo.	27
Tabela 5	Número de adultos e ovos (média \pm EP) ¹ de <i>B. tabaci</i> biotipo B nos folículos de tomate tratados com o óleo essencial em ensaio de múltipla escolha.	32
Tabela 6	Número de adultos e de ovos (média \pm DP) ^a de <i>B. tabaci</i> biotipo B nos folículos tratados com PG-EO e seus monoterpênos majoritários em ensaios de múltipla escolha.	35
Tabela 7	Concentrações inibitórias mínimas (CIM, em $\mu\text{g/L}$) das neolignananas diidrobzofurânicas 20-23 contra bactérias cariogênicas e fungos dermatopatogênicos selecionados.	39
Tabela 8	Valores de concentração inibitória mínima (CIM, em $\mu\text{g/mL}$), dos curcuminoides monocetônicos 56-65 , 56a-65a , 56b-65b e 66 contra bactérias cariogênicas selecionadas.	75
Quadro 1	Relação de óleos essenciais que exibiram atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	29
Quadro 2	Constituição química e principais efeitos dos óleos essenciais contra <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Quadro 3	Íons acílios diagnósticos dos macrotetrolídeos 30-32 com formação induzida por íons cobre(II).....	49
Quadro 4	Íons produtos das neolignananas 35-37 , 39-41 , 44 e 45 protonadas (modo positivo) e desprotonadas (modo negativo).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac₂O	Anidrido acético
AcOH	Ácido acético
BN	Neolignana benzofurânica (do inglês <i>Benzofuran Neolignan</i>)
CFU	Unidade formadora de colônia (do inglês <i>Colony-Forming Units</i>)
CHD	Clorhexidina
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês <i>Collision-Induced Dissociation</i>)
CIM	Concentração inibitória mínima
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
DBN	Neolignana diidrobenzofurânica (do inglês <i>Dihydrobenzofuran Neolignan</i>)
DDQ	Diclorodicianobenzoquinona
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DP	Desvio padrão
EI-MS	Espectrometria de massas com ionização por elétrons (do inglês <i>Electron Ionization Mass Spectrometry</i>)
EP	Erro padrão
ESI	Eletrospray (do inglês <i>electrospray</i>)
ESI(-)-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo de íons negativos
ESI(+)-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo de íons positivos
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (do inglês <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (do inglês <i>Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry</i>)
ESI-MSⁿ	Espectrometria de massas de múltiplos estágios com ionização por eletrospray (do inglês <i>Electrospray Ionization Multiple-Stage Mass Spectrometry</i>)
EtOH	Etanol
GA	Acidez em fase gasosa (do inglês <i>Gas-phase Acidity</i>)
GB	Basicidade em fase gasosa (do inglês <i>Gas-phase Basicity</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
gCOSY	<i>Pulsed-Field Gradient Correlation Spectroscopy</i>
gHMBC	<i>Pulsed-Field Gradient Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
gHMQC	<i>Pulsed-Field Gradient Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HPLC-ESI-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por electro spray (do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)

HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry</i>)
IR	Índice de retenção
IT	Espectrômetro com analisador do tipo captura de íons (do inglês <i>ion trap</i>)
J-resolved	Espectroscopia resolvida em J (do inglês <i>J-Resolved Spectroscopy</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
LST	Lactona sesquiterpênica
m/z	razão massa/carga
MCR	Reação multicomponentes (do inglês <i>Multicomponent Reaction</i>)
Me₂CO	Acetona (propanona)
MeOH	Methanol
MKC	Curcuminoide monocetônico (do inglês <i>Monoketone Curcuminoid</i>)
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>tandem mass spectrometry</i>)
MSⁿ	Espectrometria de múltiplos estágios (do inglês <i>multiple-stage mass spectrometry</i>)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ODI	Índice de deterrência de oviposição (do inglês <i>Oviposition Deterency Index</i>)
PA	Afinidade protônica (do inglês <i>Proton Affinity</i>)
PSI	Introdução pressurizada da amostra (do inglês <i>Pressurized Sample Introduction</i>)
PSI-ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray com introdução pressurizada da amostra (do inglês <i>Pressurized Sample Introduction Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)
Pyr	Piridina
QqQ	Analisador híbrido do tipo triplo quadrupolo
Q-TOF	Analisador híbrido do tipo quadrupolo-tempo de voo (do inglês <i>quadrupole – time-of-flight</i>)
r.t.	Temperatura ambiente (do inglês <i>room temperature</i>)
RI	Índice de repelência (do inglês <i>Repelency Index</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
TIC	Corrente total de íons (do inglês <i>Total Ion Current</i>)
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	PROPOSTA DE SISTEMATIZAÇÃO DA OBRA.....	11
3.1	<i>Aegiphilla sellowiana</i> CHAM. (LAMIACEAE).....	13
3.2.	<i>Minasia alpestris</i> (GARDNER) H. ROBINSON (ASTERACEAE).....	15
3.3	DIFERENCIAÇÃO DE EUDESMANOLÍDEOS E ALCALOIDES PLUMERÂNICOS POR ESI-MS/MS.....	18
3.4	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	21
3.4.1	Contextualização.....	21
3.4.2	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a bactérias cariogênicas.....	24
3.4.3	Atividade antiparasitária de óleos essenciais.....	28
3.4.4	Atividade repelente, deterrente e inseticida de óleos essenciais frente : mosca branca.....	31
3.5	SÍNTESE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	38
3.6	COMPOSTOS BENZOFURÂNICOS.....	47
3.6.1	Contextualização.....	47
3.6.2	Síntese de compostos benzofurânicos.....	56
3.6.3	Atividades biológicas de compostos benzofurânicos.....	60
3.6.4.	Reações de fragmentação em fase gasosa de compostos benzofurânicos....	62
3.7	CURCUMINOIDES MONOCETÔNICOS (MKCs).....	72
3.7.1	Contextualização.....	72
3.7.2	Atividade antimicrobiana de MKCs.....	74
3.7.3	Estudo das reações de fragmentação de MKCs em fase gasosa.....	77
3.8	ESTUDO MECANÍSTICO DE REAÇÕES POR ESI-MS.....	80
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
5	REFERÊNCIAS.....	90

ANEXO 1 *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2010**, *20*, 246-249

ANEXO 2 *Química Nova* **2010**, *33*, 2245-2260

- ANEXO 3 *Natural Product Research* **2011**, 25, 326-331
- ANEXO 4 *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, 24, 295-308
- ANEXO 5 *Natural Product Research* **2013**, 27, 1668-1672
- ANEXO 6 *Brazilian Journal of Microbiology* **2015**, 46, 519-525
- ANEXO 7 *Evidenced-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, Article ID 102317
- ANEXO 8 *Molecules* **2011**, 16, 762-773
- ANEXO *Natural Product Research* **2013**, 27, 920-924
- ANEXO 10 *Chemistry & Biodiversity* **2017**, 14, e1600194
- ANEXO 11 *Chemistry & Biodiversity* **2017**, 14, e1700149
- ANEXO 12 *Chemistry & Biodiversity* **2015**, 12, 1105-1114
- ANEXO 13 *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, 23, 877-884
- ANEXO 14 *Chemistry & Biodiversity* **2011**, 8, 2149-2157
- ANEXO 15 *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, 22, 88-93
- ANEXO 16 *Natural Product Communications* **2015**, 9, 1627-1630
- ANEXO *Journal of Pest Science* **2013**, 86, 301-308
- ANEXO 18 *Journal of Pest Science* **2015**, 88, 191-199
- ANEXO 19 Capítulo do livro *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, **2017**
- ANEXO 20 *Chemistry Select* **2018**, 3, 1836-1839
- ANEXO 21 Capítulo do livro *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*”.
- ANEXO 22 *Journal of Mass Spectrometry* **2018**, 53, 203-213
- ANEXO 23 *Journal of Mass Spectrometry* **2018**, 53, 1086-1096
- ANEXO 24 *Analytical Chemistry* **2017**, 89, 3929-3936
- ANEXO 25 *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2016**, 27, 136-143
- ANEXO 26 *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2017**, Article ID 7921867
- ANEXO 27 *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Submetido para publicação)
- ANEXO 28 *Chemistry & Biodiversity* **2018**, 15, e1800134
- ANEXO 29 *Journal of Pest Science* **2019**, 92, 861-869
- ANEXO 30 Capítulo do livro “*Benzofuran: Production and Applications*, **2020**
- ANEXO 31 *Journal of Mass Spectrometry* **2017**, 52, 809-816
- ANEXO 32 *Journal of Mass Spectrometry* **2019**, 54, 35-46
- ANEXO 33 *Journal of American Society for Mass Spectrometry* (Submetido para publicação)
- ANEXO 34 *Chemistry & Biodiversity* **2018**, 15, e1800216
- ANEXO 35 *International Journal of Complementary & Alternative Medicine* **2018**, 11, 347-350
- ANEXO 36 *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2020**, e8699
- ANEXO 37 *Inorganica Chimica Acta* **2020**, 508, 119654

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas é uma técnica em que íons gasosos da amostra são separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z). A técnica foi primordialmente desenvolvida por J. J. Thomson para diferenciar isótopos a partir de seus diferentes valores de m/z [1]. Desde então, os cientistas têm buscado incessantemente promover o desenvolvimento da técnica e expandir sua aplicabilidade, especialmente no que diz respeito à análise de compostos orgânicos.

Até a década de 1980, a aplicabilidade da espectrometria de massas encontrava-se limitada à análise de compostos voláteis (ou volatilizáveis por derivatização), termicamente estáveis e de baixo peso molecular [2]. Esta limitação era decorrente dos métodos de ionização disponíveis nos equipamentos comerciais daquela época, com destaque para a ionização por elétrons (EI-MS, do inglês *electron ionization mass spectrometry*)¹ [2]. Na EI-MS, a ionização é resultado da colisão de moléculas da amostra no estado gasoso com um feixe de elétrons de alta energia (geralmente 70 eV) emitidos por um filamento metálico aquecido. Os íons assim gerados possuem um alto conteúdo de energia interna residual e se fragmentam durante o voo para o analisador, onde são separados de acordo com seus valores de m/z . Os íons fragmentos formados sob essas condições (70 eV) são uma “impressão digital” da molécula original, podendo ser utilizados para fins de identificação estrutural a partir da comparação dos espectros de massas da amostra com os disponíveis em bibliotecas espectrais.

¹ A publicação mais recente sobre as regras de nomenclatura de espectrometria de massas em língua portuguesa foi publicada em 2011 (Vessecchi, R. *et al.*, *Química Nova* **2011**, *34*, 10, 1875-1887). Nela, são traduzidos para o português apenas os termos utilizados em espectrometria de massas, não havendo qualquer menção à tradução dos acrônimos. Por essa razão, os acrônimos utilizados neste texto foram os mesmos utilizados em inglês.

Na técnica GC-MS (do inglês *gas chromatography – mass spectrometry*), a amostra injetada na coluna cromatográfica é separada em seus componentes individuais, que são então direcionados para a fonte de ionização EI por meio de um divisor de fluxo. A identificação de cada componente pode ser feita a partir da comparação entre os espectros de massas da amostra e os disponíveis em bibliotecas espectrais, bem como na comparação de índices de retenção experimentais com os da literatura. Os índices de retenção (IR) são calculados a partir dos tempos de retenção de cada componente da amostra e dos tempos de retenção de padrões analisados nas mesmas condições que a amostra [3]. A técnica GC-MS representa, ainda nos dias de hoje, uma poderosa ferramenta para a elucidação de compostos orgânicos em amostras voláteis, com particular destaque para os óleos essenciais [4].

A partir das décadas de 1980 e 1990, a espectrometria de massas experimentou uma grande expansão em sua aplicabilidade graças ao advento das técnicas de spray, especialmente a ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*) [5]. Conforme pode ser observado no gráfico da **Figura 1** (p. 3), plotado a partir de dados extraídos do banco de dados da Web of Science®, houve um aumento vertiginoso no número total de publicações abordando a espectrometria de massas a partir da década de 1990. Esse aumento coincide com o desenvolvimento da ionização por eletrospray e, principalmente, com o seu acoplamento à cromatografia líquida de alta eficiência.

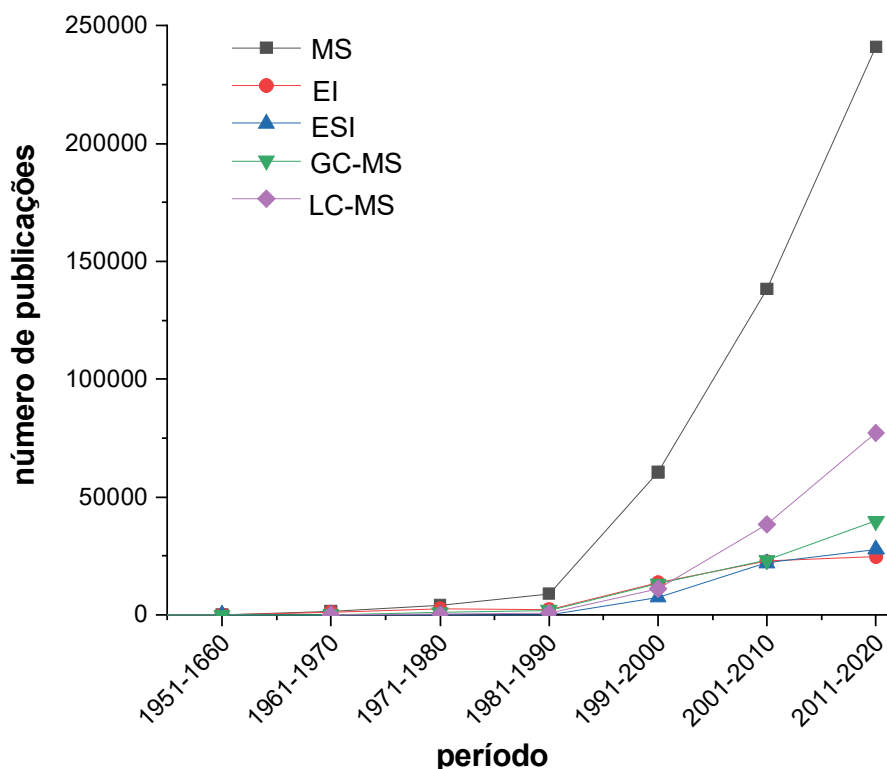


Figura 1. Número total de publicações na área de espectrometria de massas por década. O gráfico foi plotado a partir de dados “brutos” (sem filtros), obtidos de pesquisa feita na base de dados da Web of Science[®] usando apenas as palavras-chaves de interesse.

Em ESI, a solução do analito em um solvente polar é introduzida em um capilar metálico (75-150 μm de diâmetro) a um fluxo de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ (**Figura 2**, p. 4). Este capilar é mantido em um potencial elétrico (entre 3 e 5 kV) em relação às paredes da fonte, o que provoca a migração de carga das espécies em solução para a interface metal-solução, tornando carregada a superfície do líquido e formando, assim, uma dupla camada elétrica [6]. Na ponta do capilar, as forças eletrostáticas que agem sobre os íons pré-formados na dupla camada elétrica contrabalançam a tensão superficial, culminando em uma superfície cônica conhecida como cone de Taylor [7]. Um fino spray de pequenas gotas é então formado devido à ação de um gás nebulizante (geralmente N_2), que é introduzido na fonte coaxialmente ao capilar. O volume das gotas que emergem da ponta do capilar é reduzido pela ação de um gás secante (geralmente N_2), que promove a evaporação do solvente. Com a redução do tamanho das gotas, a repulsão

coulômbica entre cargas de mesmo sinal presentes na superfície das gotas aumenta. Quando o limite de Rayleigh é atingido, esta repulsão torna-se maior que a tensão superficial, ocasionando a “explosão coulômbica” da gota [6]. Esta sequência de eventos repete-se até que o raio da curvatura da gota se torne pequeno a ponto de gerar íons individuais, seja por expulsão do íon da gota de solvente (*ion evaporation model*, IEM) ou pela eliminação do solvente residual por secagem da gota (*charge residual model*, CRM) [8].

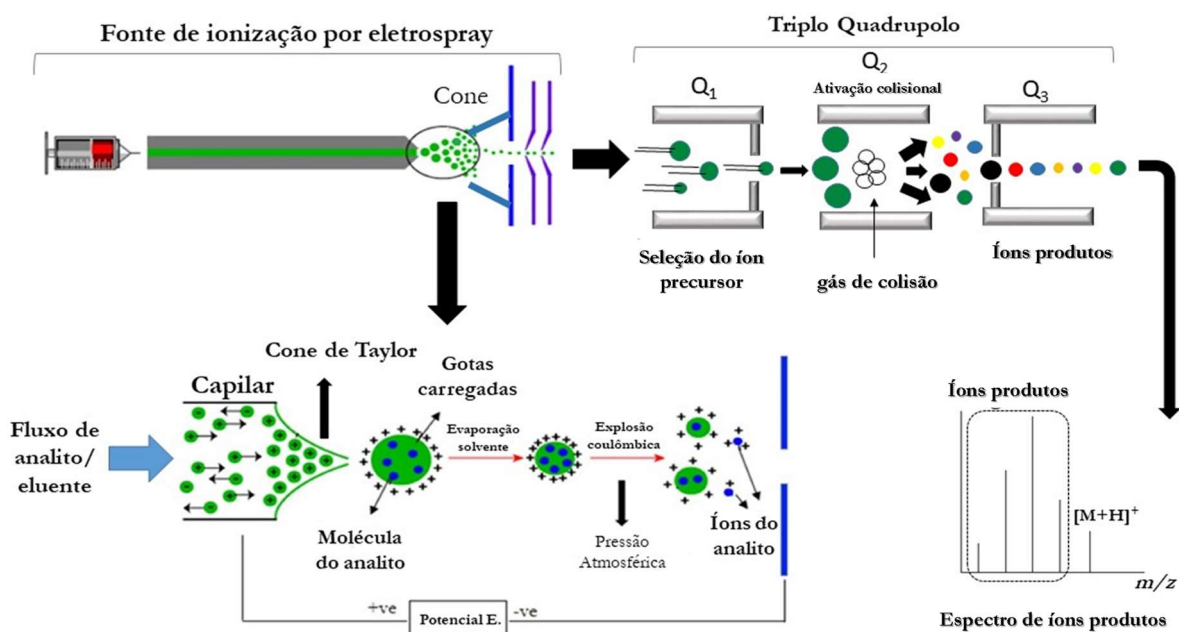


Figura 2. Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray em um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ) operando no modo de varredura de íons produtos (do inglês *product ion scan mode*).

De maneira geral, os íons gerados individualmente por ESI são moléculas protonadas ($[M+H]^+$), desprotonadas ($[M-H]^-$) ou mesmo moléculas cationizadas, principalmente com íons metálicos (por exemplo, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$) [7]. A ionização propriamente dita (isto é, a geração de íons a partir de moléculas) ocorre em solução, no interior do capilar, por meio de reações ácido-base (protonação/desprotonação) e da coordenação com cátions presentes em solução [7]. Além disso, para compostos polifuncionalizados e de alta massa molecular (por exemplo,

proteínas), íons multiplamente carregados podem também ser formados [2]. Os mecanismos de geração de íons em ESI foram abordados em um artigo de revisão publicado no periódico *Química Nova* em 2006 [9]. O artigo foi redigido sob a supervisão do prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP), com quem mantivemos estreito contato durante a pós-graduação, a partir do levantamento bibliográfico realizado durante o nosso doutorado, concluído em 2005 [10]. Posteriormente, a formação de íons radicais ($M^{\bullet+}$) em ESI a partir de moléculas com baixo potencial de oxidação foi abordada em outro artigo de revisão, publicado no *Mini-Reviews in Organic Chemistry* pelo mesmo grupo de pesquisa [11].

Dentre as várias aplicações da espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS, do inglês *electrospray ionization mass spectrometry*), merece destaque a sua utilização para a identificação de compostos orgânicos de baixa massa molecular. Na última década, a técnica ESI-MS vem se tornando uma ferramenta de elucidação estrutural de uso rotineiro em laboratórios de química orgânica em geral [12]. Como ESI é considerado um método de ionização brando (do inglês *soft ionization*) – ou seja, produz íons com baixo conteúdo de energia interna – a técnica é adequada para a determinação da massa molecular (equipamentos com analisadores de baixo poder de resolução) e da fórmula molecular (em espectrômetros com analisadores de alto poder de resolução). Entretanto, a obtenção de informações estruturais é dificultada pela pouca ou nenhuma fragmentação observada nos espectros de massas obtidos por ESI [13]. Por isso, em casos em que essas informações são também necessárias, utiliza-se a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS, do inglês *electrospray ionization tandem mass spectrometry*). Esta técnica consiste na seleção, em um primeiro estágio de MS, de um íon de m/z específica (chamado de “íon precursor”) gerado na fonte ESI. Este íon é então ativado para fragmentação e os íons fragmentos formados são analisados em um segundo estágio de MS (**Figura 2**, p. 4). Em analisadores híbridos – por exemplo, triplo quadrupolo (QqQ) ou quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF, do inglês *quadrupole – time of flight*) – os

dois estágios de MS ocorrem em analisadores distintos (*MS in space*), enquanto que em analisadores do tipo “armadilha de íons” (IT, do inglês *ion trap*) este processo ocorre em um mesmo analisador (*MS in time*) [2]. Neste último, é também possível estender a análise a outros estágios de MS. Por exemplo, um íon produto formado no segundo estágio de MS pode ser selecionado como íon precursor e ativado para fragmentação (MS^3). O processo descrito pode ser realizado consecutivas (n) vezes e é conhecido como espectrometria de massas de estágios múltiplos (*multiple-stage mass spectrometry*, ou MS^n). O método de ativação de íons mais comum em espectrômetros de massas comerciais é a dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision-induced dissociation*) [2]. Este método consiste na aceleração do íon precursor devido à interação com campos elétricos e magnéticos para que o mesmo colida-se com moléculas de um gás inerte (geralmente Ar ou N_2) [14]. A energia cinética deste íon precursor é então convertida em energia interna, fazendo com que o mesmo origine íons fragmentos (também chamados de “íons produtos”) por meio da perda de partes de sua estrutura na forma de moléculas ou radicais. Essas reações de fragmentação em fase gasosa são unimoleculares e ocorrem quando a energia interna do íon precursor no estágio pós-colisional supre a energia crítica para a formação de um íon fragmento específico [15].

Conforme mencionado anteriormente (p. 2), o aumento expressivo no número de publicações na área de espectrometria de massas não está associado apenas à maior diversidade de compostos que podem ser ionizados por ESI, mas também à compatibilidade deste método de ionização com o fluxo e o volume de fase móvel proveniente de cromatógrafos líquidos, o que possibilitou o acoplamento entre cromatografia líquida e espectrometria de massas [16, 17]. Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography Eletrospray Ionization Mass Spectrometry*) tem sido extensamente empregada em vários campos da Química, tais como Química de Alimentos [18], Proteômica [19] e Metabolômica [20], Química

Forense [21] e Química de Produtos Naturais [22], entre outros. Com o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS/MS, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*), tornou-se possível a identificação dos constituintes químicos individuais de misturas (por exemplo, metabólitos especializados presentes em extratos oriundos de plantas ou de microrganismos) sem a necessidade de serem isolados [12]. O potencial desta técnica para a “desrepliação”² (do inglês *dereplication*) de produtos naturais já foi discutido na literatura em um capítulo de livro publicado em 2012 por nosso grupo de pesquisa [7]. De modo geral, esta identificação requer que os dados obtidos por ESI-MS/MS, tais como o perfil do espectro de UV-Vis, o espectro de íons produtos e o tempo de retenção de um determinado pico, sejam comparados com os respectivos dados de padrões autênticos [7]. Portanto, a disponibilidade prévia de padrões ou de seus dados de ESI-MS/MS e de UV/vis é, na maioria dos casos, indispensável [23, 24]. No entanto, dados da literatura indicam que, em alguns casos, a identificação de um composto pode ser feita com base nos dados de MS/MS mesmo na ausência de um padrão autêntico ou de uma biblioteca comercial. Nesses casos, o conhecimento prévio sobre as rotas de fragmentação pode ser mais importante que o próprio padrão. Por outro lado, a falta de estudos sistemáticos sobre as reações de fragmentação não apenas dificulta a elaboração de bibliotecas espectrais como também pode levar a interpretações errôneas sobre a estrutura do analito [25].

Em princípio, várias reações de fragmentação competitivas e consecutivas podem ocorrer a partir de um íon precursor. As reações que possuem maior constante de velocidade (k) levarão à formação de um número maior de íons produtos, que poderão fragmentar-se novamente e formar íons produtos com m/z ainda menores [26, 27]. Dessa forma, a intensidade

² Embora seja utilizada com relativa frequência no meio acadêmico e científico, o termo “desrepliação” não aparece em dicionários da língua portuguesa. Por essa razão, optamos por utilizá-lo neste texto entre aspas.

de cada íon no espectro de íons produtos está associada ao número de íons com determinado m/z que chegam até o detector. De maneira geral, há uma tendência de que íons termodinamicamente mais estáveis (isto é, os de menor conteúdo entálpico) sejam os mais intensos no espectro de íons produtos, uma vez que a energia crítica para que os mesmos se fragmentem novamente tende a ser maior [28]. Por essa razão, íons alílicos, benzílicos, tropílios e carbocátions estabilizados por ressonância com pares de elétrons não ligantes de heteroátomos adjacentes (por exemplo, íons acílios, oxônios e imínios) são geralmente intensos no espectro de massas [25]. Além disso, íons produtos de reações de fragmentação consideradas espontâneas ($\Delta G_{298} < 0$) geralmente são intensos nos espectros de íons produtos [25]. Estes e vários outros aspectos mecanísticos das reações de fragmentação em fase gasosa foram extensamente revisados em artigo que publicamos 2016 no periódico *Natural Product Reports* [25].

A estabilidade intrínseca de íons precursores e íons produtos, tal como descrita no parágrafo anterior, é baseada em conceitos de química em fase gasosa, já que em condições de vácuo o solvente não exerce efeito sobre a estabilidade destes íons. Neste sentido, algumas conclusões equivocadas podem ser eventualmente elaboradas, visto que prever a estabilidade de estruturas iônicas na ausência do solvente não é uma tarefa tão simples. Portanto, a utilização de Química Computacional para estimar as energias relativas (ΔH e ΔG) pode auxiliar na determinação das vias de fragmentação mais favorecidas e na compreensão das intensidades relativas de diferentes íons no espectro de íons produtos [29].

Uma das primeiras etapas de estudos sobre as vias de fragmentação de um composto ou de uma classe de compostos é a determinação do sítio de protonação/desprotonação. Isto é feito a partir de grandezas como a afinidade protônica (PA, do inglês *proton affinity*), basicidade em fase gasosa (GB) e acidez em fase gasosa (GA). Por definição, GB é o valor negativo da variação da energia de Gibbs (ΔG) para uma reação de protonação do tipo $M + H^+ \rightarrow MH^+$ em fase gasosa, enquanto a PA é o valor negativo da variação da entalpia desta mesma reação. Por outro

lado, GA é definida como o valor negativo da variação da energia de Gibbs para uma reação de desprotonação ($M \rightarrow M^- + H^+$) em fase gasosa [30, 31]. Estes dados, até certo ponto, fornecem subsídios para o esclarecimento de dúvidas sobre as vias de fragmentação [32, 33]. Devido à maior precisão das correlações envolvendo H e G para o estudo de reações de protonação/desprotonação em relação a outros indicativos de acidez e basicidade, os valores de GB, GA ou PA têm se mostrado os mais funcionais em estudos de fragmentação [11].

Além de sua importância para a elucidação estrutural de compostos orgânicos, a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray também é utilizada em estudos de mecanismos de reação, tanto em solução como em fase gasosa [34, 35]. Como a técnica ESI-MS é rápida e altamente sensível, é possível utilizá-la tanto para a detecção de reagentes e produtos como para a detecção de espécies transientes que reagem rapidamente e, portanto, não se acumulam no meio reacional [34, 36]. Desta forma, é possível interceptar intermediários de reação que já tenham sido previamente propostos com base em evidências experimentais para validar, modificar ou mesmo refutar propostas mecanísticas empíricas [34]. Dentre as reações cujos mecanismos já foram investigados por ESI-EM, merecem ser citadas as reações de acoplamento de Heck [37, 38], a reação de Morita-Baylis-Hillman [36, 39], as reações de acoplamento de Eschenmoser [40], a reação de Biginelli [41] e a reação de Suzuki-Miyaura [42], entre outras.

O estudo de reações por ESI-MS pode ser feito por técnicas de amostragem *off-line* ou por monitoramento *on-line* contínuo [43]. O monitoramento *off-line* consiste em monitorar as mudanças na composição do meio reacional por meio de alíquotas coletadas da mistura reacional em tempos pré-determinados. Essas alíquotas podem ser analisadas imediatamente ou armazenadas após a supressão da reação [43]. Esta estratégia permite a caracterização de espécies presentes em concentrações razoáveis no meio reacional no momento em que a alíquota foi coletada, porém é limitada para a detecção de espécies transientes com tempos de vida muito

curto [43, 44]. No monitoramento *on-line* contínuo, informações cinéticas e mecanísticas podem ser obtidas acoplando-se o meio reacional diretamente à fonte ESI, permitindo assim a caracterização tanto de produtos estáveis como de intermediários reativos com tempos de vida da ordem de milissegundos [44]. Dentre as várias estratégias desenvolvidas para o monitoramento *on-line* de reações, merece destaque a introdução da amostra pressurizada (PSI, do inglês *Pressurized Sample Introduction*), desenvolvida por McIndoe e colaboradores (**Figura 3**) [45, 46].

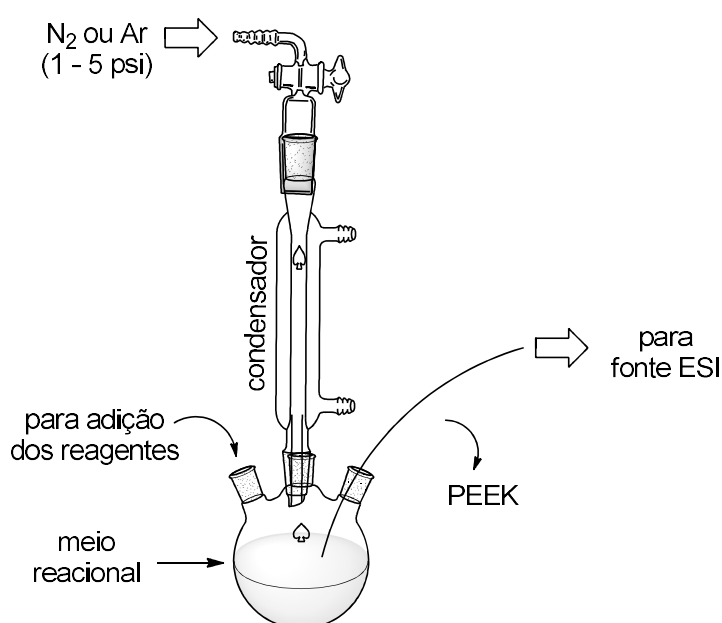


Figura 3. Representação da técnica PSI [45, 47].

Nesta técnica, um frasco de Schlenk contendo a mistura reacional é posicionado próximo à fonte ESI e conectado a uma fonte de gás inerte por meio de um pequeno tubo de borracha (**Figura 3**). Uma das extremidades de um tubo PEEK é inserido no frasco de Schlenk através de um septo de borracha, enquanto a outra é conectada à fonte ESI. Uma pressão entre 1 e 5 psi é então aplicada ao meio reacional para facilitar a introdução contínua da amostra no espectrômetro [45-47]. Neste caso, o uso de reagentes “etiquetados com carga” (do inglês *charge tagged*), que possuem uma eficiência de ionização muito alta, assegura que intermediários que existam em baixas concentrações sejam “pescados” da mistura reacional [48]. Esta técnica tem

sido utilizada com sucesso para a detecção de intermediários do ciclo catalítico de paládio e ródio na hidrogenação de alcinos [49] e na hidrodehalogenação de iodetos de arila [50], respectivamente.

2. PROPOSTA DE SISTEMATIZAÇÃO DO TEXTO

Este texto sistematiza a obra do candidato em ordem cronológica, abordando os seguintes temas:

- Atividades biológicas de compostos orgânicos naturais e sintéticos;
- Estudo de compostos orgânicos naturais e sintéticos por espectrometria de massas;
- Estudo de mecanismos de reação empregando espectrometria de massas.

Apesar de parecerem totalmente distintos, estes temas estão conectados entre si pela utilização da espectrometria de massas como ferramenta para a elucidação estrutural, seja de compostos orgânicos de interesse do ponto de vista biológico, seja de intermediários de reações orgânicas.

3. DISCUSSÃO SISTEMATIZADA **DA OBRA**

3.1 *Aegiphilla sellowiana* CHAM. (LAMIACEAE)

Após a conclusão do doutorado, em 2005, iniciamos nossas atividades como pesquisador colaborador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Universidade de Franca (UNIFRAN), em regime de dedicação parcial, a convite do prof. Dr. Wilson Roberto Cunha, então coordenador do programa. Naquele ano, o programa de pós-graduação havia sido recém-aprovado pela CAPES, o grupo de pesquisa da UNIFRAN estava sendo nucleado e a estrutura de pesquisa da instituição na área de Química estava em fase de implantação. Por outro lado, havia na universidade um laboratório de Microbiologia já bem estabelecido, coordenado pelo prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, com quem iniciamos uma colaboração científica. Neste contexto, nossos primeiros trabalhos de pesquisa na UNIFRAN foram desenvolvidos na área de Química de Produtos Naturais, com ênfase na busca por compostos com atividade antimicrobiana frente a patógenos da cavidade bucal.

O primeiro trabalho foi realizado com o extrato etanólico das partes aéreas de *Aegiphilla sellowiana* Cham. (Lamiaceae), conhecida popularmente como “tamanqueira” e utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e contra picadas de cobra [51]. O extrato em questão foi gentilmente cedido pelo prof. Dr. Wilson Roberto Cunha e foi tema da dissertação de mestrado de Marcele Araújo Ferreira. Com base nos valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos e em critérios estabelecidos na literatura (valores de CIM menores que 100 µg/mL, entre 100 e 500 µg/mL e entre 500 e 1000 µg/mL indicam atividade antimicrobiana promissora, moderada e fraca, respectivamente) [52-54], observou-se que o extrato etanólico bruto das partes aéreas de *A. sellowiana* (**AS**) apresentou atividade antimicrobiana promissora frente a *Streptococcus mitis* (CIM = 50 µg/mL), *Streptococcus sanguinis* (CIM = 70 µg/mL), *Streptococcus sobrinus* (CIM = 80 µg/mL) e *Streptococcus salivarius* (CIM = 80 µg/mL) (**Tabela 1**, p. 14). No entanto, após o fracionamento do extrato **AS** por meio de cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando eluição com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol:água para a obtenção

das frações **AS₁**, **AS₂**, **AS₃** e **AS₄**, respectivamente, observou-se um decréscimo acentuado na atividade antimicrobiana frente a todos os patógenos testados. Dentre as frações listadas, a fração em *n*-hexano (**AS₁**) foi a mais ativa, porém apresentou apenas atividade moderada frente às bactérias cariogênicas avaliadas (valores de CIM entre 140 e 350 µg/mL).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana (CIM, em µg/mL) de *A. sellowiana* determinada pelo método de microdiluição em caldo.

	Clorexidina	AS	AS ₁	AS ₂	AS ₃	AS ₄
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,3688	200	*	*	*	*
<i>Lactobacillus casei</i>	0,0230	*	150	*	*	*
<i>Streptococcus mitis</i>	0,3688	50	140	400	400	*
<i>Streptococcus mutans</i>	0,3688	200	250	400	*	*
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,0922	70	140	*	400	*
<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,0115	80	250	*	*	*
<i>Streptococcus salivarius</i>	0,0461	80	350	*	*	*

*Inativo nas concentrações avaliadas. **AS** refere-se ao extrato bruto das partes aéreas de *A. sellowiana* em etanol; **AS₁**, **AS₂**, **AS₃** e **AS₄** referem-se às frações de **AS** em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol:água, respectivamente.

