

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS DE *Baccharis platypoda* DC.
(ASTERACEAE)**

por

Carolina Paula de Souza Moreira

Belo Horizonte
Setembro/2014

TESE DBCM-CPqRR

C.P.S.MOREIRA

2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS DE *Baccharis platypoda* DC.
(ASTERACEAE)**

por

Carolina Paula de Souza Moreira

**Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular.**

Orientação: Dra. Tânia M. de Almeida Alves

Colaboração: Dr. Antonio Segura-Carretero

Belo Horizonte

Setembro/2014

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M835p Moreira, Carolina Paula de Souza.
2014

Produtos naturais bioativos de *Baccharis platypoda*
DC. (Asteraceae) / Carolina Paula de Souza Moreira.
– Belo Horizonte, 2014.

XIX, 104: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 109 – 123

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título
de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde do Centro de
Pesquisas René Rachou. Área de concentração:
Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose/quimioterapia 2.
*Leishmania*efeitos de drogas 3. *Baccharis*/química I.
Título. II. Alves, Tania Maria de Almeida (Orientação).
III. Segura-Carretero, Antonio (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS DE *Baccharis platypoda* DC. (ASTERACEAE)

por

Carolina Paula de Souza Moreira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Tânia Maria de Almeida Alves (Presidente)

Profa. Dra. Betania Barros Cota

Profa. Dra. Caryne Margotto Bertollo

Profa. Dra. Lucienir Pains Duarte

Prof. Dr. Markus Kohlhoff

Suplente: Prof. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Tese defendida e aprovada em 10/09/2014.

***“Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei
demais...”***

***Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei...”***

Renato Teixeira e Almir Sater

Dedicatórias

Dedico este trabalho ao meu marido Maxwell e à minha filha Rafaela, que estiveram sempre ao meu lado e me ajudaram a tornar esse sonho realidade. Também ao meu bebê Henrique que antes de nascer já viveu tantas emoções... Amo vocês!

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me concedido tantas bênçãos e ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas. A Nossa Senhora pela sua constante intercessão e amparo nos momentos difíceis.

À minha orientadora Dra. Tânia pela amizade sincera, pelas inúmeras oportunidades ao longo desses anos, por compartilhar comigo seus conhecimentos, pelo apoio incondicional a minha opção de ser mãe por duas vezes durante o doutorado. Muito obrigada!

Ao Dr. Carlos Zani pela confiança, pelos vários ensinamentos que vou levar por toda a vida, pelas brilhantes discussões e pelos vários momentos agradáveis fora do laboratório.

Aos meus colegas do LQPN que estiveram comigo em algum (ou todo) momento do doutorado agradeço pela amizade e troca de experiências. Obrigada especialmente a Fernanda Luiza e Daniela Nabak, por tanta ajuda e tanto carinho! A minha querida Marcinha, que não faz mais parte da equipe, mas mora no coração de todos nós! A Michele, que com sua simpatia e gentileza nos conquistou. A Claudinha, que me ajudou muito e demonstrou ter vocação para a ciência! Ao Djalma, que mais uma vez veio em meu socorro!!

À Funed pelo apoio financeiro e liberação das atividades laborais. Aos meus colegas de lá, que me apoiaram, aceitaram minha ausência e me incentivaram para lutar por esse sonho.

Aos meus pais pelo amor, pela confiança e por me apoiar sempre nos estudos. Obrigada pela certeza de ter um porto seguro em vocês. À minha família por ser minha alegria, meu alicerce, meu amparo, meu tudo.

Aos meus amigos, não importa quanto tempo eu os conheça, por ser esse tesouro maravilhoso, por se alegrarem com minhas vitórias e se colocarem ao meu lado nos momentos de dificuldades, por rezarem muitas e muitas vezes por mim.

Aos colegas do CIDAF, em especial Nassima, Cristiano e Hakim por tornarem a temporada em Granada tão feliz. Ao Dr. Antonio, pelo acolhimento e simpatia. A Dra. Rosa Piné, pelo acompanhamento, discussões e por toda ajuda fora do laboratório. Muito obrigada!

Ao meu amado marido e companheiro Max, que caminhou sempre ao meu lado, me apoiando e suportando, completando minha vida e me mostrando o que é ser feliz! À Rafaela, minha pipoquinha carinhosa e ao meu Henrique que já já estará chegando.

Obrigada!

Agradecimento especial

Agradeço especialmente à FAPEMIG pela bolsa de doutorado fornecida aos servidores estaduais no Programa de Capacitação de Recursos Humanos (PCRH nº. 95403/11) e ao CNPq - Programa Ciências sem Fronteiras pela bolsa de doutorado sanduíche na Universidade de Granada e no Centro de Pesquisas e Desenvolvimento de Alimentos Funcionais – CIDAF na Espanha (processo 237751/2012-7).

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	XII
Lista de tabelas.....	XV
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XVI
Resumo.....	XVIII
Abstract.....	XIX
1 JUSTIFICATIVA.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Leishmanioses e terapêutica atual	22
2.2 Produtos naturais leishmanicidas	28
2.3 Família Asteraceae e a espécie <i>Baccharis platypoda</i>	33
2.4 HPLC-MS na caracterização de produtos naturais de extratos vegetais	38
2.5 Atividade antioxidante e compostos fenólicos	40
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 Obtenção do extrato	46
4.2 Registro de dados.....	46
4.3 Prospecção fitoquímica.....	46
4.4 Determinação do sistema de solventes bifásico para fracionamento por cromatografia em contracorrente	47
4.5 Fracionamento de EX6458 por HSCCC	47
4.6 Análise por CCD das frações obtidas no fracionamento por HSCCC.....	48
4.7 Análise das frações CH20 por cromatografia líquida de alta eficiência	48
4.8 Refracionamento da fração CH20-7 ativa por CLAE analítico	49
4.9 Refracionamento da fração CH20-8 ativa por CLAE semi-preparativa.....	49
4.10 Obtenção dos dados espectrais de CH41-7.....	49
4.11 Refracionamento da fração CH20-11 ativa por CLAE semi-preparativa	50
4.12 Fracionamento de EX6458 por cromatografia líquida de média pressão.....	50
4.13 Caracterização dos compostos fenólicos de EX6458 por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	51
4.14 Quantificação de fenóis totais	52
4.15 Ensaio para avaliação da atividade antioxidante de EX6458	52

4.15.1	Ensaio de sequestramento do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	52
4.15.2	Ensaio de capacidade de absorvância de radicais oxigenados – ORAC.....	53
4.15.3	Ensaio para determinação da capacidade antioxidante em equivalente de Trolox – TEAC.....	53
4.15.4	Ensaio de determinação do poder redutor de ferro - FRAP	54
4.16	Ensaio para avaliação da atividade leishmanicida	54
4.16.1	Ensaio <i>in vitro</i> com formas amastigotas axênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
4.16.2	Ensaio <i>in vitro</i> com macrófagos murinos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	55
4.16.3	Ensaio <i>in vitro</i> com células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i>	56
4.16.4	Ensaio de toxicidade para macrófagos	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Fracionamento EX6458 por HSCCC	58
5.2	Atividade leishmanicida das frações CH20.....	61
5.3	Refracionamento das frações CH20 leishmanicidas e não tóxicas para macrófagos murinos.....	65
5.4	Elucidação estrutural de CH41-7 e avaliação de sua atividade leishmanicida	67
5.5	Fracionamento de EX6458 por cromatografia líquida de média pressão (CLMP).....	73
5.6	Caracterização de compostos fenólicos de EX6458 por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	76
5.6.1	Derivados de ácidos fenólicos.....	87
5.6.2	Flavonas e seus heterosídeos	90
5.6.3	Flavonóis e seus heterosídeos.....	93
5.6.4	Flavanonas e flavanonol	94
5.7	Determinação da potencial antioxidante do extrato EX6458	95
6	CONCLUSÃO	99
7	ANEXOS.....	100
7.1	Trabalhos apresentados em congressos.....	100
7.2	Trabalho publicado	100
7.3	Espectros de RMN do platypodiol.....	102
8	REFERÊNCIAS	109

Lista de figuras

FIGURA 1 - Antimoniais comercializados. Estrutura proposta por Raht et al, 2003.	24
FIGURA 2 – Estrutura da Anfotericina B.	25
FIGURA 3 – Estrutura da Miltefosina	25
FIGURA 4 – Estrutura da paramomicina.	26
FIGURA 5 – Estrutura da pentamidina.	26
FIGURA 6 – Naftoquinona leishmanicida plumbagina.	28
FIGURA 7 – Estrutura da Licochalcona A.	29
FIGURA 8 – Saponinas leishmanicidas.	29
FIGURA 9 – Alcalóides com atividade antileishmania.	30
FIGURA 10 – Estrutura do biflavonoide fukugetina.	30
FIGURA 11 – Flavonoides isolados de <i>Kalanchoe pinnata</i>	31
FIGURA 12 – Cassano-diterpenos leishmanicidas de <i>Caesalpinia echinata</i>	32
FIGURA 13 – Produtos naturais leishmanicidas isolados de <i>Blepharocalyx salicifolius</i>	33
FIGURA 14 – Cumarinas leishmanicidas de <i>Vernonia brachycalyx</i>	34
FIGURA 15 – substâncias leishmanicidas isoladas de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	36
FIGURA 16 – Flavanonas isolada de <i>Baccharis retusa</i> com atividade leishmanicida.	37
FIGURA 17 - Distribuição da espécie brasileira <i>Baccharis platypoda</i> (foto acima) – Alecrim-das-pedras. (Fonte: REFLORA, 2014).	38
FIGURA 18 – Cromatograma do extrato metanólico de <i>Artemisia vulgaris</i> (Asteraceae) obtido por HPLC-ESI-QTOF-MS (Fonte: Melguizo-Melguizo et al., 2014)	40
FIGURA 19 – Estrutura básica dos flavonoides. Presença da parte pontilhada depende do sub-grupo (Fonte: Tsimogiannis et al., 2007).	42
FIGURA 20 – Precursores dos ácidos fenólicos	42
FIGURA 21 – Estrutura do radical DPPH.	43
FIGURA 22 – Estrutura do ABTS.	43
FIGURA 23 – Estrutura da fluoresceína.	44

FIGURA 24 – Fotografia da parte interna de um HSCCC modelo tradicional (esquerda) e esquema dos movimentos de translação e rotação (direita). Fonte: Ito, 2005 e Yanagida et al., 2007.....	59
FIGURA 25 – Fotografias das placas de CCD mostrando as frações CH20 reveladas com vanilina/H ₂ SO ₄ (acima) e NP/PEG sob luz UV em λ_{366} nm (abaixo). Com o revelador NP/PEG as frações 1, 10, 14-16 e 18-21 não apresentaram fluorescência.....	61
FIGURA 26 - Cromatograma do fracionamento em CLAE de CH20-08. Condições de análise: 10-100% MeOH/ H ₂ O com 0,1% ácido fórmico de 0-40 min + 100% MeOH com 0,1% ácido fórmico de 40-60 min.....	66
FIGURA 27 - Espectro de massas de CH41-7 obtido por ESI-TOF com infusão direta no modo negativo e 7.0 eV de energia de colisão.....	68
FIGURA 28 - Espectro de massas de CH41-7 obtido por ESI-TOF com infusão direta no modo positivo e 7.0 eV de energia de colisão.....	68
FIGURA 29 – Esqueleto de clerodanos semelhantes a CH41-7 (A e B descritos por Nagashima et al., 2000; C descrito por Lu et al., 1993).....	69
FIGURA 30 – Estrutura química do clerodano isolado – platypodiol.....	70
FIGURA 31 – Correlações observadas no NOESY para o platypodiol (Moreira et al., 2014).....	70
FIGURA 32 – Esqueleto básico de um clerodano.....	72
FIGURA 33 – Biossíntese de clerodanos a partir do cátion de geranilgeranil pirofosfato (8) e diferenciação de configuração da junção dos anéis (fonte: Akhila et al., 1991).....	73
FIGURA 34 – Cromatograma de EX6458 obtido por HPLC-ESI-Q-TOF-MS com detecção do pico base. No eixo Y é mostrada a intensidade dos íons e no eixo X o tempo em minutos.....	78
FIGURA 35 – Ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico.....	87
FIGURA 36 – Ácido clorogênico e seus derivados encontrados em <i>B. platypoda</i>	88
FIGURA 37 – Ácidos cafeoilquínicos encontrados em <i>B. platypoda</i>	89
FIGURA 38 – (A) Esquema de fragmentação do anel glicosídico e sua nomenclatura; (B) Estrutura da Vicenina-2.....	91
FIGURA 39 – Esquema de fragmentação das flavonas e sua nomenclatura (Fonte: Fabre et al., 2001).....	92
FIGURA 40 – Estrutura das agliconas de flavonas encontradas em <i>B. platypoda</i>	93

FIGURA 41 – Estrutura das agliconas de flavonóis encontradas em <i>B. platypoda</i>	94
FIGURA 42 - Estrutura das flavanonas e flavonol encontrados em <i>B. platypoda</i>	95

Lista de tabelas

TABELA 1- Tratamento atual da leishmaniose visceral e suas principais características	27
TABELA 2 – Espécies da família Asteraceae que foram testadas contra <i>Leishmania</i> sp.	35
TABELA 3 – Gradiente cromatográfico utilizado para obtenção do perfil de EX6458.	51
TABELA 4 – Atividade leishmanicida das frações CH20 obtidas por HSCCC.	63
TABELA 5- Valor de percentual de redução de 50% da infecção (CI ₅₀) para as frações CH20 que foram ativas na triagem intracelular e que não apresentaram alteração morfológica dos macrófagos murinos.	64
TABELA 6 – Atividade leishmanicida das frações CH41 no ensaio com <i>L. (L.) amazonensis</i> na forma amastigota intracelular.	65
TABELA 7 – Dados espectrais de RMN de ¹ H e ¹³ C NMR da substância CH41-7 em DMSO-d ₆ (500 MHz para RMN de ¹ H e 125 MHz para RMN de ¹³ C, δ in ppm, <i>J</i> in Hz).	71
TABELA 8 – Atividade leishmanicida para <i>L. (L.) amazonensis</i> no modelo axênico	75
TABELA 9 – Compostos fenólicos detectados e caracterizados no extrato etanólico de folhas de <i>Baccharis platypoda</i> por HPLC–ESI-QTOF-MS/MS no modo de ionização negativo.	79
TABELA 10 – Avaliação do teor de fenóis totais e da atividade antioxidante para o extrato etanólico de <i>B. platypoda</i>	986

Lista de abreviaturas e símbolos

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
kg	kilograma
ABTS	Sulfonato de 2,2'-azinobis-3-etilbenzoyiazolina
ACN	Acetonitrila
AG	Ácido gálico
AMA	Amastigota
APPH	Diidrocloreto de 2,2'-azinobis-2-metilpropionamina
BHCB	Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
COSY	Homonuclear Correlated Spectroscopy
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI	Eletrospray Ionisation
eV	Eletron volts
EX6458	Extrato etanólico das folhas de <i>Baccharis platypoda</i> DC.
FRAP	Ferric íon Reducing Antioxidant Power
GQ	Geral da Qualidade
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

HSCCC	High Speed Conter-Current Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IL	Intralinfático
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
LV	Leishmaniose visceral
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega hertz
MS	Mass Spectrometry
MTT	Brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio
NAPRALERT	Banco de dados Alerta de Produtos Naturais (Natural Products Alert)
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Sprectroscopy
NP/PEG	Natural Products/Polietilenoglicol
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORAC	Oxigen Radical Absorbance Capacity
PN	Produto natural
POP	Procedimento Operacional Padrão
PRO	Promastigota
ppm	Unidade deslocamento químico nos espectros de RMN
Q	Quadropolo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Time of Flight
TR	Tempo de retenção
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível
VO	Via oral

Resumo

Existe uma necessidade urgente de drogas leishmanicidas mais eficazes e/ou menos tóxicas para contribuir com o arsenal terapêutico atualmente disponível. O grupo de pesquisa de Química de Produtos Naturais Bioativos do Laboratório de Química de Produtos Naturais bioativos do CPqRR tem realizado projetos de bioprospecção de flora brasileira buscando por novos *hits* que possam ser utilizados no tratamento das leishmanioses. A espécie *Baccharis platypoda* (Asteraceae) foi uma espécie que mostrou atividade leishmanicida e que foi pouco investigada do ponto de vista químico e biológico. O estudo químico biomonitorado do extrato etanólico das folhas dessa espécie levou à obtenção de cinco frações com elevada toxicidade para formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e o fracionamento de uma dessas frações resultou no isolamento de um novo diterpeno clerodano, de baixa atividade, que após análise de RMN e ESI-TOF-MS/MS foi denominado platypodiol ou 1R,3R,4R,8aR)-3-(hidroximetil)-4-[(3E)-5-hidroxi-3-metilpent-3-en-1-il]-4,8,8a-trimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftalen-1-ol. Em estágio sanduíche realizado na Universidade de Granada – Espanha os compostos fenólicos do extrato etanólico das folhas de *B. platypoda* foram investigados por HPLC–ESI-Q-TOF-MS/MS no modo negativo e 19 ácidos fenólicos, 10 flavonas, 5 flavonóis e 6 flavanonas foram identificados. Além disso, o potencial antioxidante do extrato foi avaliado em quatro ensaios, mostrando o potencial antioxidante da espécie. Esses resultados aumentaram o conhecimento fitoquímico sobre a espécie brasileira *B. platypoda*, considerando que ela foi até o momento pouco investigada cientificamente.

Abstract

There is an urgent need for effective leishmanicida drugs to replace or supplement those in current use. Our group have been bioprospecting many Brazilian plants looking for potential new 'hits' to combat leishmaniasis. We found that *Baccharis platypoda* was one of the Asteraceae species that displayed leishmanicidal activity and it was few investigated. The bioassay-guided chemical study of the ethanolic extract of the leaves resulted in five fractions with high toxicity for intracellular amastigotes of *L. (L.) amazonensis* and the fractionation of one of these fractions led to a new diterpene clerodane with low activity that was named platypodiol or 1R,3R,4R,8aR)-3-(hidroxymethyl)-4-[(3E)-5-hydroxy-3-methylpent-3-en-1-yl]-4,8,8a-trimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaftalen-1-ol upon NMR and ESI-TOF-MS/ MS analysis. We investigated in Granada University - Spain the phenolic components of the ethanolic leaf extract using HPLC–ESI-Q-TOF-MS/MS in negative mode and provided the identification of 19 phenolic acids, 10 flavones, 5 flavonols and 6 flavanones. We also determined the antioxidant capacity of the extract. Considering the few publications about this species, this result has increased the phytochemical knowledge about *B. platypoda*.

1 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Cerca de 0,7 milhões a 1,3 milhões de novos casos ocorrem por ano no mundo (WHO, 2014). Além disso, o número de casos vem aumentando de forma alarmante. A necessidade de tratamentos mais eficazes para as leishmanioses vem estimulando a realização de programas de bioprospecção. No trabalho de bioprospecção da flora brasileira realizado pela equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais – CPqRR/FIOCRUZ, uma coleção com cerca de 5000 extratos de vegetais e fungos foi triada no ensaio *in vitro* contra formas amastigotas axênicas de um dos vetores da leishmaniose tegumentar - *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Os extratos bioativos foram testados em macrófagos murinos para se avaliar a toxicidade dos mesmos. Aqueles que não apresentaram toxicidade para os macrófagos foram testados em macrófagos murinos previamente infectados com o parasito. Desta forma foi possível detectar extratos que eram capazes de matar formas amastigotas do parasito dentro de macrófagos, sem, contudo, causar danos a estes. Em um levantamento bibliográfico utilizando banco de dados como o NAPRALERT e o Scifinder foi verificado que várias destas espécies vegetais haviam sido pouco estudadas biológica e/ou quimicamente. O extrato etanólico das folhas de *Baccharis platypoda* DC. (Asteraceae) foi um dos selecionados no projeto de bioprospecção e neste trabalho foi proposto realizar sua investigação química visando o isolamento e a identificação estrutural das substâncias responsáveis pela atividade leishmanicida.

A família botânica Asteraceae é reconhecida como fonte de substâncias fenólicas, especialmente de flavonóides. Entre as estratégias utilizadas na otimização do processo de descoberta de produtos naturais bioativos, está a desreplicação, que consiste no conhecimento dos constituintes da amostra sem a realização de isolamento das substâncias, o que permite o direcionamento do processo de fracionamento visando a obtenção de substâncias que sejam inéditas. Essa estratégia na área de produtos naturais é de extrema importância, uma vez que 246 mil produtos naturais já foram descritos e que, aproximadamente, 4000 novas substâncias são adicionadas a esse portfólio anualmente (El-Elmat et al., 2013).

Desta forma, foi realizada a caracterização dos compostos fenólicos encontrados no extrato da *B. platypoda* utilizando o acoplamento da cromatografia

líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas e avaliado o potencial antioxidante desse extrato. Essa parte do trabalho foi realizada em estágio de doutorado sanduíche, com financiamento do Programa Ciências sem Fronteiras, no departamento de Química Analítica da Universidade de Granada, Espanha, com a supervisão do Prof. Dr. Antonio Segura-Carrtero.

Portanto, o estudo da espécie *B. platypoda* foi realizado visando contribuir com o conhecimento químico da espécie e com a descoberta de substâncias úteis no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmanioses e terapêutica atual

As doenças parasitárias são muito comuns em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias e financeiras da população são precárias. Algumas dessas doenças ocorrem apenas nesses países e são consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde por não ser objeto de estudo das indústrias farmacêuticas para desenvolvimento de fármacos (BRASIL, 2014a).

