

FITOQUÍMICA: TRIAGEM EM EXTRATOS DE PLANTAS COM ABORDAGENS CROMATOGRÁFICAS “ESTADO DA ARTE”

Cavalaro, V.¹¹ ; Oliveira, C.R.²²

¹Cavalaro, Victor. Farmacêutico pela Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, Brasil. victor.cavalaro@yahoo.com. ²Carlos Rocha Oliveira _ Professor da Universidade Anhembi Morumbi.

Recebido em: out. 2017; aceito ago. 2018; publicado out. 2018.

Resumo

O uso de vegetais com propósito de utilização como medicamentos tem origens remotas na história do homem, no Brasil remonta ao período de pré-colonização, com os nativos habitantes do território somados às contribuições de colonizadores e escravos africanos e expandindo seu nível de aplicação atualmente, por ser uma fonte de matérias-primas facilmente obtidas e pela grande diversidade biológica das espécies vegetais presentes no território nacional. Antes do uso medicamentoso, é necessário preparar a planta e realizar estudos para elucidar a presença e ação dos metabólitos secundários que possuem efeitos biológicos e assim realizar extrações para verificar se há a presença de novos metabólitos secundários e a cromatografia nas suas várias frentes tem sido amplamente aplicada nesta linha de estudo, onde há a possibilidade de se realizar desde a triagem por atividades biológicas de interesse, como por exemplo, cromatografia em camada delgada com verificação da atividade inibitória em microrganismos ou antioxidantes até a classificação por classe e estrutura molecular, através de técnicas mais avançadas, mas já consolidadas, como cromatografia de alto desempenho, cromatografia gasosa e as abordagens das três técnicas hifenizadas com espectroscopia de massas, na qual é possível criar bancos de dados complexos contendo os metabolomas de cada espécie investigada. No entanto, não há trabalho em que a convergência de todas essas técnicas ocorra com a exposição dos principais avanços e perspectivas.

Palavras-chave: Fitoquímica, triagem cromatográfica, TLC, HPLC e GC

Introdução

Em 1993, foi proposta a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), sendo o Brasil o signatário e o gestor do maior patrimônio de biodiversidade do mundo, já que existem mais de 46 mil espécies da flora catalogada no território nacional. A grande variedade de espécies deriva da diversidade de biomas presentes no Brasil e é devido a esta grande biodiversidade que o Brasil tem potencial para se tornar referência no mercado mundial

de ervas medicinais (MMA, 2015)

O conhecimento das plantas medicinais, que no Brasil deriva de nativos, africanos e colonizadores, ganharam força em virtude da inserção desse conhecimento, unindo-se às ações da política de saúde pública inserindo protocolos para o uso de 47 plantas que têm seus efeitos bem estabelecidos bem como os testes de novas plantas e regulamentações através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Ervas Medicinais

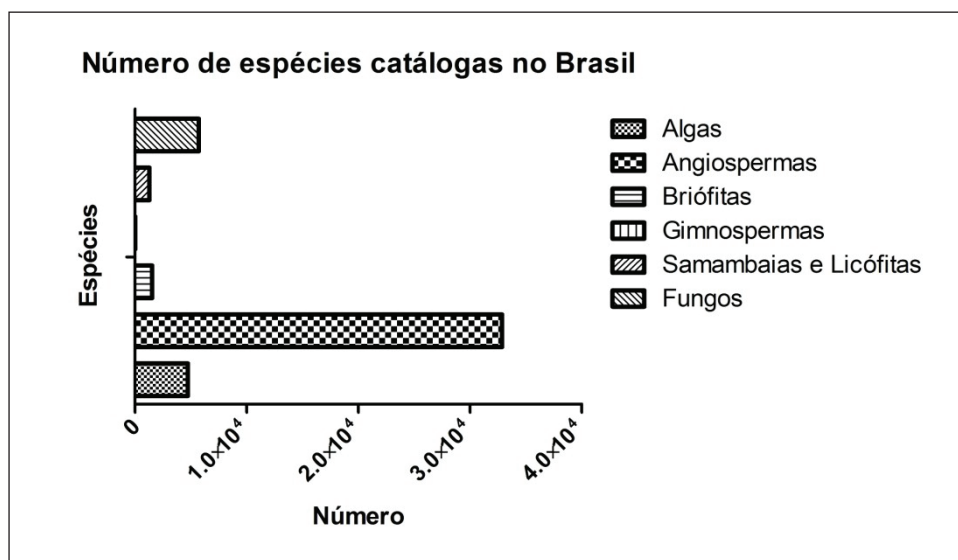


Gráfico 1 - Número de espécies catalogadas no Brasil, indicando o grande número para angiospermas que são as principais fontes de estudo para uso como medicamento (Adaptado de Sistema de flora do Brasil 2020, disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>, Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.).

