

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

**Maiara Rodrigues Salvador**

**Isolamento e caracterização de metabólitos secundários das folhas de *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) e avaliação da atividade antifúngica *in vitro* frente a linhagens de *Cryptococcus* spp.**

**Governador Valadares – MG**

**2020**

**Maiara Rodrigues Salvador**

**Isolamento e caracterização de metabólitos secundários das folhas de *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) e avaliação da atividade antifúngica *in vitro* frente a linhagens de *Cryptococcus* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Karen Luise Lang

**Governador Valadares – MG**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Salvador, Maiara Rodrigues.

Isolamento e caracterização de metabólitos secundários das folhas de *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) e avaliação da atividade antifúngica in vitro frente a linhagens de *Cryptococcus* spp. / Maiara Rodrigues Salvador. -- 2020.

119 f. : il.

Orientadora: Karen Luise Lang

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2020.

1. *Xylosma prockia*. 2. *Cryptococcus* spp. 3. Atividade antifúngica. 4. Avaliação fitoquímica. I. Lang, Karen Luise, orient. II. Título.

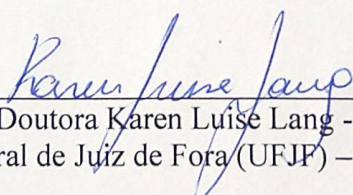
Maiara Rodrigues Salvador

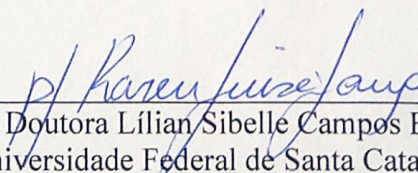
**Isolamento e caracterização de metabólitos secundários das folhas de *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) e avaliação da atividade antifúngica *in vitro* frente a linhagens de *Cryptococcus* spp.**

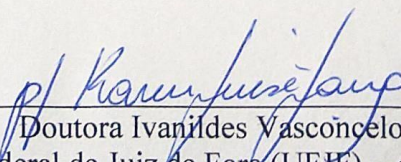
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora - *campus* Governador Valadares como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 27 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Doutora Karen Luise Lang - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – *campus* Governador Valadares

  
\_\_\_\_\_  
Doutora Lillian Sibelle Campos Bernardes  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Doutora Ivanildes Vasconcelos Rodrigues  
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – *campus* Governador Valadares

Dedico este trabalho a minha família e aos meus amigos que me inspiram, me auxiliaram, que muito me incentivaram e apoiaram durante a realização deste.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela força, saúde e sabedoria para enfrentar os obstáculos.

À Profa. Dra. Karen, orientadora e amiga, que me acompanhou desde a graduação até este momento. Agradeço pelo apoio durante todos esses anos, assim como pelos ensinamentos tanto profissionais como pessoais.

Aos professores Dra. Gabriela M. Cabrera e Dr. Gastón Siless por me receberem em seus laboratórios na Universidad de Buenos Aires, disponibilizando tempo e atenção, assim como material e suporte para realização de experimentos e análises.

À Profa. Dra. Gabriella F. Ferreira e à equipe do Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora – campus Governador Valadares, pela realização dos ensaios microbiológicos e pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Sandra Bertelli de Castro e à equipe do Laboratório Multiusuário de Imunologia e Biologia Celular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – campus Governador Valadares, pela realização dos ensaios de citotoxicidade e pelos ensinamentos.

Aos Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva, Prof. Dr. Ângelo Marcio Leite Denadai, Prof. Dr. Erly Guilherme Azevedo e à Profa. Dra. Regina Gendzelevski Kelmanne do Departamento de Farmácia da UFJF/GV por todos os ensinamentos e conselhos.

Aos servidores Joicy F. Guimarães e Oyama E. Miranda pela paciência e dedicação em responder as nossas dúvidas e solucionar os nossos problemas relacionados ao programa.

À FAPEMIG, CNPq e ProPP-UFJF pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A incidência de infecções fúngicas tem apresentado crescimento substancial nas últimas décadas devido, principalmente, ao aumento da população imunocomprometida. Espécies de *Cryptococcus* spp. são responsáveis por importantes infecções sistêmicas e apresentam estimativa global de milhões de novos casos por ano. As atuais opções terapêuticas para o tratamento da criptococose são limitadas, os tratamentos demorados e com elevada toxicidade, o que torna a procura por novos agentes terapêuticos necessária. Em estudos anteriores deste grupo de pesquisa foi observada promissora atividade antifúngica para as frações polares das folhas de *Xylosma prockia*, frente a linhagens de *Cryptococcus* spp. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar as substâncias presentes na fração acetato de etila, afim de identificar as responsáveis pela atividade antifúngica observada. A partir dessa fração foram caracterizadas 15 substâncias: derivados cafeoil-quínicos (grupo I), derivados cumaroil-glicosídeos (grupo II) e derivados cafeoil-glicosídeos (grupo III). Quatro derivados cumaroil-glicosídeos foram isolados e caracterizados através de métodos espectroscópicos, sendo três deles inéditos na literatura e um inédito para o gênero *Xylosma*. O trabalho demonstra o potencial antifúngico da FAE e de suas subfrações, contribuindo na busca por novas alternativas para o tratamento de infecções fúngicas.

**Palavras-chaves:** *Xylosma prockia*, *Cryptococcus* spp., atividade antifúngica

## ABSTRACT

The incidence of fungal infections has shown substantial growth in the last decades due to the increase in the immunocompromised population. The species *Cryptococcus* spp. are responsible for significant systemic infections and have a global estimate of millions of new cases per year. Current therapeutic options are limited and treatments take time and may present a restricted spectrum of action and high toxicity to the patient, which makes the searches for new therapeutic agents an important step in improving the treatments. Previous studies of this research group have shown promising antifungal activity for the polar fractions of the leaves of *Xylosma prockia*, against *Cryptococcus* spp. strains. Thus, the present study aimed to characterize the substances present in the ethyl acetate fraction, to identify those responsible for the observed antifungal activity. From this fraction 15 substances were identified: caffeoyl glycoside derivatives (group I), coumaroyl glycoside derivatives (group II) and caffeoyl glycoside derivatives (group III). Four coumaroyl-glycosides were isolated and characterized by spectroscopic methods, three of them was new compounds and one was new for *Xylosma* genus. The research demonstrates the antifungal potential of ethyl acetate fraction and its subfractions, contributing to the search for new alternatives for the treatment of fungal infections.

**Keywords:** *Xylosma prockia*, *Cryptococcus* spp., antifungal activity.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da anfotericina B e das equinocandinas .....	17
Figura 2 - Estrutura química dos metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Xylosma</i> .....	19
Figura 3 – Estrutura química de glicosídeos isolados de espécies do gênero <i>Xylosma</i> . .....	20
Figura 4 – Folhas, frutos e espinhos de <i>X. prockia</i> . .....	21
Figura 5 – Estrutura geral dos fenilpropanoides e estruturas químicas dos principais ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzoicos.....	23
Figura 6 – Visão esquemática da via do chiquimato na biossíntese de fenilpropanoides. ....	24
Fluxograma 1 – Delineamento experimental do presente trabalho. ....	28
Fluxograma 2 - Esquema do fracionamento do extrato etanólico de <i>X. prockia</i> .....	31
Fluxograma 3 - Esquema do processo cromatográfico para isolamento de substâncias presentes em FAE das folhas de <i>X. prockia</i> .....	35
Figura 7 - Análise por CCD das frações obtidas da coluna cromatográfica clássica da fração FA3.....	40
Fluxograma 4 – Esquema do processo cromatográfico de fracionamento de FAE. 41	
Figura 8 – Espectro de <sup>1</sup> H RMN (500 MHz, MeOD) da subfração FB3.....	42
Figura 9 – Perfil cromatográfico da subfração FB3, obtido na CLAE preparativa. ..	43
Figura 10 - Perfil cromatográfico de FAE obtido por CLAE/EM no modo negativo. 44	
Figura 11 - Perfil de fragmentação proposto para o ácido cafeoilquínico.....	46
Figura 12 – Perfil de fragmentação proposto para os isômeros do ácido cafeoilquínico. .....	47
Figura 13 – Perfil de fragmentação proposto para o ácido cafeoil glicosil quínico. .48	
Figura 14 – Perfil de fragmentação e espectro de massas de XP11 (ácido 5-cafeoil glicosil quínico).....	49
Figura 15 – Espectro de massas e perfil de fragmentação proposto para a XP13 (ácido 4,5-dicafeoilquínico). ....	50
Figura 16 - Perfil de fragmentação proposto para o ácido <i>p</i> -cumárico.....	52
Figura 17 - Perfil de fragmentação de massas proposto para a substância XP4....	53

Figura 18 - Espectro de massas e perfil de fragmentação proposto para a substância XP9.....	54
Figura 19 – Perfil de fragmentação proposto para o ácido cafeico. ....	56
Figura 20 – Espectro de massas da XP1 e perfil de fragmentação proposto para o cafeoil glicosídeo.....	57
Figura 21 - Perfil de fragmentação proposto e espectros de massas da substância XP6.....	58
Figura 22 - Perfil de fragmentação proposto e espectro de massas da substância XP14.....	60
Figura 23 - Estrutura química geral das substâncias propostas para FAE da <i>X. pockia</i> . .....	61
Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE/EM para subfração FB3 no modo negativo.....	62
Figura 25 – Estrutura geral das substâncias presentes na subfração FB3, com destaque para possíveis locais de diferenças estruturais entre as substâncias D-H. ....	63
Figura 26 - Espectro de massas das substâncias da subfração FB3.....	63
Figura 27 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C e HSQC (500 MHz, MeOD) da substância D....	65
Figura 28 – Estrutura química parcial da substância D.....	65
Figura 29 – Espectro RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância D, com destaque para os hidrogênios H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'. ....	66
Figura 30 – Estrutura química da 4-oxo-2-ciclopentenilmetila.....	67
Figura 31 – Espectro RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância D, com destaque para H-2", H-3", H-6a", H-6b", H-5a" e H-5b".....	67
Figura 32 – Ampliações do espectro HMBC da substância D apresentando as correlações entre as subunidades glucopiranosídeo e cumaroil. ....	68
Figura 33 – Ampliações do espectro HMBC da substância D, apresentando as correlações entre as subunidades glucopiranosídeo e 4-oxo-2-ciclopentenilmetila. ....	69
Figura 34 – Estrutura química de ( <i>E</i> )- <i>p</i> -cumaroil-6'-O- $\beta$ -glucopiranosídeo-4-oxo-2-ciclopentenilmetila. ....	69
Figura 35 – Espectro RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância E, com destaque para H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'. ....	71

Figura 36 – Espectro RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância E, com destaque para H-1", H-3", H-4", H-5a", H-5b", H-5", H-6a" e H-6b".....	72
Figura 37 – Estrutura química da 2-oxo-3-ciclopentenilmetila.....	72
Figura 38 – Espectro RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, MeOD) da substância F, com destaque para H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'.....	73
Figura 39 - Espectro RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, MeOD) da substância F, com destaque para os hidrogênios H-4", H-3", H-5a", H-5b", H-1", H-6a" e H-6b".....	74
Figura 40 – Estrutura química de ( <i>E</i> )- <i>p</i> -cumaroil-6'-O-β-glucopiranosídeo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila.....	75
Figura 41 – Estrutura química parcial da substância H.....	75
Figura 42 – Espectro RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância H, com destaque para H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'.....	76
Figura 43 -Espectro RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, MeOD) da substância H, com destaque para H-4", H-3", H-5a", H-5b", H-1", H-6a" e H-6b".....	77
Figura 44 – Estrutura química proposta para a substância H.....	77
Figura 45 – Estruturas químicas propostas para as substâncias de FB3 da <i>X. pockia</i> . .....	78
Figura 46 – Estrutura química de substâncias naturais contendo ciclopentenonas e de seus precursores.....	79
Figura 47 – Estrutura química dos xylocosides D–G.....	79
Figura 49- Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com FAE e FB3, após 48 horas de cultura.....	82
Figura 50 - Viabilidade celular de macrófagos J774A.1 tratados com FAE e FB3, após 48 horas de cultura.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) frente <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> das frações das folhas de <i>X. prockia</i> .....	22
Tabela 2 – Linhagens de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> , utilizadas na avaliação da atividade antifúngica, <i>in vitro</i> .....	36
Tabela 3 - Rendimento obtido na partição do extrato etanólico de <i>X. prockia</i> . .....	39
Tabela 4 - Derivados do ácido hidroxicinâmico identificados por CLAE/EM em FAE de <i>X. prockia</i> . .....	45
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) de FAE, FB3, FLU e AMB, frente às linhagens de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> .....	80
Tabela 6 – Índice de seletividade (IS) de FAE e FB3 calculado com base no IC <sub>50</sub> em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1. ....	84

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

**$\delta$**  – Deslocamento químico

**J** – Constante de acoplamento

**3-CQA** - 3-cafeoilquínico

**4-CQA** - 4-cafeoilquínico

**5-CQA** - 5-cafeoilquínico

**3,4-diCQA** – ácido 3,4 dicafeoilquínico

**3,5-diCQA** - ácido 3,3 dicafeoilquínico

**4,5-diCQA** - ácido 4,5 dicafeoilquínico

**5-FC** - flucitosina

**AcOEt** - acetato de etila

**AHB** - ácidos hidroxibenzóicos

**AHC** - ácidos hidroxicinâmicos

**AMB** – anfotericina B

**ASD** - Ágar Sabouraud Dextrose

**ATCC** - American Type Culture Collection

**BuOH** - n-butanol

**CCC** - Cromatografia em coluna clássica

**CCD** - Cromatografia em camada delgada

**CIM** - Concentração inibitória mínima

**CLAE** - Cromatografia líquida de alta eficiência

**CLSI** - Clinical and Laboratory Standards Institute

**CLAE/EM** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria

de massas

**COSY** – Homonuclear Correlation Spectroscopy

**Da** - dalton

**DAD** - Detector de arranjo de diodos

**DCM** – diclorometano

**di-CQA** - ácido dicafeoilquínico

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**EE** - Extrato etanólico

**ESI** - Ionização por eletrospray

**EtOH** – etanol

**EM** – Espectrometria de massas

**FD** - Fração diclorometano

**FAE** - Fração acetato de etila

**FB** - Fração butanólica

**FH** - Fração hexano

**FLU** - fluconazol

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana

**HEX** - n-hexano

**HMBC** - Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

**HSQC** – Heteronuclear Single Quantum Coherence

**IC<sub>50</sub>** – 50% da concentração inibitória

**IS** – Índice de seletividade

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama

**IR** - Índice de refração

**KBr** - brometo de potássio

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**MeOD** – metanol deuterado

**MeOH** – metanol

**MTT** - brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

**m/z** – Relação massa carga

**NF-K $\beta$**  - Fator nuclear kappa B

**NO** - óxido nítrico

**NOESY** - Nuclear Overhauser effect spectroscopy

**OMS** – Organização mundial da saúde

**ppm** – Partes por milhão

**PNs** – Produtos naturais

**RA** - Resíduo aquoso

**RMN** – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

**RMN <sup>1</sup>H** – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

**RMN <sup>13</sup>C**– Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono

**UI/mL** – Unidades internacionais por mililitro

**UV** – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b> <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b> <b>PRODUTOS NATURAIS</b> .....	<b>15</b>
2.2 <i>Xylosma prockia</i> (Turcz.) Turcz. ....	18
2.3      DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO .....	22
2.4      CRIPTOCOCOSE .....	25
<b>3</b> <b>OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
3.1      OBJETIVO GERAL.....	27
3.2      OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4</b> <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1      DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.2      TÉCNICAS GERAIS.....	29
<b>4.2.1</b> <b>Instrumentação</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.2</b> <b>Técnicas cromatográficas</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.3</b> <b>Solventes</b> .....	<b>30</b>
4.3      FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO .....	30
<b>4.3.1</b> <b>Material vegetal</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3.2</b> <b>Preparação do extrato</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3.3</b> <b>Fracionamento do extrato etanólico</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3.4</b> <b>Fracionamento de FAE e isolamento</b> .....	<b>31</b>
4.5      AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	36
<b>4.5.1</b> <b>Atividade antifúngica</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5.2</b> <b>Avaliação da citotoxicidade de FAE e FB3</b> .....	<b>37</b>
4.5.2.1 <i>Cultura de RAW 264.7 e J774A.1</i> .....	38

4.5.2.2	<i>Avaliação da citotoxicidade de FAE e FB3 em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1</i> .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
5.1	FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO .....	39
5.1.1	<b>Caracterização de FAE</b> .....	<b>43</b>
5.1.2	<b>Caracterização de FB3</b> .....	<b>62</b>
5.1.3	<b>Elucidação estrutural de cumaroil glicosídeos presentes em FB3</b> .....	<b>64</b>
5.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	80
5.2.1	<b>Avaliação da atividade antifúngica</b> .....	<b>80</b>
5.2.2	<b>Avaliação da citotoxicidade</b> .....	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>86</b>
	REFERÊNCIAS.....	87
	APÊNDICE I.....	96
	APÊNDICE II.....	104



## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas tem apresentado crescimento substancial nas últimas décadas. Acredita-se que o aumento no número de infecções se deve, principalmente, ao aumento da população imunocomprometida, que inclui pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), transplantados e com câncer, além do aumento da população idosa, de neonatos e de pacientes que necessitam de terapias invasivas (PARENTE-ROCHA *et al.*, 2017; PFALLER *et al.*, 2018). Sabe-se que com o aumento da incidência do HIV o problema se agrava, uma vez que as infecções fúngicas são responsáveis por aproximadamente 50% da mortalidade desses pacientes (ARMSTRONG-JAMES; MEINTJES; BROWN, 2014; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018).

Nesse cenário, um do fungo oportunista com importante relevância clínica é o *Cryptococcus* spp. Pacientes infectados podem evoluir a quadros clínicos graves, com rápida progressão em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos e alto índice de mortalidade (FIRACATIVE *et al.*, 2018; SKOLNIK; HUSTON; MODY, 2017). O gênero *Cryptococcus* possui duas espécies patogênicas principais: *Cryptococcus neoformans* - que pode ser encontrado em todo o globo terrestre e é o agente responsável por mais de 90% dos casos de criptococose; e *Cryptococcus gattii* - encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais, possuindo uma maior virulência, uma vez que atinge principalmente indivíduos imunocompetentes (FIRACATIVE *et al.*, 2018; SKOLNIK; HUSTON; MODY, 2017).

Apesar do aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas, nas últimas décadas o desenvolvimento de antifúngicos eficazes e bem tolerados ficou aquém dos avanços da terapia antibacteriana. Atualmente as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas são limitadas e possuem longos períodos de tratamento (NETT; ANDES, 2016; PARENTE-ROCHA *et al.*, 2017). A farmacoterapia de infecções fúngicas abrange as classes das sulfonamidas, polienos, azóis, equinocandinas e antimetabólitos. Estes fármacos possuem diversas limitações, podendo apresentar alta toxicidade, restrito espectro de ação, baixa tolerância dos pacientes, administração por via parenteral e/ou ineficácia devido ao desenvolvimento de resistência fúngica, o que dificulta o tratamento desta infecção e torna a procura por novos agentes terapêuticos um importante passo para melhoria

dos tratamentos (PARENTE-ROCHA *et al.*, 2017; PIANALTO; ALSPAUGH, 2016; PRASAD; SETHUMADHAVAN; FATIMA, 2011; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de agentes antifúngicos seguros e de amplo espectro de ação é complexo, uma vez que tanto o fungo como os seus hospedeiros são seres eucariotos, de maneira que as diferenças entre parasita e hospedeiro são muito pequenas (NETT; ANDES, 2016). Existem, no entanto, estratégias úteis para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, sendo a identificação de substâncias bioativas presentes em produtos naturais (PNs) de grande importância. Fármacos das classes dos polienos e das equinocandinas, por exemplo, foram descobertos por meio de triagem de PNs (NETT; ANDES, 2016).

Entre os PNs, as plantas possuem grande destaque, uma vez que produzem metabólitos secundários quimicamente diversos e potencialmente ativos (ATANASOV *et al.*, 2015). Estes metabólitos muitas vezes servem como inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos, seja através de semissíntese, síntese total, ou ainda por meio de estratégias da química medicinal, que usam seus grupos farmacofóricos como base para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Em recente trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia da UFJF/GV, observou-se promissora atividade para o extrato etanólico e frações de *Xylosma prockia* (Salicaceae) frente a linhagens ATCC, clínicas e ambientais de *Cryptococcus gatti* e *Cryptococcus neoformans* (FOLLY *et al.*, 2020). Entre as amostras testadas, a fração acetato de etila (**FAE**) apresentou potente atividade antifúngica, bom rendimento e perfil cromatográfico interessante, sendo selecionada para a continuidade das investigações acerca das propriedades antifúngicas da planta. Em função disso, o presente trabalho propôs a investigação fitoquímica da fração acetato de etila das folhas de *X. prockia*, com o objetivo de isolar e caracterizar possíveis metabólitos secundários responsáveis por sua atividade antifúngica. As subfrações obtidas, assim como os metabólitos isolados foram avaliados quanto à potencial atividade antifúngica *in vitro* frente a *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS

Desde os primórdios da humanidade, PNs vêm sendo amplamente utilizados nos tratamentos de doenças. Os relatos mais antigos datam de 2600 a.C., na Mesopotâmia, e incluem mais de 1000 plantas usadas como remédios naquela época (GURNANI *et al.*, 2014). Relatos semelhantes são descritos para os mais diversos povos e gerações durante a história da humanidade, demonstrando a importância do uso de PNs na manutenção da saúde humana no decorrer dos séculos (CALIXTO, 2019; GURNANI *et al.*, 2014; THOMFORD *et al.*, 2018).

O termo “produtos naturais” se refere a qualquer substância de ocorrência natural proveniente de plantas, animais, micro-organismos, entre outros (CALIXTO, 2019; GURNANI *et al.*, 2014). Os PNs incluem os chamados metabólitos secundários ou metabólitos especiais que possuem uma ampla diversidade de massas moleculares e estruturas químicas multidimensionais complexas. Estima-se que existam pelo menos 300 mil metabólitos secundários com grande potencial de modificar as funções biológicas (KATZ; BALTZ, 2016; MUSHTAQ *et al.*, 2018).

Reivindicados como os pilares da descoberta de novos fármacos, os PNs desempenharam e continuarão a desempenhar papel fundamental como novas alternativas terapêuticas para o tratamento das mais diversas doenças (KOPARDE; DOIJAD; MAGDUM, 2019). Estima-se que o mercado farmacêutico global tenha um faturamento de 1,1 trilhão de dólares por ano, e que aproximadamente um terço do lucro seja devido a fármacos de origem natural ou que tenham sido desenvolvidos por síntese química planejada a partir de PNs (NEWMAN; CRAGG, 2020; PATRIDGE *et al.*, 2016; THOMFORD *et al.*, 2018).

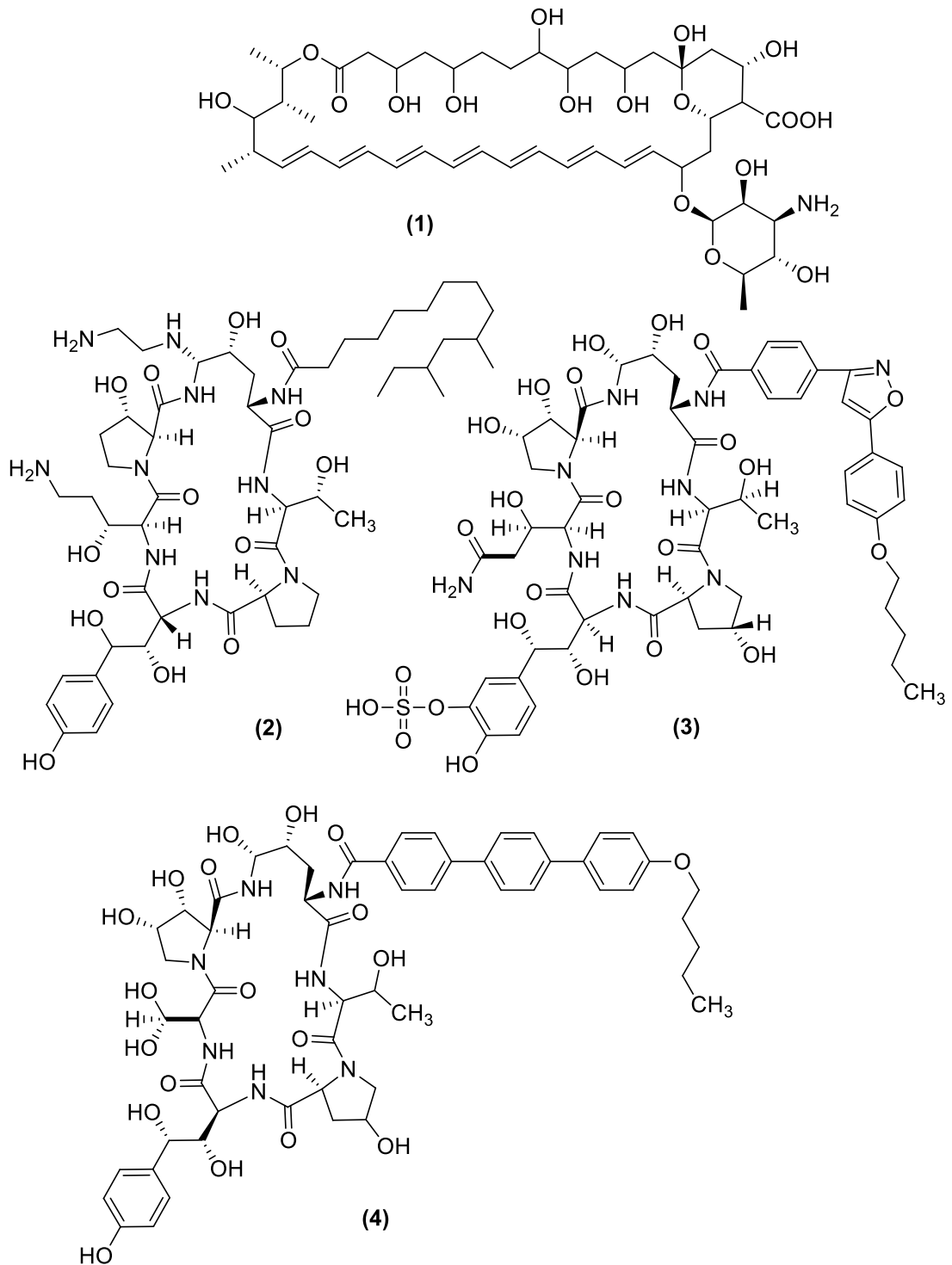
Vários são os exemplos de fármacos disponíveis no mercado que foram descobertos ou desenvolvidos a partir de fontes naturais. Um importante exemplo é a anfotericina B (AMB) (**1**) (Figura 1), um polieno que possui excelente atividade antifúngica e antiparasitária, sendo o principal fármaco utilizado no tratamento da criptococose (KLEINBERG, 2006; LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). A AMB foi isolada em 1955 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* obtidas na foz do rio Orinoco, na Venezuela. Apesar de já ter sua síntese total descrita, esta não é viável

devido à elevada complexidade da molécula, sendo até hoje extraída de culturas de *S. nodosus* (KLEINBERG, 2006; LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005).

Outro exemplo é o das equinocandinas, classe de fármacos antifúngicos utilizada no tratamento de infecções superficiais e invasivas por fungos do gênero *Candida* de e *Aspergillus*, identificada pela primeira vez a partir de PNs em 1974 (PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009; WAGNER *et al.*, 2006). Por não apresentarem características farmacológicas ideais, derivados semissintéticos de equinocandinas naturais foram desenvolvidos e aprovados para uso clínico: caspofungina (2) preparada a partir de pneumocandina Bo, micafungina (3) preparada a partir de FR901379, e anidulafungina (4) preparada a partir de equinocandina B (Figura 1) (ALDHOLMI *et al.*, 2019).

Muitos são os desafios no desenvolvimento de fármacos a partir de PNs. Entre eles, a falta de procedimentos padronizados, a dificuldade de isolamento de substâncias puras, a solubilidade e a estabilidade das substâncias em um solvente compatível com a administração oral em humanos, a ausência de estudos de mecanismo de ação em modelos animais adequados e, o mais importante, o rendimento durante a obtenção dos metabólitos secundários. Porém, a pesquisa de PNs representa uma enorme fonte de substâncias bioativas e é claramente um importante caminho para a descoberta de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020; THOMFORD *et al.*, 2018).

Figura 1 - Estrutura química da anfotericina B e das equinocandinas



Fonte: Elaborado pela autora.

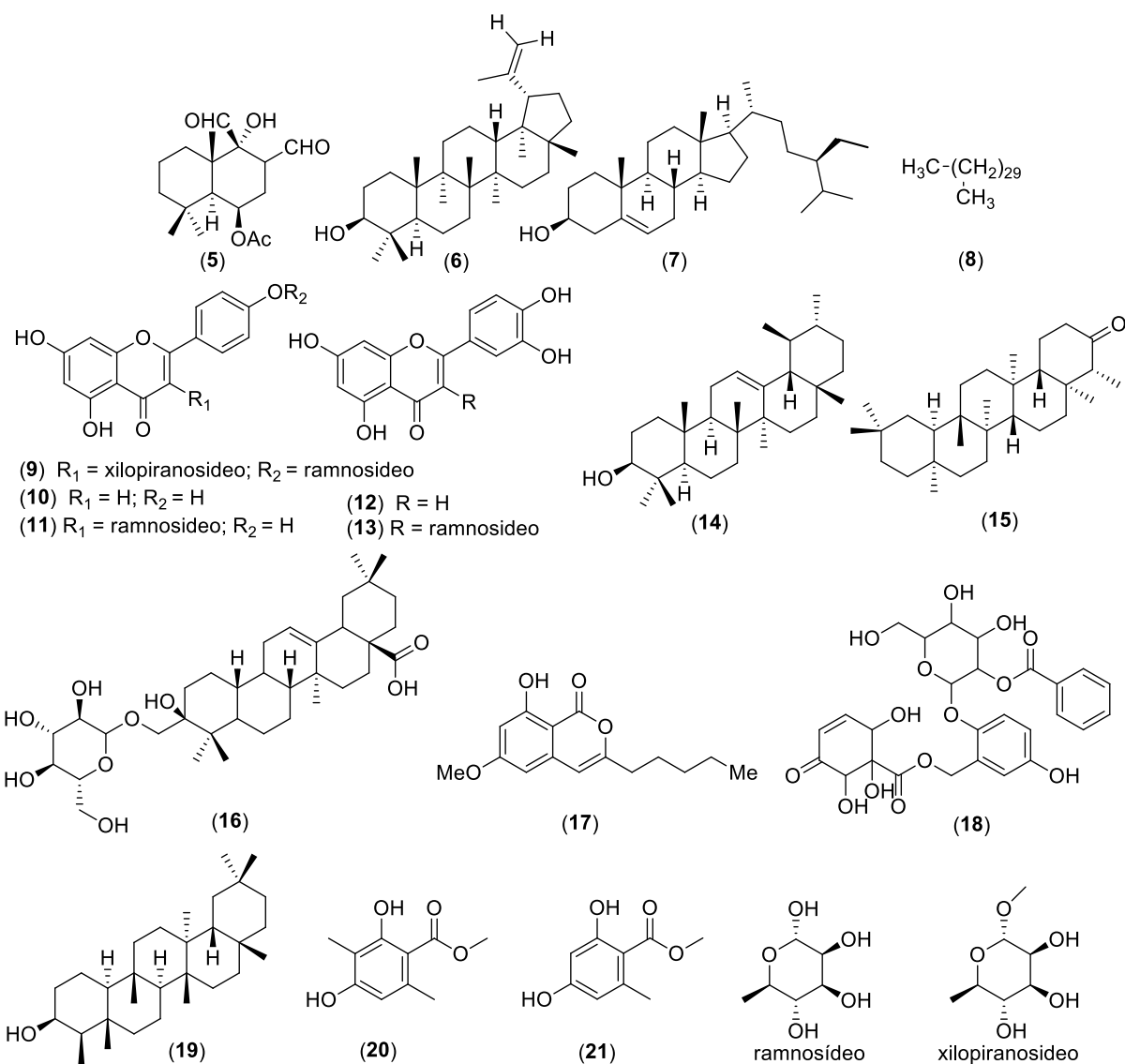
## 2.2 *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz.

O gênero *Xylosma* (Salicaceae), encontra-se distribuído em áreas tropicais e subtropicais da América, Ásia e Austrália, sendo descrita a presença de 11 espécies no Brasil (PARVEEN, Ifat *et al.*, 2011; PHILIPPSEN; MIGUEL; KALEGARI, 2013; RAU; BLUM, 2019). No que se refere à composição química, poucos são os trabalhos publicados sobre o gênero, tendo sido descrita para algumas espécies a presença de flavonoides, triterpenos e glicosídeos fenólicos (Figuras 2 e 3) (MENEZES-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2011; PARVEEN, Ifat *et al.*, 2011; PHILIPPSEN; MIGUEL; KALEGARI, 2013; RAU; BLUM, 2019; SULTANA; ALI; JAMEEL, 2018; SWAPANA *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2008). Philippsen e colaboradores (2013) isolaram da fração hexano das cascas e raízes de *X. ciliatifolium* o sesquiterpeno ugandensidial (**5**). Menezes-de-Oliveira e colaboradores (2011) isolaram no extrato hexano das folhas de *X. flexuosa* o triterpeno 3 $\beta$ -lup-20(29)-en-3-ol (**6**).

A partir do extrato metanólico das folhas de *X. longifolium* foram isolados  $\beta$ -sitosterol (**7**), *n*-hentriacontano (**8**), além dos flavonoides kaempferol-3 $\beta$ -xylopiranosídeo-4'- $\alpha$ -rhamnosídeo (**9**), kaempferol (**10**), kaempferol-3-ramnosídeo (**11**), quercetina (**12**), quercetina-3-ramnosídeo (**13**) (PARVEEN; GHALIB, 2012; SULTANA; ALI; JAMEEL, 2018). De acordo com Parveen e colaboradores (2012, p.989, apud Parveen *et al.*, 2009) também foram isoladas da *X. longifolium* as substâncias  $\beta$ -amirina (**14**), friedelina (**15**), ácido olean-12-en-3 $\alpha$ -ol-28-oic 3 $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (**16**). Já do extrato metanólico das cascas de *X. longifolium* foram isolados 8-hidroxi-6-metoxi-pentilisocumarina (**17**), álcool 2-(6-benzoil- $\beta$ -d-glucopiranosiloxi)-7-(1,2,6-trihidroxi-5-oxociclohex-3-enoil)-5-hidroxibenzil (**18**), friedelina (**15**), epifriedelanol (**19**), ácido atrárico (**20**) e orsenilato de metila (**21**) (Figura 2) (TRUONG *et al.*, 2011).

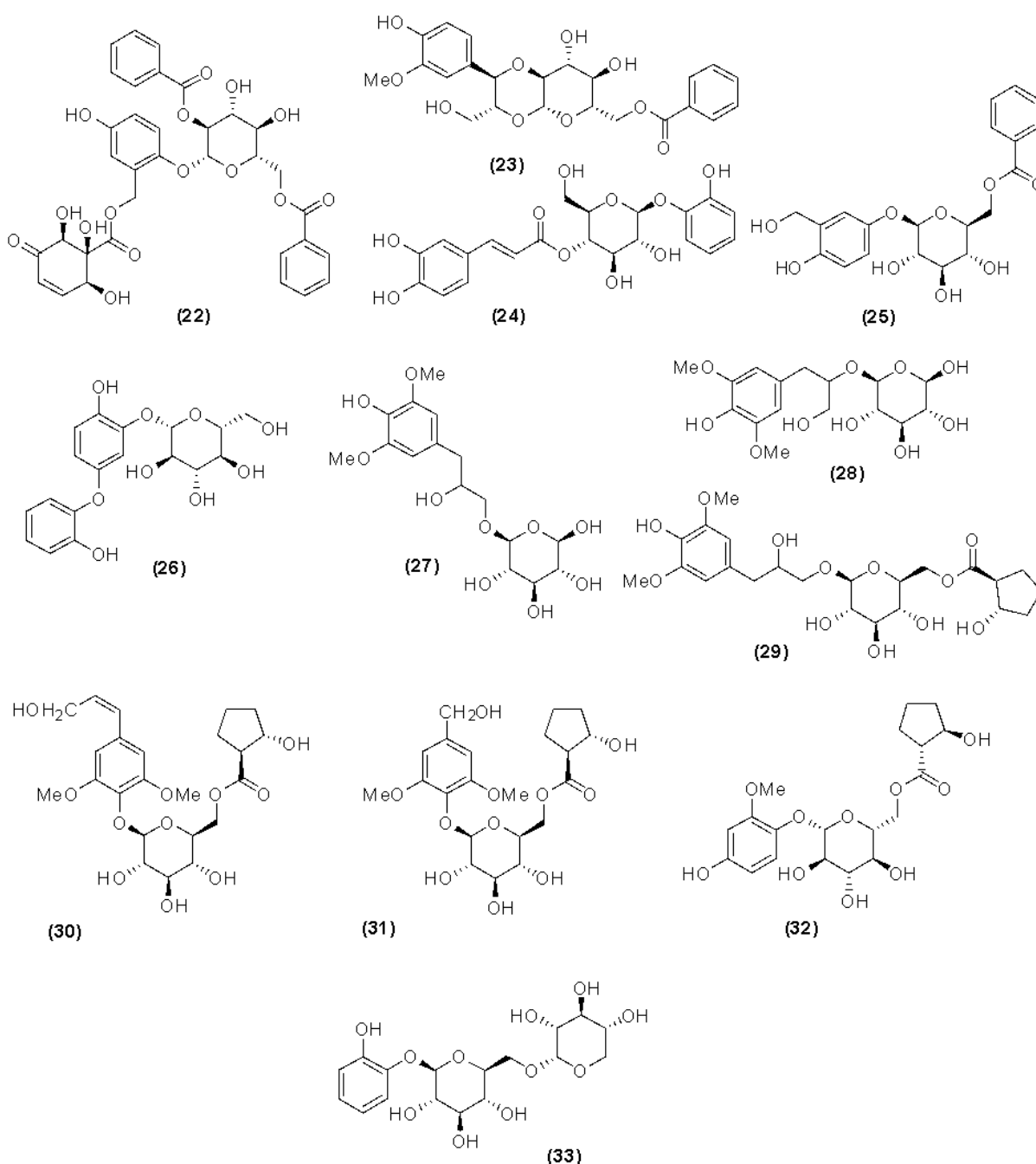
Entre os glicosídeos descritos no gênero *Xylosma*, Gilbons e colaboradores (1995) isolaram e caracterizaram xylosmina (**22**) do extrato metanólico das partes aéreas de *X. flexuosa*. A partir do extrato metanólico de *X. longifolium* foi isolado xylongosídeo A (**23**), xylongosídeo B (**24**), xylosmacina (**25**) e xylosmalosídeo (**26**) (SWAPANA *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2011). Xu e colaboradores (2008) obtiveram 7 novos glicosídeos fenólicos que foram denominados xylocosídeos A-G (**27-33**), a partir do caule de *X. controversum* (Figura 3).

Figura 2 - Estrutura química dos metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Xylosma*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3 – Estrutura química de glicosídeos isolados de espécies do gênero *Xylosma*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação às atividades biológicas descritas para o gênero, destaca-se a atividade antimicrobiana observada em algumas espécies. Os extratos éter de petróleo, clorofórmio e metanol das folhas de *X. longifolium* apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) inferiores a 10 µg/mL frente aos fungos dermatófilos (*Microsporum boullardii* MTCC 6059; *M. canis* MTCC 2820; *M. canis*



MTCC 3270; *M. gypseum* MTCC 2819; *Trichophyton ajelloi* MTCC 4878; *T. rubrum* MTCC 296; *T. rubrum* MTCC 3272) (DEVI; SINGH; SINGH, 2013).

Em uma triagem de atividade antimicrobiana de plantas nativas do Brasil contra três bactérias patogênicas de peixes (*Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, e *Flavobacterium columnare*), utilizando o ensaio CIM, Castro e colaboradores (2008) descreveram que o extrato metanólico das folhas de *Xylosma* spp. inibiram o crescimento de *Flavobacterium columnare* em uma concentração de 375 µg/mL.

*Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Figura 4), popularmente conhecida como sucará e espinho-de-agulha, é uma planta nativa do Brasil, encontrada principalmente nas regiões nordeste, sudeste e sul do país (CORDEIRO; ALMEIDA; FELIX, 2014). É um arbusto que pode alcançar até 3 m de altura, com espinhos de até 8 cm de comprimento, com presença de folhas alternadas com bordas crenadas a serradas e frutos amarelo-esverdeado quando jovem e vermelho-alaranjado quando maduro (CORDEIRO; ALMEIDA; FELIX, 2014).

Figura 4 – Folhas, frutos e espinhos de *X. prockia*.



Legenda: A) espinhos de *X. prockia*, fonte: DIAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; B) folhas de *X. prockia*; C) fruto de *X. prockia*, fonte: UFRGS, 2010.

Existem poucos estudos sobre a espécie, sendo a maioria restrito à morfologia e taxonomia da planta. Em recente publicação do nosso grupo de pesquisa, Folly e colaboradores (2020) descrevem a atividade antifúngica, *in vitro*, do extrato etanólico e de frações das folhas de *X. prockia* frente a linhagens de *Cryptococcus* spp.. Nesse estudo, é descrita uma potente atividade para as frações diclorometano (FD), acetato de etila (**FAE**) e butanol (FB), como observado na Tabela 1. Foi observado ainda que a **FAE** apresenta majoritariamente em sua composição derivados do ácido cinâmico, com provável ineditismo de alguns componentes. Os resultados observados, associados a um bom rendimento e a um perfil cromatográfico interessante levaram à seleção da **FAE** para a realização do presente trabalho.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) frente *C. neoformans* e *C. gattii* das frações das folhas de *X. prockia*.

Linhagens		CIM (mg/L)					
		EE	FH	FD	FAE	FB	RA
<b><i>C. gattii</i></b>	L28/02 (C)	8	2	<0,25	<0,25	2	8
	547/OTTI (A)	32	32	2	0,5	8	32
<b><i>C. neoformans</i></b>	96806 (C)	8	8	<0,25	<0,25	2	8
	ATCC 24067	8	8	<0,25	<0,25	1	8

Legenda: A CIM representa a concentração da amostra capaz de inibir o crescimento *in vitro* do respectivo isolado. C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection, EE: Extrato etanólico; FH: Fração hexano; FD: Fração diclorometano; **FAE**: Fração acetato de etila; FB: Fração butanol; RA: Resíduo aquoso. Fonte: Tabela adaptada de Folly *et al.*, 2020.

### 2.3 DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO

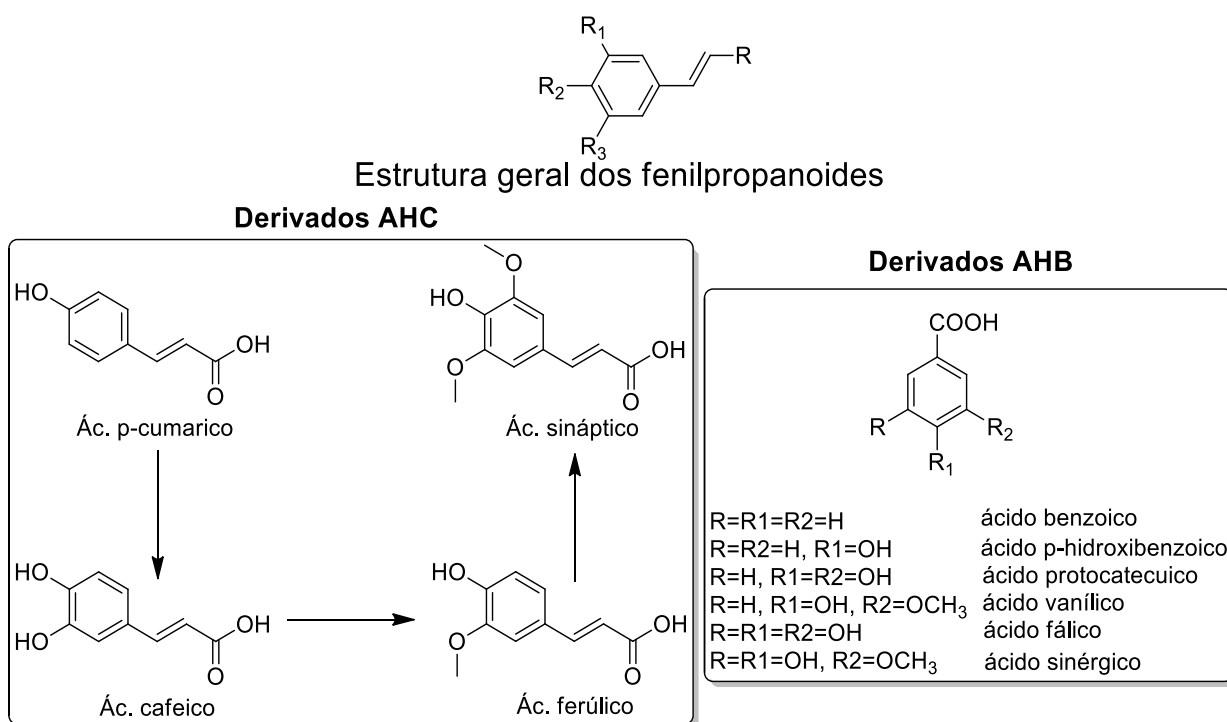
Fenilpropanoides compreendem uma ampla classe de metabólitos secundários que usualmente consistem em anel aromático de seis carbonos e cadeia lateral com três átomos de carbono (Figura 5) (DENG; LU, 2017; SIMÕES *et al.*, 2017). Baseado na estrutura química, os fenilpropanoides podem ser divididos em cinco grupos, incluindo flavonoides, ligninas, ácidos fenólicos, estilbenos e cumarinas, sendo os três primeiros os mais frequentemente encontrados em PNs (ADISAKWATTANA, 2017; DENG; LU, 2017).