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública e estão presentes em vários países tropicais e subtropicais. A gravidade da doença varia desde lesões cutâneas que se curam espontaneamente até infecção progressiva e disseminada que pode levar à morte (Ali et al., 2011). De acordo com o DNDi (2014) as leishmanioses estão presentes em 98 países, 350 milhões de pessoas se encontram em risco de infecção, 300 mil novos casos de leishmaniose visceral são notificados por ano e o Brasil é um dos sete países com maior número de casos tanto da forma visceral, como da forma tegumentar.

Leishmania é um gênero de protozoário responsável por diversas patologias coletivamente denominadas de leishmaniose. As espécies do gênero *Leishmania* são organismos digenéticos que alteram entre a forma promastigota flagelada presente no inseto flebotomíneo, conhecido como mosquito-palha, e a forma intracelular amastigota presente no hospedeiro vertebrado. As fêmeas dos flebotomínios transmitem as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. As promastigotas se aderem aos fagócitos e são internalizadas por fagocitose. Dentro do macrófago as promastigotas sofrem várias alterações bioquímicas e metabólicas, se diferenciando na forma amastigota que é obrigatoriamente intracelular. As formas amastigotas se multiplicam dentro dos macrófagos, levando-os ao rompimento e à infecção de novas células causando as diferentes manifestações clínicas (Davis & Kedzierski, 2005; Sereno et al., 2007; Freitas-Junior et al., 2012).

Os parasitos apresentam tropismo por diferentes tecidos, infectando desde células epiteliais até células viscerais. De acordo com Freitas-Junior e colaboradores a doença pode ser caracterizada por 4 tipos diferentes de síndrome dependendo do tropismo: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmanioses visceral (LV) – também denominada Calazar e a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros –

Viannia e *Leishmania*, sendo este último o subgênero das espécies causadoras da forma mais grave da doença, a LV: *L. (L.) donovani*, encontrada na Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão; *L. (L.) infantum*, encontrada na Europa e Ásia; e *L. (L.) infantum chagasi*, encontrada nas Américas (Marcili et al., 2014). A LC é causada por várias espécies, entre elas *L. (V) brasiliensis* e *L. (L) amazonensis*, que são encontradas na América Latina, sendo as principais espécies de importância médica no Brasil. A LMC é causada também pela espécie *L. (V) brasiliensis* e, junto com a LC, causam grande impacto social e econômico devido às lesões ulcerativas geradas, as quais muitas vezes levam à deformação da pessoa (Gramiccia & Gradoni, 2005; Passero et al., 2011).

A crescente incidência de resistência às drogas disponíveis para o tratamento das leishmanioses e a ausência de vacina são fatores que reforçam a busca pela identificação de novos alvos terapêuticos e pelo desenvolvimento de novas drogas (Singh et al., 2014a).

Ao longo das últimas décadas poucas alternativas terapêuticas ou novas formulações de medicamentos tradicionais foram disponibilizadas para o tratamento das leishmanioses. Além disso, até o momento, nenhum deles se mostrou ideal para o tratamento da doença devido a diversas reações adversas e problemas, entre eles: elevada toxicidade, aparecimento de resistência, elevado custo, duração longa de tratamento e forma de aplicação inadequada (TABELA 1). A combinação de fármacos tem demonstrado resultados positivos e tem se mostrado a solução a curto-prazo para o tratamento das leishmanioses (Sundar et al., 2011; Singh et al., 2014a).

Os antimoniais (estibogluconato de sódio – Pentostam[®] e antimoniato de meglumina – Glucantime[®]) (FIGURA 1) foram introduzidos em 1945 e permanecem efetivos no tratamento de algumas formas de leishmaniose, porém necessitam de 30 dias de internação hospitalar para administração parenteral do medicamento e apresentam elevada toxicidade (Freitas-Junior et al., 2012; Singh et al., 2014a).

É de consenso geral que os antimoniais exercem sua atividade por diferentes mecanismos de ação. Alguns dados sugerem que o antimônio V depois de atravessar a membrana fagolisossômica é convertido em antimônio III, o qual induz efluxo de grupos tiol intracelulares, conseqüentemente inibindo a atividade da tripanotona redutase e causando a morte das formas amastigotas (Wyllie et al., 2004; Singh et al., 2014a). O antimônio também pode matar o parasito por outros mecanismos, como levando ao aumento dos níveis de citocinas, danificando o DNA

do parasito e alterando as vias metabólicas (Singh et al., 2012). A variável eficácia frente às formas visceral e cutânea, a emergente resistência do parasito e a toxicidade são fatores que têm limitado a utilização desses fármacos (Freitas-Júnior et al., 2012; Singh et al., 2012).

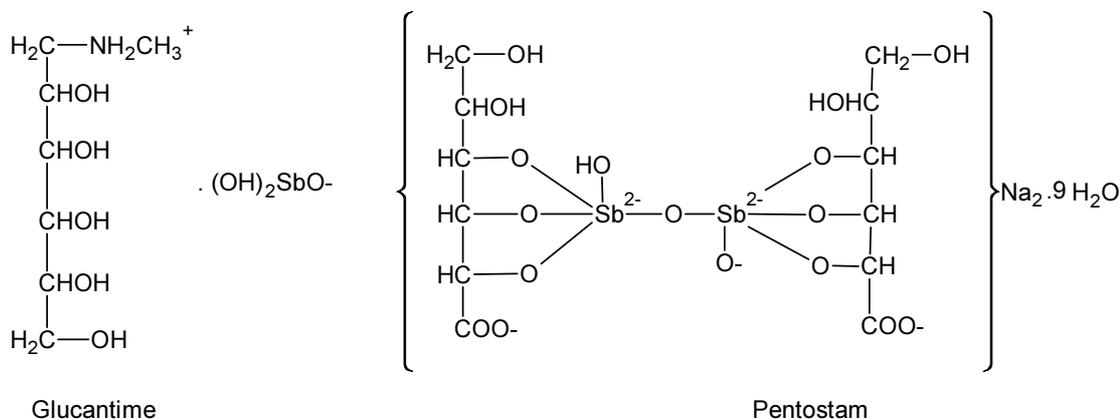


FIGURA 1 - Antimoniais comercializados. Estrutura proposta por Raht et al, 2003.

A Anfotericina B (Fungizona[®]) é um antifúngico sistêmico que possui elevada atividade leishmanicida e é usado nos casos onde é observada resistência aos antimoniais. Entretanto, esse fármaco apresenta elevada toxicidade (principalmente renal), requerendo administração intravenosa lenta com monitoração das funções vitais (FIGURA 2).

O mecanismo de ação da droga está relacionado à sua complexação com esteroides das membranas biológicas (principalmente o ergosterol presente na membrana de fungos e da leishmania), levando à formação de poros e alteração no balanço iônico, provocando a morte celular (Freitas-Junior et al., 2012; Singh et al., 2012). Os efeitos adversos da Anfotericina B têm sido contornados com o desenvolvimento de três novas formulações nas quais o deoxicolato foi substituído por outros lipídios: a liposomal (Ambiosome[®]), a dispersão coloidal (Anfocil[®]) e o complexo lipídico (Abelcit[®]). Essas formulações mantêm a atividade antifúngica e leishmanicida, possuem melhores propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade e apresentam menos efeitos tóxicos. As limitações para o uso dessas formulações ainda estão no preço elevado do medicamento, a via de administração e a instabilidade a altas temperaturas (Freitas-Júnior et al., 2012; Singh et al., 2012).

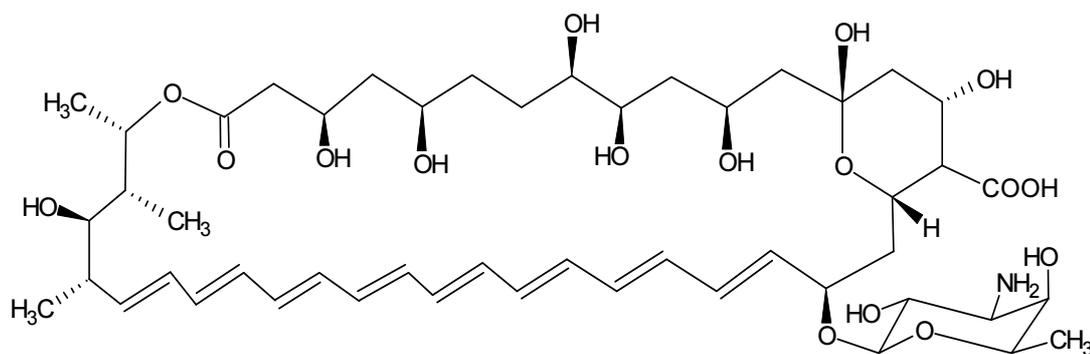


FIGURA 2 – Estrutura da Anfotericina B.

A atividade leishmanicida da miltefosina (Impavido[®]) foi descoberta simultaneamente com sua atividade antitumoral (FIGURA 3). É o fármaco com lançamento mais recente no mercado, sendo o único de administração oral. Além disso, é a primeira escolha para o tratamento de crianças. O fármaco é acumulado dentro da célula infectada e seu mecanismo de ação está ligado à indução de apoptose no parasito, embora os detalhes ainda sejam desconhecidos. Apesar de sua toxicidade não ser elevada, sua teratogenicidade é o fator limitante de seu uso. A combinação da miltefosina com Anfotericina B ou paramomicina é eficiente e tem se mostrado útil no tratamento de cepas de *Leishmania donovani* resistentes na Índia (Freitas-Júnior et al., 2012; Singh et al., 2012).

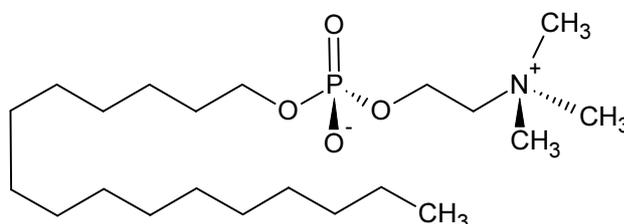


FIGURA 3 – Estrutura da Miltefosina

A paramomicina (FIGURA 4) é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos com ação tanto para a LV quanto para LC, neste último caso com aplicação tópica. O mecanismo de ação da droga ainda não está bem estabelecido, mas estudos apontam para inibição da atividade mitocondrial. Um fator que limita sua utilização é seu efeito antibiótico e seu potencial para seleção de cepas resistentes (Freitas-Júnior et al., 2012; Singh et al., 2014a).

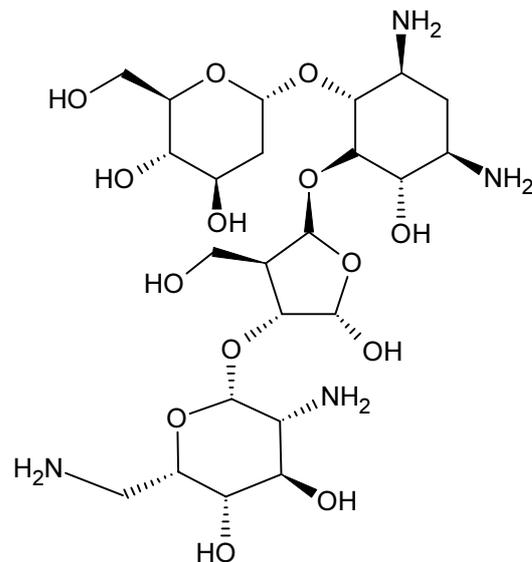


FIGURA 4 – Estrutura da paramomicina.

A pentamidina (FIGURA 5) é utilizada como medicamento de segunda escolha nos pacientes de LV refratários aos antimoniais. Apesar de não ter seu mecanismo de ação conhecido, acredita-se que ela entra na forma promastigota pelos transportadores de arginina e poliamina, acumulando-se nas mitocôndrias e inibindo a topoisomerase II. Sua elevada toxicidade (causa hipoglicemia, nefropatia e hipotensão) e o surgimento de resistência são fatores que restringem seu uso nos pacientes com LV (Singh et al., 2012; Singh et al., 2014a).

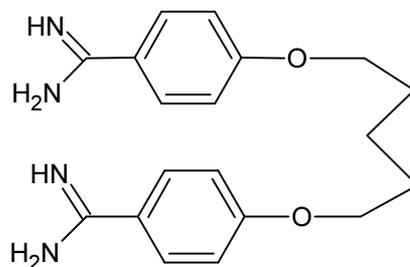


FIGURA 5 – Estrutura da pentamidina.

Como descrito acima, todos os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses possuem contraindicações relevantes, e embora a OMS recomende políticas de uso de medicamentos combinados, fica evidente a necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas (Singh et al., 2014a).

TABELA 1- Tratamento atual da leishmaniose visceral e suas principais características

Medicamento	Via de Administração	Posologia	Eficácia*	Resistência	Órgãos afetados ou sintomas	Preço (\$)
Antimoniais pentavalentes	IV, IM e IL	28 mg/kg/dia (28-30 dias)	35-95% (Depende da área)	Comum (>60% na Índia)	coração, pancreas, rins, fígado	50-70
Anfotericina B	IV	0,75-1mg/kg/dia (15-20 dias)	>90%	Linhagens de laboratório	rins	~100
Anfotericina B lipossomal	IV	10-30 mg/kg (3-5 mg/kg/dose)	>97%	-	+/- tremores e calafrios durante a infusão	280
Miltefosina	VO	100 mg/dia (28 dias)	94-97%	Linhagens de laboratório	intestino, rins, fígado, teratogenicidade	~70
Sulfato de Paramomicina	IM	15 mg/dia (21 dias)	94% (Índia) 46-85% (África)	Linhagens de laboratório	rins, ouvidos, fígado	~10
Pentamidina	IM	2 mg/kg (7 dias)	-	-	rins, hipotensão, hipoglicemia	-

IV= intravenosa; IM= intramuscular; IL= intralinfática; VO= via oral

* Cura definitiva após 6 meses

Fonte: Freitas-Júnior et al., 2012; Jain & Jain, 2013; Singh et al., 2014a

2.2 Produtos naturais leishmanicidas

A busca por novas substâncias que possam ser utilizadas como medicamento no tratamento das leishmanioses é uma estratégia que vem sendo enfatizada pelos órgãos de saúde mundiais (DNDi, 2014).

As plantas têm sido utilizadas direta ou indiretamente no desenvolvimento de medicamentos desde a origem da humanidade. O isolamento de substâncias bioativas a partir de plantas foi uma das grandes forças que deram origem ao nascimento das indústrias farmacêuticas no século XIX. Depois de um longo período de “abandono”, tem havido um interesse renovado na busca por produtos naturais vegetais que possuam atividade inibidora de enzimas essenciais para a regulação da replicação, que produzam fatores de virulência, ou que tenham outros mecanismos de ação (Sen & Chatterjee, 2011).

O isolamento biomonitorado de produtos naturais é uma estratégia que vem sendo adotada e que permite a conexão entre o perfil químico e a atividade biológica *in vitro* de extratos brutos de plantas, fungos, etc em micro-escala, reduzindo significativamente o tempo de descoberta de novos *hits*. De forma geral é um procedimento que vai diretamente do organismo investigado ao composto ativo (Bucar et al., 2013; Seger et al., 2013). Várias espécies vegetais têm sido investigadas quanto à atividade antileishmania e muitas estão sendo fracionadas visando o isolamento dos produtos naturais bioativos que poderão ser usados como *leads* para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (Singh et al., 2014).

Fournet e colaboradores (1992) isolaram de espécies de *Plumbago*, a naftoquinona leishmanicida plumbagina com atividade *in vitro* para amastigotas de *L. donovani* (CI₅₀ 2,24 µM) e *L. amazonensis* (CI₅₀ 5,87 µM) e *in vivo* para *L. venezuelensis* (5 mg/kg/dia) e *L. amazonensis* (2.5 mg/kg/dia).

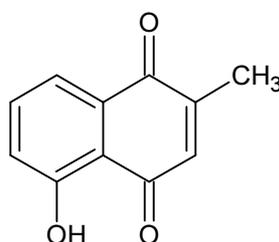


FIGURA 6 – Naftoquinona leishmanicida plumbagina.

A chalcona oxigenada isolada de *Glycyrrhiza* spp., licochalcona A, é uma substância natural que exibiu elevada atividade leishmanicida, apresentando CI₅₀ para formas amastigotas intracelulares *L. donovani* de 2,7 µM. Estudos *in vivo* com

hamsters reduziu a parasitemia de fígado e baço em 96% após dose diária de 20 mg/Kg por 6 dias. Além disso, a licochalcona A (FIGURA 7) não apresentou efeitos tóxicos para células do sangue periférico humano e o mecanismo de ação da substância parece estar relacionado à destruição da estrutura mitocondrial e inibição da fumarato redutase (Chen et al., 1993; Chen et al., 1994; Chen et al., 2001).

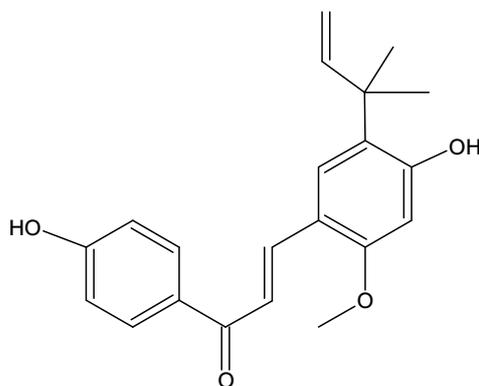


FIGURA 7 – Estrutura da Licochalcona A.

O extrato enriquecido em saponinas preparado de *Maesa balansae* quando administrado *in vivo* em camundongos BALB/c na dose única de 0,4 mg/Kg reduziu a parasitemia do fígado em 95%, entretanto, devido a toxicidade, os estudos pré-clínicos com o extrato foram descontinuados. O fracionamento desse extrato levou ao isolamento de quatro saponinas, denominadas mesabalidas I-IV, sendo as de número III e IV as mais potentes, com CI_{50} de 5 e 9 nM, respectivamente (Polonio & Efferth, 2008).

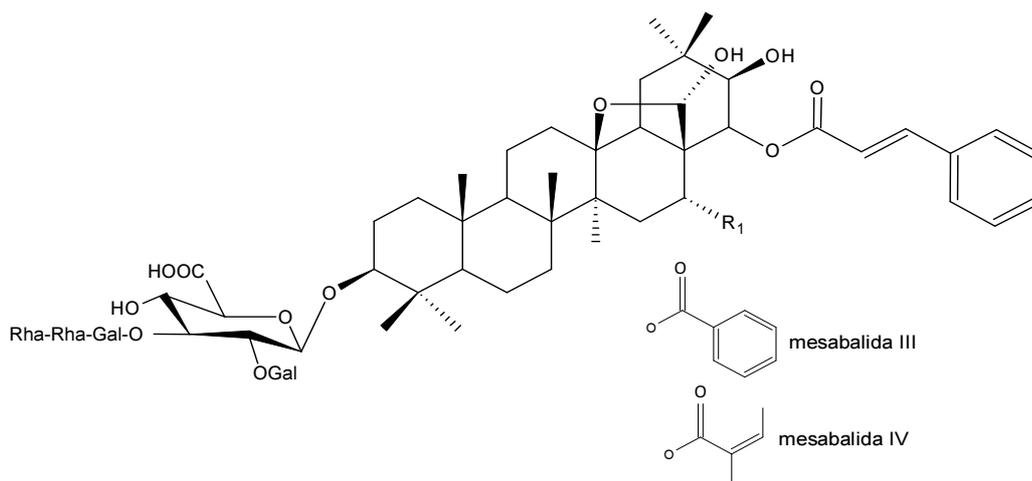


FIGURA 8 – Saponinas leishmanicidas.

O fracionamento dos extratos de folhas e cascas da planta boliviana *Peschiera van heurkii* resultou no isolamento de 20 alcaloides indólicos e bisindólicos. Dois deles, a conodurina (C) e a N-dimetilconodurina (D), exibiram

atividade leishmanicida (FIGURA 9) no modelo de amastigota intracelular e baixa toxicidade para os macrófagos (Carvalho & Ferreira, 2001).

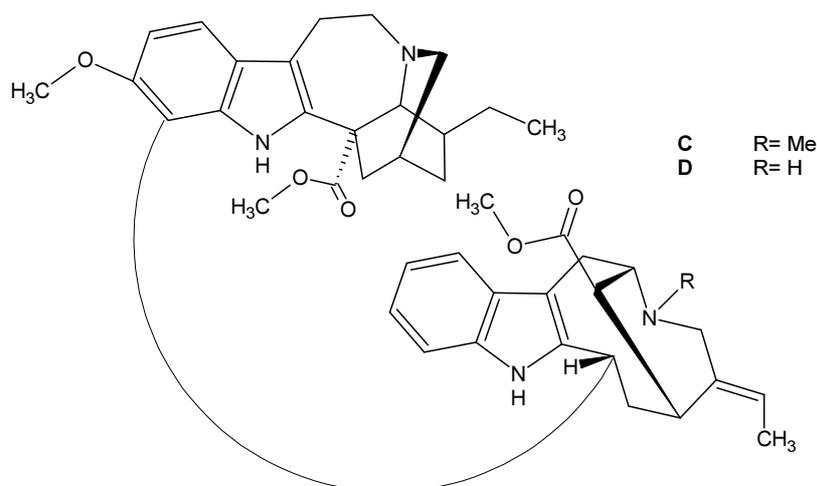


FIGURA 9 – Alcalóides com atividade antileishmania.