(PNPMF) no Sistema Único de Saúde (SUS), bem como métodos de controle de qualidade através da revisão da Farmacopeia Brasileira (FB), que nesta sexta edição incluiu 150 monografias referentes a plantas medicinais, o que mais uma vez reforça que este setor possui grande posição estratégica para o país. (Antônio, Tesser e Moretti-Pires, 2014; MATOS, 2017; Carvalho et al, 2011 e ANVISA, 2011).

O uso de plantas medicinais se deve à atividade farmacológica de seus metabolitos secundários, facilidade de obtenção da matéria-prima e fonte de moléculas facilmente biodegradáveis, de modo que as atividades de pesquisa em Fitoquímica são realizadas com o objetivo de elucidar ou avaliar a presença de compostos químicos que constituem as espécies das plantas estudadas e, em geral, as etapas iniciais dos estudos em Fitoquímica seguem o racional apresentado na figura 1, onde o primeiro passo é a seleção das espécies vegetais e busca dos grupos de metabolitos secundários ou por uma classe específica, após se segue para a pesquisa e coleta das espécies em seu ambiente nativo, é nesse estágio que deve ser preparada uma exsicata com a identificação da planta e os dados do momento da coleta, caso a espécie vegetal seja desconhecida

ocorre primeiro a identificação botânica, com uso da exsicata, para depois realizar a caracterização fitoquímica. É então definido se as moléculas de interesse devem ser extraídas da amostra fresca ou se devem ser secas e estabilizadas. Finalmente, a extração ocorre pela adoção do método mais correto para o tipo de metabolito escolhido. (SIMOES et al., 2007; AL-RUBAYE; HAMMED; KADHIM, 2017).

Após a extração dos metabolitos antes da avaliação da atividade biológica, a estrutura da molécula deve ser esclarecida para identificar os grupos de atividade ou grupos de substâncias presentes. Existe a possibilidade de caracterização direta nos tecidos do material vegetal com grandes riscos de criar falsos positivos ou mesmo de não identificar grupos de grande importância e novos compostos. Assim, a extração torna-se necessária, como mostrado na figura 1. Após a extração, as reações químicas em tubos de ensaio serão usadas para verificar a precipitação ou alteração na coloração devido à presença de grupos funcionais conhecidos ou classes de metabolitos secundários, mas essas técnicas são muito simples já que revelam a presença de

grupos de metabólitos secundários sendo qualitativas e não são usadas para quantificação dos principais metabólitos secundários (marcadores) e não revelam maiores detalhes sobre a estrutura molecular do metabólito, sendo assim impossível identificar se o composto estudado é um novo metabólito secundário ainda não catalogado. Assim, é extremamente comum proce-

der às etapas de identificação por cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), ambas passíveis de serem acopladas à espectrometria de massa, espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (IV-TF) e ressonância magnética nuclear do carbono e hidrogênio (RMN).