A fração **AS₁**, que apresentou a atividade antimicrobiana mais promissora, foi analisada por GC-MS para identificação de seus constituintes químicos. Na época, as análises foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), da FCFRP-USP. A partir dessas análises, foi possível identificar como produtos majoritários quatro ésteres de ácidos graxos (palmitato de metila, 21,1%; palmitato de etila, 8,3%; oleato de metila, 5,9%; estearato de metila, 2,1% e oleato de etila, 2,0%), três hidrocarbonetos sesquiterpênicos alifáticos (**1**: 6,10,14-trimetil-pentadecan-2-ona, 7,7%; **2**: 3,7,11,15-tetrametil-hexadec-1-en-3-ol, 5,3%; e **3**: 2,6,10-trimetil-14-etilenil-pentadec-14-eno, 11,6%) e três esteroides (**4**: estigmast-5-en-3-ol, 0,5%; **5**: acetato de estigmasta-5,22-dien-3-ol, 2,4%; e **6**: estigmasta-3,5-dien-7-ona, 1,3%) (**Figura 4**, p. 15). A lipofilicidade desses compostos majoritários, especialmente dos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, foi associada à atividade

antimicrobiana da fração **AS₁**, uma vez que tal lipofilicidade pode estar intimamente relacionada à capacidade de permeação através da parede celular das bactérias [55]. Entretanto, os dados obtidos neste estudo levaram-nos a sugerir que os efeitos desses compostos sobre as bactérias cariogênicas selecionadas são potencializados por efeitos sinérgicos e/ou aditivos de outros constituintes minoritários em **AS₁** ou mesmo pela presença de outros compostos presentes nas frações **AS₂**, **AS₃** e **AS₄** (Anexo 1).

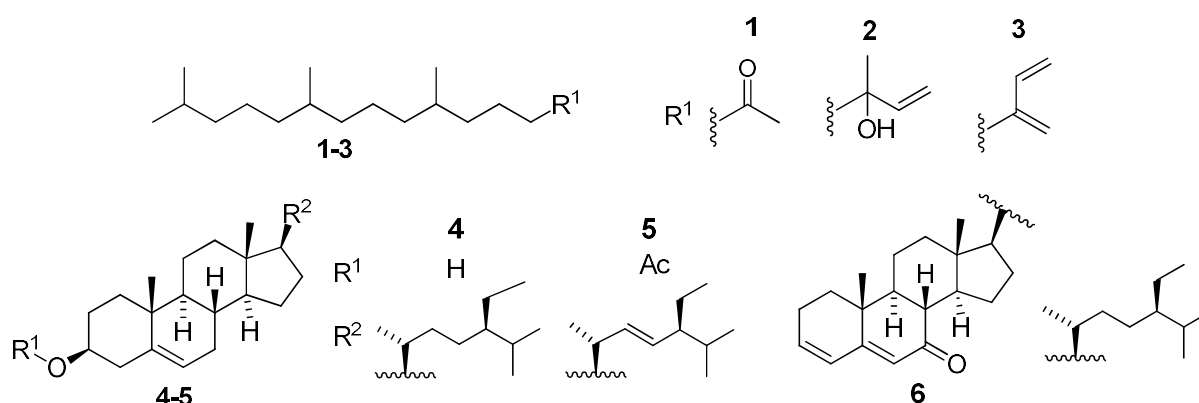


Figura 4. Estruturas dos sesquiterpenos e dos esteroides da fração **AS₁** de *A. sellowiana* identificados por GC-MS.

3.2 *Minasia alpestris* (GARDNER) H. ROBINSON (ASTERACEAE)

Minasia alpestris (Gardner) H. Robinson (Asteraceae) é uma espécie herbácea endêmica ao Estado de Minas Gerais. A partir dos espécimes de *Minasia alpestris* coletados em 1998 pelo prof. Dr. Walter Vichnewski (*in memoriam*), da FCFRP-USP, foram preparados extratos de várias partes da planta em três solventes diferentes (*n*-hexano, diclorometano e metanol). Dentre esses extratos, o extrato diclorometânico das folhas secas foi selecionado para o desenvolvimento de nosso projeto de mestrado, que foi desenvolvido entre 1999 e 2001, sob orientação do prof. Dr. João Luis Callegari Lopes (FCFRP-USP). O referido extrato foi selecionado a partir da análise dos espectros de absorção na região do infravermelho, que indicava uma maior concentração de lactonas sesquiterpênicas naquele extrato. O trabalho resultou no isolamento e na identificação de sete lactonas sesquiterpênicas (LST). 15-

desoxigoiazensolídeo (**7**, **Figura 5**) foi reportado como o constituinte majoritário daquele extrato, sendo que outras duas LST (**8** e **9**) inéditas na literatura foram também descritas [56]. No entanto, nenhum dos outros extratos de *Minasia alpestris* havia sido investigado desde então.

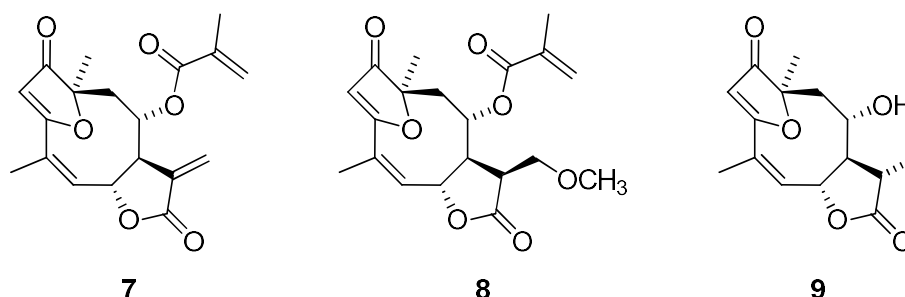


Figura 5. Estrutura química de algumas LSTs isoladas de *M. alpestris* [20].

Em 2006, a mestranda Larissa Costa Keles, sob nossa orientação, realizou uma extensa revisão bibliográfica sobre os constituintes químicos e as atividades biológicas de espécies da tribo Lychnophorinae e verificou que ainda havia uma grande carência de estudos fitoquímicos e de ensaios biológicos com espécies de *Minasia*. Além de ter sido incluída na parte introdutória da dissertação da aluna, defendida em 2008, esta revisão foi publicada no periódico *Química Nova*, em 2010 [57] (**Anexo 2**). Neste contexto, propusemos aos profs. Dr. João Luis Callegari Lopes (FCFRP-USP) e Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP) dar prosseguimento ao estudo fitoquímico dos extratos de *Minasia alpestris* que ainda não haviam sido investigados. Foi então realizado um fracionamento bioguiado do extrato dos ramos de *Minasia alpestris* em diclorometano, que foi selecionado devido à maior quantidade de material disponível (**Anexo 3**).

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto dos ramos de *M. alpestris* em diclorometano (**MA**) e das frações dele obtidas por partição em *n*-hexano (**MA-1**), diclorometano (**MA-2**) e metanol:água (**MA-3**) indicaram atividade moderada de **MA** frente à maioria das bactérias cariogênicas testadas (valores de CIM entre 250 e 400 µg/mL), com exceção de *Streptococcus mitis* (CIM = 80 µg/mL) (**Tabela 2**, p. 17). Por outro lado, a fração **MA-2**

apresentou valores de CIM menores que os do extrato bruto **MA** e das frações **MA-1**, **MA-3** e **MA-4**, sendo a mais ativa dentre as frações avaliadas.

O fracionamento de **MA-2** levou ao isolamento do 15-desoxigoiazensólídeo (7, **Figura 5**, p. 16) como constituinte químico majoritário. Contudo, a atividade apresentada por **MA-2** não pôde ser associada unicamente à presença da LST 7, que apresentou valores de CIM maiores que os de **MA-2** frente à maioria das bactérias cariogênicas avaliadas, exceto *Enterococcus faecalis* (CIM = 90 µg/mL). Estes resultados indicaram que o 15-desoxigoiazensólídeo não é o responsável pela atividade de **MA-2** ou, ainda, que sua atividade contra a maioria dos patógenos bucais é potencializada por efeitos sinérgicos ou aditivos de outros constituintes químicos minoritários presentes em **MA-2**. Da mesma forma, esses compostos minoritários podem exercer efeitos antagonísticos sobre a atividade do 15-desoxigoiazensólídeo contra *E. faecalis* (**Anexo 3**).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana (CIM, em µg/mL) do extrato diclorometânico das raízes de *M. alpestris* e de suas frações e do 15-desoxigoiazensólídeo (7) determinada pelo método de microdiluição em caldo.

	Cloridrato de clorexidina	MA	MA-1	MA-2	MA-3	MA-4	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,3688	400	>400	400	350	>400	40
<i>Lactobacillus casei</i>	0,0230	300	100	80	300	>400	200
<i>Streptococcus mitis</i>	0,3688	80	180	90	300	>400	90
<i>Streptococcus mutans</i>	0,3688	300	140	120	300	>400	200
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,0922	>400	130	60	160	>400	60
<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,0115	300	>400	140	350	>400	200
<i>Streptococcus salivarius</i>	0,0461	250	>400	160	300	>400	200

MA: extrato bruto em diclorometano; **MA-1**, **MA-2** e **MA-3** são as frações de **MA** em *n*-hexano, diclorometano e metanol:água, respectivamente; **MA-4** é o resíduo da filtração.

3.3 DIFERENCIAÇÃO DE EUDESMANOLÍDEOS E ALCALOIDES PLUMERÂNICOS POR ESI-MS/MS

A primeira orientação na área de espectrometria de massas iniciou-se em abril de 2008, quando o graduando Herbert Júnior Dias iniciou seu projeto de iniciação científica, intitulado “Diferenciação de 3,4- e 4,15-epoxieudesmanolídeos por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray”. O objetivo principal deste projeto era aproveitar o potencial do aluno, um dos melhores de sua turma de graduação, e prepará-lo para uma possível pós-graduação na área de espectrometria de massas. O projeto foi desenvolvido a partir de dados obtidos pelo prof. Dr. Ricardo Stéfani (UFMT-Campus de Barra do Garças) em 2003, na época em que éramos colegas de pós-graduação. Com base nesses dados, foi elaborada uma estratégia para a diferenciação entre duas lactonas sesquiterpênicas da classe dos eudesmanolídeos com base nos dados de ESI-MS/MS. Os resultados foram utilizados para a redação de um manuscrito, que foi submetido para publicação no periódico *Eclética Química*. No entanto, a revista foi descontinuada naquela época e o artigo sequer acabou passando pela revisão por pares.

Ainda em 2008, na Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, tivemos nosso primeiro contato com o profs. Drs. Ivo José Curcino Vieira e Raimundo Braz-Filho, este último um dos pesquisadores brasileiros mais respeitados na área de Química de Produtos Naturais, ambos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF-RJ). Ao tomar conhecimento de nosso artigo sobre as reações de fragmentação de dicetopiperazinas em fase gasosa que havia sido publicado no final de 2007 na edição especial do *Journal of Mass Spectrometry* [58] em comemoração à fundação da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, o prof. Ivo e o prof. Braz propuseram a realização de um estudo por espectrometria de massas com alcaloides plumerânicos nos mesmos moldes que aquele que havíamos realizado com as dicetopiperazinas. Diante da empolgação demonstrada na época pelo aluno Herbert em seus primeiros meses de estágio, iniciamos o trabalho já nas semanas seguintes.

Nos meses que se seguiram, o estudante Herbert foi também envolvido no projeto de óleos essenciais que havia sido recentemente aprovado pela FAPESP (item 3.4 deste texto) e ao qual passamos a nos dedicar integralmente. No entanto, após alguns meses contribuindo para com o projeto de óleos essenciais, o aluno optou por realizar estágio em indústrias. Conseqüentemente, o trabalho em colaboração com os professores Ivo e Braz foi concluído apenas em 2010, graças ao envolvimento e ao esforço conjunto dos alunos de iniciação científica Gabriela de Paula Aguiar, Kamila Akemi Lima Wakabayashi e Guilherme Luz. Neste trabalho, que foi publicado no periódico *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (**Anexo 4**), o padrão de fragmentação de seis alcaloides com esqueleto plumerânico foi investigado com base em dados de ESI-MS/MS e de massas acuradas. Após o estabelecimento das correlações estrutura-fragmentação e da identificação dos íons comuns e dos íons diagnósticos, os dados obtidos foram utilizados para a identificação desses compostos em um extrato metanólico bruto da casca do caule de *Aspidosperma spruceanum* (**Figura 6**).

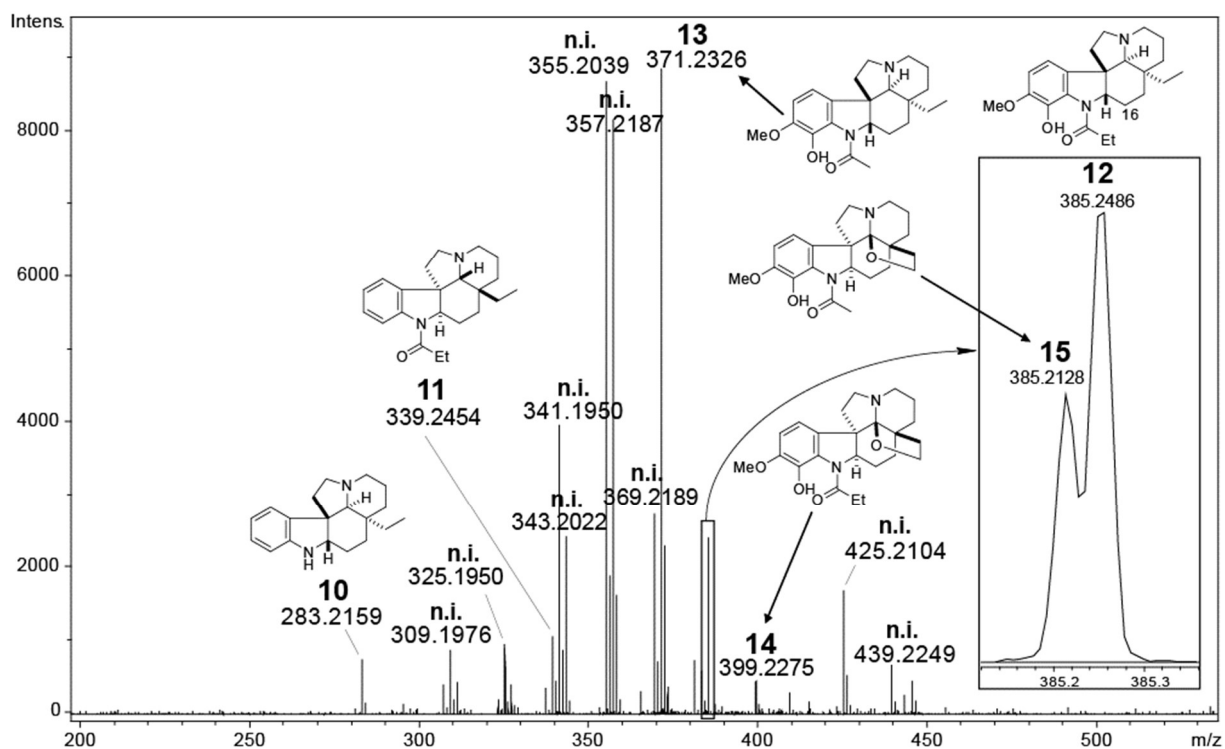
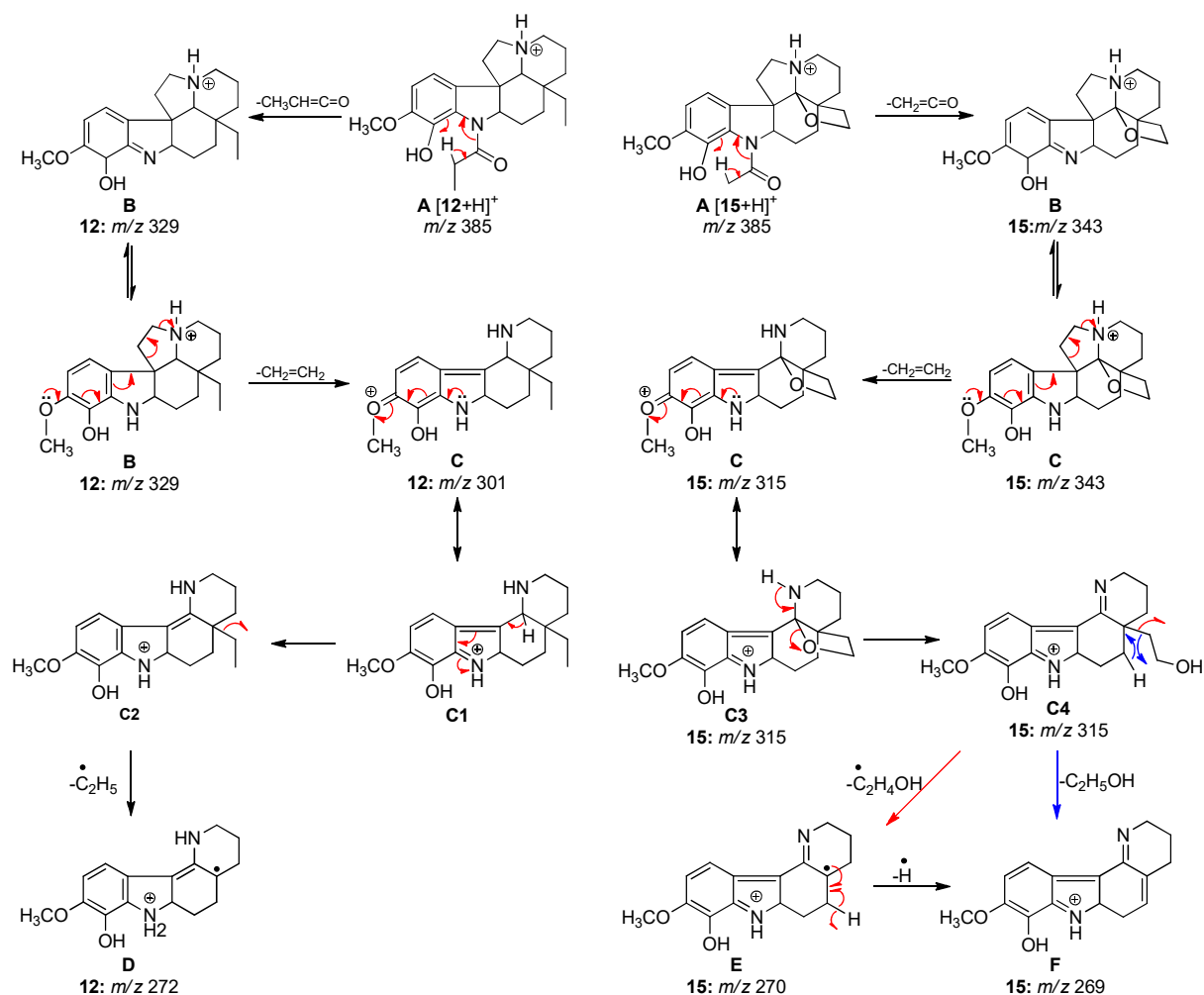


Figura 6. Espectro de ESI-MS do extrato metanólico da casca do caule de *Aspidosperma spruceanum* (n.i. = não identificado) [59].

O uso de espectrometria de massas de alta resolução permitiu a separação dos íons isobáricos correspondentes aos alcaloides **12** (aspidocarpina) e **15** (aspidolimidina) protonados. Apesar de a eliminação do grupo *N*-acílico e a posterior eliminação de etileno (C_2H_4) serem processos comuns aos alcaloides indólicos protonados **12** (m/z 385) e **15** (m/z 385), os íons produtos **B** e **C** resultantes dessas eliminações possuem valores de m/z diferentes, conforme mostrado no **Esquema 1**. Além disso, a diferenciação entre **12** e **15** pôde ser feita também a partir de algumas fragmentações específicas para cada composto. É o caso, por exemplo, das eliminações radiculares de $\bullet C_2H_5$ (para o alcaloide **12**) e $\bullet C_2H_4OH$ (para o alcaloide **15**) [59].



Esquema 1. Formação dos íons produtos **B**, **C**, **D**, **E** e **F** dos alcaloides indólicos protonados **12** e **15** [59].

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

3.4.1 Contextualização

Em 2007, foi aprovada pela CAPES a implantação do doutorado em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências da UNIFRAN. Como parte das iniciativas da instituição para atender às exigências da CAPES, vários professores foram contratados em regime de dedicação integral à docência e à pesquisa para a constituição de um corpo docente permanente, dentre os quais fomos incluídos.

Diante deste cenário otimista, decidimos elaborar um projeto de pesquisa visando não apenas a obtenção de recursos financeiros, mas principalmente o estabelecimento de uma linha de pesquisa independente que envolvesse a aplicação da espectrometria de massas. A experiência adquirida até aquele momento em termos institucionais mostrou-nos que o projeto a ser elaborado e a linha de pesquisa a ser estabelecida deveriam levar em consideração vários fatores, tais como atender às expectativas do público-alvo (o curso de pós-graduação era multidisciplinar, o que tornava o curso atrativo para estudantes com as mais diversas formações) e ser exequível pelos alunos de iniciação científica e de pós-graduação da instituição (os pós-graduandos do programa, em sua maioria, já estavam inseridos no mercado de trabalho, e como não dispunham de bolsas de estudo, também não se dedicavam integralmente à pós-graduação). Outro fator a ser considerado era o cenário desfavorável na época para a coleta de plantas em virtude do enrijecimento das leis governamentais. Foi então que, em conversa com o prof. Dr. Rodrigo Cássio Sola Veneziani, também docente Programa de Pós-graduação em Ciências e antigo colega de pós-graduação, tomamos conhecimento do “Sítio 13 de Maio”, de propriedade do médium João Berbel. Situado na cidade de Franca, o sítio revelou-se o local apropriado para a coleta de diversas plantas aromáticas, que lá eram cultivadas com o intuito de serem utilizadas para a elaboração dos “fitoterápicos” que são distribuídos gratuitamente no Instituto de Medicina

do Além (IMA) após a realização das cirurgias espirituais. A ideia de propormos um projeto voltado para a extração, determinação da constituição química e avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais ganhou forma rapidamente. A proposta inicial do projeto foi a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a bactérias cariogênicas, cujos ensaios foram realizados sob a supervisão do prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, da UNIFRAN, com quem já mantínhamos colaboração. Desta forma, o projeto intitulado “Prospecção de óleos essenciais de espécies brasileiras cultiváveis com atividade contra patógenos da cavidade bucal” foi submetido ao Programa de Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes da FAPESP (Proc. 2007/54241-8), sendo concedido em setembro de 2008. Como parte da concessão, foi aprovada pela FAPESP a aquisição de um equipamento de GC-MS Shimadzu modelo GCMS2010Plus, equipado com fonte de ionização por elétrons (EI-MS). Além de possibilitar que a determinação da constituição química dos óleos essenciais fosse feita na própria instituição, a chegada do equipamento de GC-MS também abriu várias possibilidades para o estabelecimento de novas parcerias científicas [60-62].

Com o andamento do projeto de Jovem Pesquisador, verificou-se que a composição química dos óleos essenciais das plantas aromáticas cultivadas no Sítio 13 de Maio já havia sido reportada na literatura. Esta “falta de ineditismo” já havia sido prevista inicialmente quando o projeto foi proposto e, em um primeiro momento, não foi considerada como um fator limitante para a publicação dos resultados, uma vez que o enfoque (ou “ineditismo”) seria a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra bactérias cariogênicas. No entanto, a maioria dos óleos essenciais investigados apresentou atividade antimicrobiana moderada ou fraca. Este fato levou-nos a diversificar as atividades biológicas a serem avaliadas.

Uma das atividades mais comumente reportadas para óleos essenciais e que nos despertou o interesse foi a atividade inseticida. Deste modo, por indicação do prof. Dr. Norberto

Peporine Lopes (FCFRP-USP), entramos em contato com o prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin, da Faculdade de Ciências Agrárias de Botucatu (FCA/UNESP). Uma de suas linhas de pesquisa, dedicada à prospecção de compostos com atividade deterrente, repelente e inseticida contra a mosca branca (*Bemisia tabaci* Genn. biotipo B (Homoptera: Aleyrodidae)), chamou-nos a atenção. A mosca branca é, reconhecidamente, uma das maiores pragas da agricultura e da horticultura, que afeta também plantas ornamentais, inclusive em estufas, em praticamente todos os países do mundo [63]. Os grandes prejuízos econômicos causados pela mosca branca em lavouras de tomate, feijão, soja, amendoim e algodão estão associados não apenas aos efeitos diretos de sua alimentação, mas também à sua capacidade de transmitir vírus patogênicos letais à planta [64]. Além disso, aplicações repetitivas dos inseticidas sintéticos disponíveis têm levado ao surgimento de indivíduos de *B. tabaci* resistentes [65], à eliminação de seus inimigos naturais [66] e ao aumento do risco de resíduos em tóxicos em alimentos [67].

No início de 2010, tivemos contato com a prof^ª. Dr^ª. Lizandra Guidi Magalhães. Na época, a prof^ª. Lizandra realizava estágio de pós-doutorado nos laboratórios da UNIFRAN, sob supervisão do prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, hoje na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-MG). O projeto por ela desenvolvido abrangia algumas doenças tropicais negligenciadas, mais especificamente a esquistossomose, a doença de Chagas e a leishmaniose, que também nos despertou o interesse. Dessa forma, nosso projeto na área de óleos essenciais passou a abranger aspectos importantes da saúde pública – a cárie e as doenças tropicais negligenciadas (esquistossomose, doença de Chagas e leishmaniose) – e questões de interesse da agricultura (mosca branca).

Nas seções a seguir serão discutidos os principais resultados provenientes do projeto de óleos essenciais, que foi desenvolvido na UNIFRAN no período de outubro de 2008 a setembro de 2012.

3.4.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a bactérias cariogênicas

O primeiro projeto na área de óleos essenciais foi desenvolvido pelos alunos de iniciação científica Gabriela de Paula Aguiar e Carlos Eduardo Carvalho. Neste projeto, foi feita uma triagem de vários óleos essenciais extraído das folhas de algumas plantas aromáticas quanto às suas atividades antimicrobianas frente a um painel representativo de bactérias cariogênicas (**Anexo 5**). Os resultados encontram-se reunidos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana (CIM, em $\mu\text{g/mL}$) dos óleos essenciais avaliados frente a um painel representativo de bactérias cariogênicas, determinada pelo método de microdiluição em caldo.

EO	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>E. faecalis</i>
ACo	>4000	2000	4000	>4000	>4000	4000	\geq 4000
ACa	2000	250	500	2000	2000	4000	4000
BS	250	31.2	500	>4000	4000	4000	>4000
FV	>4000	4000	4000	>4000	>4000	\geq 4000	>4000
LA	500	250	500	1000	1000	2000	4000
OG	1000	1000	500	2000	1000	2000	2000
PG	1000	1000	1000	2000	1000	2000	4000
SA	2000	2000	1000	2000	1000	2000	4000
TE	>4000	4000	4000	>4000	>4000	>4000	>4000
CHD	0.92	3.68	0.92	7.37	0.92	0.92	3.68

ACo: *Ageratum conyzoides* (mentrasto); **ACa:** *Artemisia camphorata* (canforim); **BS:** *Bidens sulphurea* (picão); **FV:** *Foeniculum vulgare* (funcho) **LA:** *Lippia alba* (erva cidreira); **OG:** *Ocimum gratissimum* (alfavaca); **PG:** *Pelargonium graveolens* (gerânio) **SA:** *Sisymbrium aromaticum* (cravo-da-índia). **TE:** *Tagetes erecta* (cravo de defunto); **CHD:** cloridrato de clorexidina.

A maioria dos óleos essenciais testados apresentou atividade moderada ($100 < \text{CIM} < 500 \mu\text{g/mL}$), fraca ($500 < \text{CIM} < 1000 \mu\text{g/mL}$) ou mostrou-se inativa ($\text{CIM} > 1000 \mu\text{g/mL}$) frente às bactérias cariogênicas testadas. Dentre os óleos testados, o óleo essencial de *Bidens sulphurea*, popularmente conhecido como picão, apresentou os menores valores de CIM frente a *Streptococcus mitis* ($\text{CIM} = 31,25 \mu\text{g/mL}$) e *Streptococcus mutans* ($\text{CIM} = 250 \mu\text{g/mL}$). As análises por

GC-MS permitiram identificar os sesquiterpenos germacreno D (**17b**, 38.3%), (*E*)-cariofileno (**17f**, 18.0%), β -elemene (**17c**, 13,9%) e biciclogermacreno (**17g**, 13.1%) como constituintes majoritários neste óleo essencial (**Figura 7**).

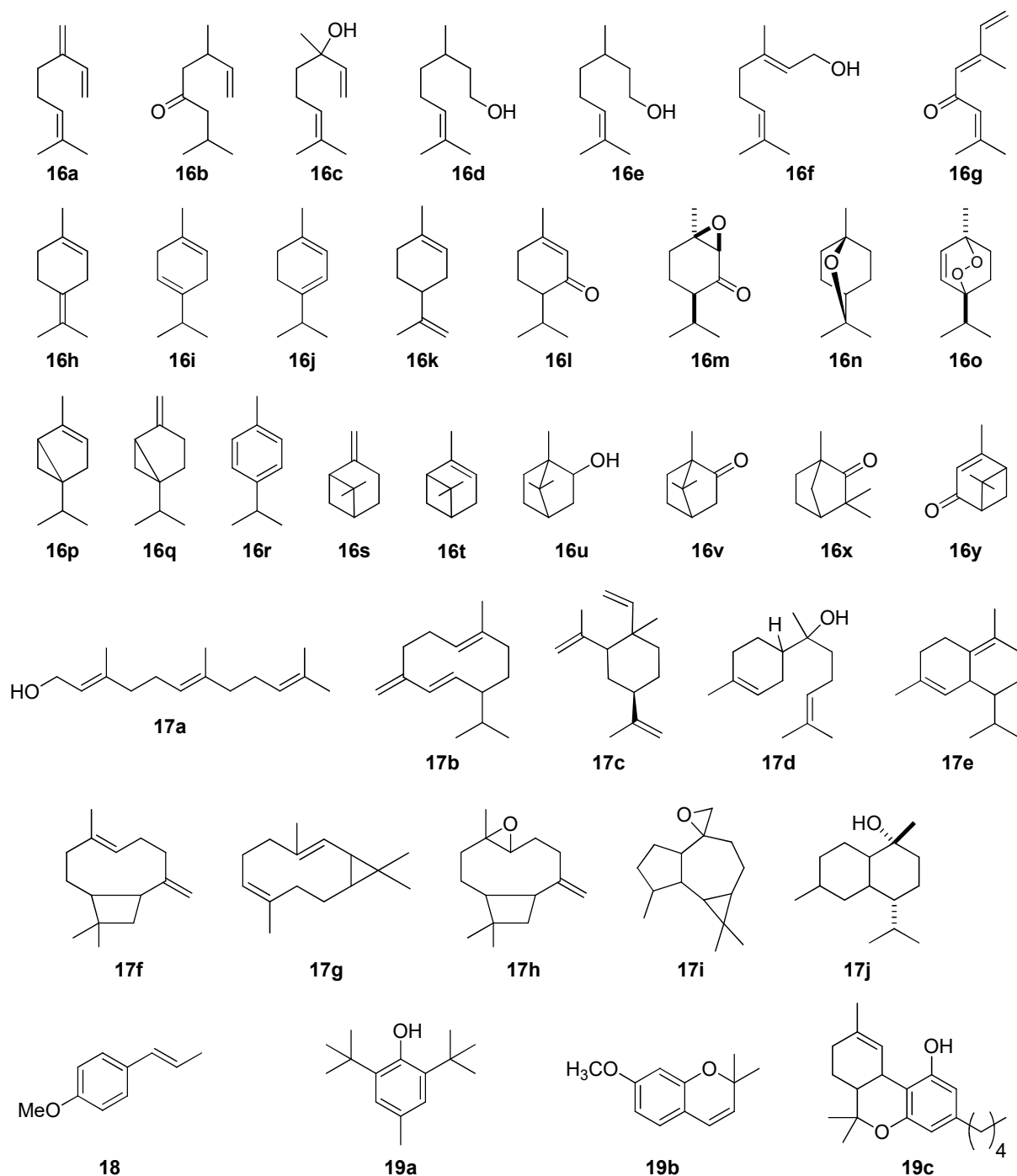


Figura 7. Estruturas dos constituintes químicos majoritários nos óleos essenciais descritos neste texto. A numeração foi feita por classe de compostos, sendo **16**: monoterpenos; **17**: sesquiterpenos; **18**: fenilpropanoide; **19**: outros.

Tetradenia riparia (Hochst.) Codd. (Lamiaceae), popularmente conhecida como “falsa mirra”, é uma espécie herbácea originada na África do Sul [68]. Com base em seu uso na medicina popular para tratar dor de dente e abscessos dentais [69] e em sua atividade antimicrobiana previamente reportada contra *Enterococcus faecalis* [68], o potencial antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *T. riparia* frente a bactérias cariogênicas foi investigado pela mestrandia Nathalya Isabel de Melo (**Anexo 6**). Os menores valores de CIM deste óleo foram obtidos frente a *Streptococcus mitis* (31,2 µg/mL), *Streptococcus mutans* (62,5 µg/mL), *Streptococcus sobrinus* (31,2 µg/mL) e *Lactobacillus casei* (62,5 µg/mL). Nos experimentos de tempo de morte, este óleo essencial apresentou atividade bactericida contra *Streptococcus mutans*, principal responsável pela cárie, já nas primeiras 12 h, resultando em uma curva de tempo de morte similar à da clorexidina (**Figura 8**). Como constituintes majoritários deste óleo foram identificados óxido de aromadendreno (**17i**, 14,5%), (*E,E*)-farnesol (**17a**, 13,6%), dronabinol (**19c**, 12,5%) e fenchona (**16x**, 6,2%) (**Figura 7**, p. 25). Apesar de a composição química do óleo essencial de *Tetradenia riparia* ter sido reportada previamente por vários outros autores, este foi o primeiro estudo relatando a presença de (*E,E*)-farnesol e de dronabinol (**Anexo 6**).

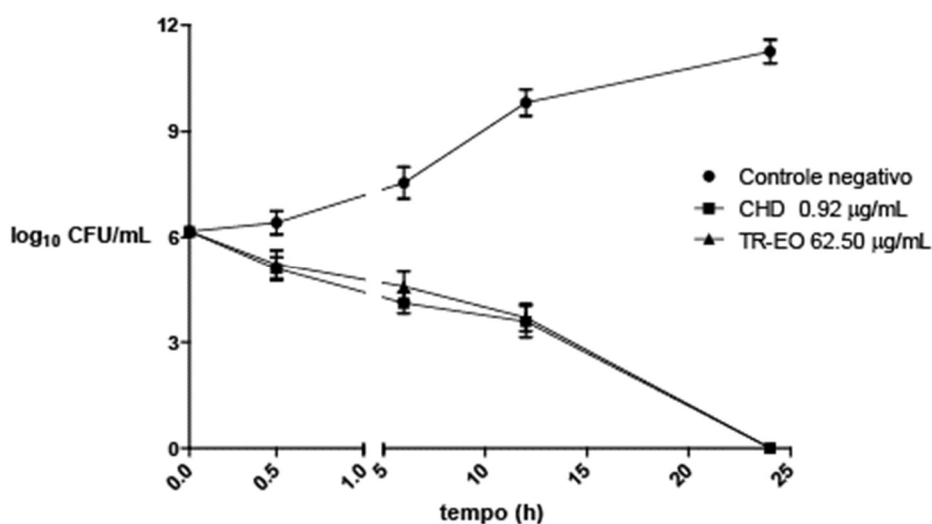


Figura 8. Curva de tempo de morte obtida para o óleo essencial de *T. riparia* (TR-EO) contra *S. mutans* (5×10^5 CFU/mL). CHD: clorexidina [70].

Dentre todos os óleos essenciais testados quanto à atividade antimicrobiana frente a patógenos bucais, o óleo essencial das folhas de *Plectranthus neochilus*, popularmente conhecido como “falso boldo” ou “boldo rasteiro”, foi o mais promissor. Conforme pode ser observado na **Tabela 4**, este óleo apresentou atividade promissora frente a *Streptococcus mutans* (CIM=3,9 µg/mL), *Streptococcus mitis* (CIM=31,2 µg/mL), *Streptococcus sobrinus* (CIM=62,5 µg/mL), *Streptococcus sanguinis* (CIM=62,5 µg/mL) e *Lactobacillus casei* (CIM=31,3 µg/mL). Os principais constituintes químicos majoritários identificados por GC-MS foram α -pineno (**16t**, 14,1%), β -pineno (**16s**, 7,1%), (*E*)-cariofileno (**17f**, 29,8%) e óxido de cariofileno (**17h**, 12,8%) (**Anexo 7**).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana (CIM, em µg/mL) do óleo essencial de *P. neochilus* (PN-EO), de seus compostos majoritários **16t**, **16s**, **17f** e **17h** e da mistura **16t+16s+17f+17h** contra bactérias cariogênicas selecionadas, determinada pelo método de microdiluição em caldo.