Outro fracionamento biomonitorado visando à obtenção de uma substância leishmanicida foi realizado por Pereira e colaboradores (2011) com extratos do fruto de *Garcinia brasiliensis*, uma espécie nativa do Brasil. O extrato em acetato de etila mostrou atividade inibidora de proteases do parasito, as quais são fundamentais para a patogênese da leishmaniose, e seu fracionamento levou ao isolamento do biflavonoide ativo fukugetina ($CI_{50} = 3,2$ a $0,5 \mu M$). Entretanto, o biflavonoide (FIGURA 10) não foi ativo no ensaio *in vitro* com formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, mostrando que derivados da fukugetina serão necessários para a realização de mais testes visando à atividade no organismo íntegro.

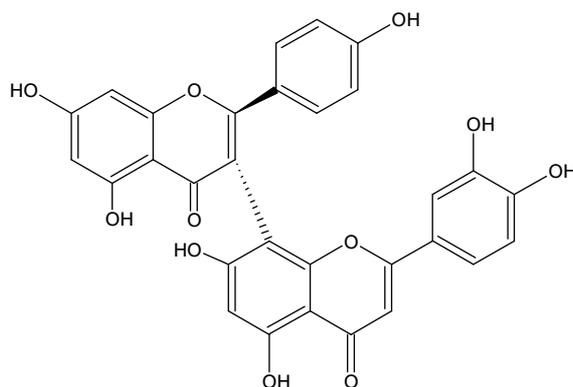
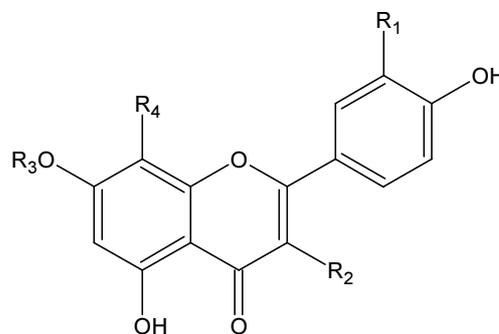


FIGURA 10 – Estrutura do biflavonoide fukugetina.

A atividade leishmanicida da espécie *Kalanchoe pinnata* tem sido reconhecida há algum tempo. Muzitano e colaboradores (2006a) realizaram o isolamento do flavonoide quercetrina e demonstraram a potente atividade leishmanicida da

substância e seu perfil de baixa toxicidade. Posteriormente o grupo realizou o isolamento de outros flavonoides glicosilados pouco usuais: kaempferol 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopiranosídeo (kapinnatosídeo) (E), quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopiranosídeo (F) e 4',5-diidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- β -D-glicopiranosídeo (G) (Muzitano et al., 2006b). Esses flavonoides foram comparados *in vitro* com a quercetrina, quercetina e com a afzelina e os pesquisadores concluíram que há dois fatores importantes para a atividade leishmanicida: possuir uma porção glicosídica e ter como aglicona a quercetina, visto que os melhores resultados foram obtidos para a quercetrina e para a quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopiranosídeo.



Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
E	H	O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L- rhamnopiranosídeo	H	H
F	OH	O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L- rhamnopiranosídeo	H	H
G	OMe	H	O- β -D- glicopiranosídeo	OMe
Quercetrina	OH	α -L-ramnpirosídeo	H	H

FIGURA 11 – Flavonoides isolados de *Kalanchoe pinnata*.

Outros flavonoides, como a luteolina e a quercetina, apresentam potente atividade leishmanicida, com CI₅₀ em amastigotas intracelulares de *L. donovani* de 12,5 e 25,5 μ M, respectivamente. Ambas induzem à clivagem da topoisomerase II, arrastando o ciclo celular na fase G0/G1e provocando a morte celular por apoptose (Polonio & Efferth, 2008).

As revisões realizadas por Carvalho & Ferreira (2001), Polonio & Efferth (2008), Sem & Chatterjee (2011) e Singh e colaboradores (2014a) mostram como substâncias de diferentes classes fitoquímicas (chalconas, flavonoides, saponinas, quinonas, alcaloides, lignanas, terpenoides, iridoides, cumarinas, taninos e outros

produtos naturais de via mista) tem sido descritas na literatura com atividade leishmanicida, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Entretanto, pode ser observado que muitas substâncias foram avaliadas nas formas promastigotas, que não são encontradas no hospedeiro vertebrado, e que várias apresentaram toxicidade para células de mamíferos. Dessa forma, pode-se concluir que muitos estudos ainda serão necessários para se encontrar uma substância que realmente possa ser considerada como protótipo para o desenvolvimento de novos medicamentos para as leishmanioses.

Uma forma de buscar novas substâncias leishmanicidas é realizar a triagem de extratos vegetais e o fracionamento biomonitorado dos mesmos em modelos *in vitro*, como o modelo empregando formas amastigotas axênicas. Nesse ensaio as amostras são avaliadas na forma encontrada no homem, a manipulação é mais fácil que a empregando formas amastigotas intracelulares e a quantificação da atividade da amostra é mais simples e barata (Serenio et al., 2007).

No trabalho contínuo de bioprospecção da flora brasileira realizado pela equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais do CPqRR/FIOCRUZ, uma coleção com cerca de 5000 extratos vegetais e de fungos foi triada no ensaio *in vitro* contra formas amastigotas axênicas de um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar - *Leishmania (Leishmania) amazonensis* visando a descoberta de novos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos. Nesse programa um dos extratos selecionados foi o extrato etanólico do caule de *Caesalpinia echinata* Lam. que, na concentração de 20 µg/mL, reduziu em 94% o crescimento dos parasitas e apresentou atividade inibitória moderada sobre células mononucleares do sangue humano periférico. O fracionamento do extrato resultou no isolamento de cinco novos diterpenos e do ácido lambertiânico, sendo que o último e dois dos diterpenos (FIGURA 12) apresentaram moderada atividade leishmanicida (Cotta, 2011).

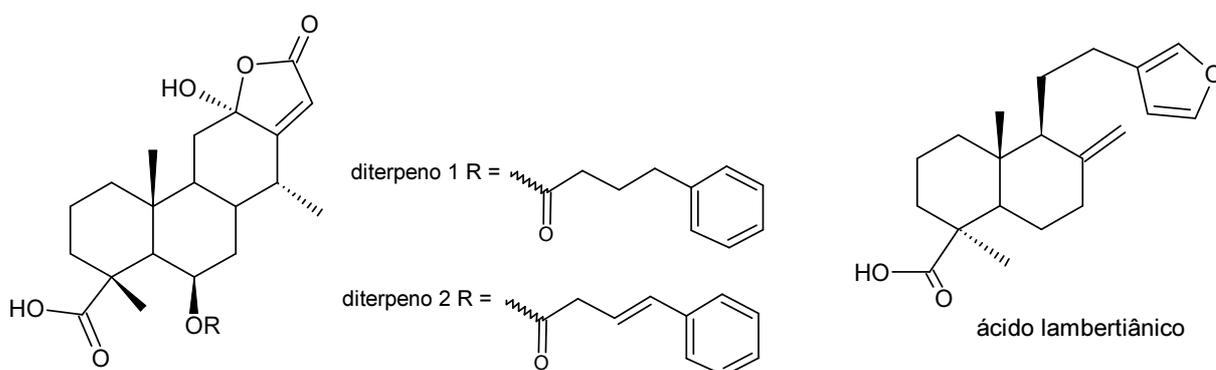


FIGURA 12 – Cassano-diterpenos leishmanicidas de *Caesalpinia echinata*.

Outra espécie selecionada pelo grupo do LQPN foi a *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae), da qual foram isoladas cinco substâncias (

FIGURA 13) com atividade leishmanicida para amastigotas axênicas, com Cl_{50} variando de 2,19 a 20,80 $\mu\text{g/mL}$ (Siqueira et al. 2011).

Estratégias de fracionamento biomonitorado vem sendo utilizadas a fim de conectar as informações químicas dos extratos com a atividade biológica *in vitro* observada em micro-escala, reduzindo de forma significativa o tempo de descoberta de novos *hits* para o desenvolvimento de novos medicamentos (Bucar et al., 2013).

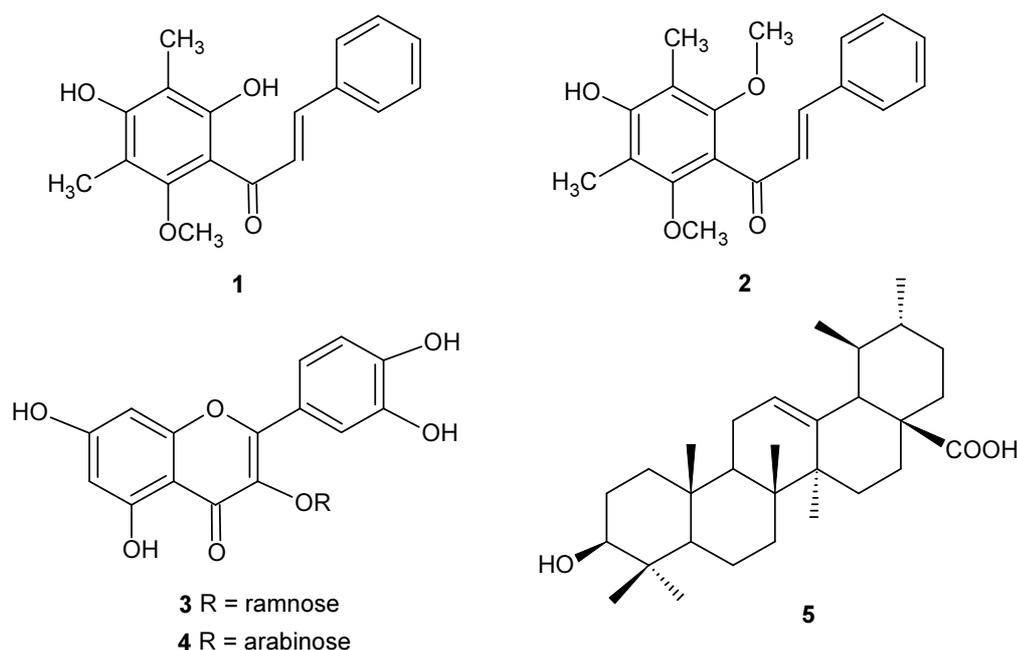


FIGURA 13 – Produtos naturais leishmanicidas isolados de *Blepharocalyx salicifolius*.

2.3 Família Asteraceae e a espécie *Baccharis platypoda*

O Brasil é um país de proporções continentais: seus 8,5 milhões km^2 ocupam quase a metade da América do Sul e abarcam várias zonas climáticas de grandes variações ecológicas, chamadas biomas. O país abriga mais de 20% do número total de espécies da Terra, o que o eleva ao posto de principal nação em biodiversidade. Em relação à flora brasileira, são estimadas mais de 55 mil espécies de plantas (22% do total mundial), sendo a mais diversa flora do mundo (BRASIL, 2014b).

A família Asteraceae abriga cerca de 25.000 espécies organizadas em aproximadamente 1.700 gêneros. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores que são

encontradas em todos os tipos de habitat (exceto Antártica), especialmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Verdi et al., 2005; Borges & Forzza, 2008). É uma das maiores famílias botânicas em número de espécies, sendo muitas delas utilizadas como plantas medicinais por populações rurais ou indígenas, principalmente como infusão e decocto, sendo relatado o uso medicinal dessa família como anti-helmíntico, anti-inflamatório, adstringente, colestérico, anti-hemorrágico, antimicrobiano, diurético, analgésico e antiespasmódico (Martinez et al., 2005; Fabri et al., 2011).

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Verdi et al., 2005).

A atividade antiparasitária de espécies dessa família também tem sido descrita na literatura. O uso do chá feito das folhas de *Vernonia brachycalyx* por tribos da África no tratamento de doenças parasitárias levaram pesquisadores a realizar o fracionamento biomonitorado de seu extrato, resultando no isolamento de duas 5-metilcumarinas isoméricas: 2'-epicicloisobranchycumarinona (H) e cicloisobranchycumarinona (I) (

FIGURA 14). Essas cumarinas mostraram atividade leishmanicida para formas promastigotas de *L. major*, mas inibiram a proliferação dos linfócitos humanos, caracterizando-se como tóxicas (Carvalho & Ferreira, 2001).

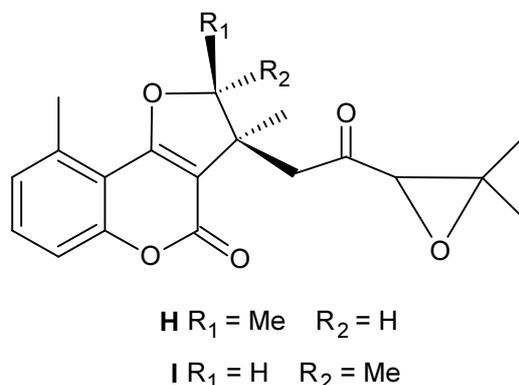


FIGURA 14 – Cumarinas leishmanicidas de *Vernonia brachycalyx*.

A TABELA 2 abaixo mostra algumas espécies da família Asteraceae que foram avaliadas contra parasitos do gênero *Leishmania*.

Assim como é grande a variedade de espécies na família Asteraceae, também é grande a diversidade de produtos naturais encontrados. Entretanto, os polifenóis, em especial os flavonoides, são encontrados em abundância e são utilizados como marcadores taxonômicos desse grupo (Emereciano et al., 2001;

Verdi et al., 2005). Também são variadas as atividades biológicas atribuídas a espécies dessa família, sendo que há ainda muito a se explorar do ponto de vista químico e farmacológico desse táxon tão rico em solo brasileiro.

O gênero *Baccharis* é um dos maiores dentro da família Asteraceae, sendo encontrado com muita frequência em países da América latina, especialmente no Brasil (Martinez et al., 2005). Várias espécies desse gênero vêm sendo utilizadas na medicina tradicional como antibiótico, antisséptico, antiparasitário, entre outros (Passero et al., 2011).

TABELA 2 – Espécies da família Asteraceae que foram testadas contra *Leishmania* sp.

Espécie	Extrato/Composto	<i>Leishmania</i> sp.	CI ₅₀ (µg/mL)	
			PRO	AMA
<i>Achillea millefolium</i>	Óleo essencial	<i>L. amazonensis</i>	7,8	6,5
<i>Anthemis auriculata</i>	Anthecotulideo	<i>L. donovani</i>	NT	8,18
	4-Hidroxianthecotulideo	<i>L. donovani</i>	NT	3,27
	4-Acetoxianthecotulideo	<i>L. donovani</i>	NT	12,5
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Extrato bruto	<i>L. donovani</i>	45,0	NT
	Lactona ác.hautriwáico	<i>L. donovani</i>	7,0	NT
	Ácido ursólico	<i>L. donovani</i>	3,7	NT
	Uvaol	<i>L. donovani</i>	15,0	NT
	Ácido 2 α -hidroxi-ursólico	<i>L. donovani</i>	19,9	NT
<i>Calea montana</i>	Extrato etanólico	<i>L. amazonensis</i>	NT	10,0
<i>Elephantopus mollis</i>	Extrato diclorometânico	<i>L. donovani</i>	NT	0,6
	Pó de planta	<i>L. amazonensis</i>	490	74,8
<i>Tenacetum parthenium</i>	Extrato diclorometânico	<i>L. amazonensis</i>	3,6	2,7
	Partenolideo	<i>L. amazonensis</i>	0,37	0,81
	Guaianolideo	<i>L. amazonensis</i>	2,6	ND
<i>Vernonia polyanthes</i>	Extrato metanólico	<i>L. amazonensis</i>	4,0	NT

PRO promastigota; AMA amastigota; NT não testado; ND não determinado.

Fonte: Tiunan et al., 2011

Na busca por produtos naturais leishmanicidas, algumas espécies desse gênero vêm sendo investigadas. O extrato de *Baccharis dracunculifolia* apresentou

IC₅₀ de 45 µg/mL no ensaio *in vitro* contra *Leishmania donovani*, sendo isolados, posteriormente, o ácido ursólico e a lactona do ácido hautriwáico (FIGURA 15) com valores de IC₅₀ de 3,7 µg/mL e 7,0 µg/mL, respectivamente (Silva Filho et al., 2009). Passero e colaboradores (2011) avaliaram o extrato etanólico de *B. uncinella*, e mostraram a atividade inibitória de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* para o ácido caféico e para a pectolinarigenina isolados.

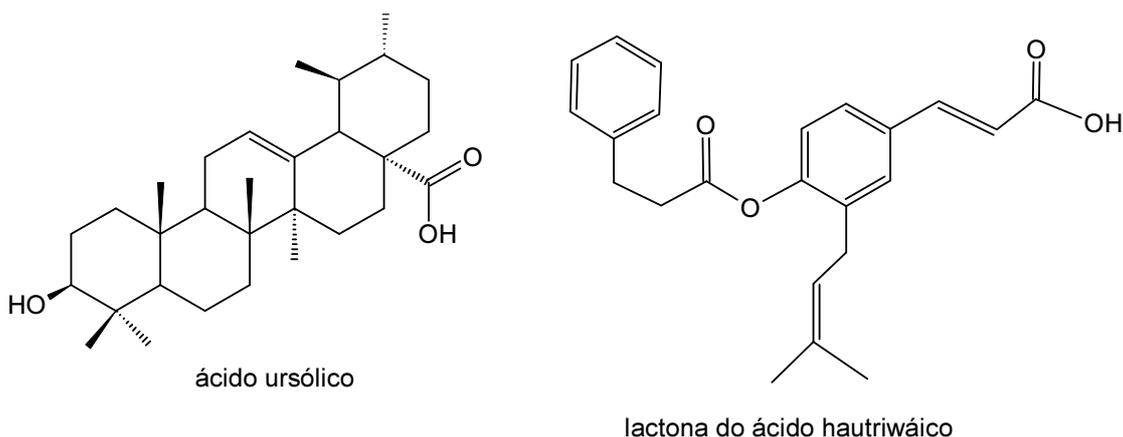


FIGURA 15 – substâncias leishmanicidas isoladas de *Baccharis dracunculifolia*.

Do extrato metanólico das folhas de *B. retusa* foram isoladas a 5,6,7-triidroxi-4'-metoxiflavanona (1), a narigenina (2) e a sakuranetina (3) (

FIGURA 16) que foram testadas em um painel de agentes etiológicos das leishmanioses. As flavanona 1 e 3 se mostraram ativas para formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, com IC₅₀ variando de 40 a 57 µg/mL e 43 a 52 µg/mL, respectivamente. A flavanona 1 foi ativa também para a forma amastigota intracelular de *L. (L.) chagasi* com IC₅₀ de 45.4 µg/mL e a narigenina não apresentou atividade antiparasitária. Essas flavanonas poderão ser utilizadas como ferramenta no desenho de moléculas para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses (Grecco et al., 2010; Grecco 2012).

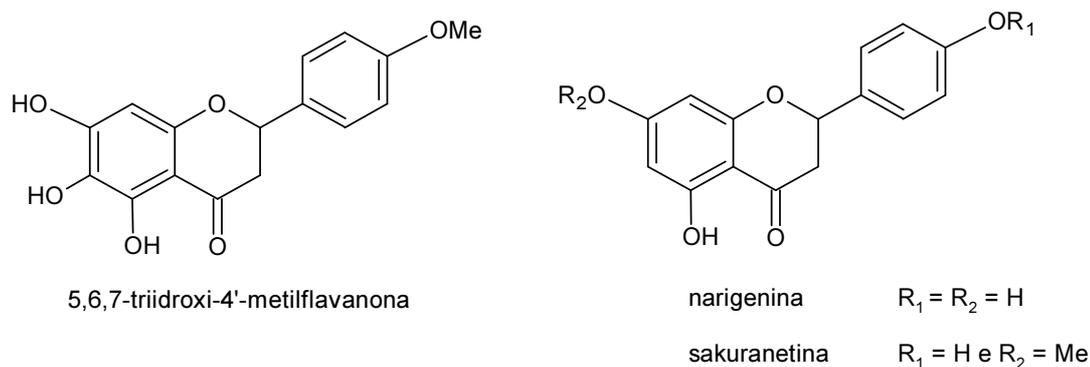


FIGURA 16 – Flavanonas isolada de *Baccharis retusa* com atividade leishmanicida.

No Brasil, há milhares de espécies vegetais nativas ainda não estudadas. Muitas delas encontram-se em fase de extinção; outras, já foram extintas antes de serem conhecidas cientificamente. Para conhecer a biodiversidade e divulgar este conhecimento para a sociedade brasileira a comunidade botânica do Brasil lançou a Lista de Espécies da Flora do Brasil, em que são disponibilizadas imagens e dados sobre as espécies em diferentes tipos de vegetação, por estados, regiões e domínios fitogeográficos (BRASIL. 2014b). A espécie *B. platypoda* DC. (sinonímia *B. condensata* e *B. syncephala*) é uma espécie nativa do Brasil, conhecida como alecrim-das-pedras, que é encontrada na caatinga, cerrado e mata atlântica, que foi muito pouco investigada do ponto de vista químico e biológico.