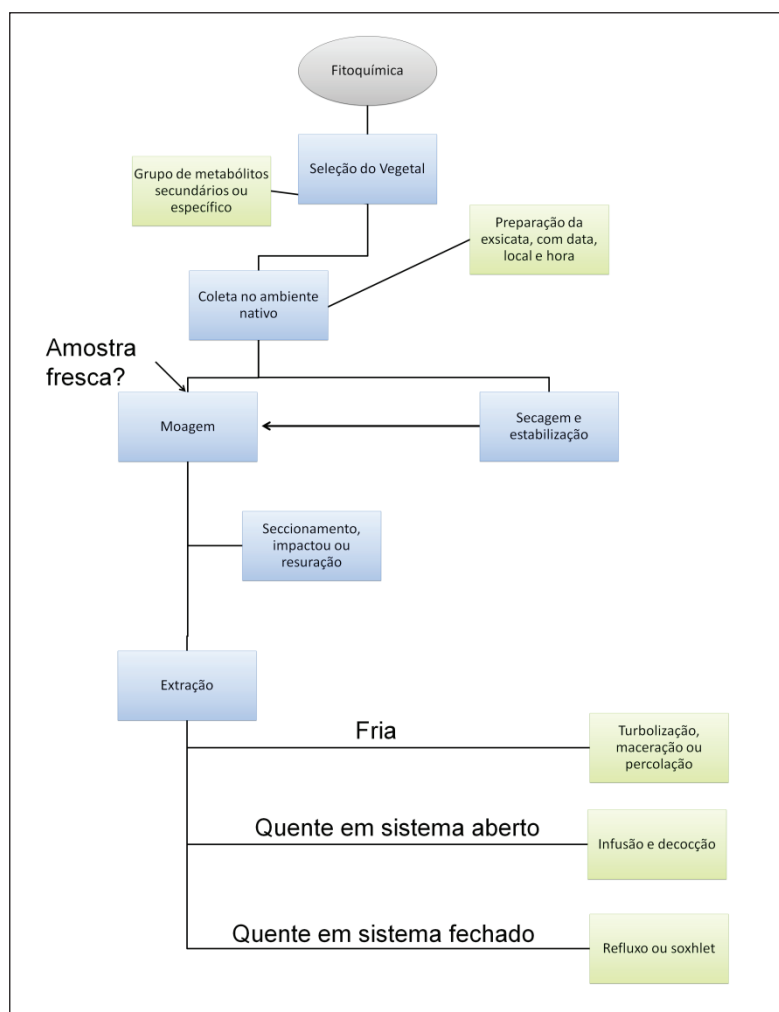


Figura 1 - Esquema do protocolo para o início do estudo da Fitoquímica, da escolha para obter o extrato vegetal. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Portanto, a cromatografia aplicada à triagem em fitoquímica pode ser resumida como técnicas de separação e isolamento, com abordagens qualitativas e quantitativas, de misturas complexas nas quais elas precisam interagir com uma fase estacionária e através de uma fase móvel que flui continuamente por um determinado tempo controlado

ocorrerá a separação em momentos distintos que variam de acordo com os níveis e tipos de interações do composto com fase estacionária e da fase móvel e, finalmente, os compostos separados, chamados eluidos, são detectados por metodologia de reação (nos casos de TLC) ou por um detector instrumental que varia desde absorção no ultravioleta

até intensidade de íons. (SIMOES et al., 2007)

Assim, se pretende fornecer uma revisão sistemática da literatura com as técnicas de identificação e elucidação de estruturas nos compostos de plantas mais amplamente utilizados abrangendo as técnicas cromatográficas de TLC, CLAE e CG para orientar iniciantes nas ciências farmacognósticas onde a fitoquímica é um dos estágios de grande importância para a descoberta de novos compostos vegetais com atividades biológicas relevantes.

Materiais e Métodos

Uma revisão da bibliografia extensiva foi realizada através da pesquisa de artigos científicos em revistas indexadas nas principais bases de dados, como BIREME, PubMed, Medline, Science Direct e Google Acadêmico, utilizando descritores como fotoquímica e análise, caracterização de extratos de plantas, perfil de metabolismo vegetal e metabólitos secundários das plantas de 2014 a 2018, foram considerados artigos que tratam da demonstração da aplicação de cada técnica e suas vantagens.

Cromatografia da camada delgada, da separação aos estudos de atividade biológica

A cromatografia em camada delgada (TLC) é uma técnica amplamente utilizada na área cromatográfica devido à simplicidade, uma vez que não requer equipamentos complexos e treinamento extensivo dos praticantes bem como a identificação e determinação de compostos em uma amostra, determinação dos melhores solventes para a separação, aceitação de grandes quantidades de amostras, menor tempo de análise e sem necessidade de limpeza exaustiva das amostras, por exemplo, com a aplicação de extratos vegetais em bruto. (KOKO-TKIEWICZ, A. et al, 2018)

Nos últimos anos, uma das principais vantagens da triagem de compostos por TLC foi a possibilidade de verificação de propriedades biológicas por análise de efeito direto (AED), ou seja, a possibilidade de separação de compostos (voláteis ou não voláteis) ligados a um ensaio (TLC -DPPH) é um exemplo, testes antiestrogênicos, antimutagê-

nicos ou antimicrobianos e são geralmente referidos como bioautografia (TLC-B). (CHOMA, I.M., JESIONEK, W., 2014;;JESIONEK, W.; MAJER-DZIEDZIC, B.; CHOMA, I.M., 2015)

Lembrando que, antes da verificação da atividade biológica através da abordagem TLC-B, a eficácia de separação verificada em paralelo, seja por desenvolvimento com luz ultravioleta de comprimento longo ou curto ou por soluções de revelação como Dragendorff. A eficácia da separação cromatográfica será verificada pelo fator de retardamento (FR), pela relação da distância percorrida pelo composto pela distância percorrida pelo solvente (figura 2). (IUPAC, 2016).