Microrganismos	PN-EO	CHD ^a	16t ^c	16s ^c	17f ^c	17h ^c	16t+16s+17f+17h
<i>Enterococcus faecalis</i>	250,0	14,8	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
<i>Streptococcus salivarius</i>	250,0	7,4	4000	4000	4000	4000	4000
<i>Streptococcus mutans</i>	3,9	1,8	>4000	>4000	>4000	>4000	1000
<i>Streptococcus mitis</i>	31,2	14,8	4000	4000	4000	4000	4000
<i>Streptococcus sobrinus</i>	62,5	1,8	>4000	>4000	>4000	>4000	4000
<i>Streptococcus sanguinis</i>	62,5	7,4	4000	>4000	>4000	>4000	>4000
<i>Lactobacillus casei</i>	31,2	3,7	4000	4000	4000	4000	500

^aCHD: cloridrato de clorexidina; **16t**: α -pineno; **16s**: β -pinene; **17f**: *trans*-cariofileno; **17h**: óxido de cariofileno; ^b**16t+16s+17f+17h**: mistura de α -pineno, β -pineno, (*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno.

^cPara os compostos **16t**, **16s**, **17f**, e **17h**, a concentração de 4000 µg/mL corresponde a 29,4, 29,4, 19,6 e 18.1 µM, respectivamente.

Quando testados isoladamente, esses compostos foram inativos frente à maioria das bactérias selecionadas, com valores de CIM iguais ou maiores que 4000 µg/mL. Esses compostos também foram testados em uma mistura cujas concentrações relativas de **16t**, **16s**, **17f** e **17h** são

próximas às razões entre as áreas destes compostos no cromatograma de GC-MS. A mistura apresentou atividade moderada frente a *Lactobacillus casei* (CIM=500 µg/mL) e atividade fraca frente a *Streptococcus mutans* (CIM=1000 µg/mL). No entanto, apesar de os valores de CIM obtidos para a mistura sugerirem um sinergismo muito discreto entre os compostos majoritários, a mistura foi muito menos ativa que o óleo essencial de *Plectranthus neochilus*. Estes resultados indicaram que a atividade do óleo essencial pode estar relacionada a outros constituintes minoritários, que tanto podem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana como também podem potencializar a atividade dos constituintes majoritários deste óleo.

3.4.3 Atividade antiparasitária de óleos essenciais

Todos os óleos essenciais obtidos no período da vigência de nosso projeto de Jovem Pesquisador da FAPESP, entre 2008 e 2012, foram avaliados quanto à atividade esquistossomicida *in vitro*. De maneira geral, a maioria dos óleos que apresentou atividade antiparasitária promissora não foi ativa nos ensaios antimicrobianos, com exceção dos óleos obtidos das folhas de *Plectranthus neochilus* e de *Tetradenia riparia*, que apresentaram ambas as atividades. As atividades antimicrobiana e esquistossomicida desses dois óleos essenciais foram temas das dissertações de mestrado de Soraya Carolina Caixeta e Nathalya Isabel de Melo, respectivamente. No **Quadro 1** (p. 29) encontram-se listados os óleos essenciais testados e os alunos que realizaram a extração, a determinação da constituição química e os ensaios para avaliação da atividade antiparasitária. No **Quadro 2** (p. 30) estão reunidos os constituintes majoritários e os principais efeitos observados nos ensaios para avaliação da atividade esquistossomicida de cada um desses óleos, bem como o número dos anexos correspondentes.

Nos ensaios realizados, os óleos essenciais foram avaliados em concentrações entre 3,125 a 200 µg/mL. A atividade esquistossomicida *in vitro* dos óleos foi avaliada a partir

de sua eficácia para causar a mortalidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, para promover a separação de casais e para reduzir a atividade motora e a viabilidade dos vermes adultos. Os efeitos foram avaliados a cada 24 h em um total de 120 h. Praziquantel, na concentração de 10 μ M (3,9 μ g/mL), foi utilizado como controle positivo em todos os ensaios realizados.

Quadro 1. Relação de óleos essenciais que exibiram atividade esquistossomicida *in vitro*. *

Espécie	Nome popular	Estudante	Anexo
<i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae)	Mentrasto	Nathalya I. de Melo (ME)	8
<i>Bidens sulphurea</i> (Cav.) Sch. Bip. (Asteraceae)	Picão	Gabriela de P. Aguiar (IC)	9
<i>Citrus lemonia</i> Osbeck (Rutaceae)**	Limão cravo	Moara H. G. Martins (IC)	10
<i>Citrus reticulata</i> Blanco (Rutaceae)**	Tangerina poncã	Moara H. G. Martins (IC)	10
<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants (Chenopodiaceae)	Erva de Santa Maria	Marina H. Soares (ME)	11
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (Apiaceae)	Funcho	Kamila A. L. Wakabayashi (IC)	12
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. (Lamiaceae)	Lavanda	André L. L. Mantovani (ME)	13
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr. (Lamiaceae)	Falso-boldo	Soraya C. Caixeta (ME)	14
<i>Tagetes erecta</i> L. (Asteraceae)	Cravo de defunto	Ligia R. Tonuci (DO)	15
<i>Tetradenia riparia</i> (Hochst.) Codd. (Lamiaceae)	Falsa mirra	Nathalya I. de Melo (ME)	16

* Todos os óleos essenciais listados neste quadro foram extraídos das folhas de cada espécie, com exceção do óleo de *Bidens sulphurea*, que foi extraído das flores. ** Óleo fornecido pelo prof. Dr. Ricardo Stéfani (UFMT-Campus de Barra do Garças).

Quadro 2. Constituição química e principais efeitos dos óleos essenciais contra *Schistosoma mansoni*.

Planta	Constituintes majoritários	Principais efeitos sobre <i>S. mansoni</i>	Anexo
AC	Precoceno I (19b, 74,3%) e (E)-cariofileno (17f, 14,2%)	75% de separação dos casais e mortalidade de 75% fêmeas e 100% de machos após 120h (LC ₅₀ =75,7µg/mL) e decréscimo da atividade motora após 24h na concentração de 100 µg/mL.	8
BS	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol (19a, 44,9%), germacreno D (17b, 33,7%) e (E)-cariofileno (17f, 10,2%).	100% de mortalidade (100 µg/mL, 48h), decréscimo da atividade motora (50 µg/mL, 96h), 75% de separação de casais (50 µg/mL, 120h) e redução significativa da viabilidade (100 µg/mL),	9
CL e CR	CL: limoneno (16k, 29,9%), β-pineno (16a, 12,0%), sabineno (16q, 9,0%), citronelal (16e, 9,0%) e citronelol (16d, 5,8%) CR: limoneno (16k, 26,5%), γ-terpineno (16i, 17,2%), linalool (16c, 11,1%), octanal (8,0%), mirceno (16a, 6,2%) e capradéido (3,9%).	100% de mortalidade (CL: 50 µg/mL, 72h, LC ₅₀ = 38,9 µg/mL; CR: 100 µg/mL, 24h, LC ₅₀ = 81,7 µg/mL), separação de casais (CL: 75%, 100 µg/mL, 72 h; CR: 100%, 24h, 25µg/mL) e redução significativa da atividade motora (CL e CR) a 500 µg/mL após 24h	10
DA	Óxido de <i>α</i> -piperitona (16m, 35,2%), <i>p</i> -cimene (16r, 14,5%), isoascaridol (16o, 14,1%) e α-terpineno (16j, 11,6%)	100% de mortalidade a 25 µg/mL após 24h (LC ₅₀ =6,50± 0,38 g/mL) e a 12,5 µg/mL após 72h (LC ₅₀ =3,65± 0,76 g/mL)	11
FV	(E)-Anetol (18, 69,8%) e limoneno (16k, 22,5%)	50% de mortalidade (100 µg, 24h), redução da atividade motora de 50% (10 µg/mL, 120h), separação de casais (50 µg/mL, 24h)	12
LA	borneol (16u, 22,4%), <i>epi</i> -α-muurolol (17j, 13,4%), α-bisabolol (17d, 13,1%), precoceno I (19b, 13,0%) e eucalyptol (16n, 7,9%)	100% de mortalidade (200 µg/mL, 24h, LC ₅₀ = 117,7 µg/mL), redução da atividade motora (75% dos vermes, 100 µg/mL, 24h), 100% de separação dos casais (25µg/mL após 120h ou 50µg/mL após 120h).	13
PN	(E)-cariofileno (17f, 28,2%), α-tujeno (16p;12,2%), α-pineno (16i; 12,6%), β-pineno (16s; 6,1%), germacreno D (17b; 5,3%) e óxido de cariofileno (17h; 5,3%)	100% de mortalidade (100 µg/mL, 24h, LC ₅₀ = 89,65 µg/mL), 100% de separação de casais (100 µg/mL, 24h), redução da atividade motora a 100 µg/mL após 24h; viabilidade dos vermes reduzida (100 µg/mL, 120h)	14
TE	α-terpinoleno (16h, 17,9%), (E)-ocimenona (16g, 12,9%), didrotagetona (16b, 11,8%), piperitona (16l, 8,7%), verbenona (16y, 9,7%) e limoneno (16k, 10,4%)	100% de mortalidade (100µg/mL, 24h, LC ₅₀ = 81,47 µg/mL), 100% de separação dos casais (100µg/mL, 24h), redução da atividade motora a 100µg/mL após 24h	15
TR	fenchona (16x, 18,9%), óxido de aromadendreno (17i, 17,3%), (E,E)-farnesol (17a, 17,7%), (E)-cariofileno (17f, 4,4%), cânfora (16v, 4,3%), δ-cadineno (17e, 4,3%)	100% de mortalidade (100µg/mL, 24h), 100% de separação dos casais (50µg/mL, 120h), redução da atividade motora (50µg/mL, 120h).	16

AC: *Ageratum conyzoides*; BS: *Bidens sulphurea*, CL: *Citrus lemonia*; CR: *Citrus reticulata*; DA: *Dysphania ambrosioides*; FV: *Foeniculum vulgare*; LA: *Lavandula angustifolia*; PN: *Plectranthus neochilus*; TE: *Tagetes erecta*; TR: *Tetradenia riparia*

O óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (erva de Santa Maria) foi o que provocou a mortalidade de 100% dos vermes adultos nas menores concentrações (25 µg/mL após 24 h e 12,5 µg/mL após 72 h de tratamento), com valores de LC₅₀ de 6,50 ± 0,38 µg/mL em 24h e 3,65 ± 0,76 µg/mL em 72 h. Por outro lado, o óleo essencial de *Citrus reticulata* (tangerina poncã) foi o que promoveu a separação de todos os casais de vermes adultos na menor concentração (25 µg/mL) e no menor tempo de incubação (24 h). Além disso, a viabilidade dos vermes incubados com alguns óleos essenciais (por exemplo, *Bidens sulphurea*, *Plectranthus neochilus* e *Tetradenia riparia*) nas maiores concentrações avaliadas (100 e 200 µg/mL) foi similar à dos vermes tratados com o controle positivo (praziquantel) na concentração de 3,9 µg/mL. Alguns óleos também apresentaram efeito sobre a redução do número de ovos, porém esses efeitos foram resultantes da separação dos casais. Estes resultados, em conjunto, indicaram que os óleos essenciais apresentam potencial esquistossomicida promissor, que até então não tinha sido muito explorado na literatura.

3.4.4 Atividade repelente, deterrente e inseticida de óleos essenciais frente à mosca branca

Os óleos essenciais extraídos das espécies coletadas no “Sítio 13 de maio” foram avaliados quanto aos seus potenciais repelente, deterrente e fumigante frente à mosca branca (*Bemisia tabaci* biotipo B). Conforme mencionado anteriormente, os ensaios foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin (FCA-UNESP/Botucatu). Para facilitar a logística dos ensaios, parte dos óleos foi enviada em meados de 2010 e a outra no início de 2012. Os resultados obtidos foram utilizados para a redação de quatro artigos científicos [71-74], porém somente dois deles serão discutidos neste texto (**Anexos 17 e 18**).

No primeiro trabalho, foram avaliadas as atividades repelente e deterrente dos óleos essenciais extraídos das folhas do canforim (*Artemisia camphorata* Vill., Asteraceae), mentrasto (*Ageratum conyzoides* L., Asteraceae), funcho (*Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae), erva cidreira de arbusto (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br, Verbenaceae), falso boldo (*Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae) e cravo de defunto (*Tagetes erecta* L., Asteraceae) (**Anexo 17**). Os resultados apresentados na **Tabela 5** mostraram uma tendência para um número menor de adultos nos folículos de tomate tratados com os óleos essenciais. O óleo essencial de *P. neochilus* foi o mais repelente dentre os óleos essenciais testados quando comparado ao controle após 6h, 12h e 24h de tratamento. Este óleo apresentou também os menores índices de repelência (RI, do inglês *repelency index*) nas três avaliações (6, 12 e 24h), conforme mostrado na **Figura 9** (p. 33). Além disso, houve uma redução significativa no número de ovos depositados nos folículos tratados com os óleos essenciais de *P. neochilus*, *A. conyzoides* e *T. erecta* em relação ao controle (**Tabela 5**). No entanto, com base no índice de deterrência de oviposição (ODI, do inglês *oviposition index*), o óleo essencial de *P. neochilus* (-82,07) foi também o mais ativo (**Figura 10**, p. 33). A redução da oviposição nos folículos tratados com este óleo essencial pode estar associada à sua repelência, que reduz a infestação por moscas adultas.

Tabela 5. Número de adultos e ovos (média \pm EP)¹ de *B. tabaci* biotipo B nos folículos de tomate tratados com o óleo essencial em ensaio de múltipla escolha.

Óleos essenciais	Nº de adultos			Nº de ovos
	6h	12h	24h	
PN	35,75 \pm 11,24 b	26,25 \pm 16,42 b	23,00 \pm 13,38 b	41,75 \pm 23,22 c
ACa	49,25 \pm 10,66 ab	71,75 \pm 36,13 ab	51,25 \pm 7,69 ab	315,25 \pm 134,31ab
ACo	60,00 \pm 10,68 ab	51,50 \pm 15,54 ab	63,25 \pm 10,51 ab	85,75 \pm 34,33 bc
TE	62,25 \pm 25,81 ab	68,25 \pm 16,08 ab	42,75 \pm 8,86 ab	88,25 \pm 9,41 bc
LA	83,50 \pm 19,57 ab	88,75 \pm 19,88 a	76,75 \pm 11,67 a	488,50 \pm 64,13 a
FV	88,50 \pm 10,37 ab	85,75 \pm 28,69 a	52,25 \pm 13,12 ab	329,25 \pm 75,16 ab
Control	153,70 \pm 46,22 a	98,25 \pm 33,41 a	67,50 \pm 16,85 ab	469,75 \pm 78,85 a
P value	0,0261	0,0125	0,0314	0,0389

¹Dados originais; médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para ANOVA, os dados foram transformados para $(x+0,5)^{1/2}$. **ACa**: *A. camphorata*, **ACo**: *A. conyzoides*, **FV**: *F. vulgare*, **LA**: *L. alba*, **PN**: *P. neochilus*, **TE**: *T. erecta*

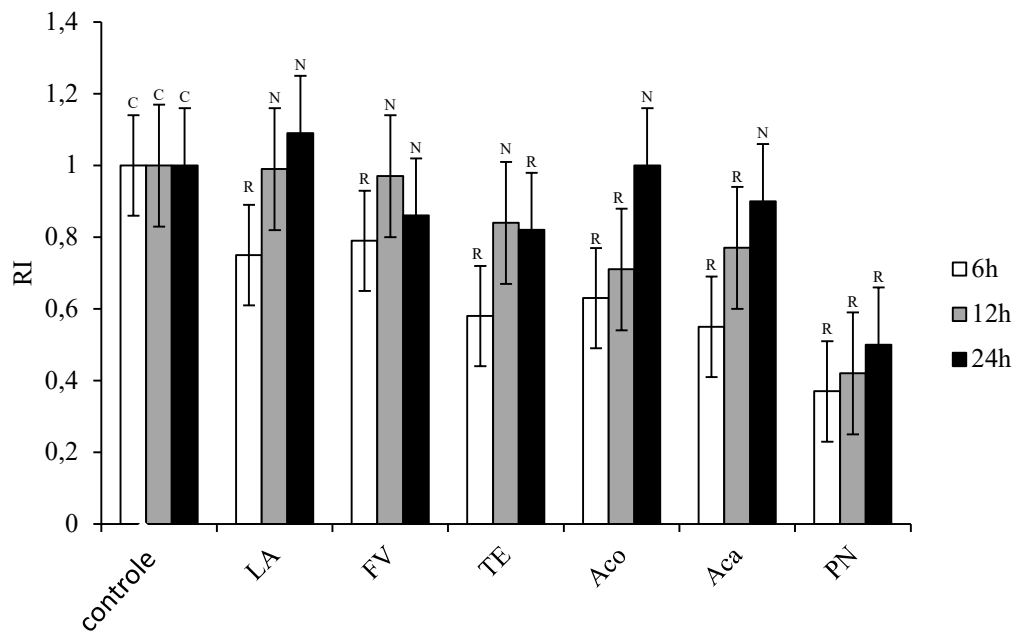


Figura 9. Índice de repelência (RI) e classificação dos óleos essenciais (C: controle; R: repelente; N: neutro; A: atrativo) após 6, 12 e 24 h de infestação por *B. tabaci* biotipo B. Erros padrões: 6h= $\pm 0,14$; 12h= $\pm 0,17$; 24h= $\pm 0,16$. A classificação foi baseada nos valores listados na Tabela 5 (p. 32). LA: *L. alba*, FV: *F. vulgare*, TE: *T. erecta*, ACo: *A. conyzoides*, Aca: *A. camphorata*, PN: *P. neochilus*.

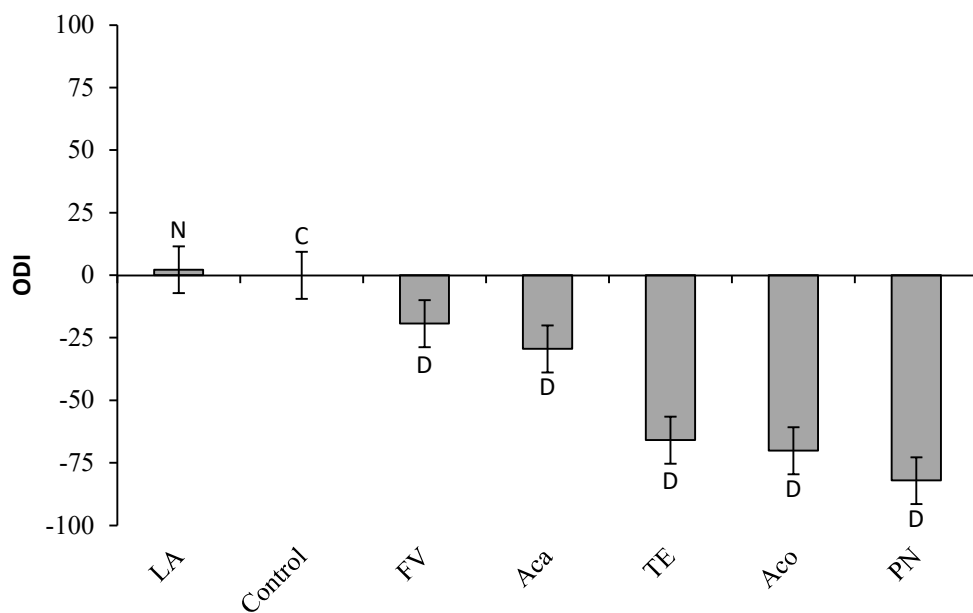


Figura 10. Índice de deterrência de oviposição (ODI) e classificação dos óleos essenciais (C: controle; D: deterrente; N: neutro) após 24h de infestação por *B. tabaci* biotipo B. Erro padrão = $\pm 9,38$. A classificação foi baseada nos valores listados na Tabela 5 (p. 32). LA: *L. alba*, FV: *F. vulgare*, TE: *T. erecta*, ACo: *A. conyzoides*, Aca: *A. camphorata*, PN: *P. neochilus*.

A partir das análises por GC-MS, foi possível identificar (*E*)-cariofileno (**17f**, 30,7%), α -pineno (**16t**, 15,0 %) e α -tujeno (**16p**, 11,7%) como constituintes majoritários do óleo essencial de *P. neochilus*. Os efeitos de repelência e de deterrência deste óleo essencial podem estar associados à presença de (*E*)-cariofileno e de α -pineno, cujas atividades repelentes já foram reportadas na literatura [75], ou podem resultar da interação entre eles e os constituintes minoritários do óleo [76, 77]. Em resumo, os resultados deste trabalho revelaram que o óleo essencial das folhas de *P. neochilus*, na concentração de 1%, pode ser aplicado em plantações de tomate para reduzir de forma eficiente a infestação e oviposição de *B. tabaci* biotipo B sem fitotoxicidade.

O segundo trabalho sobre a atividade repelente, deterrente e inseticida de óleos essenciais foi realizado com o óleo essencial de *Pelargonium graveolens* L'Her (Geraniaceae) (**Anexo 18**). No Brasil, *P. graveolens* é popularmente conhecido como “gerânio” ou “malva-rosa”. Apesar de haver vários relatos na literatura sobre a atividade inseticida do óleo essencial de *P. graveolens* (PG-EO), não havia até então nenhum estudo sobre os seus efeitos frente à mosca branca. Além dos ensaios para avaliação da atividade repelente e deterrente da oviposição deste óleo, foi também avaliado o seu potencial inseticida em ensaios de fumigação. Tanto o óleo essencial como os seus constituintes majoritários (linalool **16c**, geraniol **16f** e citronelol **16d**), identificados por GC-MS, foram avaliados neste estudo (**Tabela 6**, p. 35).

Os ensaios mostraram que PG-EO e seus constituintes majoritários provocaram a morte de 100% dos insetos nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 $\mu\text{L/L}$ de ar (**Figura 11**, p. 36). Notavelmente, o óleo essencial foi mais efetivo que o imidacloprid (controle positivo), que é um dos inseticidas sintéticos utilizados no combate à mosca branca [78]. Nos ensaios de repelência, PG-EO e os monoterpenos citronelol (**16d**) e geraniol (**16f**) foram os mais eficazes, reduzindo o

número de moscas nas folhas tratadas após 3 h, 6 h, 12 h e 24 h de tratamento. Os menores valores de RI foram obtidos para PG-EO e o citronelol (**Figura 12**, p. 36).

Quanto à deterrência de oviposição, PG-EO (ODI = -43,35), geraniol (ODI = -41,02) e citronelol (ODI = 43,35) reduziram de forma estatisticamente significativa a oviposição de *B. tabaci* biotipo B em relação ao controle e ao linalool (**Figura 13**, p. 37). Apesar de sua toxicidade nos ensaios de fumigação, linalool foi menos repelente e menos deterrente que PG-EO, geraniol e citronelol. Com base nos resultados obtidos, foi possível inferir que a toxicidade de PG-EO nos ensaios de fumigação pode estar associada aos seus componentes majoritários. Estes resultados foram bastante promissores e sustentam a continuidade da pesquisa tanto com o óleo essencial como com seus constituintes majoritários para o combate da mosca branca.

Tabela 6. Número de adultos e de ovos (média \pm DP)^a de *B. tabaci* biotipo B nos folículos tratados com PG-EO e seus monoterpenos majoritários em ensaios de múltipla escolha.

Amostra	Nº de adultos				Nº de ovos
	3 h	6 h	12 h	24 h	
PG-EO	5,54 \pm 2,39 b	5,83 \pm 2,13 c	5,33 \pm 1,99 c	5,42 \pm 1,78 b	0,37 \pm 0,19 c
Geraniol (16f)	8,54 \pm 2,61 b	9,13 \pm 3,45 c	9,58 \pm 3,61 bc	7,25 \pm 3,37 b	0,47 \pm 0,27 c
Linalol (16c)	16,33 \pm 3,20 ab	14,50 \pm 3,95 b	17,83 \pm 4,33 a	19,13 \pm 4,98 a	2,46 \pm 0,83 a
Citronelol (16d)	9,00 \pm 3,68 b	8,13 \pm 3,66 c	8,46 \pm 3,29 bc	8,67 \pm 3,74 b	0,47 \pm 0,22 c
Imidacloprid	17,54 \pm 2,62 a	15,29 \pm 2,52 a	13,96 \pm 2,50 a	9,13 \pm 1,33 b	0,95 \pm 0,30 bc
Controle	20,38 \pm 4,28 a	19,13 \pm 3,98 a	18,04 \pm 3,63 a	16,63 \pm 2,52 a	1,26 \pm 0,33 b
<i>P</i>	0,0118	0,0025	0,0409	0,0013	< 0,0001

^a Dados originais; médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para ANOVA, os dados foram transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$

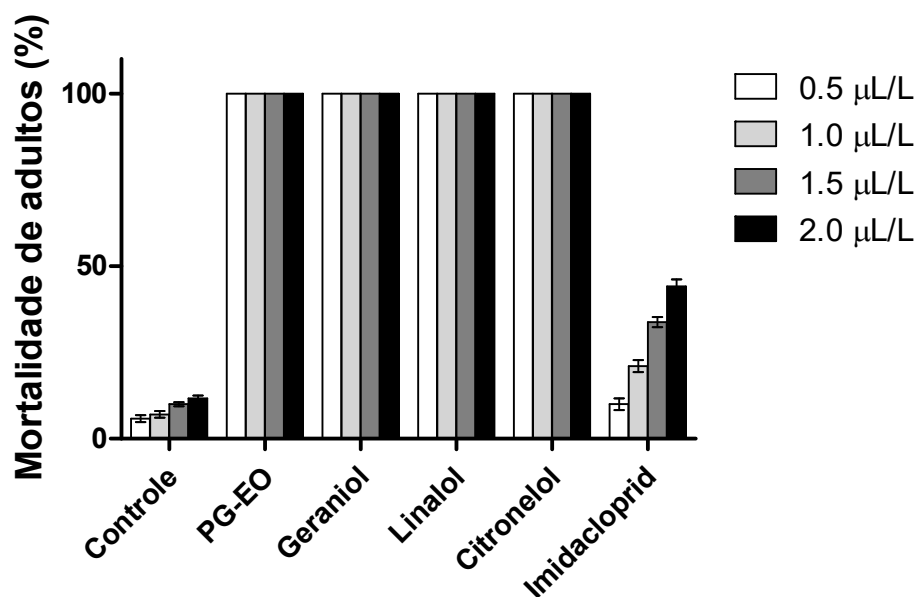


Figura 11. Porcentagem de mortalidade de *Bemisia tabaci* biotipo B exposta ao óleo essencial (PG-EO) e seus monoterpenos geraniol (**16f**), linalool (**16c**) e citronelol (**16d**) em diferentes concentrações após 24h. As barras representam a média \pm DP; $n = 7$ replicatas com 30 moscas adultas por replicata. Uma solução de Tween 20 0,5% (v/v) e imidacloprid foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

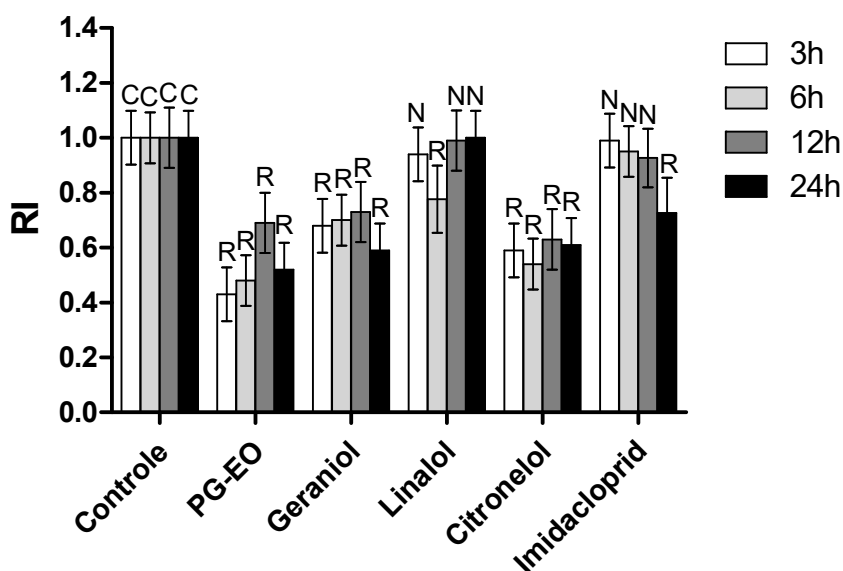


Figura 12. Índice de repelência (RI) e classificação de PG-EO e seus monoterpenos majoritários geraniol, linalol e citronelol (**C**: controle; **N**: neutro; **R**: repelente) após 3, 6, 12 e 24 h de infestação por *B. tabaci* biotipo B. Erros padrões: 3 h = $\pm 0,17$; 6 h: $\pm 0,16$; 12 h: $\pm 0,19$; 24 h: $\pm 0,17$. A classificação baseou-se nos valores mencionados na **Tabela 6** (p. 35).

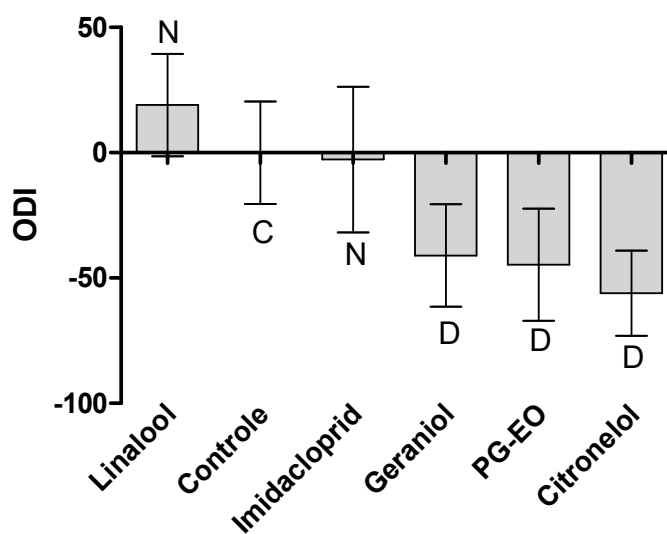
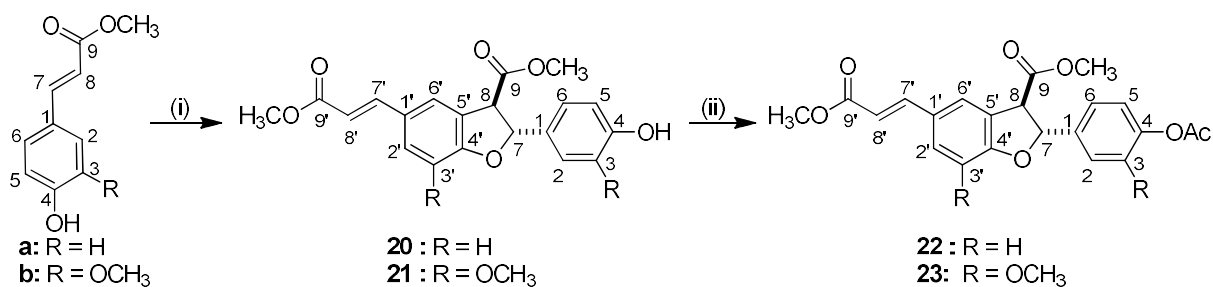


Figura 13. Valores dos índices de deterrência de oviposição (ODI) e classificação de PG-EO e monoterpênicos (**C**: controle; **N**: neutro; **D**: deterrente) obtidos após 24 h de infestação por *B. tabaci* biotipo B. Erro padrão = ± 20.40). A classificação foi baseada nos valores listados na **Tabela 6** (p. 35).

Em virtude dos trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais, fomos convidados pela prof^a. Dr^a. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado (FCRRP-USP) a contribuir com um capítulo sobre o assunto para o livro intitulado “Farmacognosia”, por ela editado e publicado em 2017. O capítulo foi escrito com a colaboração de Nathalya Isabel de Melo, ex-aluna de nosso grupo (**Anexo 19**). Nele foram abordados aspectos químicos da biossíntese de terpenoides e fenilpropanoides, que são os constituintes mais comumente identificados em óleos essenciais. Também foram incluídos no capítulo os métodos de extração e as estratégias utilizadas para a determinação da composição química desses óleos. Por fim, foram selecionadas e discutidas algumas atividades biológicas de óleos essenciais, tais como inseticida, antinociceptiva, anti-inflamatória, antiparasitária, antimicrobiana, antioxidante e citotóxica.

3.5 SÍNTESE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Em 2010, deu-se início à orientação do projeto de mestrado de Murilo de Jesus Fukui, intitulado “Atividades esquistossomocida e leishmanocida *in vitro* de algumas neolignanas diidrobencofurânicas” (Proc. FAPESP 09/12202-1). Este projeto representou o primeiro passo para a concretização de um anseio antigo de desenvolvermos alguns projetos com compostos orgânicos sintéticos. Quatro neolignanas diidrobencofurânicas foram sintetizadas (**Esquema 2**) e submetidas à avaliação de suas atividades antibacteriana, antifúngica, leishmanocida, tripanocida, esquistossomocida e citotóxica. Esses ensaios foram realizados em colaboração com os professores Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio, Dr^a. Lizandra Guidi Magalhães e Dr^a. Denise Crispim Tavares, da UNIFRAN. Os resultados dos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias cariogênicas e a fungos dermatopatogênicos causadores de aspergilose encontram-se reunidos na **Tabela 7** (p. 39) e no **Anexo 20**.



Esquema 2. Síntese das neolignanas diidrobencofurânicas **20-23**. (i) Ag₂O, Me₂CO/C₆H₆ 5:8 (v/v), r.t., 20 h; rendimentos de 34% (**20**) e 40% (**21**). (ii) Ac₂O, Pyr, 48 h, r.t.; rendimentos de 96% (**22**) e 82% (**23**).

Tabela 7. Concentrações inibitórias mínimas (CIM, em $\mu\text{g/L}$) das neolignanais diidrobenezofurânicas **20-23** contra bactérias cariogênicas e fungos dermatopatogênicos selecionados.

Microorganismo	1	2	3	4	Controle positivo
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	>400 (1129) ^a	>400 (965) ^a	>400 (1009) ^a	>400 (877) ^a	0.92 ^b (1.59) ^a
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 49456)	400 (1129) ^a	400 (965) ^a	>400 (1009) ^a	400 (877) ^a	7.37 ^b (6.72) ^a
<i>Streptococcus salivarius</i> (ATCC 25975)	>400 (1129) ^a	>400 (965) ^a	>400 (1009) ^a	>400 (877) ^a	3.69 ^b (3.36) ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)	>400 (1129) ^a	>400 (965) ^a	>400 (1009) ^a	>400 (877) ^a	3.69 ^b (3.36) ^a
<i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC 33478)	>400 (1129) ^a	>400 (965) ^a	>400 (1009) ^a	>400 (877) ^a	1.84 ^b (3.18) ^a
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 4082)	>400 (1129) ^a	>400 (965) ^a	>400 (1009) ^a	>400 (877) ^a	7.37 ^b (6.72) ^a
<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 11578)	>400 (1129) ^a	400 (965) ^a	>400 (1009) ^a	>400 (877) ^a	1.84 ^b (3.18) ^a
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	>500 (1411) ^a	>500 (1206) ^a	125 (315) ^a	>500 (1096) ^a	1.25 ^c (3.00) ^a
<i>Aspergillus fumigatus</i> (JA13a)	>500 (1411) ^a	>500 (1206) ^a	500 (1261) ^a	>500 (1096) ^a	5.00 ^c (12.01) ^a
<i>Rhizopus stolonifer</i> (JA8b))	>500 (1411) ^a	>500 (1206) ^a	>500 (1261) ^a	>500 (1096) ^a	1.25 ^c (3.00) ^a
<i>Mucor rouxii</i> (NRRL 1894)	>500 (1411) ^a	>500 (1206) ^a	250 (630) ^a	>500 (1096) ^a	0.62 ^c (1.48) ^a

^a Valores em μM . ^b Cloridrato de clorexidina. ^c Miconazol.