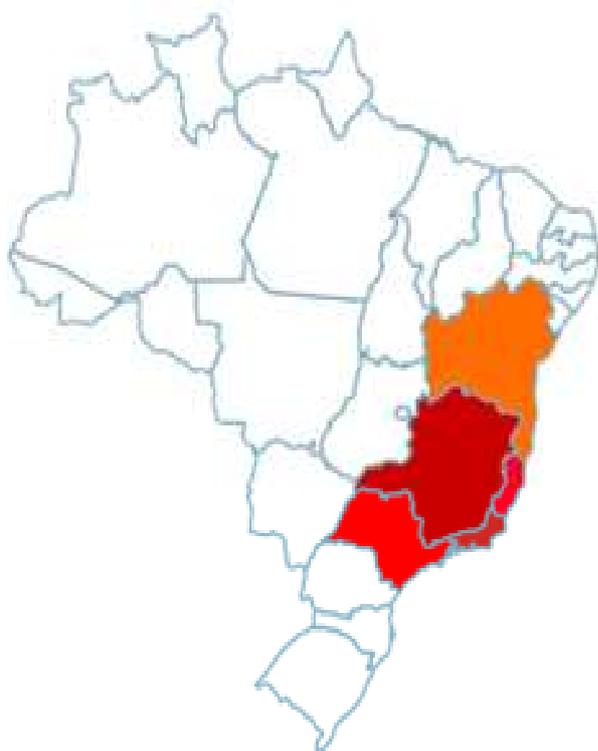


FIGURA 17 - Distribuição da espécie brasileira *Baccharis platypoda* (foto acima) – Alecrim-das-pedras. (Fonte: REFLORA, 2014).

2.4 HPLC-MS na caracterização de produtos naturais de extratos vegetais

Na atualidade é desejável que a pesquisa de produtos naturais seja feita com o uso de técnicas de separação de alta resolução, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou a eletroforese capilar, combinadas com espectrômetros de massas (MS) ou ressonância magnética nuclear. A utilização dessas plataformas instrumentais de análise é uma ferramenta valiosa na identificação *de novo* ou desreplicação de produtos naturais, bem como na autenticação, distribuição e quantificação de constituintes em material vegetal, medicamentos e fluidos biológicos. Além disso, permitem a obtenção de um perfil metabólico, que pode ser usado em análises de caracterização, processos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, entre outros usos (Bucar et al., 2013; Seger et al., 2013).

A espectrometria de massas (EM) surgiu no início do século XX, quando Joseph John Thompson observou que raios positivos eram desviados de sua trajetória por campos elétricos e magnéticos e que o desvio era dependente de sua massa. A partir dessa descoberta foram necessários muitos anos de investigação científica até a técnica se tornar uma análise de fundamental importância em análises aplicadas, sendo utilizada desde estudos astronômicos até a medicina (Steinmann & Ganzera, 2011).

A EM é uma técnica de elevada sensibilidade que se adequa muito bem ao processo de desreplicação, especialmente quando acoplada à cromatografia líquida (Konishi et al., 2007; Smyth et al., 2012). O acoplamento das técnicas fornece uma segunda dimensão de separação, a primeira realizada pela em função do tempo de retenção pela técnica cromatográfica e a segunda em função da relação massa/carga (m/z) fornecida pelo espectrômetro de massas. Como resultado a massa molecular de picos cromatográficos (que não depende de fonte, preparo da amostra e condições de medida) e sua respectiva fragmentação é comparada com dados de bancos de dados e literatura e sua não correspondência pode indicar um potencial novo produto natural, o qual deverá ser isolado e identificado para alimentação dos bancos de dados (Konishi et al., 2007).

A EM utilizando como fonte de ionização o eletrospray (ESI) foi introduzida por Yamashita e Fenn em 1984 com a análise de produtos naturais e drogas sintéticas. Hoje o ESI é uma das técnicas de ionização mais importantes,

principalmente em função do acoplamento *on-line* com o HPLC e ainda assim é um campo que precisa ser mais bem explorado (Smyth et al., 2012).

A análise de metabólitos secundários de plantas continua sendo um desafio devido à: (i) grande diversidade estrutural existente, (ii) pouca abundância em geral dos analitos e (iii) grande variabilidade de composição dentro de uma mesma espécie. Para lidar com tal desafio a cromatografia líquida de alta eficiência, no inglês HPLC, é a técnica de separação preferida na maioria das análises dos 100.000 – 200.000 produtos naturais estimados para o reino vegetal, com exceção dos óleos voláteis para os quais a cromatografia gasosa é mais adequada. O desenvolvimento de fases estacionárias com partículas inferiores a 2 µm e de bombas que trabalham em pressões superiores a 1300 bar tem permitindo um sucesso ainda maior na exploração desse universo de moléculas. A combinação dessa técnica de separação com a detecção por massas, no inglês MS, tem sido extensivamente aplicada nos últimos anos nos estudos qualitativos e quantitativos de plantas medicinais (Steinmann & Ganzera, 2011). A Organização Mundial de Saúde tem introduzido no controle de qualidade de produtos naturais técnicas de cromatografia, principalmente dados de *fingerprint* obtidos pelo acoplamento dessas técnicas com técnicas espectrométricas, usando o resultado para autenticação amostral e outras finalidades (Tistaert et al., 2012).

A caracterização de extratos vegetais tem sido muito explorada por vários grupos de pesquisa no busca, um exemplo é a investigação dos compostos fenólicos de *Artemisia vulgaris*, espécie da família Asteraceae, com o objetivo de descobrir e fundamentar seu uso como antioxidante. A análise por LC-MS permitiu a identificação de 22 substâncias entre as 35 detectadas, 15 delas compostos fenólicos, principalmente derivados de ácido clorogênico e flavonoides (Melguizo-Melguizo et al., 2014).

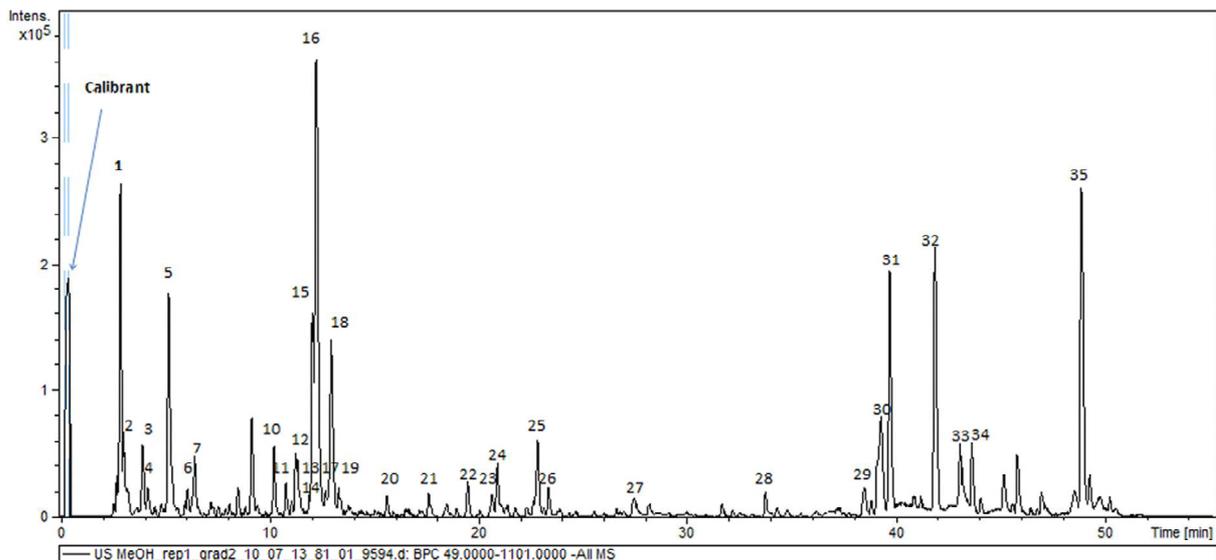


FIGURA 18 – Cromatograma do extrato metanólico de *Artemisia vulgaris* (Asteraceae) obtido por HPLC-ESI-QTOF-MS (Fonte: Melguizo-Melguizo et al., 2014)

Apesar de todo desenvolvimento nas técnicas acopladas e na identificação de produtos naturais ainda na mistura complexa do extrato, muitas vezes ainda é necessário a purificação dessas substâncias para sua caracterização química e avaliação biológica. O fracionamento biomonitorado é a estratégia de escolha para muitos grupos de investigação que buscam identificar as substâncias bioativas na busca por novos agentes quimioterápicos e o auxílio da desreplicação nesse processo é de grande importância para a aceleração do processo de busca por substâncias com potencial de inovação (Bucar et al., 2013; Seger et al., 2013).

2.5 Atividade antioxidante e compostos fenólicos

Os benefícios dos antioxidantes na manutenção da saúde humana tem sido um importante tema mundial na última década. Os antioxidantes estão relacionados com a proteção celular frente ao estresse oxidativo, o qual pode levar à doenças como Alzheimer, câncer, doenças cardíacas e outras doenças onde um processo inflamatório crônico esteja envolvido (Seo et al., 2012; Abu-Reidah et al., 2012; Rajendran et al., 2014). Substâncias antioxidantes são aquelas que em pequenas concentrações inibem significativamente ou retardam o processo oxidativo, geralmente por oxidação própria, levando à manutenção do balanço redox do organismo e o protegendo dos radicais livres (Carocho & Ferreira, 2013; Rajendran et al., 2014).

Radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados que possuem elevada instabilidade química e, portanto, reagem prontamente com outras moléculas. Eles são derivados de três elementos - oxigênio, nitrogênio e enxofre - e reagem com proteínas, DNA, RNA, açúcares e lipídeos (Carocho & Ferreira, 2013). Os radicais livres são formados constantemente pelo organismo durante a produção de energia pela cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, no metabolismo do ácido araquidônico, durante a fagocitose, na ovulação, no metabolismo de xenobióticos, etc, e também são absorvidos de fontes externas, como alimentos e poluentes (Unekwu et al., 2014). É o acúmulo de radicais livres que leva ao surgimento de processos patológicos.

A atividade antioxidante pode ser realizada por vários mecanismos: inibindo as reações dos radicais livres (prevenção de oxidação), inibindo a formação de radicais livres a partir de lipídeos, interrompendo a propagação da cadeia de reação auto-oxidativa, agindo como quelantes e estabilizando os produtos formados, reagindo como redutores ou inibindo enzimas pró-oxidantes (lipooxigenases) (Carocho & Ferreira, 2013).

O metabolismo secundário dos vegetais produz uma série de substâncias responsáveis pela atividade antioxidante de extratos vegetais determinada *in vivo* e *in vitro*. Essas substâncias são, principalmente, compostos fenólicos capazes de diminuir ou eliminar a produção de radicais livres, os quais estão muito presentes na dieta humana (Guimarães et al., 2012). Entre os principais tipos de compostos fenólicos estão os flavonoides e os ácidos fenólicos.

Flavonoides é o nome que se dá um grande grupo de compostos fenólicos, composto por flavonóis, flavonas, antocianinas, isoflavonas, flavanonas, flavononóis, chalconas, entre outros. Todos esses sub-grupos possuem um esqueleto carbônico difenilpropano - $C_6C_3C_6$ (FIGURA 19). A propriedade antioxidante dos flavonoides está ligada às hidroxilas fenólicas, que exercem essa atividade como agentes redutores, doadores de hidrogênio, quelantes de metais e sequestradores de radicais. Eles também ativam enzimas, reduzem radicais, inibem oxidases, entre outras (Rice-Evans et al., 1996; Tsimogiannis et al., 2007; Carocho & Ferreira, 2013).

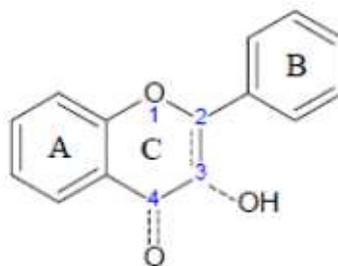


FIGURA 19 – Estrutura básica dos flavonoides. Presença da parte pontilhada depende do sub-grupo (Fonte: Tsimogiannis et al., 2007).

Ácidos fenólicos são formados pelos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico, estão amplamente distribuídos no reino vegetal e muitas vezes são esterificados e glicosilados. Exercem a atividade antioxidante como quelantes e sequestradores de radicais livres, especialmente dos radicais hidroxila e peroxila e dos ânions superóxido e peroxinitrila (Krimmel et al., 2010; Carochó & Ferreira, 2013).

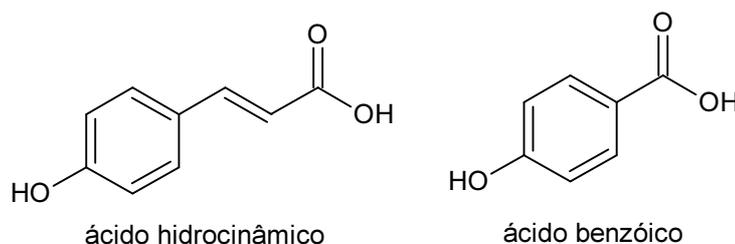


FIGURA 20 – Precursores dos ácidos fenólicos

Vários ensaios para determinação da atividade antioxidante são descritos na literatura, cada um com seu específico alvo e suas vantagens e desvantagens, fornecendo um resultado específico. Desta forma, a melhor forma de analisar a atividade antioxidante de uma substância é a utilização de vários ensaios com mecanismos distintos (Alam et al., 2013; Carochó & Ferreira, 2013).

Entre os ensaios de sequestro de radicais, o método usando o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é o mais rápido, simples (com poucas etapas e reagentes) e de baixo custo em comparação com outros modelos. O DPPH é um radical estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado sobre toda a molécula. Esse radical não se dimeriza e o deslocamento do elétron dá origem à cor violeta intensa, caracterizada pela banda de absorção em etanol centrada em λ_{517} nm. Quando misturada com uma substância doadora de hidrogênio a solução do DPPH é reduzida e perde a cor violeta. A solubilidade do radical é o fator limitante

do ensaio, que não pode ser aplicado para substâncias muito hidrofílicas (Wojdylo et al., 2007; Krishnaiah et al., 2011; Alam et al., 2013).

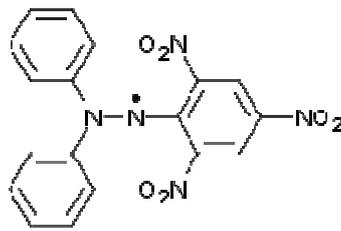


FIGURA 21 – Estrutura do radical DPPH.

O método TEAC - capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (análogo sintético da vitamina E) - é um método que também utiliza um radical estável, o ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) e junto com o DPPH é um dos métodos mais utilizados na triagem de plantas. O cromóforo azul/esverdeado $ABTS^{•+}$ é formado pela reação do ABTS e o persulfato de potássio, e sua descoloração na presença de compostos doadores de hidrogênio é medida espectrofotometricamente em λ_{730} nm. Esse ensaio mede a capacidade antioxidante total tanto para substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (Krishnaiah et al., 2011; Alam et al., 2013).

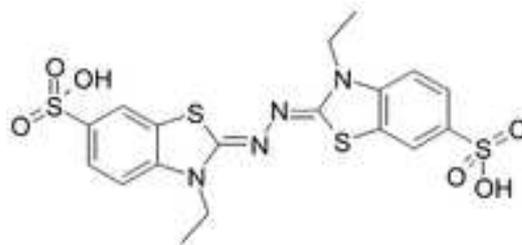


FIGURA 22 – Estrutura do ABTS.

O ensaio de capacidade de absorvância de radicais de oxigênio (ORAC) Oxygen radical absorbance capacity utiliza a fluoresceína como substrato oxidável e o APPH (diidrocloreto de 2,2-azobis-2 amidinopropano) como gerador de radicais peróxila. É o único método cinético, que mede a completa reação radicalar e usa a técnica de área abaixo da curva para a quantificação, combinando extensão da reação e tempo gasto para tal. O método também utiliza o Trolox para normalizar os resultados e permitir comparação de amostras (Krishnaiah et al., 2011; Alam et al., 2013).

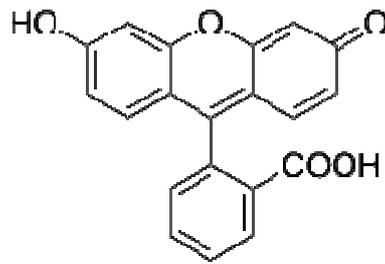


FIGURA 23 – Estrutura da fluoresceína.

O método de poder redutor do ferro (FRAP) utiliza o princípio do aumento da absorvância como indicativo de aumento da atividade antioxidante. Neste método os compostos antioxidantes formam um complexo colorido com a mistura de ferricianeto de potássio, ácido tricloroacético e cloreto férrico, que é medido a λ_{593} nm e a redução da absorção mostra o poder redutor do analito e, conseqüentemente, sua atividade antioxidante (Krishnaiah et al., 2011; Alam et al., 2013).

A determinação do potencial antioxidante de um extrato vegetal é o primeiro passo na busca por antioxidantes naturais que possam ser usados com mais segurança pela população. O gênero *Baccharis* é reconhecidamente fonte de compostos fenólicos e seu potencial antioxidante desperta interesse de pesquisadores, como feito por Oliveira e colaboradores (2012) com *B. trimera*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico da espécie *Baccharis platypoda* DC. (Asteraceae) visando contribuir com o conhecimento químico da espécie e com a descoberta de substâncias úteis no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

3.2 Objetivos específicos

Realizar o fracionamento do extrato e avaliar *in vitro* a ação das frações obtidas sobre *Leishmania (L.) amazonensis*;

Isolar as substâncias leishmanicidas presentes;

Identificar as substâncias isoladas empregando técnicas espectrométricas;

Avaliar a atividade biológica das substâncias obtidas;

Caracterizar os compostos fenólicos presentes no extrato utilizando técnica cromatográfica acoplada à espectrometria de massas;

Avaliar o potencial antioxidante do extrato.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato

As partes aéreas de *B. platypoda* foram coletadas entre 9 a 11 de junho de 2006 na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, no município de Catas Altas – MG, mediante autorização do responsável legal. Um exsicata está depositada no Herbário BHCB sob o código 82328. O extrato vegetal foi obtido previamente pela equipe do LQPN submetendo-se o material vegetal à extração a frio com etanol. O extrato (EX6458) utilizado na tese foi previamente por filtração e o solvente parcialmente evaporado a 40°C em rotavapor. Após a evaporação parcial do solvente o extrato foi concentrado em centrífuga a vácuo (SpeedVac) modelo SC250, ThermoSavant e armazenado ao abrigo de luz.

4.2 Registro de dados

Toda a metodologia executadas foi registrada segundo as normas do Sistema da Qualidade implantado no CPqRR (POP GQ20). Todas as frações e substâncias obtidas foram codificadas por “CH” seguido do número da página do caderno de registro. Esta codificação será empregada no restante desta tese.

4.3 Prospecção fitoquímica

Realizou-se a prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato bruto EX6458 para identificação das classes de metabólitos secundários presentes no mesmo.

Solubilizou-se cerca de 1 mg do extrato bruto em 1 mL de metanol PA e com um capilar essa amostra foi aplicada em cromatofolhas de alumínio revestidas com Silicagel 60 F₂₅₄. Após aplicação, a placa foi eluída em cuba cromatográfica utilizando-se como eluente uma mistura de acetato de etila/metanol/água na proporção 100: 13,5: 10 (Wagner & Bladt, 2001).

Após a eluição e secagem da cromatoplaça, fez-se a aspensão dos reveladores: KOH 10% para detecção de cumarinas, NP/PEG para detecção de flavonoides (com avaliação do perfil cromatográfico em cabine UV nos comprimentos de onda 254 e 366nm), vanilina/acido sulfúrico para detecção de terpenoides e saponinas (Wagner & Bladt, 2001).

4.4 Determinação do sistema de solventes bifásico para fracionamento por cromatografia em contracorrente

Utilizou-se técnica descrita por Ito & Oka (1990) da seguinte forma: Preparou-se cerca de 10 mL de 14 misturas bifásicas a serem testadas. As misturas foram colocadas em funil de separação, agitadas e deixadas em repouso para a separação das fases. Observou-se o tempo necessário para que a separação das fases ocorresse e também a formação de emulsão.

As fases foram recolhidas separadamente e identificadas. Pesou-se em frasco de cintilação cerca de 1 mg do extrato EX6458 e a este foram adicionados 1 mL de cada uma das fases (superior e inferior). Esse procedimento foi feito para as 14 misturas analisadas.

Após solubilização do extrato nas duas fases realizou-se, por CCD, a comparação do perfil cromatográfico apresentado pelo extrato quando solubilizado na fase inferior e na fase superior de cada mistura. A partir desse perfil foi escolhida a mistura bifásica para realização do fracionamento em cromatografia em contracorrente de alta velocidade - HSCCC (HSCCC-1000 Pharma-Tech Research Corp).

4.5 Fracionamento de EX6458 por HSCCC

Inicialmente preparou-se 4,5 L do sistema bifásico previamente determinado (hexano:acetato de etila:metanol:água na proporção 2:3:2,5:2,5) e separou-se as duas fases formadas. Obteve-se ao final do preparo 1,8 L da fase superior e 2,6 L da fase inferior, sendo esta última escolhida como fase móvel devido ao seu maior rendimento. Assim, o sentido da eluição foi cabeça-calda de acordo com técnica descrita por Ito e Oka (1990).

As colunas do equipamento foram preenchidas com a fase estacionária (superior) utilizando bomba LC-8A (SHIMADZU) num fluxo de 10 mL/min. O volume necessário para o preenchimento total das colunas foi de 850 mL.

Antes de se iniciar o fracionamento foi realizado o processo de sangria, com o início da rotação (800 rpm) e bombeamento da fase móvel no fluxo de 5 mL/min. Após equilíbrio, o volume de fase estacionária retida na coluna foi de 550 mL, ou seja, na sangria foram retirados 300 mL de fase estacionária.

Solubilizou-se 2,0 g do extrato bruto em 5 mL de cada uma das fases e com uma seringa de vidro apropriada injetou-se a solução via loop de injeção. A amostra retida no frasco e seringa foi recuperada para cálculo do percentual de injeção.