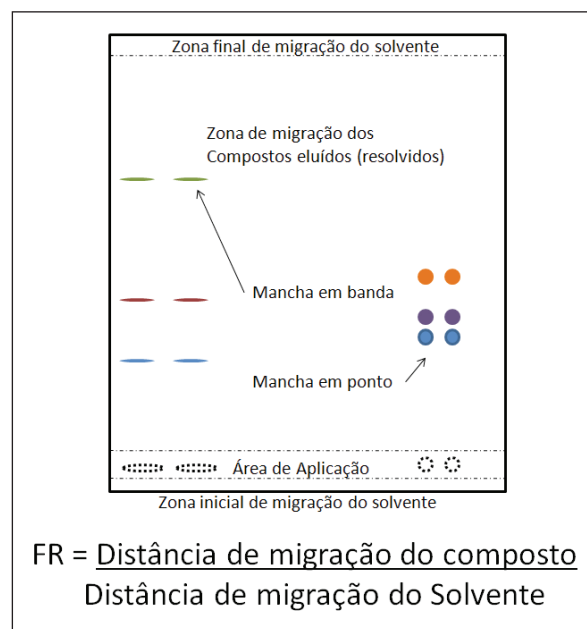


Figura 2 - Esquema de aplicação por mancha em ponto ou mancha em banda e cálculo de RF para TLC realizado antes do ensaio TLC-B. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

A TLC se mostrou ser o método ideal para a hifenização de métodos indicativos de atividade biológica, uma vez que a separação cromatográfica dos componentes ocorre em um sistema aberto, existe a possibilidade de separação de numerosos compostos em paralelo e a evaporação facilitada dos solventes. Dentro das possibilidades do TLC -B, existem três variantes possíveis: (CHOMA, I.; JESIONEK, W., 2014):

a. TLC de bioautografia direta, onde a separação biológica e o ensaio devem ser visualizados diretamente na placa de cromatografia, neste ensaio ocorre a possibilidade de usar TLC-DPHH ou ensaios de redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio de brometo (MTT);

b. TLC de bioautografia de contato, a placa de cromatografia com os compostos separados devem ser colocadas contra uma placa de agar previamente inoculada com microorganismos de interesse.

c. TLC de bioautografia de sobreposição, onde a placa de cromatografia com os compostos resolvidos deve ser colocada sobreposta por uma fina camada de Agar contendo microorganismos.

Foi indicado por Choma, Jesionek (2014) e Kokotkeiwicz (2017) que tanto as aplicações por mancha em ponto quanto as aplicações de manchas em banda/traço (Figura 2) foram eficazes contra as diferentes técnicas de TLC-B, onde a técnica pontual se apresentou mais adequada para a verificação da atividade antimicrobiana e aplicações em banda indicadas para verificar a atividade antioxidante e enzimática.

De acordo com Choma e Jesionek(2014), ainda existe a possibilidade de que, após a corrida cromatográfica em TLC, seja necessária a elucidação estrutural das moléculas de interesse através de hifenização em espectroscopia infravermelha (IV) com TLC-IV ou hifenização em espectroscopia de massa (MS) com TLC-MS, sendo necessária a extração das moléculas das partículas de sílica da placa de TLC após raspar as bandas de interesse.

Cromatografia líquida de alta eficiência, do arranjo de fotodiodo à espectrometria massas

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando o detector de absorvância no ultravioleta e visível é amplamente utilizada nos estudos de triagem e quantificação de metabólitos secundários devido à alta velocidade de obtenção dos resultados, identificação e quantificação de substâncias em pequenas concentrações, a grande capacidade de separação de compostos complexos em frações polares e apolares dos extratos vegetais

devido à grande variação das colunas cromatográficas disponíveis no mercado, a possibilidade de isolamento de frações através de técnicas preparativas e a obtenção de perfis ao usar detectores de fotodiodos (PDA) e espectrometria de massa (MS). (Pang, B. et. al., 2016)

A difusão da aplicação da CLAE na fitoquímica deve-se à necessidade de mapeamento, monitoramento e, ao mesmo tempo, quantificação de vários compostos presentes em extratos de plantas, neste nível de estudo o nome de metaboloma é adotado. Além disso, a alta reprodutibilidade da técnica para monitorar e qualificar/quantificar metabólitos secundários já conhecidos, chamados marcadores, garante o uso desta técnica em controles de qualidade, garantindo as quantidades mínimas em cada extrato, ao padronizar os extratos de plantas e garantir as identidades dos extratos, dado que a CLAE permite a separação de uma quantidade diversa de moléculas, dificultando assim a contaminação cruzada ou a falsificação.