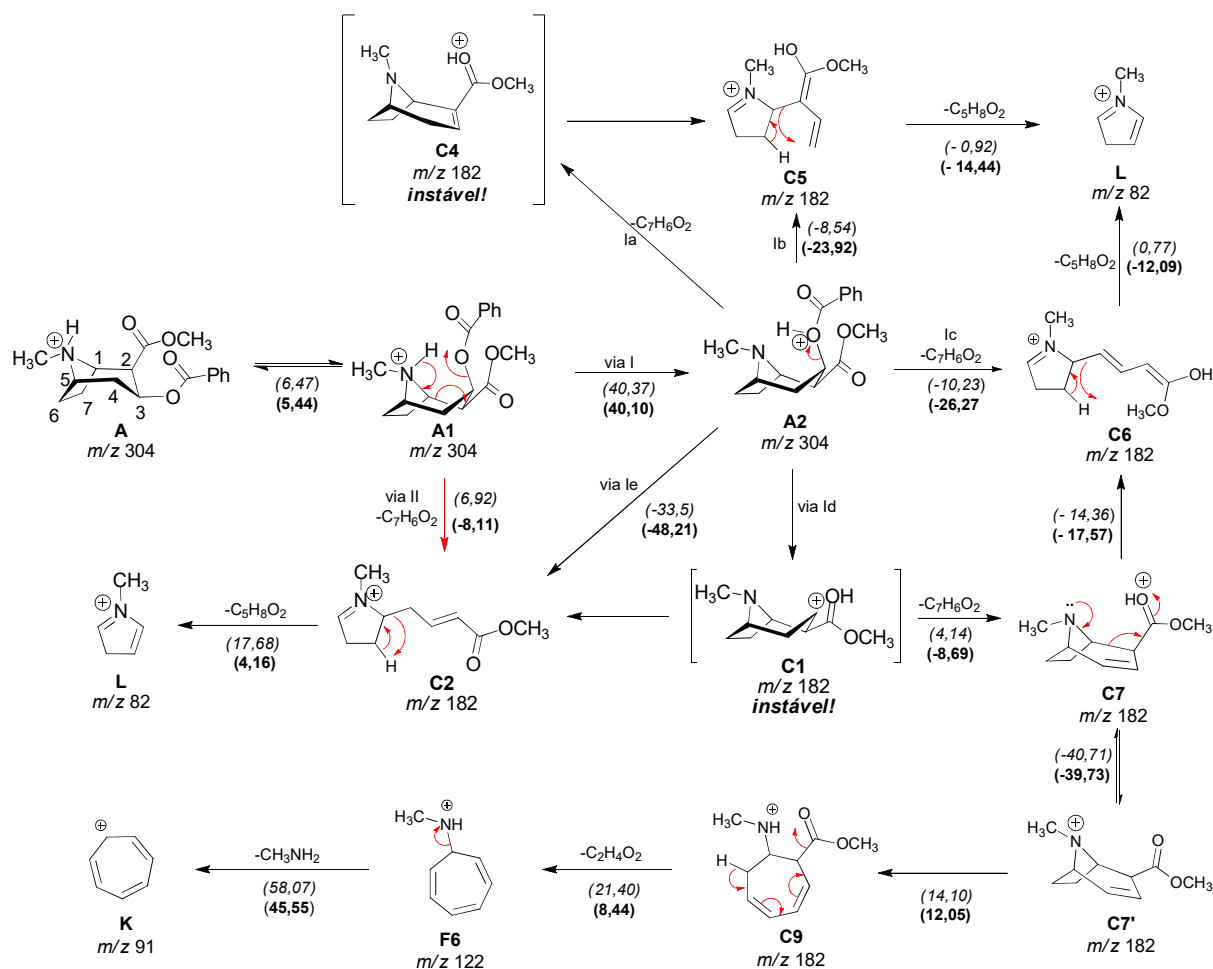
Com base nos valores de concentração inibitória mínima (CIM), foi possível observar que a neolignana **21** apresentou atividade antibacteriana moderada frente a *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei* (CIM = 400 $\mu\text{g/mL}$, 965 μM), enquanto os compostos **20** e **23** foram moderadamente ativos contra *S. mitis* (CIM = 400 $\mu\text{g/mL}$; 1129 μM e 877 μM , respectivamente). No entanto, esses compostos foram fracamente ativos ou inativos frente a todas as demais bactérias testadas. Já o composto **22**, que não apresentou atividade frente a nenhuma das bactérias testadas, apresentou os menores valores de CIM contra *Aspergillus niger* (CIM= 125

$\mu\text{g}/\text{mL}$; 315 μM), *Aspergillus fumigatus* (MIC = 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1261 μM) e *Mucor rouxii* (CIM = 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 630 μM), enquanto as neolignananas **20**, **21** e **23** foram fracamente ativas ou inativas frente a todos os fungos dermatopatogênicos avaliados.

Com relação aos efeitos citotóxicos das neolignananas **20-23** sobre a viabilidade de células V79, a neolignanana **22** foi a mais citotóxica em concentrações entre 3,12 e 50 μM . Os valores de IC_{50} para os compostos **20**, **21**, **22** e **23** após 24 h, nas condições experimentais utilizadas, foram de $232,00 \pm 7,33 \mu\text{M}$, $> 400 \mu\text{M}$, $67,97 \pm 3,45 \mu\text{M}$ e $> 400 \mu\text{M}$. Estes resultados sugeriram que a presença das metoxilas aromáticas diminuem a citotoxicidade dos compostos **21** ($\text{IC}_{50} > 400 \mu\text{M}$ ou 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e **23** ($\text{IC}_{50} > 400 \mu\text{M}$ ou 182 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em relação aos compostos **20** ($\text{IC}_{50} = 232,00 \pm 7,33 \mu\text{M}$ ou 82,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e **22** ($\text{IC}_{50} = 67,97 \pm 3,45 \mu\text{M}$ ou 26,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por outro lado, a acetilação do composto **20** para a síntese do composto **22** aumenta a citotoxicidade sobre células V79. No entanto, não foi possível inferir como a presença do grupo acetil em **23** afetou a citotoxicidade do composto **23** em relação ao **21**.

Ainda em 2010, com a consolidação do doutorado no Programa de Pós-graduação em Ciências da UNIFRAN, a instituição passou a incentivar seu corpo docente a fazer estágios de pós-doutoramento. A combinação desses dois fatores – o incentivo da universidade para a realização de estágios de pós-doutorado e a oportunidade de se engajar em uma linha de pesquisa diferente – motivou-nos a realizar um estágio de pós-doutorado no Laboratório de Síntese Orgânica (LSO) do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do prof. Dr. Paulo Marcos Donate. Neste estágio, realizado entre julho de 2011 e junho de 2012, tivemos a oportunidade de contribuir para a síntese de uma série de γ -butirolactonas empregando uma metodologia *one-pot* multicomponentes (MCR) catalisada por cobalto(II) [79]. Os compostos sintetizados foram posteriormente submetidos à avaliação de suas atividades leishmanicidas *in vitro*. Parte dos resultados deste estágio foi publicada no periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society* [80].

Ainda em 2011, o aluno Herbert Júnior Dias, que já havia integrado anteriormente nosso grupo de pesquisa em 2008, retornou para cursar o mestrado na área de espectrometria de massas. Além de realizar uma extensa revisão sobre a aplicação da espectrometria de massas com ionização por eletrospray na “desrepliação” de diversas classes de produtos naturais, que foi publicada como um capítulo de livro (**Anexo 21**), o aluno realizou uma investigação sistemática e detalhada das vias de fragmentação da cocaína empregando uma combinação entre dados experimentais e dados termoquímicos obtidos por Química Computacional (**Anexo 22**). Este projeto contou com a colaboração do prof. Dr. Marcelo Firmino (DQ-FFCLRP-USP), que forneceu as amostras de cocaína, e dos professores Dr. Renato Luís Tame Parreira (UNIFRAN) e Ricardo Vesecchi (FFCLRP-USP), que obtiveram os dados termoquímicos. Os resultados mostraram que os íons de m/z 182 e m/z 82, que são os mais intensos no espectro de íons produtos da cocaína protonada (**A**, m/z 304), podem ser formados por mais de uma via de fragmentação (**Esquema 3**, p. 42). Os dados dos experimentos com troca de deutério indicaram que o próton/deutério ligado ao nitrogênio, que é o sítio de maior basicidade em fase gasosa (GB, do inglês *gas-phase basicity*), é eliminado juntamente com o grupo benziloxi para formar o íon produto de m/z 182 ($[M+H-C_7H_6O_2]^+$). A fragmentação é desencadeada por uma mudança de conformação do tipo cadeira **A** (do inglês *like-chair*) para uma do tipo barco **A1** (do inglês *like-boat*), que propicia uma maior proximidade entre o próton ligado ao nitrogênio e os oxigênios do grupo benziloxi para onde o próton será transferido (**Esquema 3**, p. 42). Os valores de ΔH e de ΔG estimados para as vias de fragmentação que levam à formação do íon de m/z 182 são baixos, suportando assim a alta intensidade desses íons no espectro de íons produtos da cocaína protonada (**Esquema 3**, p. 42).



Esquema 3. Formação dos íons produtos de m/z 182, 122 e 82 da cocaína protonada (**A**, m/z 304). Os valores estimados de ΔH (em *itálico*) e ΔG (em **negrito**) encontram-se abaixo das setas.

A fragmentação da cocaína protonada já havia sido anteriormente proposta por Wang e Bartlett em 1998 [81]. No entanto, os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa contribuíram para uma melhor compreensão das vias de fragmentação e da estrutura de alguns íons produtos. Por exemplo, os cálculos computacionais revelaram que a estrutura do cátion **C1** proposto pelos autores, que é formado por heterólise da ligação C3–O, é instável e se rearranja espontaneamente para **C2** durante a otimização da geometria (**Esquema 3**). Além disso, a partir de dados dos experimentos de MS^3 e MS^4 , foi possível concluir que o íon produto de m/z 91 foi formado a partir do íon de m/z 122 por meio da perda de CH_3NH_2 (31 Da) e não por meio da

eliminação de CO (28 Da) a partir de m/z 119, como havia sido proposto Wang e Bartlett [81] (**Anexo 22**).

Em abril de 2012, foi concedido pela FAPESP um auxílio ao projeto temático intitulado “Validação química e farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*” (Proc. 11/13630-7), coordenado pelo prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos (FCFRP-USP). Na condição de pesquisador associado deste projeto temático, nossa contribuição deu-se na área de espectrometria de massas, através do projeto de mestrado intitulado “Estudo da fragmentação de diterpenos do tipo labdano isolados do óleo-resina de *Copaifera langsdorfi* empregando espectrometria de massas sequencial”, que foi financiado pela FAPESP (Proc. 12/22832-5). O projeto teve vigência de março a 2013 a fevereiro de 2015 e foi desenvolvido pela aluna Gabriela de Paula Aguiar, que já havia participado anteriormente da elaboração de um trabalho na área de espectrometria de massas (ver item 3.3). Inicialmente, o padrão de fragmentação de quatro ácidos diterpênicos com esqueleto do tipo labdânico (**Figura 14**) previamente isolados por outros pesquisadores envolvidos no projeto temático foi sistematicamente investigado a partir de dados de massas acuradas, dados de experimentos de MSⁿ e de dados termoquímicos, estimados por Química Computacional (**Anexo 23**).

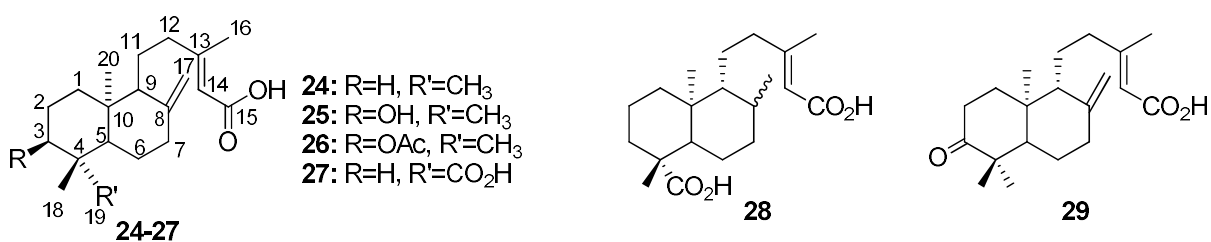
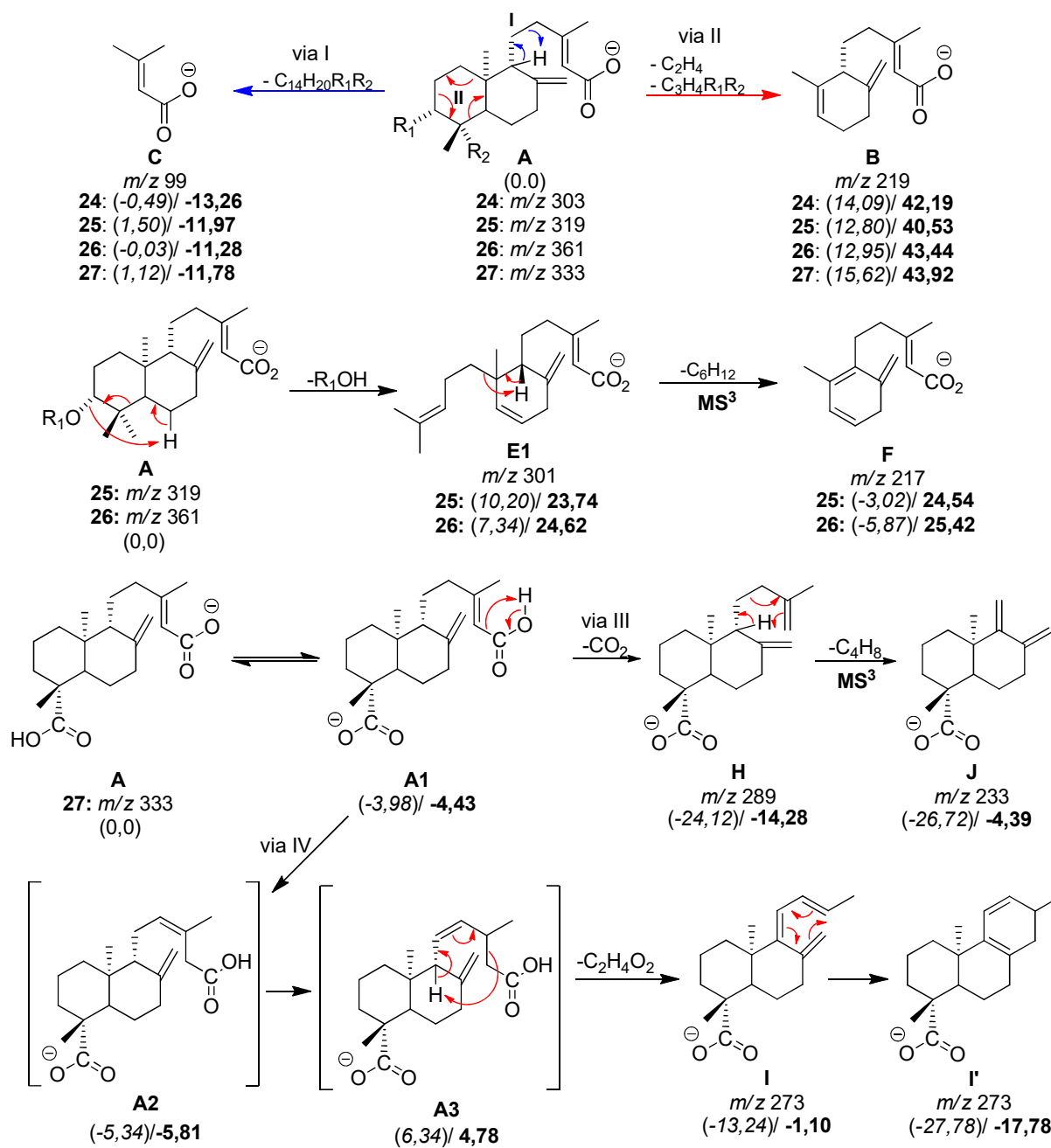


Figura 14. Estruturas químicas do ácido (–)-*ent*-copálico (**24**), ácido (–)-*ent*-3β-hidroxi-copálico (**25**), (–)-*ent*-3β-acetoxi-copálico (**26**), ácido (–)-*ent*-agático (**27**), ácido 8,17-diidro-*ent*-agático (**28**) e ácido 3-ceto-*ent*-copálico (**29**). Os ângulos das ligações C7–C8–C17 e C9–C8–C17 foram distorcidos intencionalmente para otimizar o tamanho das estruturas.

Com base nos dados obtidos, foi possível identificar os íons produtos de m/z 99 e m/z 219 como íons fragmentos comuns a todos os diterpenos desprotonados analisados. A formação do íon de m/z 217 foi identificada como diagnóstica para os ácidos (–)-*ent*-3β-hidroxi-copálico (**25**) e (–)-*ent*-3β-acetoxi-copálico (**26**), enquanto os íons $[M-H-CO_2]^-$ e $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ foram observados apenas no espectro de íons produtos do ácido (–)-*ent*-agático (**27**) desprotonado. Os valores de acidez em fase gasosa (GA) confirmaram que o hidrogênio da carboxila da cadeia lateral (C15) é o mais ácido na estrutura dos ácidos (–)-*ent*-copálico (**24**), (–)-*ent*-3β-hidroxi-copálico (**25**) e (–)-*ent*-3β-acetoxi-copálico (**26**). No caso do ácido (–)-*ent*-agático (**27**), o hidrogênio da carboxila ligada a C4 é o mais ácido (**Esquema 4**, p. 45). Dessa forma, a formação dos íons produtos de m/z 99 e m/z 219 são resultantes de dois rearranjos de hidrogênio remotos competitivos (vias I e II, **Esquema 4**, p. 45). Os valores de ΔH e de ΔG estimados para a formação do íon de m/z 99 foram menores que os envolvidos na formação do íon de m/z 219, o que justifica sua maior intensidade no espectro de íons produtos dos diterpenos analisados (**Esquema 4**, p. 45). Para os compostos **25** e **26**, a eliminação do substituinte oxigenado em C3 (H₂O para **25** e C₂H₄O₂ para **26**) por meio do rearranjo de hidrogênio leva à formação do íon produto de m/z 301, que é precursor de m/z 217. A maior intensidade do pico de m/z 301 no espectro de íons produtos de **26** foi associada aos valores de ΔH (7,34 kcal/mol) e de ΔG (23,74 kcal/mol), que são menores que os estimados para a formação do mesmo íon para o composto **25** ($\Delta H = 10,20$ kcal/mol e $\Delta G = 23,74$ kcal/mol). Por sua vez, a formação dos íons produtos diagnósticos do composto **27** são decorrentes da desprotonação da carboxila em C19, que torna a carboxila em C15 livre para ser eliminada como CO₂ (via III) ou como C₂H₄O₂ (via IV) por meio de rearranjos de hidrogênios remotos competitivos (**Esquema 4**, p. 44).



Esquema 4. Formação dos íons produtos dos diterpenos desprotonados 24 (m/z 303), 25 (m/z 319), 26 (m/z 361) e 27 (m/z 333). Os ângulos das ligações C7–C8–C17 e C9–C8–C17 foram distorcidos intencionalmente para otimizar o tamanho das estruturas no esquema.

Na segunda parte do projeto, os dados de ESI(-)-MS/MS obtidos para os diterpenos 24-27 foram utilizados em estudos de “desreplicação” a partir de uma amostra comercial de óleosresina de *Copaifera langsdorfii*. Para a identificação destes compostos, vários experimentos de

MRM (monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) foram realizados usando as seguintes transições: composto **24**: m/z 303 \rightarrow m/z 219 e m/z 303 \rightarrow m/z 99; composto **25**: m/z 319 \rightarrow m/z 219, m/z 319 \rightarrow 217 e m/z 319 \rightarrow 99; composto **26**: m/z 361 \rightarrow m/z 219, m/z 361 \rightarrow 217 e m/z 361 \rightarrow 99; composto **27**: m/z 333 \rightarrow m/z 233, m/z 333 \rightarrow 219 e m/z 333 \rightarrow 99. Por fim, experimentos de varredura do íon precursor (do inglês *precursor ion scan*) foram conduzidos utilizando os íons de m/z 99. No cromatograma de corrente total de íons resultante (**Figura 15**), além dos picos referentes aos compostos **24** ($t_R = 8,83$ min), **25** ($t_R = 6,78$ min), **26** ($t_R = 7,78$ min) e **27** ($t_R = 6,56$ min), foi possível observar a presença de picos em 5,50 min (m/z 335) e 7,04 min (m/z 317). Com base nos respectivos espectros de íons produtos desses picos e no padrão de fragmentação dos diterpênicos labdânicos **24-27** que havíamos investigado, foi possível sugerir que esses picos são referentes aos compostos **28** e **29** (**Figura 14**, p. 43). Apesar de serem derivados do ácido (-)-*ent*-copálico (**24**), esses dois compostos não haviam sido anteriormente reportados de espécies de *Copaifera* (**Anexo 23**).

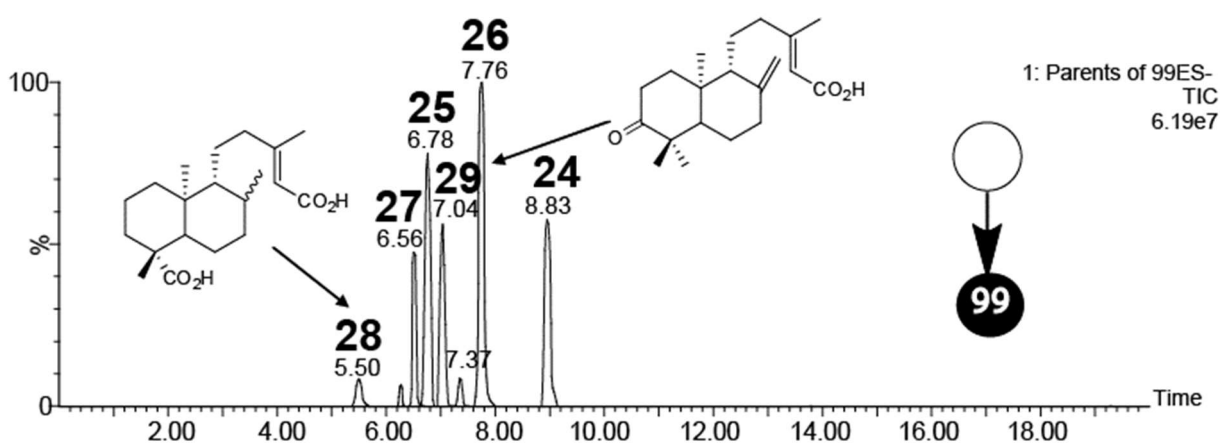


Figura 15. Cromatograma de TIC (do inglês *Total Ion Current*) obtido do scan do íon precursor (íon produto de m/z 99).

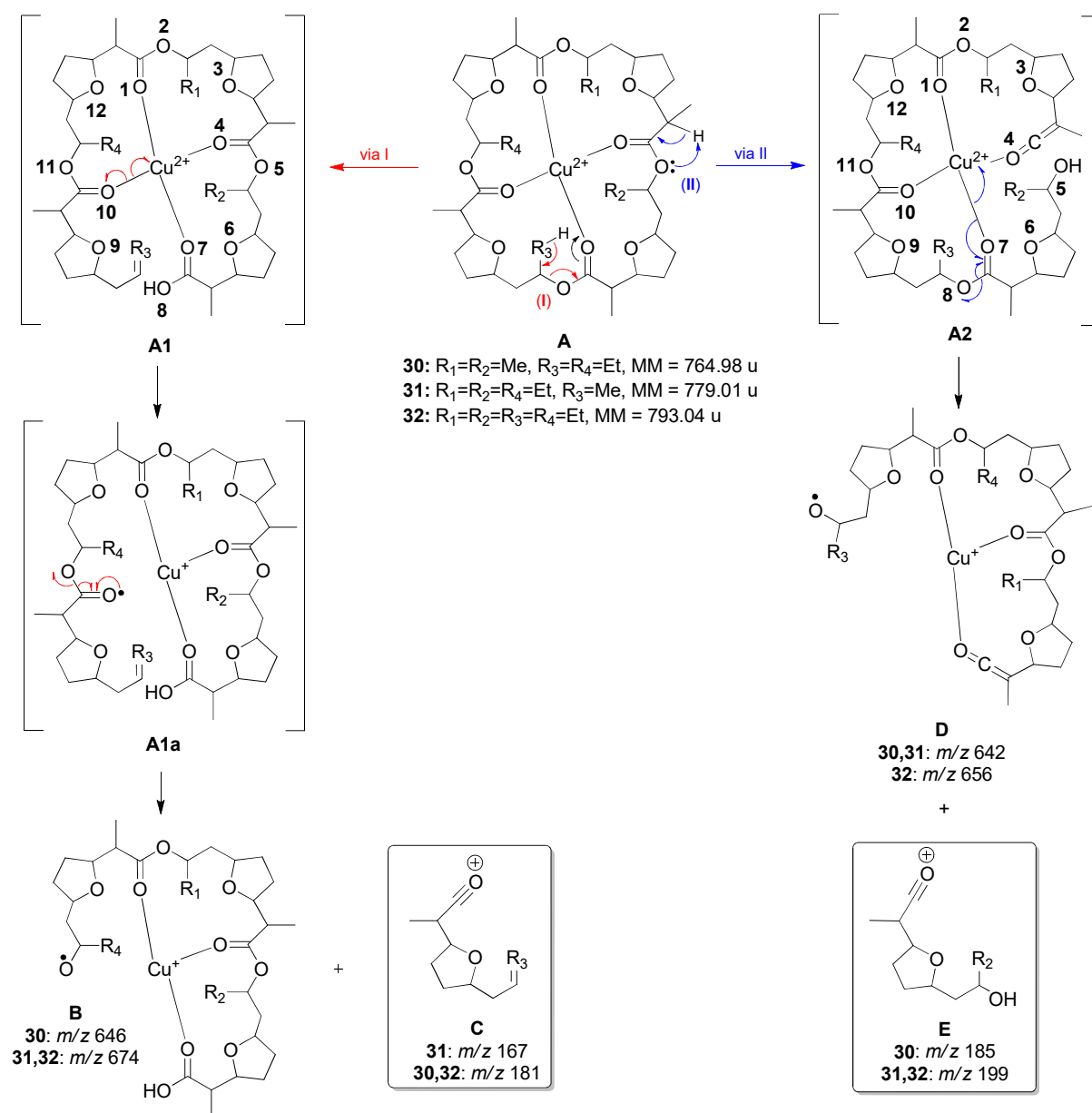
3.6 COMPOSTOS BENZOFURÂNICOS

3.6.1 Contextualização

Com os términos do estágio de pós-doutorado na FFCLRP-USP e da vigência do projeto de Jovem Pesquisador junto à FAPESP, ambos em setembro de 2012, e após termos contribuído para com a consolidação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da UNIFRAN, optamos por partir em busca de novos desafios. Em maio de 2013, após aprovação em concurso para provimento de cargo de professor na área de Química Orgânica no Departamento de Química da FFCLRP-USP, foi solicitado o desligamento junto à UNIFRAN para dar início às atividades no Departamento de Química da FFCLRP-USP em 6 de junho de 2013.

Com o ingresso no Departamento de Química da FFCLRP-USP e com o interesse em retomar e intensificar os projetos na área de espectrometria de massas, o estabelecimento de parcerias científicas com o prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moares (DQ-FFCLRP-USP) e o Dr. Eduardo José Crevelin (FFCLRP-USP), especialistas na área, ocorreu de maneira natural. Dentre os trabalhos resultantes dessas parcerias [82-84], merece ser destacado o estudo sobre a utilização de cloreto de cobre(II) para induzir reações radicalares em alguns poliéteres ionóforos produzidos por *Streptomyces* sp. AMC-23, realizado em colaboração com o Dr. Crevelin (**Anexo 24**). Em trabalho anterior, também em colaboração com o Dr. Crevelin [82], já havíamos explorado o potencial da técnica ESI-MS/MS para a elucidação estrutural dos macrotetrolídeos isodinactina (**30**), trinactina (**31**) e tetranactina (**32**) (**Esquema 5**, p. 48). No entanto, foi observado que a maioria dos íons produtos da molécula sodiada ($[M+Na]^+$) é resultante da eliminação de 184 ou 198 Da, que ocorrem por meio de rearranjos do tipo McLafferty e de rearranjos de hidrogênios remotos à carga. Neste sentido, decidimos investigar como a adição de íons cobre(II) poderia contribuir para a obtenção de informações estruturais adicionais em relação às obtidas a partir dos íons $[M+Na]^+$. Os resultados mostraram que os íons cobre(II)

induzem a ocorrência de outras reações de fragmentação além dos rearranjos do tipo McLafferty e dos rearranjos de hidrogênio remotos à carga, levando à formação de um número de fragmentos maior que o observado no espectro de íons produtos dos macrotetrolídeos sodiados ($[M+Na]^+$). Este fato deveu-se à propriedades redox do cobre(II), que é reduzido a cobre(I) em fase gasosa, desencadeando assim processos de transferência de um elétron e a consequente formação de espécies radicalares [85].



Esquema 5. Reações de redução dos íons cobre(II) a cobre(I) em fase gasosa e formação dos íons elétron-ímpares **B** e **D** e dos íons acílios **C** e **E** a partir dos macrotetrolídeos isodinactina (**30**), trinactina (**31**) e tetranactina (**32**).

Os resultados obtidos foram utilizados para a elaboração de uma estratégia para a identificação dos macrotetrolídeos **30-32** diretamente em extratos de *Streptomyces* sp AMC-23 empregando a técnica UPLC-ESI-MS/MS (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*). Essa estratégia baseou-se nos íons acílios diagnósticos listados no **Quadro 3**, cuja formação foi induzida pelos íons cobre(II) infundidos pós-coluna.

Quadro 3. Íons acílios diagnósticos dos macrotetrolídeos **30-32** com formação induzida por íons cobre(II).

Íon diagnóstico	30	31	32
m/z 167	+	+	-
m/z 181	+	+	+
m/z 185	+	-	-
m/z 199	+	+	+

Em seguida, foi utilizada uma combinação de diferentes experimentos de varredura do íon precursor em espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) para a identificação dos macrotetrolídeos **30-32** em uma amostra obtida de *Streptomyces* sp AMC-23, conforme mostrado na **Figura 16** (p. 50). Inicialmente, foi obtido um espectro de massas no modo *full-scan* (**Figura 16a**, p. 50) para se conhecer o perfil cromatográfico da amostra. Para identificar os picos correspondentes aos macrotetrolídeos **30-32**, foi feito um experimento de varredura dos íons precursores para monitorar os íons acílios de m/z 181 (**Figura 16b**, p. 50) e m/z 199 (**Figura 16c**, p. 50), que são comuns aos três compostos investigados (**Quadro 3**). O monitoramento desses íons revelou que os picos em 8,5 min, 9,0 min e 9,4 min correspondem aos poliéteres de interesse. Por outro lado, quando o íon acílio de m/z 185 foi monitorado, apenas o pico em 8,5 min foi observado, evidenciando assim que este pico corresponde à isodinactina (**30**) (**Figura 16d**, p. 50). Finalmente, o monitoramento do íon acílio de m/z 167 resultou nos picos em 8,5 min e 9,0 min (**Figura 16e**, p. 50). Desta forma, foi possível identificar os picos em 8,5, 9,0 e 9,4 min como sendo correspondente aos compostos **30**, **31** e **32**, respectivamente. Experimentos similares foram também realizados usando os íons fragmentos diagnósticos formados a partir dos macrotetrolídeos **30-32** sodiados. No entanto, a seletividade

foi muito menor que a obtida a partir dos íons acílios induzidos por cobre(II). Os resultados evidenciaram que a estratégia proposta permitiu identificar os compostos **30-32** de maneira seletiva e rápida (**Anexo 24**).

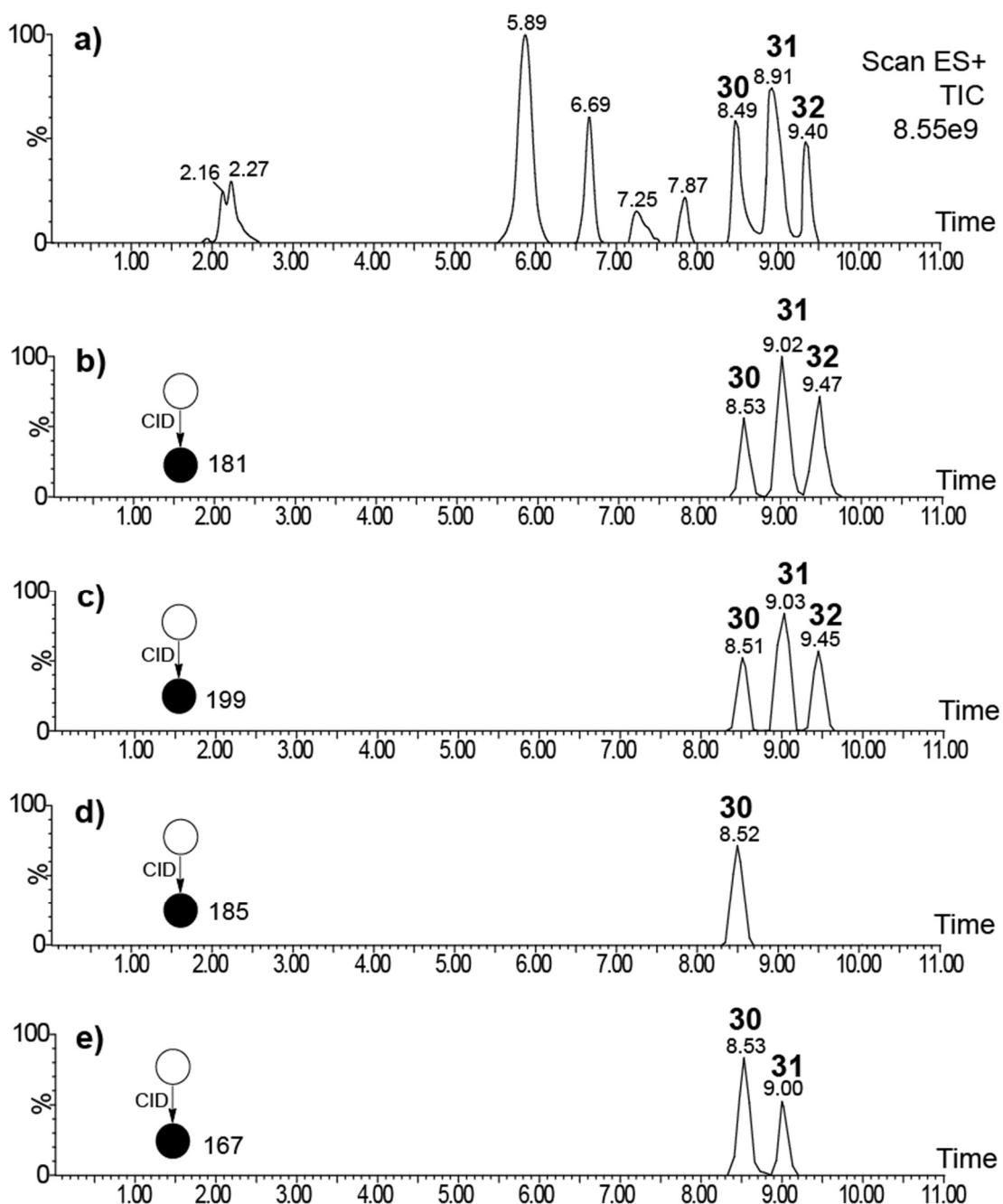


Figura 16. a) Cromatograma TIC (do inglês *Total Ion Current Chromatogram*) de uma amostra desconhecida obtida de *Streptomyces* sp. AMC-23. b-e) Cromatograma de íons extraídos obtidos dos experimentos de varredura do íon precursor (íons acílios de m/z 181, 199, 185 e 167, respectivamente).

Após alguns meses no departamento, fomos integrados ao espaço físico do recém-reformado Laboratório de Síntese Orgânica (LSO), iniciando então o desenvolvimento de nosso projeto intitulado “Avaliação da atividade antiparasitária e inseticida de compostos benzofurânicos e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa empregando espectrometria de massas sequencial”. Este projeto foi apresentado à Comissão Especial de Regime de Trabalho (CERT) no ato de nosso ingresso na USP e foi posteriormente financiado pela FAPESP (Proc. 2013/20094-0). A elaboração deste projeto ocorreu de forma estratégica, de modo a: 1) contemplar a síntese de alguns compostos orgânicos, atendendo não apenas a uma antiga expectativa pessoal, mas também aproveitando a estrutura física do LSO; 2) explorar o potencial antiparasitário, antimicrobiano e inseticida de compostos orgânicos sintéticos, consolidando assim as parcerias científicas com os profs. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins (na época na UNIFRAN, hoje na UFU-MG), Dr^a. Lizandra Guidi Magalhães (UNIFRAN) e Edson Luiz Lopes Baldin (FCA/UNESP), que haviam sido estabelecidas durante o projeto de Jovem Pesquisador e que haviam se mostrado bastante produtivas; 3) dar continuidade à pesquisa com neolignanas diidrobzofurânicas, que haviam apresentado atividades biológicas preliminares promissoras; e 4) retomar os trabalhos de pesquisa na área de espectrometria de massas, que haviam sido deixados em segundo plano durante a execução do projeto de Jovem Pesquisador.