Os ácidos fenólicos constituem um grupo de substâncias aromáticas ácidas caracterizadas pela presença de um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila com a presença de um grupo carboxílico na cadeia lateral (BARTNIK; FACEY, 2017; DENG; LU, 2017; VINHOLES; SILVA; SILVA, 2015). Os ácidos fenólicos, podem ser divididos em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos (AHB), contendo sete átomos de carbono (C6-C1) e ácidos hidroxicinâmicos (AHC), com nove átomos de carbono (C6-C3). (Figura 5) (ADISAKWATTANA, 2017; BARTNIK; FACEY, 2017; VINHOLES; SILVA; SILVA, 2015).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico compreendem um grande grupo de ácidos fenólicos simples, encontrados principalmente em cereais, frutas e vegetais (ALAM *et al.*, 2016). A diversidade estrutural dos AHCs é dada pelo número e posição das hidroxilas fenólicas, além de serem comumente encontrados na natureza ligados por ligações éster, éter ou acetal a uma variedade de outros componentes naturais,

como celulose, proteínas, lignina, flavonoides, glicose, ácidos quínico, maleico e tartárico e terpenos (BARTNIK; FACEY, 2017; VINHOLES; SILVA; SILVA, 2015). Os principais AHCs naturais são os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (Figura 5) (DENG; LU, 2017; VINHOLES; SILVA; SILVA, 2015).

Figura 5 – Estrutura geral dos fenilpropanoides e estruturas químicas dos principais ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzoicos.



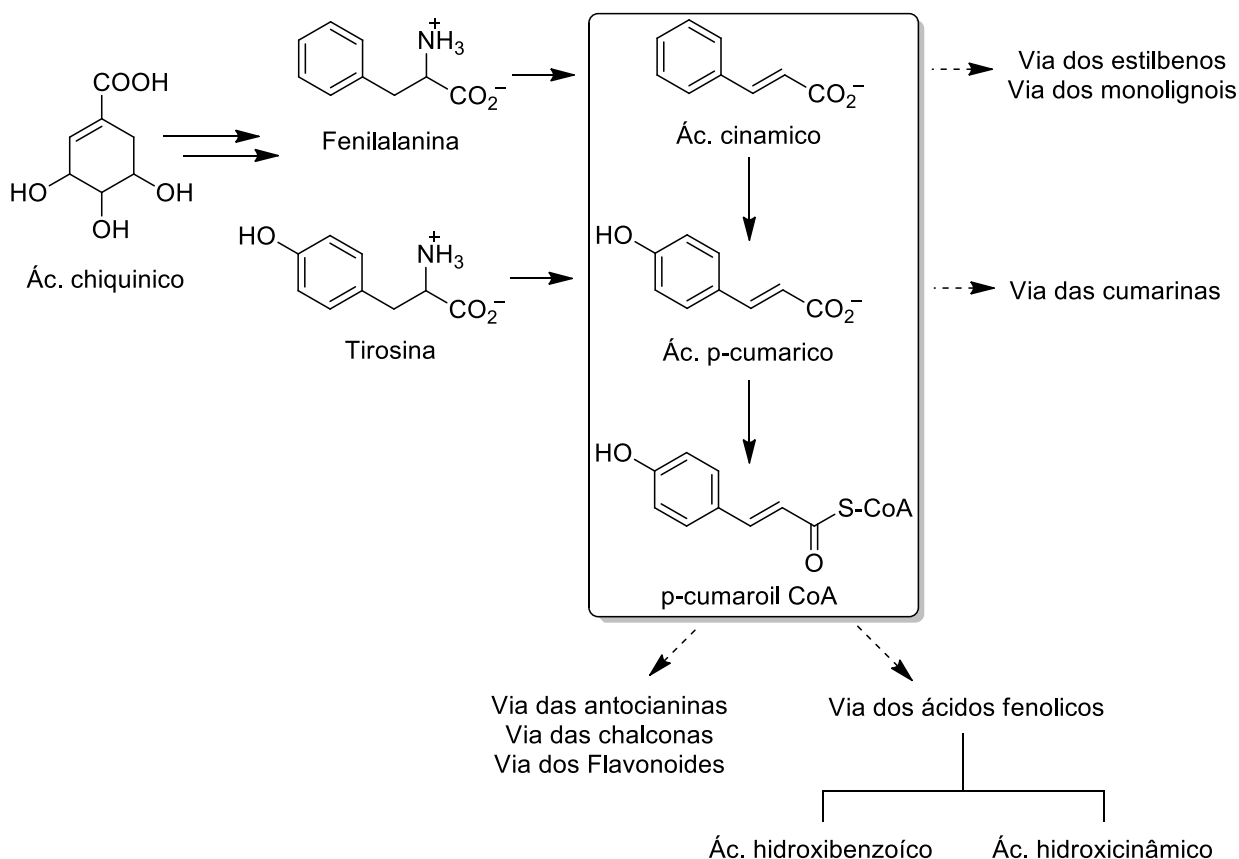
Fonte: Elaborado pela autora.

Ácidos fenólicos são substâncias presentes na dieta humana, estando presentes em frutas, legumes e grãos integrais, e, principalmente, no café há principal fonte de ácidos fenólicos consumida pelo homem (ADISAKWATTANA, 2017; DENG; LU, 2017; KUMAR; PARLE, 2019; NAVEED *et al.*, 2018). Os ácidos fenólicos, principalmente os AHCs apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas podendo ser citadas as atividades antioxidante (HELENO *et al.*, 2015; NAVEED *et al.*, 2018; PEI *et al.*, 2016), anti-inflamatória (ALAM *et al.*, 2016; NAVEED *et al.*, 2018; PEI *et al.*, 2016), antitumoral (HELENO *et al.*, 2015; PEI *et al.*, 2016; PEPERIDOU *et al.*, 2017), antimutagênica, anti-úlceras, antiplaquetária (PEI *et al.*, 2016), antimicrobiana (HELENO *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2018; MA; MA, 2015; PEPERIDOU *et al.*, 2017), múltiplas ações citoprotetoras (HELENO *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2018; MA; MA, 2015;

PEPERIDOU *et al.*, 2017), anti-hipertensiva (NAVEED *et al.*, 2018; PEPPERIDOU *et al.*, 2017) e anti-hiperlipidêmica (ALAM *et al.*, 2016; PEPPERIDOU *et al.*, 2017).

A origem biossintética dos AHCs se dá pela via do chiquimato (Figura 6), tendo a fenilalanina e tirosina como aminoácidos precursores. Após vários processos enzimáticos, a via do chiquimato produz os ácidos cinâmico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e várias moléculas complexadas com lignina. Os AHCs também servem como moléculas precursoras na formação de outros metabólitos secundários, como os estilbenos, monolignóis, cumarinas, chalconas, flavonoides, lignanas e antocianinas (ADISAKWATTANA, 2017; ALAM *et al.*, 2016; DENG; LU, 2017; HELENO *et al.*, 2015; KUMAR; PARLE, 2019; PEI *et al.*, 2016).

Figura 6 – Visão esquemática da via do chiquimato na biossíntese de fenilpropanoides.



Fonte: adaptado de Deng, 2017

## 2.4 CRIPTOCOCOSE

Fungos do gênero *Cryptococcus* foram identificados pela primeira vez em 1894, quando o patologista Otto Busse e o médico Abraham Buschke observaram que o *Cryptococcus* spp. era a causa de um granuloma crônico no osso tibial de uma mulher de 31 anos (KWON-CHUNG *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2016). A criptococose passou a ser reconhecida como um grande problema de saúde na década de 1980 com a pandemia de HIV, devido ao *Cryptococcus* spp. ser um fungo oportunista (KWON-CHUNG *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2016). Atualmente a meningite criptocócica é responsável por cerca de 223.100 novos casos ao ano e 181100 mortes associada ao HIV (BONGOMIN *et al.*, 2017; OMS, 2018). Na América Latina, estimativas apontam mais de 5 mil novos casos anuais de meningite criptocócica e cerca de 2400 mortes, sendo Brasil e Colômbia os países com maior incidência (FIRACATIVE *et al.*, 2018).

O gênero *Cryptococcus* possui duas espécies patogênicas principais: *C. neoformans* distribuído globalmente, se manifesta principalmente em pacientes imunocomprometidos, na forma de meningoencefalite, e *C. gattii* normalmente restrito a regiões tropicais e subtropicais, afeta com mais frequência pacientes imunocompetentes, provocando infecções pulmonares em pacientes imunocompetentes (FIRACATIVE *et al.*, 2018; SKOLNIK; HUSTON; MODY, 2017). A exposição a *C. neoformans* é comum em humanos, sendo que a maioria dos indivíduos produz anticorpos contra essa espécie já na idade escolar, sem manifestação clínica (GOLDMAN *et al.*, 2001).

No meio ambiente, *Cryptococcus* spp. pode ser encontrado em diferentes nichos. Tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* são facilmente encontrados nas cascas de várias espécies de árvores. Ao contrário do *C. gattii*, *C. neoformans* é particularmente abundante em excremento de aves, tendo pombos selvagens como principal fonte de disseminação em áreas urbanas densamente povoadas (KWON-CHUNG *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2016).

A contaminação por *Cryptococcus* se dá por meio da inalação de células fúngicas dessecadas ou esporos existentes no meio ambiente. No pulmão, *Cryptococcus* spp. pode causar pneumonia em pacientes imunocomprometidos, enquanto que em pacientes imunocompetentes as células fúngicas são eliminadas pelo sistema imune ou estabelecem uma infecção latente assintomática. Caso o

paciente apresente imunossupressão, a infecção assintomática pode ser disseminada para outros tecidos, especialmente para o sistema nervoso central (MAY *et al.*, 2016).

Ao atingir as vias aéreas distais, *Cryptococcus* spp. entra em contato com macrófagos alveolares, que ao serem ativados recrutam outras células imunológicas através de citocinas e quimiocinas e provocam uma resposta Th1 adequada e inflamação granulomatosa. Em um hospedeiro imunocompetente, uma resposta imune eficaz elimina a maioria dos *Cryptococcus* inalados (KWON-CHUNG *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2016). Por outro lado, em um hospedeiro imunocomprometido, as células criptocócicas se proliferam, se disseminam hematologicamente, principalmente para o cérebro, ao atravessar a barreira hematoencefálica provocando meningoencefalite que se não tratada poderá ser fatal (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o tratamento preconizado para criptococose, principalmente para pacientes HIV positivos, é a administração de AMB desoxicolato e flucitosina (5-FC) por 7 dias, seguido de fluconazol (FLU) por 7 a 14 dias (MORACE; BORGHI, 2010). Um grande problema dessa tratamento tem relação com sua toxicidade, principalmente devido à AMB, que apresenta potencial hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (LAWRENCE *et al.*, 2018; TU *et al.*, 2019). A AMB lipossomal é uma alternativa que apresenta menor toxicidade, porém tem custo substancialmente mais elevado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Observa-se nas últimas décadas aumento nos casos de resistência a antifúngicos azólicos. Estudos sugerem que a resistência ao FLU é relativamente comum em recidivas de meningite criptocócica (BONGOMIN *et al.*, 2018) e que cerca de 30% de isolados de *Cryptococcus* resistentes ao fármaco são encontrados em pacientes que nunca tiveram exposição prévia a este (CHEONG; MCCORMACK, 2013).

Em mais de duas décadas, nenhum novo fármaco antifúngico foi desenvolvido para o tratamento da meningite criptocócica, apesar do limitado arsenal de fármacos e a crescente resistência fúngica observada para esta infecção (MOLLOY *et al.*, 2017), o que torna evidente a importância da busca e desenvolvimento de novos agentes seguros e eficazes para o tratamento dessa enfermidade.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, caracterizar e avaliar a atividade biológica dos metabólitos secundários presentes na fração acetato de etila das folhas de *X. prockia*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

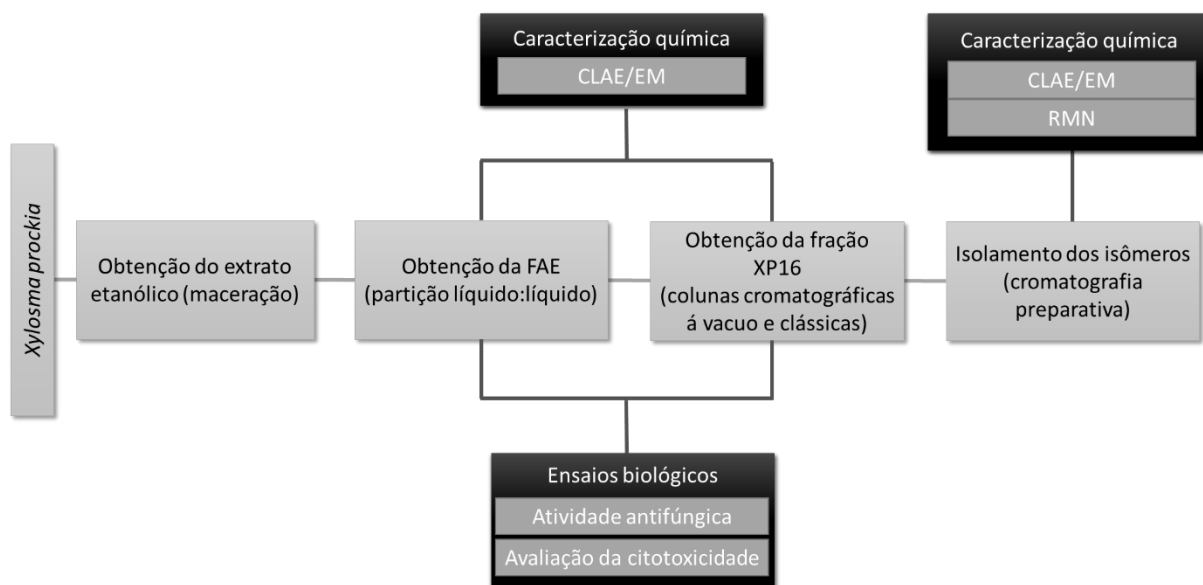
- Obter e fracionar o extrato etanólico das folhas de *X. prockia*;
- Caracterizar os constituintes presentes na fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *X. prockia*, por meio de análises de espectrometria de massas (EM);
  - Fracionar a fração acetato de etila e isolar seus constituintes, por meio de métodos cromatográficos;
  - Caracterizar a subfração FB3 e as substâncias isoladas por meio de análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM);
  - Avaliar a concentração inibitória mínima da fração acetato de etila e da subfração FB3 frente a linhagens clínicas, ambiental e ATCC de *Cryptococcus* spp.;
  - Avaliar a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 tratados com a fração acetato de etila e subfração FB3 de *X. prockia*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho partiu das folhas de *X. prockia* para caracterização e identificação dos metabólitos secundários presentes na fração acetato de etila (**FAE**). O extrato etanólico foi obtido a partir das folhas de *X. prockia* e particionado para obtenção da **FAE**. O fracionamento de **FAE** deu origem à subfração **FB3**. Ambas (**FAE** e **FB3**) foram caracterizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM). As substâncias presentes em **FB3** foram isoladas por cromatografia preparativa utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) e caracterizadas por meio de experimentos de espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A **FAE** e a subfração **FB3** foram avaliadas quanto à atividade antifúngica e citotoxicidade frente a macrófagos (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 – Delineamento experimental do presente trabalho.



Legenda: **FAE**: fração acetato de etila; CLAE/EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a massas; RMN: espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Fonte: Elaborado pela autora.



## 4.2 TÉCNICAS GERAIS

### 4.2.1 Instrumentação

Os experimentos de RMN e CLAE/EM foram realizados na Universidade de Buenos Aires (UBA) - Argentina, sob orientação da Dra. Gabriella M. Cabrera.

As análises de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais (COSY, NOESY, HSQC e HMBC) foram realizadas em equipamentos Bruker Fourier (300 MHz e 500 MHz), tendo como referência interna o próprio solvente. O solvente utilizado foi metanol deuterado (MeOD). Os valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz. A análise dos espectros foi realizada através do software MestRenova® versão 7.0.0-8331.

Para a análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à massas (CLAE/EM) foi utilizado equipamento RRLC Agilent 1200 com coluna Luna C18 (3  $\mu\text{m}$ , 2,0 x 100 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A detecção foi realizada com detector de arranjo de diodos (DAD) de 270 a 320nm nm e detector de massas. As análises de massas foram realizadas em espectrômetro de massa Bruker MicrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), equipado com fonte de eletropulverização no modo negativo e analisador quadrupolo-tempo de voo. O instrumento foi operado a uma tensão capilar de 4,5 kV com um deslocamento da placa final de 500 V, temperatura seca de 200 °C usando  $\text{N}_2$  como gás seco a 6,0 L/min e pressão do nebulizador de 3,0 bar. A calibração de massa multiponto foi realizada usando uma solução de formiato de sódio de  $m/z$  50 a 1200 no modo negativo. A aquisição e o processamento dos dados foram realizados no software Bruker Compass Data Analysis versão 4.3, fornecido com o instrumento.

### 4.2.2 Técnicas cromatográficas

Para o fracionamento e o isolamento de componentes das folhas de *X. prockia* foram utilizados métodos cromatográficos como cromatografia em coluna à vácuo utilizando sílica gel G60 (Merck®) como suporte, cromatografia em coluna clássica (CCC) utilizaram sílica gel (70-230 mesh) (Merck®) como suporte e cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando equipamento Thermo Separations P100 com coluna preparativa YMC RP C18 (5 µm, 2,5 x 22,5 cm).

As colunas a vácuo e clássica foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 (MACHEREY-NAGEL®), visualização em luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) e/ou revelação através de pulverização com vanilina fosfórica seguida de aquecimento. A CLAE foi monitorada com detector UV Micrometrics, modelo 787, e detector de índice de refração Shodex RI-71.

#### **4.2.3 Solventes**

Os solventes utilizados foram adquiridos das empresas Neon, Vetec e/ou Tedia. Quando necessário, solventes foram purificados seguindo métodos descritos por Armarego e Perrin (1987).

### **4.3 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO**

#### **4.3.1 Material vegetal**

Folhas de *X. prockia* foram coletadas no município de Governador Valadares – MG, identificadas pelo botânico Ronaldo Marquete (Jardim Botânico do Rio de Janeiro) e depositadas sob o número RB 773293 no Herbário RB (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ). O presente trabalho foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob o número de registro A66F830.

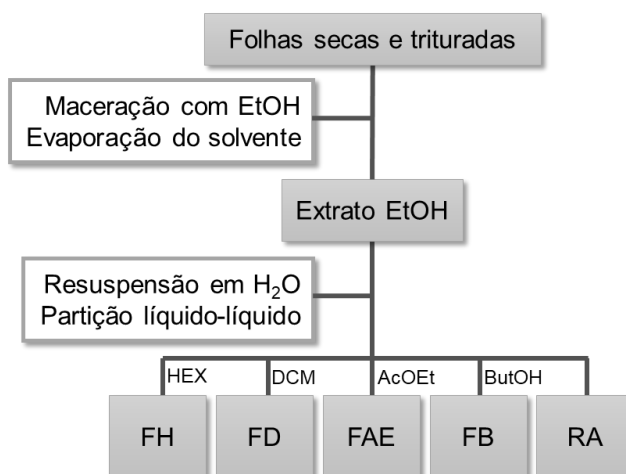
#### **4.3.2 Preparação do extrato**

Após triagem para eliminação de materiais estranhos, o material vegetal foi seco em estufa de ar circulante sob temperatura inferior a 40 °C, moído em moinho de facas e submetido à maceração com etanol 96 °GL. Após 4 dias, o extrato foi filtrado e o solvente removido sob pressão reduzida em temperatura inferior a 45 °C, sendo o processo extrativo repetido por mais três vezes.

### 4.3.3 Fracionamento do extrato etanólico

O extrato etanólico (EE) foi ressuspensionado em água e submetido à partição com solventes de polaridade crescente. Para tanto, foram empregados *n*-hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH) (Fluxograma 2). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura de 45 °C. A fração AcOEt foi denominada **FAE** e foi caracterizada por CLAE/EM.

Fluxograma 2 - Esquema do fracionamento do extrato etanólico de *X. prockia*.



Legenda: FH: fração hexano; FD: fração diclorometano; **FAE**: fração acetato de etila; FB: fração butanólica; RA: resíduo aquoso. Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.3.4 Fracionamento de FAE e isolamento

A **FAE** (16 g) foi submetida à cromatografia em coluna à vácuo empacotada com sílica gel G60 (Merck®), utilizando como fase móvel frações de 200 mL de AcOEt puro, seguido de AcOEt com proporções crescentes de MeOH, sendo finalizada com 800 mL de MeOH puro. As frações foram coletadas a cada passagem de 200 mL da fase móvel, obtendo-se ao final do processo 10 frações, que foram agrupadas de acordo com sua semelhança cromatográfica, resultando em 4 frações finais (**F1-F4**) (Fluxograma 3).

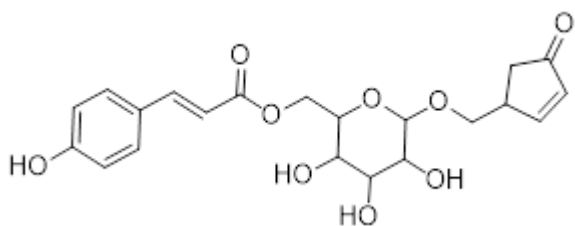
A fração **F3**, foi então submetida à CCC empacotada com a sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e a combinação de DCM:AcOEt (90:10 v/v) como fase

móvel. A coluna com **F3** deu origem a 5 frações (**FA1-FA5**), reunidas de acordo com sua semelhança cromatográfica. A fração **FA3** foi submetida a nova CCC, utilizando as mesmas condições cromatográficas anteriores, originando ao final 6 subfrações (**FB1-FB6**).

A subfração **FB3** foi submetida à CLAE com coluna preparativa para o isolamento dos constituintes. O isolamento foi realizado em cromatógrafo Thermo Separations P100 (Thermo Separation Products, San Jose, CA) equipado com coluna preparativa YMC RP C18 (5 µm, 2,5 x 22,5 cm). A fase móvel consistiu em 80% de água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e 20% de acetonitrila (B). O fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min e a coluna foi mantida em temperatura ambiente (25 °C). A detecção foi realizada com um detector UV Micrometrics, modelo 787, de longitude de onda variável e um detector de índice de refração Shodex RI-71, conectados em série com injetor manual do tipo Rheodyne. O procedimento levou ao isolamento de 5 substâncias que foram identificadas com letras (**D, E, F, G e H**) O processo de fracionamento pode ser observado na Fluxograma 3.

A subfração **FB3** foi caracterizada por CLAE/EM utilizado equipamento RRLC Agilent 1200 com coluna Luna C18 e fase móvel composta por 85% de água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e 15% de acetonitrila (B). O fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 30 °C. As substâncias isoladas (**D, E, F, G e H**) foram caracterizadas por CLAE/EM e RMN.

#### **Substância D** - *E*-cumaroil-6'-O-β-D-glicosideo-4-oxo-2-ciclopentenilmetila



**[α]<sup>25</sup><sub>D</sub>**: +17.15 (c 0.6, MeOH)

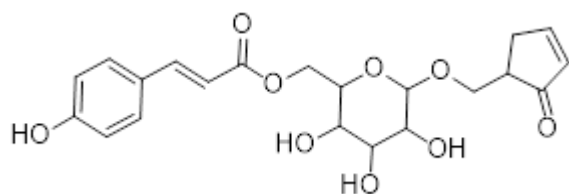
**NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD)**: δ = 7,85 (dd, *J* = 5,69 e 2,51 Hz, H-2''), 7,63 (d, *J* = 15,94 Hz, H-7), 7,46 (d, *J* = 8,54 Hz, H-2 e H-6), 6,81 (d, *J* = 8,54 Hz, H-3 e H-5), 6,36 (d, *J* = 15,94 Hz, H-8), 6,15 (dd, *J* = 5,69 e 2,23 Hz, H-3''), 4,50 (dd, *J* = 11,80 e 2,25 Hz, H-6a'), 4,35 (dd, *J* = 11,80 e 6,11 Hz, H-6b'), 4,31 (d, *J* = 7,86 Hz, H-1'), 3,91 (dd, *J* = 9,79 e 6,38 Hz, H-6a''), 3,64 (dd, *J* = 9,79 e 6,38 Hz, H-6b''), 3,53 (m, H-4'), 3,39 (d, *J* = 8,89 Hz, H-2'), 3,35 (m, H-3'), 3,31 (m, H-1''), 3,21 (t, *J* = 16,79, 3,25 Hz, H-5'), 2,45 (dd, *J* = 19,06 e 6,76 Hz, H-5a''), 2,19 (dd, *J* = 19,06 e 2,57 Hz, H-5b'')

**NMR <sup>13</sup>C (126 MHz, MeOD):** δ = 212,4 (C-4''), 169,1 (C-9), 168,8 (C-2''), 161,4 (C-4), 146,8 (C-7), 135,3 (C-3''), 131,2 (C-2, C-6), 127,1 (C-1), 116,9 (C-3, C-5), 114,9 (C-8), 104,7 (C-1'), 77,9 (C-2), 75,5 (C-4'), 75,0 (C-5'), 72,7 (C-6''), 71,8 (C-3'), 64,5 (C-6'), 43,7 (C-1''), 38,9 (C-5'').

**Tempo de retenção:** ≈ 13,6; coluna: Luna C18, fase móvel: água ultrapura: acetonitrila (v/v 85:15) com 0,1% de ácido fórmico.

**ESI-MS m/z (modo negativo):** calc. para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>, 419,1348; obtido 419,3105 [M - H]<sup>-</sup>.

**Substância E - E-cumaroil-6'-O-β-D-glicosideo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila**



**[α]<sup>25</sup><sub>D</sub>:** -23,41 (c 0.6, MeOH)

**NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD):** δ = 7,85 (dt, 5,67 e 2,70 Hz, H-4''), 7,66 (d, J = 15,94 Hz, H-7), 7,47 (d, J = 8,83 Hz, H-2 e H-6), 6,82

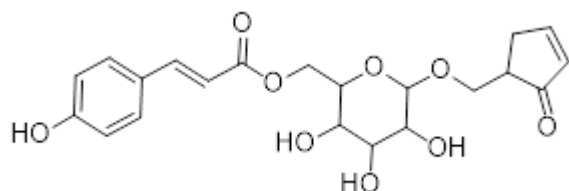
(d, J = 8,83 Hz, H-3 e H-5), 6,38 (d, J = 15,94 Hz, H-8), 6,13 (dt, J = 5,67 e 2,13 Hz, H-3''), 4,47 (dd, J = 11,85 e 2,24 Hz, H-6a'), 4,32 (dd, J = 11,85 e 5,80 Hz, H-6b'), 4,29 (d, J = 7,86 Hz, H-1'), 3,97 (dd, J = 9,91 e 6,83 Hz, H-6a''), 3,86 (dd, J = 7,97 e 6,83 Hz, H-6b''), 3,49 (ddd, J = 9,40, 5,91 e 2,22 Hz, H-5'), 3,38 (m, H-4'), 3,36 (t, J = 15,28 e 7,6 Hz, H-3'), 3,18 (t, J = 16,85, 8,37 Hz, H-2'), 2,88 (m, H-5a''), 2,80 (m, H-5b''), 2,65 (m, H-1'').

**NMR <sup>13</sup>C (126 MHz, MeOD) δ** 212,4 (C-2''), 169,1 (C-9), 167,6 (C-4''), 161,3 (C-4), 146,8 (C-7), 134,2 (C-3''), 131,2 (C-2, C-6), 127,1 (C-1), 116,8 (C-3, C-5), 115,0 (C-8), 104,6 (C-1'), 77,9 (C-4'), 75,4 (C-5'), 74,9 (C-2'), 71,6 (C-3'), 70,3 (C-6''), 64,6 (C-6'), 47,0 (C-1''), 34,6 (C-5'').

**Tempo de retenção:** ≈ 16,3; coluna: Luna C18, fase móvel: água ultrapura: acetonitrila (v/v 85:15) com 0,1% de ácido fórmico.

**ESI-MS m/z (modo negativo):** calc. para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>, 419,1348; obtido 419,2881 [M - H]<sup>-</sup>.

**Substância F - E-cumaroil-6'-O-β-D-glicosideo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila**



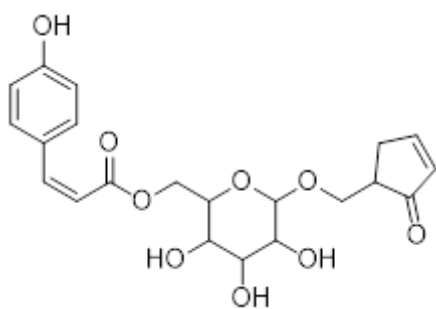
**NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD):** δ = 7,87 (dt, 5,44 e 2,66 Hz, H-4''), 7,66 (d, J = 15,97 Hz, H-7), 7,49 (d, J = 8,63 Hz, H-2 e H-6), 6,83

(d,  $J = 8,63$  Hz, H-3 e H-5), 6,38 (d,  $J = 15,97$  Hz, H-8), 6,14 (dt,  $J = 5,44$  e  $1,95$  Hz, H-3''), 4,53 (dd,  $J = 11,86$  e  $2,16$  Hz, H-6a'), 4,36 (dd,  $J = 11,86$  e  $6,10$  Hz, H-6b'), 4,31 (d,  $J = 7,77$  Hz, H-1'), 4,05 (dd,  $J = 10,00$  e  $4,25$  Hz, H-6a''), 3,82 (dd,  $J = 10,00$  e  $6,70$  Hz, H-6b''), 3,55 (ddd,  $J = 8,74$ ,  $6,07$  e  $2,31$  Hz, H-3'), 3,39 (m, H-4'), 3,37 (m, H-2'), 3,17 (t,  $J = 8,27$  Hz, H-5'), 2,88 (m, H-5a''), 2,80 (m, H-5b''), 2,69 (m, H-1'').

**Tempo de retenção:**  $\approx 17,8$ ; coluna: Luna C18, fase móvel: água ultrapura: acetonitrila (v/v 85:15) com 0,1% de ácido fórmico.

**ESI-MS  $m/z$  (modo negativo):** calc. para  $C_{21}H_{24}O_9$ , 419,1348; obtido 419,3066 [M - H]<sup>-</sup>.

**Substância H - Z-cumaroil-6'-O- $\beta$ -D-glicosideo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila**



**$[\alpha]^{25}_D$ :** -3,65 (c 0.6, MeOH)

**NMR  $^1H$  (500 MHz, MeOD):**  $\delta = 7,82$  (m, H-4''), 7,68 (d,  $J = 8,70$  Hz, H-2 e H-6), 6,90 (d,  $J = 12,82$  Hz, H-7), 6,78 (d,  $J = 8,70$  Hz, H-3 e H-5), 6,14 (m, H-3''), 5,81 (d,  $J = 12,82$  Hz, H-8), 4,50 (m, H-6a'), 4,30 (m, H-6b'), 4,25 (d,  $J = 7,82$  Hz, H-1'), 3,97 (dd,  $J = 10,11$

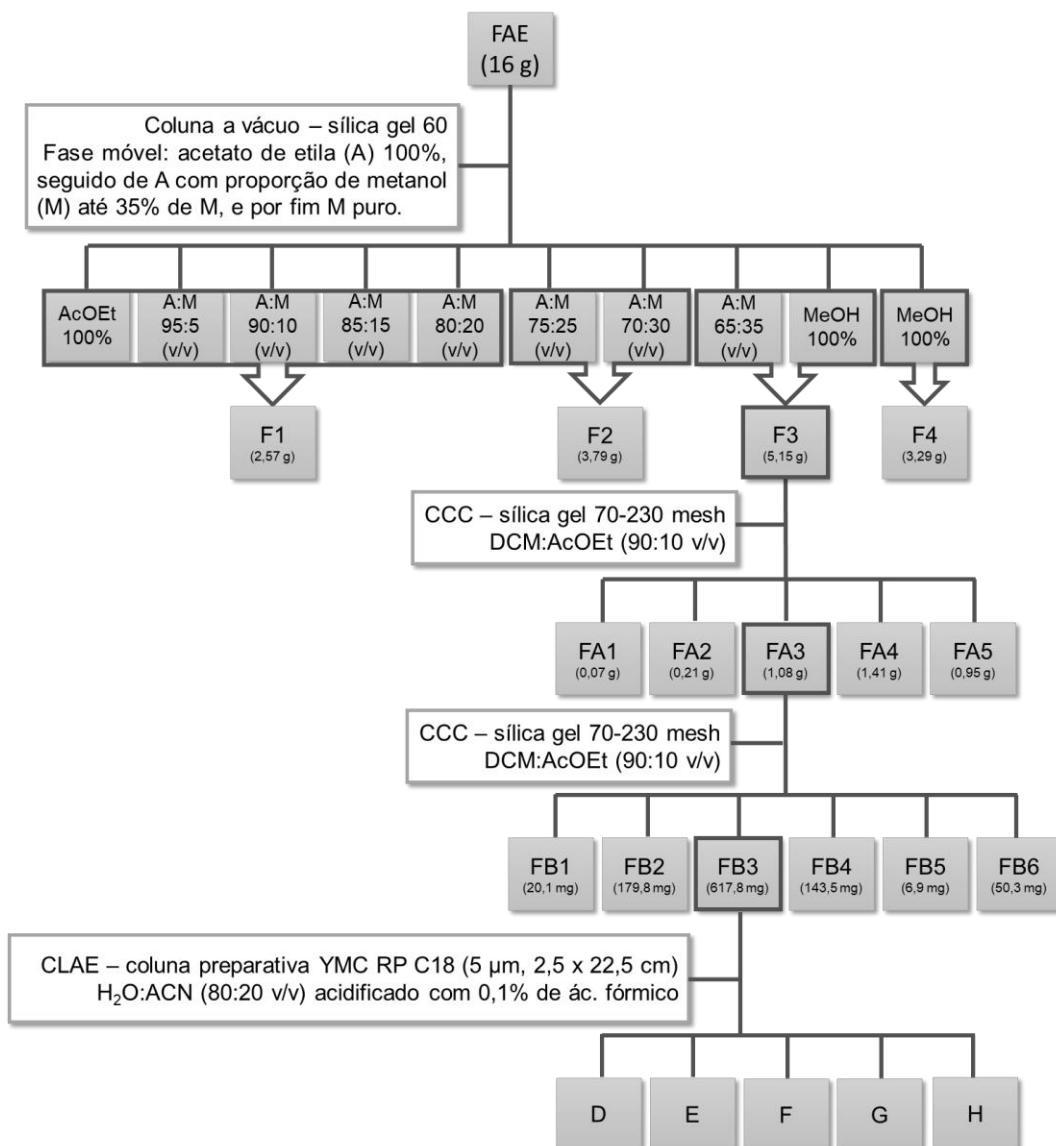
e  $4,51$  Hz, H-6a''), 3,80 (dd,  $J = 10,11$  e  $3,81$  Hz, H-6b''), 3,48 (m, H-4'), 3,35 (m, H-5'), 3,28 (m, H-3'), 3,14 (t,  $J = 8,42$  Hz, H-2'), 2,84 (m, H-5a''), 2,74 (m, H-5b''), 2,63 (m, H-1'').

**NMR  $^{13}C$  (126 MHz, MeOD):**  $\delta = 193,6$  (C-2''), 166,6 (C-9), 166,4 (C-4''), 158,8 (C-4), 143,8 (C-7), 132,8 (C-3''), 132,4 (C-2, C-6), 129,8 (C-1), 114,5 (C-3, C-5), 103,3 (C-1'), 92,52 (C-8), 76,4 (C-5'), 73,9 (C-4'), 73,5 (C-2'), 70,3 (C-3'), 68,9 (C-6''), 62,9 (C-6'), 39,0 (C-1''), 33,2 (C-5'').

**Tempo de retenção:**  $\approx 22,3$ ; coluna: Luna C18, fase móvel: água ultrapura: acetonitrila (v/v 85:15) com 0,1% de ácido fórmico.

**ESI-MS  $m/z$  (modo negativo):** calc. para  $C_{21}H_{24}O_9$ , 419,1348; obtido 419,2793 [M - H]<sup>-</sup>.

Fluxograma 3 - Esquema do processo cromatográfico para isolamento de substâncias presentes em **FAE** das folhas de *X. prockia*.



Legenda: **FAE**: fração acetato de etila; CCC: coluna de cromatografia clássica; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; ACN: acetonitrila; v/v: volume por volume. Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.5.1 Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica, *in vitro*, de **FAE**, **FB3** e substâncias isoladas, foi realizada no Laboratório de Microbiologia da UFJF-GV, coordenado pela Prof. Dra. Gabriela Freitas Ferreira.

A atividade antifúngica das substâncias isoladas foi avaliada frente a linhagens ATCC, ambientais e clínicas de *C. gattii* e *C. neoformans* (Tabela 2), conforme proposto pelo documento M27-A3 do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2008), com modificações. Todas as linhagens utilizadas pertencem à coleção de micro-organismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia da UFMG e foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Microbiologia da UFJF/GV.

Tabela 2 – Linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, utilizadas na avaliação da atividade antifúngica, *in vitro*.

<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>
L28/02 (C)	5396 (C)
196L/03(C)	96806 (C)
1913ER (C)	27JF (C)
L2701 (C)	H99 (C)
LMM818 (C)	WP (C)
L2401 (C)	C-3-1 (A)
547/ OTTI/94-PI-10 (A)	ATCC 28957
ATCC 24065	ATCC 24067
ATCC 32608	ATCC 62066

Legenda: C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection. Fonte: Elaborado pela autora.

O inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas dos fungos e incubados a 35°C, por 48 h em tubos inclinados contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). A suspensão fúngica foi preparada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada. As suspensões foram homogeneizadas em vórtex e a densidade celular foi ajustada a uma turbidez equivalente a 530 nm por meio de uma solução-padrão da escala de Mc Farland 0,5 utilizando NaCl 0,85%, obtendo uma suspensão de células contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A suspensão de trabalho foi preparada a partir da suspensão em salina fazendo-se duas diluições consecutivas



1:50 e 1:20 com meio ASD, resultando em uma concentração de células entre  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células por mL.

Para avaliar o CIM das frações **FAE** e **FB3** de *X. prockia* e dos padrões fluconazol (FLU) e anfotericina B (AMB), foi preparada solução estoque em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1000 mg/mL para cada amostra. Para cada solução estoque inicial foi preparada 10 soluções com concentrações decrescentes, utilizando método de diluição seriada. Dessas soluções 100 µL de foram adicionados à placa de 96 poços estéril e previamente identificada. Em seguida, foram adicionados em cada poço 100 µL do inóculo anteriormente preparado, de forma que a concentração das soluções caísse pela metade.

Como controle de esterilidade das amostras e padrões, foi realizado um controle de crescimento negativo, onde se adicionou 100 µL da menor concentração das soluções e 100 µL de meio ASD, sem adição do inóculo. Como controle de crescimento do inóculo, foi realizado um controle de crescimento positivo, onde se adicionou 200 µL de meio ASD, sem adição de amostras e padrões. Deve-se ressaltar que o esquema de diluição descrito na CLSI assegura que haverá menos de 1% de DMSO em quaisquer dos poços e, portanto, o DMSO não afetará o crescimento, não sendo necessário teste de controle de DMSO.

As placas foram incubadas a 35 °C, sem agitação, por 48 horas. Após a incubação foi realizada a leitura dos resultados observando a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico por meio da alteração da turbidez visível ao olho nu.

#### **4.5.2 Avaliação da citotoxicidade de FAE e FB3**

A citotoxicidade de **FAE** e **FB3** frente a macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio - Sigma, St, Louis, MO, USA). Os experimentos foram realizados no Laboratório Multiusuário de Imunologia e Biologia Celular (UFJF-GV), sob orientação da Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro.

#### 4.5.2.1 *Cultura de RAW 264.7 e J774A.1*

Macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1 foram cultivados em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos essenciais e 0,5% de solução penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL, 10.000 mg/mL, respectivamente). Após atingirem confluência, as garrafas foram raspadas e as células colocadas em placas de 96 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL para o ensaio de viabilidade por MTT. As células foram então incubadas em atmosfera úmida de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

#### 4.5.2.2 *Avaliação da citotoxicidade de **FAE** e **FB3** em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1*

A viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Após 48 horas, o sobrenadante da cultura celular de macrófagos tratados com **FAE** e **FB3** nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 5 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,1 µg/mL foi descartado e 100 µL de RPMI-1640 foi adicionado em todos os poços, seguido de 10 µL de MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorrido o período de 4 horas a reação foi finalizada com a retirada do meio de cultura e adição de 100 µL de DMSO. A leitura foi feita em leitor de microplaca *Multiskan™ FC* Microplate Photometer (adaptado de CASTRO *et al.*, 2012) com comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram inseridos e analisados no programa Prisma 6.0 e considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Para controle foram utilizadas células tratadas com o diluente DMSO.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO

A partir de 711 g de folhas secas de *X. prockia* foram obtidos 150,1 g de extrato etanólico seco (EE) (21,11%). O rendimento das frações obtidas após a partição do EE com solventes em ordem crescente de polaridade é apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Rendimento obtido na partição do extrato etanólico de *X. prockia*.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
FH	31,59	21,05
FD	6,57	4,38
<b>FAE</b>	16,0	10,66
FB	13,47	8,98
RA	2,34	1,56

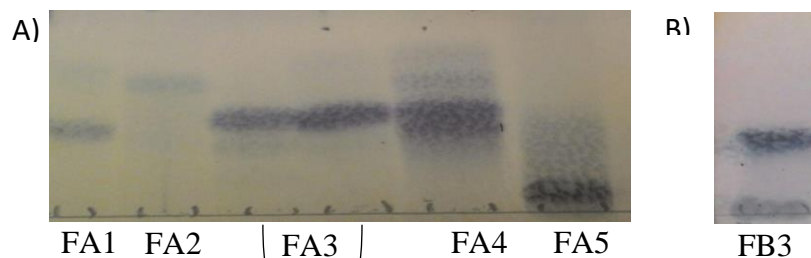
Legenda: FH: fração hexano; FD: fração diclorometano; **FAE**: fração acetato de etila; FB: fração butanólica; RA: resíduo aquoso. Fonte: Elaborado pela autora.

Devido à atividade antifúngica promissora e ao provável ineditismo de algumas substâncias que compõe a **FAE** observados em trabalho recentemente publicado, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Folly et al, 2020), deu-se continuidade ao seu fracionamento a fim de isolar e identificar os metabólitos responsáveis pela atividade observada.

Cerca de 16g de **FAE** foram inicialmente submetidos à cromatografia em coluna à vácuo. A coluna foi eluída com porções de 200 mL de solvente. Inicialmente foi utilizado AcOEt 100% e, na sequência, a mistura AcOEt/MeOH com porções crescentes de MeOH (5% até 35%), sendo finalizada com 100% de metanol (800 mL). Este procedimento gerou 10 frações que foram agrupadas, devido à semelhança cromatográfica, em 4 frações (**F1-F4**).

A fração **F3** (4,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna clássica (CCC) utilizando gel de sílica como fase estacionária e a mistura de solventes DCM:MeOH (9:1, v/v) como fase móvel. Este procedimento deu origem a 5 frações (**FA1-FA5**). Em seguida a fração **FA3** (1,1g) foi submetida à nova CCC utilizando gel de sílica como fase estacionária e a mistura de solventes DCM:MeOH (9:1, v/v) como fase móvel, resultando na obtenção da subfração **FB3** (0,62 g) (Figura 7). Os rendimentos do processo de fracionamento de **FAE** podem ser observados na Fluxograma 4.

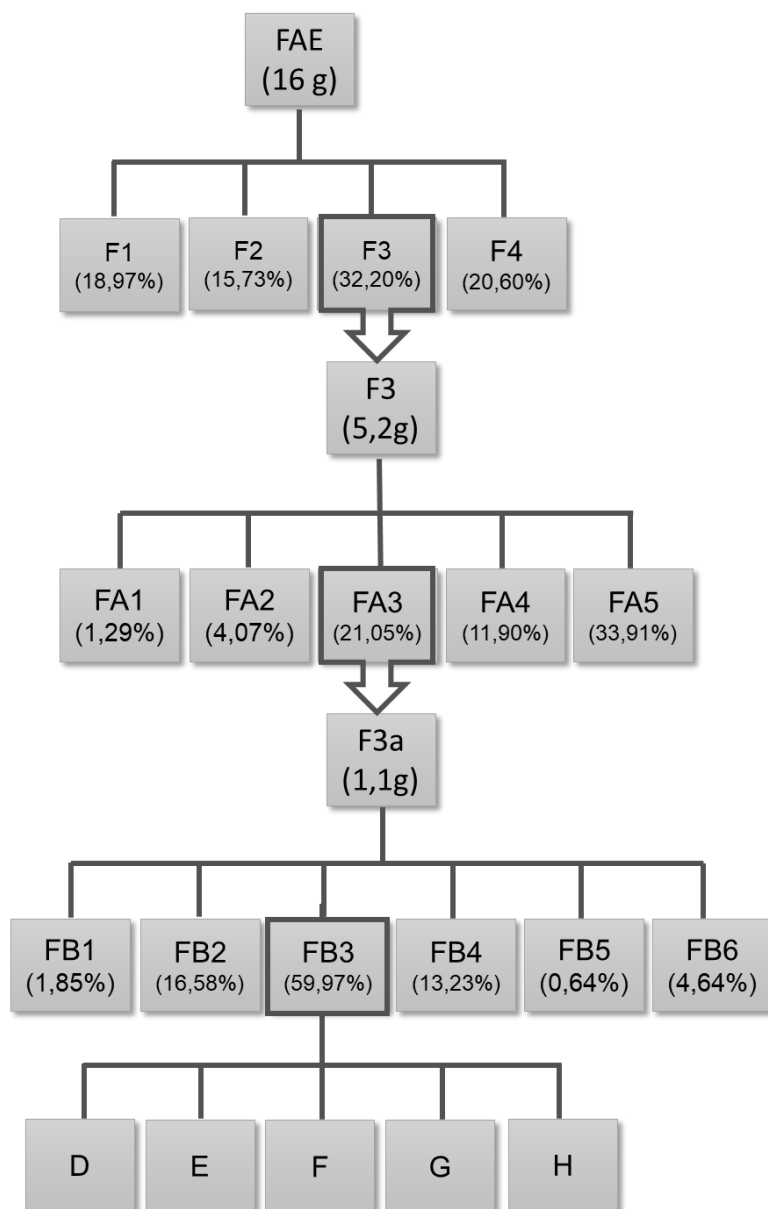
Figura 7 - Análise por CCD das frações obtidas da coluna cromatográfica clássica da fração **FA3**.