Nas análises de CLAE, é possível identificar os compostos eluídos ao avaliar o tempo de retenção de cada composto (TR), avaliar os perfis gerados pelo tempo de retenção relativo (TRR) ao comparar os compostos eluídos com um marcador específico, verificar as diferenças dos espectros UV extraídos gerados por cada composto permitindo identificações e comparações quando a análise ocorre com detectores de fotodiodo (varredura no espectro ultravioleta e visível (UV-Vis)) e quantificação usando um padrão de referência com uma concentração conhecida por realizar da integral das curvas gaussianas (picos) e comparar a área obtida do composto padrão e o composto a quantificar, podendo ser da mesma molécula em análise ou molécula quimicamente semelhante, mas com um tempo de retenção similar. (Pang, B. et. al., 2016; VINAXIA et al., 2016).

A Figura 3 representa um cromatograma obtido com detector de arranjo de diodos (gráfico gerado pelo software de processamento de dados de HPLC, tempo versus a absorvância) representando o perfil dos metabólitos secundários hipotéticos encontrados em um extrato de planta. Cada composto (numerado 1 a 7) aparece como

uma curva gaussiana (pico) em um determinado momento, para o pico 4 foi realizado extração do

espectro UV que identifica a substância. Para os picos 2 e 7 TRR foi calculado como exemplo.

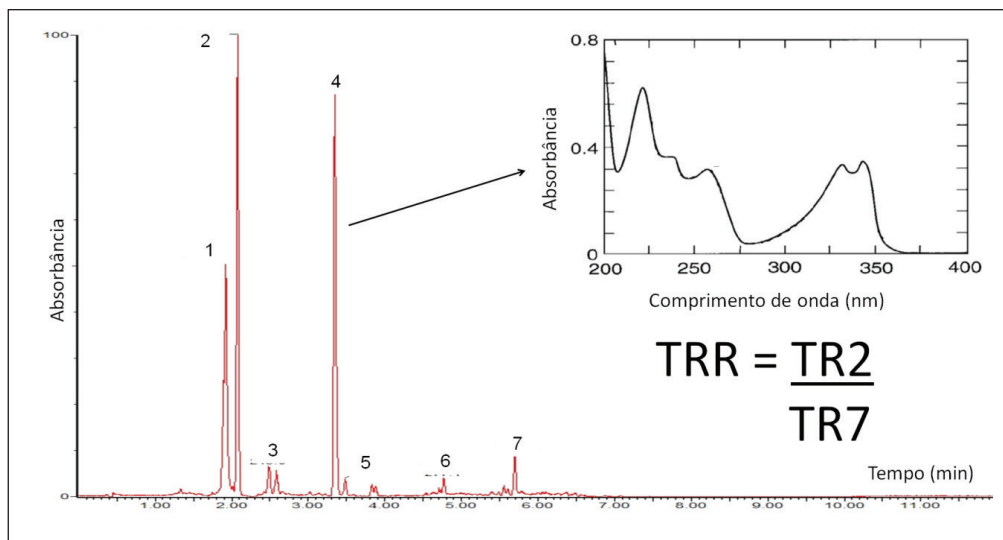


Figura 3 - Cromatograma representativo que ilustra uma análise de extrato de plantas com a separação identificada pelas RTs dos metabolitos secundários por detecção de DAD, com subsequente extração do espectro de ultravioleta para construir um perfil do extrato auxiliando pelo cálculo exemplificado de RRT. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Outra maneira de monitorar o metaboloma presente no extrato, bem como construir o perfil do metabolismo e quantificá-lo via detecção por espectrometria de massa (MS). A técnica de CLAE hifenizada à espectrometria de massa (CLAE-MS) é caracterizada pela abundância relativa na amostra dos metabolitos secundários quando ionizados em relação à sua massa, ou seja, massa / carga (m/z). O detector consiste em: uma fonte de ionização que introduz e ioniza o eluído do CLAE, que é então passado através de um analisador de massa, onde ocorre a separação e seleção das massas de interesse. (POTTERAT; HAMBURGUER, 2014).

O mais comum no mercado, o modelo quadrupolar simples ou Tandem quadrupolo (isto é, permite a fragmentação das moléculas e ajuda na elucidação estrutural) e o tempo de voo (TOF) que separa as moléculas pelo seu tempo de voo de maneira predeterminada. Os primeiros são dispositivos de massa de baixa resolução, ou seja, eles indicam exatidão na decimal (10^{-1}) da m/z verificada e o segundo é um analisador de alta resolução, que pode atingir o décimo de milésimo (10^{-4}) da m/z verificada, com um alto poder de identificação di-

reta de moléculas, pois usa o conceito de defeito de massa, servindo como uma verdadeira impressão digital (*fingerprint*) de moléculas. Após a molécula cruzar os analisadores de massa, a detecção ocorre em um fotomultiplicador que converte o sinal em picos criando cromatogramas também com curvas gaussianas (picos) pela variação de tempo contra a abundância relativa do do íon, portanto é possível a extração dos espectros de massas fragmentadas ou isotópicas (Figura 4).