No início de 2014, com o ingresso do aluno Herbert Júnior Dias no doutorado, demos início à nossa primeira orientação pelo Programa de Pós-graduação em Química da FFCLRP-USP. Auxiliado pelas alunas de iniciação científica Talita Carla de Tralia Medeiros e Carlismari de Oliveira Grundmann e pela estagiária Manon Baguenard (Université de Poitiers, Poitiers, França), coube ao aluno a execução do projeto sobre a síntese, avaliação biológica e estudos por espectrometria de massas de compostos benzofurânicos. Os primeiros compostos sintetizados foram as neolignanas diidrobzofurânicas **20-24** (**Esquema 2**, p. 38), que já haviam

apresentado atividade antiparasitária promissora em ensaios preliminares. A síntese dos compostos 2-aroilbenzofurânicos foi iniciada posteriormente, em meados de 2015, com o ingresso da aluna de iniciação científica Tatiana Manzini Vieira em nosso grupo.

No início do projeto, após a síntese das primeiras neolignanas diidrobenzofurânicas, nosso grupo notou algumas imprecisões nos dados de ressonância magnética nuclear (RMN) da literatura reportados para esses compostos. Recorremos então ao prof. Dr. Vladimir Constantino Gomes Heleno (UNIFRAN), que é especialista em RMN, para a realização de um estudo detalhado dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C das neolignanas diidrobenzofurânicas **20** e **21** (**Anexo 25**). Nos espectros de RMN de ^1H desses compostos obtidos em CDCl_3 e acetona- d_6 , que são os solventes mais comumente descritos na literatura para a análises desses compostos por RMN, foi possível observar que a maioria dos sinais apareceu entre δ_{H} 6,0 e 8,0, porém as multiplicidades de alguns destes sinais não estavam claras (**Figura 17**, p. 53). Neste trabalho, verificou-se que para o composto **20** em acetona- d_6 , os sinais em δ_{H} 7,6–7,7 possuem intensidade para quatro hidrogênios, porém a sobreposição de seus sinais impede que suas respectivas atribuições sejam feitas de forma inequívoca. Por outro lado, o uso de CDCl_3 como solvente permitiu-nos obter um espectro com os sinais mais resolvidos. No caso da neolignana diidrobenzofurânica **21**, o espectro de RMN de ^1H do sinal em δ_{H} 6,91 tem intensidade para três átomos de hidrogênio, o mesmo não ocorrendo quando o espectro foi obtido a partir da amostra solubilizada em acetona- d_6 . Portanto, CDCl_3 mostrou-se o solvente mais adequado para o composto **20**, enquanto acetona- d_6 foi utilizada nas análises por RMN do composto **21**.

Na estratégia utilizada neste trabalho, inicialmente foram analisados os espectros de RMN de ^{13}C e de DEPT 135. A combinação dos dados obtidos a partir desses espectros permitiu identificar quais carbonos eram metílicos e metínicos e quais não estavam ligados a átomos de hidrogênio. Em seguida, foi feita a análise dos espectros de RMN de ^1H . Uma vez identificados os deslocamentos químicos, as integrais e as multiplicidades de cada sinal, foram analisados os

espectros de correlação gHMQC, a partir dos quais foram feitas as atribuições de quais hidrogênios estão ligados a cada carbono hidrogenado. Por sua vez, os carbonos que não estiveram ligados a nenhum átomo de hidrogênio foram atribuídos a partir dos dados do espectro de correlação gHMBC. As multiplicidades dos sinais mais complexos foram definidas a partir dos espectros de gCOSY e *J*-resolved. Por fim, a estereoquímica relativa foi inferida com base nas correlações observadas no espectro de NOESY (**Figura 18**, p. 54) e nos deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C simulados por Química Computacional. Os cálculos computacionais foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Renato Luís Tame Parreira (UNIFRAN) e com o prof. Dr. Tapas Kar (Utah State University, UT) e apresentaram boa correlação com a configuração *trans* para os substituintes em C7 e C8.

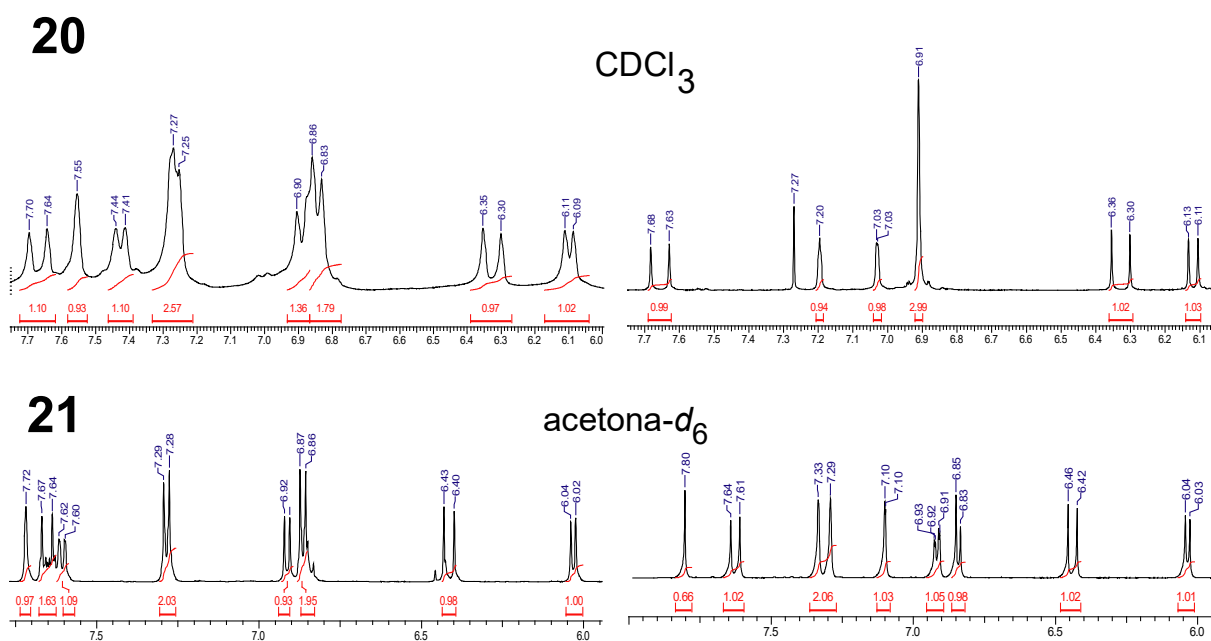


Figura 17. Expansões dos espectros de RMN das neolignanas diidrobzofurânicas **20** e **21** obtidos em CDCl_3 e acetona- d_6 .

Dentre as contribuições deste trabalho podemos citar o detalhamento dos sinais de H7' (ddd, 1H, δ_{H} 7,63) do composto **21**, até então descrito na literatura como um duplete, que apresentou acoplamento a longa distância (4J) com H2' (δ_{H} 7,33) e H6' (δ_{H} 7,29). Os valores das

constantes do acoplamento de H7' com H2' e H6' foram medidos no espectro de *J*-resolved como sendo 0,8 e 0,4 Hz, respectivamente (**Anexo 25**).

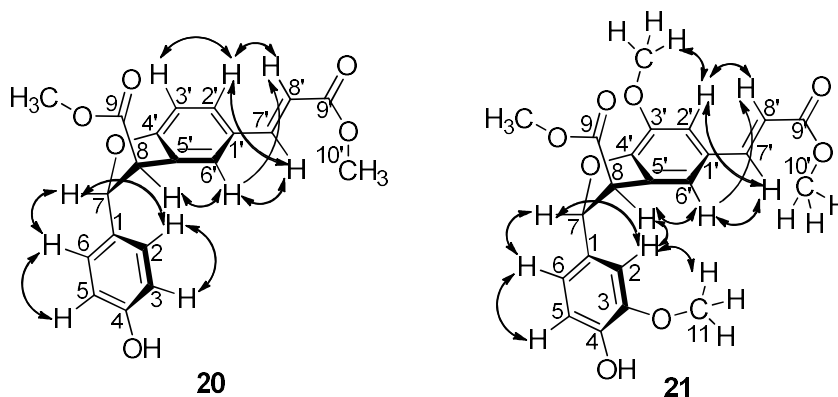


Figura 18. Principais correlações observadas no espectro de NOESY (do inglês *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).

Após o retorno do aluno Herbert Júnior Dias à pós-graduação, uma de suas primeiras iniciativas foi finalizar o trabalho sobre a diferenciação entre os 3,4- e 4,15-epóxieu-desmanolídeos **33** e **34** (**Figura 19**) por espectrometria de massas, que por ele foi iniciado em 2007. O trabalho foi concluído em colaboração com o prof. Dr. Ricardo Vessecchi (FFCLRP-USP) (**Anexo 26**).

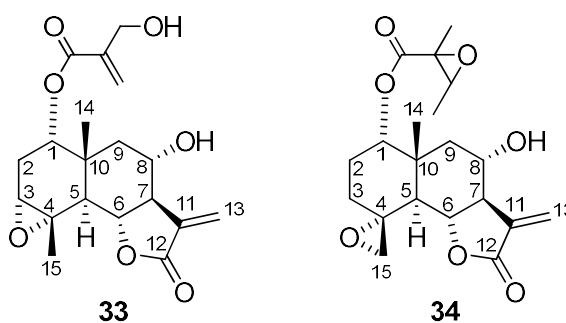
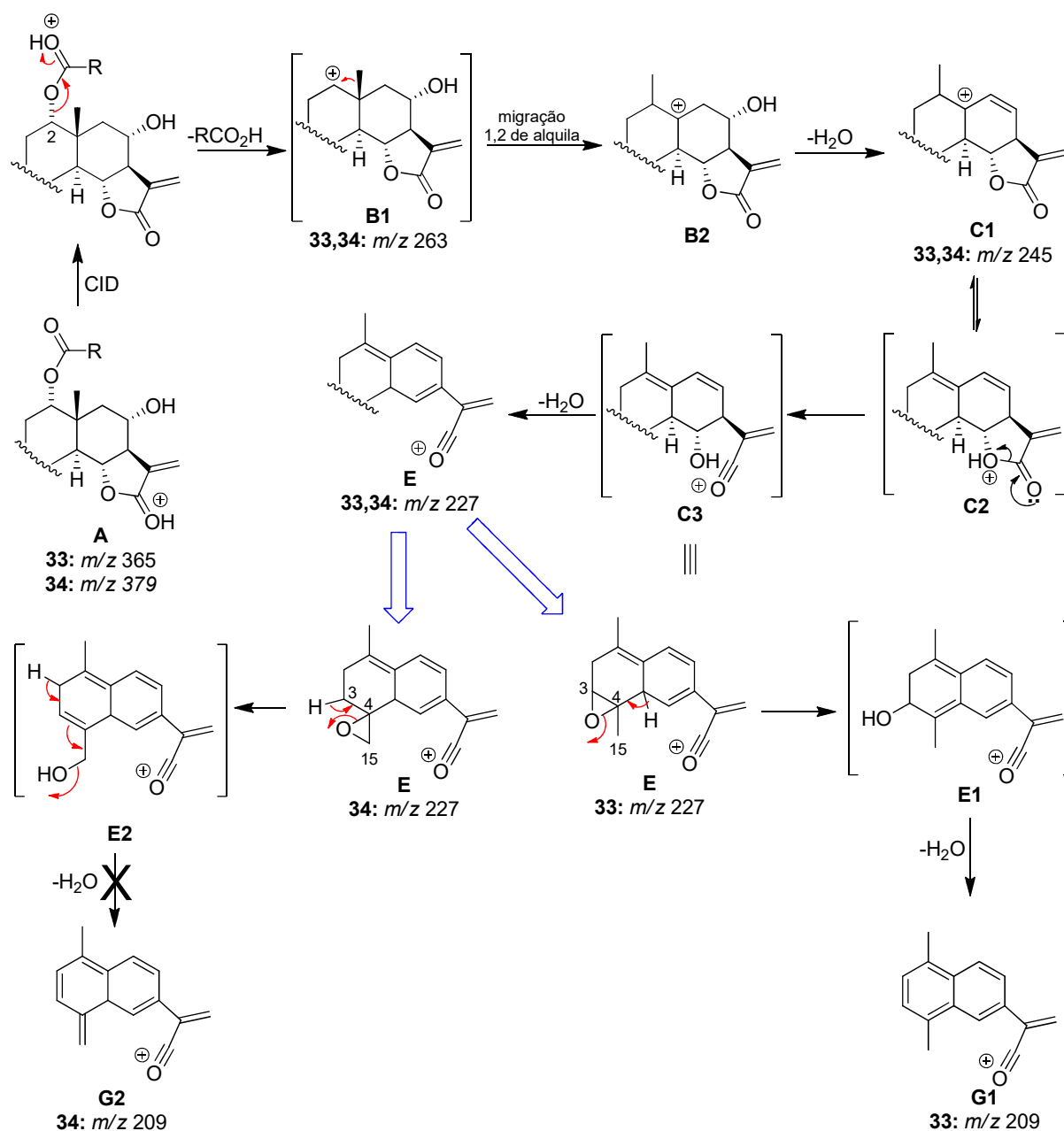


Figura 19. Estruturas químicas dos eudesmanolídeos **33** (1 α -(4-hidroximetacrilóiloxi)-3 α ,4 α -epoxi-8 α -hidroxieu-desm-11(13)-6 α ,12-olídeo) e **34** (1 α -(2,3-epoxiangeloiloxi)-4 α ,15-epoxi-8 α -hidroxieu-desm-11(13)-6 α ,12-olídeo).

Apesar de os eudesmanolídeos **33** e **34** não serem isômeros, observou-se que a primeira etapa da fragmentação de ambos os compostos protonados foi a eliminação do éster em C1. Os valores de afinidade protônica (PA, do inglês *proton affinity*), estimados por Química

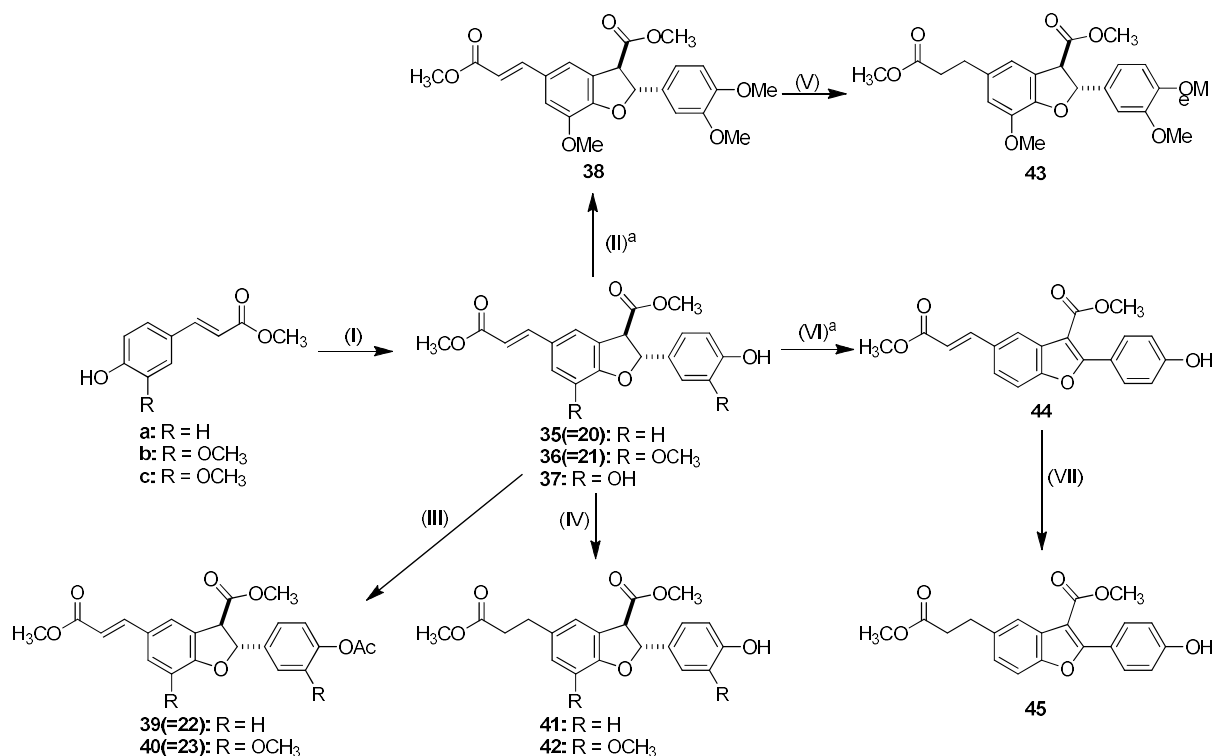
Computacional, revelaram que o oxigênio da carbonila do anel γ -lactônico é o sítio mais básico de ambos os compostos. Esses dados, em combinação com os experimentos de troca com deutério, indicaram que no estágio pós-ativação colisional ocorre migração do próton da carbonila do anel γ -lactônico para a carbonila do éster da cadeia lateral em **C1** (**Esquema 6**, p. 56). Deste modo, a eliminação do ácido carboxílico correspondente e a consequente formação do íon produto de m/z 263 se dá por meio de um mecanismo que envolve migração de carga, excluindo assim a possibilidade de um rearranjo de hidrogênio remoto ou de um rearranjo do tipo McLafferty, ambos com participação de H₂. O carbocátion resultante **B1** se rearranja para **B2** por meio de uma migração 1,2 de grupo metila, sendo que todos os demais íons produtos são formados a partir de **B2** por meio de eliminações de H₂O e de CO. É o caso do íon **C1** (m/z 245), cuja formação a partir de **B2** é dirigida pela estabilização de carga. No entanto, uma análise comparativa detalhada entre os espectros de íons produtos das LST **33** e **34** protonadas permitiu-nos identificar alguns íons que aparecem apenas no espectro do composto **33**. Como exemplo, podemos citar o íon produto **G** (m/z 209), que é formado a partir do íon acílio **E** (m/z 227), conforme mostrado no **Esquema 6** (p. 56). Neste caso, a eliminação de água por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto requer a abertura do anel epóxido entre C3 e C4 (lactona **33**) ou entre C4 e C15 (lactona **34**). Para a lactona **34**, a eliminação de água resulta na formação de uma ligação dupla exocíclica (íon **G2**), enquanto que para o composto **33**, esta eliminação leva à aromatização do sistema decalina, resultando em um íon **G1** que é relativamente mais estável que **G2**. Consequentemente, o pico correspondente ao íon **G** (m/z 209) é observado apenas no espectro do composto **33** e compete com a eliminação de CO. No caso do composto **34**, a eliminação de CO leva à formação de um íon relativamente mais intenso. Os resultados deste estudo mostraram o potencial da espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) para a rápida diferenciação destes compostos (**Anexo 26**).



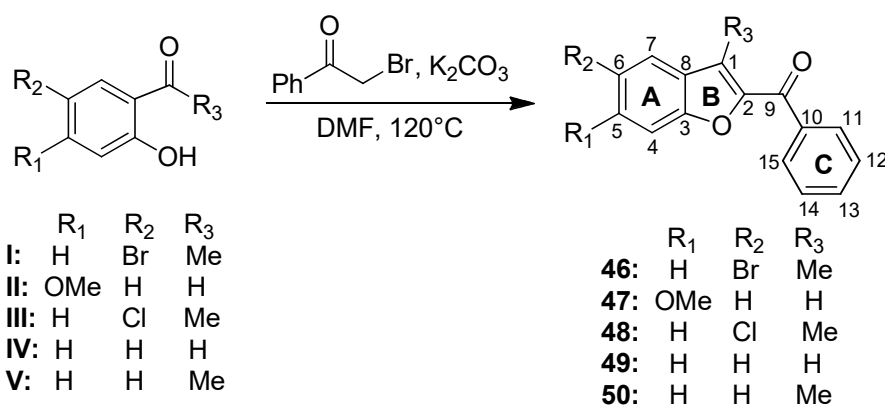
Esquema 6. Formação dos íons produtos **B**, **C** e **E**, comuns aos eudesmanoídeos **33** e **34**, e do íon produto **G**, diagnóstico para o composto **33**.

3.6.2. Síntese de compostos benzofurânicos

Como parte do projeto sobre compostos benzofurânicos mencionados no item 3.6.1, foram sintetizadas nove neolignanas diidrobzofurânicas (**35-43**) e duas neolignanas benzofurânicas (**44** e **45**, **Esquema 7**, p. 57). Além das neolignanas, foram também sintetizados cinco compostos 2-aroil-benzofurânicos (**46-50**, **Esquema 8**, p. 57).



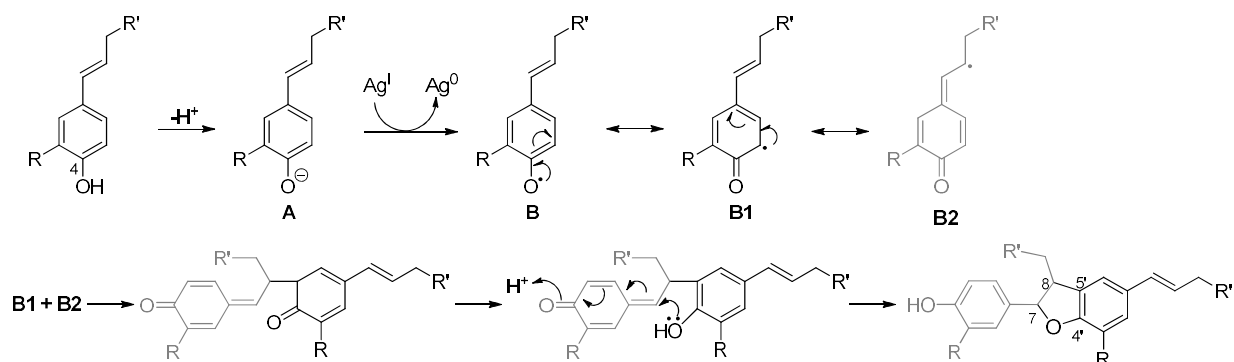
Esquema 7. Síntese dos compostos **35-45**.³ (I) Ag₂O, Me₂CO/C₆H₆ 5:8 (v/v), r.t., 20 h; rendimentos: 34% (**35**), 40% (**36**) e 11% (**37**); (II) MeI, K₂CO₃ em Me₂CO; refluxo, 22 h; rendimento: 65% (**38**); (III) Ac₂O, Pyr, 48 h, r.t.; rendimentos: 96% (**39**) e 82% (**40**); (IV) H₂, Pd/C, 60 psi, 2 h; Rendimentos: 96% (**41**) e 94% (**42**); (V) H₂, Pd/C (5%), 60 psi, 2 h; Rendimento: 97% (**43**); (VI) DDQ, dioxano, 105 °C, 22 h; Rendimento: 74% (**44**); (VII) H₂, Pd/C (5%), 60 psi, 2 h; Rendimento: 96% (**45**).



Esquema 8. Síntese dos compostos 2-aroilbenzofuranos **46-50**. Rendimentos: 66% (**46**), 55% (**47**), 70% (**48**), 52% (**49**) e 58,7% (**50**).

³ Para assegurar a fluência do texto na discussão dos resultados dos ensaios biológicos e dos estudos por ESI-MS/MS, as neolignan **20**, **21**, **22** e **23** foram renumeradas para **35**, **36**, **38** e **39**, respectivamente.

A síntese das neolignananas diidrobzofurânicas foi realizada a partir do acoplamento oxidativo de fenilpropanoides promovido por óxido de prata (I), conforme metodologias previamente descritas na literatura [86-90]. De acordo com o mecanismo proposto na literatura, a reação envolve a homólise da ligação O–H fenólica e a consequente formação de um radical fenoxil intermediário, mimetizando assim a biogênese desses compostos em plantas [91]. Alguns estudos preliminares, realizados em nosso grupo de pesquisa, levaram-nos a sugerir que o radical fenoxil é produzido pela oxidação do ânion fenolato **A** promovida pelos íons Ag^+ , que se reduzem a Ag^0 e se precipitam nas paredes internas do balão de reação (**Esquema 9**). Em seguida, ocorre a formação da ligação C5'–C8 entre duas unidades de radical fenoxil, com posterior fechamento de anel devido à formação da ligação C7'–O4, seguida por tautomerização.



Esquema 9. Mecanismo proposto para o acoplamento oxidativo de fenilpropanoides promovido pelo óxido de prata(I) utilizado para a síntese de neolignananas diidrobzofurânicas (adaptado de Daquino e colaboradores [91]).

A metodologia do acoplamento oxidativo foi utilizada com sucesso para a síntese das neolignananas diidrobzofurânicas **35** e **36**, a partir das quais foram obtidas as demais neolignananas. A escolha desta metodologia deveu-se, entre outros fatores, à possibilidade de se obter o esqueleto básico das neolignananas diidrobzofurânicas em uma única etapa sintética, além de ser relativamente simples do ponto de vista experimental e de exigir condições brandas. No entanto, existem alguns inconvenientes nesta metodologia, tais como o tempo reacional (geralmente entre 20 e 24 h) e a toxicidade dos solventes utilizados (benzeno, diclorometano e clorofórmio). Por

essa razão, optamos por realizar um estudo para otimização das condições utilizadas para o acoplamento oxidativo do *p*-cumarato de metila e ferulato de metila promovido por Ag₂O. (**Anexo 27**). A maioria das condições testadas afetou tanto a conversão (ou seja, o consumo dos ésteres **a** e **b**, **Esquema 7**, p. 57) como a seletividade (isto é, a porcentagem de **a** e **b** que foi convertida nas neolignanas **35** e **36**). Por essa razão, as condições otimizadas foram selecionadas levando-se em conta o balanço entre conversão e seletividade. O estudo realizado revelou que, dentre os vários reagentes de prata(I) testados (Ag₂O, AgBr, AgNO₃, AgOCOCF₃ e AgOSO₂CF₃), a maior conversão foi obtida para AgOSO₂CF₃, porém a seletividade foi muito baixa. Por outro lado, a seletividade alcançada pelo uso de AgOCOCF₃ foi similar à observada para o Ag₂O, porém a conversão foi muito menor. O melhor balanço entre conversão e seletividade foi obtido para o uso de 0.5 eq de óxido de prata(I). Quantidades crescentes de Ag₂O aumentaram a conversão às custas da perda de seletividade. Dentre os solventes testados (diclorometano, benzeno:acetona 6:4, metanol e acetonitrila), acetonitrila foi o que forneceu o melhor balanço entre conversão e seletividade, além de ser um solvente mais “verde” que benzeno e diclorometano. Nas condições de agente oxidante e solvente otimizadas, o tempo de reação pôde ser reduzido de 20 h para 4 h sem grande decréscimo na conversão e na seletividade. A temperatura ambiente foi mantida como condição padrão para esta reação, uma vez que o uso de refluxo, apesar de aumentar a conversão, resultou em maior solubilização do agente oxidante, dificultando assim a sua remoção após o término da reação. Por fim, considerando que intermediários radiculares estão supostamente envolvidos no mecanismo desta reação, o efeito da adição de um inibidor radicalar (AIBN) e de um inibidor radicalar (isoquinolina) foi também avaliado. No entanto, os resultados obtidos foram inconclusivos quanto ao envolvimento de intermediários radiculares no mecanismo. Após a realização deste trabalho, a síntese das neolignanas diidrobzofurânicas passou a ser conduzida em nosso laboratório de forma mais

rápida e mais “verde”. Os resultados deste estudo foram submetidos para publicação no periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society* (**Anexo 27**).

3.6.3 Atividades biológicas de compostos benzofurânicos

As neolignanas diidrobenzofurânicas foram testadas na forma de mistura de enantiômeros *trans*. Tanto as neolignanas como os compostos 2-aroil-benzofurânicos foram submetidos aos ensaios para avaliação de suas atividades leishmanicida, tripanocida, esquistossomicida e inseticida. Ensaios para avaliação da atividade antifúngica das neolignanas foram também realizados em colaboração com a prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhares Rodrigues Pietro, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, porém a atividade desses compostos frente aos fungos selecionados foi muito baixa [92]. Por essa razão, serão discutidos neste texto, de forma resumida, apenas os resultados mais promissores.

Conforme mencionado anteriormente neste texto, as neolignanas **35(=20)**, **36(=21)**, **38(=22)** e **39(=23)** já haviam sido avaliadas quanto às suas atividades esquistossomicidas frente a *Schistosoma mansoni* durante a execução do projeto de mestrado do aluno Murilo de Jesus Fukui, na UNIFRAN. Posteriormente, além dessas, outras neolignanas diidrobenzofurânicas e benzofurânicas foram também sintetizadas por nosso grupo de pesquisa no Departamento de Química da FFCLRP-USP (**Esquema 7**, p. 57) e submetidas à avaliação de suas atividades esquistossomicidas (**Anexo 28**). Nas concentrações de 12,5, 25,0 e 50 μM , nenhum dos compostos afetou a atividade motora ou a mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni* de forma significativa. Por outro lado, com exceção dos compostos **42** e **45**, todos os compostos, nas concentrações de 100 μM ou 200 μM , alteraram a mortalidade e/ou a atividade motora de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em alguma extensão. O composto **39(=22)** apresentou a atividade esquistossomicida mais promissora; na concentração de 200 μM , causou morte de todos os vermes incubados após 24h. Este efeito foi similar ao promovido pelo praziquantel (controle

positivo) na concentração de 1,56 μM . A partir da comparação dos resultados obtidos com os dados previamente reportados para a licarina (**51**, **Figura 20**, p. 61), que também apresentou atividade esquistossomicida [93], foi possível inferir que a hidrogenação da ligação dupla entre C7' e C8', a introdução de um grupo metila adicional em C3' e a presença da ligação dupla entre C7 e C8 diminuem a atividade esquistossomicida das neolignananas diidrobenzofurânicas. Por outro lado, a presença do grupo acetoxi em C4 e a presença de uma ligação dupla entre C7' e C8' desempenham um papel importante na atividade esquistossomicida desta classe de compostos (**Anexo 28**).

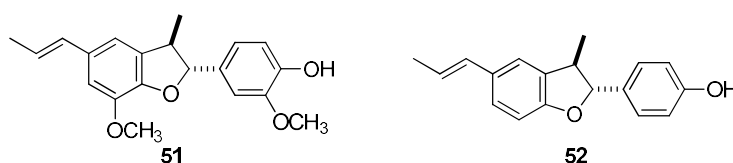


Figura 20. Estrutura da licarina A (**51**) e da conocarpana (**52**).

Há poucos relatos na literatura sobre o potencial inseticida de neolignananas diidrobenzofurânicas. A maior parte dos dados disponíveis referem-se à atividade inseticida da conocarpana (**52**) contra lepdópteros [94, 95]. Nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o grupo do prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin (FCA-UNESP/Bauru), investigou as atividades repelente, deterrente e inseticida das neolignananas **35**, **36** e **38-45** frente a ninfas de segundo instar da mosca branca (*Bemisia tabaci* (Gennadius) biotipo B (Hemiptera: Aleyrodidae)) (**Anexo 29**). A maioria dos compostos testados provocou a morte de 100% das ninfas de *B. tabaci* no sexto dia após a pulverização de folhas de couve-manteiga (*Brassica olearacea* L. var. *acephala*) com as neolignananas **35**, **36** e **38-45** na concentração de 5 mg/mL. A toxicidade por contato dos compostos **36**, **38**, **40**, **41**, **43** e **45** foi maior que a toxicidade do piriproxifeno na concentração de 75 mg/L, que foi utilizado como controle positivo. Efeitos de repelência para os compostos **36** e **42** e de deterrência na oviposição para os compostos **36**, **38** e **42** foram também observados para as moscas adultas expostas às folhas pulverizadas com as neolignananas após 24 e 48 h,

respectivamente. Esses resultados sugeriram que as neolignanas possuem potencial para aplicação no desenvolvimento de estratégias para o manejo efetivo da mosca branca (**Anexo 29**).

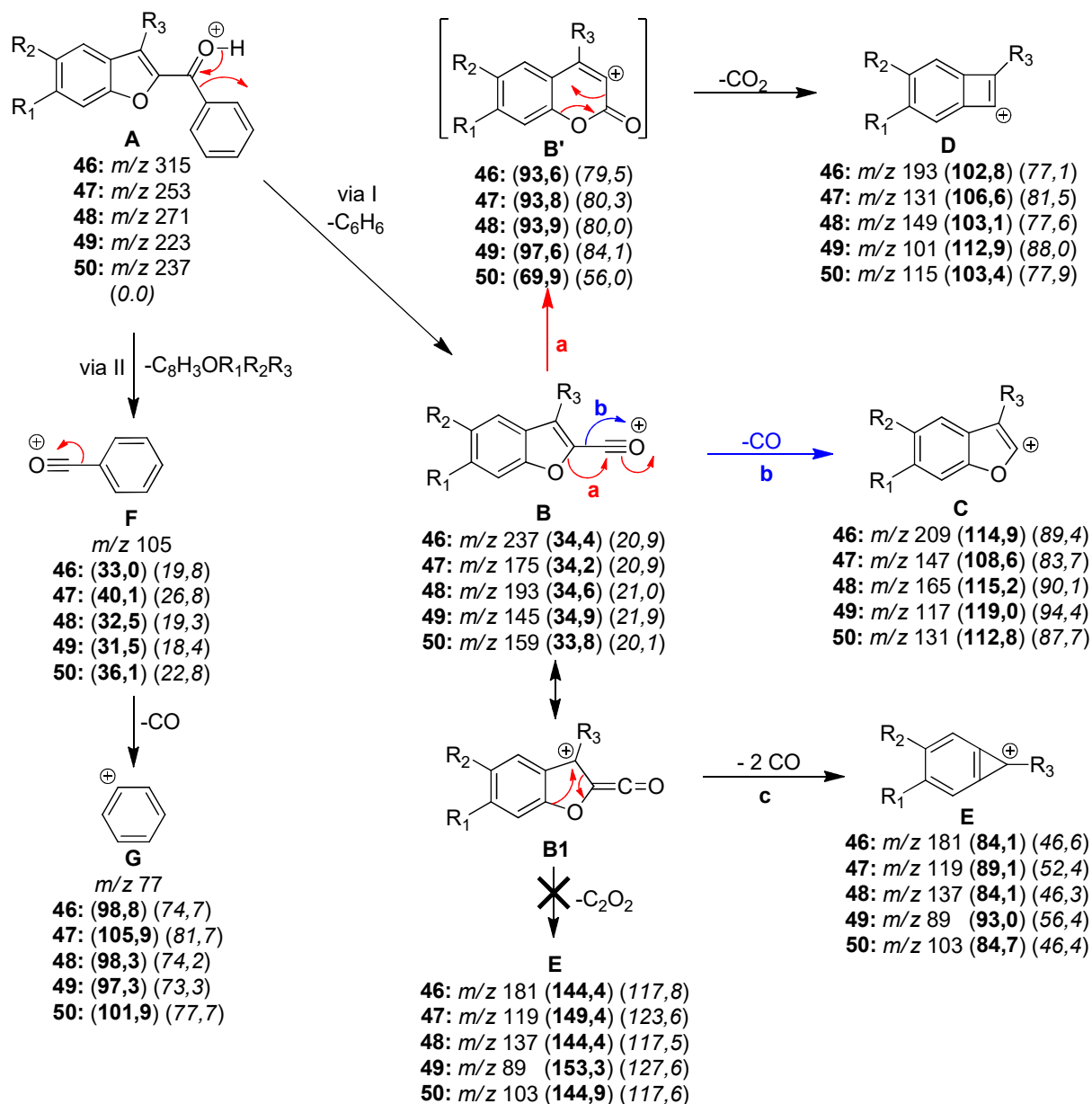
Após a publicação de alguns trabalhos sobre as atividades biológicas de compostos benzofurânicos [92, 96-98], recebemos em 2019 um convite para contribuirmos com um capítulo para o livro “Benzofuran: Production and Applications”, da Editora Nova Publishers (**Anexo 30**). Neste capítulo, intitulado “Dihydrobenzofuran neolignans: an overview of their chemistry and biological activities”, tivemos a oportunidade de apresentar uma extensa revisão sobre as fontes naturais e as atividades biológicas de neolignanas diidrobenzofurânicas, bem como sobre os métodos sintéticos para obtê-las. Além da colaboração dos pós-graduandos Herbert Júnior Dias e Tatiana Manzini Vieira, de nosso grupo de pesquisa, o trabalho contou também com a colaboração da prof^a. Dr^a. Eliane de Oliveira Silva, que realizou um estágio de pós-doutorado em nosso grupo de pesquisa em 2015 durante alguns meses até sua aprovação no concurso para vaga de docente no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, onde trabalha atualmente.