Legenda: A) Fase estacionária: Sílica-gel 60G F254; Fase móvel: Ácido acético: H<sub>2</sub>O: AcOEt (5:5:90, v/v/v); B) Fase estacionária: Sílica-gel 60 RP-18 F254; Fase móvel: MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1; v/v). Revelador: vanilina fosfórica e aquecimento (100°C). Fonte: Elaborado pela autora.

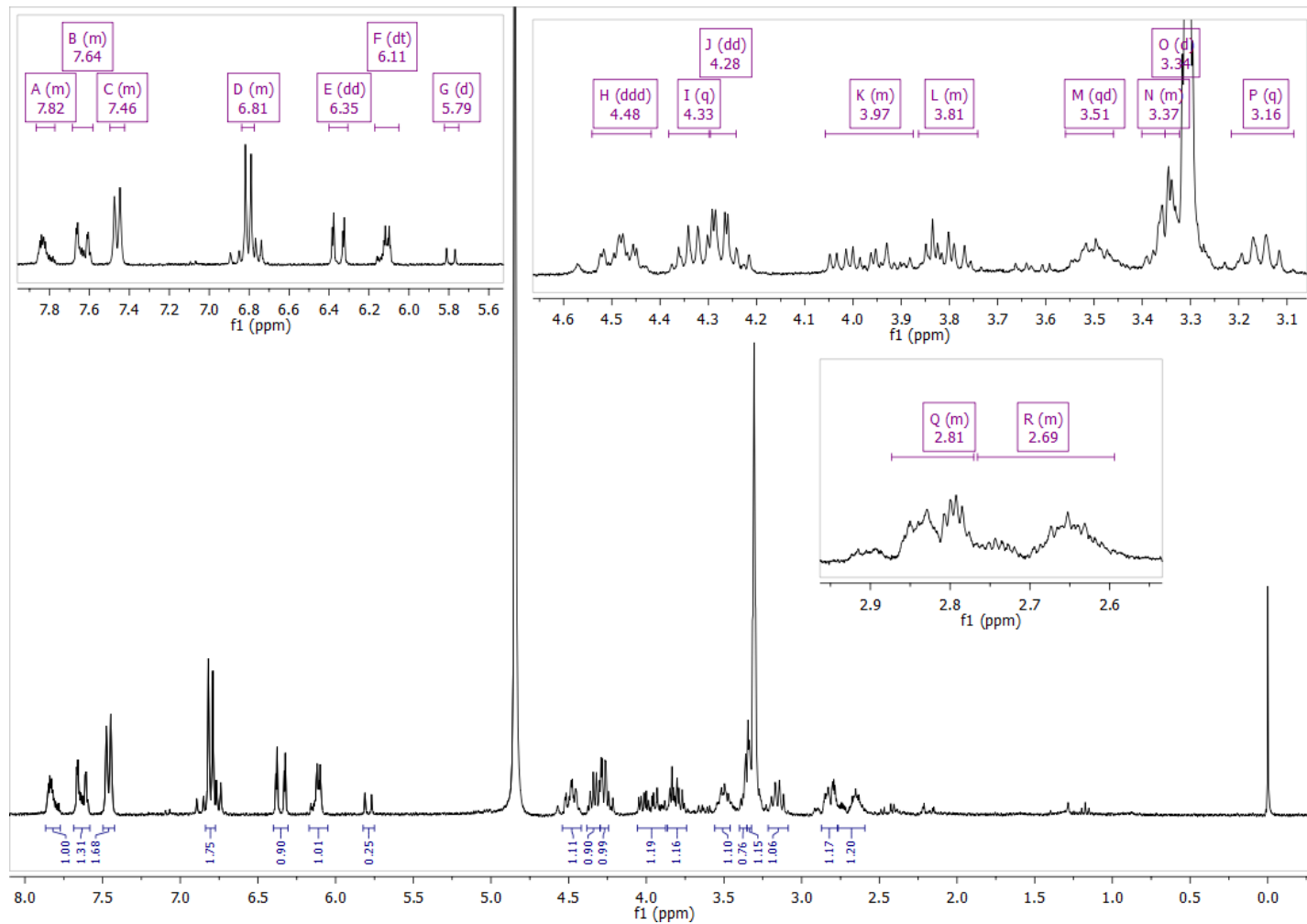
Após separação por CCC, por encontrar-se aparentemente pura, a subfração **FB3** foi submetida à análise de RMN. Entretanto, a análise do espectro <sup>1</sup>H RMN (Figura 8) revelou que esta, provavelmente, se tratava de uma mistura de isômeros. Dessa maneira, a subfração **FB3** foi submetida à separação por CLAE utilizando coluna preparativa YMC RP C18 (5 µm, 2,5 x 22,5 cm), fase móvel 80% de água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e 20% de acetonitrila (B) em um fluxo de 0,5 mL/min e temperatura ambiente. A análise do cromatograma da subfração **FB3** (Figura 9) permitiu observar a presença de 8 picos principais (**A-F**). A partir dessa subfração foi possível isolar 5 substâncias (**D, E, F, G e H** – fluxograma 4) que foram caracterizadas através de métodos espectroscópicos de RMN e espectrometria de massas.

Fluxograma 4 – Esquema do processo cromatográfico de fracionamento de **FAE**.



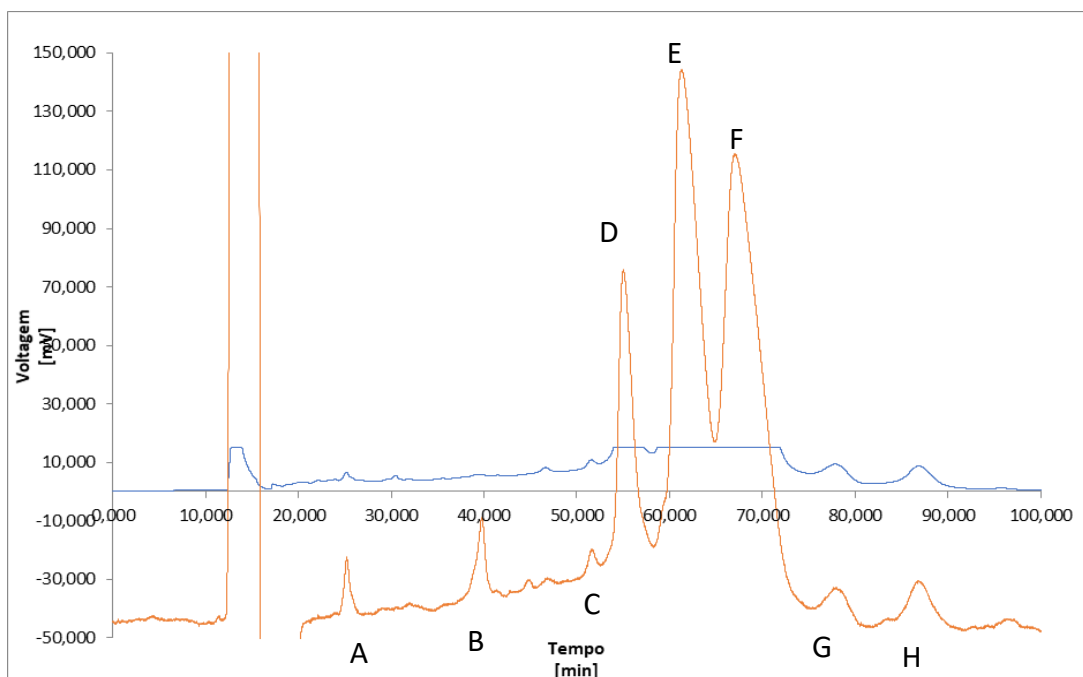
Legenda: **FAE**: fração acetato de etila. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, MeOD) da subfração **FB3**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9 – Perfil cromatográfico da subfração **FB3**, obtido na CLAE preparativa.



Legenda: Linha azul: detector UV (270-320nm) e linha laranja: detector IR. Coluna preparativa YMC RP C18 (5  $\mu\text{m}$ , 2,5 x 22,5 cm), fase móvel: água ultrapura: acetonitrila 80:20 acidificado com 0,1% de ácido fórmico. Fonte: Elaborado pela autora.

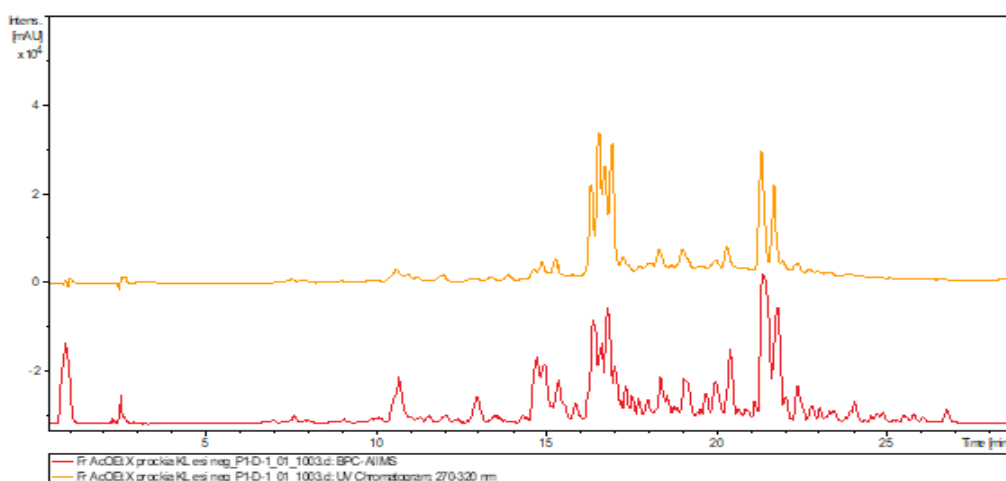
### 5.1.1 Caracterização de FAE

A caracterização de **FAE** de *X. prockia* foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM). O espectro de massas foi realizado em *full scan* no modo negativo, de maneira a verificar as principais relações  $m/z$  presentes em **FAE**.

A espectrometria de massas (EM) envolve a formação e detecção de íons, consistindo então na determinação da relação entre massa e carga ( $m/z$ ) das espécies ionizadas (DE VIJLDER *et al.*, 2018; SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2015). Um dos principais métodos de ionização utilizados em CLAE/EM é a ionização por eletrospray (ESI), uma técnica branda que produz moléculas protonadas (modo positivo,  $[M+H]^+$ ) e desprotonadas (modo negativo,  $[M-H]^-$ ) intactas, gerando poucos fragmentos (DEMARQUE *et al.*, 2016; PAVIA *et al.*, 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). A ESI normalmente é utilizada junto a células de colisão (ou outros métodos) que induzem a fragmentação, gerando espectros  $EM^2$  (EM/EM) que ajudam na identificação de diversas substâncias químicas (DEMARQUE *et al.*, 2016; PAVIA *et al.*, 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

A análise de **FAE** por CLAE/EM no modo negativo permitiu identificar 15 picos majoritários (APÊNDICE I) que foram divididos em três grupos de substâncias devido ao seu perfil de fragmentação. O perfil cromatográfico de **FAE** pode ser observado na Figura 10. A Tabela 4 apresenta os 15 picos majoritários, com suas respectivas massas teórica e experimental, perfis de fragmentação e possível fórmula molecular. A partir da análise dos espectros de massas e comparação com dados da literatura foi possível inferir que **FAE** é composta por derivados do ácido cinâmico reunidos em três grupos distintos de substâncias: I, derivados do ácido cafeoilquínico; II, derivados de cumaroil glicosídeos; III derivados de cafeoil-glicosídeos (Tabela 4). (AMARASINGHE *et al.*, 2007; CLIFFORD *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2010; JAISWAL *et al.*, 2014; OUYANG *et al.*, 2018; PARVEEN, Mehtab; GHALIB, 2012; PAZ, 2017; PUIGVENTÓS *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 10 - Perfil cromatográfico de **FAE** obtido por CLAE/EM no modo negativo.



Legenda: linha amarela: detector DAD (270-320nm); linha vermelha: detector EM. Coluna: C<sub>18</sub> (3 µm, 2.0 x 100 mm), fase móvel: água ultrapura com ácido fórmico 0,1%: acetonitrila 85:15. Fonte: Elaborado pela autora.



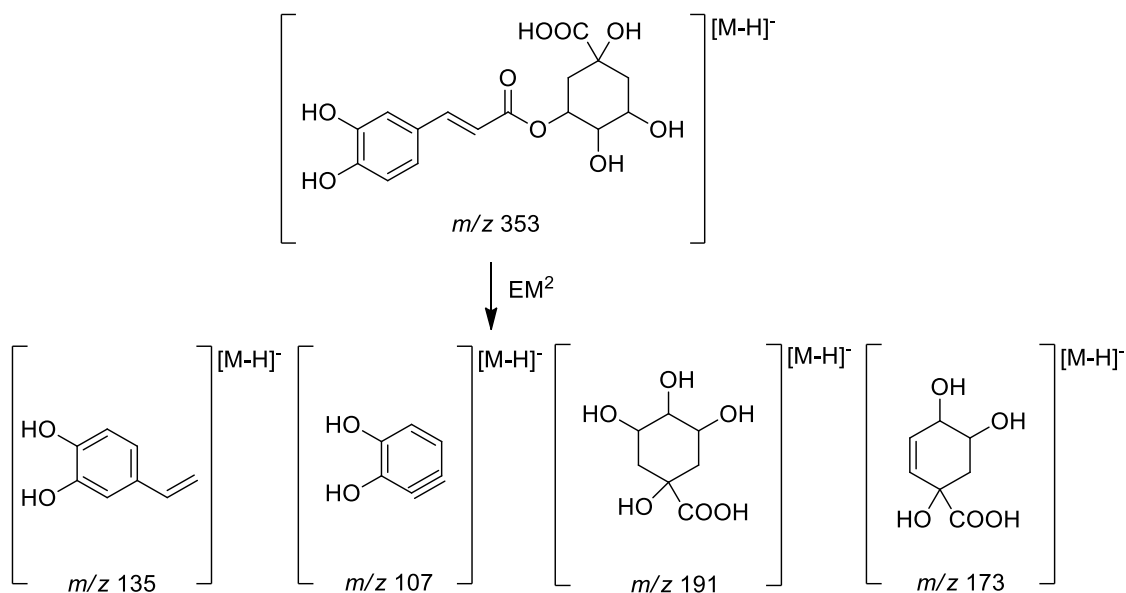
Tabela 4 - Derivados do ácido hidroxicinâmico identificados por CLAE/EM em **FAE** de *X. prockia*.

Número	Grupo*	Tr (min)	Fórmula molecular	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) calculado	Error (ppm)	Íons produzidos (intensidade relativa)
<b>XP1</b>	III	10,1	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	341,0876	341,0878	0,5	135(100), 179(60), 161(55)
<b>XP2</b>	I	10,7	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,0894	353,0878	-4,6	191(100), 179(70), 135(20)
<b>XP3</b>	I	10,9	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,0862	353,0878	4,7	191(100)
<b>XP4</b>	II	11,0	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	325,0920	325,0929	2,9	119(100), 145(50), 163(30)
<b>XP5</b>	II	12,1	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	325,0941	325,0929	-3,9	119(100), 145(50), 163(30)
<b>XP6</b>	III	14,7	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	435,1302	435,1297	-1,3	281(60), 179(80), 161(100)
<b>XP7</b>	III	15,0	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	435,1307	435,1297	-2,3	281(60), 179(80), 161(100)
<b>XP8</b>	III	15,4	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	435,1304	435,1297	-1,7	281(60), 179(80), 161(100)
<b>XP9</b>	II	16,4	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	419,1342	419,1348	1,3	265(100), 205(60), 163(55), 145(50), 235(25)
<b>XP10</b>	II	16,6	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	419,1350	419,1348	-0,7	265(100), 205(60), 163(55), 145(50), 235(25)
<b>XP11</b>	I	16,8	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	515,1412	515,1406	0,3	353(85), 191(100), 179(50), 135(15)
<b>XP12</b>	II	17,3	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	419,1364	419,1348	-4,0	265(100), 205(60), 163(55), 145(50), 235(25)
<b>XP13</b>	I	18,3	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515,1190	515,1195	0,9	353(100), 335(1), 191(30), 179(56), 173(72)
<b>XP14</b>	III	21,3	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	581,1867	581,1876	1,3	161(100), 435(54), 487(43), 179(34), 203(30), 427(17), 235(10)
<b>XP15</b>	III	21,7	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	581,1877	581,1876	-0,3	161(100), 435(54), 487(43), 179(34), 203(30), 427(17), 235(10)

Legenda: \*Grupo I: derivados do ácido cafeoilquínico; Grupo II: derivados de cumaroil glicosídeos; Grupo III: derivados de cafeoil-glicosídeos; Tr: tempo de retenção. Fonte: Elaborado pela autora.

Como mencionado, sugere-se que as substâncias do grupo I (substâncias **XP2**, **XP3**, **XP11** e **XP13**) com tempos de retenção 10,7, 10,9, 16,8 e 18,3 minutos, respectivamente, sejam derivados do ácido cafeoilquínico. O ácido cafeoilquínico é resultado da união de um ácido cafeico a um ácido quínico através de uma ligação éster. A fragmentação dessas substâncias apresenta íons característicos, como  $m/z$  191 e  $m/z$  173 relativos a porção do ácido quínico e  $m/z$  179,  $m/z$  135 e  $m/z$  107 relativos à parte cafeica (Figura 11) (CLIFFORD *et al.*, 2003; JAISWAL *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 11 - Perfil de fragmentação proposto para o ácido cafeoilquínico.



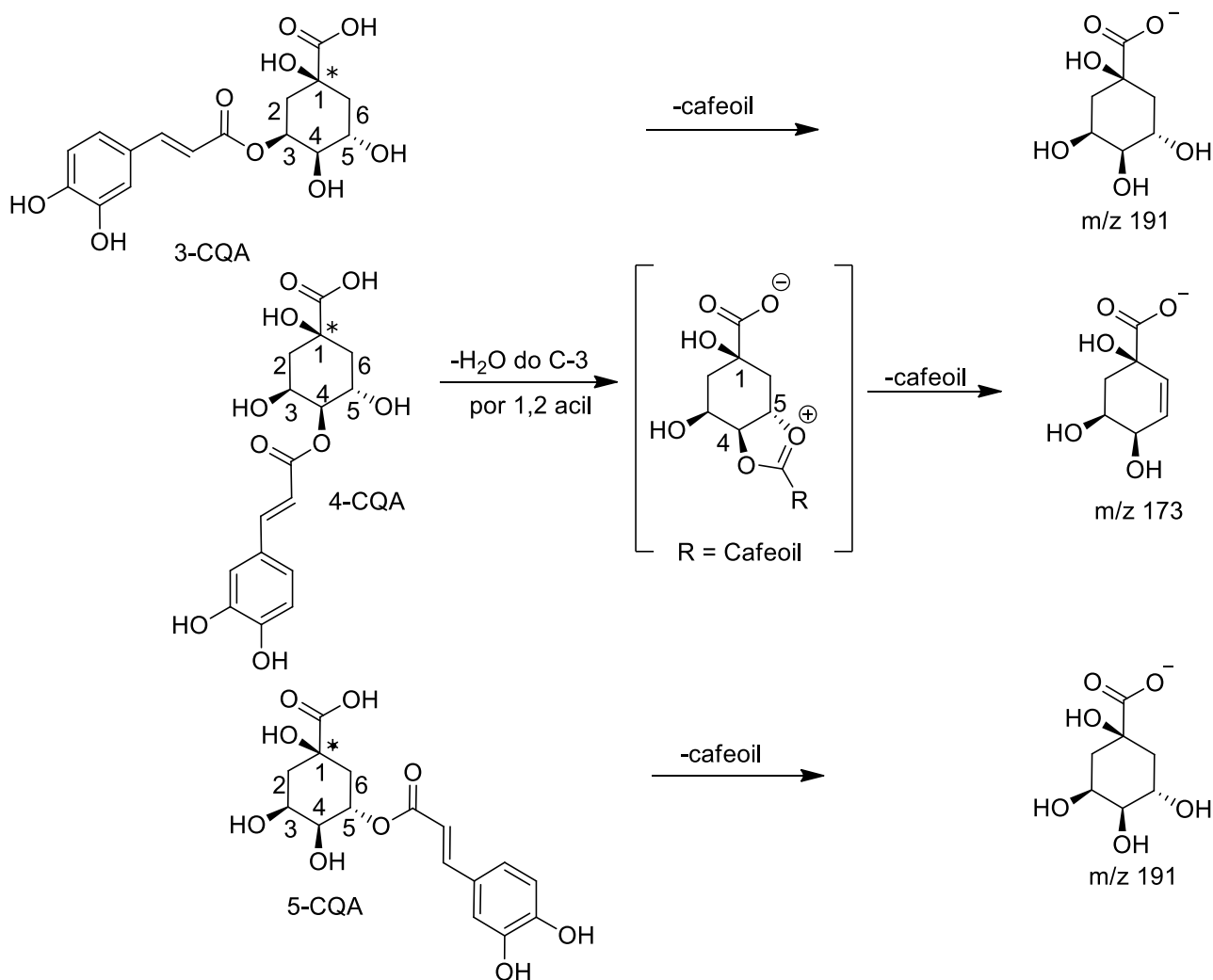
Fonte: Elaborado pela autora.

As substâncias **XP2** e **XP3** apresentaram massa e fragmentos clássicos do ácido cafeoilquínico, sendo possivelmente isômeros. As duas substâncias possuem molécula desprotonada  $[M-H]^-$  com  $m/z$  353 condizente com a fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_9$ . **XP2** apresenta pico base em  $m/z$  191 e fragmentos intensos em  $m/z$  179 e  $m/z$  135, enquanto a **XP3** apresenta apenas o pico base em  $m/z$  191 (Figura II e III – APÊNDICE I).

O ácido cafeoilquínico possui 3 isômeros principais, o 3-cafeoilquínico (3-CQA), o 4-cafeoilquínico (4-CQA) e o 5-cafeoilquínico (5-CQA). O isômero 4-CQA é de fácil distinção uma vez que apresenta como pico base o íon  $m/z$  173, que é gerado por desidratação e por perda do ácido quínico. Já os isômeros 3-CQA e 5-CQA apresentam o mesmo pico base, sendo ele o íon  $m/z$  191 gerado pela perda do ácido

quínico (Figura 12). Adicionalmente, os isômeros 4-CQA e 5-CQA apresentam íon  $m/z$  135 característico, não observado em 3-CQA (OUYANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018). Dessa maneira, com base no padrão de fragmentação e na presença do íon  $m/z$  135, sugere-se que as substâncias **XP2** e **XP3** sejam os isômeros 5-CQA e 3-CQA, respectivamente.

Figura 12 – Perfil de fragmentação proposto para os isômeros do ácido cafeoilquínico.

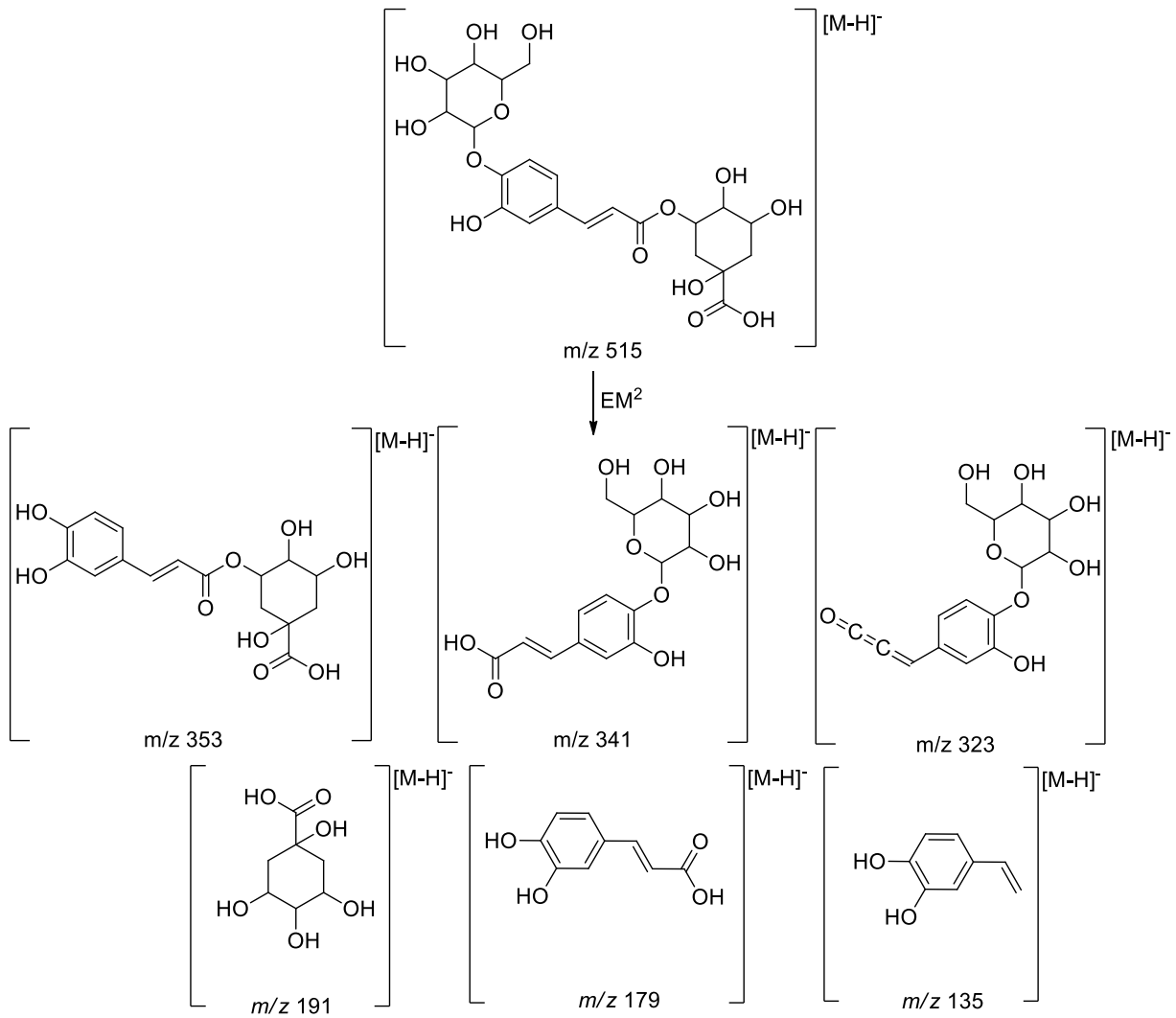


Fonte: adaptado de Clifford *et al.*, 2003.

A substância **XP11** apresentou  $[M-H]^-$   $m/z$  515,1412, fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub> e fragmentos intensos em  $m/z$  353,  $m/z$  191,  $m/z$  179 e  $m/z$  135, condizente com a presença do ácido cafeoilquínico e de uma glicose. O íon  $m/z$  353 é formado pela perda do açúcar. Quando a porção glicosil encontra-se ligada ao cafeoil, os íons  $m/z$  341 e  $m/z$  323 são formados (Figura 13). Como os dois íons não estão presentes

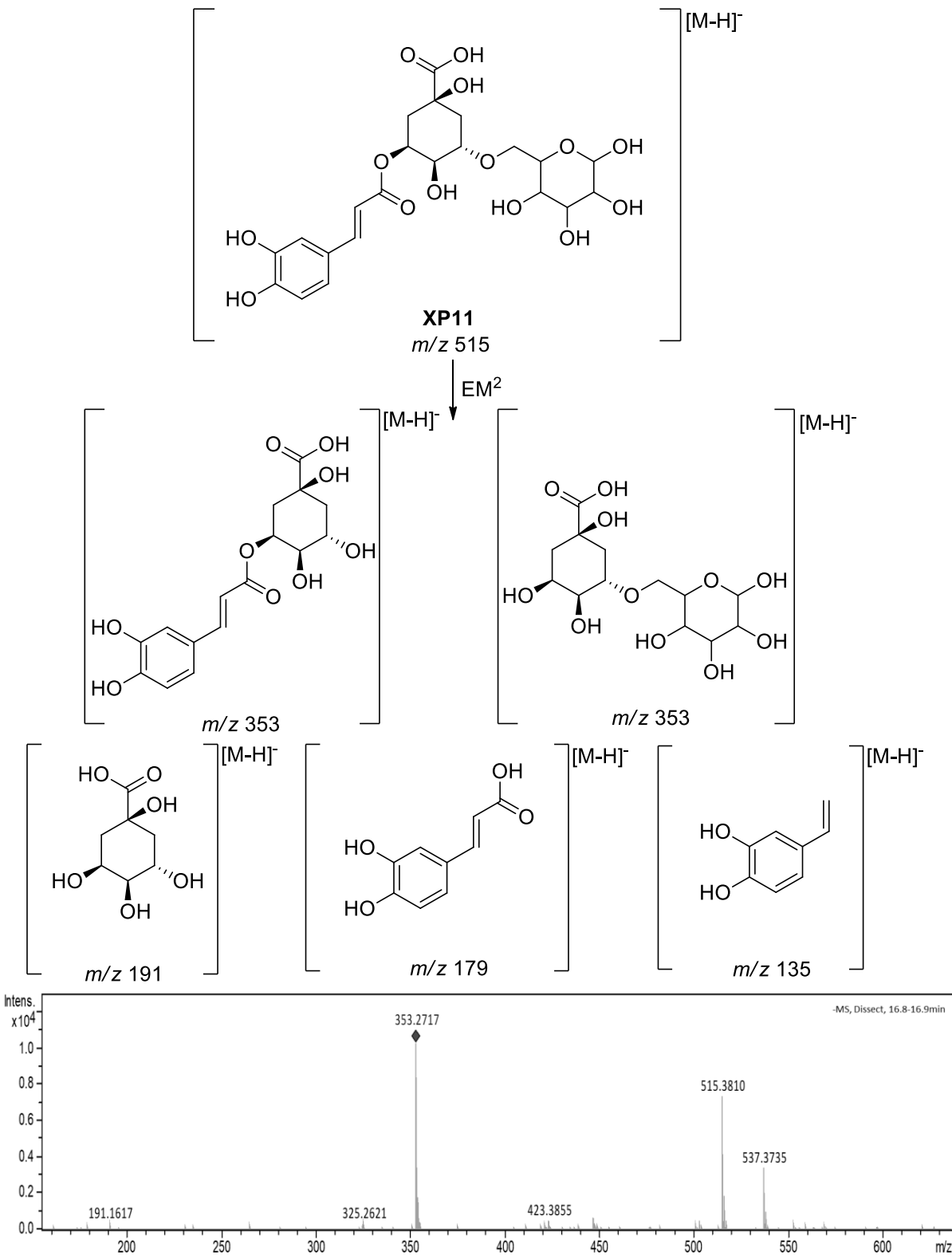
na análise de massas, sugere-se que a porção glicosil esteja ligada ao ácido quínico (JAISWAL *et al.*, 2014). Adicionalmente, uma vez que a substância **XP11** apresenta perfil de fragmentação similar ao 5-CQA, ela foi identificada como ácido 5-cafeoil glicosil quínico (Figura 14) (JAISWAL *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 13 – Perfil de fragmentação proposto para o ácido cafeoil glicosil quínico.



Fonte: adaptado de Jaiswal *et al.*, 2014.

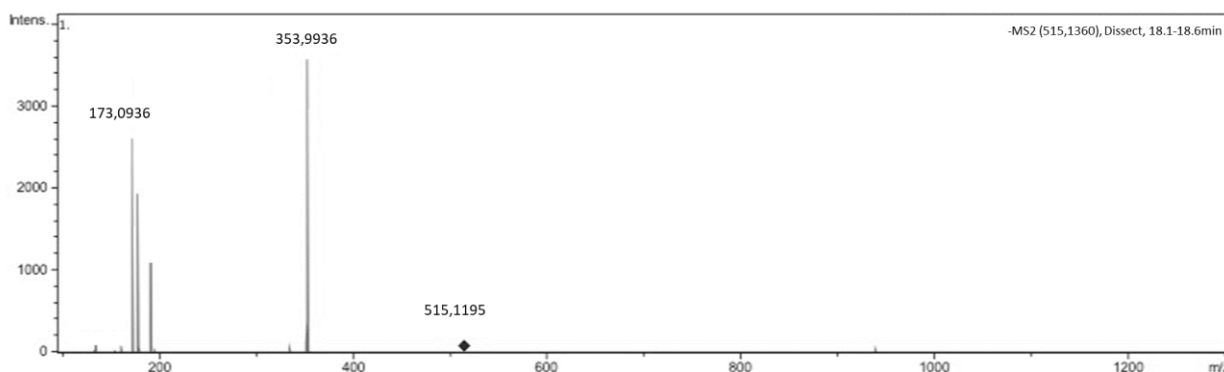
Figura 14 – Perfil de fragmentação e espectro de massas de **XP11** (ácido 5-cafeoil glicosil quínico).

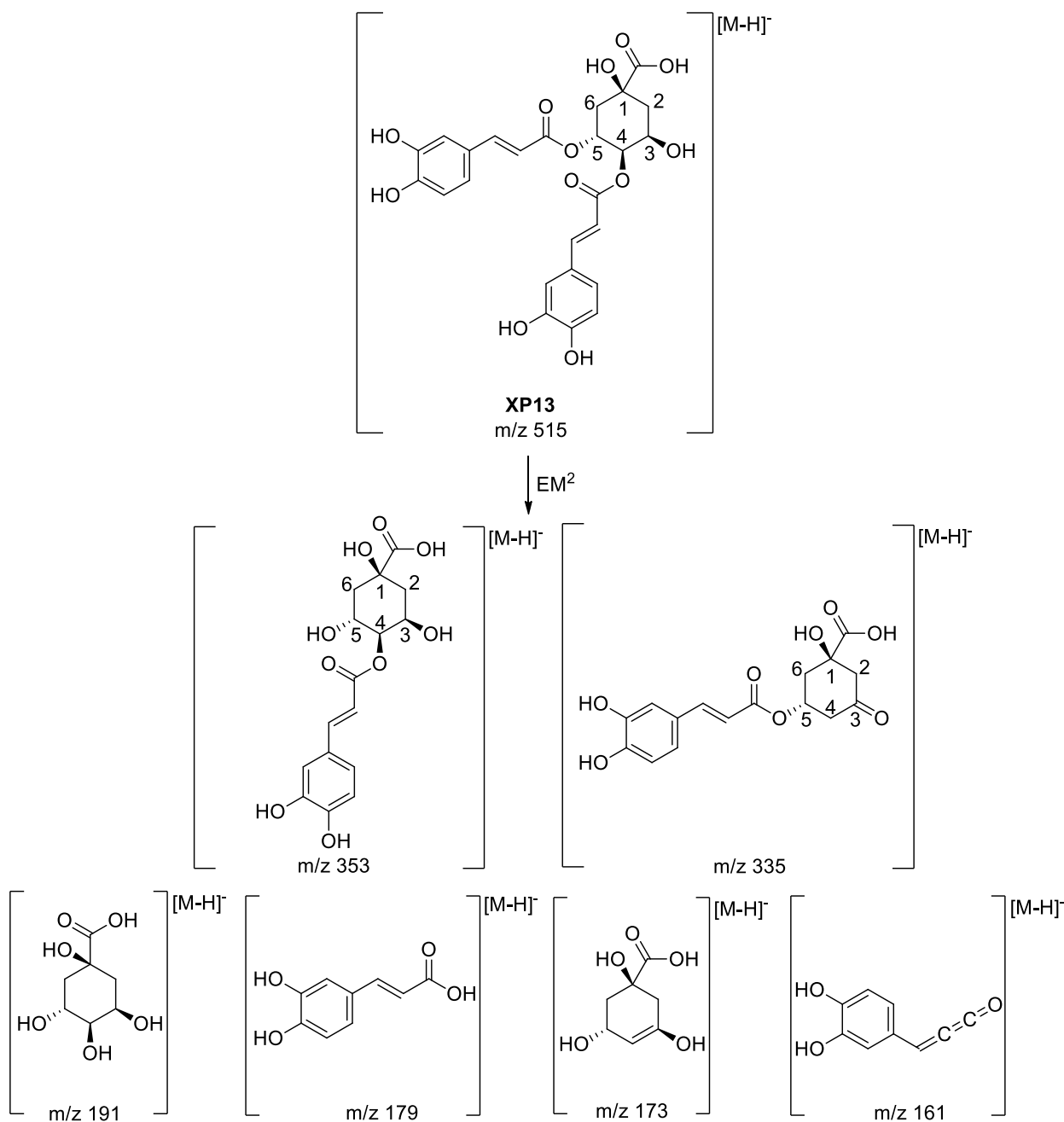


Fonte: Elaborado pela autora.

A substância **XP13**, por sua vez, apresentou  $[M-H]^-$   $m/z$  515,1195, fórmula molecular  $C_{25}H_{24}O_{12}$  e íons de fragmentos intensos em  $m/z$  353,  $m/z$  335,  $m/z$  191,  $m/z$  179 e  $m/z$  173, condizente com ácido dicafeoilquínico (di-CQA). Isômeros di-CQA apresentam como característica  $[M-H]^-$   $m/z$  515 e fragmento com  $m/z$  353 semelhantes aos monoacil-CQA. O isômero 3,4-diCQA apresenta íon fragmento  $m/z$  335 com intensidade próxima a 20, o isômero 4,5-diCQA apresenta intensidade baixa (próxima de 2) para íon  $m/z$  335 e o isômero 3,5-diCQA não o apresenta o íon  $m/z$  335 (HE *et al.*, 2010; PARVEEN; GHALIB, 2012). A presença do fragmento  $m/z$  173 confirma a presença da substituição na posição 4 do ácido quínico, como apresentado anteriormente na Figura 13. Através de comparação com dados da literatura, pode inferir que **XP13** se trata do ácido 4,5-dicafeoilquínico (Figura 15).

Figura 15 – Espectro de massas e perfil de fragmentação proposto para a **XP13** (ácido 4,5-dicafeoilquínico).



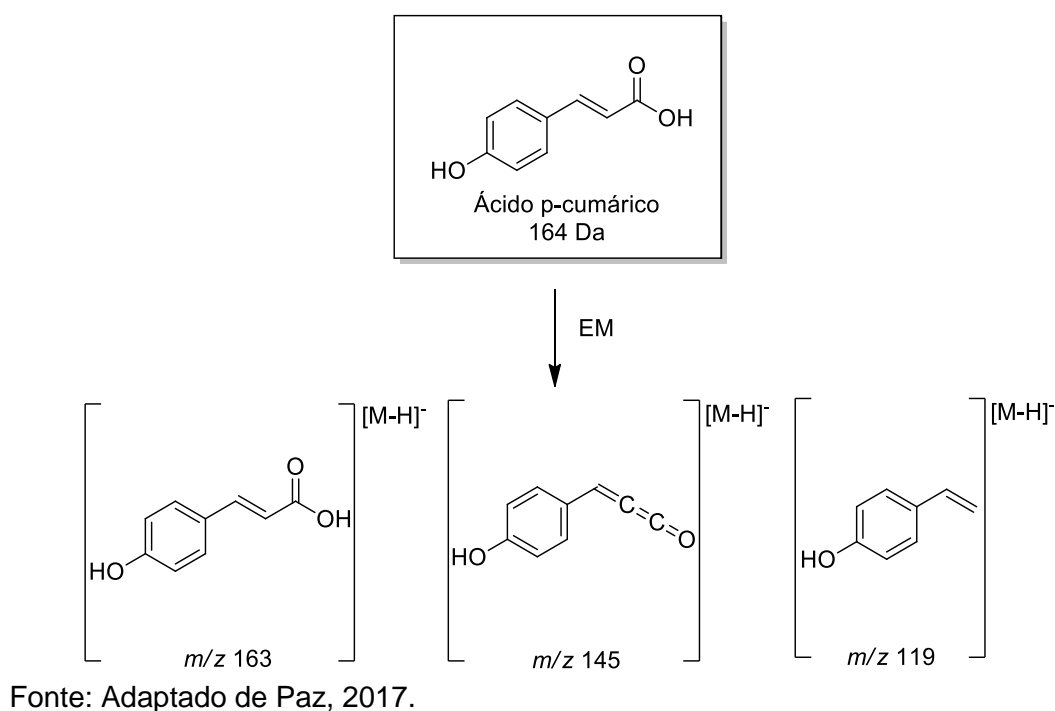


Fonte: Perfil de fragmentação - adaptado de Zhang *et al.*, 2018. Espectro de massa -  
Elaborado pela autora.

As substâncias do grupo II (substâncias **XP4**, **XP5**, **XP9**, **XP10** e **XP12**) com tempos de retenção 11, 12,1, 16,4, 16,6 e 17,3 minutos, respectivamente, foram identificadas como derivados cumaroil glicosídeos. Os cumaroil glicosídeos são metabólitos que possuem em sua estrutura um ácido cumárico ligado a um açúcar através de uma ligação éster. Esse grupo de substâncias apresenta fragmentação característica com íons  $m/z$  163,  $m/z$  145 e  $m/z$  119, relativos ao ácido cumárico. O

íon de  $m/z$  163 é gerado pela fragmentação da ligação C-O da carbonila do éster ligado ao açúcar e corresponde ao ácido cumárico. A presença do ácido cumárico foi confirmada pelo íon  $m/z$  119, gerado pela perda de  $\text{CO}_2$  (Figura 16), que é frequente na maioria dos ácidos fenólicos em seus espectros de varredura no modo de íons negativo (PAZ, 2017; PUIGVENTÓS *et al.*, 2015).

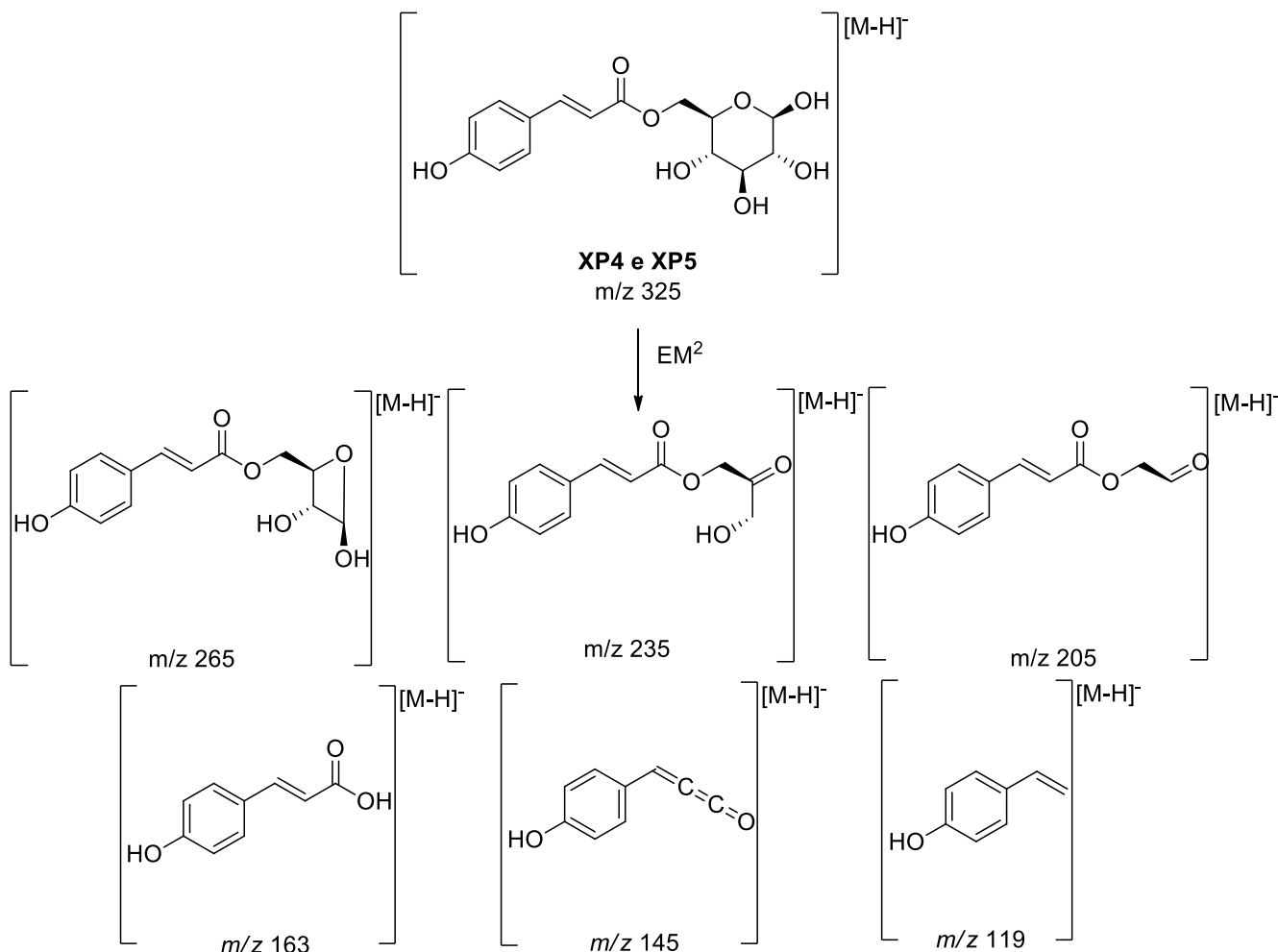
Figura 16 - Perfil de fragmentação proposto para o ácido *p*-cumárico



As substâncias **XP4** e **XP5** apresentaram mesmo perfil de fragmentação e massa molar próxima (326 Da), no entanto exibem tempo de retenção distinto, o que sugere que sejam isômeros. Essas substâncias, que possuem  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  325, com a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_8$  apresentaram fragmentos intensos em  $m/z$  163,  $m/z$  145, e  $m/z$  119, característicos do ácido cumárico (Figura 15). A fragmentação do molécula desprotonada  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  325 é condizente com a presença de um cumaroil e de uma glicose (Figura 17), caracterizando as substâncias **XP4** e **XP5** como isômeros cumaroil glicosídeos que não puderam ser diferenciados apenas pelo espectro de massas (Figura IV e V – APÊNDICE I).