Foi descrito por Jesionex, Majer-Dziedzic e Choma (2015); Vinaxia, (2016), Keskes (2017) e Potterat e Hambuerguer (2014), que a técnica de CLAE-MS ou CLAE-MS-MS (para detectores com analisadores Tandem ou Tandem-TOF) tem sido de grande importância para garantir a elucidação estrutural e para a confirmação da presença dos metabolitos ou mesmo a identificação de novos metabolitos com potencial biológico. Além disso, com a possibilidade de elucidação estrutural, existe a possibilidade de verificar o metabolismo completo, não apenas o metabolito secundário de interesse, mas também as moléculas progenitoras, auxiliando na compreensão do metabolismo

da planta ou metaboloma. A forma de ionização por ser mais suave garante alta reprodutibilidade

da técnica e, portanto, armazenamento e troca de bases de dados entre laboratórios.

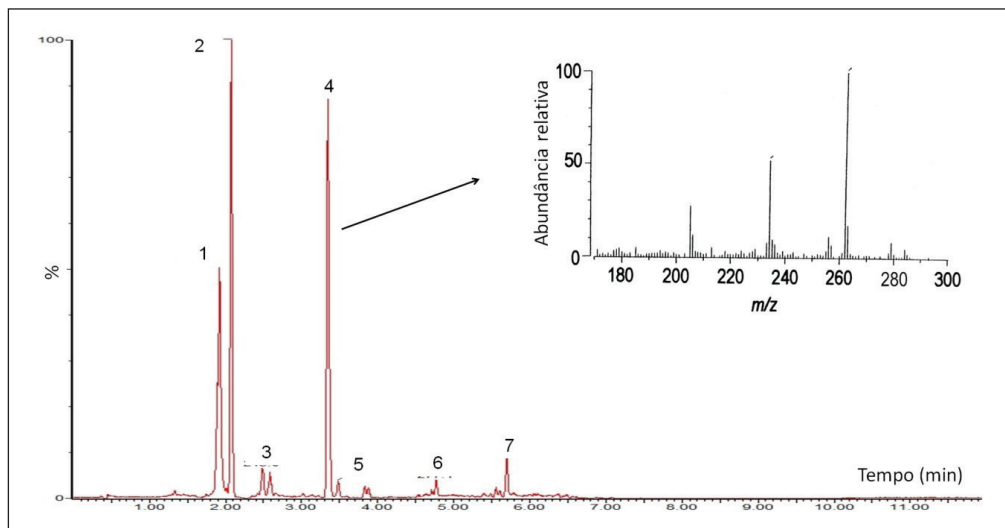


Figura 4 - Cromatograma representativo com extração do espectro de massas fragmentadas do pico 4 para avaliar a elucidação estrutural..(Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Cromatografia de gasosa e espectrometria massa

A cromatografia gasosa (GC) é largamente utilizada para a análise de compostos apolares, óleos essenciais, ácidos gordurosos, lipídios e alcalóides que, embora não voláteis, podem ser quali/quantificados com reações de derivação de silano para reduzir o ponto de ebulição, mas se deve ter

em mente que tais reações podem gerar muitos subprodutos, uma vez que ocorrem em extratos de plantas. Além disso, possui grande aplicabilidade no controle de qualidade, como por exemplo, análise de fenóis para vinhos entre outros. (AL-RUBAYE; HAMMED; KADHIM, 2017) A Figura 5 representa um cromatograma típico por análise de GC onde o pico 1 indica a eluição do solvente de diluição da amostra.