3.6.4 Reações de fragmentação em fase gasosa de compostos benzofurânicos

As reações de fragmentação em fase gasosa das neolignanas diidrobenzofurânicas e dos compostos 2-aroilbenzofurânicos sintetizados por nosso grupo de pesquisa foram investigadas por ESI-MS/MS e ESI-MSⁿ, em combinação com dados termoquímicos estimados por Química Computacional. Esses trabalhos foram realizados pelo doutorando Herbert Júnior Dias. Os dados termoquímicos foram obtidos em colaboração com o prof. Dr. Ricardo Vessecchi (DQ-FFCLRP-USP).

Os primeiros compostos benzofurânicos investigados foram os derivados 2-aroilbenzofurânicos **46-50** (**Esquema 8**, p. 57). Na energia de colisão de 20 eV (E_{lab}), os íons mais intensos no espectro de íons produtos dos compostos **46-50** protonados foram os íons **B**

($[M-H-C_6H_6]^+$) e **F** (m/z 105) (**Esquema 10**). Perdas de moléculas de CO e de CO₂ a partir de **B** também foram observadas nos espectros de todos os compostos analisados (**Anexo 31**).



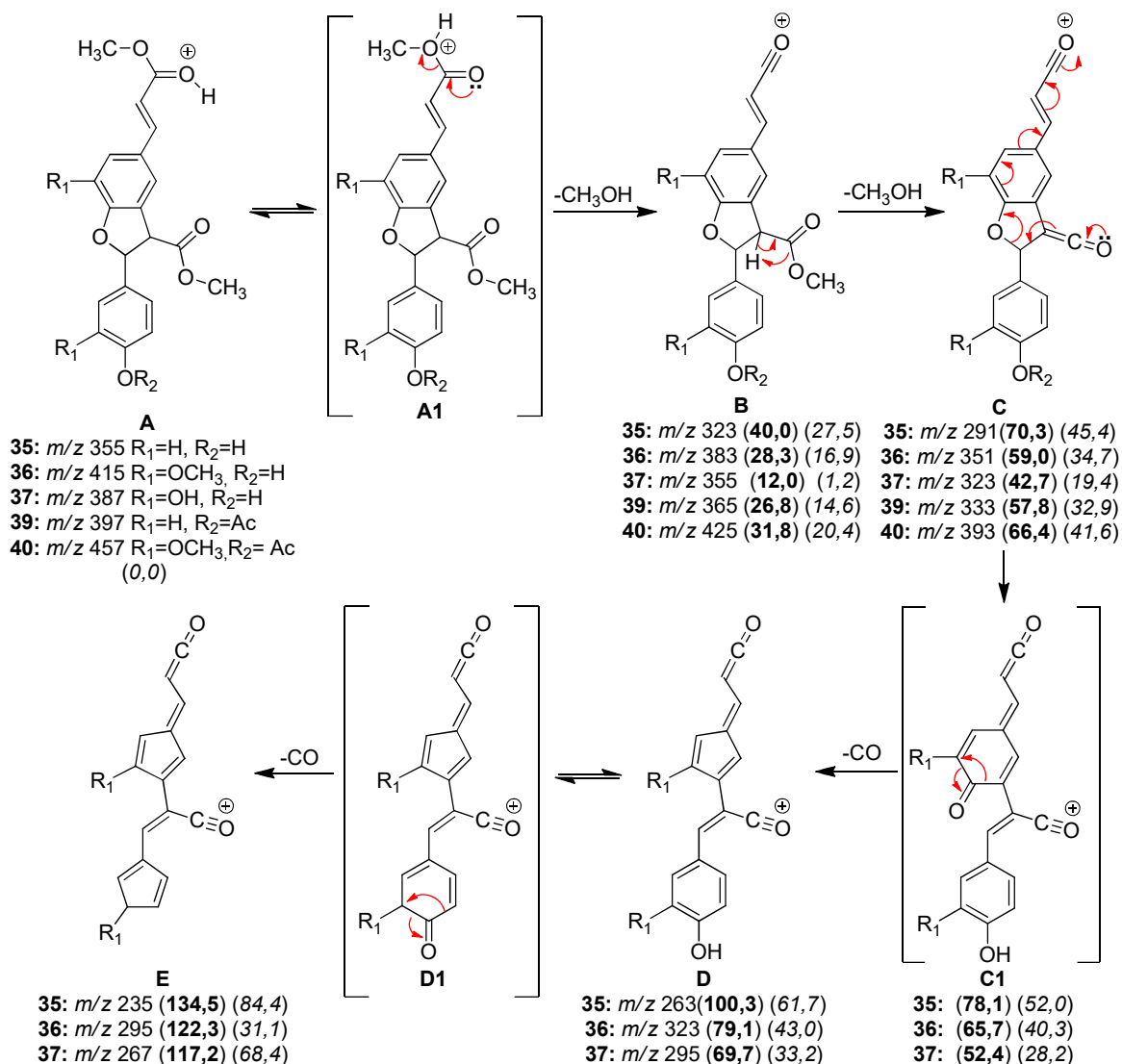
Esquema 10. Formação dos íons **B**, **C**, **D**, **E**, **F** e **G** dos 2-aroilbenzofuranos **46-50** protonados. Os valores expressos abaixo das estruturas são as respectivas **entalpias** (H) e **energias de Gibbs** (G), em kcal/mol.

Os valores de afinidade protônica (PA) revelaram que a protonação ocorre no oxigênio da carbonila dos compostos **46-60**. Este dado, somado aos resultados obtidos dos experimentos de troca com deutério, indicou que os íons acílios **B** e **F** são resultantes de dois

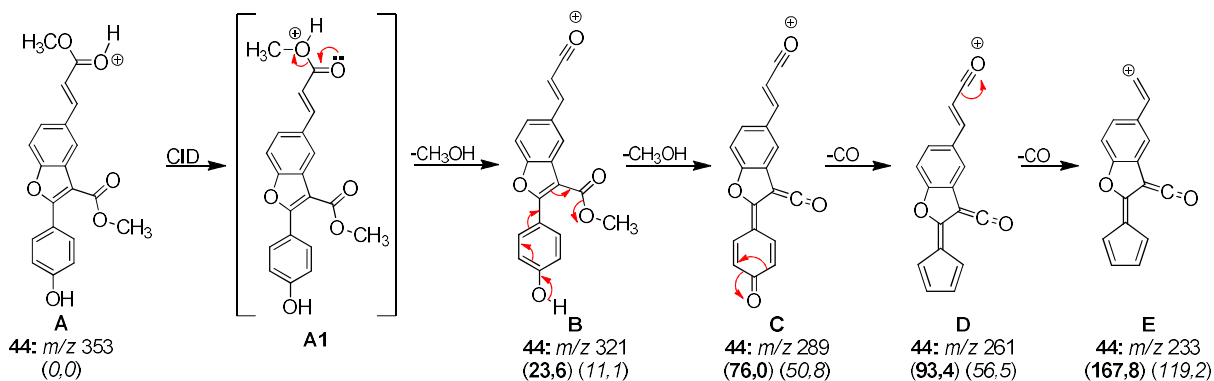
rearranjos de hidrogênios competitivos, similares aos reportados para cetonas aromáticas α,β -insaturadas [99]. Os dados termoquímicos revelaram que as diferenças entre as intensidades relativas de **B** e **F** nos espectros de íons produtos dos compostos 2-aroil-benzofurânicos investigados não estão relacionadas às estabilidades relativas desses íons, e sim aos valores de ΔH e de ΔG envolvidos na conversão de **F** em **G** e de **B** em **C**, **D** e **E**. Esses valores são menores no caso de **F**, o que favorece sua conversão no íon **G** (m/z 77) e, assim diminui sua intensidade no espectro em relação a **B**. No caso da intensidade relativa dos íons **C**, **D** e **E**, cuja formação a partir de **B** foi confirmada por experimentos de MS³, a maior intensidade do íon **E** em relação a **C** e **D** pôde ser explicada a partir da eliminação concertada de duas moléculas de CO, similar à reportada para 1,4-benzodiazepinas protonadas [100]. Os valores de ΔH estimados para este processo foram relativamente menores que os envolvidos na eliminação de etilenodiona (C₂O₂), cuja eliminação havia sido proposta anteriormente para outros compostos aroilbenzofurânicos ionizados por EI-MS [101]. Por outro lado, os íons diagnósticos **I** (m/z 160) e **H** (m/z 102) são formados por meio de eliminações radiculares de X• (X=Br para **46** e X= Cl para **48**) e de •CH₃ (para o composto **47**) que violam a regra do elétron-par. Estes resultados foram publicados no *Journal of Mass Spectrometry* (**Anexo 31**), sendo até então o primeiro estudo a reportar os dados de ESI-MS/MS de aroilbenzofuranos.

Após a realização dos ensaios biológicos com as neolignanas diidrobzofurânicas e a obtenção de alguns resultados promissores, o estudo da fragmentação desses compostos, que já havia sido previsto inicialmente, ganhou maior relevância em virtude dos possíveis estudos de metabolismo que podem vir a ser realizados futuramente. Experimentos preliminares demonstraram que os compostos em questão podem ser ionizados de forma eficiente tanto no modo positivo como no modo negativo. Desta forma, os estudos com esta classe de compostos proporcionou-nos a oportunidade de compararmos os potenciais de ESI(+)-MS/MS e ESI(-)-MS/MS para a obtenção de informações estruturais.

Os estudos com as neolignananas **35-37**, **39-41**, **44** e **45** foram inicialmente conduzidos no modo positivo de ionização a partir de dados de alta resolução, dados de experimentos de MSⁿ e de troca de deutério e de dados termoquímicos estimados por Química Computacional (**Anexo 32**). Os dados de massas acuradas foram obtidos pelo prof. Dr. Paul J. Gates, da University of Bristol, UK, enquanto os dados termoquímicos foram estimados em colaboração com o prof. Dr. Ricardo Vessecchi (DQ-FFCLRP-USP). Os picos correspondentes à molécula protonada ($[M+H]^+$) e à molécula sodiada ($[M+Na]^+$) foram observados nos espectros de ESI(+)-MS de todos os compostos, porém foi necessário adicionar ácido fórmico às soluções das amostras para aumentar o número de moléculas protonadas em relação ao de moléculas sodiadas. Os íons produtos das neolignananas **35-37**, **39-41**, **44** e **45** protonadas foram formados por eliminações de metanol, CO, água ou ceteno, porém a ordem com que essas eliminações ocorrem variou conforme a estrutura. A comparação entre os espectros de íons produtos obtidos em $E_{lab} = 10$ eV revelou que **B** ($[M+H-MeOH]^+$), **C** ($[B-MeOH]^+$), **D** ($[C-CO]^+$) e **E** ($[D-CO]^+$) são íons produtos comuns às neolignananas **35-37**, **39-41**, **44** e **45** protonadas. Os valores de afinidade protônica (PA), em conjunto com os dados dos experimentos de troca de deutério, indicaram que a primeira eliminação de metanol envolve a migração do próton do oxigênio da carbonila do éster em C9' para o oxigênio adjacente, resultando em uma espécie instável **A1** que se decompõe espontaneamente em **B** durante a otimização da geometria (**Esquema 11**, p. 66). Entretanto, os mecanismos pelos quais ocorrem a eliminação da segunda molécula de metanol a partir de **B** para formar o íon **C** e as duas eliminações de CO a partir de **B** estão intrinsecamente relacionados às estruturas das neolignananas. Por exemplo, para as neolignananas diidrobenzofurânicas **35-37**, **39-41** esta eliminação ocorre por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto, com participação de H8 (**Esquema 11**, p. 66). No caso das neolignananas benzofurânicas **44** e **45**, o hidrogênio da hidroxila fenólica em C4 está envolvido na eliminação da segunda molécula de metanol (**Esquema 12**, p. 66).

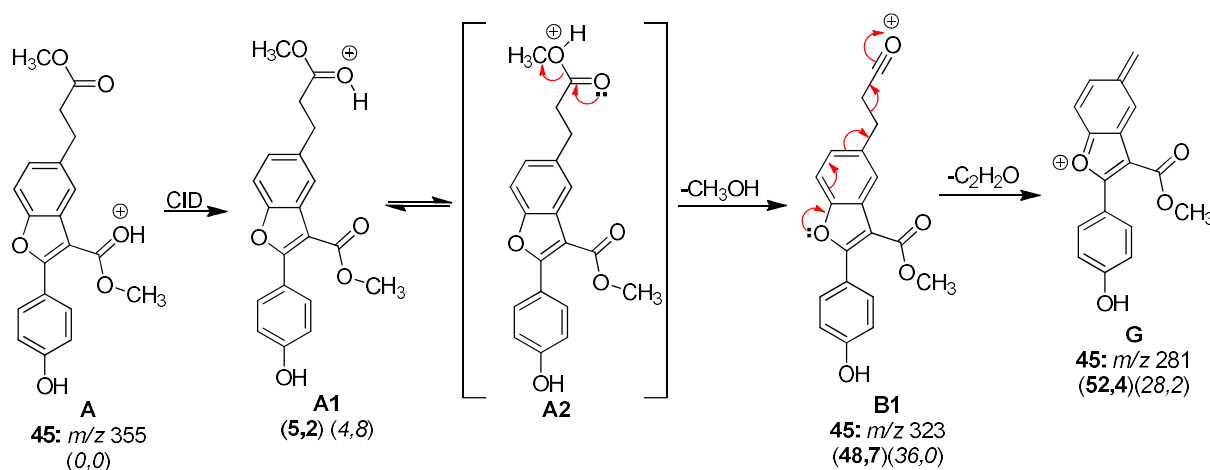


Esquema 11. Formação dos íons produtos **B**, **C**, **D** e **E** para as neolignanas dihidrobenzofurânicas **35-37** protonadas. Os valores expressos abaixo das estruturas são as respectivas **entalpias** (H) e **energias de Gibbs** (G), em kcal/mol.



Esquema 12. Formação dos íons produtos **B**, **C**, **D** e **E** para a neolignana benzofurânica **44** protonada. Os valores expressos abaixo das estruturas são as respectivas **entalpias** (H) e **energias de Gibbs** (G), em kcal/mol.

Apesar dos diferentes mecanismos envolvidos na formação dos íons **B**, **C**, **D** e **E** de neolignanas diidrobzofurânicas e neolignanas benzofurânicas, não é possível utilizar essas diferenças para fins de elucidação estrutural, já que levam à formação de íons produtos comuns. Por outro lado, alguns íons produtos diagnósticos podem ser úteis para a identificação de aspectos estruturais específicos. Por exemplo, a presença de um grupo acetoxi em C4 na estrutura dos compostos **39** e **40** possibilita a eliminação de ceteno (C_2H_2O) a partir de **C**, levando à formação dos íons diagnósticos **K** ($[C-C_2H_2O]^+$) e de seus derivados **L** ($[K-CO]^+$) e **P** ($[L-CO]^+$). A perda de ceteno (C_2H_2O) a partir de **B** também pode ocorrer para o composto **42**, porém, neste caso, esta fragmentação é diagnóstica da presença de uma ligação simples entre C7' e C8' do composto **45** (Esquema 13).



Esquema 13. Formação do íon produto **G** diagnóstico da neolignana benzofurânica **45** protonada (m/z 355). Os valores expressos abaixo das estruturas são as respectivas **entalpias** (H) e **energias de Gibbs** (G), em kcal/mol.

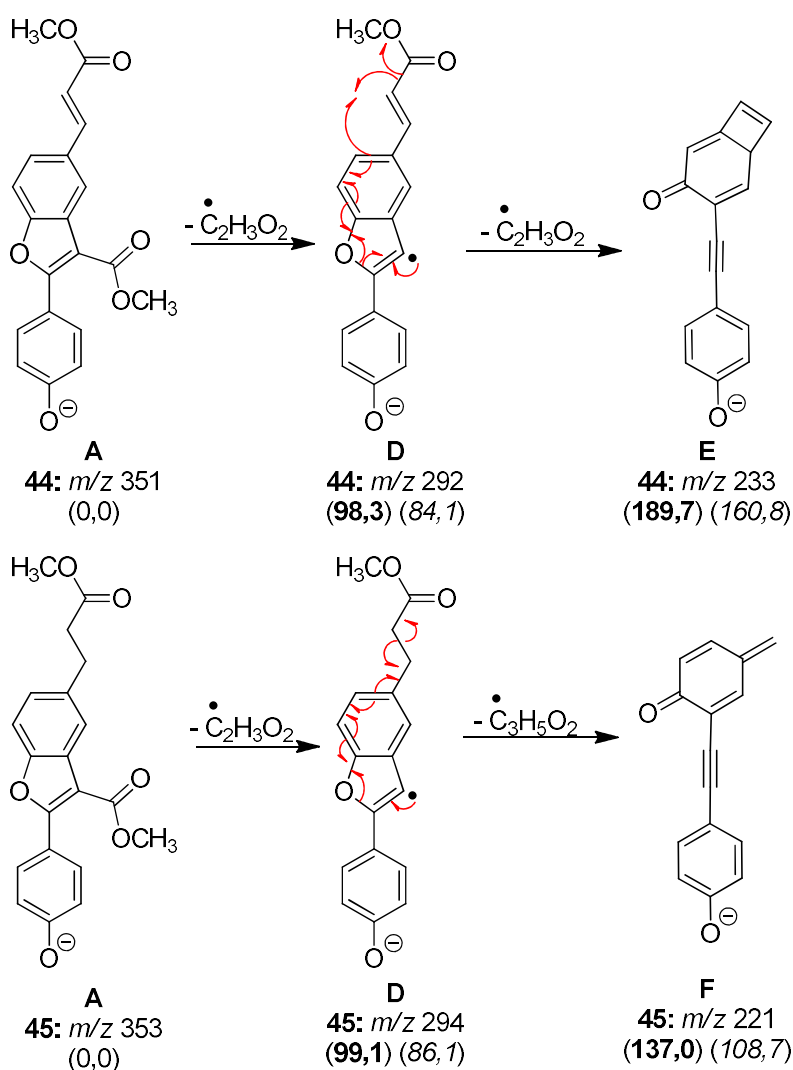
Embora alguns íons produtos sejam indicativos da presença dos grupos acetil (**K**, **L** e **P**), hidroxila fenólica em C3 e C3' (íons produtos **H** $[D-H_2O]^+$ e **M** $[H-CO]^+$) e metoxila aromática em C-3 and C-3' (**N** $[D-MeOH]^+$ e **O** $[N-MeOH]^+$), nenhum íon diagnóstico específico foi associado à estrutura dos compostos **35** e **44** no modo positivo (ESI(+)-MS/MS).

As neolignanas diidrobzofurânicas **35-37**, **39-41** e as neolignanas benzofurânicas **44** e **45** foram também investigadas no modo negativo (**Anexo 33**). Os dados termoquímicos

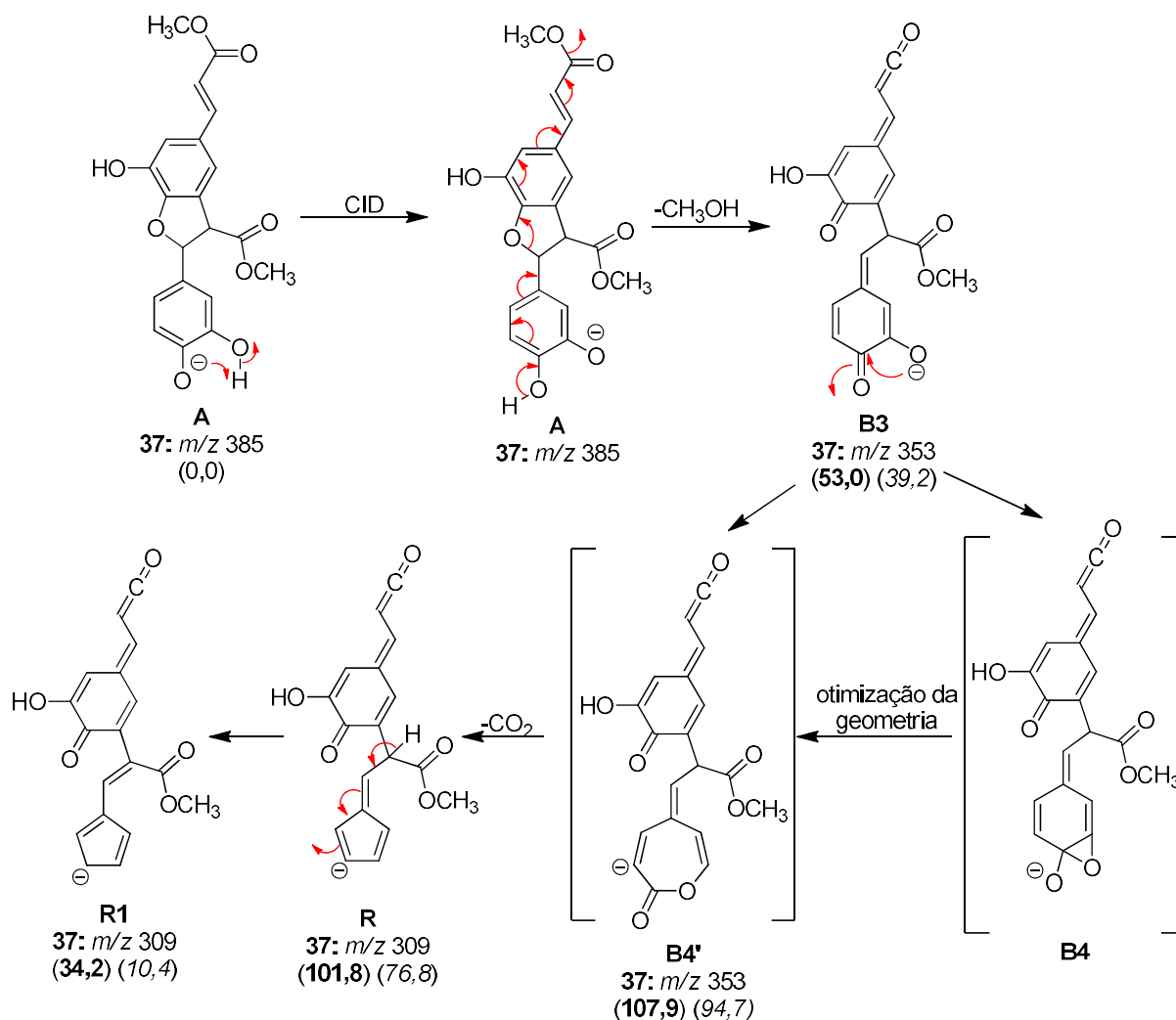
indicaram que a hidroxila fenólica em C4 é o sítio mais ácido na estrutura de todas as neolignanas investigadas, com exceção das neolignanas acetiladas **39** e **40**. Neste caso, o hidrogênio α -carbonílico H8 é o mais ácido, seguido pelo hidrogênio α -carbonílico do grupo acetil. No caso da neolignana **37**, os valores estimados para a acidez em fase gasosa (GA, do inglês *gas-phase acidity*) das hidroxilas fenólicas em C3 e C4 são muito similares. Essas diferenças nos sítios de desprotonação desencadeiam diferentes vias para a formação do íon **B** ($[M-H-MeOH]^-$) e, posteriormente, resultam na formação de uma série de íons diagnósticos. Ao contrário do que ocorreu no modo positivo, pelo menos um íon produto diagnóstico foi formado para cada uma das neolignanas desprotonadas investigadas na energia de colisão (E_{lab}) de 25 eV. Com base no íon produto **D** ($[M-H-\bullet C_2H_3O_2]^-$), foi possível distinguir as neolignanas benzofurânicas **44** e **45** das neolignanas diidrobzofurânicas **35-37**, **39-41** (**Esquema 14**, p. 69). A diferenciação entre **44** e **45**, que diferem entre si quanto à presença da ligação dupla entre C7' e C8', também foi possível no modo negativo (ESI(-)-MS/MS).

Assim como ocorreu com as neolignanas protonadas, as vias de fragmentação de todas as neolignanas desprotonadas selecionadas foram elucidadas com base em experimentos de MSⁿ e em dados de massas acuradas. Os dados termoquímicos estimados por Química Computacional foram de suma importância para suportar a estrutura dos íons propostos e se mostraram em concordância com as intensidades desses íons nos espectros de íons produtos das respectivas neolignanas desprotonadas. Para exemplificar parte do trabalho, discutiremos o caso da neolignana diidrobzofurânica **37**, que apresenta um grupo hidroxila em C3 e em C3'. Para esta neolignana, a formação dos íons produtos **B** ($[M-H-MeOH]^-$) e **C** ($[B-CO]^-$) se dá pela mesma via que os compostos **35**, **36** e **41** (**Anexo 33**). No entanto, a presença da hidroxila fenólica em C3', cujo valor de acidez em fase gasosa (GA) é muito próximo ao da hidroxila em C4, propicia a migração de próton de OH(3) para o oxigênio aniônico de C4 (**Esquema 15**, p. 70). Como consequência, o hidrogênio da hidroxila fenólica em C4 pode participar de uma via de fragmentação alternativa que leva à eliminação de metanol acompanhada por perda da

aromaticidade do anel A e com formação de uma carbonila entre C4 e O4. A formação do íon diagnóstico **R** ($[\mathbf{B}-\text{CO}_2]^-$) é desencadeada pelo ataque nucleofílico do oxigênio aniônico em C3 ao carbono carbonílico C4. O íon resultante **B4** é instável e se rearranjou espontaneamente para um anel lactônico de sete membros **B4'** (Esquema 15, p. 70). Tanto a eliminação de CO_2 por meio da contração do anel lactônico para produzir **R** (m/z 309) como o posterior rearranjo de **R** em **R1** são etapas exotérmicas ($\Delta H = -6,1$ e $-67,6$ kcal/mol, respectivamente) e exergônicas ($\Delta G = -15,9$ e $-66,4$ kcal/mol, respectivamente), o que corrobora sua intensidade relativamente alta de **R** no espectro de íons produtos da neolignana **37**.



Esquema 14. Formação dos íons produtos **D**, **E** e **F** diagnósticos das neolignanas benzofurânicas **44** e **45**. Os valores expressos abaixo das estruturas são as respectivas **entalpias** (H) e **energias de Gibbs** (G), em kcal/mol.



Esquema 15. Formação do íon produto **R**, diagnóstico da neolignana diidrobenzofurânica **37**. Os valores expressos abaixo das estruturas são as respectivas **entalpias** (H) e **energias de Gibbs** (G), em kcal/mol.

Após a realização dos estudos sobre as reações de fragmentação das neolignanas **35-37**, **39-41**, **44** e **45** protonadas e desprotonadas, foi feito um estudo comparativo para se determinar qual dos dois modos de ionização – positivo ou negativo – foi o mais eficiente para a obtenção de informações estruturais desta classe de substâncias utilizando ESI-MS/MS. Os dados foram agrupados no **Quadro 4** (p. 71). A partir da análise deste quadro, é possível notar que todos os íons produtos das moléculas protonadas foram formados por meio de eliminações neutras (CH_3OH , CO , C_2H_2O e H_2O). Apesar de as eliminações de CH_3OH , CO e C_2H_2O também estarem envolvidas na formação da maioria dos íons produtos das moléculas

desprotonadas, eliminações radiculares ($\bullet\text{CH}_3$, $\bullet\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$, $\bullet\text{C}_2\text{HO}$ e $\bullet\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$) foram também observadas no modo negativo e desempenham um papel chave na formação de íons diagnósticos. A eliminação de $\bullet\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ diretamente da molécula desprotonada permitiu diferenciar as neolignan benzofurânicas das diidrobenzofurânicas, o que não foi possível a partir dos espectros de íons produtos das neolignanas protonadas.

Quadro 4. Íons produtos das neolignanas **35-37**, **39-41**, **44** e **45** protonadas (modo positivo) e desprotonadas (modo negativo).

BN/ DBN	ESI(+)-MS/MS	ESI(-)-MS/MS
35	Nenhum íon diagnóstico	m/z 265 ([M-H-MeOH-CO-CO] ⁻) m/z 233 ([M-H-MeOH-CO-C ₂ H ₄ O ₂] ⁻) m/z 206 ([M-H-MeOH-CO-CO- $\bullet\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$] ⁻) m/z 192 ([M-H-MeOH-CO-C ₂ H ₄ O ₂ - $\bullet\text{C}_2\text{HO}$] ⁻) m/z 164 ([M-H-MeOH-CO-C ₂ H ₄ O ₂ - $\bullet\text{C}_2\text{HO-CO}$] ⁻)
36	m/z 291 ([M+H-MeOH-MeOH-CO-MeOH] ⁺) m/z 259 ([M+H-MeOH-MeOH-CO-MeOH-MeOH] ⁺)	m/z 338 ([M-H-MeOH- $\bullet\text{CH}_3\text{-CO}$] ⁻) m/z 323 ([M-H-MeOH- $\bullet\text{CH}_3\text{-CO-}\bullet\text{CH}_3$] ⁻) m/z 264 ([M-H-MeOH- $\bullet\text{CH}_3\text{-CO-}\bullet\text{CH}_3\text{-}\bullet\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$] ⁻)
37	m/z 277 ([M+H-MeOH-MeOH-CO-H ₂ O] ⁺) m/z 249 ([M+H-MeOH-MeOH-CO-H ₂ O-CO] ⁺)	m/z 309 ([M-H-MeOH-CO ₂] ⁻)
39	Nenhum íon diagnóstico	m/z 353 ([M+H-C ₂ H ₂ O] ⁻) m/z 321 ([M+H-C ₂ H ₂ O-MeOH] ⁻) m/z 293 ([M+H-C ₂ H ₂ O-MeOH-CO] ⁻)
40	Nenhum íon diagnóstico	m/z 425 ([M-H- $\bullet\text{CH}_3\text{-}\bullet\text{CH}_3$] ⁻)
41	Nenhum íon diagnóstico	m/z 233 ([M-H- $\bullet\text{CH}_3\text{-}\bullet\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{-}\bullet\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$] ⁻)
44	m/z 339 ([M+H-H ₂ O] ⁺) m/z 283 ([M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺) m/z 263 ([M+H-C ₆ H ₆ O] ⁺) m/z 231 ([M+H-C ₆ H ₆ O-MeOH] ⁺)	m/z 291 ([M-H-MeOH-MeOH] ⁻) m/z 263 ([M-H-MeOH-MeOH-CO] ⁻) m/z 222 ([M-H-MeOH-MeOH-CO- $\bullet\text{C}_2\text{HO}$] ⁻)
45	m/z 281 ([M+H-MeOH-C ₂ H ₂ O] ⁺)	m/z 221 ([M-H- $\bullet\text{CH}_3\text{-}\bullet\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{-}\bullet\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$] ⁻)

Para os compostos **37** e **41**, um maior número de íons diagnósticos foi formado a partir da molécula protonada. No caso dos compostos acetilados **39** e **40**, é possível utilizar alguns processos de fragmentação que podem ser utilizados para identificar a presença do grupo acetil, porém nenhum íon diagnóstico específico permitiu diferenciar essas duas neolignanas uma da outra, razão pela qual esses processos não foram incluídos no **Quadro 4** (p. 71). No entanto, nenhum íon produto ou processo de fragmentação diagnóstico foi associado aos compostos **35** e **44** protonados. Por outro lado, conforme mencionado anteriormente, pelo menos um íon produto ou fragmentação diagnóstica foi observada nos espectros das neolignanas desprotonadas. Este fato, somado à necessidade de se utilizar aditivos para gerar moléculas protonadas no modo positivo, levou-nos a concluir que o modo negativo é o mais útil para a análise das neolignanas **35-37, 39-41, 44** e **45** (**Anexo 33**).

3.7 CURCUMINOIDES MONOCETÔNICOS (MKCs)

3.7.1. Contextualização

A curcumina ([1,7-*bis*(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona]) (**53**), **Figura 21**, p 73) é um composto fenólico hidrofóbico majoritário nos rizomas da *Curcuma longa* (família Zingiberaceae), componente primário encontrado no açafrão [102]. O termo "curcuminóide" é usado para descrever a curcumina e outros análogos *bis*- β -dicetonônicos α,β -insaturados. Além da curcumina, outros curcuminoides também são encontrados nos rizomas da *C. longa*, com destaque para a demetoxicurcumina (**54**) e a *bis*-demetoxicurcumina (**55**).

Na literatura, diversas atividades biológicas têm sido reportadas para a curcumina, dentre as quais podemos citar as atividades inseticida [103], antioxidante [104], anti-inflamatória [105], antimicrobiana [106], anticarcinogênica [107, 108], tripanocida [109] e esquistossomicida [110, 111], entre outras. No entanto, apesar de sua eficácia e segurança – vários estudos em humanos e modelos animais provarem que a curcumina é extremamente segura, mesmo em altas

doses – a curcumina ainda não foi aprovada como agente terapêutico devido à sua biodisponibilidade relativamente baixa. Essa biodisponibilidade baixa deve-se à sua baixa absorção e ao seu rápido metabolismo [112]. Dados da literatura também indicam que estudos *in vitro* com a curcumina são dificultados devido à sua rápida decomposição em presença de luz e à sua baixa solubilidade em água[113]. Por esses motivos, a curcumina tem sido utilizada como modelo para a síntese de curcuminoides mais efetivos, tais como os monocetônicos (**I**) [114], os 4-hidroxiacetilênicos (**II**) [115] e os 4-amilidênicos (**III**) [116] (**Figura 21**).

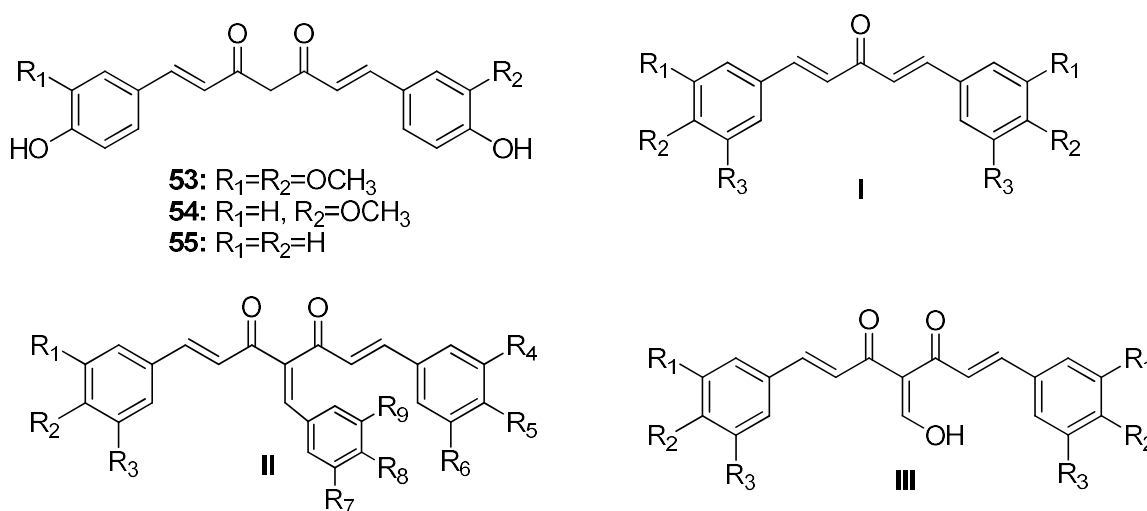
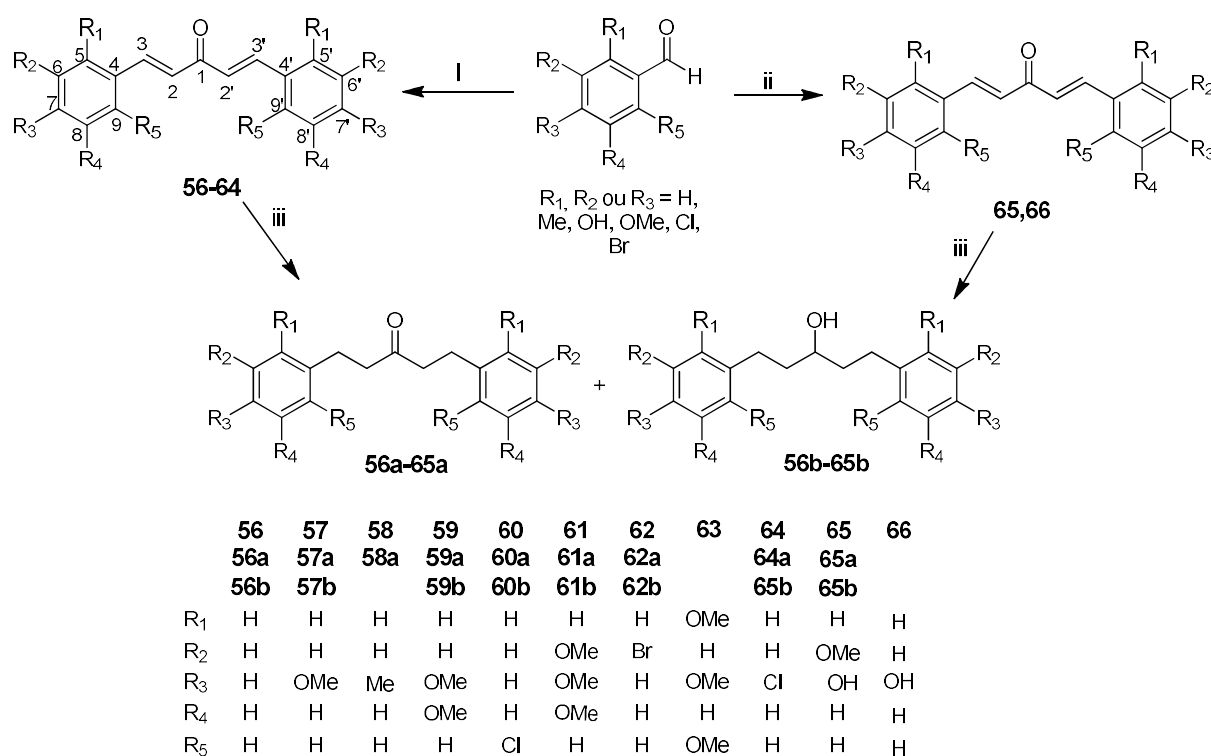


Figura 21. Estruturas químicas da curcumina (**53**), demetoxicurcumina (**54**) e *bis*-demetoxicurcumina (**55**) e estruturas básicas de curcuminoides monocetônicos (**I**), 4-hidroxiacetilênicos (**II**) e 4-amilidênicos (**III**).