Figura 17 - Perfil de fragmentação de massas proposto para a substância **XP4**.



Fonte: Elaborado pela autora

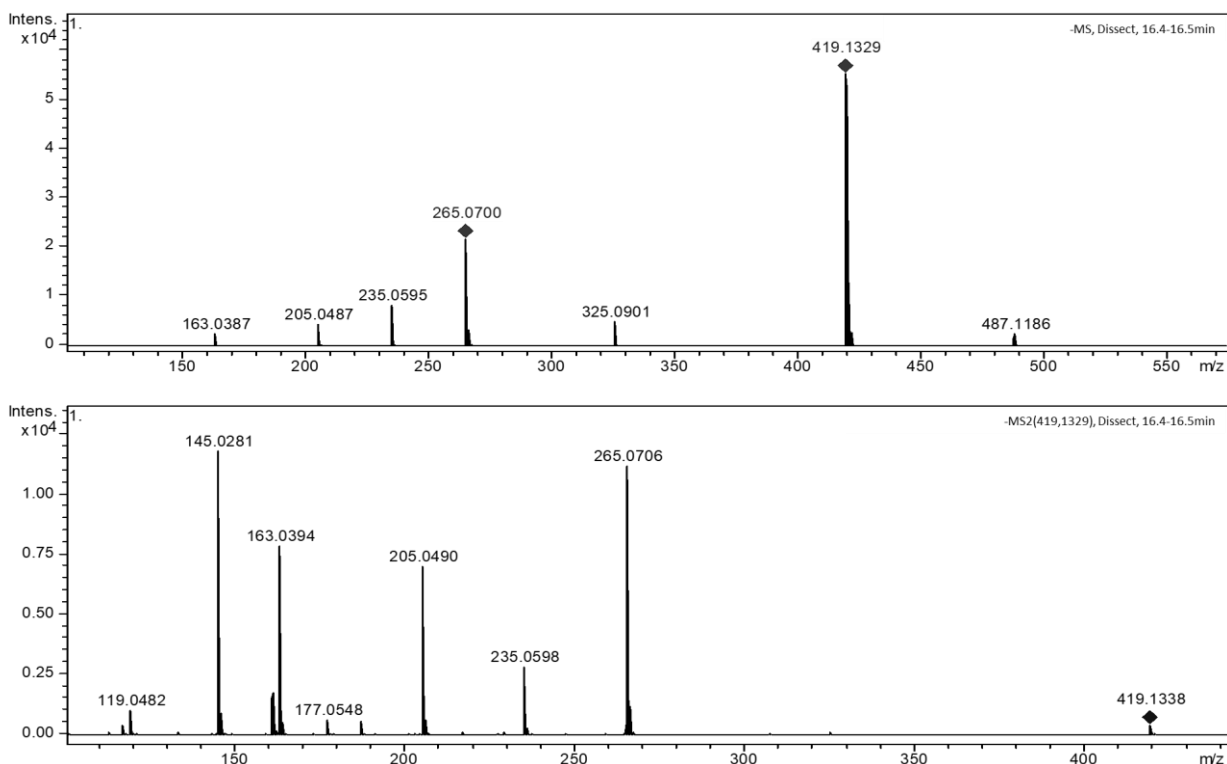
As substâncias **XP9**, **XP10** e **XP12** apresentaram tempo de retenção distintos, porém mesmo perfil de fragmentação e massa molar próxima (420 Da), o que sugere que sejam isômeros. As substâncias **XP9**, **XP10** e **XP12** exibiram maior abundância relativa na fração AcOEt, sendo as principais substâncias presentes nesta.

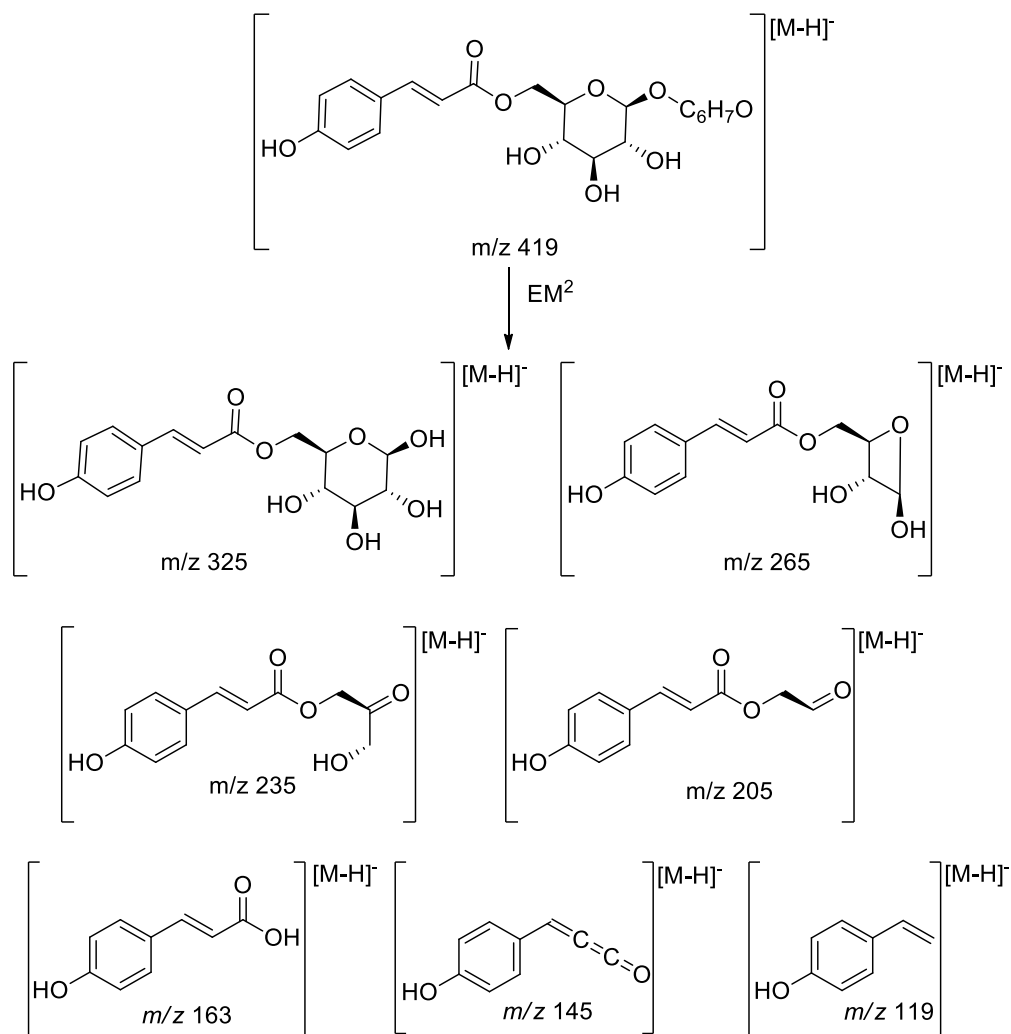
O padrão de fragmentação de EM observado no modo negativo para **XP9**, **XP10** e **XP12** apresentou íons de fragmento intensos em  $m/z$  325,  $m/z$  265,  $m/z$  235,  $m/z$  205,  $m/z$  163 e molécula desprotonada  $[M-H]^-$  de  $m/z$  419 condizente com a fórmula molecular  $C_{21}H_{24}O_9$ . O íon  $m/z$  325 é gerado pela perda de 94 unidades de massa e os íons  $m/z$  265,  $m/z$  235 e  $m/z$  205 seriam gerados pela fragmentação do anel da porção glicosídica. O padrão de fragmentação de EM<sup>2</sup> do íon  $m/z$  325 apresentou íons de fragmento intensos em  $m/z$  265,  $m/z$  235,  $m/z$  205,  $m/z$  163 e  $m/z$  145 (Figura 18 e Figuras IX, X e XII – APÊNDICE I), bem como os íons  $m/z$  265,

$m/z$  235,  $m/z$  205 gerados pela fragmentação do anel glicosídeo e os íons  $m/z$  163 e  $m/z$  145 característicos do ácido cumárico, como apresentado na Figura 14.

As 94 unidades de massa restantes, condizentes com a fórmula molecular  $C_6H_7O$  não puderam ser caracterizadas apenas através de EM. Para elucidação completa mais análises são necessárias.

Figura 18 - Espectro de massas e perfil de fragmentação proposto para a substância **XP9**.

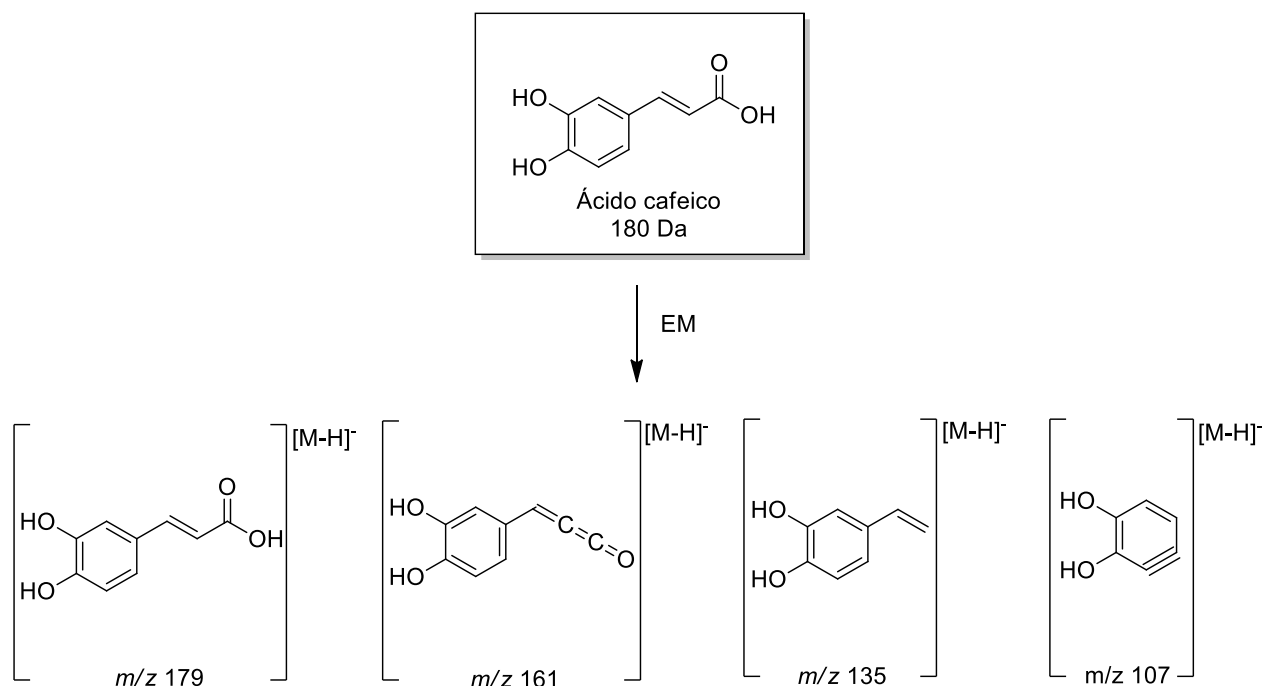




Fonte: Elaborado pela autora.

As substâncias do grupo III (substâncias **XP1**, **XP6**, **XP7**, **XP8**, **XP14** e **XP15**) com tempos de retenção 10,1, 14,7, 15, 15,4, 21,3 e 21,7 minutos respectivamente, foram caracterizadas como derivados cafeoil glicosídeos. Os cafeoil glicosídeos são substâncias que possuem em sua estrutura uma unidade de ácido cafeico ligado a um açúcar através de uma ligação éster. Sua fragmentação apresenta íons característicos em  $m/z$  179,  $m/z$  135 e  $m/z$  107, correspondentes à subunidade cafeica (Figura 19).

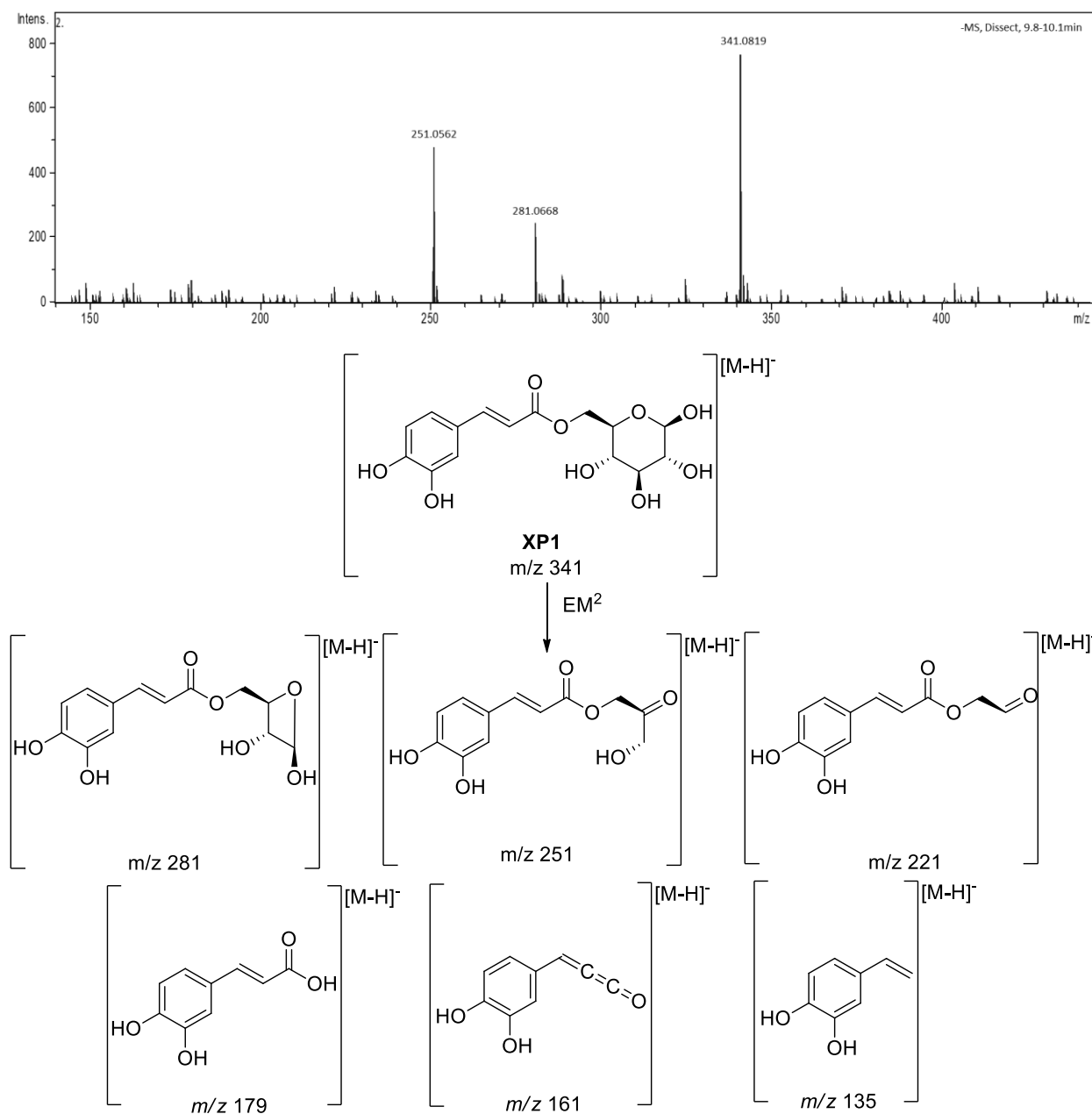
Figura 19 – Perfil de fragmentação proposto para o ácido cafeico.



Fonte: Adaptado de Paz, 2017.

A substância **XP1** possui  $[M-H]^-$   $m/z$  341,0876 condizente com a fórmula molecular  $C_{15}H_{18}O_9$  e apresenta íons de fragmentos intensos em  $m/z$  179,  $m/z$  161, e  $m/z$  135. A fragmentação do  $[M-H]^-$   $m/z$  341 gera o íon  $m/z$  179 (correspondente ao ácido cafeico) através da perda do resíduo de glicose ( $C_6H_{10}O_5$ ) pela fragmentação da ligação C-O da carbonila do éster ligado ao açúcar. Já o íon  $m/z$  135 é característico de ácidos fenólicos e corresponde à perda de um  $CO_2$  a partir do fragmento  $m/z$  179 (Figura 20) (PAZ, 2017; PUIGVENTÓS *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2007). A comparação com dados da literatura permitiu caracterizar a substância **XP1** como cafeoil glicosídeo.

Figura 20 – Espectro de massas da **XP1** e perfil de fragmentação proposto para o cafeoil glicosídeo.



Fonte: Elaborado pela autora.

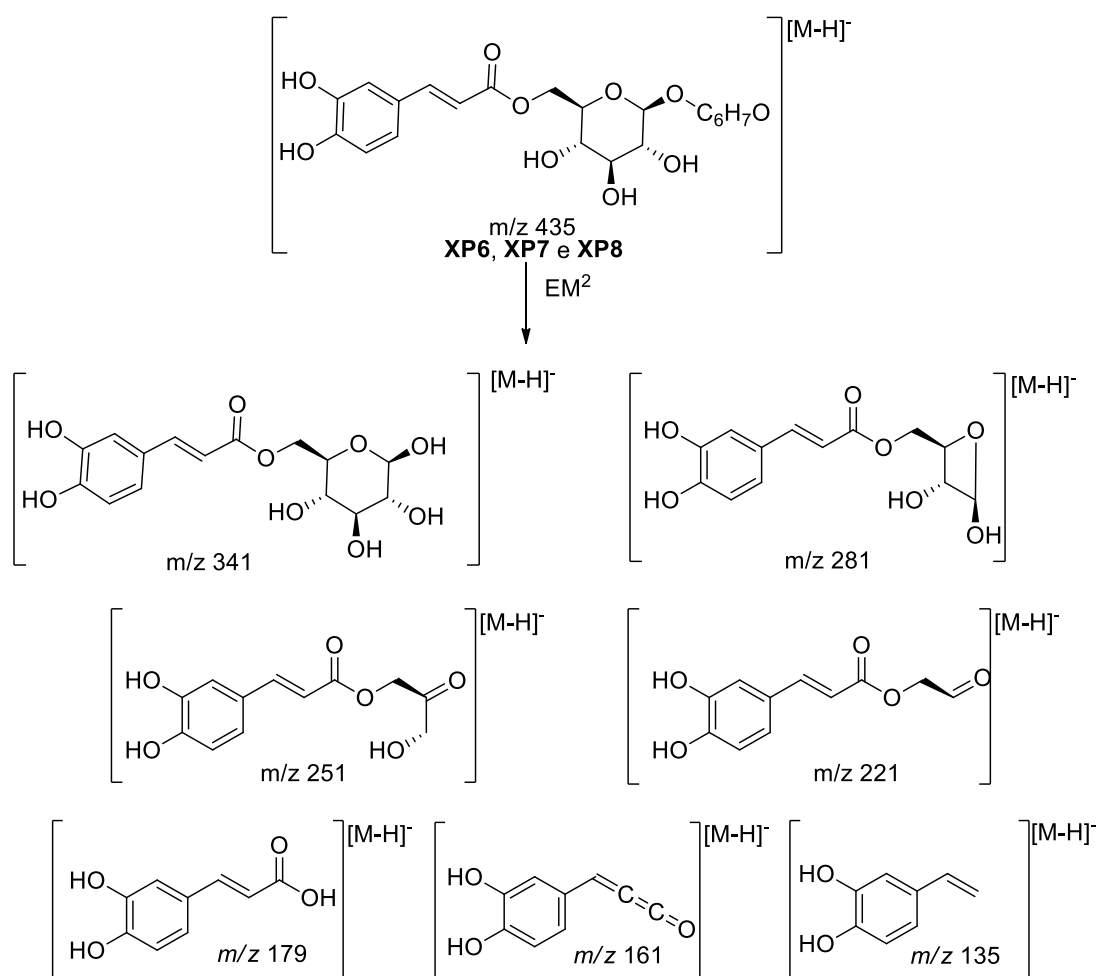
As substâncias **XP6**, **XP7** e **XP8** correspondem a mais um grupo de isômeros presentes em **FAE**, uma vez que apresentam os mesmos perfis de fragmentação e massa molar, porém exibem tempo de retenção distintos. O padrão de fragmentação de EM observado no modo negativo para as substâncias **XP6**, **XP7** e **XP8**, apresentou íons de fragmento intensos em  $m/z$  341,  $m/z$  281,  $m/z$  251,  $m/z$  221, e molécula desprotonada  $[M-H]^-$  de  $m/z$  435 condizente com a fórmula molecular  $C_{21}H_{24}O_{10}$ . O íon

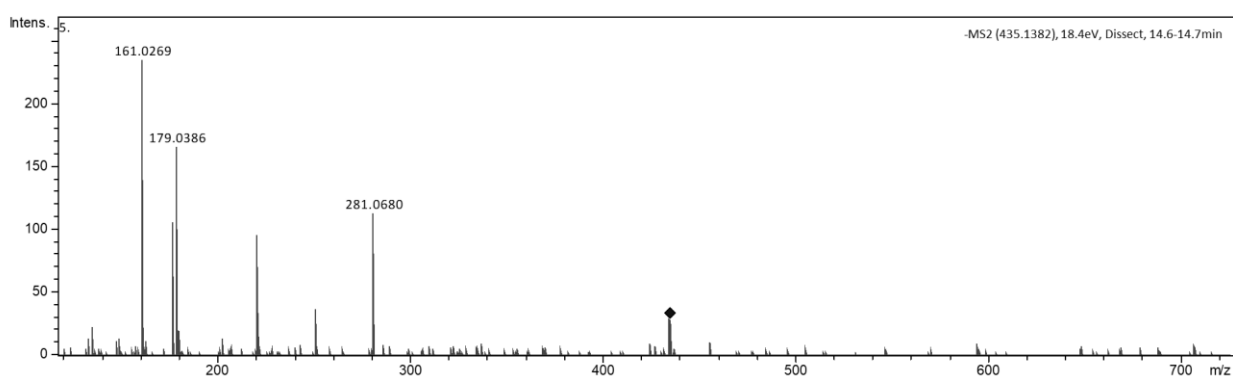
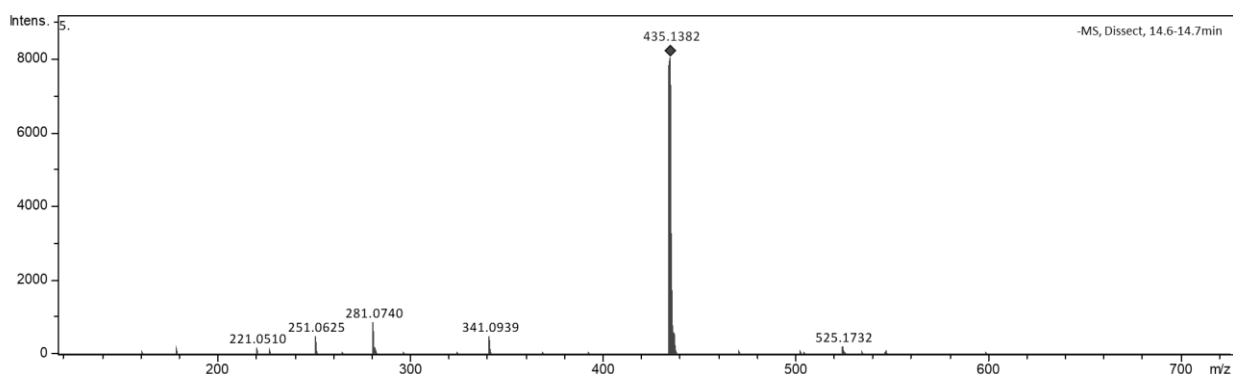
$m/z$  341 é gerado pela perda de 94 unidade de massa, e os íons  $m/z$  281,  $m/z$  251 e  $m/z$  221 seriam gerados pela fragmentação do anel da porção glicosídica (Figura 21 e Figuras VI, VII e VIII – APÊNDICE I). O fragmento restante, com 94 Da e fórmula molecular  $C_6H_7O$  provavelmente possui a mesma subestrutura presente nas substâncias **XP9**, **XP10** e **XP12**.

O padrão de fragmentação de  $EM^2$  do íon  $m/z$  341 apresentou íons de fragmento intensos em  $m/z$  281,  $m/z$  251,  $m/z$  221,  $m/z$  179 e  $m/z$  161. Mais uma vez observa-se os íons  $m/z$  281,  $m/z$  251,  $m/z$  221 gerados pela fragmentação do anel glicosídeo, além de apresentar os íons  $m/z$  179 e  $m/z$  161 característicos do ácido cafeico, como apresentado na Figura 19.

Figura 21 - Perfil de fragmentação proposto e espectros de massas da substância

**XP6.**

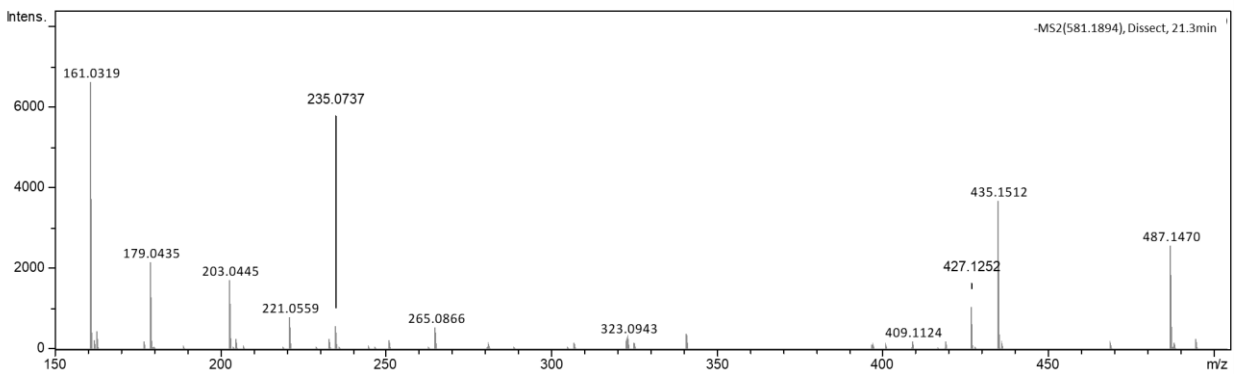
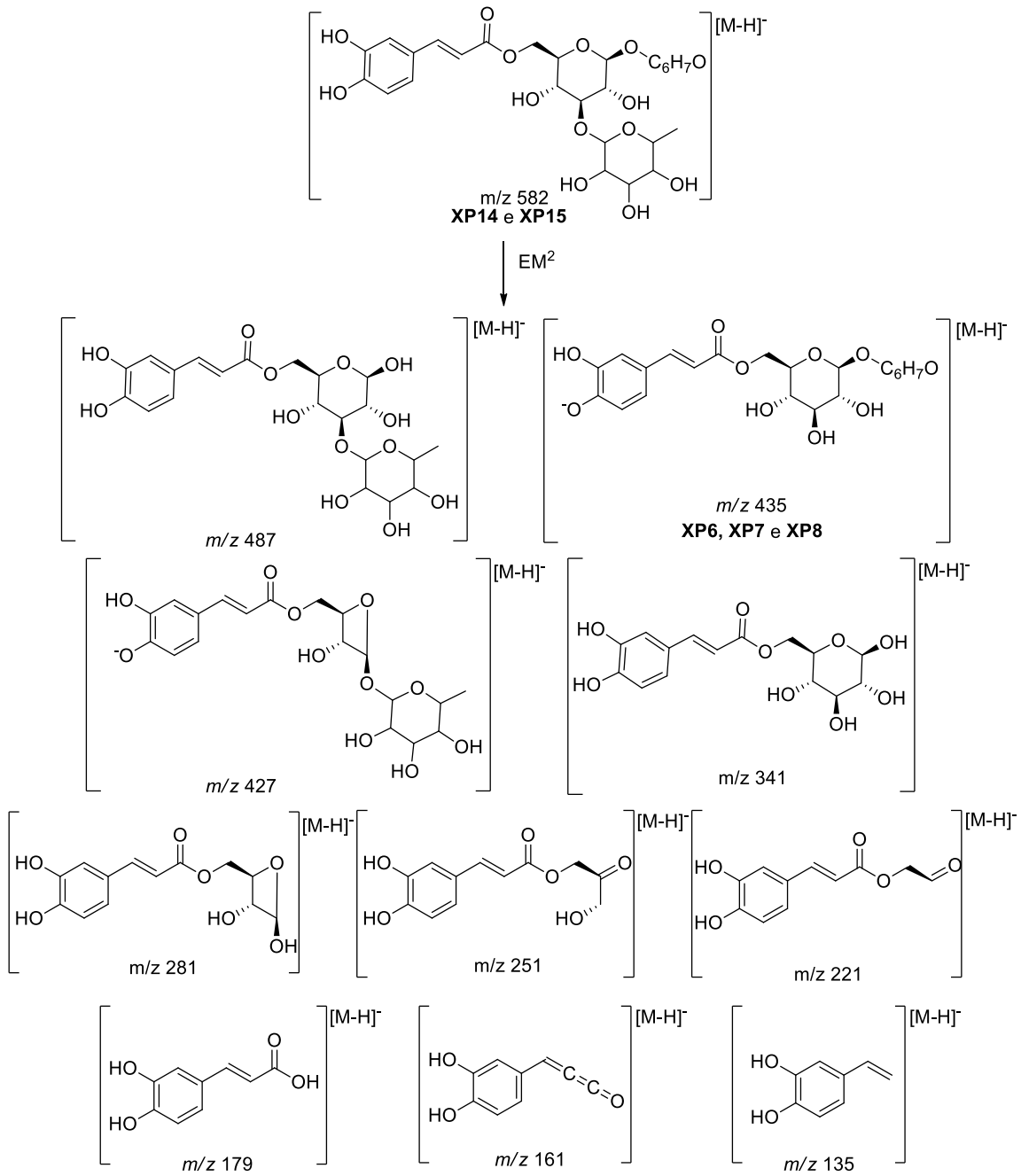




Fonte: Elaborado pela autora.

As substâncias **XP14** e **XP15** também apresentam características de isomeria entre si por possuírem massa molar e perfil de fragmentação semelhantes, mas tempo de retenção distintos. Essas substâncias apresentaram massa molecular de 582 Da e padrão de fragmentação de EM<sup>2</sup> com íons de fragmentos intensos em  $m/z$  487,  $m/z$  435,  $m/z$  427,  $m/z$  235,  $m/z$  203,  $m/z$  179 e  $m/z$  161, condizente com a fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>14</sub>, o que sugere que sejam análogos das substâncias **XP6**, **XP7** e **XP8**, com o acréscimo de um resíduo C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (147 Da) que foi atribuído a uma desoxihexose. O íon 487 seria originado pela perda de 94 unidades de massa e o íon 427 pela a abertura da glicose com a saída de um C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> de 59 unidades de massa (Figura 22 e Figuras XIV e XV – APÊNDICE I).

Figura 22 - Perfil de fragmentação proposto e espectro de massas da substância **XP14**.

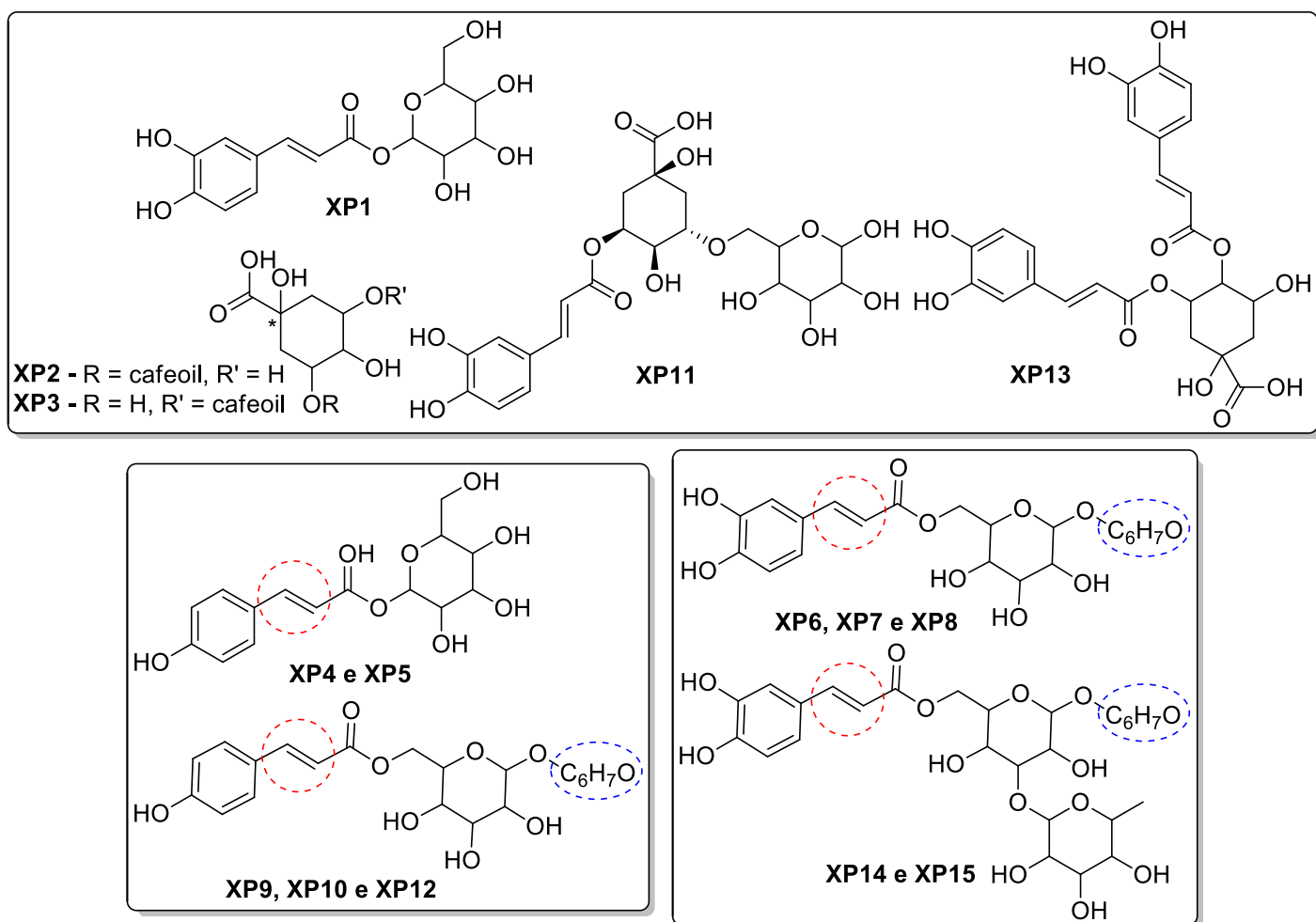


Fonte: Elaborado pela autora.



Com a análise dos espectros de massa das substâncias presentes em **FAE**, foi possível identificar três grupos de metabólitos: grupo I - derivados do ácido cafeoilquínico; grupo II - derivados de cumaroil glicosídeos; e grupo III - derivados de cafeoil-glicosídeos. Dentre os espectros analisados, foi possível definir, com base na literatura, a estrutura completa e isomeria das substâncias **XP1**, **XP2**, **XP3**, **XP11** e **XP13**. Para as substâncias **XP4** e **XP5**, foi possível definir a estrutura, que se tratava do cumaroil glicosídeo, mas a diferenciação dos isômeros não pode ser realizada. Por fim, as substâncias **XP6**, **XP7**, **XP8**, **XP9**, **XP10**, **XP12**, **XP14** e **XP15**, pertencentes aos grupos II e III, não puderam ser completamente elucidadas, por se tratarem de isômeros e apresentarem um fragmento de 94 Da ( $C_6H_7O$ ) desconhecido, o que possivelmente as torna substâncias inéditas na literatura.

Figura 23 - Estrutura química geral das substâncias propostas para **FAE** da *X. pockia*.



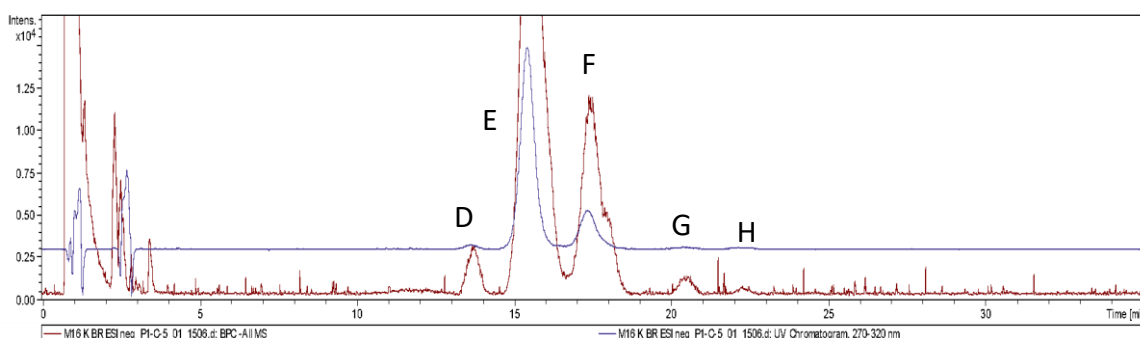
Legenda: - - -: possível isomeria E/Z; - - -: subestrutura desconhecida, que pode apresentar diferença entre as substâncias. Fonte: Elaborado pela autora

### 5.1.2 Caracterização de FB3

A subfração **FB3** foi caracterizada por CLAE/EM equipado com os detectores ESI e DAD. As análises foram realizadas em *full scan* no modo negativo, de maneira a verificar as substâncias e as principais relações  $m/z$  presentes na fração. O perfil cromatográfico obtido pode ser observado na figura 24.

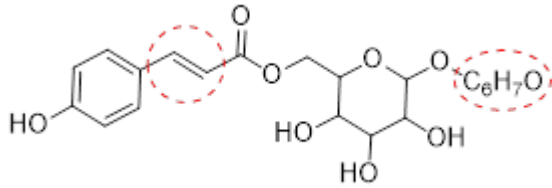
Pode-se observar no perfil cromatográfico da fração **FB3**, 5 picos (**D-H**) (Figura 24), os quais apresentaram, através da análise de massas, a mesma molécula desprotonada ( $m/z$  419) e padrão de fragmentação semelhante aos apresentados pelas substâncias **XP9**, **XP10** e **XP12** presentes no grupo II de **FAE** (Figura 25 e 26). Observa-se que as substâncias **D**, **E** e **F** apresentam EM semelhante, com íons de fragmento intensos em  $m/z$  325,  $m/z$  265,  $m/z$  235,  $m/z$  205 e  $m/z$  163. As substâncias **G** e **H** apresentaram íons de fragmento intensos em  $m/z$  325,  $m/z$  265 e  $m/z$  235, porém não apresentam os íons  $m/z$  205 e  $m/z$  163 (Figura 26). Apenas pela análise de EM não foi possível determinar a estrutura completa das substâncias **D-H**, sendo necessário a realização de outros experimentos a fim de determinar a configuração e a isomeria correta de cada uma das cinco substâncias.

Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE/EM para subfração **FB3** no modo negativo.



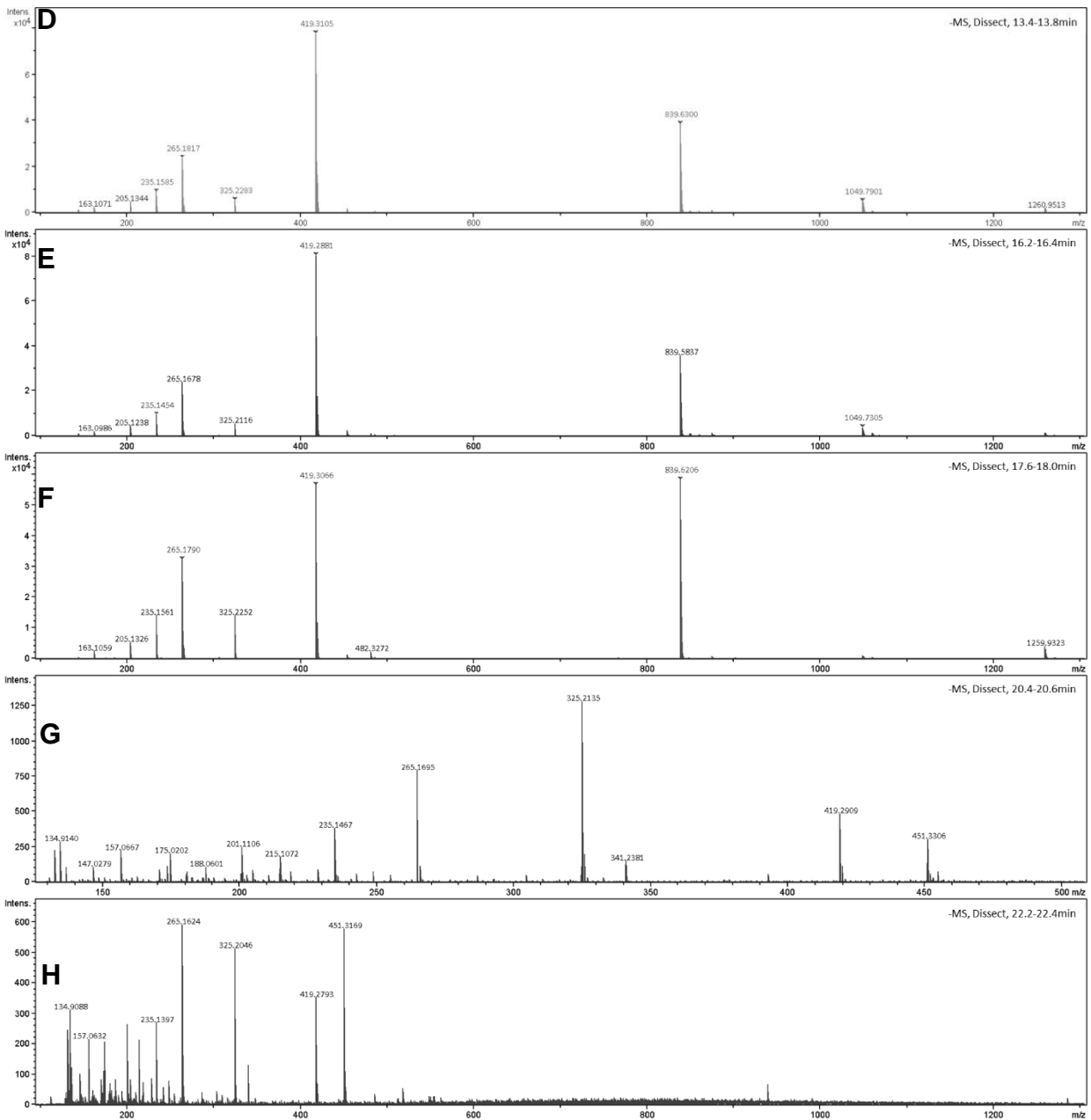
Legenda: Linha azul: detector DAD (280nm); linha vermelha: detector EM (Pico base do Cromatograma). Coluna: C18 (3  $\mu$ m, 2,0 x 100 mm), fase móvel: água ultrapura: acetonitrila 85:15 com 0,1% de ácido fórmico. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25 – Estrutura geral das substâncias presentes na subfração **FB3**, com destaque para possíveis locais de diferenças estruturais entre as substâncias **D-H**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 26 - Espectro de massas das substâncias da subfração **FB3**.



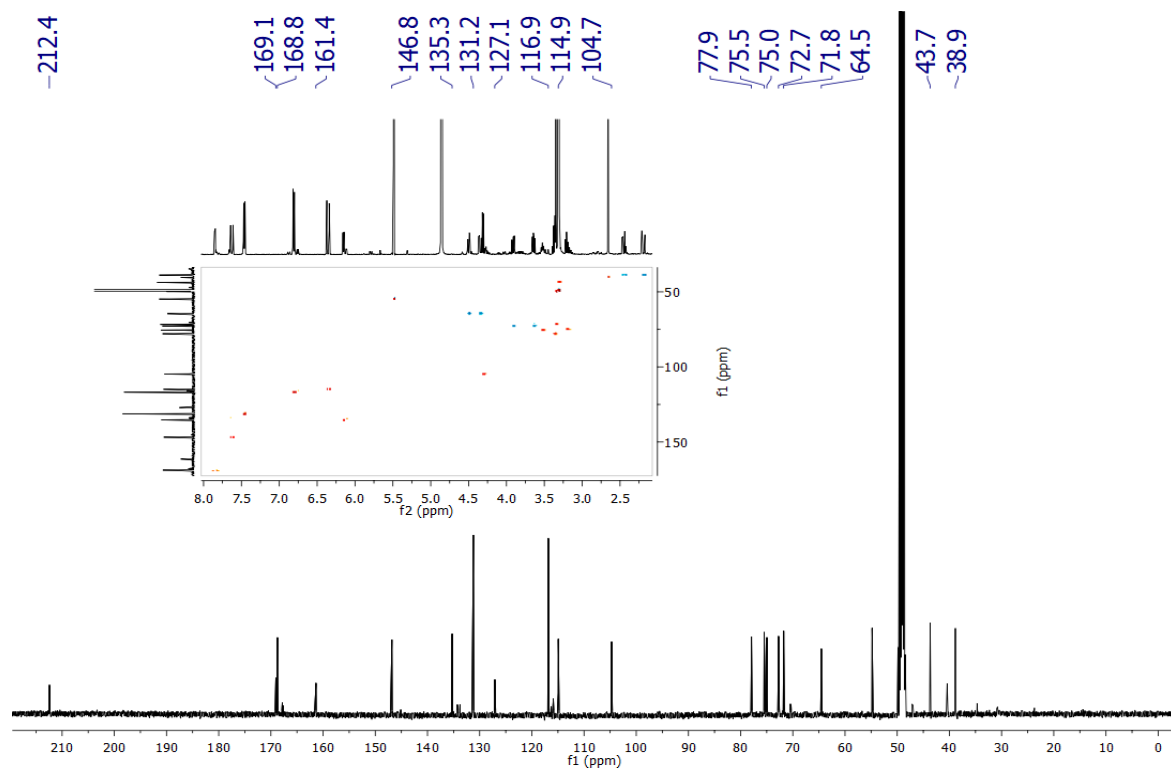
Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.3 Elucidação estrutural de cumaroil glicosídeos presentes em FB3

Para uma completa caracterização das substâncias presentes na subfração **FB3**, estas foram isoladas por CLAE com coluna preparativa, como descrito no tópico 5.1. A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada com base em espectros RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , correlações bidimensionais (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), EM e, quando possível, confirmada através da comparação com dados disponíveis na literatura. Todos os espectros se encontram no apêndice II.