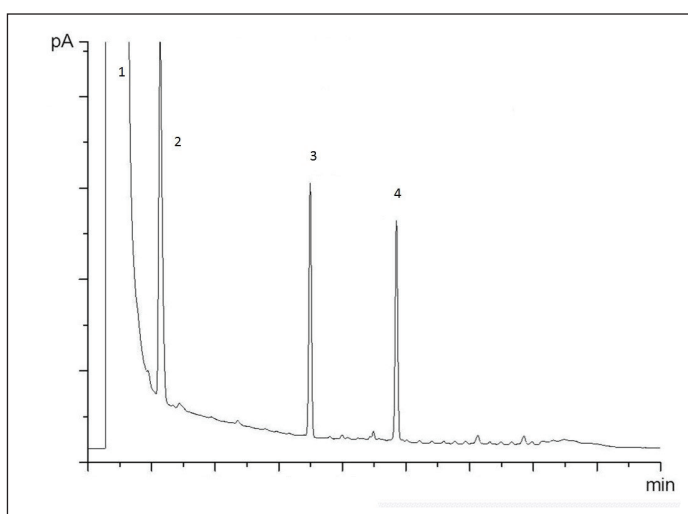


Figura 5 - Cromatograma esquemático de cromatografia em fase gasosa, representando a saída do solvente (1) e outros picos dos metabolitos secundários (2,3 e 4). (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Ao contrário da CLAE, a diversidade das colunas cromatográficas não é abundante no CG e a fase móvel deve ser um gás inerte que limita o potencial de separação uma vez que os compostos devem ter diferentes pontos de ebulição para garantir que os compostos sejam resolvidos além da necessidade de a fase estacionária permanecer em um forno com rampas de aquecimento ou aquecimento constante (técnica com grande tempo de análise) para garantir a separação cromatográfica. Finalmente, existem dois detectores de uso muito comum, como a condutância térmica (TCD) que verifica as diferenças na condutividade térmica do material eluído da separação do forno para interpretação como compostos distintos e é ideal para a separação com detectores de massa, uma vez que não são destrutivos e detectores de ionização de chama (FID), onde o material eluído é ionizado em uma chama de hidrogênio com alta potência redox, criando espécies iônicas (destruição da amostra) que, devido à diferença de carga, geram os sinais interpretados como compostos diferentes em ambos os casos o cromatograma é gerado em relação a intensidade do sinal pelo tempo. Assim, para a construção de perfis de metabolitos secundários e quantificações, se torna necessário usar substâncias de re-

ferência com concentrações conhecidas. Apesar das limitações, esta é uma técnica amplamente difundida, devido às facilidades de instalação e operação de baixo custo. (EL SOHLY et al., 2017, VINAXIA et al., 2016).

A técnica CG tem uma boa perspectiva, uma vez que pode ser facilmente acoplada a um detector de massa, permitindo a criação de perfis de metabolomas vegetais ricos em informações, uma vez que nesta técnica é possível analisar numerosos compostos das fases oleosas, além de CLAE-MS, a possibilidade de agregar informações a partir de bancos de dados disseminados, uma vez que ambas as técnicas foram amplamente utilizadas e descritas na literatura. (VINAXIA et al. 2016; HAMEED, ADNAN E HADHIM, 2015; KESKES et al. 2017 e GALINDO et al., 2017).

No entanto, Vinaxia et al (2016) infere que ao usar espectrometria de massa hifenizada a CG a intensidade de carga elétrica para ionização é mais pesada, cerca de 70 eV, quando comparada à CLAE-MS, sendo assim um processo menos reprodutível quando comparados, gerando erros na interpretação uma vez que substâncias com similaridade espectral a partir da degradação ou envelhecimento da amostra podem criar espécies com m/z similar.