Com base em relatos da literatura sobre a atividade esquistossomicida da curcumina [117], foi elaborado em colaboração com a prof^a. Dr^a. Lizandra Guidi Magalhães (UNIFRAN) um projeto de auxílio regular destinado à síntese de uma série de curcuminoides monocetônicos (MKCs, do inglês *monoketone curcuminoids*) para avaliação de seu potencial esquistossomicida (Proc. FAPESP 16/24456-1). Concomitantemente, considerando a atividade antimicrobiana da curcumina frente a *Streptococcus mutans* [118-120], um projeto visando a síntese de MKCs, a avaliação de suas atividades antimicrobianas frente a patógenos bucais e o estudo de suas reações

de fragmentação em fase gasosa foi desenvolvido pela mestranda Tatiana Manzini Vieira (Proc. FAPESP 16/19272-9). Os principais resultados deste projeto serão discutidos a seguir.

Os curcuminoides monocetônicos (MKCs) foram sintetizados por condensação de Claisen-Schmidt entre acetona e diferentes aldeídos aromáticos, conforme metodologias previamente descritas na literatura [121], com pequenas modificações. Os derivados **56a-65a** e **56b-65b** foram obtidos por hidrogenação catalítica a partir dos compostos **56-65**.



Esquema 16. Síntese dos curcuminoides monocetônicos (MKCs) e de seus derivados. (i) acetone, NaOH/EtOH, r.t., 15min-24h; (ii) acetona, HCl/AcOH, r.t., 24h; (iii) H₂, Pd/C (10%), 100 psi, r.t.

3.7.2. Atividade antimicrobiana de MKCs

Os curcuminoides monocetônicos (MKCs) **56-66**, **56a-65a** e **56b-65b** (**Esquema 16**) foram submetidos a ensaios para avaliação da atividade biológica frente a bactérias cariogênicas. Os ensaios foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, da UNIFRAN. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 8** (p. 75) e nos **Anexos 34** e **35**.

Tabela 8. Valores de concentração inibitória mínima (CIM, em $\mu\text{g/mL}$), dos curcuminoides monocetônicos **56-65**, **56a-65a**, **56b-65b** e **66** contra bactérias cariogênicas selecionadas.*

MKC	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>mutans</i> (ATCC 25175)	<i>mitis</i> (ATCC 49456)	<i>salivarius</i> (ATCC 25975)	<i>sanguinis</i> (ATCC 10556)	<i>sobrinus</i> (ATCC 33478)	<i>faecalis</i> (ATCC 4082)	<i>casei</i> (ATCC 11578)
56	>400	400	>400	400	>400	>400	>400
56a	>400	>400	400	400	>400	>400	>400
56b	400	200	400	40	>400	>400	>400
57	>400	>400	400	400	>400	>400	>400
57a	>400	>400	>400	>400	400	>400	>400
57b	400	400	400	>400	400	400	>400
58a	200	100	200	200	400	>400	>400
62	>400	400	400	>400	400	>400	>400
62b	>400	100	200	400	>400	>400	>400
63	400	400	400	>400	>400	400	>400
65	50	50	200	100	400	>400	100
65a	>400	400	>400	400	400	>400	400
65b	200	100	>400	200	400	>400	200
66	50	50	200	100	200	400	25
Controle positivo^a	0,92	1,84	1,84	0,92	0,92	7,37	0,92

^aCloridrato de clorexidina. *Os compostos **58**, **59**, **59a**, **59b**, **60**, **60a**, **60b**, **61**, **61a**, **61b**, **62a**, **64**, **64a** e **64b** não foram ativos na faixa de concentrações testadas (CIM > 400 $\mu\text{g/mL}$) e, portanto, não foram incluídos na tabela.

Com base nos critérios da literatura anteriormente discutidos neste texto (p. 12), com exceção dos compostos **58**, **59**, **59a**, **59b**, **60**, **60a**, **60b**, **61**, **61a**, **61b**, **62a**, **64**, **64a** e **64b**, todos os compostos apresentaram atividade antimicrobiana moderada (CIM \leq 400) contra pelo menos um dos microrganismos selecionados (**Tabela 8**). Os menores valores de CIM foram obtidos para os compostos **10** e **11**. Esses compostos apresentaram atividade promissora frente a *Streptococcus*

mutans (CIM = 50 µg/mL), *Streptococcus mitis* (CIM = 50 µg/mL), *Streptococcus sanguinis* (CIM = 100 µg/mL) e *Lactobacillus casei* (CIM = 100 e 25 µg/mL, respectivamente). Os compostos **58a** e **62b** também apresentaram atividade moderada frente a *Streptococcus mitis* (CIM = 100 µg/mL), porém foram fracamente ativos ou inativos frente às demais bactérias cariogênicas.

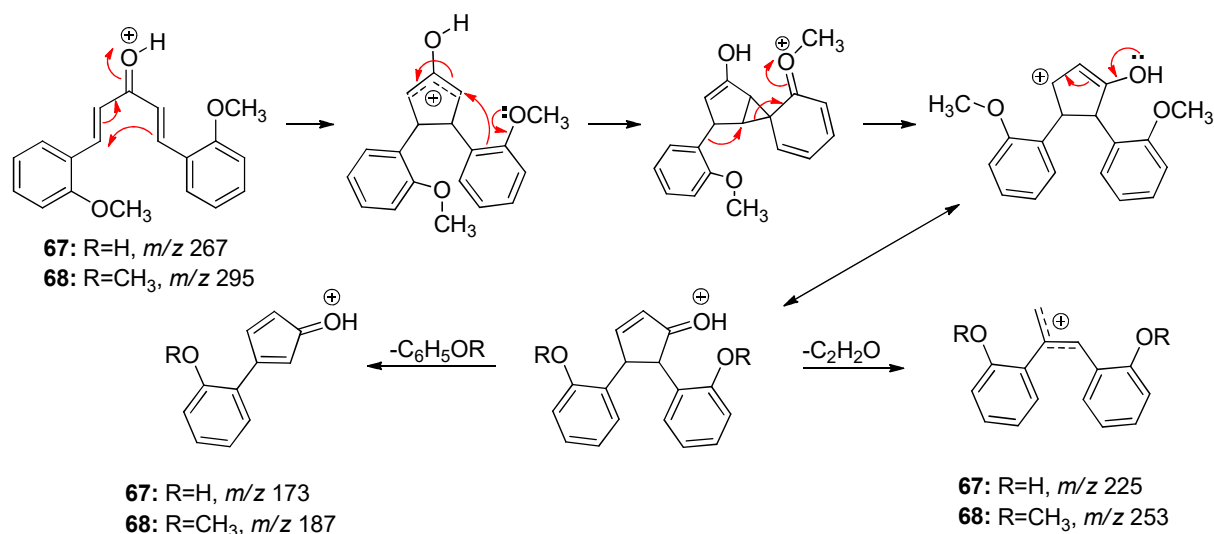
A partir destes resultados, algumas relações entre a estrutura dos MKCs testados e a atividade antimicrobiana por eles apresentada foram inferidas. Por exemplo, a maioria dos compostos que apresentaram uma ligação dupla entre C2 e C3 e C2' e C3' foi inativa contra os microrganismos selecionados na região de concentrações testadas, exceto os compostos **56**, **57**, **63**, **65** e **66**. No entanto, apesar de uma tendência para um aumento discreto da atividade antimicrobiana em compostos obtidos por hidrogenação da ligação dupla entre C2 e C3 e entre C2' e C3' em relação a seus precursores, o papel da natureza da ligação entre C2 e C3 e C2' e C3' sobre a atividade antimicrobiana não ficou claro, uma vez que a atividade antimicrobiana parece estar também associada à natureza do substituinte presente no anel. Por exemplo, a presença de grupos metoxila no anel aromático dos compostos **57**, **63** e **65** parece potencializar a atividade antimicrobiana destes MKCs. Contudo, a inatividade dos compostos **59** e **61**, que possuem grupos metoxila adjacentes, sugeriu que a presença de grupos metoxila em carbonos adjacentes diminui a atividade contra as bactérias cariogênicas testadas. Por outro lado, a maior atividade dos compostos **65** e **66** pode indicar que a hidroxila fenólica desempenha um papel muito importante na atividade antimicrobiana de MKCs.

Para fins de comparação, a atividade antimicrobiana da curcumina A (**65**) foi comparada com a da curcumina (**53**), que é o seu análogo β-dicetônico [122]. A curcumina é capaz de suprimir a adesão de *Streptococcus mutans* na superfície do dente por meio da inibição da atividade da enzima sortase [118-120]. Na literatura, a curcumina é efetiva contra *S. mutans* (CIM = 250 µg/mL) e *S. mitis* (CIM = 62,5 µg/mL). Os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que a curcumina A é ativa contra *S. mutans* e *S. mitis* na concentração de 50

$\mu\text{g/mL}$, sendo, portanto, mais efetiva que a curcumina contra essas duas bactérias cariogênicas (Anexos 34 e 35).

3.7.3 Estudo das reações de fragmentação de MKCs em fase gasosa

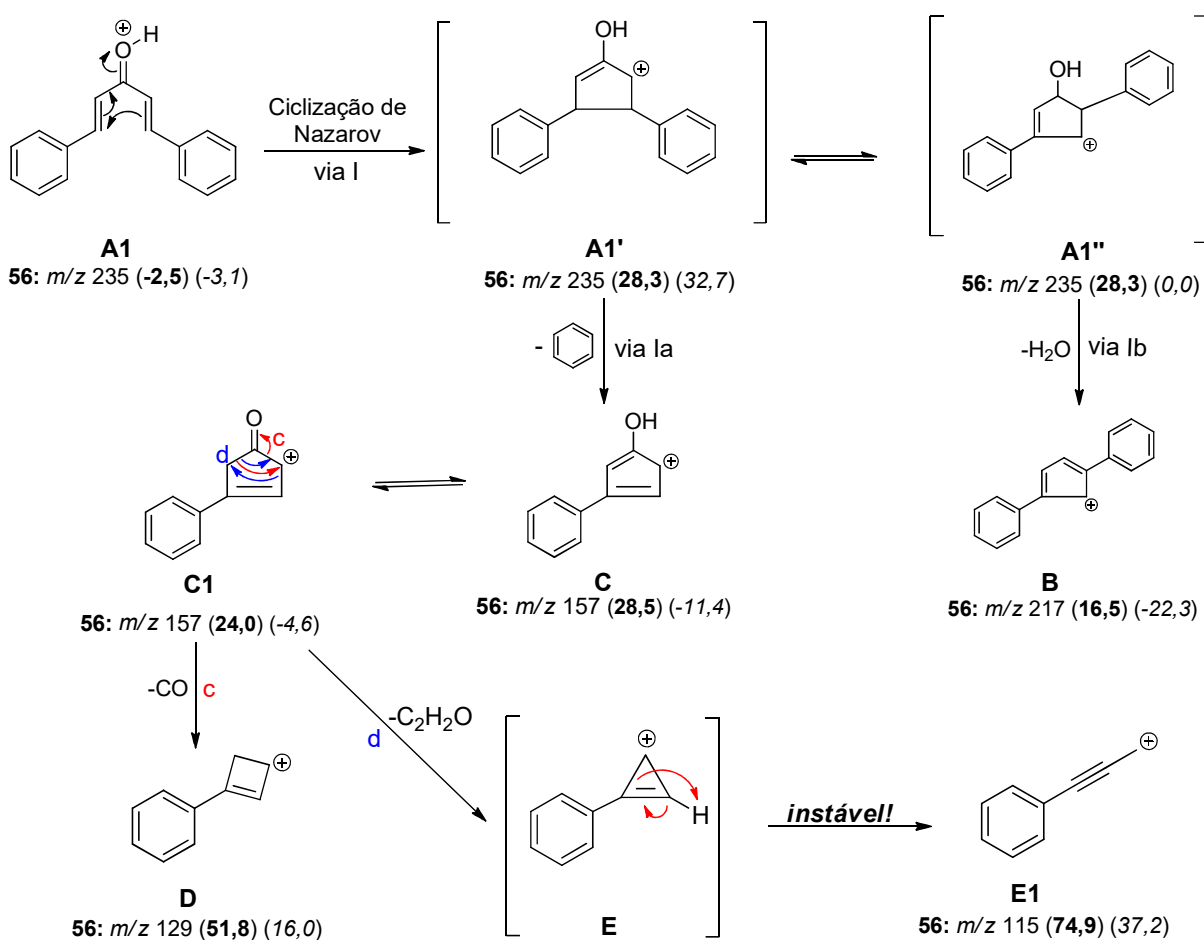
Na literatura, a fragmentação dos curcuminoides **56**, **57**, **67** e **68** (Esquema 16, p. 74) foi investigada por Cyriac e colaboradores [123]. Para os compostos **67** e **68**, os autores reportaram que as eliminações de ceteno (42 Da) ou de fenol (para o composto **67**)/anisol (para o composto **68**) a partir da molécula protonada são precedidas por uma ciclização de Nazarov em fase gasosa, que é análoga à que ocorre em solução. Os autores reportaram que o substituinte oxigenado na posição *orto* do anel benzênico desempenha um papel importante no mecanismo por meio da ancoragem da migração 1,2 dos grupos arila, conforme representado no Esquema 17.



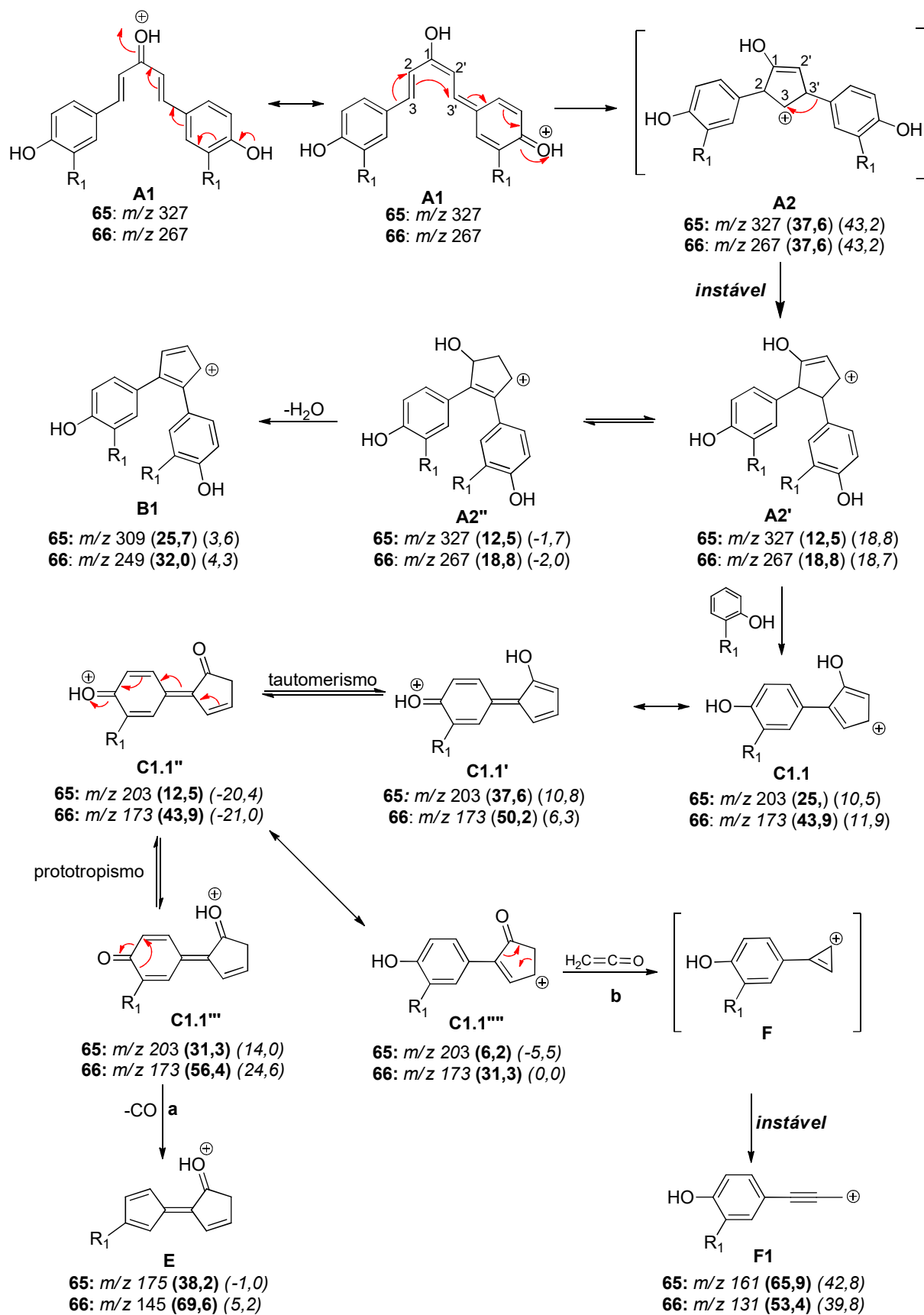
Esquema 17. Ciclização de Nazarov em fase gasosa e eliminação de ceteno e de fenol/anisol a partir dos compostos **67** e **68** protonados [123].

Em trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, mais especificamente pela mestrandia Tatiana Manzini Vieira, foi demonstrado através de dados de ESI-MS/MS e de

cálculos computacionais que a reação de Nazarov ocorre também para outros MKCs que não possuem substituinte oxigenado na posição *orto*. O mecanismo proposto reforçou alguns aspectos do mecanismo previamente proposto por Cyriac e colaboradores para a eliminação de ceteno e de areno, porém pode ser utilizado para explicar a fragmentação de uma maior diversidade de MKCs. É o caso do composto **56**, que não apresenta substituintes oxigenados no anel aromático (**Esquema 18**) A formação do íon produto **B** ($[M+H-H_2O]^+$), que havia sido apenas mencionada na literatura, foi também investigada. O trabalho foi feito em colaboração com o prof. Dr. Renato Luis Tame Parreira (UNIFRAN) (**Anexo 36**).



Esquema 18. Ciclização de Nazarov e formação dos íons produtos $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-C_6H_6]^+$, $[M+H-CO]^+$, $[M+H-C_2H_2O]^+$ do MKC **56** protonado.



Esquema 19. Reação de Nazarov e fragmentação dos MKCs 65 e 66 protonados.

Outro resultado interessante deste estudo diz respeito aos compostos **65** e **66**, que apresentam grupo hidroxila em *para*. Os cálculos computacionais mostraram que a estrutura **A1'** desses compostos é convertida espontaneamente em **A1** durante a otimização da geometria, indicando que a fragmentação desses compostos ocorre por uma via diferente da dos demais MKCs investigados (**Esquema 19**, p. 79). O mesmo não ocorre com o composto **67**, cuja estrutura **A1'** é estável e não é convertida a **A1**. Estes dados evidenciaram que a posição da hidroxila desempenha um papel chave na fragmentação desses MKCs. Entretanto, ao contrário do que foi previamente sugerido por Cyriac e colaboradores [123], o efeito da hidroxila parece estar mais associado à formação de ligação de hidrogênio intramolecular do que à participação do hidrogênio da hidroxila no mecanismo. Neste caso, a ligação de hidrogênio intramolecular entre os dois grupos hidroxila em *orto* estabilizam a estrutura **A1'** resultante da ciclização de Nazarov (**Esquema 18**, p. 78), tornando sua fragmentação similar à dos compostos **56-64**. No caso dos compostos **65** e **66**, cujos grupos hidroxila estão em *para*, esta interação estabilizante não ocorre, fazendo com que **A1'** seja convertido em **A1** e se fragmente conforme mostrado no **Esquema 19** (p. 79).

3.8. ESTUDOS MECANÍSTICOS DE REAÇÕES POR ESI-MS

Os primeiros cinco anos no Departamento de Química da FFCLRP-USP (2013-2018) foram particularmente intensos em termos de trabalho. Houve um esforço constante não apenas para nuclear um novo grupo de pesquisa no Laboratório de Síntese Orgânica (LSO), mas também para atender aos compromissos que haviam sido assumidos antes do ingresso no Departamento com ex-alunos, colegas com quem mantivemos colaboração e instituições de fomento. Conforme mostrado no gráfico da **Figura 22** (p. 81), que foi plotado a partir dados extraídos do site Web of Science®, houve um aumento significativo no número total de artigos publicados entre 2013 e 2020 (62) em relação ao período entre 2005 e 2013 (35). Este aumento

foi acompanhado pelo aumento no número de publicações resultantes de orientações de alunos de iniciação científica e de pós-graduação (**Figura 22a**).⁴ No gráfico da **Figura 22b**, é possível constatar uma tendência para o aumento do fator de impacto médio dos periódicos em que os trabalhos de nosso grupo foram publicados.

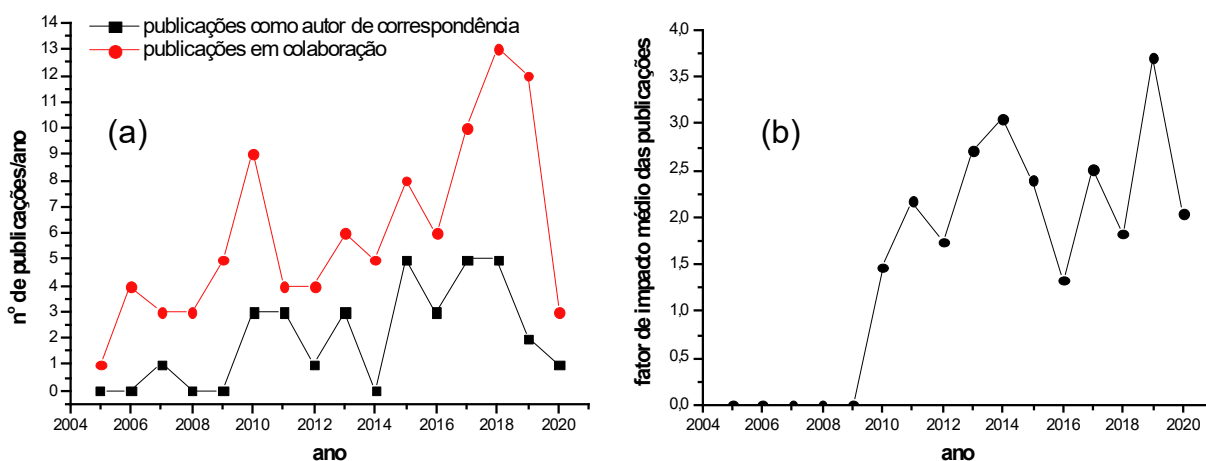


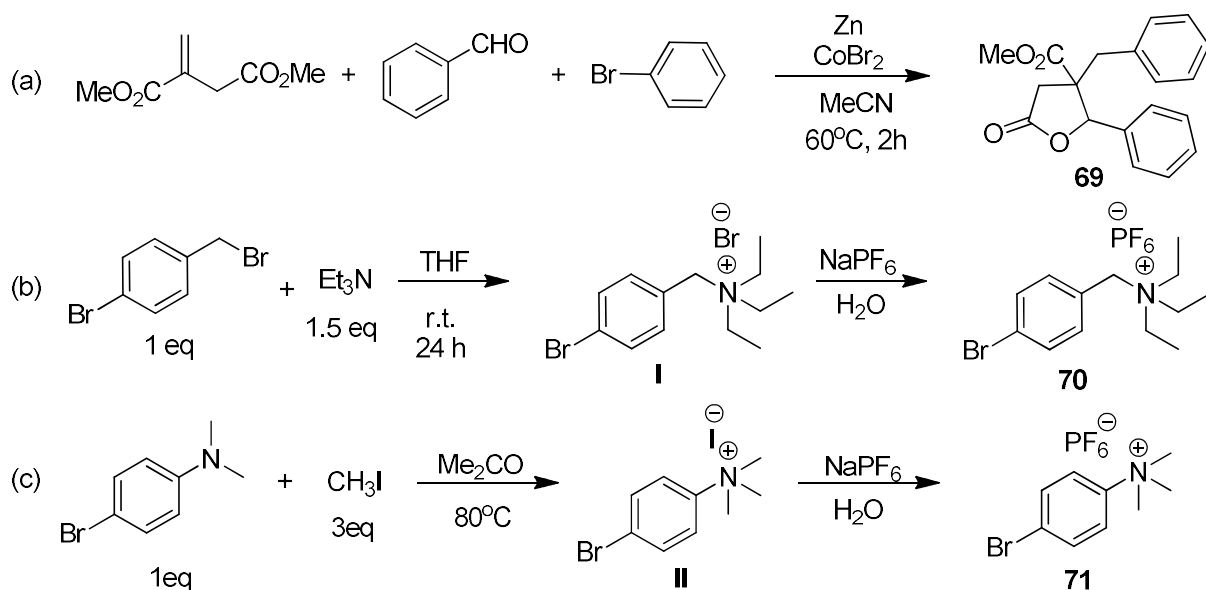
Figura 22. Variação do número de publicações por ano (a) e da média dos fatores de impacto das publicações de nosso grupo de pesquisa (b). No gráfico (b) foram considerados apenas artigos fruto de orientações de alunos de iniciação científica e/ou de pós-graduação.

No final de 2016, após o término da vigência do projeto de auxílio regular da FAPESP, entendemos que era chegado o momento de realizar um estágio sabático. Mais que uma necessidade diante do quadro atual de internacionalização da USP, realizar um estágio sabático representava um desafio profissional que há tempos pretendíamos enfrentar. A escolha do projeto a ser desenvolvido deveria combinar síntese orgânica e espectrometria de massas, atendendo assim às expectativas do departamento (dada a nossa inserção no LSO) e aproveitando a experiência com espectrometria de massas. A aplicação de espectrometria de massas em estudos de mecanismos de reações orgânicas atendia perfeitamente a esses dois quesitos. Entramos então em contato com o prof. J. Scott McIndoe, da University of Victoria, British Columbia, Canadá,

⁴ Na elaboração deste gráfico, foram considerados os anos que aparecem nas publicações no site Web of Science®.

pesquisador com longa experiência na utilização de espectrometria de massas em estudos de mecanismos de reações orgânicas, especialmente de reações catalíticas e de organometálicos. No projeto apresentado ao prof. McIndoe e que posteriormente foi financiado pela FAPESP (Proc. 2016/03036-4), foi proposta a investigação do mecanismo da reação multicomponentes *one-pot* que havia sido utilizada durante o estágio de pós-doutorado na FFCLRP-USP (2011-2012) para a síntese de γ -lactonas (**Esquema 20a**, p. 83). Esta reação é conduzida em acetonitrila (um bom solvente para ESI-MS), completa-se em menos de 2 h (condição indispensável para o monitoramento *on-line* da reação por PSI-ESI-MS) e emprega reagentes que possuem grupos carbonilas (itaconato de dimetila e aldeído aromático) que podem ser úteis para o monitoramento da reação por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Além disso, Le Floch e colaboradores já haviam apresentado uma proposta mecanística para esta reação [79], que poderia ser confirmada, refutada ou modificada conforme os resultados obtidos do projeto proposto.

O estágio sabático foi realizado entre agosto de 2018 a junho de 2019. No projeto desenvolvido nos laboratórios do prof. McIndoe, vários desafios foram encontrados na tentativa de se utilizar a técnica PSI-ESI-MS no monitoramento *on-line* da reação multicomponentes em estudo. O principal deles foi o fato de tratar-se de uma catálise heterogênea. O grupo do prof. McIndoe possui grande experiência no estudo de catálise homogênea, mas até então nenhuma catálise heterogênea havia sido investigada em seu laboratório, principalmente em virtude das dificuldades em se manter o spray uniforme e aos problemas relacionados ao entupimento da tubagem PEEK e do capilar da fonte ESI. Outro problema foi a necessidade de se utilizar reagentes etiquetados por carga (do inglês *charge-tagged compounds*) **69** e **70** (**Esquema 20b** e **20c**, respectivamente, p. 83). Apesar de serem extremamente úteis como estratégia para a detecção de intermediários, as intensidades dos sinais desses reagentes etiquetados no espectro de ESI suprimiram os sinais de espécies mecanisticamente importantes.



Esquema 20. Síntese da γ -lactona **69** (a) e dos reagentes (haletos arílicos) etiquetados **70** (b) e **71** (c).

A reação multicomponente (MCR) foi inicialmente monitorada *off-line* nas mesmas condições reportadas na literatura (estequiometria, concentrações, ordem de adição e temperatura) [79], exceto pela adição dos reagentes etiquetados **70** e **71** (0,2 mmol) como co-reagentes. Aliquotas foram retiradas da mistura reacional a cada 5, 15 ou 60 min durante 6h, sendo filtradas, diluídas e introduzidas diretamente na fonte ESI por meio de uma seringa. Conforme pode ser observado nos espectros de massas da **Figura 23** (p. 85), os picos correspondentes às γ -lactonas etiquetadas em m/z 424 (para o haleto etiquetado **70**) e m/z 368 (para o haleto etiquetado **71**) foram observados a partir de 10 min de reação. Os picos de m/z 136 e m/z 192 foram identificados como sendo derivados dos haletos **70** e **71**, respectivamente. No entanto, picos correspondentes a possíveis intermediários de reação não foram observados ou não puderam ser distinguidos dos ruídos.

Como não havia na literatura nenhum relato sobre a formação de espécies similares às de m/z 136 e m/z 192 para esta MCR, a técnica PSI-ESI-MS foi utilizada para monitorar as

mudanças na composição da mistura reacional nas primeiras 2 h de reação. Após a realização de uma série de experimentos alterando-se vários parâmetros experimentais, inclusive a ordem de adição dos reagentes, foi possível associar cerca de cinquenta picos do espectro de massas extraído de cada experimento de PSI-ESI-MS a complexos de cobalto(II) com acetonitrila, itaconato de dimetila e benzaldeído. A formação desses complexos, somada à já mencionada intensidade dos sinais dos haletos de arila etiquetados, impossibilitou a detecção de outras espécies importantes para a compreensão do mecanismo. Por outro lado, os experimentos de PSI-ESI-MS permitiram identificar os picos de m/z 192 e m/z 136 como sendo produtos de hidrodehalogenação dos compostos etiquetados **70** (m/z 270) e **71** (m/z 214), promovida por cobalto(II). Conforme pode ser visualizado na **Figura 24** (p. 86), o decréscimo nas intensidades de m/z 270 e m/z 214 é acompanhado por um aumento nas intensidades de m/z 192 e m/z 136 logo após a adição de CoBr_2 (**Figura 24**, p. 86). Apesar de a hidrodesalogenação promovida por cobalto(II) já ter sido reportada na literatura [124], este foi o primeiro relato de sua ocorrência como reação paralela para esta MCR. Estes resultados reforçaram a necessidade de se utilizar o haleto de arila em excesso nesta reação, além de acrescentar uma peça importante no mecanismo global desta reação que não havia sido considerada em estudos anteriores (**Esquema 21**, p. 87).

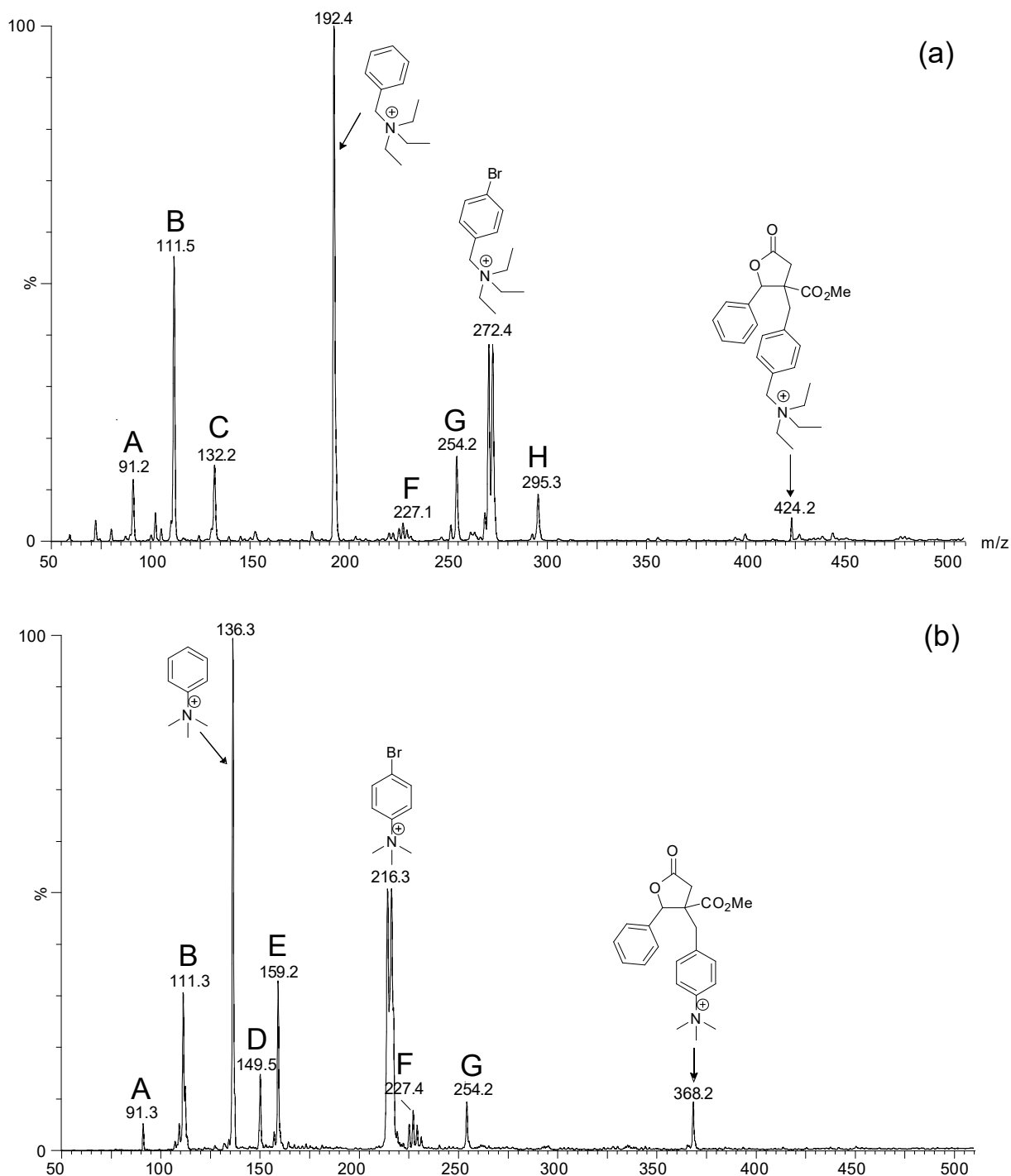


Figura 23. Espectro de ESI-MS da mistura reacional em $t = 10$ min em duas condições reacionais usando os haletos etiquetados **70** (a) e **71** (b) como co-reagentes. **A:** $[\text{Co}(\text{MeCN})_3]^{2+}$; **B:** $[\text{Co}(\text{MeCN})_4]^{2+}$; **C:** $[\text{Co}(\text{MeCN})_6]^{2+}$; **D:** $[\text{Co}(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_4)(\text{MeCN})]^{2+}$; **E:** $[\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_4 + \text{H}]^+$; **F:** $[\text{ZnBr}(\text{MeCN})_3]^+$; **G:** $[\text{Co}(\text{CF}_3\text{CO}_2)(\text{MeCN})_2]^+$; **H:** $\text{Co}(\text{CF}_3\text{CO}_2)(\text{MeCN})_3^+$.