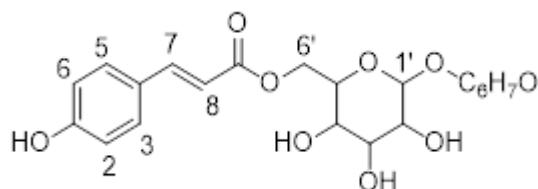
A análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **D** mostrou a presença de 21 carbonos, que através da comparação como o espectro HSQC-dept (Figura 27) puderam ser definidos como quaternários (4), metínicos (14) e metilênicos (3). Na análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  destaca-se a presença de quatro hidrogênios *orto*-acoplados em  $\delta$  7,46 [d,  $J = 8,54$  Hz, 2H (H-2 e H-6)] e  $\delta$  6,81 [d,  $J = 8,54$  Hz, 2H (H-3 e H-5)], característicos de anel aromático para-substituído. Também observa-se dois hidrogênios trans-olefínicos em  $\delta$  7,63 [(d,  $J = 15,94$  Hz, 1H (H-7)] e  $\delta$  6,36 [(d,  $J = 15,94$  Hz, 1H (H-8)] que, junto com os hidrogênios *orto*-acoplados são característica principal do (*E*)-*p*-cumaroil (Figura 28 e 29) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017). Observa-se também uma região de hidrogênios compreendida entre  $\delta$  4,50 e  $\delta$  3,21 com rede de acoplamento C-H, com destaque para a presença do hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,31 [d,  $J = 7,86$  Hz, 1H (H-1')], característico de  $\beta$ -glucopiranosídeos (Figuras 28 e 29) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017; LIU, 2011; ROSLUND *et al.*, 2008).

Figura 27 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e HSQC (500 MHz, MeOD) da substância **D**.



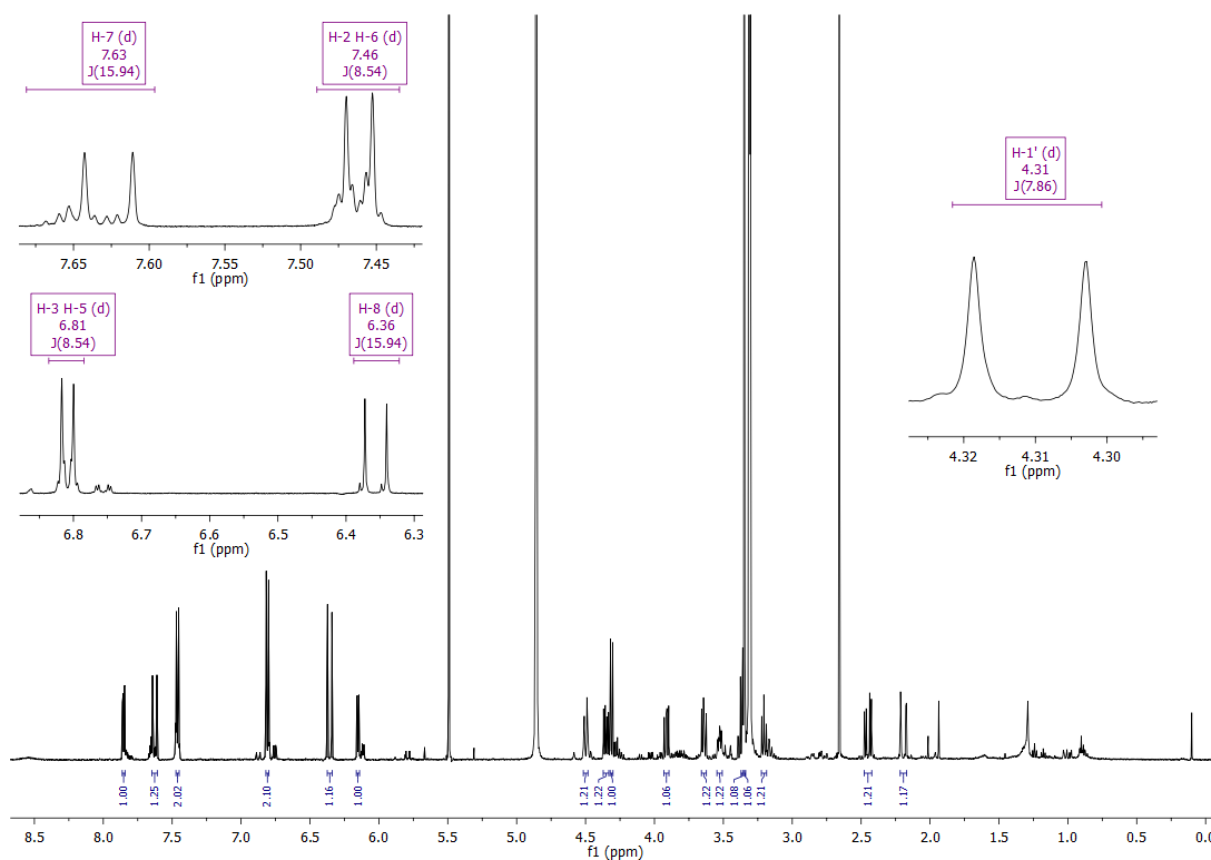
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 28 – Estrutura química parcial da substância **D**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 29 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância **D**, com destaque para os hidrogênios H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'.

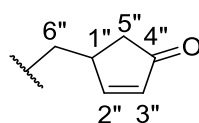


Fonte: Elaborado pela autora.

A substância **D** faz parte do grupo com subestrutura  $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}$ , que não pode ser completamente caracterizado por EM. A subestrutura  $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}$  apresenta índice de deficiência de hidrogênio igual a 3, o que indica a presença de insaturações (dupla ou tripla) e/ou presença de estrutura cíclica. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  observa-se um sinal em  $\delta$  212,4 - indicando a presença de um grupo carbonila, dois sinais em  $\delta$  168,8 e  $\delta$  135,3 - pertencentes à uma dupla ligação  $\text{C}=\text{C}$ , sinais em  $\delta$  72,7 e  $\delta$  38,9 - referentes a carbonos metilênicos e um sinal em  $\delta$  43,7 - referente a um carbono metínico (Figura 27). A carbonila e a dupla ligação são responsáveis por dois dos três elementos de deficiência de hidrogênio, indicando que a subestrutura seja cíclica. Essas informações, juntamente com a fórmula molecular e através da comparação com dados da literatura (AMARASINGHE *et al.*, 2007), sugerem que a subestrutura  $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}$  seja uma ciclopentenona ligada ao *p*-cumaroil glicosídeo através de um grupo metilênico (Figura 30).

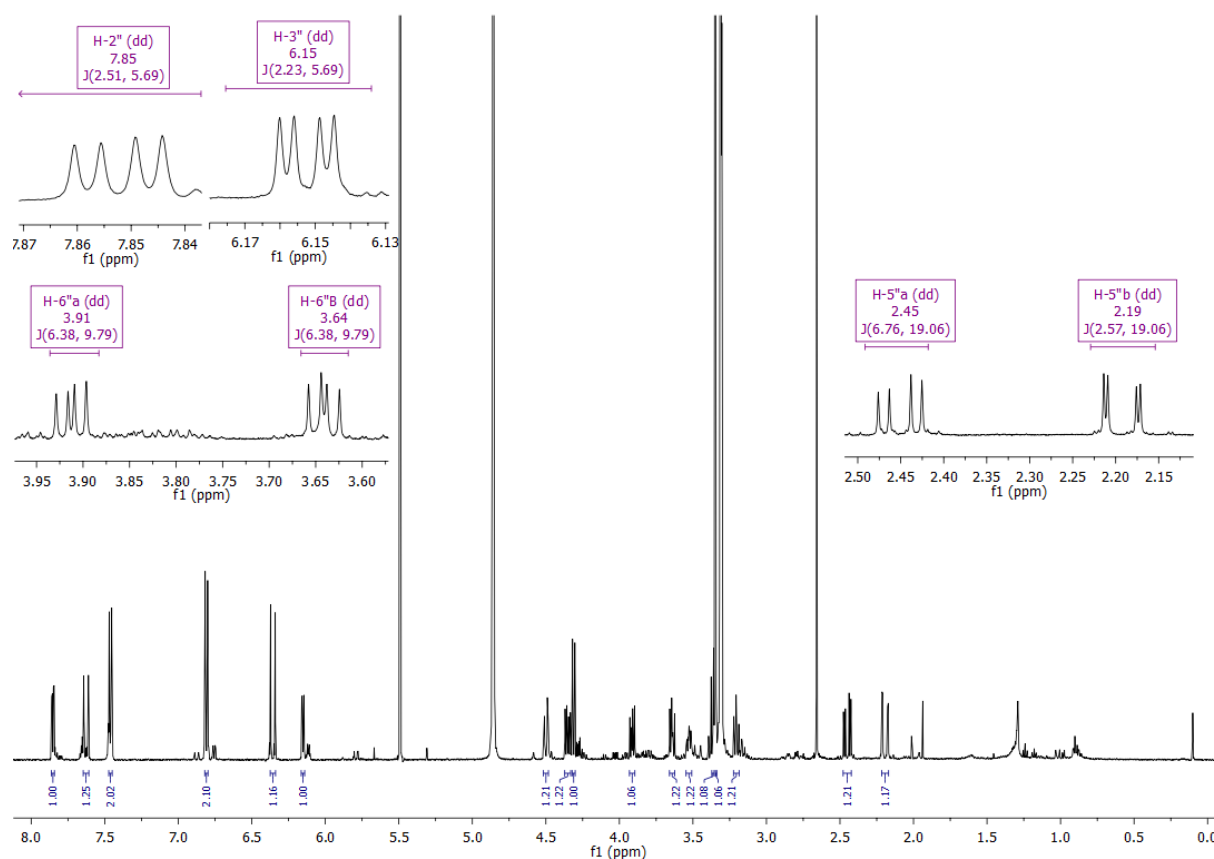
O espectro COSY de **D** mostrou que os hidrogênios  $\delta$  3,91 (H-6a'') e  $\delta$  3,64 (H-6b''), ligados ao carbono metilênico  $\delta$  72,7 se correlacionam com os hidrogênios  $\delta$  2,45 (H-5a'') e  $\delta$  2,19 (H-5b'') e com o hidrogênio  $\delta$  3,31 (H-4''), ligado ao carbono metínico  $\delta$  43,7. O hidrogênio metínico em  $\delta$  3,31, por sua vez, se correlaciona com os hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,85 (H-2'') e  $\delta$  6,13 (H-3''). Esses dados e as correlações de HMBC permitem determinar a estrutura como 4-oxo-2-ciclopentenilmetila (Figura 30).

Figura 30 – Estrutura química da 4-oxo-2-ciclopentenilmetila.



Fonte: Elaborado pela autora.

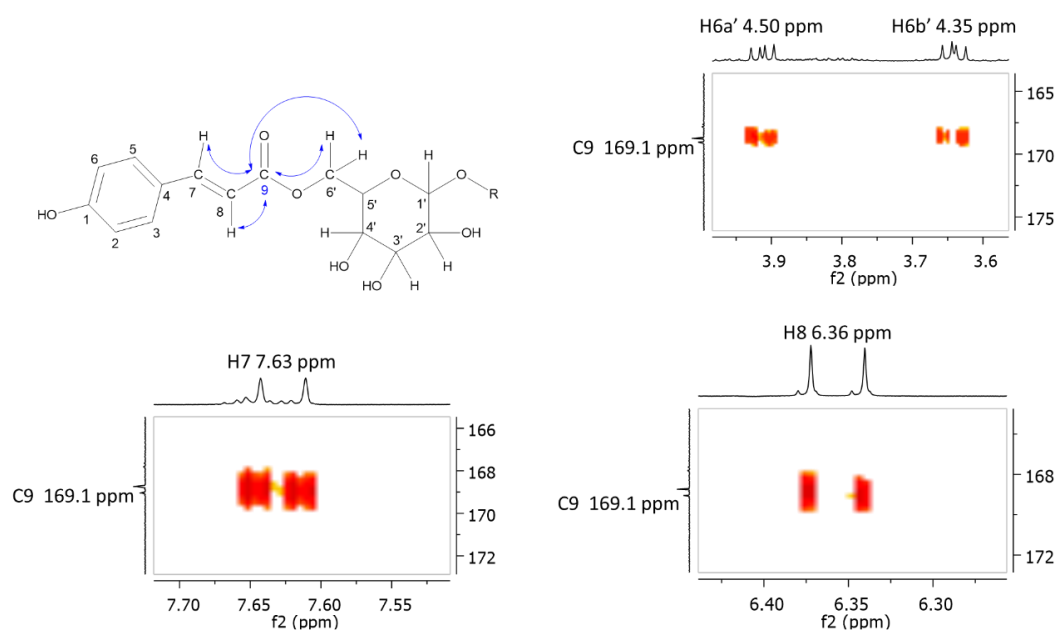
Figura 31 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância **D**, com destaque para H-2'', H-3'', H-6a'', H-6b'', H-5a'' e H-5b''.



Fonte: Elaborado pela autora.

Por meio da análise das correlações presentes no espectro HMBC, foi possível determinar como as três subunidades (cumaroil, glucopiranosídeo e hidroximetilciclopentenona) da substância **D** estão conectadas. Observa-se a correlação entre os hidrogênios metilênicos H-6' ( $\delta$  4,50 e  $\delta$  4,35) do glucopiranosídeo, com a carbonila C-9 ( $\delta$  169,1) do cumaroil (Figura 32). Observa-se também que a carbonila C-9 ( $\delta$  169,1) possui correlação com H-7 e H-8 ( $\delta$  7,63 e  $\delta$  6,36, respectivamente), confirmando que está pertence à subunidade cumaroil. A ligação do glucopiranosídeo com a 4-oxo-2-ciclopentenilmetila se dá através de uma ligação éter entre C-6'' e o oxigênio ligado ao carbono anomérico do açúcar. No espectro HMBC pode ser observada a correlação entre os hidrogênios H-6'' ( $\delta$  3,91 e  $\delta$  3,64) e o carbono anomérico C-1' ( $\delta$  104,72) do glucopiranosídeo. Ainda, são observadas correlações entre o carbono C-6'' ( $\delta$  72,73) com os hidrogênios H-5'' ( $\delta$  2,45 e  $\delta$  2,19), confirmando que este pertence a 4-oxo-2-ciclopentenilmetila (Figura 33). Com base nas análises anteriores, a substância **D** foi caracterizada como (*E*)-*p*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -glucopiranosídeo-4-oxo-2-ciclopentenilmetila (Figura 34).

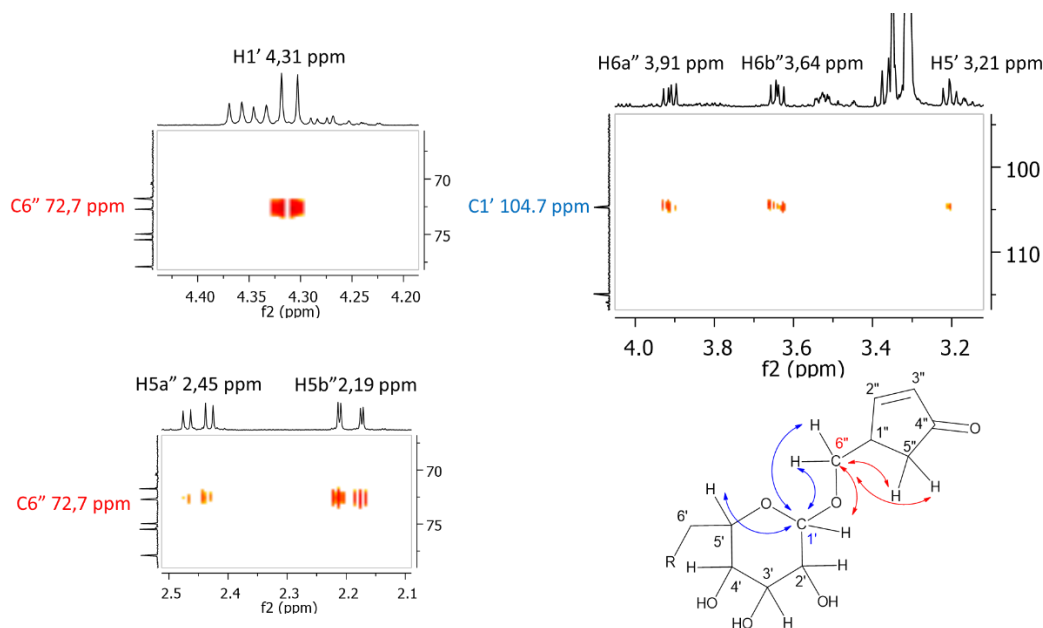
Figura 32 – Ampliações do espectro HMBC da substância **D** apresentando as correlações entre as subunidades glucopiranosídeo e cumaroil.



Fonte: Elaborado pela autora.

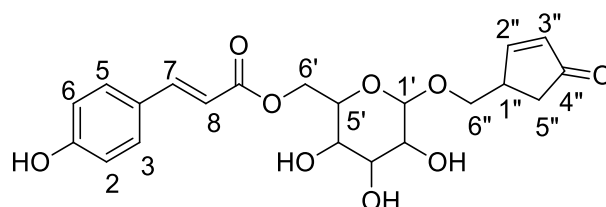


Figura 33 – Ampliações do espectro HMBC da substância **D**, apresentando as correlações entre as subunidades glucopiranosídeo e 4-oxo-2-ciclopentenilmetila.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 34 – Estrutura química de (*E*)-*p*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -glucopiranosídeo-4-oxo-2-ciclopentenilmetila.



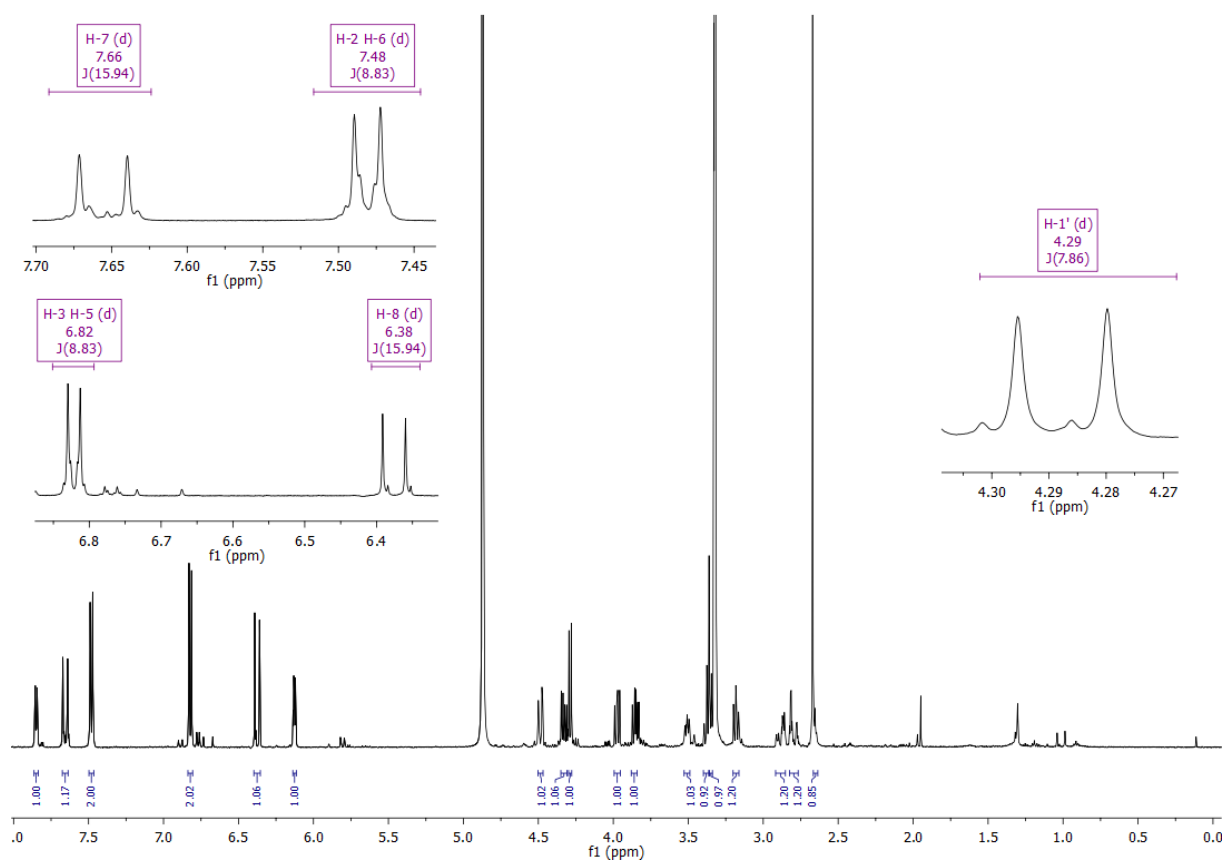
Fonte: Elaborado pela autora.

As substâncias **E**, **F** e **H** são isômeros geométricos e de posição de **D**, de modo que a caracterização pode ser realizada principalmente pela análise dos espectros RMN  $^1\text{H}$ , COSY e NOESY. Três pontos são de fundamental importância na hora de distinguir a isomeria presente nestas substâncias: a) as constantes de acoplamento dos hidrogênios olefínicos do *p*-cumaroil (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2011); b) a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico do glucopiranosídeo (FEISTEL *et al.*, 2017; LIU, 2011; ROSLUND *et al.*, 2008); e c) as correlações COSY e NOESY, para os hidrogênios da hidroximetilciclopentenona.

Por meio da constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos do *p*-cumaroil é possível diferenciar os isômeros geométricos *E* e *Z*. Constantes de acoplamento próximas a 15 Hz são características de isômeros *E*; já constantes de acoplamento próximas a 12 Hz são características de isômeros *Z* (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2011). Adicionalmente, as constantes de acoplamento de hidrogênios anoméricos dos glucopiranosídeos possibilitam a caracterização da configuração da porção glicosídica: constantes de acoplamento próximas a 8 Hz são características de configuração  $\beta$ , já constantes de acoplamento próximas a 3,8 Hz são características da presença de configuração  $\alpha$  (FEISTEL *et al.*, 2017; LIU, 2011; ROSLUND *et al.*, 2008).

As substâncias **E** e **F** apresentam dados de RMN semelhantes, apesar de apresentarem tempo de retenção distintos na análise de CLAE, diferenciando-se da substância **D** pela posição da ligação do *p*-cumaroil glicosídeo à ciclopentenona. No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , a substância **E** possui hidrogênios aromáticos *orto* acoplados em  $\delta$  7,48 [d,  $J = 8,83$  Hz, 2H (H-2 e H-6)] e  $\delta$  6,82 [d,  $J = 8,83$  Hz, 2H (H-3 e H5)], e hidrogênios *trans*-olefínicos em  $\delta$  7,66 [d,  $J = 15,94$  Hz, 1H (H-7)] e  $\delta$  6,38 [(d,  $J = 15,94$  Hz, 1H (H-8)] característicos do (*E*)-*p*-cumaroil (Figura 35) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017). Observa-se também uma região de hidrogênios compreendida entre  $\delta$  4,47 e  $\delta$  3,18 com rede de acoplamento C-H, com presença do hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,29 [d,  $J = 7,86$  Hz, 1H (H-1')], característicos de  $\beta$ -glucopiranosídeos (Figura 35) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017; LIU, 2011; ROSLUND *et al.*, 2008).

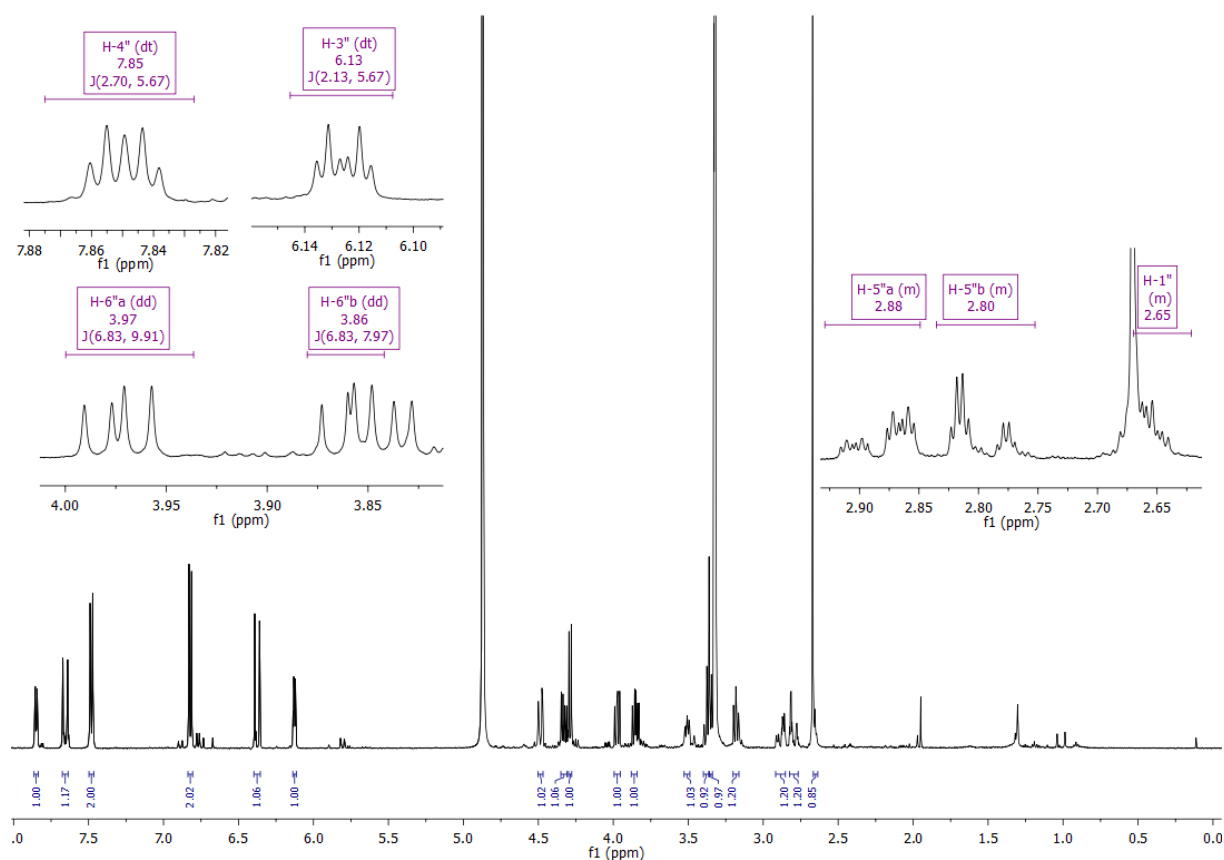
Figura 35 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância **E**, com destaque para H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'.



Fonte: Elaborado pela autora.

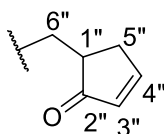
Como mencionado acima, a substância **E** se diferencia de **D** pela posição dos substituintes da ciclopentenona. No espectro RMN  $^1\text{H}$  de **E** observa-se um hidrogênio metínico em  $\delta$  2,65 (m, 1H), quatro hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,97 (dd,  $J = 6,83$  e  $9,91$  Hz, 1H),  $\delta$  3,86 (dd,  $J = 6,83$  e  $7,97$  Hz, 1H),  $\delta$  2,88 (m, 1H) e  $\delta$  2,80 (m, 1H), e dois hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,85 (dt,  $J = 2,70$  e  $5,67$ , 1H) e  $\delta$  6,13 (dt,  $J = 2,13$  e  $5,67$  Hz, 1H) (Figura 36). O espectro COSY mostrou que os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,97 (H-6a'') e  $\delta$  3,85 (H-6b'') se correlacionam com o hidrogênio metínico em  $\delta$  2,65 (H-1''). Já os hidrogênios de metileno em  $\delta$  2,80 (H-5a'') e  $\delta$  2,88 (H-5b'') foram correlacionados com dois hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,85 (H-4'') e  $\delta$  6,13 (H-3''). A subestrutura foi caracterizada como 2-oxo-3-ciclopentenilmetila (Figura 37).

Figura 36 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância **E**, com destaque para H-1", H-3", H-4", H-5a", H-5b", H-5", H-6a" e H-6b".



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 37 – Estrutura química da 2-oxo-3-ciclopentenilmetila.

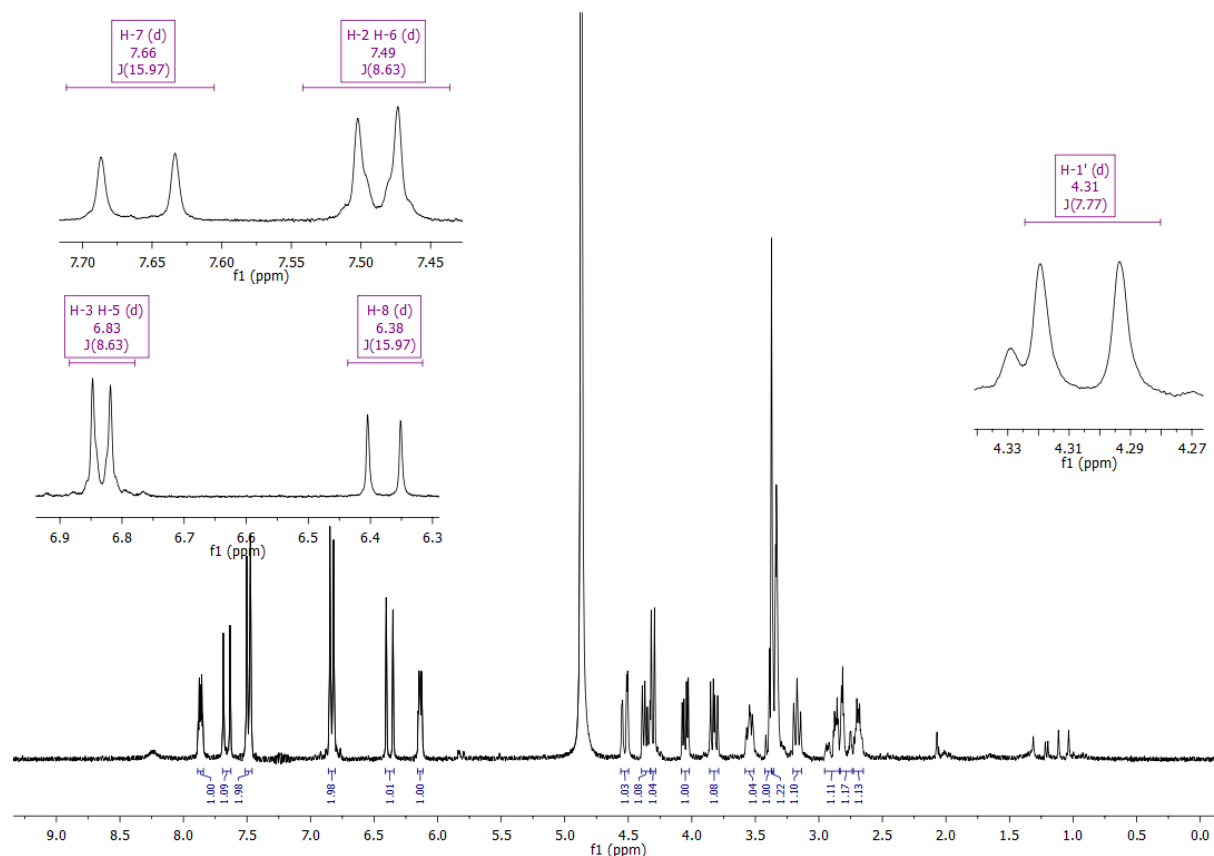


Fonte: Elaborado pela autora.

A substância **F** apresenta espectro RMN  $^1\text{H}$  semelhante ao da substância **E**. Nele é observado a presença dos hidrogênios *orto* acoplados em  $\delta$  7,49 [d,  $J = 8,63$  Hz, 2H (H-2 e H-6)] e  $\delta$  6,83 [d,  $J = 8,63$  Hz, 2H (H-3 e H-5)], e os hidrogênios *trans*-olefínicos em  $\delta$  7,66 [d,  $J = 15,97$  Hz, 1H (H-7)] e  $\delta$  6,38 [d,  $J = 15,97$  Hz, 1H (H-8)] correspondentes ao (*E*)-*p*-cumaroil (Figura 38) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017). A região do glucopiranosídeo também é semelhante, sendo observada na região de hidrogênios compreendida entre  $\delta$  4,53 e  $\delta$  3,17, com destaque para a presença do hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,31 [d,  $J = 7,77$  Hz, 1H (H-

1')] característico da configuração  $\beta$  (Figura 38) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017; LIU, 2011; ROSLUND *et al.*, 2008).

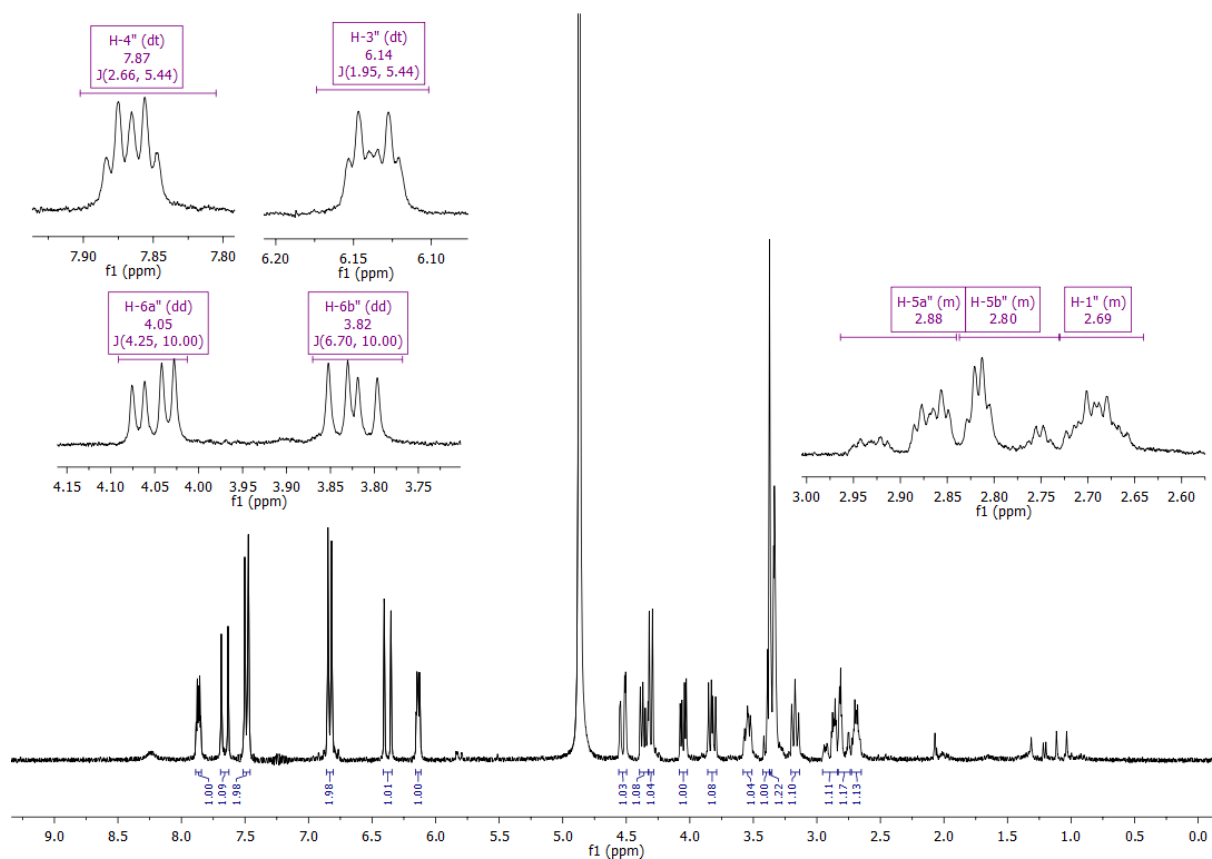
Figura 38 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) da substância **F**, com destaque para H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os sinais característicos de uma ciclopentenona semelhante à observada em **E** estão presentes: um hidrogênio metínico em  $\delta$  2,69 (m, 1H), quatro hidrogênios metilênicos em  $\delta$  4,05 (dd,  $J = 4,25$  e  $10,00$  Hz, 1H),  $\delta$  3,82 (dd,  $J = 6,70$  e  $10,00$  Hz, 1H), 2,88 (m, 1H) e  $\delta$  2,80 (m, 1H), e dois hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,87 (dt,  $J = 2,66$  e  $5,44$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,14 (dt,  $J = 1,95$  e  $5,44$  Hz, 1H) (Figura 39). Observa-se no espectro NOESY um padrão muito semelhante ao observado para substância **E**, onde os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  4,05 (H-6a'') e  $\delta$  3,82 (H-6b'') se correlacionam com o hidrogênio metínico em  $\delta$  2,88 (H-1''). Já os hidrogênios do metileno em  $\delta$  2,80 (H-5a'') e  $\delta$  2,88 (H-5b'') se correlacionam com dois hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,87 (H-4'') e  $\delta$  6,14 (H-3''). Assim, a subestrutura da substância **F** também foi caracterizada como 2-oxo-3-ciclopentenilmetila (Figura 37).

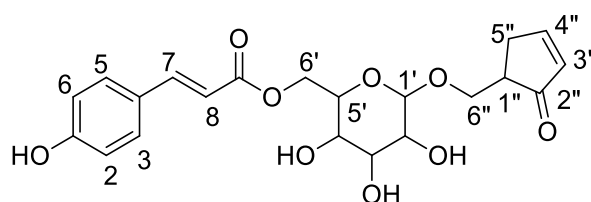
Figura 39 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) da substância **F**, com destaque para os hidrogênios H-4", H-3", H-5a", H-5b", H-1", H-6a" e H-6b".



Fonte: Elaborado pela autora.

Através das análises de RMN, as substâncias **E** e **F** foram caracterizadas como (*E*)-*p*-cumaroil-6'-*O*- $\beta$ -glucopiranosídeo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila (Figura 40), porém, por apresentarem tempos de retenção distintos nas análises de CLAE, pode-se afirmar que exista diferenças entre elas. É possível que **E** e **F** sejam diastereoisômeros, porém mais análises precisam ser realizadas para se determinar as diferenças entre essas substâncias.

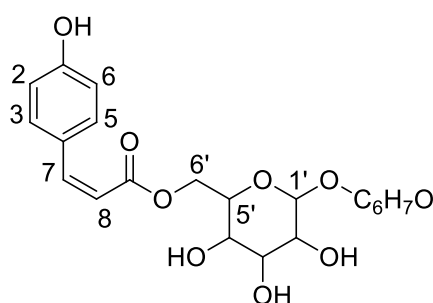
Figura 40 – Estrutura química de (*E*)-*p*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -glucopiranosídeo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila.



Fonte: Elaborado pela autora.

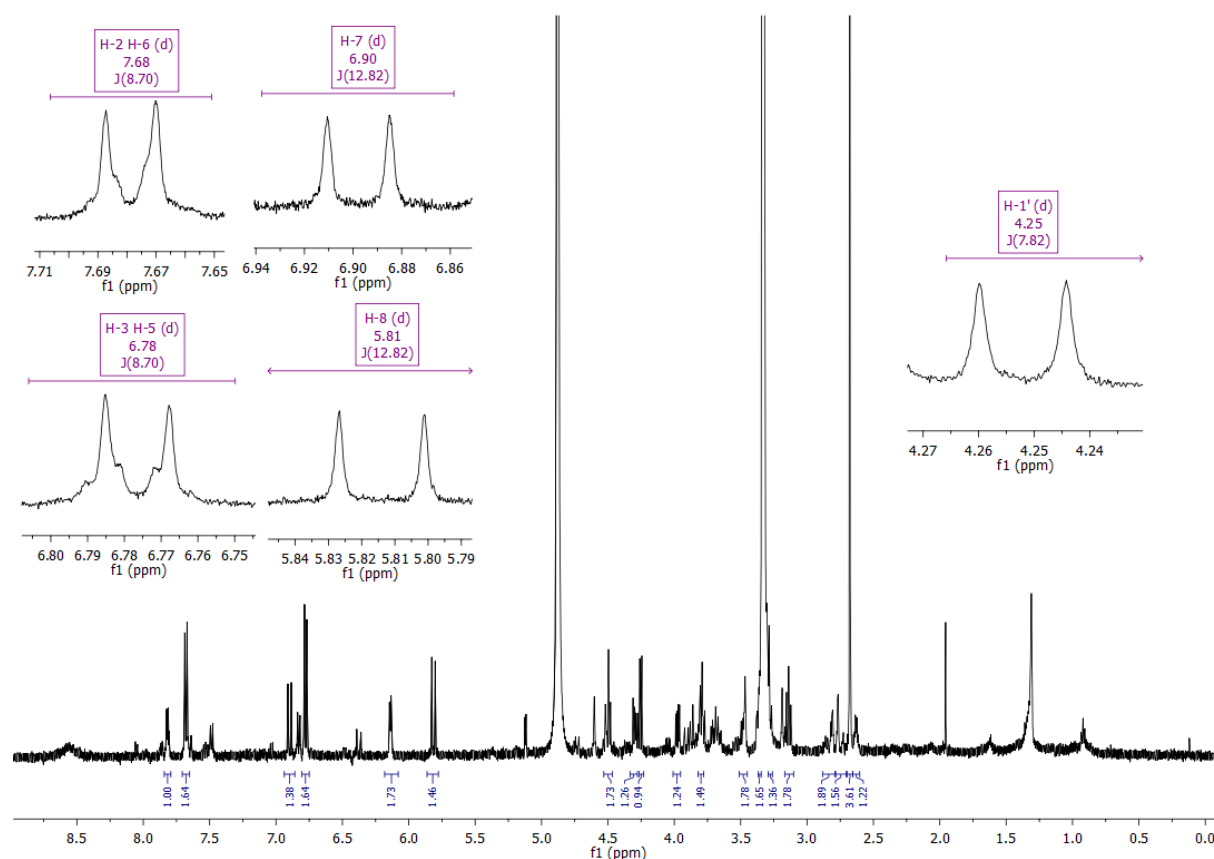
Na análise de RMN  $^1\text{H}$  da substância **H** também se destaca a presença de hidrogênios *orto*-acoplados em  $\delta$  7,68 [d,  $J = 8,70$  Hz, 2H (H-2 e H-6)] e  $\delta$  6,78 [d,  $J = 8,70$  Hz, 2H (H-3 e H-5)] característicos de anel aromático para-substituído. Porém, ao contrário das substâncias **D**, **E** e **F**, observam-se hidrogênios cis-olefínicos em  $\delta$  6,90 [d,  $J = 12,82$  Hz, 1H (H-7)] e  $\delta$  5,81 [d,  $J = 12,82$  Hz, 1H (H-8)] o que torna a substância **H** a única com características do (*Z*)-*p*-cumaroil (Figura 41 e 42) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017). A substância **H** apresenta a região de hidrogênios do  $\beta$ -glucopiranosídeo compreendida entre  $\delta$  4,50 e  $\delta$  3,14, com destaque para o hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,25 [d,  $J = 7,82$  Hz, 1H (H-1')] (Figura 42) (AMARASINGHE *et al.*, 2007; FEISTEL *et al.*, 2017; LIU, 2011; ROSLUND *et al.*, 2008).

Figura 41 – Estrutura química parcial da substância **H**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 42 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância **H**, com destaque para H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-1'.

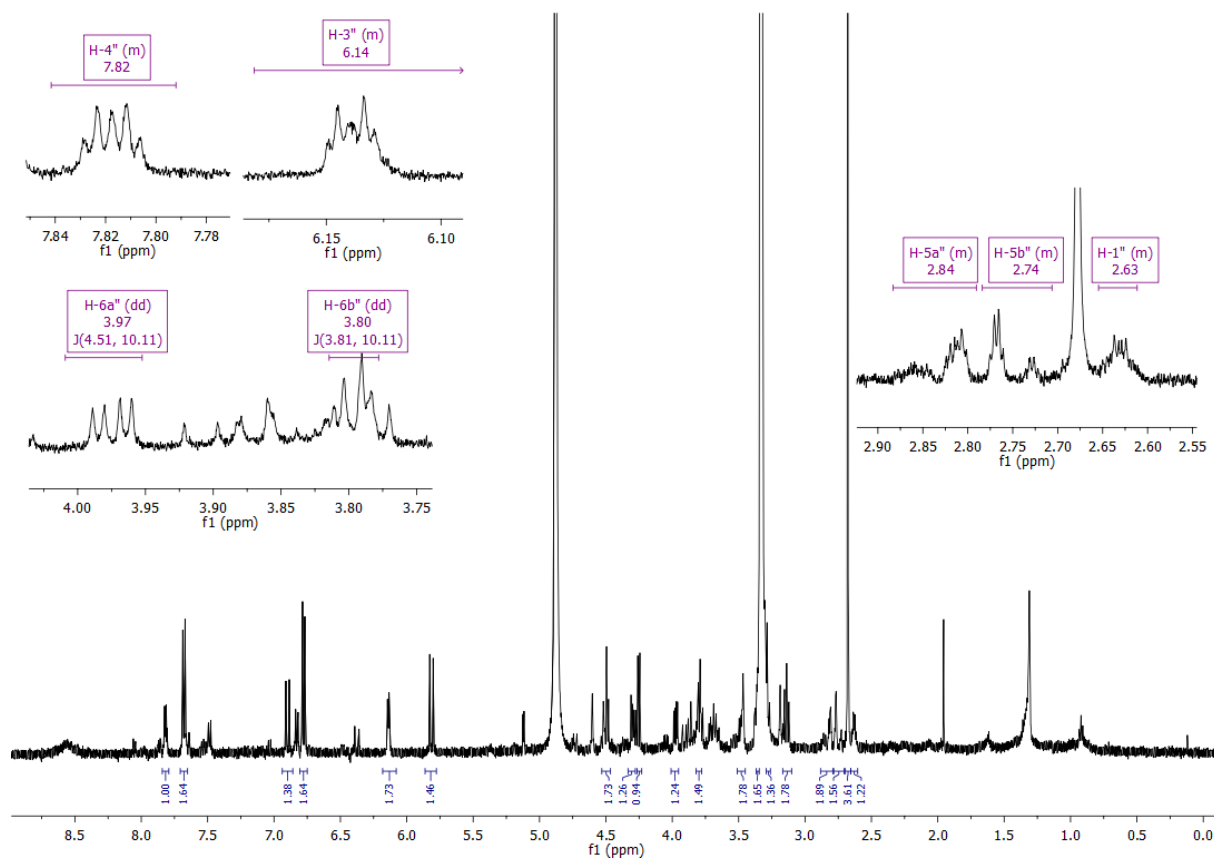


Fonte: Elaborado pela autora.