O fracionamento foi realizado num fluxo de 5 mL/min e o coletor automático foi programado para coletar 10 mL de cada fração. Após o bombeamento de aproximadamente três volumes de coluna, parou-se o bombeamento da fase móvel e a rotação e realizou-se a extrusão da fase estacionária, bombeando-se etanol e em seguida soprando nitrogênio gasoso. As frações obtidas foram transferidas para frascos de cintilação identificados e secas em SpeedVac.

4.6 Análise por CCD das frações obtidas no fracionamento por HSCCC

Para análise do perfil cromatográfico das frações obtidas no fracionamento por HSCCC do extrato EX6458, as mesmas foram solubilizadas em metanol e aplicadas com capilar em cromatofolhas de Silicagel 60 F₂₅₄. Utilizou-se como eluente duas misturas de solventes, uma composta por acetato de etila/metanol/água/ácido acético na proporção 100:13,5:10:5 e outra com apenas os três primeiros componentes da primeira mistura. As placas foram reveladas com os reveladores NP/PEG e vanilina/H₂SO₄.

Após a análise do perfil cromatográfico, as frações semelhantes foram agrupadas e transferidas para frascos de cintilação previamente identificados e tarados, secas em SpeedVac e pesadas para calcular a massa recuperada após fracionamento. As frações reagrupadas foram denominadas como CH20 de acordo com a sequência do livro de registros CH e foram preparadas alíquotas para realização de ensaios biológicos conforme descrito no item 4.16.

4.7 Análise das frações CH20 por cromatografia líquida de alta eficiência

As frações ativas no ensaio com macrófagos infectados (descrito a seguir) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se, inicialmente, coluna de fase reversa (SHIM-PACK ODS) e gradiente de 10 a 100% de acetonitrila (ACN) grau HPLC (Vetec) e água Milli-Q (Millipore) em 20 minutos com mais 3 minutos com 100% de acetonitrila.

Injetou-se 15 µL das amostras na concentração 3 mg/mL, fluxo de 1 mL/min e varredura de detecção no detector com fotodiodo utilizando a faixa de $\lambda_{190-400}$ nm para determinação do comprimento de onda a ser utilizado nas etapas posteriores de purificação cromatográfica. A partir da análise dos cromatogramas obtidos, modificou-se o gradiente de eluição para otimizar a separação dos constituintes presentes nas amostras.

4.8 Refracionamento da fração CH20-7 ativa por CLAE analítico

Solubilizou-se 3 mg da fração CH20-7 em 200 µL da mistura metanol HPLC/água Milli-Q (1:1). Esta fração foi submetida a dois fracionamentos distintos com 40% de metanol HPLC (Merck) em água Milli-Q, com adição de 0,1% de ácido fórmico, por 20 minutos. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min.

As frações obtidas no fracionamento da CH20-7 foram denominadas como CH39 de acordo com a sequência do livro de registros CH.

4.9 Refracionamento da fração CH20-8 ativa por CLAE semi-preparativa

Solubilizou-se 10 mg da fração CH20-8 em 1mL de mistura de metanol/água (1:1) para fracionamento. O gradiente utilizado foi metanol HPLC/água Milli-Q de 65 a 100% em 40 minutos e 100% de metanol HPLC de 40 a 60 min. Adicionou-se 0,1% de ácido fórmico aos solventes utilizados. O fluxo utilizado foi de 10 mL/min.

As frações obtidas no fracionamento da CH20-8 foram denominadas como CH41 de acordo com a sequência do livro de registros CH e foram preparadas alíquotas para realização dos ensaios biológicos descritos em 4.16.

4.10 Obtenção dos dados espectrais de CH41-7

Foi preparada uma solução da amostra CH41-7 a (200 µg/mL) para análise por ESI-TOF/MS por infusão direta (espectrômetro MaXis ETD Bruker) nos modos positivo e negativo, utilizando como solventes isopropanol e água (1:1) com adição de 0,1% de ácido fórmico. Foi feita a varredura de massas de 100 a 1000 *m/z*, energia do capilar de 4500 V, energia de colisão de ±7,0 eV de acordo com o modo de varredura e gás de secagem a 4,0 L/min.

Os espectros de RMN de 1D e 2D de ¹H e ¹³C para a amostra CH41-7 foram obtidos na plataforma de Métodos Analíticos - RMN da Fiocruz em espectrômetro Bruker DX-400 linha AVANCE, operando a 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS), empregado como referência interna. O solvente utilizado para obtenção dos espectros foi DMSO-D₆.

As seqüências de pulsos (listadas abaixo) e de processamentos foram obtidas por programas padrão.

- DEPT 90: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
- DEPT 135: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

- ^1H - ^1H -COSY: Homonuclear Correlated Spectroscopy
- HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation
- NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

4.11 Refracionamento da fração CH20-11 ativa por CLAE semi-preparativa

Solubilizou-se 9 mg da fração CH20-11 em 1mL de mistura de ACN/água (9:1) para fracionamento. O gradiente utilizado foi ACN HPLC 35% por 68 minutos, seguido de ACN HPLC/água Milli-Q de 35 a 100% de 68 a 85 minutos. Adicionou-se 0,1% de ácido trifluoracético aos solventes utilizados. O fluxo utilizado foi de 10 mL/min.

As frações obtidas no fracionamento da CH20-11 foram denominadas como CH111 de acordo com a sequência do livro de registros CH e foram preparadas alíquotas para realização dos ensaios biológicos.

4.12 Fracionamento de EX6458 por cromatografia líquida de média pressão

Foi realizado fracionamento em coluna de vidro (20 x 5 cm) preenchida com octadecilsilano (C_{18} , partícula de 25-40 μm). A coluna foi lavada e condicionada com metanol 10% para início do fracionamento.

Uma alíquota de 6,0 g do extrato EX6458 foi incorporada em 14 g de C_{18} para montagem da pré-coluna. O fracionamento foi realizado passando-se pela coluna soluções metanol/água com polaridade decrescente e posteriormente mistura de metanol com 10 e 20% de diclorometano. O fluxo utilizado foi de 10 mL/min (bomba Shimadzu LC 8A) e as frações foram coletadas a cada 90 segundos (volume de 15 mL). As frações obtidas foram transferidas para frascos de cintilação identificados, secas em SpeedVac, solubilizadas em metanol e analisadas por CCD para reagrupamento. As frações agrupadas foram denominadas como CH56 de acordo com a sequência do livro de registros CH. Alíquotas foram preparadas para realização dos ensaios biológicos descritos no item 4.16.

4.13 Caracterização dos compostos fenólicos de EX6458 por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Foi preparada uma solução de EX6458 a 5 mg/mL em metanol/água (1:1). A separação cromatográfica foi feita em HPLC Rapid Resolution (Agilent, série 1200) composto por bomba binária, desgazeificador e injetor automático. Foi utilizada coluna Agilent Zorbax C₁₈ (4.6 x 150 mm, 1,8 µm), fluxo de 0,5 mL/min, injeção de 10 µL e gradiente de eluição (TABELA 3) utilizando metanol (B) e água com 0,5% de ácido acético (A). o efluente da coluna foi dividido por válvula T e uma fração equivalente a 20 µL/min foi introduzida no espectrômetro de massas.

TABELA 3 – Gradiente cromatográfico utilizado para obtenção do perfil de EX6458.

Tempo (min)	% Eluente	
	A	B
0	95	5
10	65	35
52	40	60

A= água com 0,5% ácido acético; B = metanol

O HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas ortogonal Q-TOF (microTOF-QTM, Bruker Daltonics), equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os parâmetros de análise foram fornecidos para o modo negativo, com aquisição de faixa de massas de 50-1100 *m/z*: voltagem do capilar de 4,5 kV; temperatura de gás de secagem 190°C; fluxo de gás de secagem 9,0 mL/min; pressão de gás de nebulização 2 bar; tempo de transferência 70 µs; frequência de colisão 150 e 200 Vpp.

Foram realizados experimentos automáticos de fragmentação (MS/MS) ajustando a energia de colisão da seguinte forma: *m/z* 100, 25 eV; *m/z* 500, 30 eV, *m/z* 1000, 35 eV, usando N₂ como gás de colisão.

Os dados de massas obtidos foram processados no software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics), fornecendo uma lista de possíveis fórmulas moleculares dos íons adquiridos. O editor Generate Molecular FormulaTM utilizou o algoritmo CHNO, o qual permite, entre outros parâmetros, comparar o padrão isotópico da massa obtida com da massa esperada (valor de mSigma), o que aumenta a confiabilidade da proposta de fórmula molecular.

Durante o experimento foi realizada uma calibração interna utilizando bomba de seringa paralela (Cole Palmer, Vernon Hills) diretamente acoplada à interface, com solução para formação de *clusters* de acetato de sódio (10 µL de NaOH 1 mol/L em 990 µL de água/isopropanol 1:1 com 0,1% de ácido acético).

Para confirmação de caracterização foram utilizados os padrões: quercetina (Sigma-Aldrich), rutina (Sigma-Aldrich), crisina (Aldrich), ácido cafeico (Sigma-Aldrich), ácido clorogênico (Sigma-Aldrich), apigenina (Fluka), kampferida (Extrasynthèse), luteolina (Sigma-Aldrich), taxifolina (Fluka), pinocembrina (Extrasynthèse), isoramnetina (Extrasynthèse), isosakuranetina (Extrasynthèse), hesperitina (Extrasynthèse).

4.14 Quantificação de fenóis totais

A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin–Ciocalteu segundo Zheng & Wang (2001) com algumas modificações. Em um eppendorff de 2 mL foram adicionados 10 µL da solução do extrato (5 mg/mL), 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, 150 µL de uma solução de Na₂CO₃ (20% m/v) e 790 µL de água milli-Q (Millipore). A mistura, após agitação em vórtex, foi deixada em incubação por 2h em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após esse período, 200 µL da mistura foi transferido para placa de 96 poços e a absorvância medida em espectrofotômetro de UV (BioTek) no comprimento de onda de 760 nm. O metanol foi utilizado como branco e o valor de fenóis totais calculados com relação à curva de calibração de ácido gálico (AG), expresso como mg AG/g extrato. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.15 Ensaios para avaliação da atividade antioxidante de EX6458

4.15.1 Ensaio de sequestro do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

A capacidade antioxidante de EX6458 foi avaliada *in vitro* pelo método de sequestro do radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995). Foi preparada uma solução estoque do radical DPPH (Sigma-Aldrich) a 500 µmol/L em metanol. Essa solução foi posteriormente diluída em metanol a 50 µmol/L para realização do ensaio e ambas foram armazenadas a 4°C até o momento de utilização. Em eppendorf foram adicionados 20 µL do extrato em diferentes concentrações (0,2 a 40 µg/mL) e 980 µL da solução de DPPH 50 µmol/L. A mistura foi agitada e deixada em

incubação por 1h à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Depois desse período, 200 μ L foram transferidos para placa de 96 poços e a absorvância medida em espectrofotômetro de UV (BioTek) no comprimento de onda de 516 nm. A solução metanólica de DPPH foi utilizada como referência. A concentração do DPPH remanescente foi calculada pela curva de calibração do DPPH (5-70 μ g/mL) e depois determinada a CI_{50} para a amostra. As medidas foram feitas em triplicata.

4.15.2 Ensaio de capacidade de absorvância de radicais oxigenados – ORAC

A capacidade de sequestro de radicais peróxila foi determinada pelo método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) conforme proposto por Ou e colaboradores (2001) e modificado por Laporta e colaboradores (2007). Preparou-se uma solução de fluoresceína a 56 nmol/L (Sigma-Aldrich) e deixou-se a mesma por, no mínimo, 30 minutos a 37°C antes da utilização. Preparou-se, também, uma solução do padrão Trolox (análogo da vitamina E – Sigma-Aldrich) a 1 mmol/L em tampão fosfato pH 7,4. Foram adicionados 30 μ L da solução do extrato (5 mg/mL) ou soluções do padrão Trolox (7 a 95 μ mol/L) e 150 μ L da solução de fluoresceína nos poços da microplaca negra. A placa foi incubada dentro do espectrofotômetro de UV (BioTek) por 15 minutos a 37°C. Nesse período foi preparada uma solução de AAPH (diidrocloreto de 2,2'-azobis-2-metilpropionamina) na concentração de 133 mmol/L. Após 15 minutos, 30 μ L do AAPH foram adicionados aos poços e a fluorescência medida a λ_{520} nm (excitação a λ_{485} nm) a cada 1 minuto por 3h. Foi determinado o equivalente de Trolox por grama do extrato. As medidas foram feitas em triplicata.

4.15.3 Ensaio para determinação da capacidade antioxidante em equivalente de Trolox – TEAC

O ensaio TEAC foi realizado conforme descrito por Laporta e colaboradores (2007). O radical ABTS^{••} foi preparado pela reação do ABTS (sulfonato de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína) com solução 2,45 mmol/L de persulfato de potássio após 24h de incubação à temperatura ambiente na ausência de luz. No momento do ensaio a absorvância do ABTS^{••} foi ajustada para $0,70 \pm 0,02$ no comprimento de onda de 734 nm com diluição em água. Foi feita uma leitura inicial com 300 μ L da solução de ABTS^{••}. Em seguida adicionou-se 30 μ L das soluções do padrão Trolox ou do extrato e foi realizada nova medida após 3 minutos de agitação a λ_{734} nm. Foi

determinado o equivalente de Trolox (mmol) por grama de extrato. As medidas foram feitas em triplicata.

4.15.4 Ensaio de determinação do poder redutor de ferro - FRAP

O ensaio FRAP, no inglês Ferric ion Reducing Antioxidant Power, foi executado de acordo com Benzie & Strain (1996). Preparou-se a mistura dos reagentes: tampão acetato pH 3,6; cloreto férrico e do complexo de[Fe(III)-TPTZ], tripiridiltriazina férrica. Adicionou-se 250 µL dessa mistura de reagentes aos poços e a microplaca colocada no espectrofotômetro de UV (BioTek) por 10 minutos a 37°C. Em seguida foi feita a leitura de absorvância inicial a λ_{593} nm e depois adicionou-se 40 µL do extrato/branco/solução de FeSO₄ (padrão) aos poços e feita a leitura final. Determinou-se o equivalente de ferro por grama de extrato. As medidas foram feitas em triplicata.

4.16 Ensaios para avaliação da atividade leishmanicida

4.16.1 Ensaio *in vitro* com formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*

O ensaio foi realizado pela bióloga Daniela Nabak do LQPN seguindo o protocolo descrito por Callahan e colaboradores (1997) com algumas modificações conforme descrito no POP LQPN- 16. De forma resumida, as amostras de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram descongeladas e cultivadas em meio Schneider's pH 7,2 a 26°C por 7 dias. A cultura foi então centrifugada por 10 minutos a 1000 g, reconstituída em meio pH 6,0 e incubada a 32°C. Após 9 dias de cultivo nessas condições, cerca de 90% dos parasitas se encontravam na forma amastigota axênica.

Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se placas de 96 poços. Em cada poço-teste foram adicionados 90 µL de cultura na concentração de 1×10^8 parasitos/mL e 10 µL das soluções a 200 µg/mL das amostras a serem testadas. Como controle foram utilizados: a) branco: meio de cultura; b) controle negativo: meio de cultura + parasitos; c) controle de veículo: meio de cultura + parasitos + 10 µL DMSO; d) controle positivo: meio de cultura + Anfotericina B (0,2 µg/mL).

As placas foram incubadas por 72 horas a 32°C e após esse período 10 µL de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço. Após 4 horas de incubação foram adicionados 100 µL de

SDS (dodecilsulfato de sódio) 10% em isopropanol 50% e após 30 minutos à temperatura ambiente foi feita a medição da absorbância no λ_{570} nm em leitor de placas (SpectraMax M5 – Molecular Devices) . Os resultados foram expressos como porcentagem de morte em comparação com o controle de parasitas não tratados.

4.16.2 Ensaio *in vitro* com macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis*

Este ensaio foi realizado pela então doutoranda Marcele Neves Rocha de acordo com o procedimento descrito por Pinheiro e colaboradores (2011) com modificações.

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/C fêmeas de 6 semanas após estímulo de 72h com tioglicolato de sódio (3%) via intraperitoneal. A coleta foi realizada com injeção de 5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma) sem soro. O procedimento de obtenção de macrófagos murinos foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) segundo a licença L-004/08.

A suspensão celular foi recolhida, centrifugada (10 min, 150 g, 4°C) e o sedimento resuspenso em RPMI com 10% de soro fetal bovino. Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e sua viabilidade determinada por Azul de Trypan (1%).

Para o ensaio foram plaqueadas 2×10^5 células/mL em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm. As células foram incubadas em estufa (37°C, 5% CO₂) por aproximadamente 18 horas para adesão.

Formas promastigotas oriundas de cultura de *L. (L.) amazonensis* (2×10^6 células/mL) foram aplicadas sobre os macrófagos (10:1). Após 5 h de infecção foi feita a lavagem para retirada dos parasitos livres.

A concentração utilizada para cada uma das frações testadas foi de 50 µg/mL. Para avaliar as infecções, controles sem a adição de drogas foram utilizados (controle negativo). A anfotericina B (5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Após 72 h de exposição às amostras (37° C, 5% de CO₂), as lamínulas foram coletadas e coradas pelo método Panótico rápido (Laborclin) e posteriormente montada com Entellan[®] (Merck) sobre lâmina de vidro.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus CKX41) na objetiva 40x para determinação do percentual de inibição dos parasitos. Nessa análise foi observada a presença ou ausência de parasitos no citoplasma do

macrófago, bem como a quantidade dos mesmos. Além disso, foram observadas as características morfológicas das células.

O percentual de inibição foi calculado após a contagem, com a utilização de um contador de células, de 100 células que apresentavam morfologia íntegra. Os macrófagos que ainda permaneciam infectados após o contato com a amostra testada foram distinguidos dos não infectados, e assim foi feita a relação de porcentagem de cada lamínula.

Essa porcentagem de células infectadas obtida foi utilizada para calcular a porcentagem de inibição em relação ao controle negativo utilizando a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\% \text{ de células infectadas no teste}}{\% \text{ de células infectadas controle negativo}} \times 100$$

O valor da concentração inibitória de 50% da infecção dos macrófagos (CI_{50}) foi determinado utilizando o mesmo procedimento descrito acima variando-se a concentração das amostras. As concentrações testadas foram 50; 25; 12,5; 6,3 e 3,15 $\mu\text{g/mL}$.

4.16.3 Ensaio *in vitro* com células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*

O ensaio de atividade intracelular foi realizado pela então pós-doutoranda do Caryne Margotto Bertollo utilizando células THP-1 de forma semelhante ao experimento com macrófago murino. As células THP-1 (ATCC[®] TIB-202) foram semeadas em placas de 96 poços contendo lamínulas (2×10^5 células/poço) e colocadas em incubação por 72 h com 12-miristato-13-acetato de forbol (50 ng/mL) para diferenciação. Os macrófagos diferenciados foram incubados por 5 h (37°C , 5% CO_2) com 2×10^6 parasitos na forma promastigota (1:10). Após esse período o meio foi retirado e adicionado meio fresco sem e com amostras nas concentrações apropriadas. Após 72 h de incubação com as amostras (37°C , 5% CO_2), as lamínulas foram removidas, coradas com Giemsa e o número de amastigotas em 100 células determinado ((Ogunkolade et al., 1990; Gebre-Hiwot et al, 1992; Mehta et al, 2010; Siqueira-Neto et al, 2010).

4.16.4 Ensaio de toxicidade para macrófagos

Para o ensaio de toxicidade foi utilizado macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 (conforme descrito acima). Foram colocados 2×10^5 macrófagos por poço em placas de 96 poços. Adicionou-se a amostra (CH41-7, 1 mg/mL to 0,32

$\mu\text{g/mL}$) e controles e deixou-se em incubação por 72h a 37°C, 5% CO_2 . Depois desse período o meio foi removido e adicionado 200 μL de meio contendo 10% de AlamarBlue[®] a cada poço. Foi realizada nova incubação por 5 h e a absorvância medida em leitor de microplaca (SpectraMax M5, Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com as instruções do fabricante do software.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de *B. platypoda* foi selecionado para o fracionamento químico por ser capaz de eliminar *Leishmania (L) amazonensis* dentro de macrófagos murinos sem, contudo, causar danos a estes (Moreira et al., 2014). A planta foi recoletada e seu extrato etanólico (EX6458) foi testado no ensaio com formas amastigotas axênicas do parasito sendo capaz de inibir em 62% a proliferação destes. Uma pesquisa em bancos de dados (SciFinder, Napralert) demonstrou que não havia relato da atividade leishmanicida para esta espécie vegetal. Assim, decidiu-se pela sua investigação química.

5.1 Prospecção fitoquímica

Na prospecção fitoquímica do extrato foi detectada presença de cumarinas, flavonoides e terpenoides e não foi detectada a presença de alcaloides. De acordo com Verdi e colaboradores (2005) os metabólitos que mais se destacam na família Asteraceae são os flavonoides. Grecco e colaboradores (2012) destacam também a presença de terpenoides e outros fenólicos com atividade antiparasitária no gênero *Baccharis*, o maior gênero da família Asteraceae.

5.2 Fracionamento EX6458 por HSCCC

A cromatografia em contracorrente (CCC) começou sua história moderna com Ito em 1966 e se refere ao processo cromatográfico que não utiliza um suporte sólido como fase estacionária e sim um sistema de partição líquido/líquido como fases estacionária e móvel, usando a força centrífuga ou gravitacional para arraste das substâncias, que migram diferencialmente devido às diferenças de coeficiente de partição. Durante as últimas décadas a cromatografia de contracorrente em alta velocidade (HSCCC em inglês) tem sido aplicada em separações analíticas e preparativas de uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (Yanagida et al., 2007).