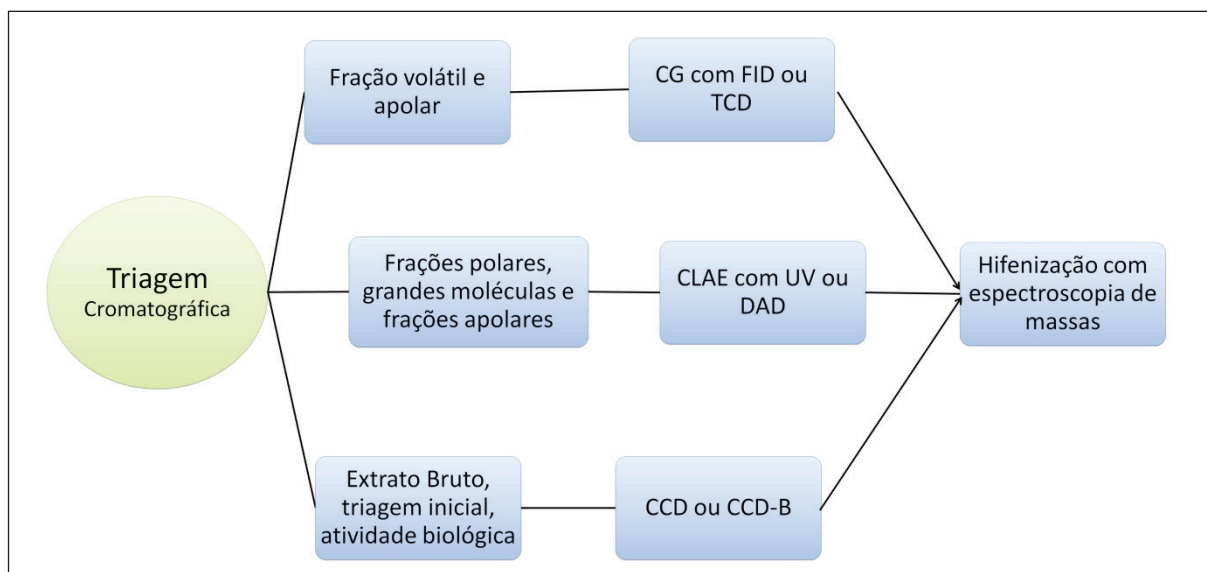


Figura 6 - Resumo esquemático da matriz de decisão para protocolos de teste em fotoquímica com abordagem cromatografia, indicando a necessidade de selecionar a fração de extrato e os testes necessários. (Autorizada pelos autores Cavalaro, V., Oliveira, C.R.)

Conclusão

Portanto, foi possível verificar que a cromatografia foi amplamente utilizada nos estudos de triagem fitoquímica para identificar novos compostos, bem como a confirmação de compostos já conhecidos. Existem possibilidades de verificação da atividade biológica dos metabólitos da planta e a grande importância da elucidação estrutural desses compostos e a elucidação dos metabolomas para uma melhor compreensão da fisiologia das plantas e sua aplicabilidade para fins farmacêuticos, uma vez que é uma área de grande crescimento e importância estratégica. A figura 6 resume as etapas de triagem por cromatografia.

Referências bibliográficas

AL-Rubaye, A.F.; Hameed, I.H.; Kadhim, M.J. A: **Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants.** International Journal of Toxicological and Pharmacological Research, vol.9 issue.1 p. 81-85, mar. 2017.

ANTONIO, Gisele Damian; TESSER, Charles Dalcanale; MORETTI-PIRES, Rodrigo Otavio. **Phytotherapy in primary health care.** Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 541-553, June 2014 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia. Brasil.

CARVALHO, A.C.B., et al., 2011. **Regulation of herbal medicines in Brazil: Advances and perspectives.** Bras. J. Pharm. Sci. 47, 467 – 474.

CHOMA, I.; JESIONEK, W. **Effects-Directed Biological Detection: Bioautography.** In **Instrumental Thin-Layer Chromatography**; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014.

GALINDO, J.L.G. et al. **The joint action in the bioactivity studies of Antarctic lichen Umbilicaria Antarctica: Synergic-biodirected isolation in a preliminary holistic ecological study.** Phytochemistry Letters, Elsevier, v. 20, p.433-442, jun. 2017

HAMEED, I.H.; ADNAN, I.; KADHIM, H.

Gas chromatography mass spectrum and Fourier transform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of Rosmarinus officinalis leaves. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, p.; 90-106, jan. 2015.

IUPAC. União Internacional da Química Pura e Aplicada. **Compendium of Chemical Terminology.** The Gold Book, 1997, 2 ed, 1997. Online Corrected 2016.

MATOS, A. **Farmacopeia Brasileira tem nova atualização.** Disponível em: <<http://far.fiocruz.br/2017/02/farmacopeia-brasileira-tem-nova-atualizacao/>>. Acesso em: 12 Fev. 2018

JESIONEK, W.; MAJER-DZIEDZIC, B.; CHOMA, I.M. **Separation, Identification and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC-MS and TLC-DPPH.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Taylor & Francis: V. 38, n.11, p 1147-1153, mar 2015.

KESKES, H.; et al. **LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian Juniperus phoenicea leaves.** Pharmaceutical Biology, Taylor & Francis: p. 88-95, dez. 2017.

KOKOTKIEWICZ, A. et al. **Densitometric TLC analysis for the control of tropane and steroidal alkaloids in Lycium barbarum.** Food Chemistry, Elsevier: v.221, p 535-540, abr. 2017.

PANG, B.; et al. **The Applications and Features of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Traditional Chinese Medicine, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine:** vol. 2016, pages, 2016.

POTTERAT, O.; HAMBURGUER, M. **Combined use of extract libraries and HPLC-based activity profiling for lead Discovery: potential, challenges, and practical considerations.** Planta Medica, E-Thieme, v.80, p. 1171-1181, ago. 2014.

SIMÕES, C.M.O.; et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 eds. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1104 p.

VINAIXA, M. et al. **Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the Field and future prospects.** Trends in Analytical Chemistry, Elsevier, v. 78, p. 23-25, abr. 2016.