Assim como nas demais substâncias, por meio da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foi identificada para **H** a presença dos sinais característicos de ciclopentenona, sendo eles um hidrogênio metínico em  $\delta$  2,63 (m, 1H), quatro hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,97 (dd,  $J = 4,51$  e  $10,11$  Hz, 1H),  $\delta$  3,80 (dd,  $J = 3,81$  e  $10,11$  Hz, 1H),  $\delta$  2,84 (m, 1H) e  $\delta$  2,74 (m, 1H), e dois hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,82 (m, 1H) e  $\delta$  6,14 (m, 1H) (Figura 43). No espectro de COSY da substância **H** observa-se um padrão muito semelhante ao observado para as substâncias **E** e **F**, onde os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  3,97 (H-6a'') e  $\delta$  3,80 (H-6b'') se correlacionam com o hidrogênio metínico em  $\delta$  2,63 (H-1''). Já os hidrogênios do metileno em  $\delta$  2,84 (H-5a'') e  $\delta$  2,74 (H-5b'') foram correlacionados com dois hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,82 (H-4'') e  $\delta$  6,14 (H-3''). Dessa maneira, a substância **H** foi então caracterizada como (*Z*)-*p*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -glucopiranosídeo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila (Figura 44).

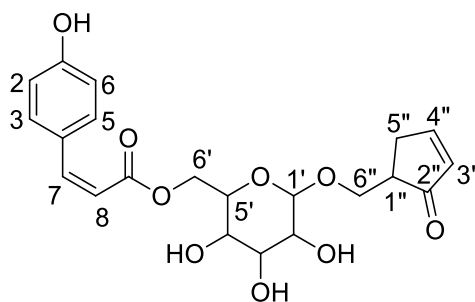


Figura 43 -Espectro RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) da substância **H**, com destaque para H-4", H-3", H-5a", H-5b", H-1", H-6a" e H-6b".



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 44 – Estrutura química proposta para a substância **H**.

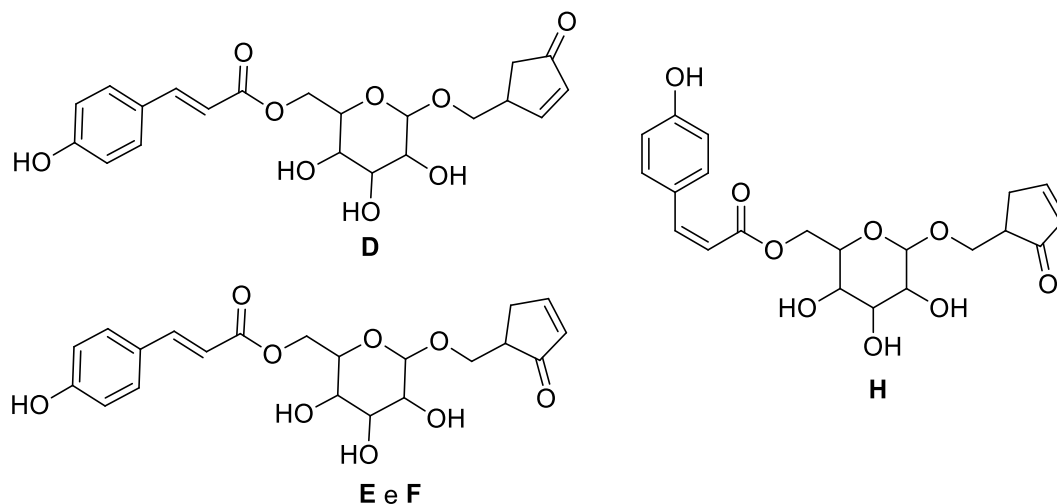


Fonte: Elaborado pela autora.

Em suma, as substâncias foram caracterizadas como: *E*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -D-glicosideo-4-oxo-2-ciclopentenilmetila (**D**); *E*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -D-glicosideo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila (**E** e **F**); e *Z*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -D-glicosideo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila (**H**) (figura 45). Ciclopentenonas são estruturas raras em PNs e costumam ser encontradas no ácido 12-oxofitodienoico (**I**), um precursor do ácido

jasmônico (II), e também em prostaglandinas de musgos e vegetais marinhos (TAYLOR, PYKE e PYKE, 1991).

Figura 45 – Estruturas químicas propostas para as substâncias de **FB3** da *X. pockia*.

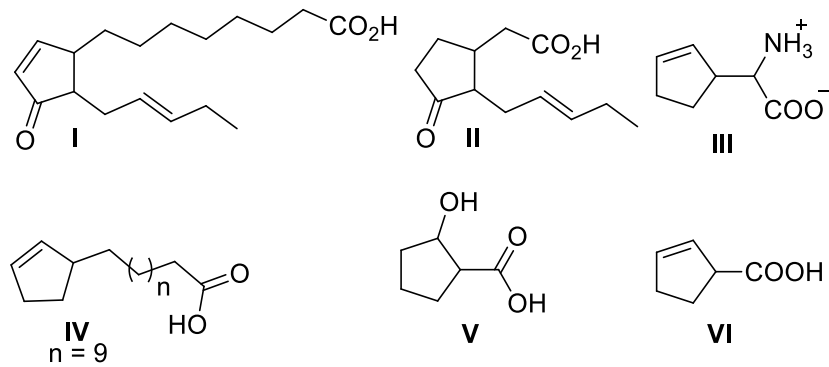


Fonte: Elaborado pela autora.

Há, na literatura, relatos da presença de ciclopentanos em glicosídeos cianogênicos e ácidos graxos encontrados na família Flacourtiaceae, que tem como precursor comum a ciclopentenilglicina (III) (Figura 46) (SELMAR *et al*, 2010; REHFELDT *et al*, 1980; OLAFSDOTTIR *et al*, 1992). Como a família Flacourtiaceae foi extinta e seus gêneros divididos entre as famílias Salicaceae e Achariaceae (CHASE *et al*, 2002; APG III, 2009), pode-se assumir que a biogênese das ciclopentenonas identificadas nesse trabalho podem estar ligadas a ciclopentenilglicina (III). Além disso, outra espécie do gênero *Xylosma*, apresenta em sua constituição fitoquímica o ácido chaulmoógrico (IV) que é um ácido graxo ciclopentenóide, e glicosídeos fenólicos (xylocosídeos D–G) (29–32) (Figura 47) esterificados com o ácido 2-hidroxíciclopentanocarboxílico (V), que possuem biogênese semelhante (XU *et al*, 2008).

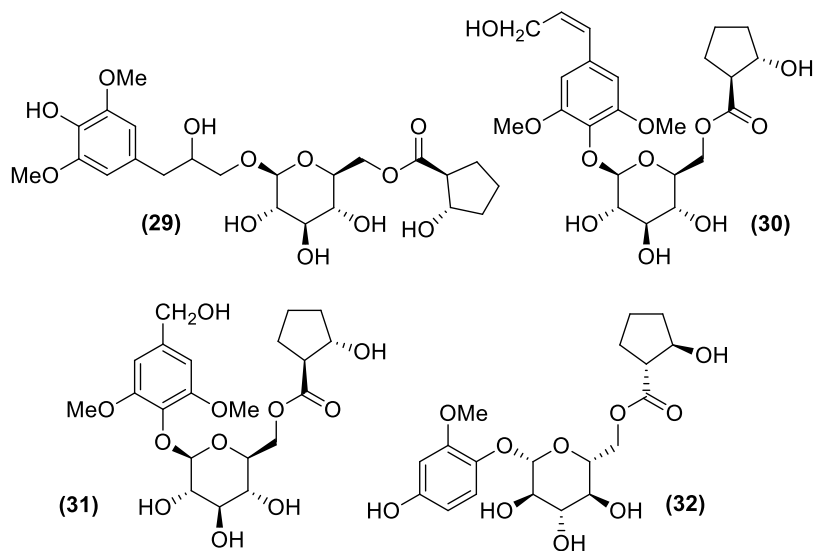
Amarasinghe e colaboradores (2007) sugerem que a biossíntese de S-ciclopentenonas se dá pela oxidação em C-4 e a redução da função carboxílica do ácido alepróico (VI) (Figura 46), um derivado da ciclopentenilglicina precursor de ciclopentenil ácidos graxos. Supondo que as ciclopentenonas isoladas nesse trabalho sejam formadas por meio dessa mesma rota biossintética, é possível inferir que estas também possuem estereoquímica S.

Figura 46 – Estrutura química de substâncias naturais contendo ciclopentenonas e de seus precursores.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 47 – Estrutura química dos xylocosides D–G.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 5.2.1 Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica das frações **FAE** e **FB3** foi avaliada por meio do ensaio de microdiluição (CLSI, 2008), utilizando 9 linhagens de *C. gattii*, 9 linhagens de *C. neoformans*, e os fármacos fluconazol (FLU) e anfotericina B (AMB) como controle. Na tabela 5 são apresentados os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) para **FAE** e **FB3** frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, respectivamente.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) de **FAE**, **FB3**, FLU e AMB, frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Linhagens	FAE ( $\mu\text{g/mL}$ )	FB3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	FLU ( $\mu\text{g/mL}$ )	AMB ( $\mu\text{g/mL}$ )	
<i>C. gattii</i>	L28/02 (C)	4	21	4	1,25
	196 L 03 (C)	1	2,63	8	1,25
	1913 ER (C)	4	1,31	16	5
	L 27/01 (C)	8	21	8	1,25
	LM 818 (C)	2	2,63	8	5
	L 24/01 (C)	8	21	8	5
	547/OTTI (A)	2	10,5	16	5
	ATCC 24065	8	5,25	2	1,25
	ATCC 32608	4	21	2	0,62
<i>C. neoformans</i>	5396 (C)	16	10,5	1	0,5
	96806 (C)	0,5	10,5	8	0,5
	27 JF (C)	8	0,16	2	0,5
	WP (C)	8	5,25	8	0,5
	H 99 (C)	4	2,63	4	0,5
	C 31 (A)	4	5,25	4	1
	ATCC 24067	1	5,25	4	0,5
	ATCC 28957	4	5,25	2	0,25
	ATCC 62066	8	10,5	2	0,25

Legenda: A CIM representa a concentração da amostra capaz de inibir o crescimento *in vitro* do respectivo isolado. C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection, FLU: fluconazol; AMB: anfotericina B. Fonte: Elaborado pela autora.

Como pode ser observado na tabela 5, os valores de CIM observados para **FAE** encontram-se entre 1 e 8  $\mu\text{g/mL}$  frente a *C. gattii* e entre 0,5 e 16  $\mu\text{g/mL}$  frente a *C. neoformans*. Já **FB3** apresenta CIM entre 1,31 e 21  $\mu\text{g/mL}$  frente a *C. gattii* e 0,16 a

10,5 µg/mL frente a *C. neoformans*. Os valores de CIM observados para **FAE** e **FB3** revelam uma potente atividade antifúngica para as frações. Segundo Rios e Recio (2005), extratos e frações de plantas que apresentam  $CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$  são considerados fontes promissoras de substâncias com atividade antimicrobiana e abrem novas possibilidades para a descoberta de moléculas ativas.

Na tabela 5 também é possível observar que **FAE** apresentou, de modo geral, valores de CIM inferiores aos apresentados por **FB3**. Esse fenômeno pode ser explicado de duas maneiras distintas: a presença de sinergismo entre as substâncias presentes em **FAE**, ou seja, o conjunto de substâncias juntas produziram o efeito antifúngico observado (MUNDY; PENDRY; RAHMAN, 2016; YARNELL, 2015); ou as substâncias presentes em **FB3**, apesar de apresentarem atividade antifúngica, não são as principais responsáveis pela atividade de **FAE**. O isolamento e avaliação da atividade das substâncias presentes em ambas as frações é fundamental para que o comportamento observado possa ser explicado.

Por outro lado, **FB3** apresentou CIM duas vezes menor que o observado para **FAE** para as linhagens 1913 ER e ATCC 24065 de *C. gattii* e para as linhagens clínicas 5396, 27 JF, WP, H99 de *C. neoformans*. Destaca-se o CIM de **FB3** para as linhagens clínicas 1913 ER (1,31 µg/mL) e 27 JF (0,16 µg/mL), concentrações mais potentes que as observadas para AMB, principal fármaco utilizado no tratamento das criptococose. Além disso, é importante destacar que **FAE** e **FB3** apresentaram atividade semelhante ou até mais potente que o FLU, um dos principais fármacos utilizados no tratamento de criptococose.

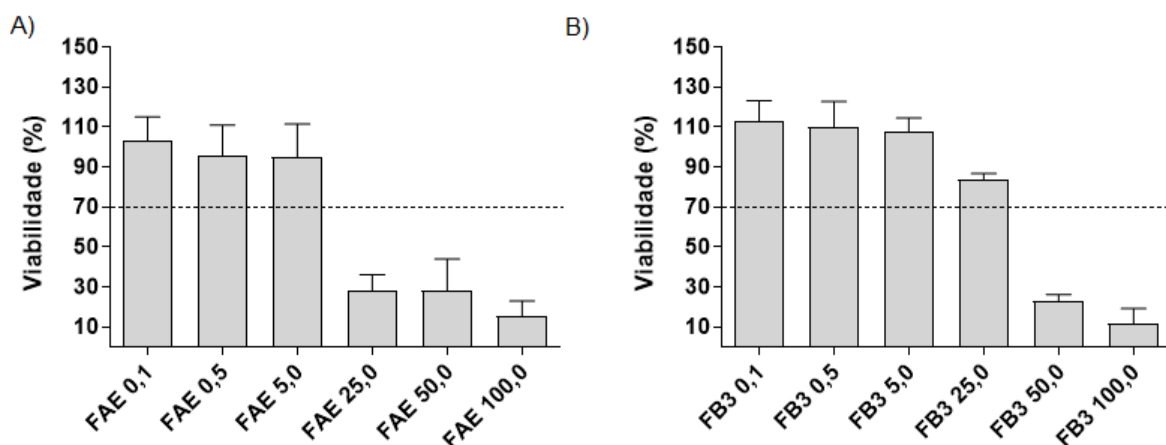
O tratamento padrão para criptococose é longo e de elevada toxicidade, consistindo na administração de AMB desoxicolato e 5-FC por uma semana, seguida de FLU por 7 a 14 dias (LAWRENCE *et al.*, 2018; MORACE; BORGHI, 2010; TU *et al.*, 2019). Em países, como o Brasil, que não dispõem de 5-FC, a OMS recomenda o uso de AMB desoxicolato e FLU por duas semanas (OMS, 2018). A toxicidade do tratamento está diretamente relacionada à AMB, fármaco conhecido pela elevada presença de efeitos adversos. Sabe-se ainda que os casos de resistência a antifúngicos azólicos, principalmente ao FLU, vêm aumentando nas últimas décadas, o que compromete a efetividade do tratamento da criptococose (BONGOMIN *et al.*, 2018; CHEONG; MCCORMACK, 2013). Ao apresentar atividade semelhante e por vezes até mais potente que o FLU, **FAE** e **FB3** podem ser consideradas fontes

potencialmente promissoras para a descoberta de novos líderes para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da criptococose, uma vez que apresentam substâncias com elevado potencial antifúngico. As substâncias **D**, **E**, **F** e **H** estão sendo avaliadas quanto à atividade antifúngica frente a linhagens de *Cryptococcus* spp.

### 5.2.2 Avaliação da citotoxicidade

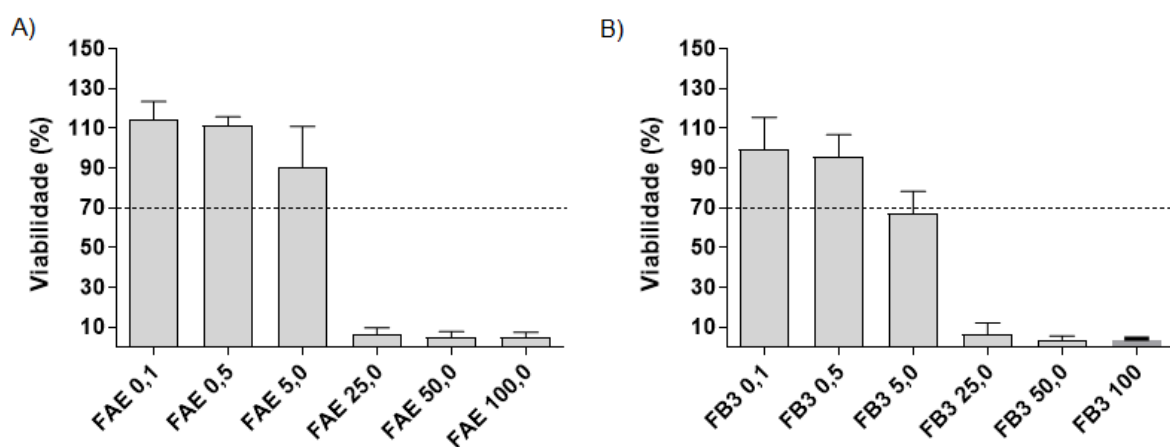
A citotoxicidade de **FAE** e **FB3** foi determinada através de experimentos de viabilidade celular em culturas de macrófagos RAW 264.7 e J774A.1. Como pode ser observado nas figuras 49 e 50, em concentrações até 5 µg/mL de **FAE**, a viabilidade dos macrófagos foi superior a 70%. Já para **FB3** observa-se viabilidade superior a 70% em concentrações inferiores a 25 µg/mL para macrófagos RAW 264.7 e concentrações inferiores a 0,5 µg/mL para macrófagos J774A.1

Figura 49- Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com **FAE** e **FB3**, após 48 horas de cultura.



Legenda: A) viabilidade celular de **FAE**; B) viabilidade celular de **FB3**. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 50 - Viabilidade celular de macrófagos J774A.1 tratados com **FAE** e **FB3**, após 48 horas de cultura.



Legenda: A) viabilidade celular de **FAE**; B) viabilidade celular de **FB3**. Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo a ISO 10993-5 (2009) são consideradas substâncias não citotóxicas, em ensaios de MTT, aquelas que mantenham a viabilidade celular em valores superiores a 70%. Em vista disso, concentrações de **FAE** pode ser considerada não citotóxicas na faixa de concentração entre 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e 4  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, para algumas linhagens foram observadas CIMs entre 8  $\mu\text{g/mL}$  a 16  $\mu\text{g/mL}$ , citotóxicas para ambos as linhagens de macrófagos. As concentrações ativas de **FB3** variam de 0,16  $\mu\text{g/mL}$  a 21  $\mu\text{g/mL}$ , sendo considerada não citotóxica frente macrófagos RAW 264.7. Porém, para as células J774A.1 apenas a CIM de 0,16  $\mu\text{g/mL}$  mL pode ser considerada não citotóxica através desses experimentos. Em ensaios de viabilidade celular, diferentes resultados são esperados já que linhagens diferentes costumam apresentar susceptibilidade específica e distinta para uma mesma amostra (GUNAWARDENA *et al.*, 2015).

De posse de dados de atividade biológica e informações sobre citotoxicidade, foi possível inferir o índice de seletividade (IS) das frações avaliadas, permitindo traçar um perfil de segurança preliminar para as amostras. O IS é um parâmetro que demonstra a relação entre eficácia e segurança de um extrato ou substância, e é calculado por meio da divisão do  $\text{IC}_{50}$  pelo CIM (ADAMU; NAIDOO; ELOFF, 2012). Uma substância antifúngica é considerada potencialmente segura quando o IS é igual ou maior que 1, ressaltando que quanto maior for o IS, maior será a segurança da substância (ADAMU; NAIDOO; ELOFF, 2012; GULLO *et al.*, 2012).

Os valores de IC<sub>50</sub> para **FAE** e **FB3** em macrófagos RAW 264.7 foram, respectivamente, 12,24 µg/mL e 31,69 µg/mL, enquanto que, para J774A.1 foram 7,30 µg/mL e 6,72 µg/mL, respectivamente. Na tabela 6 é possível observar os valores de IS para **FAE** e **FB3** para todas as linhagens de *Cryptococcus* testadas. Observa-se que algumas linhagens apresentam IS < 1, o que representa uma toxicidade inespecífica (DE SOUZA *et al.*, 2014; SHAI *et al.*, 2008). No entanto, de modo geral, as frações apresentam IS > 1, mostrando-se seguras para o prosseguimento dos estudos de atividade anticriptocócica. Os melhores resultados foram observados para a subfração **FB3** frente à linhagem 27 JF (C), com IS = 198,06 (RAW 264.7) e IS = 42 (J774A.1), sugerindo elevada seletividade e perfil de segurança promissor.

Tabela 6 – Índice de seletividade (IS) de **FAE** e **FB3** calculado com base no IC<sub>50</sub> em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1.

Linhagens	FAE			FB3			
	CIM (µg/mL)	IS		CIM (µg/mL)	IS		
		RAW 264.7	J774A.1		RAW 264.7	J774A.1	
<i>C. gattii</i>	L28/02 (C)	4	3,06	1,83	21	1,51	0,32
	196 L 03 (C)	1	12,24	7,30	2,63	12,05	2,56
	1913 ER (C)	4	3,06	1,83	1,31	24,19	5,13
	L 27/01 (C)	8	1,53	0,91	21	1,51	0,32
	LM 818 (C)	2	6,12	3,65	2,63	12,05	2,56
	L 24/01 (C)	8	1,53	0,91	21	1,51	0,32
	547/OTTI (A)	2	6,12	3,65	10,5	3,02	0,64
	ATCC 24065	8	1,53	0,91	5,25	6,04	1,28
	ATCC 32608	4	3,06	1,83	21	1,51	0,32
<i>C. neoformans</i>	5396 (C)	16	0,77	0,46	10,5	3,02	0,64
	96806 (C)	0,5	24,48	14,60	10,5	3,02	0,64
	27 JF (C)	8	1,53	0,91	0,16	198,06	42,00
	WP (C)	8	1,53	0,91	5,25	6,04	1,28
	H 99 (C)	4	3,06	1,83	2,63	12,05	2,56
	C 31 (A)	4	3,06	1,83	5,25	6,04	1,28
	ATCC 24067	1	12,24	7,30	5,25	6,04	1,28
	ATCC 28957	4	3,06	1,83	5,25	6,04	1,28
	ATCC 62066	8	1,53	0,91	10,5	3,02	0,64

Legenda: CIM: concentração da amostra capaz de inibir o crescimento *in vitro* da linhagem; C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: American Type Culture Collection. Nota: O IS foi calculado pela divisão do IC<sub>50</sub> pelo CIM. Os valores de IC<sub>50</sub> para RAW 264.7 foram 12,24 µg/mL (**FAE**) e 31,69 µg/mL (**FB3**), e para J774A.1 foram 7,30 µg/mL (**FAE**) e 6,72 µg/mL (**FB3**). Fonte: Elaborado pela autora.



Observa-se, que de modo geral, nas concentrações ativas (0,5 a 8 µg/mL para **FAE** e 0,16 a 21 µg/mL para **FB3**) as frações não apresentaram citotoxicidade considerável para macrófagos RAW 264.7. Por outro lado, quando analisadas frente a macrófagos J774A.1, observa-se uma potencial citotoxicidade, onde a subfração **FB3** só seria considerada segura frente à linhagem 27 JF (C) (0,16 µg/mL). Já a fração **FAE** apresentou segurança nas concentrações inferiores a 4 µg/mL. O cálculo de IS reforça a segurança para as concentrações ativas entre 0,5 a 4 µg/mL de **FAE** tanto para RAW 264.7 quanto pra J774A.1. Já para **FB3**, o IS demonstra que todas as concentrações são seguras frente RAW 264.7, porém concentrações de 10,5 e 21 µg/mL apresentam toxicidade inespecífica para J774A.1. O IS é um importante valor de orientação geral, porém não pode ser usado como parâmetro exclusivo para decidir se uma substância é segura ou não (POLAQUINI *et al.*, 2017). Outros testes de citotoxicidade devem ser conduzidos, utilizando linhagens celulares e metodologias alternativas, a fim de se determinar a segurança das frações **FAE** e **FB3**.

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo, realizado com as folhas de *X. prockia*, permitiu a obtenção e caracterização da fração acetato de etila (**FAE**) e da subfração **FB3**. A caracterização permitiu identificar a presença majoritária de glicosídeos fenólicos na composição de **FAE**. A caracterização de **FB3** demonstrou que esta se trata de uma mistura de isômeros geométricos e de posição, sendo isoladas quatro substâncias. A substância **D** foi caracterizada como *E*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -D-glicosídeo-4-oxo-2-ciclopentenilmetila, sendo aqui descrita pela primeira vez para o gênero *Xylosma*. As substâncias **E**, **F** e **H** são inéditas na literatura e foram caracterizadas como: *E*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -D-glicosídeo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila (**E** e **F**) e *Z*-cumaroil-6'-O- $\beta$ -D-glicosídeo-2-oxo-3-ciclopentenilmetila (**H**). As frações **FAE** e **FB3** apresentaram potente atividade antifúngica frente a linhagens de *Cryptococcus* spp., com certa citotoxicidade em alguns experimentos. A necessidade de mais estudos é clara, principalmente referente às substâncias isoladas, a fim de se esclarecer a relação destas com a atividade biológica e a citotoxicidade observada, de maneira que possam servir como protótipos para o desenvolvimento de fármacos a serem utilizados no tratamento da criptococose.

## REFERÊNCIAS

ISSO 10993-5, ISSO. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. **International Organization**, 2009. doi.org/10.1021/es0620181.

ADAMU, M.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Some southern African plant species used to treat helminth infections in ethnoveterinary medicine have excellent antifungal activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol. 12, 2012. doi.org/10.1186/1472-6882-12-213.

ADISAKWATTANA, S. Cinnamic acid and its derivatives: Mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. **Nutrients**, vol. 9, n.º. 2, 2017. doi.org/10.3390/nu9020163.

ALAM, A.; SUBHAN, N.; HOSSAIN, H.; HOSSAIN, M.; REZA, H.M.; RAHMAN, M.; ULLAH, M. Obayed. Hydroxycinnamic acid derivatives: A potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. **Nutrition and Metabolism**, vol. 13, n.º. 1, p. 1–13, 2016. dx.doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3.

ALDHOLMI, M.; MARCHAND, P.; OURLIAC-GARNIER, I.; LE PAPE, P.; GANESAN, A. A decade of antifungal leads from natural products: 2010–2019. **Pharmaceuticals**, vol. 12, n.º. 4, p. 2010–2019, 2019. doi.org/10.3390/ph12040182.

AMARASINGHE, N.R.; JAYASINGHE, L.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Flacourside, a new 4-oxo-2-cyclopentenylmethyl glucoside from the fruit juice of *Flacourtia indica*. **Food Chemistry**, vol. 102, n.º. 1, p. 95–97, 2007. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.004.

ARMAREGO, W.L.F.; PERRIN, D.D. Purification of Laboratory Chemicals, Fourth Edition. **Molecules**, vol. 2, n.º. 10, p. 152, 1997. doi.org/10.3390/21000152.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G.D. A neglected epidemic: Fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**, vol. 22, n.º. 3, p. 120–127, 2014. dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.001.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, vol. 33, n.º. 8, p. 1582–1614, 2015. dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.

BARTNIK, M.; FACEY, P.C. **Glycosides**. [S. /]: Elsevier Inc., 2017. doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of Fungi**, vol. 3,

nº. 4, 2017. doi.org/10.3390/jof3040057.

BONGOMIN, F.; OLADELE, R.O.; GAGO, S.; MOORE, C.B.; RICHARDSON, M.D. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, vol. 61, nº. 5, p. 290–297, May 2018. doi.org/10.1111/myc.12747.

CALIXTO, J.B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 91 3, p. e20190105, 2019. doi.org/10.1590/0001-3765201920190105.

CASTRO, S.B.R; LEAL, C.A.G; FREIRE, F.R; CARVALHO, D.A; OLIVEIRA, D.F; FIGUEIREDO, H.C.P. Antibacterial Activity of Plant Extracts From Brazil Against Fish. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 39, p. 756–760, 2008. doi.org/10.1590/S1517-838220080004000030.

CHEONG, J.W.S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: Emerging or intrinsic? **Medical Mycology**, vol. 51, nº. 3, p. 261–269, 2013. doi.org/10.3109/13693786.2012.715763.

CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, nº. 10, p. 2900–2911, 2003. doi.org/10.1021/jf026187q.

CLSI. (CLSI). CaLSI. 2017. Reference Method for Broth Dilution Antifungal 486 Susceptibility Testing of Yeasts. , vol4th ed. CLSI standard M27. , Wayne, Pennsylvania19087 USA. 2008.

CORDEIRO, J.M.P.; ALMEIDA, E.M.; FELIX, L.P. Estudos taxonômicos da família Salicaceae Mirb. **Revista eletrônica do curso de geografia - campus Jataí - UFG**, nº. 23, p. 17–32, 2014.

DE SOUZA, T.B.; ORLANDI, M.; COELHO, L.F.L.; MALAQUIAS, L.C.C.; DIAS, A.L.T.; DE CARVALHO, R.R.; SILVA, N.C.; CARVALHO, D.T.. Synthesis and *in vitro* evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research**, vol. 23, nº. 1, p. 496–502, 2014. doi.org/10.1007/s00044-013-0669-2.

DE VIJLDER, T.; VALKENBORG, D.; LEMIÈRE, F.; ROMIJN, E.P.; LAUKENS, K.; CUYCKENS, F. A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation. **Mass Spectrometry Reviews**, vol. 37, nº. 5, p. 607–629, 2018. doi.org/10.1002/mas.21551.

DEMARQUE, D.P.; CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, vol. 33, nº. 3, p. 432–455, 2016. doi.org/10.1039/c5np00073d.

DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, vol. 36, nº. 4, p. 257–290, 2017.

doi.org/10.1080/07352689.2017.1402852.

DEVI, W.R.; SINGH, S.B.; SINGH, C.B. Antioxidant and anti-dermatophytic properties leaf and stem bark of *Xylosma longifolium* clos. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol. 13, 2013. doi.org/10.1186/1472-6882-13-155.

DIAS DE OLIVEIRA, J.; SCIPIONI, M.C.; NUNHO DOS REIS, A.R.; XIMENES, E. Diagnóstico da arborização da Praça Centenário, Curitibaanos, Santa Catarina, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, vol. 6, no. 3, p. 23–36, 25 Sep. 2019. DOI 10.21726/abc.v6i3.852.

FEISTEL, F.; PAETZ, C.; LORENZ, S.; BERAN, F.; KUNERT, G.; SCHNEIDER, B. *Idesia polycarpa* (Salicaceae) leaf constituents and their toxic effect on *Cerura vinula* and *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. **Phytochemistry**, vol. 143, p. 170–179, 2017. doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.08.008.

FIRACATIVE, C.; LIZARAZO, J.; ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M.T.; CASTAÑEDA, E. The status of cryptococcosis in latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 113, nº. 7, p. 1–23, 2018. doi.org/10.1590/0074-02760170554.

FOLLY, M.L.C.; FERREIRA, G.F.; SALVADOR, M.R.; SATHLER, A.A.; DA SILVA, G.F.; SANTOS, J.C.B.; SANTOS, J.R.A.dos; NUNES NETO, W.R.; RODRIGUES, J.F.S.; FERNANDES, E.S.; DA SILVA, L.C.N.; DE FREITAS, G.J.C.; DENADAI, Â.M.; RODRIGUES, I.V.; MENDONÇA, L.M.; MONTEIRO, A.S.; SANTOS, D.A.; CABRERA, G.M.; SILESS, G.; LANG, K.L. Evaluation of *in vitro* Antifungal Activity of *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) Leaves Against *Cryptococcus* spp. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, nº. February, p. 1–13, 2020. doi.org/10.3389/fmicb.2019.03114.

GOLDMAN, D. ; KHINE, H.; ABADI, J.; LINDENBERG, D.J.; PIROFSKI, L.; NIANG, R.; CASADEVALL, A. Serologic Evidence for *Cryptococcus neoformans* Infection in Early Childhood. **PEDIATRICS**, vol. 107, nº. 5, p. e66–e66, 1 May 2001. doi.org/10.1542/peds.107.5.e66.

GULLO, F.P.; SARDI, J.C.O.; SANTOS, V.A.F.F.M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N.S.; ROSSI, S.A.; DE PAULA E SILVA, A.C.A.; SOARES, L.A.; SILVA, J.F.; OLIVEIRA, H.C.; FURLAN, M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2012, p. 1–6, 2012. doi.org/10.1155/2012/340787.

GURNANI, N.; MEHTA, D.; GUPTA, M.; MEHTA, B.K. Natural Products: Source of Potential Drugs. **AJ. Basic Appl. Sci.**, vol. 6, nº. 6, p. 171–186, 2014. doi.org/10.5829/idosi.ajbas.2014.6.6.21983.

HE, W.; LIU, X.; XU, H.; GONG, Y.; YUAN, F.; GAO, Y. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. **Food Chemistry**, vol. 123, nº. 2, p. 521–528, 2010. dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.030.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, vol. 173, p. 501–513, 2015. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057.

JAISWAL, R.; HALABI, E.A.; KARAR, M.G.E.; KUHNERT, N. Identification and characterisation of the phenolics of *Ilex glabra* L. Gray (Aquifoliaceae) leaves by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, vol. 106, p. 141–155, 2014. dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.018.

KATZ, L.; BALTZ, R.H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 43, n<sup>o</sup>. 2–3, p. 155–176, 2016. doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5.

KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 27, no. SUPPL. 1, p. 12–16, 2006. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.013.

KOPARDE, A.A.; DOIJAD, Rajendra Chandrashekar; MAGDUM, Chandrakant Shripal. Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacognosy - Medicinal Plants**. [S. l.]: IntechOpen, 2019. vol. i, p. 13. doi.org/10.5772/intechopen.82860.

KUMAR, N.; PARLE, A. Cinnamic acid derivatives : An ERA. **the Pharma Journal**, vol. 8, no. 5, p. 580–595, 2019. .

KWON-CHUNG, K.J.; FRASER, J.A.; DOERING, T.L.; WANG, Z.A.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 4, p. a019760, 2014. .

LAWRENCE, D.S.; YOUSOUF, N.; MOLLOY, S.F.; ALANIO, A.; ALUFANDIKA, M.; BOULWARE, D.R.; BOYER-CHAMMARD, T.; CHEN, T.; DROMER, F.; HLUPENI, A.; HOPE, W.; HOSSEINIPOUR, M.C.; KANYAMA, C.; LORTHOLARY, O.; LOYSE, A.; MEYA, D.B.; MOSEPELE, M.; MUZOORA, C.; MWANDUMBA, H.C.; JARVIS, J.N. AMBIsome Therapy Induction Optimisation (AMBITION): High Dose AmBisome for Cryptococcal Meningitis Induction Therapy in sub-Saharan Africa: Study Protocol for a Phase 3 Randomised Controlled Non-Inferiority Trial. **Trials**, vol. 19, n<sup>o</sup>. 1, p. 649, 23 Dec. 2018. doi.org/10.1186/s13063-018-3026-4.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 68, n<sup>o</sup>. 2, p. 151–162, 9 Aug. 2005. doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9.

LIMA, T.C.; FERREIRA, A.R.; SILVA, D.F.; LIMA, E.O.; DE SOUSA, D.P. Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. **Natural Product Research**, vol. 32, n<sup>o</sup>. 5, p. 572–575, 2018. dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1317776.

LIU, W.J.H. **Traditional Herbal Medicine Research Methods Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2011.

MA, J.; MA, C. Antifungal Inhibitory Activities of Caffeic and Quinic Acid Derivatives. **Coffee in Health and Disease Prevention**. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 635–641. dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00071-1.

MAY, R.C.; STONE, N.R.H.; WIESNER, D.L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 14, n.º. 2, p. 106–117, 2016. dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6.

MENEZES-DE-OLIVEIRA, D.; AGUILAR, M.I.; KING-DÍAZ, B.; VIEIRA-FILHO, S.A.; PAINS-DUARTE, L.; SILVA, G.D.F.; LOTINA-HENSEN, B. The Triterpenes 3 $\beta$ -Lup-20(29)-en-3-ol and 3 $\beta$ -Lup-20(29)-en-3-yl Acetate and the Carbohydrate 1,2,3,4,5,6-Hexa-O-acetyl-dulcitol as Photosynthesis Light Reactions Inhibitors. **Molecules**, vol. 16, n.º. 12, p. 9939–9956, 1 Dec. 2011. doi.org/10.3390/molecules16129939.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**, , p. 1–416, 2017. .

MOLLOY, S.F.; CHILLER, T.; GREENE, G.S.; BURRY, J.; GOVENDER, N.P.; KANYAMA, C.; MFINANGA, S.; LESIKARI, S.; MAPOURE, Y.N.; KOUANFACK, C.; SINI, V.; TEMFACK, E.; BOULWARE, D.R.; DROMER, F.; DENNING, D.W.; DAY, J.; STONE, N.R.H.; BICANIC, T.; JARVIS, J. N.; LORTHOLARY, O.; HARRISON, T.S.; Jaffar, S.; LOYSE, Angela. Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, n.º. 6, p. 1–7, 2017. doi.org/10.1371/journal.pntd.0005575.

MORACE, G.; BORGHI, E. Fungal infections in ICU patients: Epidemiology and the role of diagnostics. **Minerva Anestesiologica**, vol. 76, n.º. 11, p. 950–956, 2010. .

MUNDY, L.; PENDRY, B.; RAHMAN, M. Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine. **Perspectives in Medicine**, vol. 6, n.º. 2, p. 53–58, 2016. dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2016.03.001.

MUSHTAQ, S.; ABBASI, B.H.; UZAIR, B.; ABBASI, R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. **EXCLI Journal**, vol. 17, p. 420–451, 2018. doi.org/10.17179/excli2018-1174.

NAVEED, M.; HEJAZI, V.; ABBAS, M.; KAMBOH, A.A.; KHAN, G.J.; SHUMZAID, M.; AHMAD, F.; BABAZADEH, D.; FANGFANG, X.; MODARRESI-GHAZANI, F.; WENHUA, L.; XIAOHUI, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 97, n.º. October 2017, p. 67–74, 2018. doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064.

NETT, J.E.; ANDES, D.R. Antifungal Agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, vol. 30, n.º. 1, p. 51–83, Mar. 2016. doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, vol. 83, n.º. 3, p. 770-803, 2020. doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

OMS. **Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection.** [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260399/9789241550277-eng.pdf;jsessionid=04435249DFBDD7B62C8B6AEEE4928A4F?sequence=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260399/1/9789241550277-eng.pdf?ua=1%0Ahttp://www.who.int/hiv/pub/cryptococcal\\_di](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260399/9789241550277-eng.pdf;jsessionid=04435249DFBDD7B62C8B6AEEE4928A4F?sequence=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260399/1/9789241550277-eng.pdf?ua=1%0Ahttp://www.who.int/hiv/pub/cryptococcal_di).

OUYANG, H.; BO, T.; ZHANG, Z.; GUO, X.; HE, M.; LI, J.; YANG, S.; MA, X.; FENG, Y. Ion mobility mass spectrometry with molecular modelling to reveal bioactive isomer conformations and underlying relationship with isomerization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 32, n.º. 22, p. 1931–1940, 2018. doi.org/10.1002/rcm.8271.

PARENTE-ROCHA, J.A.; BAILÃO, A.M.; AMARAL, A.C.; TABORDA, C.P.; PACCEZ, J.D.; BORGES, C.L.; PEREIRA, M. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators of Inflammation**, vol. 2017, p. 16, 2017. doi.org/10.1155/2017/9870679.

PARVEEN, I.; THREADGILL, M.D.; HAUCK, B.; DONNISON, I.; WINTERS, A. Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves and stems of *Miscanthus x giganteus* using LC-ESI-MS<sup>n</sup>. **Phytochemistry**, vol. 72, n.º. 18, p. 2376–2384, 2011. dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.015.

PARVEEN, M.; GHALIB, R.M. Flavonoids and antimicrobial activity of leaves of *Xylosma longifolium*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, vol. 57, n.º. 1, p. 989–991, 2012. doi.org/10.4067/S0717-97072012000100007.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M.S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, vol. 21, n.º. 2, p. 204–207, 2016. dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ JR, G.S.; VYVYAN, J. R. Introdução a Espectroscopia. **Introdução a espectroscopia**, 4ª edição, Cengage Learning, 2008. .

PAZ, W.H.P. **Aplicações de espectrometria de massas e estudo biológico do extrato dos frutos da remela-de-cachorro (Clavija lancifolia-Theophrastaceae).** 2015. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Amazonas, 2015.

PEI, K.; OU, J.; HUANG, J.; OU, S. p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 96, n.º. 9, p. 2952–2962, 2016. doi.org/10.1002/jsfa.7578.

PEPERIDOU, A.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; VOULGARI, E.;



AVGOUSTAKIS, Konstantinos. Multifunctional cinnamic acid derivatives. **Molecules**, vol. 22, n<sup>o</sup>. 8, p. 1–17, 2017. doi.org/10.3390/molecules22081247.

PFALLER, M.A.; RHOMBERG, P.R.; WIEDERHOLD, N.P.; GIBAS, C.; SANDERS, C.; FAN, H.; MELE, J.; KOVANDA, L.L.; CASTANHEIRA, M. *In vitro* activity of isavuconazole against opportunistic fungal pathogens from two mycology reference laboratories. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 62, n<sup>o</sup>. 10, 2018. doi.org/10.1128/AAC.01230-18.

PHILIPPSSEN, A.F.; MIGUEL, D.M.; KALEGARI, M. Avaliação da atividade antibacteriana das cascas das raízes de *Xylosma ciliatifolia* (Clos) Eichler (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, vol. 18, n<sup>o</sup>. 2, p. 1–5, 2013.

PIANALTO, K.M.; ALSPAUGH, J.A. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**, vol. 2, n<sup>o</sup>. 4, p. 10–12, 2016. doi.org/10.3390/jof2040026.

PIGATTO, M.C.; UCHOA, F.T.; COSTA, T.D. Sistêmico Utilizados Em Pacientes Imunocomprometidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 90, n<sup>o</sup>. 1, p. 86–94, 2009. .

POLAQUINI, C.R.; TORREZAN, G.S.; SANTOS, V.R.; NAZARÉ, A.C.; CAMPOS, D.L.; ALMEIDA, L.A.; SILVA, I.C.; FERREIRA, H.; PAVAN, F.R.; DUQUE, C.; REGASINI, L. O. Antibacterial & antitubercular activities of cinnamylideneacetophenones. **Molecules**, vol. 22, n<sup>o</sup>. 10, p. 1–12, 2017. doi.org/10.3390/molecules22101685.

PRASAD, T.; SETHUMADHAVAN, S.; FATIMA, Z. Altered Ergosterol biosynthetic pathway - an alternate multidrug resistance mechanism independent of drug efflux pump in human pathogenic fungi *C. albicans*. In: MÉNDEZ-VILAS, Antonio (ed.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Microbiolo. [S. l.]: Formatex Research Center, 2011. p. 757–768.

PUIGVENTÓS, L.; NAVARRO, M.; ALECHAGA, É.; NÚÑEZ, O.; SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; PUIGNOU, L. Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 407, n<sup>o</sup>. 2, p. 597–608, 5 Jan. 2015. DOI 10.1007/s00216-014-8298-2.

RADHAKRISHNAN, V.S.; DWIVEDI, S.P.; SIDDIQUI, M.H.; PRASAD, T. *In vitro* studies on oxidative stress-independent, Ag nanoparticles-induced cell toxicity of *Candida albicans*, an opportunistic pathogen. **International journal of nanomedicine**, vol. 13, p. 91–96, 2018. doi.org/10.2147/IJN.S125010.

RAU, T.G.; BLUM, C.T. Caracterização dendrológica da família Salicaceae em um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. **Acta Biológica Catarinense**, vol. 6, n<sup>o</sup>. 2, p. 26, 2019. doi.org/10.21726/abc.v6i2.703.

ROSLUND, M.U.; TÄHTINEN, P.; NIEMITZ, M.; SJÖHOLM, R. Complete

assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts and  $J_{\text{H,H}}$  coupling constants in NMR spectra of d-glucopyranose and all d-glucopyranosyl-d-glucopyranosides.

**Carbohydrate Research**, vol. 343, n $^\circ$ . 1, p. 101–112, 2008.

doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.008.

SHAI, L.J.; MCGAW, L.J.; ADEROGBA, M.A.; MDEE, L.K.; ELOFF, J.N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 119, n $^\circ$ . 2, p. 238–244, 2008. doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.036.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Silverstein - Spectrometric Identification of Organic Compounds 7<sup>th</sup> ed.pdf**. New York : John Wiley and Sons, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, Artmed, 2017.

SKOLNIK, K.; HUSTON, S.; MODY, C.H. Cryptococcal Lung Infections. **Clinics in Chest Medicine**, vol. 38, n $^\circ$ . 3, p. 451–464, 2017.

dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.007.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C.; SNYDER, S. **Organic Chemistry**. John Wiley & Sons, 10<sup>a</sup> edição, [S. n.], 2015.

SULTANA, S.; ALI, M.; JAMEEL, M. Aliphatic Constituents from the Leaves of *Dillenia indica* L., *Halothamus bottae* Jaub. and *Xylosma longifolium* Clos.