O equipamento de HSCCC (FIGURA 24) tradicional que usa três bobinas de tubos PTFE com movimento planetário do tipo J (as bobinas se movem ao redor do eixo central da centrífuga – translação e, simultaneamente, se movem ao redor de seu próprio eixo em uma dada velocidade angular constante – rotação) é aplicado à separação desde compostos hidrofóbicos até substâncias hidrofílicas, exceto substâncias de elevada polaridade como proteínas e polissacarídeos. O HSCCC

apresenta elevada eficiência de partição e retenção maior com o uso de sistemas bifásicos de baixa e média polaridade (Weisz & Ito, 2011).

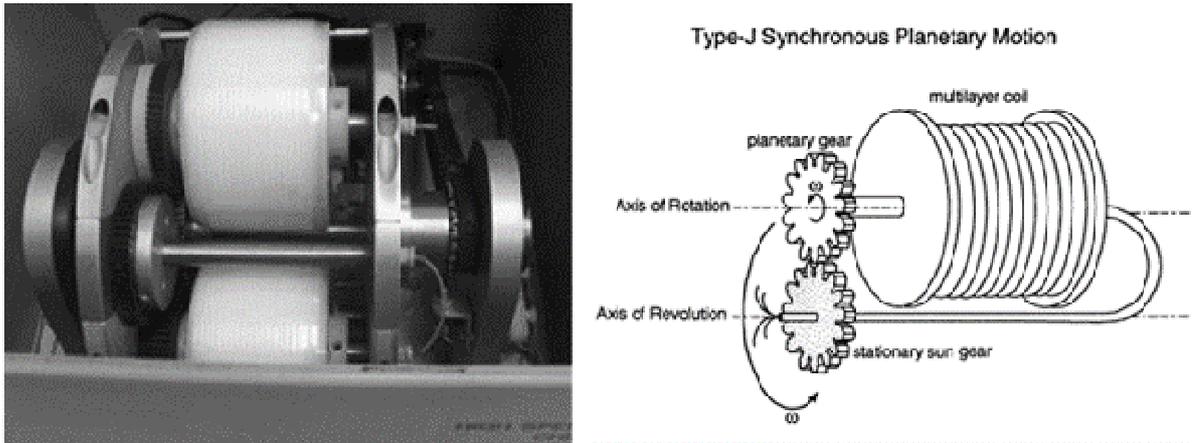


FIGURA 24 – Fotografia da parte interna de um HSCCC modelo tradicional (esquerda) e esquema dos movimentos de translação e rotação (direita). Fonte: Ito, 2005 e Yanagida et al., 2007.

O fracionamento inicial do extrato EX6458 foi realizado utilizando-se HSCCC. Entre as vantagens dessa técnica estão: 1) a capacidade de injeção de grandes quantidades de amostra complexas como extratos brutos de plantas; 2) a menor perda de material de partida, pois não há interações irreversíveis dos analitos na fase estacionária; 3) recuperação total dos analitos pela extrusão da fase estacionária do sistema de colunas (Chen & Sutherland, 2006).

A seleção do sistema bifásico de solventes para a HSCCC é tão importante para a separação das substâncias, quanto à escolha da coluna e eluente na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), correspondendo a 90% do trabalho do HSCCC. O critério mais importante é a definição da polaridade da amostra e a escolha de um sistema no qual ela seja completamente solúvel e estável. Além disso, o sistema deve apresentar separação de fases de forma equitativa levar à boa partição dos componentes da mistura pelas duas fases e boa retenção destes pela fase escolhida como fase estacionária (Foucault & Chevolot, 1998; Ito, 2005).

A avaliação da razão de distribuição das amostras pelas duas fases pode ser determinada qualitativamente pelo perfil cromatográfico das duas fases em cromatografia de camada delgada (CCD). Desta forma, quando o perfil das duas fases é semelhante (número de bandas e fator de retenção), pode-se selecionar a mistura para utilização. Outros critérios importantes para serem verificados é o tempo necessário para a separação das fases (não pode ser observada emulsão) e a solubilidade da amostra na mistura (Ito, 2005).

Foram testadas 14 combinações de solventes para escolha do sistema para fracionamento de EX6458, que estão listadas abaixo.

- acetato de etila: butanol: água (4:2:4)
- acetato de etila: butanol: água (5:2,5:2,5)
- acetato de etila: metanol: acetona: água (5:1:0,5:5)
- acetato de etila: metanol: água (5:1,5:5)
- clorofórmio: acetato de etila: metanol: água (1,5:5:1,5:5)
- clorofórmio: butanol: Metanol: água (10:1:10:6)
- clorofórmio: metanol: água (4:3:2)
- clorofórmio: metanol: água (3,3:4:2,7)
- clorofórmio: metanol: butanol: água (7:6:3:4)
- hexano: acetato de etila: metanol: água (2:3:3,5:1,5)
- hexano: clorofórmio: metanol: água (1:5:5:2)
- hexano: Clorofórmio: metanol: água (2:5:5:2)
- hexano: clorofórmio: metanol: água (3:5:5:2)
- hexano: acetato de etila: metanol: água (1:1:1:1)
- hexano: acetato de etila: metanol: água (2:3:2,5:2,5)
- hexano: acetato de etila: metanol: água (1,5:3,5:2,5:2,5)

O sistema bifásico que melhor atendeu às exigências descritas acima foi a mistura hexano: acetato de etila: metanol: água na proporção 2:3:2,5:2,5. Depois de preparada a mistura e separada as fases, a coluna foi preenchida com a fase superior (menos polar), que foi obtida em menor quantidade, de forma que foi feita a separação nos moldes da fase reversa, as substâncias mais polares saindo no início do fracionamento e as menos polares na extrusão das colunas.

Foram obtidas 241 frações no fracionamento, que depois de comparadas por CCD foram agrupadas em 21 frações denominadas CH20. A FIGURA 25 mostra fotografias das placas de CCD das frações finais.

Dos 1,8 g que foram efetivamente submetidos ao fracionamento em HSCCC foi recuperado 1,5 g (83%), sendo os 17% perdidos atribuídos ao gotejamento fora do tubo de ensaio durante a coleta automatizada e à perda de amostra durante a lavagem dos frascos no agrupamento das frações.

Alíquotas das frações foram encaminhadas para realização dos ensaios com formas amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* para biomonitoramento (TABELA 4).

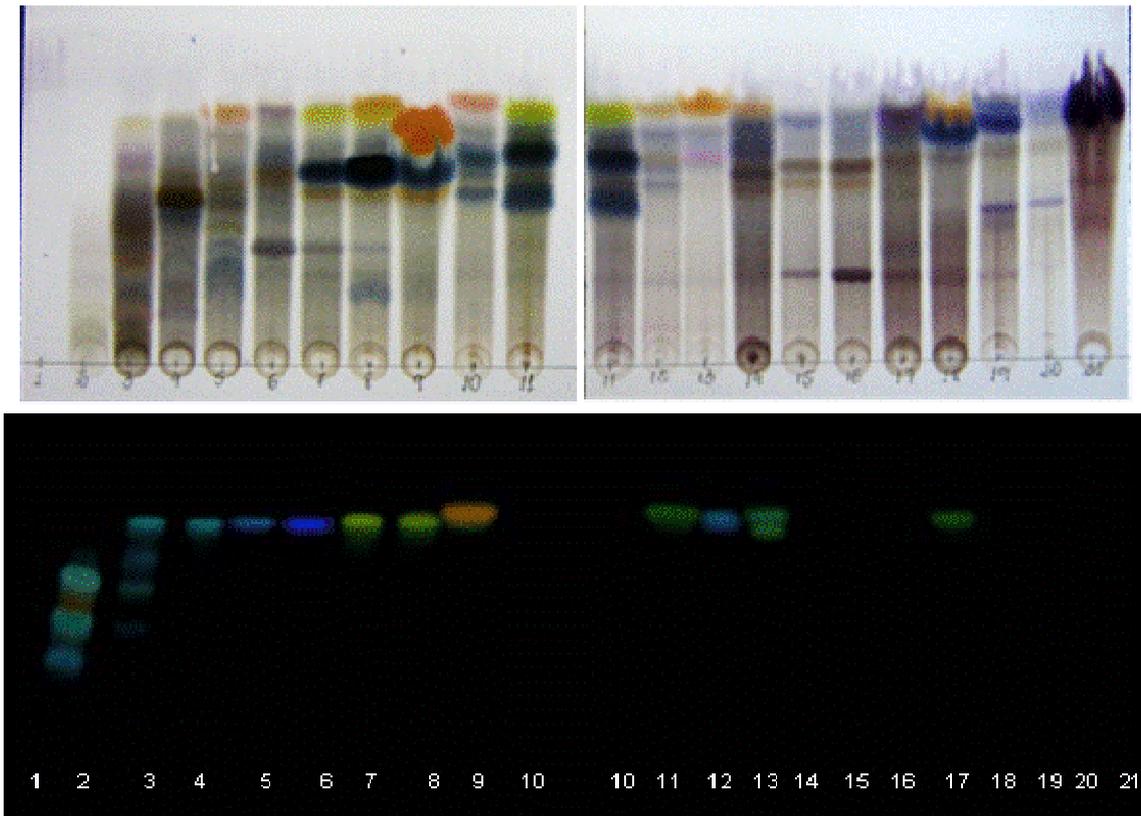


FIGURA 25 – Fotografias das placas de CCD mostrando as frações CH20 reveladas com vanilina/H₂SO₄ (acima) e NP/PEG sob luz UV em λ_{366} nm (abaixo). Com o revelador NP/PEG as frações 1, 10, 14-16 e 18-21 não apresentaram fluorescência.

5.3 Atividade leishamanicida das frações CH20

As formas amastigotas do parasito são as formas presentes no mamífero hospedeiro e as responsáveis pela manutenção da infecção. Por essa razão a atividade anti-amastigota foi avaliada para o extrato e frações obtidas por HSCCC.

As formas amastigotas axênicas mimetizam as formas descritas anteriormente com a vantagem de no ensaio a leitura do resultado não depender de observação e contagem de parasitos em dezenas de campos ao microscópio. A leitura do resultado é feita de forma automatizada sendo por isso operacionalmente mais fácil de ser utilizado na triagem inicial de um grande número de amostras, além de testar uma forma mais próxima presente no hospedeiro vertebrado do que aqueles ensaios que utilizam as formas promastigotas do parasita, ou seja, as formas encontradas nos vetores. Entretanto, a similaridade com a forma amastigota intracelular é questionável e modelos empregando macrófagos infectados é de grande importância no processo de obtenção de novos *hits*, ou seja, na obtenção de

alvos para novas e mais aprofundadas investigações de mecanismo de ação e comprovação de atividade (Sereno et al., 2007; Freitas-Junior et al., 2012).

A espécie *L. (L.) amazonensis* é agente etiológico da leishmaniose cutânea e da leishmaniose cutânea difusa, sendo frequentemente associado à resistência contra os medicamentos convencionais. Essa espécie é muito adequada para testes *in vitro* e *in vivo* devido a fácil manutenção da cepa em laboratório e por ser um modelo efetivo em camundongos, por isso, tem sido utilizada com frequência em estudos de determinação de atividade leishmanicida de produtos derivados de plantas (Pinheiro et al., 2011).

No ensaio com formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*, além do extrato bruto EX6458, seis frações (CH20-11 a CH20-16) tiveram atividade igual ou superior à Anfotericina B, a qual apresentou 86% de morte dos parasitos. Essas frações foram obtidas no HSCCC após bombeamento de mais de 850 mL de fase móvel, ou seja, após um volume de coluna, indicando uma interação maior com a fase estacionária menos polar que foi utilizada. As frações iniciais, mais polares, também tiveram atividade leishmanicida, embora menor que o controle. Já as frações finais, menos polares e que ficaram retidas na coluna, foram inativas. Desta forma, pode-se concluir que a substâncias ativas são de média polaridade e, provavelmente, não são glicosiladas.

As frações CH20 também foram avaliadas no ensaio com macrófagos murinos infectados. A triagem de substâncias em formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. tem sido usada como modelo clássico por muitos anos. Apesar de esse método ser laborioso e não permitir automatização, a contagem direta dos parasitos permite a determinação do percentual de células infectadas e o número de parasitos por célula (Pinheiro et al., 2011).

Das 21 frações CH20, onze tiveram redução da infecção maior que 80% e destas, apenas cinco não apresentaram lise dos macrófagos (ou apresentaram pequena alteração morfológica). Esse resultado caracterizou uma pequena toxicidade dessas cinco frações, para as quais a concentração de redução da infecção em 50% (CI₅₀) foi determinada (TABELA 5). Foi possível perceber, também, que as frações menos polares provocaram elevada lise de macrófagos, indicando elevada toxicidade.

TABELA 4 – Atividade leishmanicida das frações CH20 obtidas por HSCCC.

Amostra	Massa (mg)	% Atividade leishmanicida em <i>L. (L.) amazonensis</i>	
		Modelo axênico ¹ (20 µg/mL)	Modelo intracelular ² (50 µg/mL)
CH20-1	1,94	64	18,5*
CH20-2	496,57	50	4,5
CH20-3	61,10	63	7,0
CH20-4	23,01	62	9,0
CH20-5	15,68	62	8,0
CH20-6	12,66	59	7,5
CH20-7	11,26	46	54,0
CH20-8	14,93	46	100,0
CH20-9	46,64	77	18,0
CH20-10	6,54	74	10,0*
CH20-11	20,54	94	100
CH20-12	4,73	89	42,0*
CH20-13	31,04	91	87,0
CH20-14	16,47	85	ND
CH20-15	5,62	94	ND
CH20-16	9,89	91	ND
CH20-17	23,58	62	ND
CH20-18	27,36	63	100,0
CH20-19	43,13	15	ND
CH20-20	13,92	18	ND
CH20-21	553,51	5	ND
EX6458	-	86	13
Anfotericina B	-	86**	99**

¹percentual de morte; ²percentual de redução da infecção; * amostras testadas na concentração de 20 µg/mL; **0,2 e 5 µg/mL no ensaio axênico e intracelular, respectivamente; ND amostras tóxicas para os macrófagos.

TABELA 5- Valor de percentual de redução de 50% da infecção (CI_{50}) para as frações CH20 que foram ativas na triagem intracelular e que não apresentaram alteração morfológica dos macrófagos murinos.

Amostra*	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
CH20-7	23,80
CH20-8	16,30
CH20-11	26,17
CH20-13	26,61
CH20-18	17,31
Anfotericina B**	<0,03

*20 $\mu\text{g/mL}$; ** 5 $\mu\text{g/mL}$; Valores de CI_{50} obtidos pelo programa Microcal Origin[®] 5.0

Apenas as frações CH20-11 e CH20-13 foram ativas nos dois ensaios (atividade superior a 80%) e não apresentaram toxicidade para os macrófagos, indicando que essas substâncias são capazes de atravessar a membrana biológica para agir no parasita. As divergências entre os resultados se deve à diferença entre os modelos. O ensaio com amastigotas axênicas é um bom direcionador do processo de fracionamento, visando o isolamento de substâncias leishmanicidas. Entretanto, as substâncias isoladas por esse modelo podem não atravessar a membrana celular e, conseqüentemente não agir no parasito, ou podem ser degradadas pelas condições intracelulares, inativando-se. Dessa forma, a atividade deixa de ser detectada em modelos mais semelhantes ao real. Por outro lado, algumas substâncias podem ser ativadas de alguma forma pelas condições do meio onde o parasito se encontra, mostrando-se mais ativas no modelo intracelular.

Foram, portanto, selecionadas para refração as frações CH20-7, CH20-8, CH20-11, CH20-13 e CH20-18. A fração CH20-7, embora tenha apresentado uma atividade moderada no ensaio com amastigota intracelular, foi selecionada para refração devido à diminuição da parasitemia por macrófago, além de não causar alterações morfológicas nessas células.

5.4 Refracionamento das frações CH20 leishmanicidas e não tóxicas para macrófagos murinos.

As frações CH20 ativas foram analisadas por HPLC em fase reversa para determinação do perfil cromatográfico.

Depois de otimizado o sistema de eluição, foi realizado o fracionamento de CH20-7 em cromatógrafo analítico devido à pequena quantidade de amostra obtida depois do preparo das soluções para ensaio biológico. Foram realizadas duas injeções de 3 mg, mas o perfil obtido com a amostra concentrada foi diferente do perfil na determinação do método de eluição e, além disso, cerca de 50% da amostra ficou retida na coluna. As frações obtidas nesse refracionamento tiveram massa insuficiente para realização de ensaio biológico, de forma que maior massa da fração CH20-7 deverá ser obtida para isolamento das substâncias presentes e identificação daquelas que são ativas.

A fração CH20-8 foi refracionada em HPLC semi-preparativa (FIGURA 26), resultando em nove frações, denominadas CH41 que foram avaliadas biologicamente (TABELA 6).

TABELA 6 – Atividade leishmanicida das frações CH41 no ensaio com *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota intracelular.

Amostra	Massa (mg)	% Redução da infecção (50 µg/mL)	
		Experimento 1	Experimento 2
CH41-1	1,30	-4,17	5,26
CH41-2	1,73	10,42	16,67
CH41-3	3,24	20,83	6,14
CH41-4	3,64	13,89	12,28
CH41-5	1,13	23,61	33,33
CH41-6	4,77	1,39	21,05
CH41-7	3,29	75,00	69,30
CH41-8	3,05	70,14	60,53
CH41-9	9,15	19,44	20,18
Anfotericina B*	-	100,00	100,00

* 5 µg/mL

As frações CH41-7 e CH41-8 apresentaram atividade leishmanicida. A visualização de um único pico na CLAE e uma mancha em CCD indicaram que a

fração CH41-7 estava pura. Os dados espectrais da substância foram obtidos e será discutido a seguir na seção 5.4.

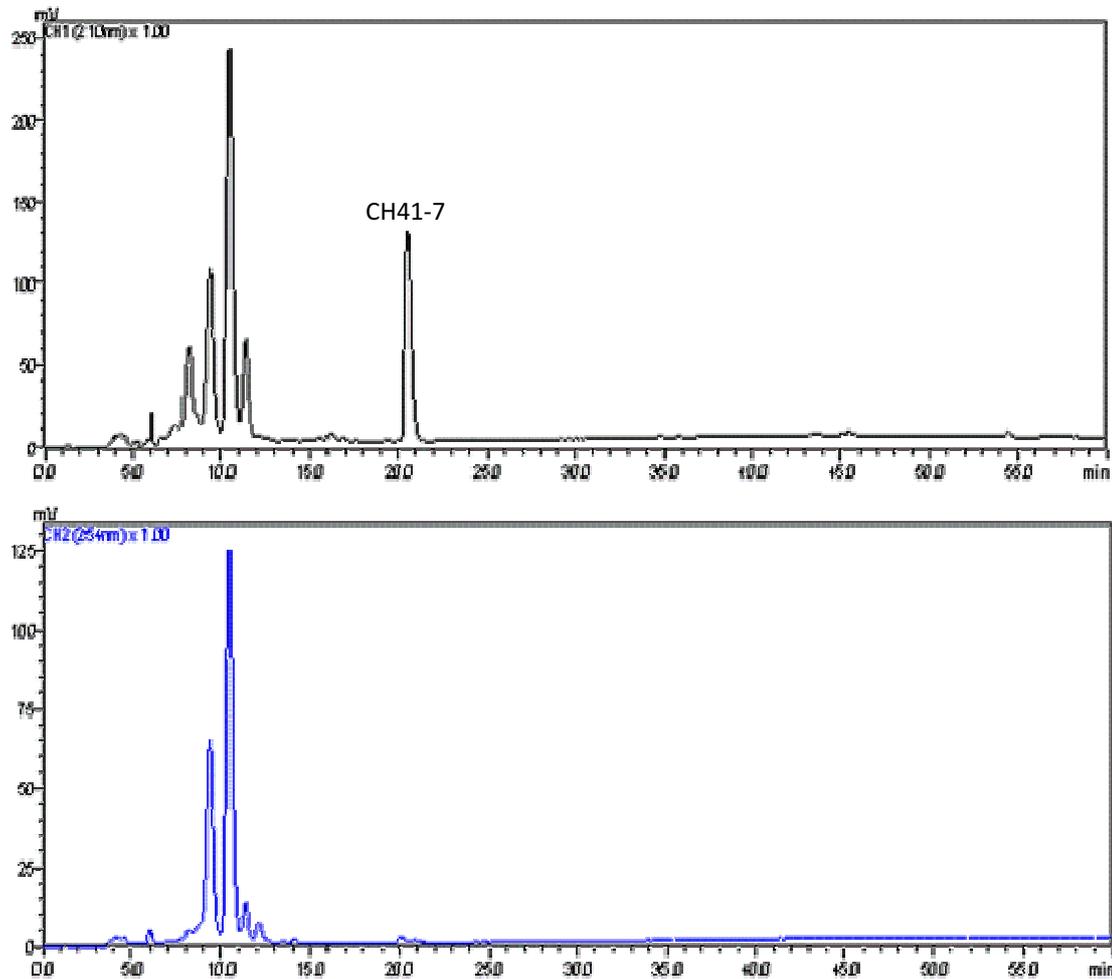


FIGURA 26 - Cromatograma do fracionamento em CLAE de CH20-08. Condições de análise: 10-100% MeOH/ H₂O com 0,1% ácido fórmico de 0-40 min + 100% MeOH com 0,1% ácido fórmico de 40-60 min.