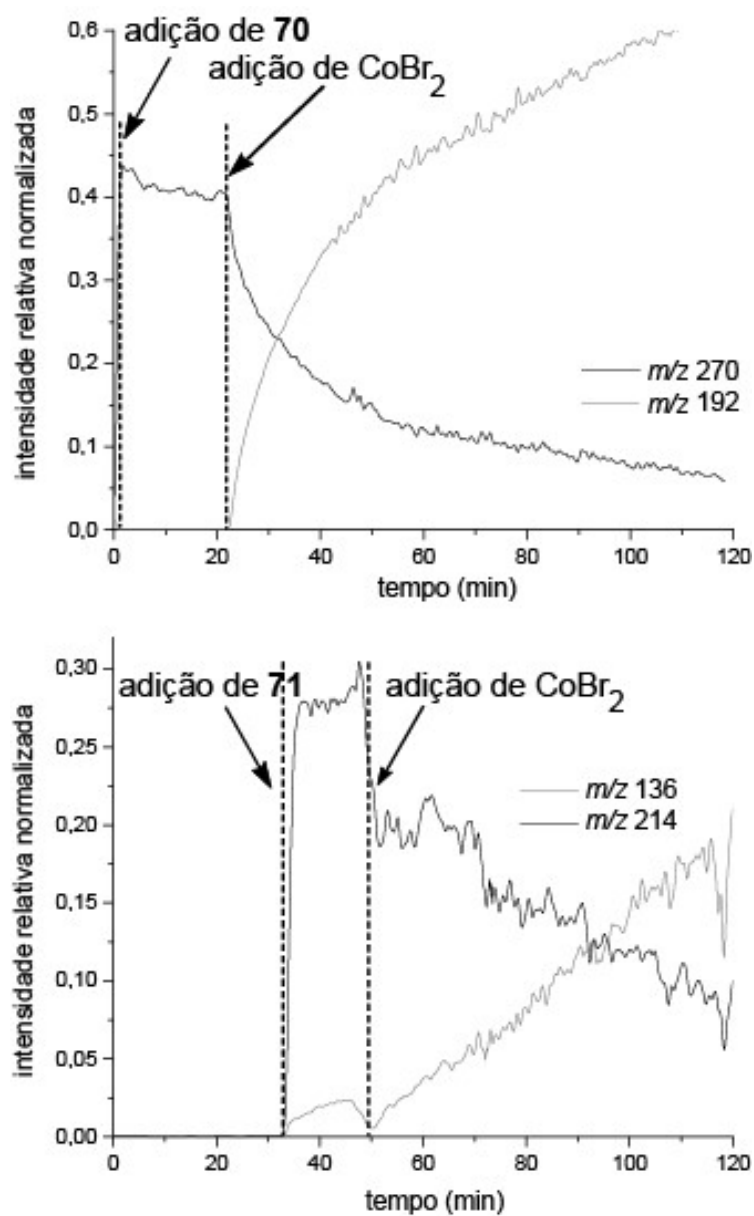
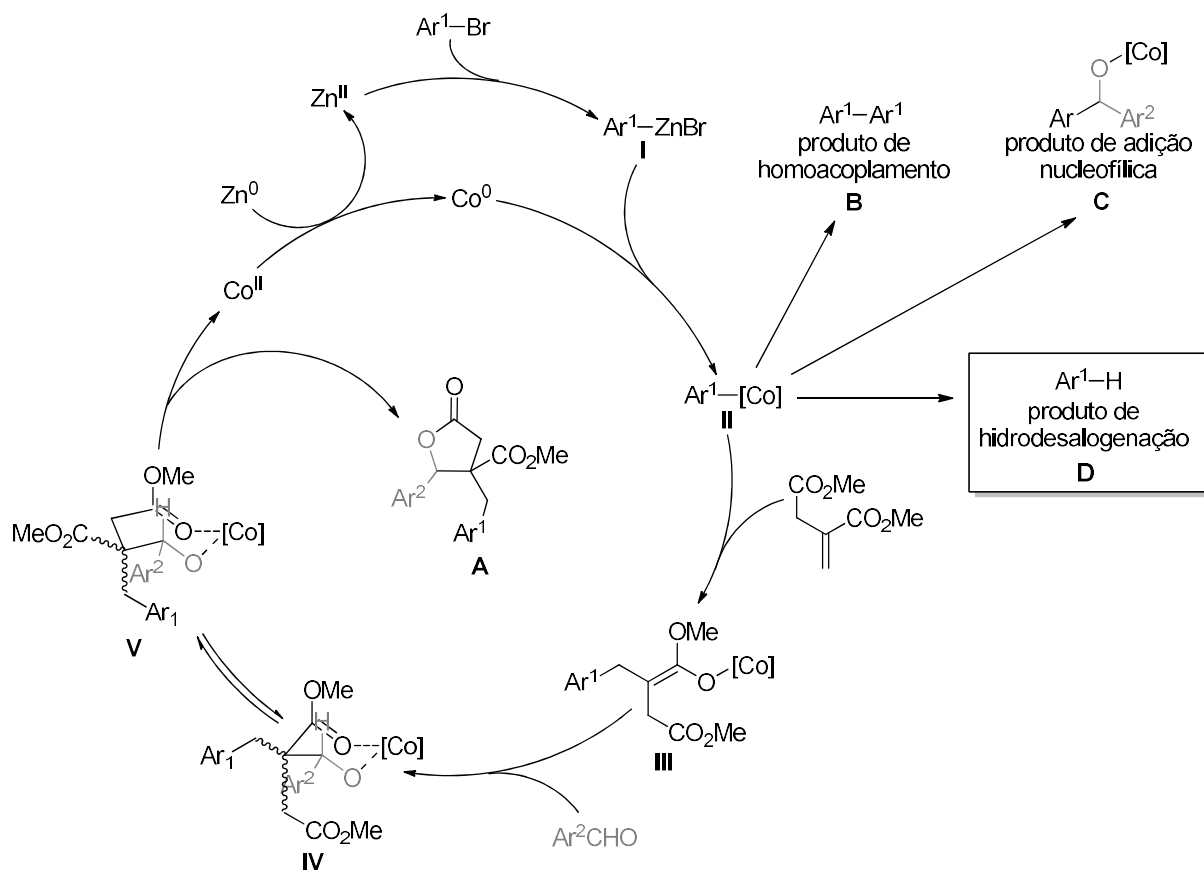


Figura 24. Mudanças nas intensidades relativas normalizadas de m/z 270 e m/z 192 (a) e m/z 214 e 136 (b) com o tempo, monitoradas por PSI-ESI-MS.



Esquema 21. Visão geral dos produtos (A) e subprodutos (B e C) da MCR promovida por cobalto(II), adicionada da reação lateral de hidrodesalogenação (D).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados compilados neste texto revelaram o potencial esquistossomicida de vários óleos essenciais, com especial destaque para o óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (erva de Santa Maria). Apesar de o nosso grupo não ter sido pioneiro na investigação da atividade esquistossomicida de óleos essenciais, um número limitado de trabalhos sobre o assunto estava disponível na literatura quando os primeiros artigos de nosso grupo foram publicados. Desta forma, nossa pesquisa neste campo contribuiu para chamar a atenção da comunidade científica para uma atividade biológica de óleos essenciais até então pouco explorada.

Dentre os compostos sintéticos descritos nesta obra, os curcuminoides monocetônicos **65** (curcumina A) e **66** foram mais ativos frente a *Streptococcus mutans* que a curcumina, cuja atividade antimicrobiana tem sido bastante explorada na literatura. Esses resultados, somados àqueles obtidos dos ensaios esquistossomicidas – apesar de não discutidos neste texto, ensaios esquistossomicidas *in vivo* com alguns MKCs estão em andamento – e à relativa simplicidade da metodologia de síntese utilizada indicam que esta classe de compostos pode ser uma alternativa viável à curcumina.

Os monoterpenos geraniol e citronelol, identificados como sendo os responsáveis pelos efeitos repelente, deterrente e fumigante do óleo essencial do gerânio (*Pelargonium graveolens*), bem como algumas neolignananas diidrobzofurânicas sintéticas, foram mais efetivos contra a mosca branca (*Bemisia tabaci* biotipo B) que os inseticidas comerciais utilizados no manejo desta praga. Estudos mais aprofundados sobre a aplicação destes compostos no manejo da mosca branca deverão ser iniciados em breve.

Além de contribuir para com o estabelecimento de metodologias e estratégias para a identificação de compostos orgânicos diretamente de extratos e matrizes biológicas, resultando em economia de tempo e de material, os trabalhos na área de espectrometria de massas realizados compilados nesta obra levaram a um melhor entendimento da fragmentação de diversas classes de compostos ionizados por eletrospray. A combinação entre dados de massas acuradas,

4. Considerações finais

experimentos de MSⁿ, experimentos de troca com deutério e dados termoquímicos estimados por Química Computacional provou-se bastante eficaz na realização desses estudos. O potencial da espectrometria de massas para a investigação mecanística de diferentes reações deverá ser também explorada por nosso grupo de pesquisa nos próximos anos.

5. REFERÊNCIAS

-
- [1] Griffiths, I. W. J. J. Thomson — the centenary of his discovery of the electron and of his invention of mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 2-16.
- [2] Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*, 4th. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007.
- [3] Adams, R. *Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4th. Carol Stream, IL: Allured Publishing, 2007.
- [4] Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Óleos essenciais: constituintes químicos e atividades biológicas. In: Furtado, N. A. J. C.; Veneziani, R. C. S.; Ambrósio, S. R. (eds.). *Farmacognosia*, São Paulo, SP: Atheneu, 2017.
- [5] McLafferty, F. W. Mass spectrometry across sciences. *PNAS* **2008**, *105*, 18088-18089.
- [6] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- [7] Dias, H. J.; Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. In: Prasain, J. (ed.) *Tandem mass spectrometry: applications and principles*, Switzerland: Intech Open, **2012**.
- [8] Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Anal. Chem.* **2012**, *85*, 2-9.
- [9] Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Electrospray ionization mass spectrometry: chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 287-292.
- [10] Crotti, A. E. M. Estudo da fragmentação de substâncias orgânicas de baixo peso molecular ionizadas por *electrospray* empregando espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas. Tese de doutorado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2005.
-

-
- [11] Vessecchi, R.; Galembeck, S. E.; Lopes, N. P.; Nascimento, P. G. B. D.; Crotti, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. *Quím. Nova* **2008**, *31*, 840-853.
- [12] Kind, T.; Fiehn, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal. Rev.* **2010**, *2*, 23-60.
- [13] Sleno, L.; Volmer, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1091-1112.
- [14] Cooks, G. Special feature: Historical. Collision-induced dissociation: Readings and commentary. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1215-1221.
- [15] McLuckey, S. A. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, *3*, 599-614.
- [16] Ernst, M.; Silva, D. B.; Silva, R. R.; Vêncio, R. Z. N.; Lopes, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 784-806.
- [17] Begou, O.; Gika, H. G.; Wilson, J. D.; Theodoridis, G. Hyphenated MS-based targeted approaches in metabolomics. *Analyst* **2017**, *142*, 3079-3100.
- [18] Dominguez, I.; Frenich, A. G.; Romero-Gonzalez, R. Mass spectrometry approaches to ensure food safety. *Anal. Methods* **2020**, *12*, 1148-1162.
- [19] Camperi, J.; Pichon, V.; Delaunay, N. Separation methods hyphenated to mass spectrometry for the characterization of the protein glycosylation at the intact level. *J. Pharm. Biom. Anal.* **2020**, *178*, 112921. DOI: 112910.111016/j.jpba.112019.112921.
- [20] Feng, Z.; Ding, C. Q.; Li, W. H.; Wang, D. C.; Cui, D. Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. *Food Chem.* **2020**, *310*, 125914. DOI: 125910.121016/j.foodchem.122019.125914.

-
- [21] Gaunitz, F.; Kieliba, T.; Thevis, M.; Mercer-Chalmers-Bender, K. Solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the qualitative analysis of 61 synthetic cannabinoid metabolites in urine. *Drug. Test. Anal.* **2020**, *12*, 27-40.
- [22] Cirigliano, A. M.; Cabrera, G. M. Post-column in-source derivatisation in LC-MS: a tool for natural products characterisation and metabolomics. *Phytochem. Anal.* **2020**, *31*, DOI: 10.1002/pca.2926.
- [23] Herrera-Lopez, S. H., M.D.; García-Calvo, E.; Fernández-Alba, A.R.; Ulaszewska, M.M. Simultaneous screening of targeted and nontargeted contaminants using an LC-QTOF-MS system and automated MS/MS library searching. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 878–893.
- [24] Oberacher, H.; Whitley, G.; Bernd, B. Evaluation of the sensitivity of the 'Wiley registry of tandem mass spectral data, MSforID' with MS/MS data of the 'NIST/NIH/EPA mass spectral library' *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 487-496.
- [25] Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 432-455.
- [26] Hammes, G. G. *Principles of Chemical Kinetics*, New York: Academic Press, 1978.
- [27] Smith, K. M. *Understanding Mass Spectra - A Basic Approach*, 2nd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.
- [28] McLafferty, F. W.; Turecek, F. *Interpretation of Mass Spectra*, 4° Ed. Sausalito, EUA: University Science Books, 1993.
- [29] Nobes, R. H.; Radom, L. Rationalization of scrambling processes. *Org. Mass Spectrom.* **1989**, *21*, 407-409.

-
- [30] Range, K.; Riccardi, D.; Cui, Q.; Elstner, M.; York, D. M. Benchmark calculations of proton affinities and gas-phase basicities of molecules important in the study of biological phosphoryl transfer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3070-3079.
- [31] Isaacs, N. S. *Physical organic chemistry*, New York: Longmann Scientific & Technical, 1995.
- [32] Bagno, A.; Scorrano, G. Selectivity in proton transfer, hydrogen bonding, and solvation. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 609-616.
- [33] Stewart, R. *The Proton: Application to Organic Chemistry*, Orlando: Academic Press, 1985.
- [34] Santos, L. S.; Knaack, L.; Metzger, J. O. Investigation of chemical reactions in solution using API-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *246*, 84-104.
- [35] Schroder, D. Applications of electrospray ionization mass spectrometry in mechanistic studies and catalysis research. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1521-1532.
- [36] Rodrigues, T. S.; Silva, V. H. C.; Lalli, P. M.; de Oliveira, H. C. B.; da Silva, W. A.; Coelho, F.; Eberlin, M. N.; Neto, B. A. D. Morita-Baylis-Hillman reaction: ESI-MS(/MS) investigation with charge tags and ionic liquid effect origin revealed by DFT calculations. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5239-5248.
- [37] Aldhart, C.; Chen, P. Mechanism and activity of ruthenium olefin metathesis catalysts: the role of ligands and substrates from a theoretical perspective. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3496-3510.
- [38] Fiebig, L.; Schmalz, H.-G.; Schäfer, M. Heck coupling in the gas phase: examination of the reaction mechanism by ion/molecule reactions and mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *308*, 307-310.
- [39] Amarante, G. W.; Milagre, H. M. S.; Vaz, B. G.; Ferreira, B. R. V.; Eberlin, M. N.; Coelho, F. Dualistic nature of the mechanism of the Morita-Baylis-Hillman reaction probed by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3031-3037.

-
- [40] Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Bernd, A. B.; Russowsky, D. Studies on the Eschenmoser coupling reaction and insights on its mechanism. Application in the synthesis of Norallosedamine and other alkaloids. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2484-2496.
- [41] De Souza, R. O. M. A.; da Penha, E. T.; Milagre, H. M. S.; Garden, S. J.; Esteves, P. M.; Eberlin, M. N.; Antunes, O. A. C. The three-component Biginelli reaction: A combined experimental and theoretical mechanistic investigation. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9799-9804.
- [42] Yunker, L. P. E.; Ahmadi, Z.; Logan, J. R.; Wu, W.; Li, T.; Martindale, A.; Oliver, A. G.; McIndoe, J. S. Real-time mass spectrometry investigations into the mechanism of the Suzuki-Miyaura reaction. *Organometallics* **2018**, *37*, 4297-4308.
- [43] Fabris, D. Mass spectrometric approaches for the investigation of dynamic processes in condensed phase. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 30-54.
- [44] Santos, L. S. *Reactive intermediates: MS investigations in solution*, Weinheim: Wiley-VCH, 2010.
- [45] Vikse, K. L.; Ahmadi, Z.; Luo, J.; van der Wal, N.; Daze, K.; Taylor, N.; McIndoe, J. S. Pressurized sample infusion: An easily calibrated, low volume pumping system for ESI-MS analysis of reactions. *Int J of Mass Spectr* **2012**, *323-324*, 8-13.
- [46] Vikse, K. L.; Henderson, M. A.; Oliver, A. G.; McIndoe, J. S. Direct observation of key intermediates by negative-ion electrospray ionisation mass spectrometry in palladium-catalysed cross-coupling. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7412-7414.
- [47] Yunker, L. P. E.; Stoddard, R. L.; McIndoe, J. S. Practical approaches to the ESI-MS analysis of catalytic reactions. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 1-8.
- [48] Schade, M. A.; Fleckenstein, J. E.; Knochel, P.; Koszinowski, K. Charged tags as probes for analyzing organometallic intermediates and monitoring cross-coupling reactions by electrospray-ionization mass spectrometry. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6848-6857.
- [49] Luo, J.; Oliver, A. G.; Scott McIndoe, J. A detailed kinetic analysis of rhodium-catalyzed alkyne hydrogenation. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 11312-11318.
-

-
- [50] Ahmadi, Z.; McIndoe, J. S. A mechanistic investigation of hydrodehalogenation using ESI-MS. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11488-11490.
- [51] Leitão, S. G.; Kaplan, M. A. C.; Delle Monache, F.; Akihisa, T.; Tamura, T. Sterols and sterol glucosides from two *Aegiphila* species. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2813-2817.
- [52] Gibbons, S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 263-267.
- [53] Rios, J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 80-84.
- [54] Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M. S.; Hussain, H.; Lee, Y. S.; Riaz, N.; Jabbar, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 238-254.
- [55] Tokuyama, R.; Takahashi, Y.; Tomita, Y.; Tsobouchi, M.; Yoshida, T.; Iwasaki, N.; Kado, N.; Okezaki, E.; Nagata, O. Structure-activity relationship (SAE) studies on oxazolidinone antibacterial agents. 2. Relationship between lipophilicity and antibacterial activity in 5-thiocarbonyl oxazolidinones. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 353-360.
- [56] Crotti, A. E. M.; Cunha, W. R.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. Sesquiterpene lactones from *Minasia alpestris*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 677-680.
- [57] Keles, L. C.; Melo, N. I.; Aguiar, G. P.; Wakabayashi, K. A. L.; Carvalho, C. E.; Cunha, W. R.; Crotti, A. E. M.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Lychnophorinae (Asteraceae): a survey of its chemical constituents and biological activities. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2245-2260.
- [58] Furtado, N. A. J. C.; Vessecchi, R.; Tomaz, J. C.; Galembeck, S. E.; Bastos, J. K.; Lopes, N. P.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1279-1286.
- [59] Aguiar, G. P.; Wakabayashi, K. A. L.; Luz, G. F.; Oliveira, V. B.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of plumeran indole alkaloids from

-
- Aspidosperma spruceanum by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **2010**, *24*, 295-308.
- [60] Caputo, L.; Campos, M. I.; Dias, H. J.; Crotti, A. E. M.; Fajardo, J.; Vanelli, C.; Presto, A.; Alves, M. S.; Aeerstrup, F.; Paula, A. P. C.; da Silva-filho, A. A.; Aeerstrup, B.; Pereira Júnior, O.; Correa, J. Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *80*, Article ID 106177. DOI: 106110.101016/j.intimp.102019.106177.
- [61] Cabral, R. C. S.; Alves, C. C. F.; Batista, H. R. F.; Sousa, W. C.; Abrahão, I. S.; Crotti, A. E. M.; Santiago, M. B.; Martins, C. H. G.; Miranda, M. L. D. Chemical composition of essential oils from different parts of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand and their in vitro antibacterial activity. *Nat. Prod. Res.* **2020**, (aceito para publicação), DOI: 10.1080/14786419.14782018.11536659.
- [62] Moreira, R. R. D.; dos Santos, A. G.; Carvalho, F. A.; Perego, C. H.; Crevelin, E. J.; Crotti, A. E. M.; Cogo, J.; Cardoso, M. L. C.; Nakamura, C. V. Antileishmanial activity of the essential oils of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* on *Leishmania amazonensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **2019**, *61*, e33, DOI: 10.1590/S1678-9946201961033.
- [63] Karut, K.; Castle, S. J.; Karust, S. T.; Karaca, M. M. Secondary endosymbiont diversity of *Bemisia tabaci* and its parasitoids. *Infect. Gen. Evol.* **2020**, *78*, Article number 104104, DOI: 104110.101016/j.meegid.102019.104104.
- [64] Belay, D. K.; Huckaba, R. M.; Ramirez, A. M.; Rodrigues, J. C. V.; Foster, J. E. Insecticidal control of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) transmitting Carlavirus on soybeans and detection of the virus in alternate hosts. *Crop Prot.* **2012**, *35*, 53-57.
- [65] Basit, M. Status of insecticide resistance in *Bemisia tabaci*: resistance, cross-resistance, stability of resistance, genetics and fitness costs. *Phytoparasitica* **2019**, *47*, 207-225.
-

-
- [66] Vieira, S. S.; Boff, M. I. C.; Bueno, A. F.; Gobbi, A. L.; Lobo, R. V.; Bueno, R. C. O. F. Effects of insecticides used in *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotype B control and their selectivity to natural enemies in soybean crop. *Semina Cienc. Agr.* **2012**, *33*, 1809-1818.
- [67] Chen, J. C.; Wang, Z. H.; Cao, L. J.; Gong, Y. J.; Hoffmann, A. A.; Wei, S. J. Toxicity of seven insecticides to different developmental stages of the whitefly *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae) in multiple field populations of China. *Ecotoxicology* **2018**, *27*, 742-751.
- [68] Gazim, Z. C.; Amorim, A. C.; Hovell, A. M.; Rezende, C. M.; Nascimento, I. A.; Ferreira, G. A.; Cortez, D. A. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules* **2010**, *15*, 5509-5524.
- [69] Vlietinck, A. J.; Van Hoof, L.; Totté, J.; Lasure, A.; Vanden Berghe, D.; Rwangabo, P. C.; Mvukiyumwami, J. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *46*, 31-47.
- [70] Melo, N. I.; Carvalho, C. E.; Fracarolli, L.; Cunha, W. R.; Veneziani, R. C. S.; Martins, C. H. G.; Crotti, A. E. M. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 519-525.
- [71] Baldin, E. L. L.; Crotti, A. E. M.; Wakabayashi, K. A. L.; Silva, J. P. G. F.; Aguiar, G. P.; Souza, E. S.; Veneziani, R. C. S.; Groppo, M. Plant-derived essential oils affecting settlement and oviposition of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato. *J. Pest Sci.* **2013**, *86*, 301-308.
- [72] Baldin, E. L. L.; Aguiar, G. P.; Fanela, T. L. M.; Soares, M. C. E.; Groppo, M.; Crotti, A. E. M. Bioactivity of *Pelargonium graveolens* essential oil and related monoterpenoids against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *J. Pest Sci.* **2015**, *88*, 191-199.

-
- [73] Baldin, E. L. L.; Fanela, T. L. M.; Pannuti, L. E. R.; Kato, M. J.; Takeara, R.; Crotti, A. E. M. Botanical extracts: alternative control for silverleaf whitefly management in tomato. *Hort. Bras.* **2015**, *33*, 59-65.
- [74] Fanela, T. L. M.; Baldin, E. L. L.; Pannuti, L. E. R.; Cruz, P. L.; Crotti, A. E. M.; Takeara, R.; Kato, M. J. Lethal and inhibitory activities of plant-derived essential oils against *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype B in tomato. *Neotrop. Entomol* **2016**, *45*, 201-210.
- [75] Gillij, Y. G.; Gleiser, R. M.; Zygadlo, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 2507-2515.
- [76] Jiang, Z.; Akhtar, Y.; Bradbury, R.; Zhang, X.; Isman, M. B. Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of the major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Agr. Food Chem* **2009**, *57*, 4833-4837.
- [77] Akhtar, Y.; Pages, E.; Stevens, A.; Bradbury, R.; Camara, C.; Isman, M. B. Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. *Physiol. Entomol.* **2012**, *37*, 81-91.
- [78] Sohrabi, F.; Shishehbor, P.; Saber, M.; Mosaddegh, M. S. Lethal and sublethal effects of buprofezin and imidacloprid on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Crop Prot.* **2011**, *30*, 1190-1195.
- [79] Le Floch, C.; Le Gall, E.; Léonel, E.; Koubaa, J.; Martens, T.; Retailleau, P. A cobalt-catalyzed multicomponent approach to novel 2,3-di and 2,2,3-trisubstituted 3-methoxycarbonyl- γ -butyrolactones. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5279-5286.
- [80] Pinato-Botelho, M. F.; Crotti, A. E. M.; Souza, J. M.; Magalhães, L. G.; Donate, P. M. Microwave-assisted synthesis and antileishmanial activity of 3-methoxycarbonyl- γ -butyrolactone derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 1331-1337.

-
- [81] Wang, P.; Bartlett, M. G. Collision-induced dissociation mass spectra of cocaine, and its metabolites and pyrolysis products. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 961-967.
- [82] Crevelin, E. J.; Crotti, A. E. M.; Zucchi, T. D.; Melo, I. S.; Moraes, L. A. B. Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate mass electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 1117-1126.
- [83] Crevelin, E. J.; Salami, F. H.; Alves, M. N. R.; De Martinis, B. S.; Crotti, A. E. M.; Moraes, L. A. B. Direct analysis of amphetamine stimulants in a whole urine sample by atmospheric solids analysis probe tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 944-947.
- [84] Crevelin, E. J.; Possato, B.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; Crotti, A. E. M. Precursor ion scan mode-based strategy for fast screening of polyether ionophores by copper-induced gas-phase radical fragmentation reactions. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 3929-3936.
- [85] Lopes, N. P.; Stark, C. B.; Staunton, J.; Gates, P. J. Evidence for gas-phase redox chemistry inducing novel fragmentation in a complex natural product. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 358-363.
- [86] Maeda, S.; Masuda, H.; Tokoroyama, T. Studies on the preparation of bioactive lignans by oxidative coupling reaction. V. Oxidative coupling reaction of methyl (*E*)-3-(2-Hydroxyphenyl)propenoate derivatives and lipid peroxidation inhibitory effects of the produced lignans. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 935-940.
- [87] Orlandi, M.; Rindone, B.; Molteni, G.; Rummakko, P.; Brunow, G. Asymmetric biomimetic oxidations of phenols: the mechanism of the diastereo- and enantioselective synthesis of dehydrodiconiferyl ferulate (DDF) and dehydrodiconiferyl alcohol (DDA). *Tetrahedron* **2001**, *57*, 371-378.

-
- [88] Pelter, A.; Ward, R. S.; Venkateswarlu, R.; Kamakshi, C.; Moinuddin, S. G. A.; Subhash, P. V.; Hursthouse, M. B.; Coles, S. J.; Light, M. E. Dimerisations of cinnamates using acidic and acidic/oxidative conditions. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7755-7763.
- [89] Pieters, L.; De Bruyne, T.; Van Poel, B.; Vingerhoets, R.; Tott^Å, J.; Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A. In vivo wound healing activity of Dragon's Blood (*Croton* spp.), a traditional South American drug, and its constituents. *Phytomedicine* **1995**, *2*, 17-22.
- [90] Pieters, L.; Van Dyck, S.; Gao, M.; Bai, R. L.; Hamel, E.; Vlietinck, A.; Lemièrre, G. Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5475-5481.
- [91] Daquino, C.; Rescifina, A.; Spatafora, C.; Tringali, C. Biomimetic Synthesis of Natural and “Unnatural” Lignans by Oxidative Coupling of Caffeic Esters. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 6289-6300.
- [92] Dias, H. J.; Aquaroni, N. A. S.; Pietro, R. C. L. R.; Crotti, A. E. M. Antifungal activity of dihydrobenzofuran neolignans. *MOJ Proteomics Bioinform.* **2017**, *6*, 00201. DOI: 00210.15406/mojpb.02017.00206.00201.
- [93] Pereira, A. C.; Magalhães, L. G.; Gonçalves, U. O.; Luz, P. P.; Moraes, A. C. G.; Rodrigues, V.; da Matta-Guedes, P. M.; da Silva Filho, A. A.; Cunha, W. R.; Bastos, J. K.; Nanayakkara, N. P. D.; Silva, M. L. A. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (–)- and (+)-enantiomers. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1424-1440.
- [94] Bernard, C. B.; Krishnamurty, D.; Chauret, D.; Durst, T.; Philogène, B. J. R.; Sánchez-Vindas, C.; Hasbun, C.; Poveda, L.; San Roman, L.; Arnason, J. T. Insecticidal defenses of Piperaceae from Neotropics. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 801-814.
- [95] Chauret, D. C.; Bernard, C. B.; Arnason, J. T.; Durst, T.; Krishnamurty, H. G.; Sanchez-Vindas, P.; Moreno, N.; San Roman, L.; Poveda, L. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *J. Agr. Food Chem* **1996**, *59*, 152-155.
-

-
- [96] Baldin, E. L. L.; Dias, H. J.; Souza, C. M.; Soares, M. C. E.; Grundmann, C. O.; Santos, T. L. B.; Crotti, A. E. M. Insecticidal and inhibitory effects of dihydrobenzofuran neolignans on *Bemisia tabaci*. *J. Pest Sci.* **2019**, *92*, 861-869.
- [97] Fukui, M. J.; Dias, H. J.; Severiano, M. E.; Souza, M. G. M.; Oliveira, P. F.; Ambrósio, S. R.; Martins, C. H. G.; Tavares, D. C.; Crotti, A. E. M. Antimicrobial and cytotoxic activity of dihydrobenzofuran neolignans. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 1836-1839.
- [98] Dias, H. J.; Patrocínio, A. B.; Pagotti, M. C.; Fukui, M. J.; Rodrigues, V.; Magalhães, L. G.; Crotti, A. E. M. Schistosomicidal activity of dihydrobenzofuran neolignans. *Chem. Biodiv.* **2018**, *15*, e1800134, DOI: 1800110.1801002/cbdv.201800134.
- [99] Hu, N.; Tu, Y. P.; Liu, Y.; Jiang, K.; Pan, Y. Dissociative protonation and proton transfers: fragmentation of a α,β -unsaturated aromatic ketones in mass spectrometry. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3369-3376.
- [100] Risoli, A.; Cheng, J. B. Y.; Verkerk, U. H.; Zhao, J.; Ragno, G.; Hopkinson, A. C.; Siu, K. W. Gas-phase fragmentation of protonated benzodiazepines. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2273-2281.
- [101] Givens, E. N.; Alexakos, L. G.; Venuto, P. G. Mass spectra of benzofurans. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 2407-2415.
- [102] Marini, E.; Di Giulio, M.; Magi, G.; Di Lodovico, S.; Cimarelli, M. E.; Brenciani, A.; Nostro, A.; Cellini, L.; Facinelli, B. Curcumin, an antibiotic resistance breaker against amultiresistant clinical isolate of *Mycobacterium abscessus*. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 488-495.
- [103] Anstrom, D.; Zhou, X.; Kalk, C. N.; Song, B.; Lan, Q. Mosquitocidal properties of natural product compounds isolated from Chinese herbs and synthetic analogs of curcumin. *J. Med. Entomol.* **2012**, *49*, 350-355.
- [104] Ruby, A. J.; Kuttan, G.; Babu, K. D.; Rajasekharan, K. N.; Kuttan, R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* **1995**, *94*, 79-83.
-

-
- [105] Jung, E.; Noh, J.; Kang, C.; Yoo, D.; Song, C.; Lee, D. Ultrasound imaging and on-demand therapy of peripheral arterial diseases using H₂O₂-Activated bubble generating anti-inflammatory polymer particles. *Biomaterials* **2018**, *179*, 175-185.
- [106] Teow, S. Y.; Liew, K.; B., A. A. S.; Khoo, A. S.; Peh, S. C. Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: a brief review. *J. Trop. Med.* **2016**, *2016*, 2853045, DOI: 2853010.2851155/2852016/2853045.
- [107] Stewart, T. M.; Dunworth, M.; Lui, Y. J.; Guiardiello, F. M.; Woster, P. M.; Casero Jr, R. A. Curcumin mediates polyamine metabolism and sensitizes gastrointestinal cancer cells to antitumor polyamine-targeted therapies. *PLoS One* **2018**, *13*, e0202677, DOI: 0202610.0201371/journal.pone.0202677.
- [108] Kuttan, R.; Bhanumathy, P.; Nirmala, K.; George, M. C. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett.* **1985**, *29*, 197-202.
- [109] Nagajyothi, F. Z., D.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 2491-2499.
- [110] Hussein, A.; Rashed, S.; Hayawan, I.; El-Sayed, R.; Ali, H. Evaluation of the anti-schistosomal effects of turmeric (*Curcuma longa*) versus praziquantel in *Schistosoma mansoni* Infected mice. *Iran J. Parasitol.* **2017**, *12*, 587-596.
- [111] Chen, Y. Q.; Xu, Q. M.; Li, X. R.; Yang, S. L.; Zhu-Ge, H. X. *In vitro* evaluation of schistosomicidal potential of curcumin against *Schistosoma japonicum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2012**, *14*, 1064-1072.
- [112] Anand, P.; Thomas, S. G.; Kunnumakkara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590-1611.
- [113] Anand, P.; Kunnumakkara, A. B.; Newman, R. A.; Aggarwal, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 807-818.
-

-
- [114] Alkhaldi, A. A.; Creek, D. J.; Ibrahim, H.; Kim, D. H.; Quashie, N. B.; Burgess, K. E.; Changtam, C.; Barrett, M. P.; Suksamrarn, A.; de Koning, H. P. Potent trypanocidal curcumin analogs bearing a monoenone linker motif act on *Trypanosoma brucei* by forming an adduct with trypanothione. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *87*, 451-464.
- [115] Qiu, X.; Du, Y.; Lou, B.; Zuo, Y.; Shao, W.; Huo, Y.; Huang, J.; Yu, Y.; Zhou, B.; Du, J.; Fu, H.; Bu, X. Synthesis and identification of new 4-arylidene curcumin analogues as potential anticancer agents targeting nuclear factor- κ B signaling pathway. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8260-8273.
- [116] Mishra, S.; Karmodiya, K.; Surolia, N.; Surolia, A. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2894-2902.
- [117] Magalhães, L. G.; Machado, C. B.; Morais, E. R.; Moreira, E. B.; Soares, C. S.; da Silva, S. H.; da Silva Filho, A. A.; Rodrigues, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol. Res.* **2009**, *104*, 1197-1201.
- [118] Hu, P.; Huang, P.; Chen, M. W. Curcumin inhibits the sortase A activity of the *Streptococcus mutans* UA159. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *171*, 396-402.
- [119] Hu, P.; Huang, P.; Chen, M. W. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. *Arch. Oral Biol.* **2013**, *58*, 1343-1348.
- [120] Song, B. C. J.; Jin, E. J.; Yoon, Y.; Choi, K. H. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31*, 1347-1352.
- [121] Franco, L. L.; Almeida, M. V.; Silva, E. L. F.; Vieira, P. P.; Pohlitz, A. M.; Vale, M. S. Synthesis and antimalarial activity of dihydroperoxides and tetraoxanes conjugated with bis(benzyl)acetone derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 790-797.
-

-
- [122] Kumari, N.; Kulkarni, A. A.; Lin, X.; McLean, C.; Ammosova, T.; Ivanov, A.; Hipolito, M.; Nekhai, S.; Nwulia, E. Inhibition of HIV-1 by curcumin A, a novel curcumin analog. *Drug. Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 5051—5060.
- [123] Cyriac, J.; Paulose, J.; George, M.; Ramesh, M.; Srinivas, R.; Giblin, D.; Gross, M. L. The role of methoxy group in the Nazarov cyclization of 1,5-*bis*-(2-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one in the gas phase and condensed phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*, 398-409.
- [124] Chen, C.; Zuo, H. P.; Chan, K. S. Catalytic hydrodebromination of aryl bromides by cobalt tetra-butyl porphyrin complexes with EtOH. *Tetrahedron* **2019**, *75*, 510-517.