**Chemistry Research Journal**, vol. 3, n $^\circ$ . 3, p. 109–117, 2018. .

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, vol. 12, n $^\circ$ . 3, p. 679–693, 2007.

doi.org/10.3390/12030679.

SWAPANA, N.; NOJI, M.; NISHIUMA, R.; IZUMI, M.; IMAGAWA, H.; KASAI, Y.; OKAMOTO, Y.; ISEKI, K.; SINGH, B.; ASAKAWA, Y.; UMEYAMA, A. A new diphenyl ether glycoside from *Xylosma longifolium* collected from north-east India. **Natural Product Communications**, vol. 12, n $^\circ$ . 8, p. 1273–1275, 2017.

doi.org/10.1177/1934578x1701200832.

THOMFORD, N.E.; SENTHEBANE, D.A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21<sup>st</sup> century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 19, n $^\circ$ . 6, 2018. doi.org/10.3390/ijms19061578.

TRUONG, B.N.; PHAM, V.C.; MAI, H.D.T.; NGUYEN, V.H.; NGUYEN, M.C.; NGUYEN, T.H.; ZHANG, H.; FONG, H.H.S.; FRANZBLAU, S.G.; SOEJARTO, D.D.; CHAU, V.M. Chemical constituents from *Xylosma longifolia* and their anti-tubercular activity. **Phytochemistry Letters**, vol. 4, n $^\circ$ . 3, p. 250–253, Sep. 2011.

doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.008.

TU, J.; LI, Z.; JIANG, Y.; JI, C.; HAN, G.; WANG, Y.; LIU, N.; SHENG, C. Discovery of Carboline Derivatives as Potent Antifungal Agents for the Treatment of Cryptococcal Meningitis. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 62, no. 5, p. 2376–2389, 2019. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01598.

UFRGS. Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 2010. Disponível em:  
[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar\\_mini.php&especie=1115](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php&especie=1115). Accessed on: 8 Apr. 2020.

VINHOLES, J.; SILVA, B.M.; SILVA, L.R. Hydroxycinnamic acids (HCAS): Structure, biological properties and health effects. **Advances in Medicine and Biology**, vol. 88, n°. April 2016, p. 105–130, 2015. .

WAGNER, C.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E.; JOUKHADAR, C. The echinocandins: Comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. **Pharmacology**, vol. 78, n°. 4, p. 161–177, 2006. doi.org/10.1159/000096348.

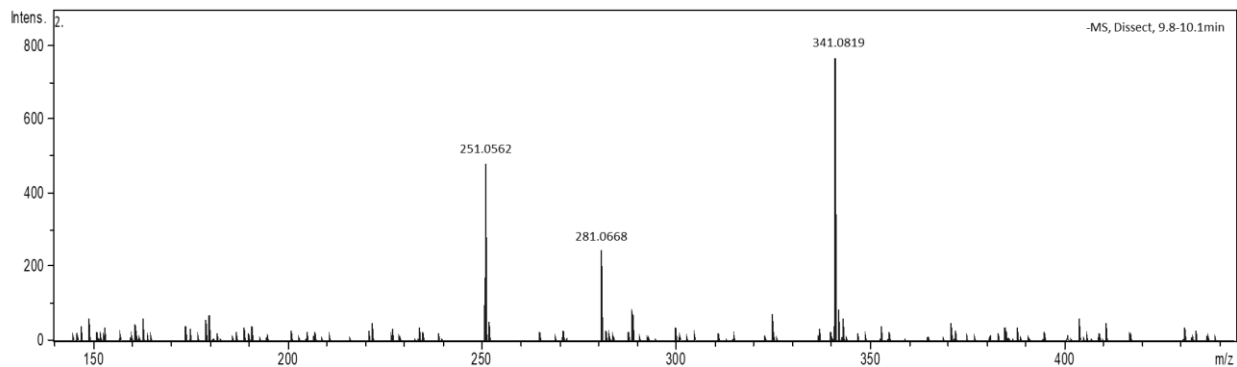
XU, Z.R.; CHAI, X.Y.; BAI, C.C.; REN, H.Y.; LU, Y.N.; SHI, H.M.; TU, P.F. Xylocosides A-G, phenolic glucosides from the stems of *Xylosma controversum*. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 91, n°. 7, p. 1346–1354, 2008. doi.org/10.1002/hlca.200890146.

YARNELL, E. Synergy in Herbal Medicines: Part 1. **Journal of Restorative Medicine**, vol. 4, n°. 1, p. 60–73, 1 Dec. 2015. doi.org/10.14200/jrm.2015.4.0104.

ZHANG, Y.; XIONG, H.; XU, X.; XUE, X.; LIU, M.; XU, S.; LIU, H.; GAO, Y.; ZHANG, H.; LI, X. Compounds identification in semen cuscudae by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLCS) coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, vol. 23, n°. 5, 2018. doi.org/10.3390/molecules23051199.

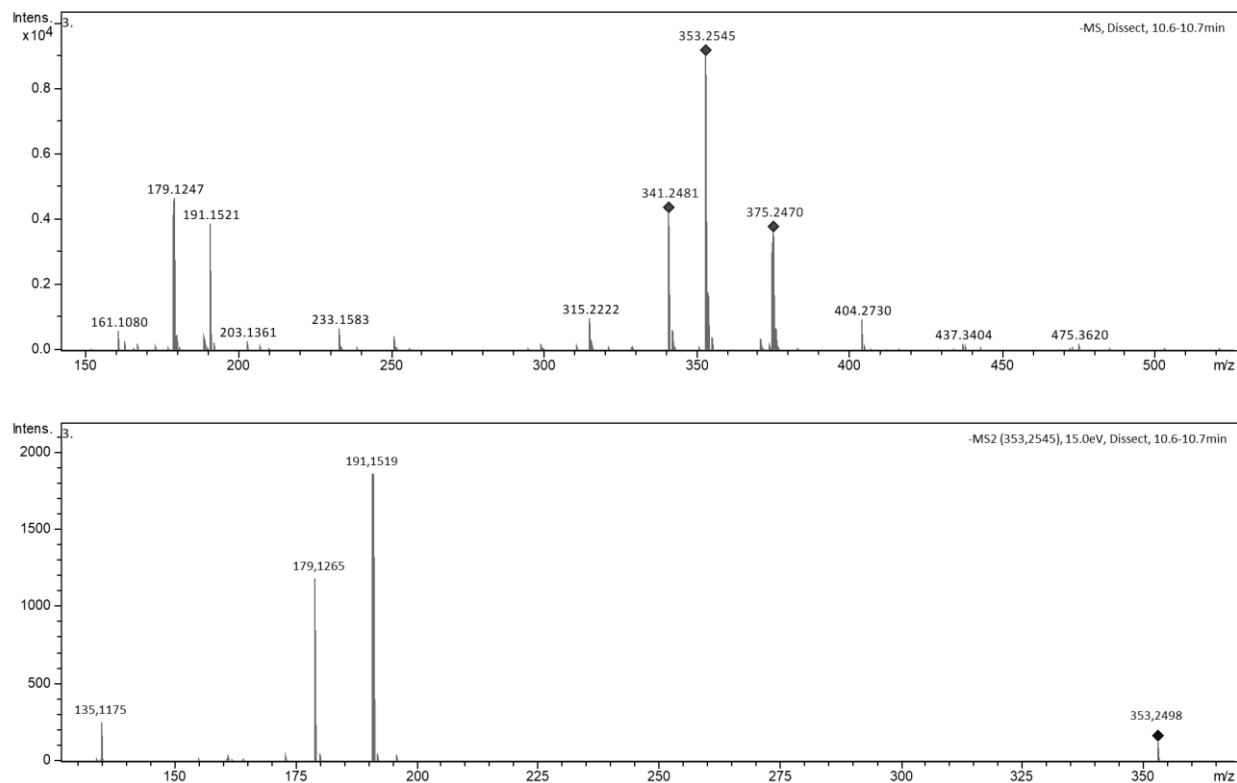
## APÊNDICE I

Figura I – Espectro EM da substância **XP1**



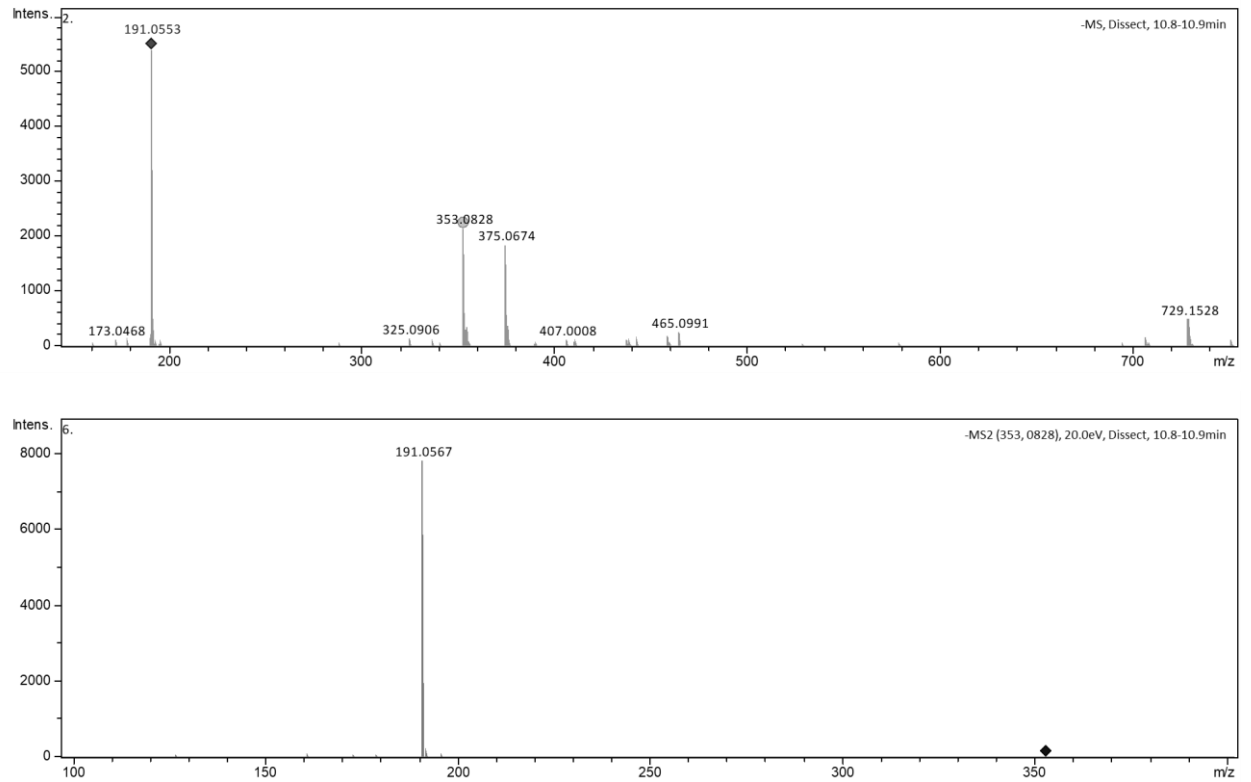
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura II - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP2**



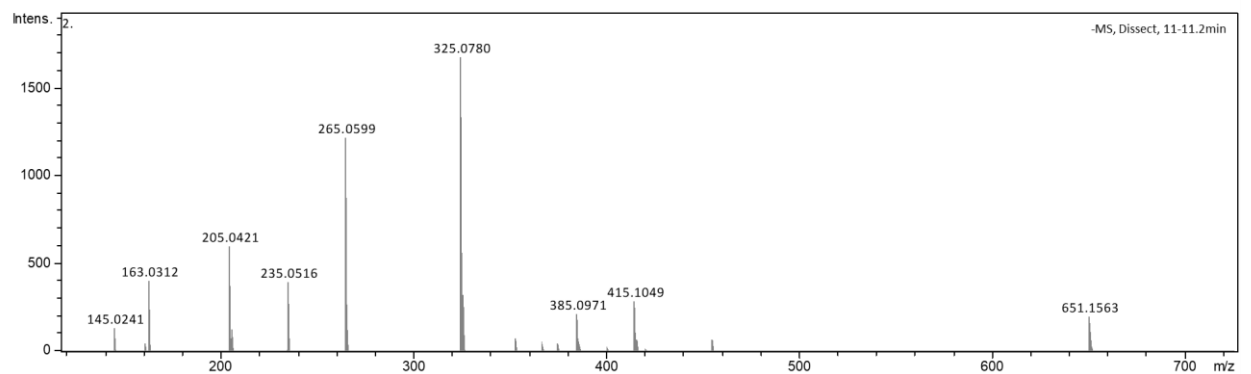
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura III - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP3**



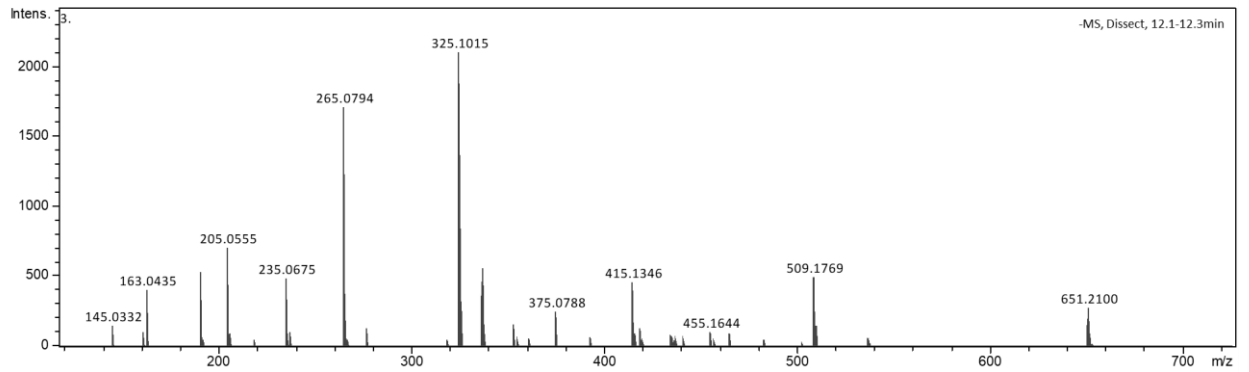
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura IV - Espectros EM da substância **XP4**



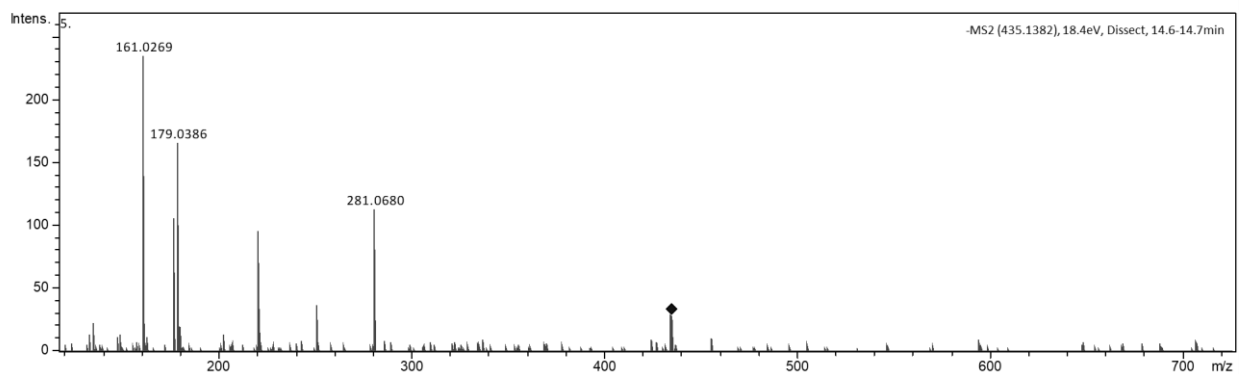
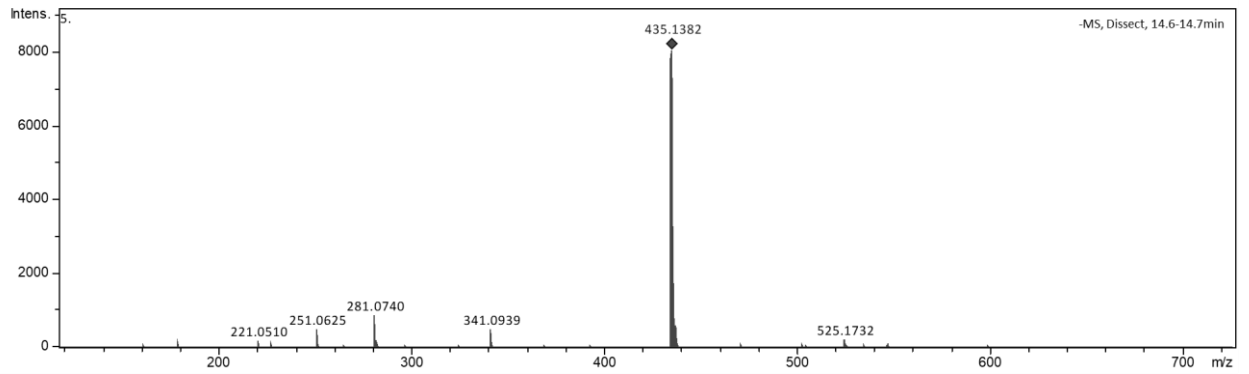
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura V - Espectros EM da substância **XP5**



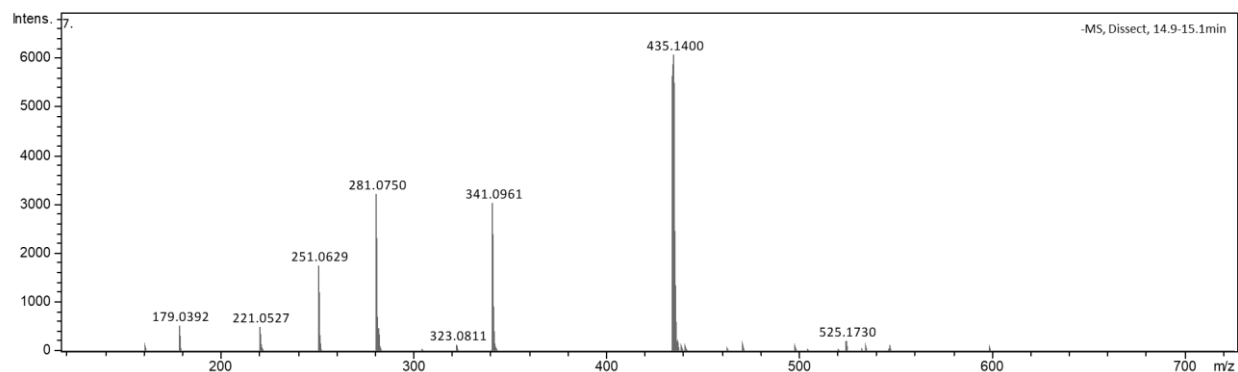
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura VI - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP6**



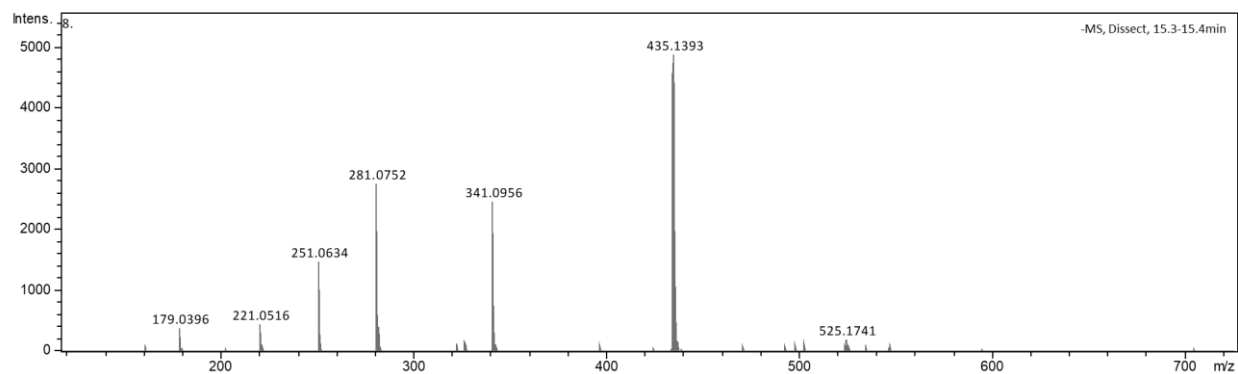
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura VII - Espectros EM da substância **XP7**



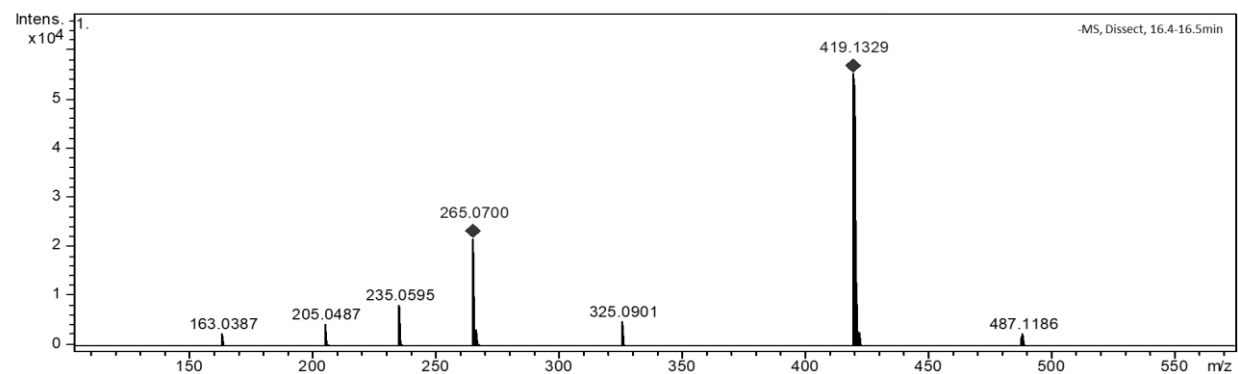
Fonte: Elaborado pela autora.

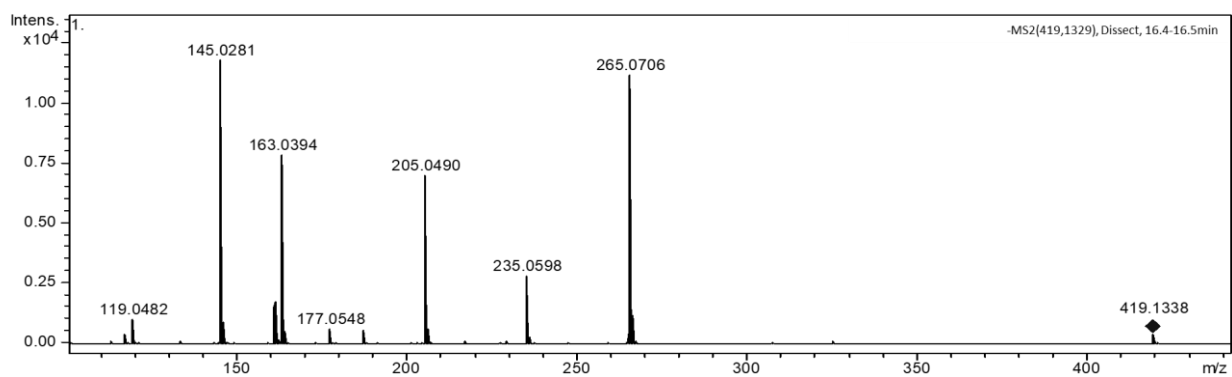
Figura VIII - Espectros EM da substância **XP8**



Fonte: Elaborado pela autora.

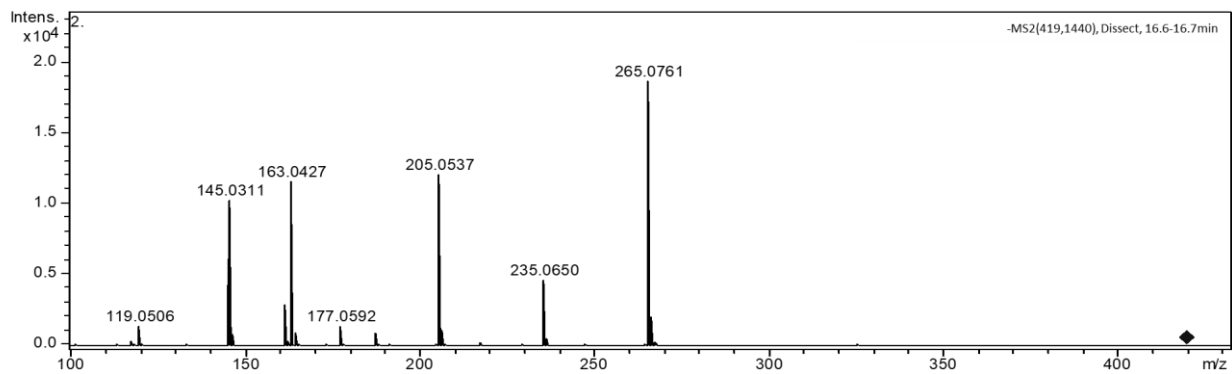
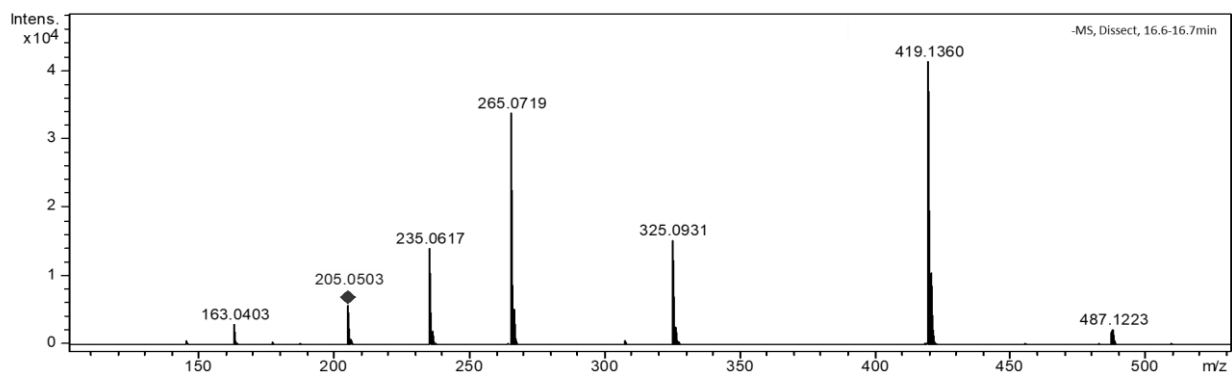
Figura IX - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP9**





Fonte: Elaborado pela autora.

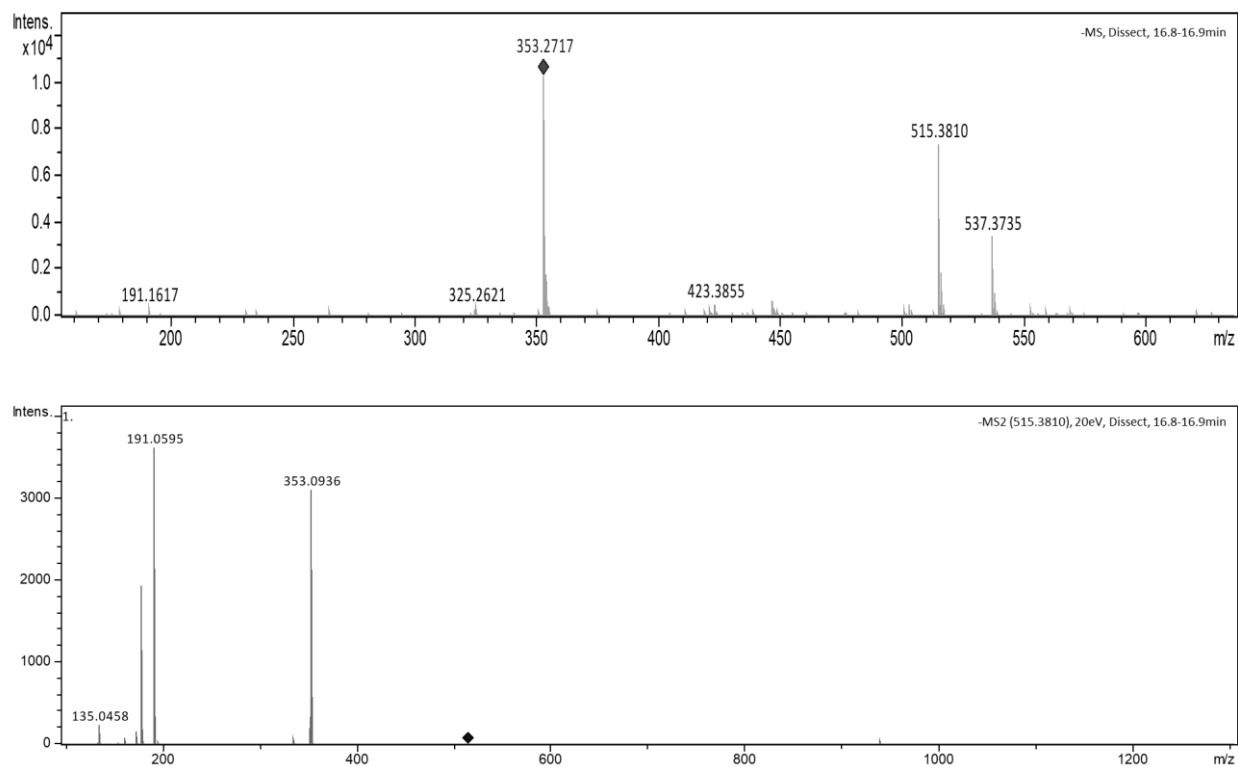
Figura X - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP10**



Fonte: Elaborado pela autora.

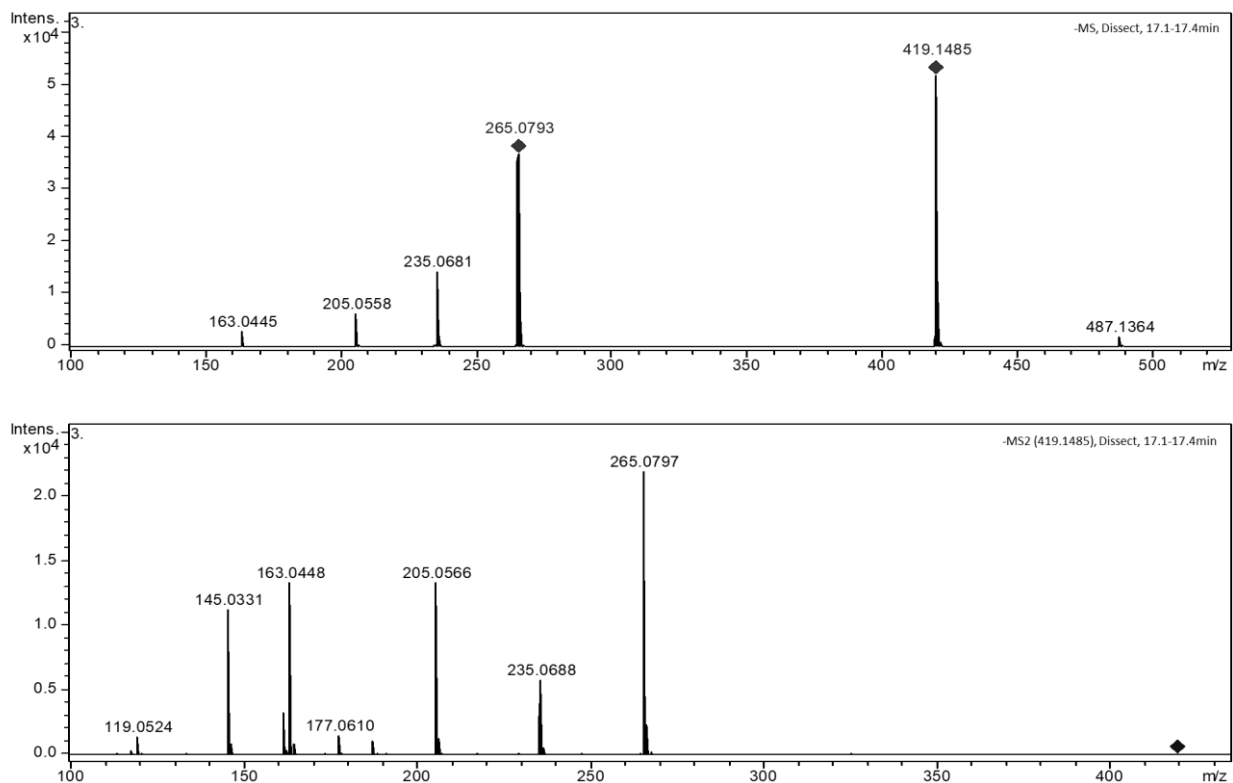


Figura XI - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP11**



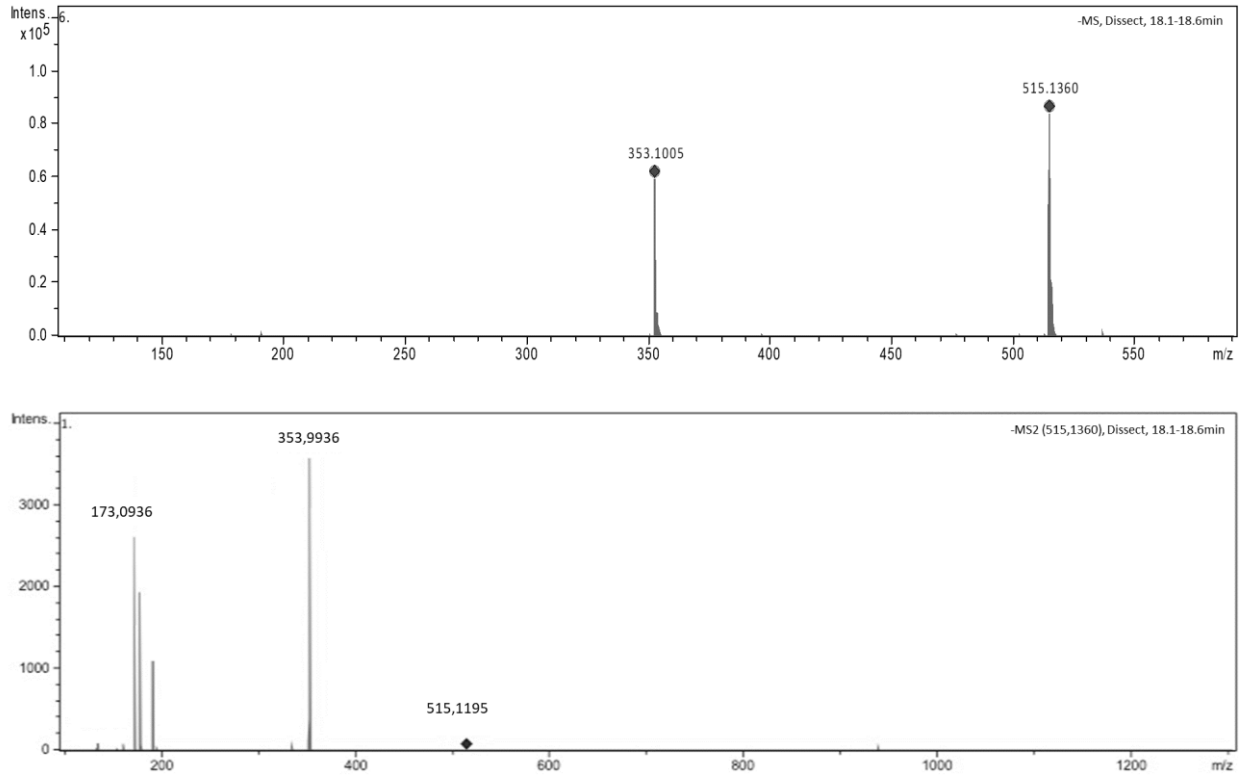
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura XII - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP12**



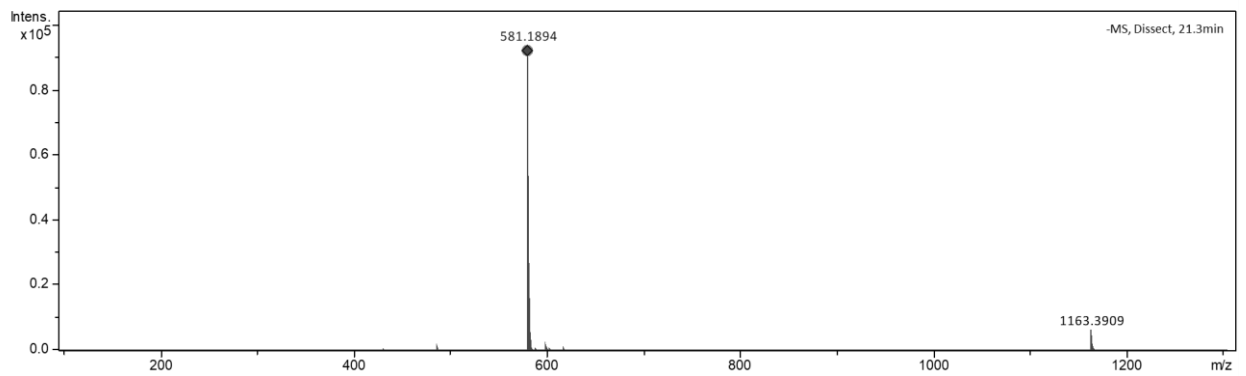
Fonte: Elaborado pela autora.

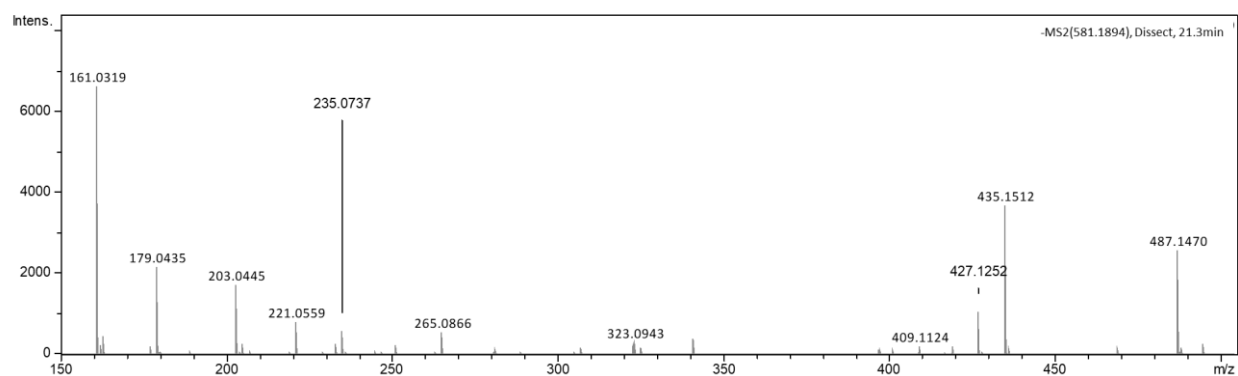
Figura XIII - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP13**



Fonte: Elaborado pela autora.

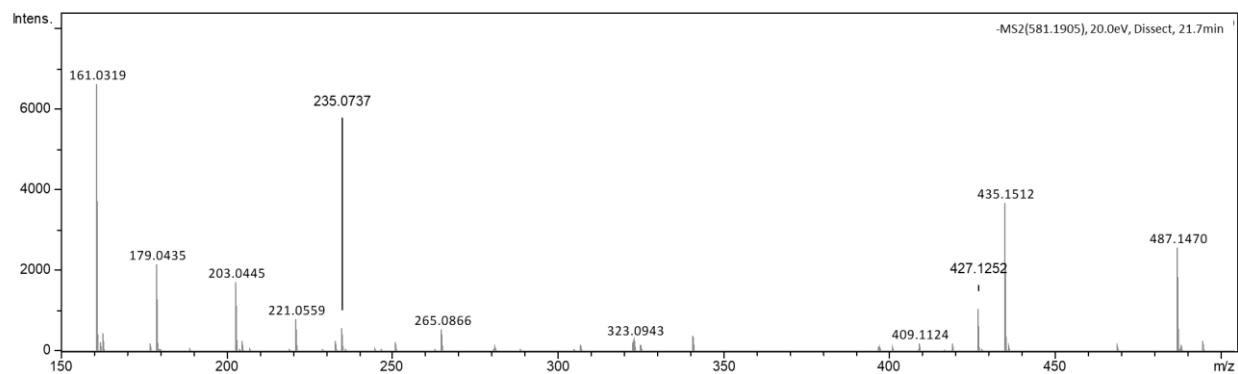
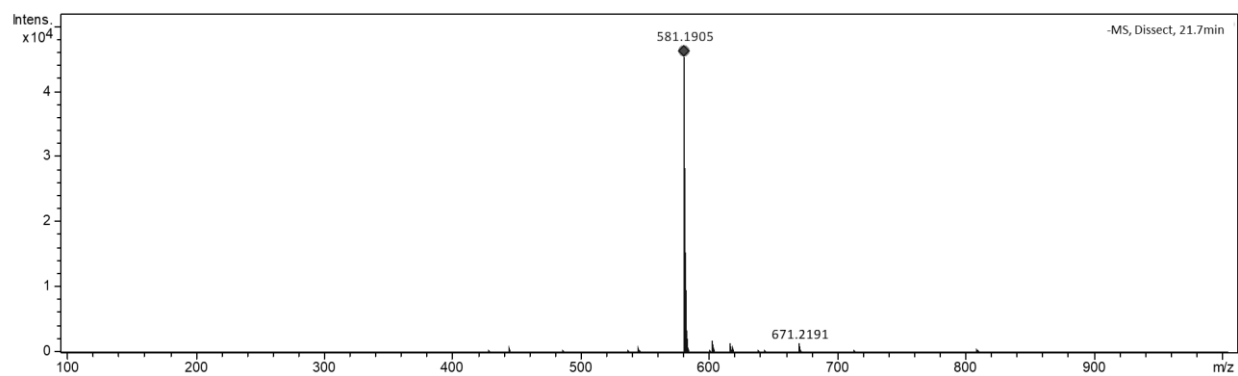
Figura XIV - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP14**





Fonte: Elaborado pela autora.

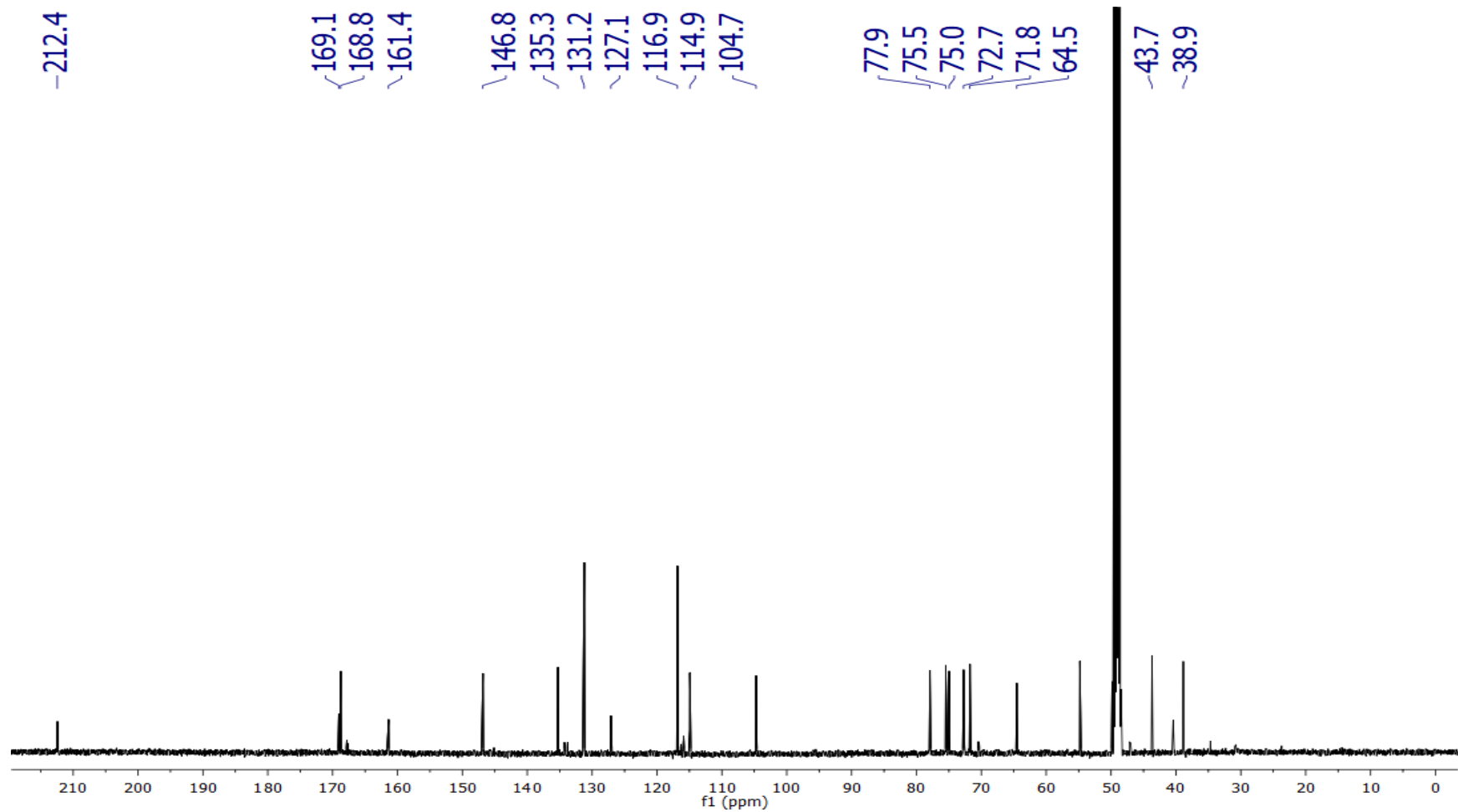
Figura XV - Espectros EM e EM<sup>2</sup> da substância **XP15**



Fonte: Elaborado pela autora.