A fração CH20-11 também foi refractionada em HPLC semi-preparativa, resultando em dezesseis frações, denominadas CH111, que foram enviadas para ensaio com formas amastigotas axênicas. Na solubilização da amostra em ACN/H₂O (9:1) ocorreu a formação de um precipitado marrom que também foi enviado para ensaio biológico. A massa das frações obtidas não foi suficiente para obtenção de dados espectrais de RMN e, após avaliação de qual fração é ativa, será obtido o espectro de massas para tentativa de desreplicação e posterior obtenção de maior quantidade da substância caso seja uma substância nova.

As frações CH20-13 e 18 ainda não foram refractionadas.

5.5 Elucidação estrutural de CH41-7 e avaliação de sua atividade leishmanicida

Os dados de espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador de tempo de voo (ESI-TOF-MS) foram obtidos para a substância isolada em HPLC preparativo e denominada CH41-7. Esse equipamento tem sensibilidade elevada, permitindo a determinação da massa exata da substância. No modo negativo (FIGURA 27) foi observado o ânion $[M+HCO_2]^-$ no m/z 367.2490, com 100% de intensidade (massa calculada pelo Software de 367.2485; 100%), fornecendo a distribuição isotópica de ^{13}C e ^{14}C de 23 e 2%, respectivamente, conforme previsão calculada pelo software. No modo positivo (FIGURA 28) foi observado o cátion $[M+Na]^+$ no m/z 345.2391, com 100% de intensidade (calculado 345.2406; 100%) e distribuição isotópica ^{13}C e ^{14}C de 21 e 3%, respectivamente, valor próximo ao previsto pelo software. A análise desses dados permitiu a proposta da fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_3$ para a substância isolada (massa molar de 322.2508 g/mol). A análise da composição atômica permitiu deduzir que a soma das insaturações (φ) causadas pela presença de duplas ligações e anéis era de quatro. Além disso, no espectro de massas no modo positivo foi observado a perda de uma molécula de H_2O , observando-se o cátion $[M-H_2O+H]^+$ no m/z 305.2474. Foi feita a seleção desse íon e o bombardeamento com hélio (CID 15 eV) e observou-se a perda de mais duas moléculas de água (m/z 287.2367 e m/z 269.2262). Desta forma, conclui-se que deveria se tratar de um diterpeno trihidroxilado.

A análise dos dados de RMN de ^{13}C e do sub-espectro DEPT confirmou a presença de 20 átomos de carbonos: quatro metilas; sete metilenos – dois deles hidroxilados (C-15 em δ 57.6 e C-17 em δ 61.4); cinco metinos – sendo dois olefínicos (C-3 em δ 120.9 e C-14 em δ 124.8) e um hidroxilado (C-6 em δ 73.8); e quatro carbonos quartenários – sendo dois olefínicos (C-4 em δ 144.5 e C-13 em 136.4). Esses dados mostraram que duas duplas ligações estavam presentes em CH41-7. Como o grau de insaturação (φ) determinado pela fórmula molecular era 4, foi possível deduzir que o diterpeno era formado por dois anéis.

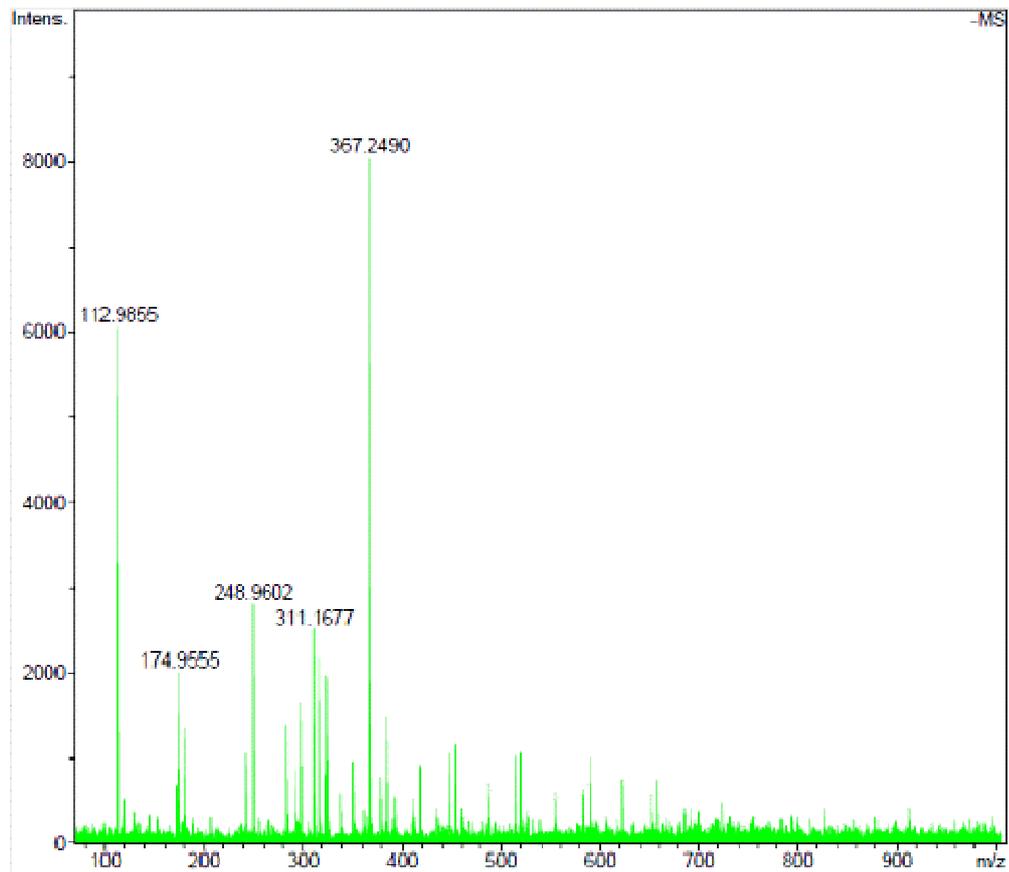


FIGURA 27 - Espectro de massas de CH41-7 obtido por ESI-TOF com infusão direta no modo negativo e 7.0 eV de energia de colisão.

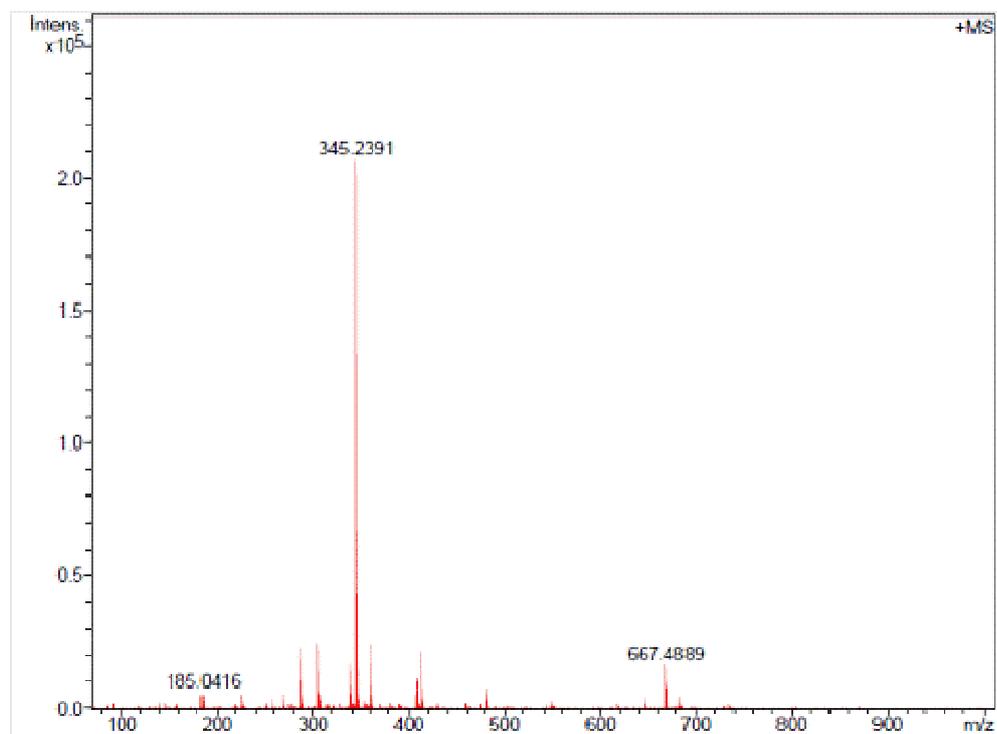


FIGURA 28 - Espectro de massas de CH41-7 obtido por ESI-TOF com infusão direta no modo positivo e 7.0 eV de energia de colisão.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C em δ 120.9 e 144.5 são típicos de duplas ligações endocíclicas de diterpenos do tipo clerodano, os quais foram assinalados como C-3 e C-4 (Martinez et al., 2005). A presença de ressonância na faixa de 15-20 ppm para o carbono da metila C-19 é tipicamente observada em clerodanos com fusão *trans* dos anéis (Cifuentes et al., 2002). Esses dados estão de acordo com o esqueleto de diterpenos do tipo clerodano (FIGURA 29) descritos por Lu e colaboradores (1993) e Nagashima e colaboradores (2000).

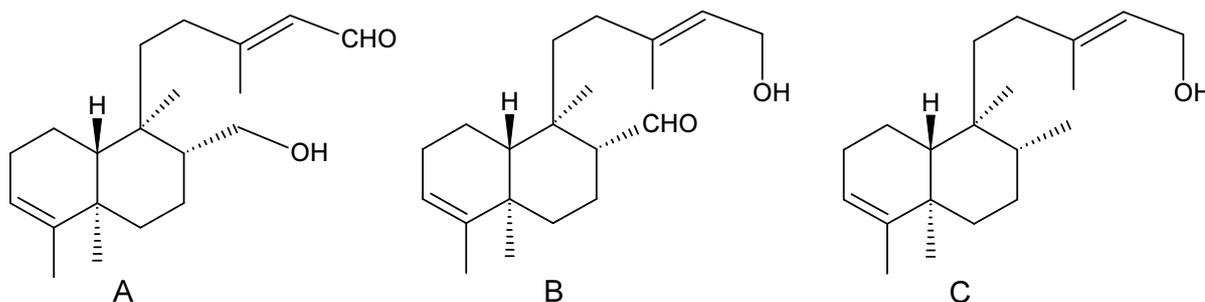


FIGURA 29 – Esqueleto de clerodanos semelhantes a CH41-7 (A e B descritos por Nagashima et al., 2000; C descrito por Lu et al., 1993).

O espectro de RMN de ^1H mostrou a ressonância de quatro metilas (simpletos) em δ 1.57 (H-16), 1.76 (H-18), 0.93 (H-19) e 0.66 (H-20); e dois sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5.10 (H-3) e 5.24 (H-4). No mapa de contornos COSY os hidrogênios metilênicos do álcool secundário (H-15) aparecem como um duplete em δ 3.91 acoplado ao próton olefínico em δ 5.24 (H-14). Esses dados, juntamente com a ressonância em δ 1.57 para a metila (H-16), são compatíveis com o sistema $-\text{C}(\text{Me})=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ como cadeia lateral ligada ao C-9 do anel clerodânico (Hassan et al., 1982; Jakupovic et al., 1990; Yang et al., 2004).

As correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, bem como os dados de RMN de ^{13}C e ^1H estão listados na TABELA 7. Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para H-15 e H-16 estão em concordância com os valores relatados para diterpenos clerodanos isolados de espécies do gênero *Baccharis* (Jakupovic et al., 1990; Martinez et al., 2005). Além disso, o deslocamento químico de H-16 (δ 1.57) indica configuração *E* para a ligação dupla formada entre C-13 e C-14 (Yang et al., 2004).

A estereoquímica relativa de CH41-7 foi deduzida pela análise do espectro de NOESY (FIGURA 31). As correlações observadas entre H-10/H-1 e H-10/H-8 são consistentes com dois anéis de seis carbonos fundidos em configuração *trans*,

conforme é observado na conformação cadeira torcida e cadeira de diterpenos tipo clerodano descritos na literatura (Lu et al., 1993).

A partir da análise desses resultados e de busca bibliográfica foi possível propor uma nova estrutura química para o clerodano isolado, cujo nome IUPAC é (1R,3R,4R,8aR)-3-(hidroximetil)-4-[(3E)-5-hidroxi-3-metilpent-3-en-1-il]-4,8,8a-trimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftalen-1-ol, e que foi denominado platypodiol (FIGURA 30). Esse diterpeno difere de outros clerodanos similares pela presença de três grupos hidroxila, os quais estão ligados em C-6, C-15 e C-17 (Moreira et al., 2014).

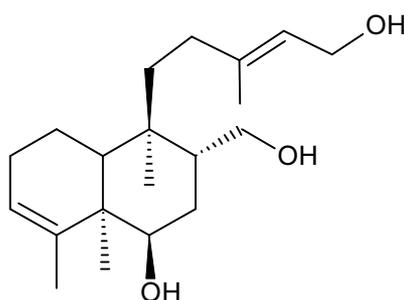


FIGURA 30 – Estrutura química do clerodano isolado – platypodiol.

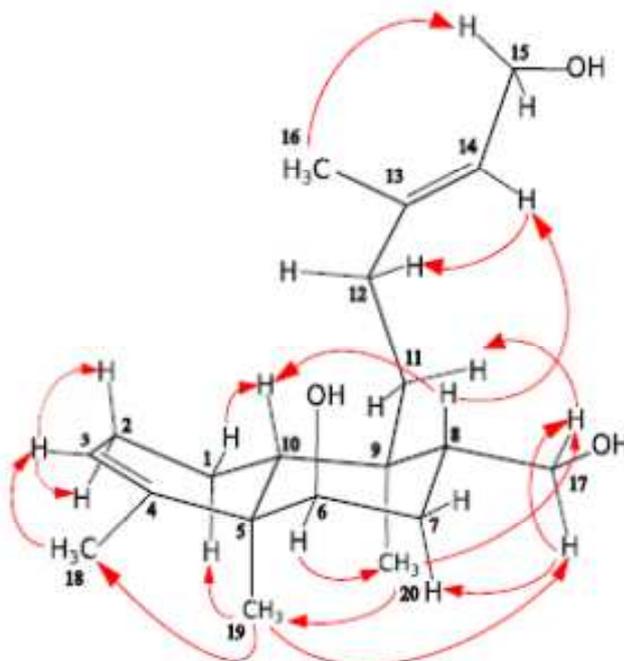
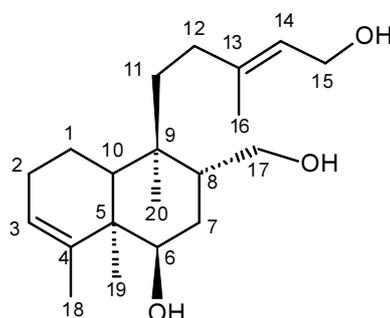


FIGURA 31 – Correlações observadas no NOESY para o platypodiol (Moreira et al., 2014).

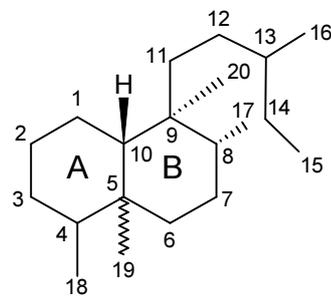
TABELA 7 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C NMR da substância CH41-7 em DMSO- d_6 (500 MHz para RMN de ^1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C , δ in ppm, J in Hz).



Posição	δC , tipo	δH	HMBC	COSY
1	16.9, CH_2	A:1.44 (<i>m</i> , 1H) B:1.49 (<i>m</i> , 1H)		H-2B H-2A
2	26.2, CH_2	B:1.92 (<i>m</i> , 1H) A:1.97 (<i>m</i> , 1H)		H-3
3	120.9, CH	5.10 (<i>br. s</i> , 1H)	H-18	H-2, H-18
4	144.5, C		H-18, H-19	
5	43.3, C		H-18, H-19	
6	73.8, CH	3.27 (<i>m</i> , 1H)	H-19	H-7A
7	36.3, CH_2	A:1.34 (<i>m</i> , 1H) B:1.43 (<i>m</i> , 1H)	H-20	H-6
8	42.1, CH	1.52 (<i>m</i> , 1H)	H-20	
9	37.1, C		H-10,	
10	45.3, CH	1.24 (<i>br. s</i> , 1H)	H-19, H-20	H-1A
11	32.4, CH_2	A:1.28 (<i>d</i> , $J = 12.5$, 1H) B: 1.85 (<i>m</i> , 1H)		H-12A
12	32.0, CH_2	B: 1.67 (<i>td</i> , $J = 12.5$ e 5.0 , 1H) A: 1.89 (<i>m</i> , 1H)	H-16	H-11A
13	136.4, C		H15, H-16	
14	124.8, CH	5.24 (<i>dd</i> , $J = 6.5$, 1H)	H-15, H-16	H-15
15	57.6, CH_2	3.91 (<i>d</i> , $J = 6.5$, 2H)		H-14
16	16.2, CH_3	1.57 (<i>s</i> , 3H)		H-14
17	61.4, CH_2	A: 3.03 (<i>dd</i> , $J = 9.8$ e 9.5 , 1H) B: 3.57 (<i>dd</i> , $J = 9.8$ e 3.5 , 1H)		H-8 H-8, H-17B
18	22.5, CH_3	1.76 (<i>br. s</i> , 3H)		H-3
19	15.2, CH_3	0.93 (<i>s</i> , 3H)	H-10	
20	18.7, CH_3	0.66 (<i>s</i> , 3H)		

Diterpenos são uma classe de terpenos muito comuns em espécies de Asteraceae que apresentam uma grande variedade estrutural e de atividades biológicas. No gênero *Baccharis* são, juntamente com os flavonoides, comumente encontrados, especialmente os dos tipos clerodano, labdano e kaurano. Esses diterpenos são considerados por alguns autores possíveis marcadores químicos de espécies desse gênero botânico (Jakupovic et al., 1990; Cifuentes et al., 2002; Lu et al., 2003; Vasconcelos Ribeiro et al., 2013).

Diterpenos do tipo clerodano são uma classe de substâncias bicíclicas com o esqueleto básico mostrado na FIGURA 32, o qual é formado biogeneticamente pelo rearranjo do esqueleto do cátion labdanodienila produzido pela ciclização do geranylgeranyl-pirofosfato (FIGURA 33) (Tokoroyama et al., 1988; Akhila et al., 1991).



A/B pode ser *cis* ou *trans*

FIGURA 32 – Esqueleto básico de um clerodano.

O platypodiol havia sido testado no ensaio com amastigotas intracelulares usando macrófagos murinos e mostrado média de 72% de redução da infecção na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida foi verificada a toxicidade dessa substância para os macrófagos e determinada a IC_{50} para a atividade leishmanicida relatada.

A determinação da CI_{50} foi feita utilizando a linhagem celular humana THP-1, que é uma linhagem derivada de células de leucemia monolítica que pode se diferenciar em células de fenótipo característico de macrófagos maduros (Tsuchiya et al., 1982). Estudos vem demonstrando que células THP-1 podem ser utilizadas como modelo para ensaios de triagem *in vitro* em busca de substâncias leishmanicidas em substituição ao uso de macrófagos peritoneais (Ogunkolade et al., 1990; Gebre-Hiwot et al., 1992; Mehta et al., 2010; Siqueira-Neto et al., 2012).

O diterpeno mostrou uma moderada atividade leishmanicida para amastigotas intracelulares na concentração de 0,62 mM (75% de redução da infecção) e não apresentou toxicidade aparente para a linhagem de células humanas (THP-1) na

concentração de 3,1 mM, não sendo possível determinar a CI_{50} devido à falta de solubilidade da amostra nas condições de teste e quantidade de amostra disponível.