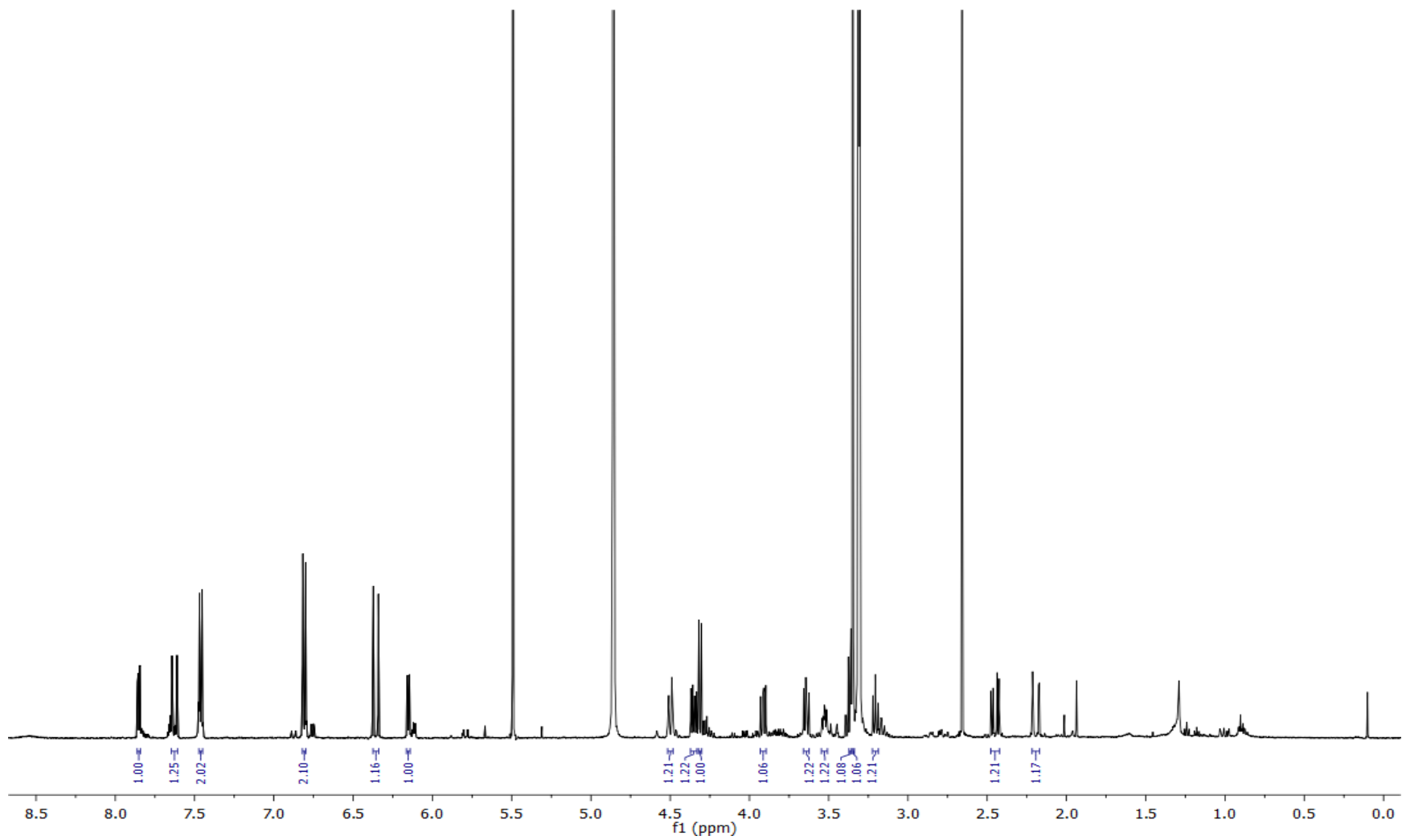
## APÊNDICE II

Figura XVI – Espectros de  $C^{13}$  RMN (500 MHz, MeOD) da substância D.



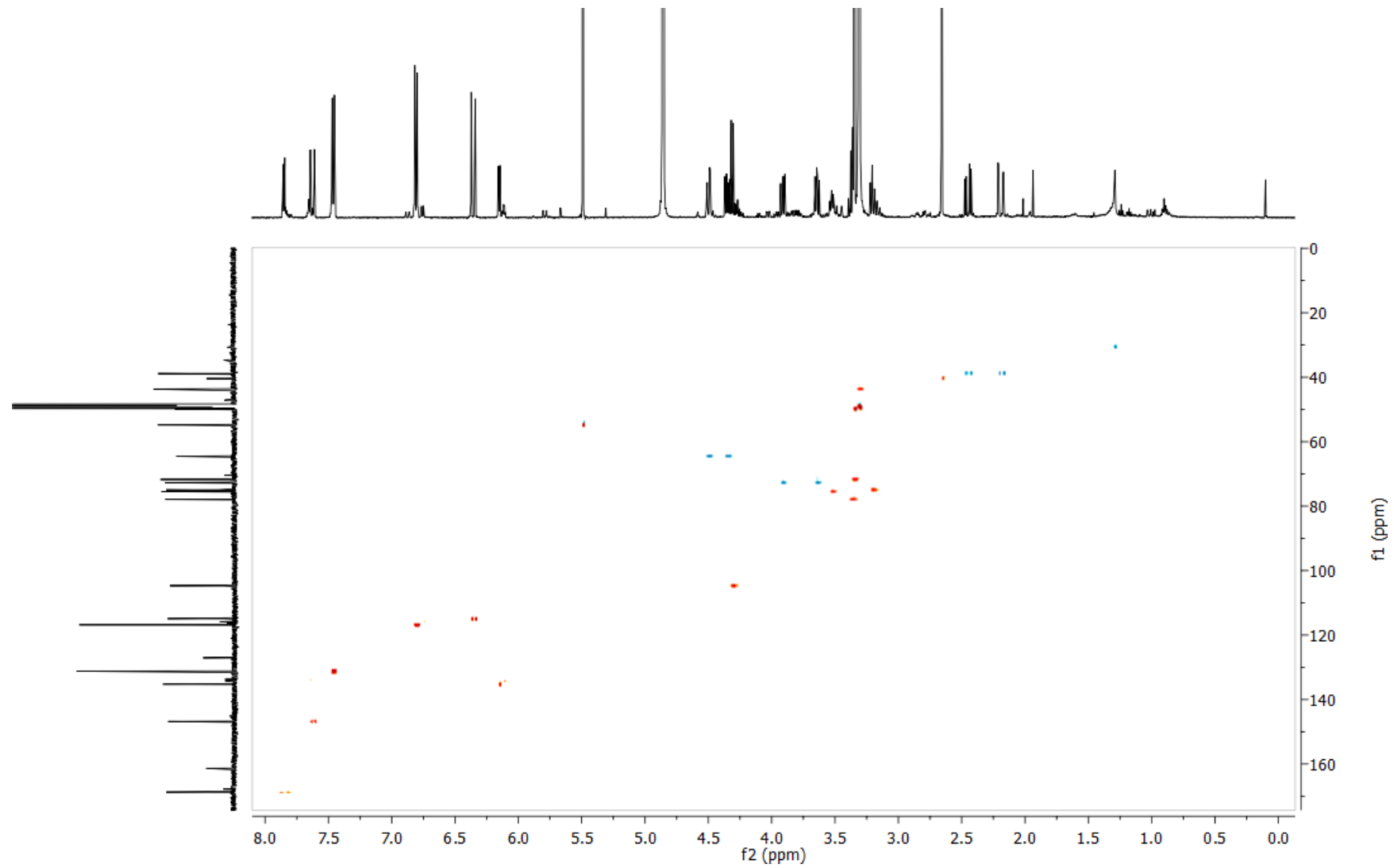
Fonte: elaborado pela autora.

Figura XVII – Espectros de H<sup>1</sup> RMN (500 MHz, MeOD) da substância **D**.



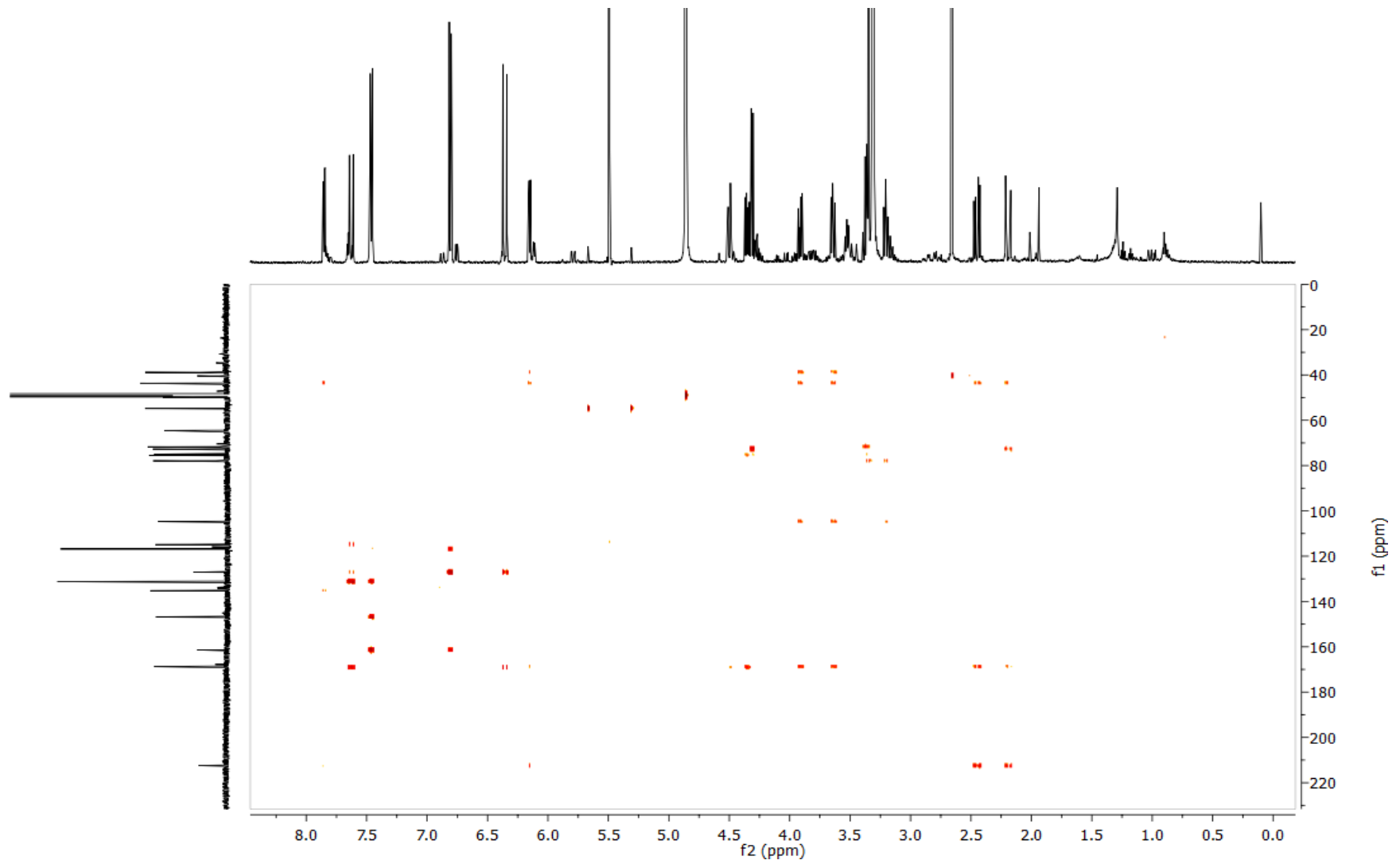
Fonte: elaborado pela autora.

Figura XVIII – Espectro bidimensional HSQC (500 MHz, MeOD) da substância **D**.



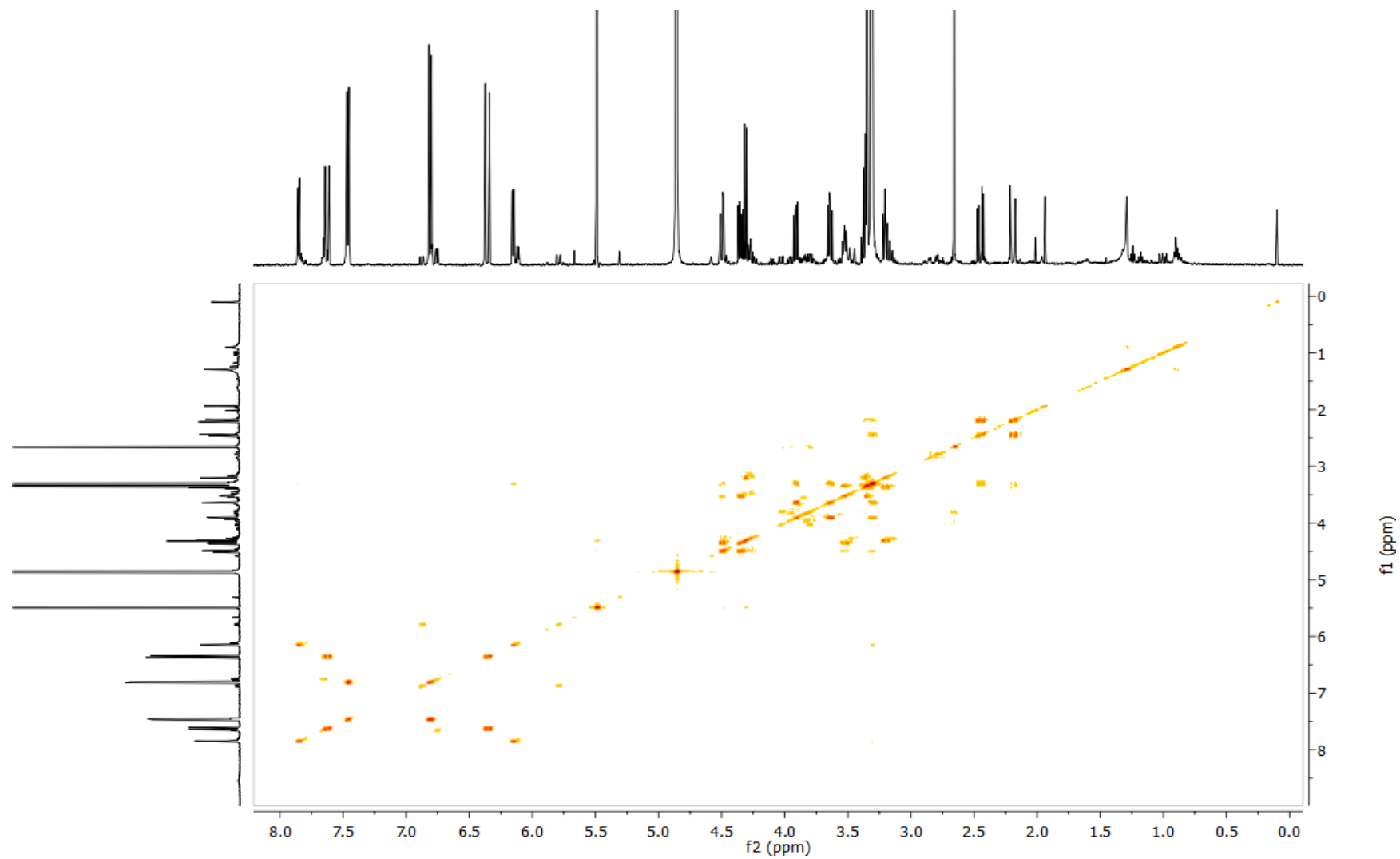
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura XIX – Espectro bidimensional HMBC (500 MHz, MeOD) da substância **D**.



Fonte: Elaborado pela autora.

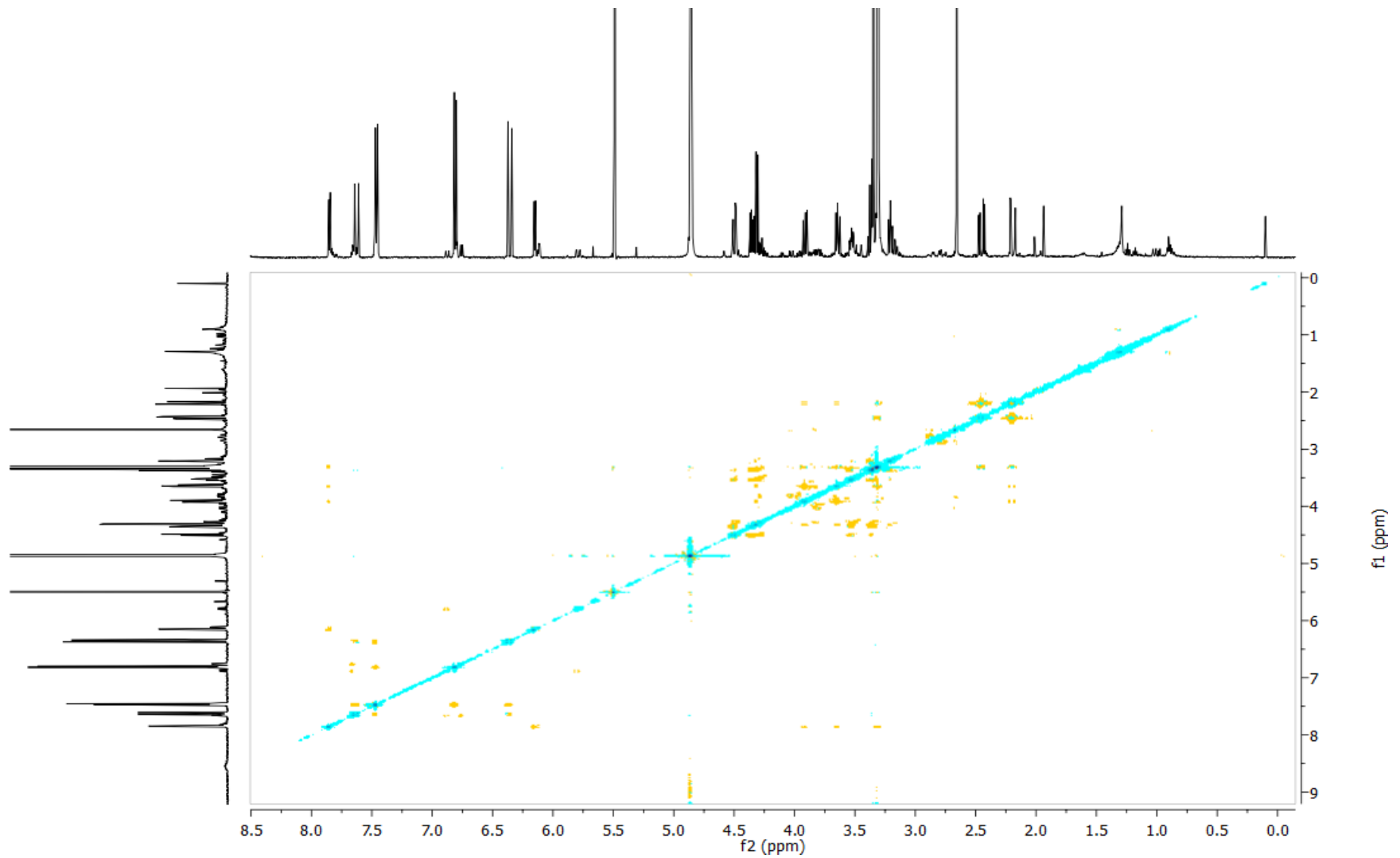
Figura XX – Espectro bidimensional COSY (500 MHz, MeOD) da substância **D**.



Fonte: Elaborado pela autora.

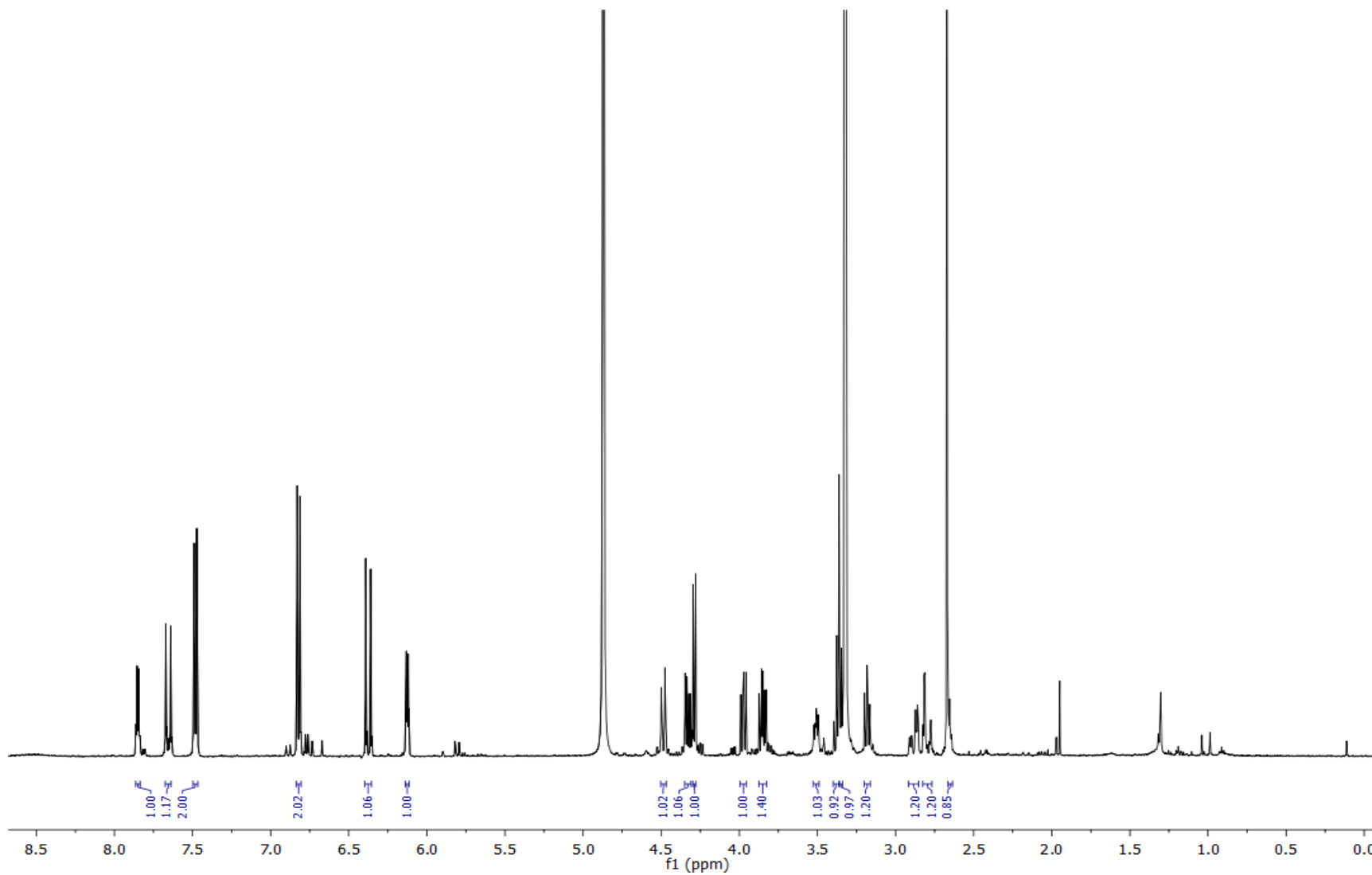


Figura XXI – Espectro bidimensional NOESY (500 MHz, MeOD) da substância **D**.



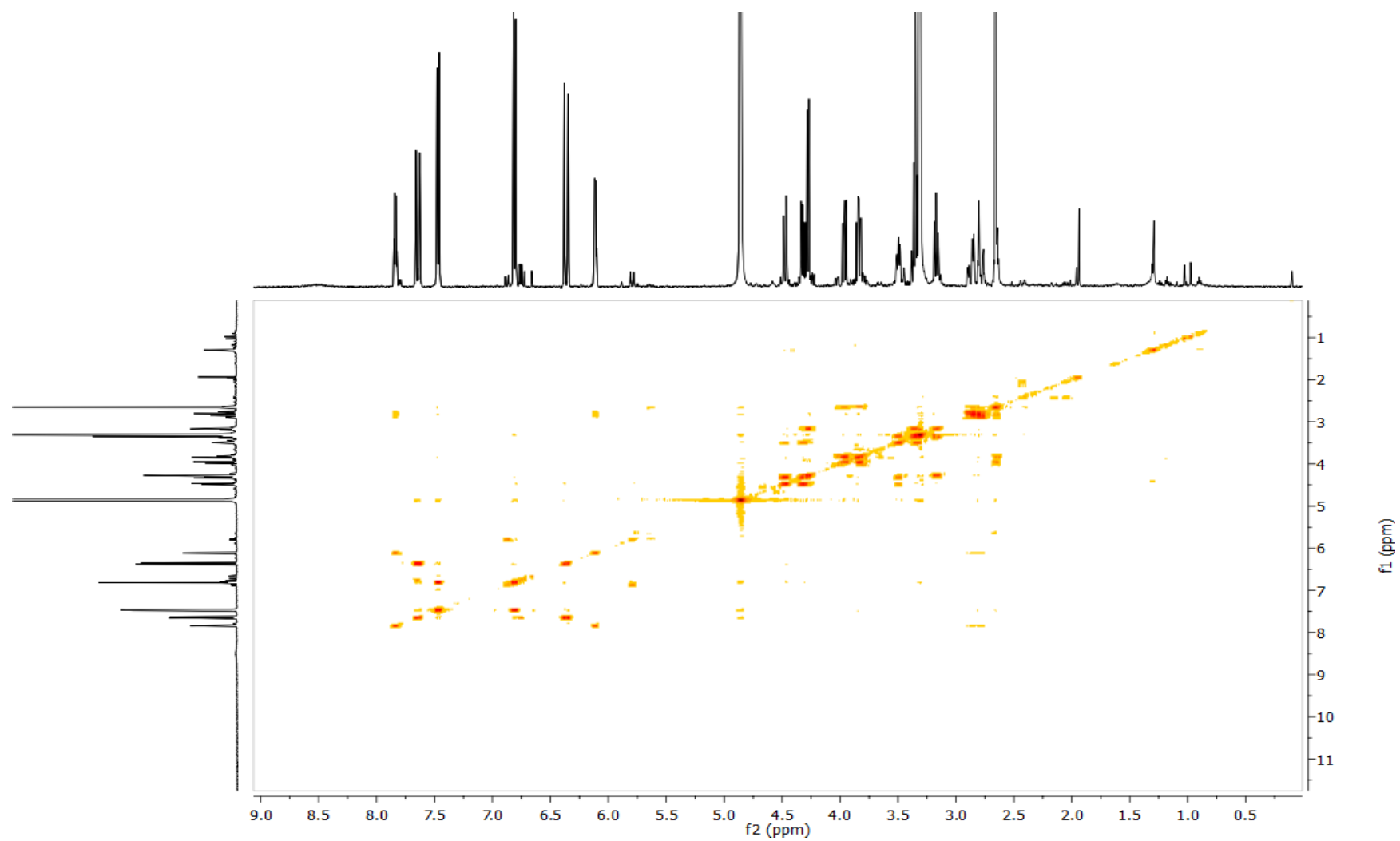
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura XXII – Espectros de H<sup>1</sup> RMN (500 MHz, MeOD) da substância E.



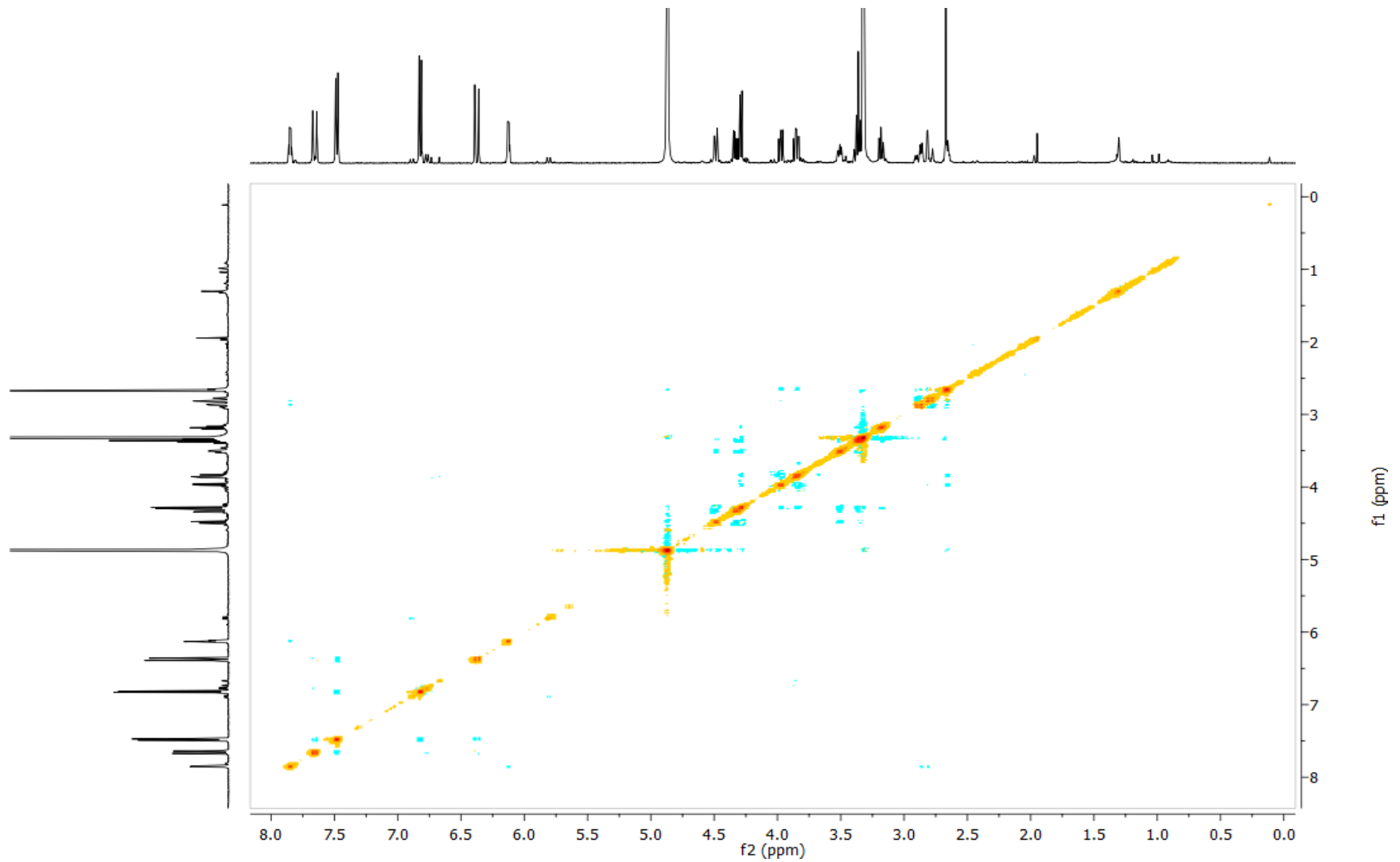
Fonte: elaborado pela autora.

Figura XXIII – Espectro bidimensional COSY (500 MHz, MeOD) da substância **E**.



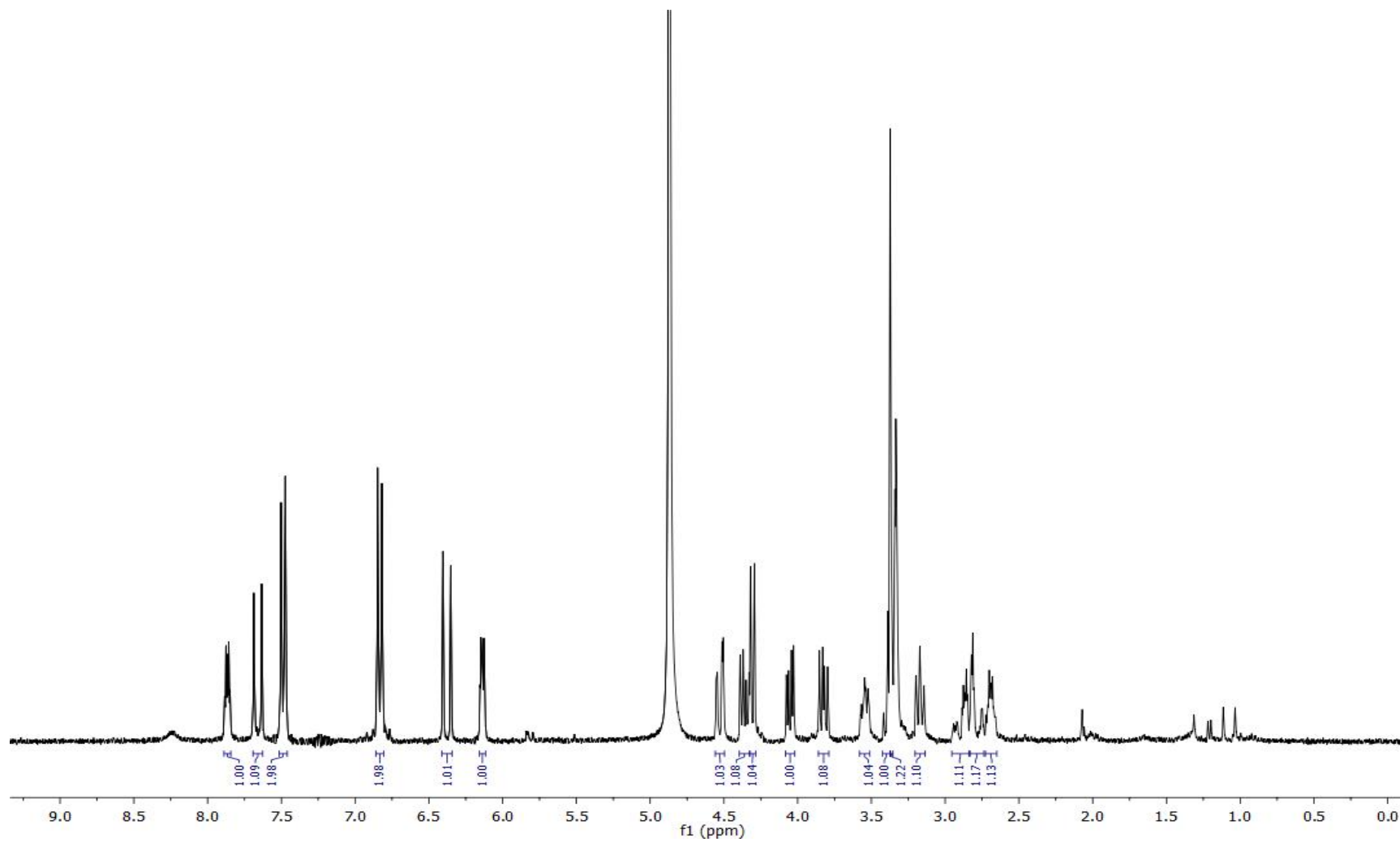
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura XXIV – Espectro bidimensional NOESY (500 MHz, MeOD) da substância **E**.



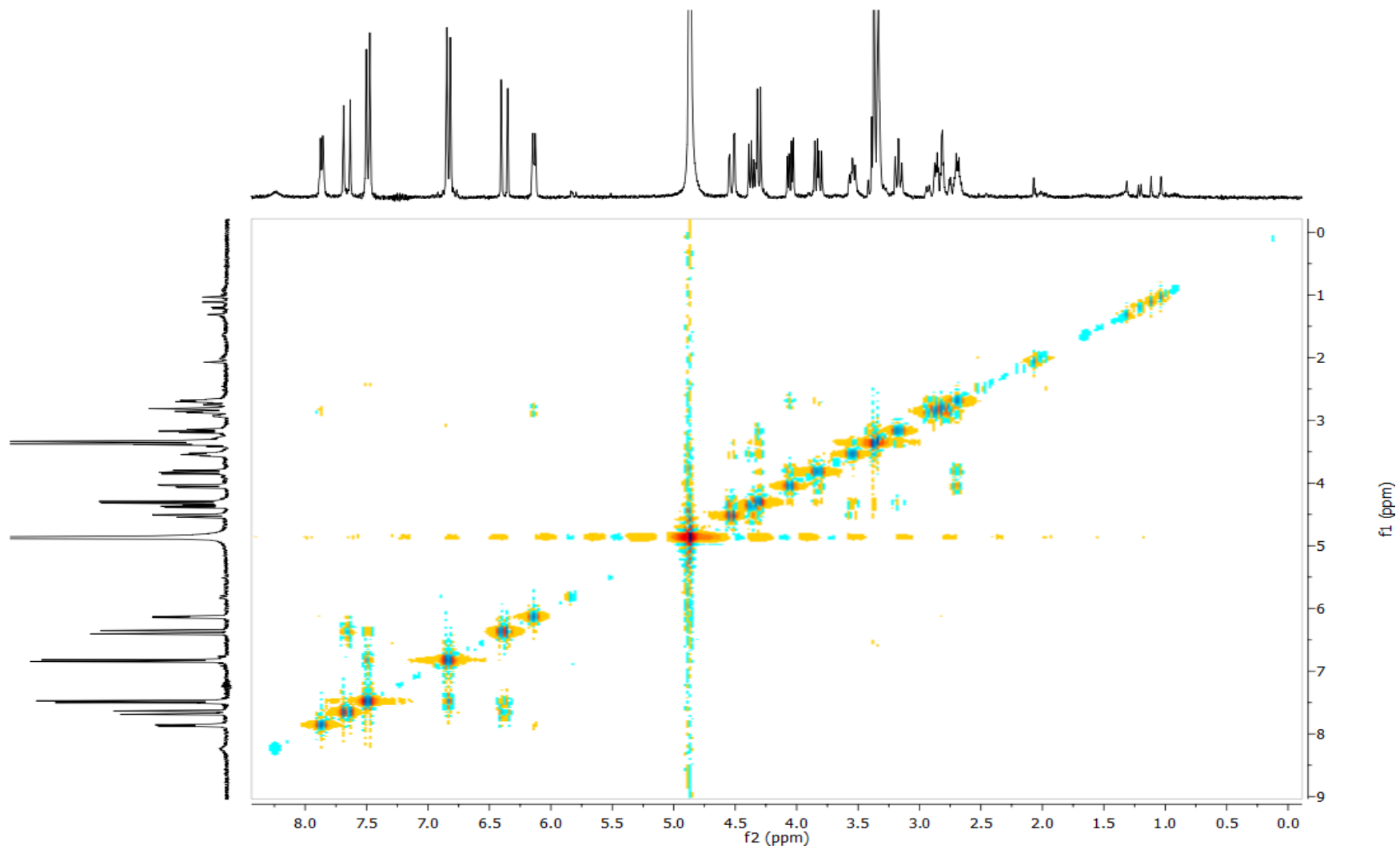
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura XXV – Espectros de H<sup>1</sup> RMN (300 MHz, MeOD) da substância **F**.



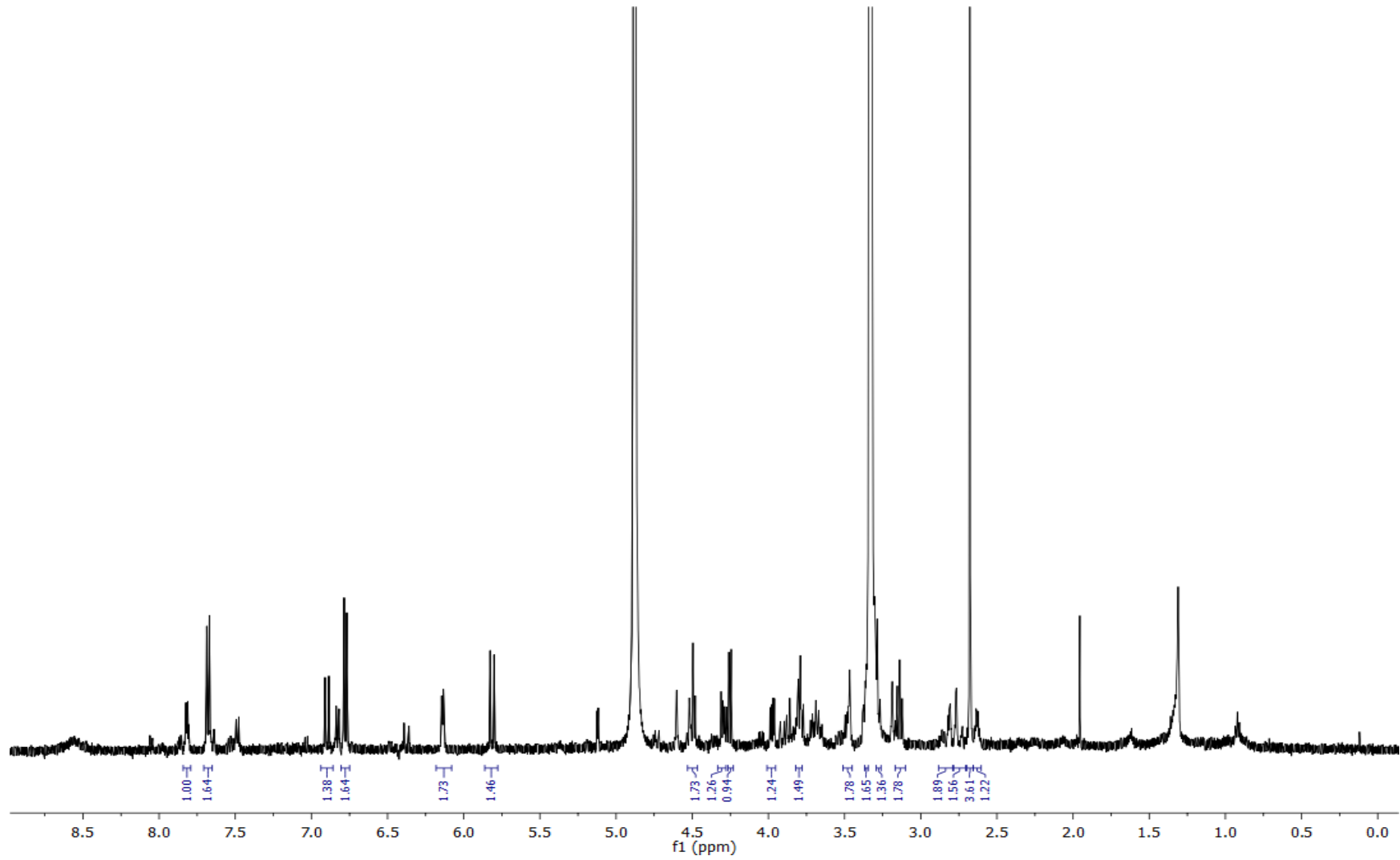
Fonte: elaborado pela autora.

Figura XXVI – Espectro bidimensional NOESY (300 MHz, MeOD) da substância F.



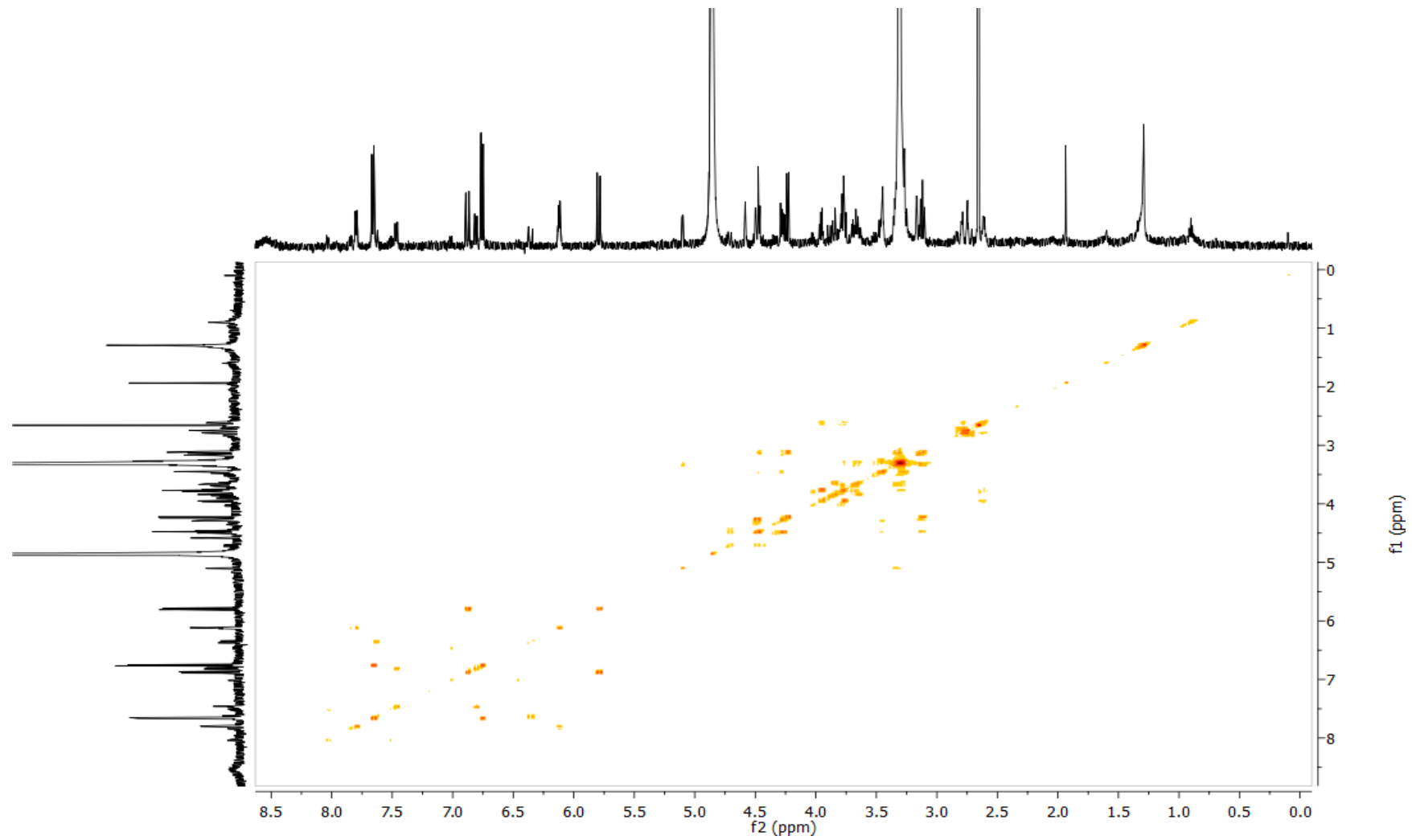
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura XXVII – Espectros de H<sup>1</sup> RMN (500 MHz, MeOD) da substância H.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura XXVIII – Espectro bidimensional COSY (500 MHz, MeOD) da substância **H**.



Fonte: Elaborado pela autora.