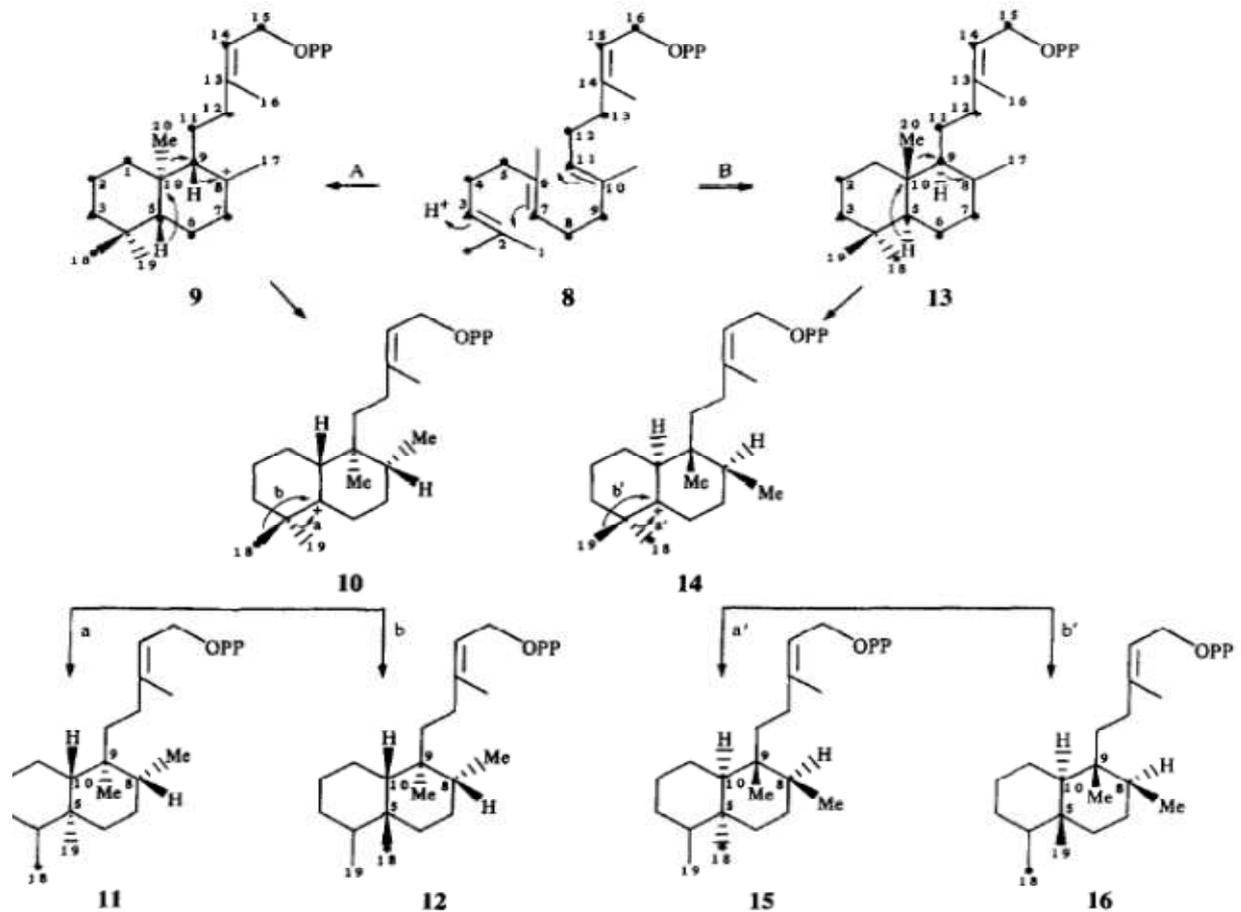


FIGURA 33 – Biossíntese de clerodanos a partir do cátion de geranylgeranyl pirofosfato (8) e diferenciação de configuração da junção dos anéis (fonte: Akhila et al., 1991).

5.6 Fracionamento de EX6458 por cromatografia líquida de média pressão (CLMP)

Com a finalidade de se obter maior massa das frações ativas e, conseqüentemente, maior massa das substâncias ativas, foi realizado o fracionamento de EX6458 em CLMP, o que permitirá uma investigação mais detalhada da atividade exercida por essas substâncias.

Foram obtidas 903 frações no fracionamento, que depois de analisadas por CCD foram agrupadas em 34 frações denominadas CH56. O total de massa recuperado foi de 4,0 g (67%), ou seja, houve grande perda de material de partida por adsorção na coluna e transferência de matéria no agrupamento. Alíquotas dessas frações foram enviadas para realização de ensaio com formas amastigotas axênicas e o resultado do ensaio encontra-se disponível na TABELA 8.

TABELA 8 – Atividade leishmanicida para *L. (L.) amazonensis* no modelo axênico

Amostra	Massa (mg)	% Atividade (20 µg/mL)
CH56-1	531,1	77
CH56-2	86,2	53
CH56-3	14,1	43
CH56-4	22,1	81
CH56-5	58,3	35
CH56-6	35,8	80
CH56-7	689,1	74
CH56-8	62,0	80
CH56-9	93,2	60
CH56-10	44,4	74
CH56-11	104,6	44
CH56-12	63,8	70
CH56-13	31,7	61
CH56-14	51,5	42
CH56-15	83,3	75
CH56-16	19,8	72
CH56-17	59,5	36
CH56-18	14,0	73
CH56-19	90,6	61
CH56-20	82,7	62
CH56-21	46,0	61
CH56-22	59,8	75
CH56-23	135,8	62
CH56-24	149,9	32
CH56-25	407,5	56
CH56-26	194,1	19
CH56-27	36,7	53
CH56-28	31,7	37
CH56-29	165,6	47
CH56-30	128,6	51
CH56-31	21,8	15
CH56-32	60,8	28
CH56-33	62,8	68
CH56-34	181,1	24
EX6458	-	80
Anfotericina B*	-	81

*0,2 µg/mL

A partir da análise desses dados, verificou-se que das 34 frações, três apresentaram atividade igual ou superior a 80% (CH56-4, 6 e 8). Essas frações

serão comparadas com as alíquotas de CH₂₀ ativas e refractionadas por HPLC em escala semi-preparativa para isolamento das substâncias ativas. Previamente serão analisadas por HPLC-ESI-TOF-MS para análise dos dados e tentativa de caracterização dos constituintes ainda na mistura do extrato. Outras oito frações apresentaram atividade superior ou igual a 70% e também serão refractionadas para isolamento dos produtos naturais bioativos.

5.7 Caracterização de compostos fenólicos de EX6458 por HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada à detecção por espectrometria de massas é uma das técnicas analíticas mais importantes usada na análise de compostos fenólicos. A ionização por eletrospray (ESI) é uma técnica que permite a formação de íons em meio líquido a pressão atmosférica (API) e a transferência destes para o meio gasoso. Sua utilização como interface desse acoplamento é uma ferramenta poderosa devido à aplicabilidade em uma ampla faixa de polaridade de amostra. Além disso, espectrômetros híbridos com analisadores por quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF) fornecem exatidão na determinação das massas dos íons e medidas do padrão isotópico. O quadrupolo opera como guia dos íons e permite a seleção do íon desejado funcionando como uma câmara para posterior fragmentação no modo MS/MS, enquanto o TOF analisa com alta resolução os íons formados, fatores importantes na determinação da fórmula molecular das substâncias (Verardo et al., 2010; Gu et al., 2012).

Um método de HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS de elevada sensibilidade foi desenvolvido para a caracterização dos compostos fenólicos presentes no extrato etanólico de *B. platypoda*. A FIGURA 34 mostra o cromatograma de EX6458 obtido com detecção do pico base no modo negativo pelo espectrômetro de massas. A detecção no modo negativo fornece elevada sensibilidade e resulta em menor fragmentação em comparação ao modo positivo, facilitando a determinação da massa molecular da substância, principalmente se estiver em pequena quantidade na amostra (Abad-Garcia et al., 2012).

Os elementos químicos usados na análise da fórmula molecular foram C, H, N, O, já que são os principais elementos encontrados nos produtos naturais. Além disso, o elevado grau de separação e exatidão na medida das massas dos íons produzidos pelo analisador Q-TOF e o perfil de fragmentação obtido com a colisão são fatores essenciais no processo de caracterização das substâncias (Konishi et

al., 2007). A partir dos dados gerados foi possível obter a fórmula molecular das substâncias, bem como fragmentos das mesmas, dados que foram utilizados no processo de caracterização após comparação com perfis de substâncias descritas em banco de dados de massas (MassBank, MetFrag, METLIN) e nas informações da literatura.

A busca bibliográfica por uma dada massa molecular resulta em uma lista de fórmulas moleculares com massas que se aproximam da massa medida (desvio). Deve-se ter cuidado para que não seja escolhida da listagem uma fórmula molecular que seja de um falso-positivo. Esse equívoco é minimizado utilizando-se os dados de fragmentação (MS/MS), o qual fornece dados estruturais (*fingerprint*) muito importantes no processo de caracterização dos produtos naturais. Outro fator a ser ressaltado é que esse *fingerprint* obtido por LC-MS/MS é dependente do tipo de espectrômetro, do modo de ionização, energia de colisão, etc. Além disso, informações botânicas são muito úteis na classificação das substâncias e na redução dos equívocos (Konishi et al., 2007).

Os dados obtidos na análise no modo negativo e a caracterização dos picos cromatográficos estão descritos na TABELA 9. A partir desses dados foi possível verificar que os flavonoides são a classe majoritária de fenólicos no extrato de *B. platypoda*, o que está de acordo com o descrito na literatura (Aboy et al., 2012; Grecco et al., 2010b). Os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e benzoico também são fenólicos encontrados em abundância (Jaiswal et al., 2011a). Os pequenos valores de mSigma (análise isotópica) obtidos para a maioria dos compostos, bem como os pequenos desvios de exatidão de massas (ppm), mostram a adequação do método à sua finalidade.

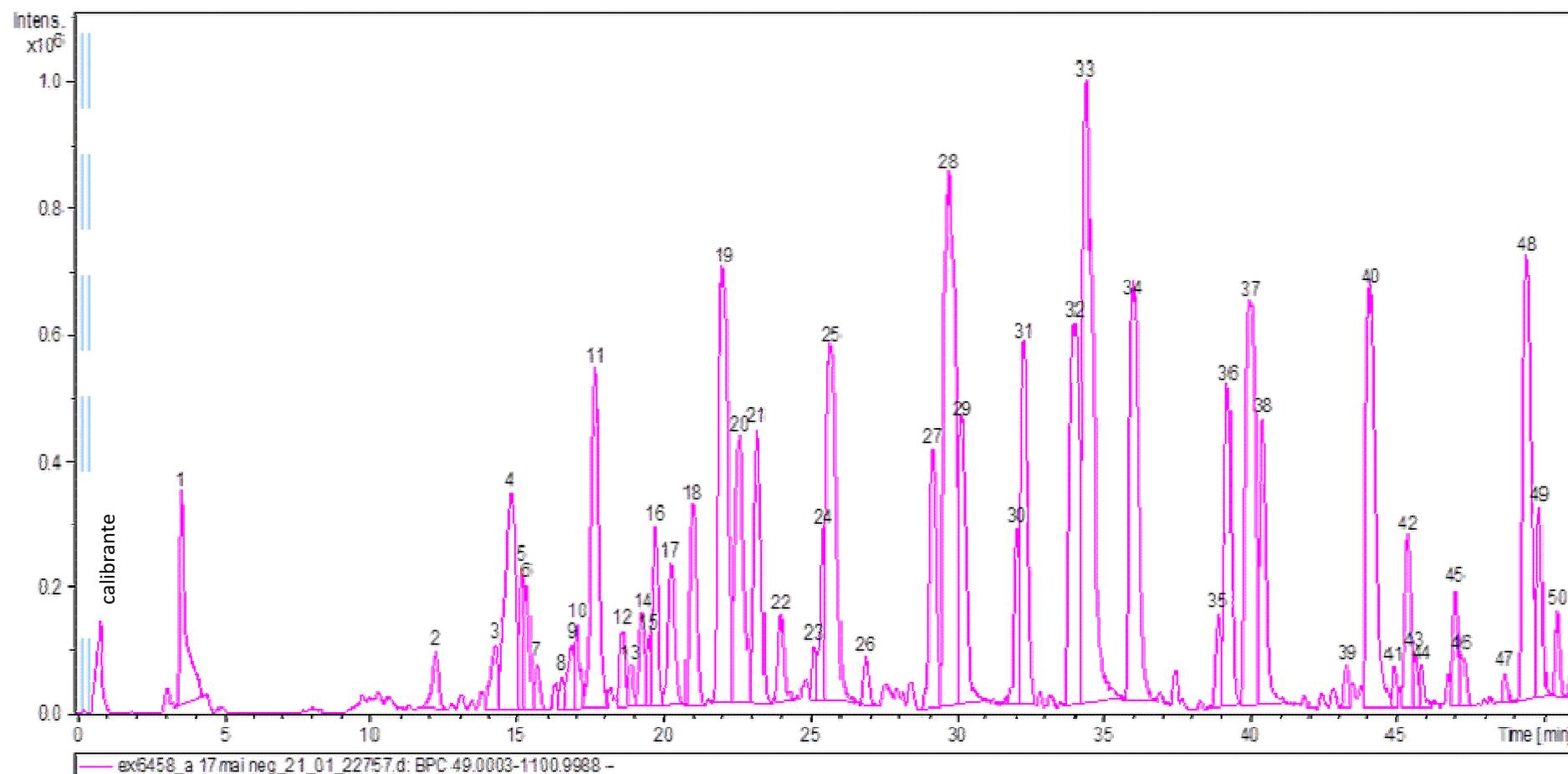


FIGURA 34 – Cromatograma de EX6458 obtido por HPLC-ESI-Q-TOF-MS, modo negativo, com detecção do pico base. No eixo Y é mostrada a intensidade dos íons e no eixo X o tempo em minutos.

TABELA 9 – Compostos fenólicos detectados e caracterizados no extrato etanólico de folhas de *Baccharis platypoda* por HPLC–ESI–QTOF-MS/MS no modo de ionização negativo.

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma	MS/MS Fragmentos (% int)	Substância proposta
1	3.6	533.1727	C ₁₉ H ₃₄ O ₁₇	533.1723	- 0.7	13.30	341.1072 (28) 191.0565 (100)	Indeterminada
2	12.3	353.0871	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	2.1	5.03	191.0571 (100) 179.0355 (71.3) 135.0451 (28.6)	Ácido neoclorogênico
3	14.3	475.1439	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₃	475.1457	3.8	2.35	281.0670 (8.9) 179.0370 (12.2) 161.0273 (82.6)	Indeterminada
4	14.8	353.0875	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	0.8	9.14	191.0568 (100) 161.0259 (2)	Ácido clorogênico*
5	15.2	325.0926	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0929	1.0	5.90	119.0498 (100) 163.0403 (22.3)	Coumaroil hexosídeo isômero 1
6	15.4	353.0872	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	1.8	12.97	191.0568 (99.9) 179.0459 (80.8) 173.0459 (100) 135.0451 (42.9)	Ácido criptoclorogênico
7	15.7	339.0713	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339.0722	2.6	30.67	179.0360 (92.8) 161.0253 (100) 135.0452 (70.7) 147.0296 (23.9)	Cafeoil-glucono lactona
8	16.6	459.1509	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	459.1508	- 0.2	15.17	281.0648 (8.3) 161.0255 (86)	Indeterminada

Tabela 9 (Continuação)

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma	MS/MS Fragmentos (% int)	Substância proposta
9	16.9	401.1448	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	401.1453	1.3	9.06	269.1020 (100) 201.0390 (46) 191.0592 (68.7) 161.0426 (90.1) 113.0247 (28.6)	Indeterminada
10	17.1	179.0352	C ₉ H ₈ O ₄	179.0350	- 1.0	4.99	135.0452 (100)	Ácido caféico*
11	17.7	593.1537	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1512	- 4.3	15.46	503.1230 (18) 473.1132 (57.2) 383.0806 (21.7) 353.0714 (36)	Apigenina-6,8-diglicosídeo
12	18.6	371.0974	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.0984	2.5	10.39	249.0627 (76.5) 121.0296 (100)	Indeterminada
13	18.9	381.1182	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	381.1191	2.5	10.90	267.0732 (12.3) 161.0248 (100)	Indeterminada
14	19.3	563.1400	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1406	1.1	7.85	503.1234 (29) 473.1125 (47.7) 443.1028 (39.2) 383.0806 (55) 353.0706 (67.2)	Apigenina-6,8-di-C-pentósil-hexosídeo
15	19.5	325.0914	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0929	4.5	4.51	163.0403 (72.4) 119.0499 (100)	Coumaroil hexosídeo isômero 2
16	19.7	563.1401	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1406	1.0	10.40	503.1229 (21.2) 473.1120 (37.7) 443.1018 (39.2) 383.0804 (55)	Shaftosídeo

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma	MS/MS Fragmentos (%)	Substância proposta
							353.0709 (50.6)	
17	20.3	563.1392	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1406	2.6	13.23	473.1122 (32.1) 443.1021 (43) 383.0811 (18.6) 353.0703 (25)	Isoshaftosídeo
Tabela 9 (Continuação)								
18	21.0	303.0502	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0510	2.8	19.47	285.0412 (19.4) 217.0548 (10.9) 199.0435 (10) 193.0544 (12.5) 175.0443 (15) 151.0197 (26.4) 125.0269 (100)	Taxifolin*
19	22.0	515.1230	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1195	- 6.7	32.12	353.0890 (90.4) 335.0787 (31.6) 191.0570 (40.8) 179.0355 (92.7) 173.0462 (100)	Ácido 3,4-Dicafeoilquínico
20	22.6	515.1200	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1195	- 1.0	21.17	353.08984 (76.2) 191.0568 (100) 179.0356 (69)	Ácido 3,5-Dicafeoilquínico
21	23.2	381.1196	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	381.1191	- 1.2	18.34	179.0356 (100) 161.0251 (18.8) 135.0455 (39.6)	Clorogenato de etila
22	24.0	477.1029	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1038	1.9	3.77	315.0727 (100) 161.0253 (27.7) 152.0112 (21.2)	Isoramnetina-O-glicosídeo

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma	MS/MS Fragmentos (% int)	Substância proposta
23	25.1	529.1336	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	529.1351	2.8	4.03	349.0939 (20.6) 335.0780 (39.4) 193.0512 (100) 179.0355 (59.8) 173.0460 (72.1)	Ácido 3-feruloil-5-cafeoilquínico
24	25.4	609.1456	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1461	0.8	1.71	301.0391 (72.1) 300.0323 (98.9)	Rutina*
Tabela 9 (Continuação)								
25	25.7	515.1214	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1195	- 3.6	26.77	353.0886 (100) 191.0569 (25.1) 179.0357 (70.3) 173.0463 (91.3)	Ácido 4,5-Dicafeoilquínico
26	26.9	433.0752	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0776	5.5	2.36	301.0350 (34.2) 300.0287 (100)	Quercetina-3-arabinosídeo
27	29.1	543.1518	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	543.1508	- 1.8	7.73	381.1196 (100) 161.0249 (80.7)	Ácido Dimetoxicinamoil-cafeoilquínico isômero 1
28	29.7	287.0572	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.0561	- 3.8	1.0	135.0452 (100) 151.0036 (69.3)	Eriodictiol
29	30.1	543.1532	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	543.1508	- 6.2	10.71	381.1194 (96.7) 179.0352 (41.3) 161.0249 (100)	Ácido Dimetoxicinamoil-cafeoilquínico isômero 2
30	32.0	677.1498	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	677.1512	2.0	6.96	515.1194 (100) 353.0881 (40.9)	Ácido tricafeoilquínico
31	32.2	207.0676	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207.0663	- 6.5	1.54	179.0352 (41.7)	Cafeato de etila

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma	MS/MS Fragmentos (% int)	Substância proposta
							161.0285 (77.7) 135.0450 (100)	
32	34.0	301.0364	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0354	- 3.3	6.6	273.0406 (9.4) 178.9988 (35.4) 151.0036 (100) 121.0293 (17.4)	Quercetina*
33a	34.3	543.1521	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	543.1508	- 2.4	8.96	381.1194 (57.6) 271.0622 (100) 179.0356 (85.7) 161.0250 (36.1)	Ácido Dimetoxicinamoil-cafeoilquínico isômero 3
33b	34.3	271.0629	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	271.0612	- 6.4	1.6	177.0196 (9.9) 151.0036 (100; 119.0499 (67.1) 107.0136 (13.2)	Narigenina
34	36.0	285.0434	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0405	- 10.4	25.0	257.0465 (1.2) 241.0509 (1.8) 217.0523 (2.8) 201.0217 (1.2) 174.0403 (3.5) 151.0042 (8.4) 133.0296 (8.5)	Luteolina*
35	37.4	531.1672	C ₃₀ H ₂₈ O ₉	531.1661	- 2.1	28.5	487.1589 (100) 179.0375 (21.8) 161.0257 (86.3)	Indeterminada
36	38.9	705.18	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₅	705.1825	- 0.5	4.80	543.1536 (86.6) 525.1436 (15.6) 381.1231 (19.8)	Ácido cafeoil-diferuloilquínico

Tabela 9 (Continuação)

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma	MS/MS Fragmentos (% int)	Substância proposta
							179.0386 (18.1) 161.0278 (41.3)	
37	39.2	301.0734	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	301.0718	- 5.6	5.50	273.0415 (10.7) 178.9993 (36.7) 151.0038 (100) 121.0295 (16.6)	Hesperitina*
38a	39.9	315.0517	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.0510	- 2.1	2.2	300.0083 (100) 151.0034 (7.2)	Isorhamnetina*
38b	39.9	269.0491	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0455	- 13.3	37.8	255.0567 (5.9) 201.0561 (2.4) 151.0038 (13.2) 117.0342 (8.7)	Apigenina*
39	40.3	299.0574	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0561	- 4.4	4.71	284.0335 (100) 256.0379 (7.2)	Crisoeriol
40	43.2	421.2579	C ₂₄ H ₃₈ O ₆	421.2596	4.0	4.0	377.2680 (25.8) 285.0779 (100) 165.0196 (50.5) 119.0493 (13.9)	Indeterminada
Tabela 9 (Continuação)								
41	44.0	285.0783	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	285.0768	- 5.2	13.58	165.0194 (83.7) 149.9958 (5.5) 119.0500 (100)	Sakuranetina
42	44.8	255.0652	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0663	4.2	8.12	213.0599 (54.6) 211.0802 (18.3) 171.0488 (43.6) 151.0062 (54) 145.0693 (34.6)	Pinocembrina*

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma	MS/MS Fragmentos (% int)	Substância proposta
							107.0165 (20.2)	
43	45.3	299.0553	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0561	2.8	1.08	284.0335 (100) 256.0372 (2.9) 227.0354 (0.8) 165.0203 (0.9) 151.0032 (1.3) 133.0287 (2.7)	Diosmetina
44	45.5	421.2574	C ₂₄ H ₃₈ O ₆	421.2596	5.1	3.21	377.2662 (32.5)	Indeterminada
45	45.7	543.3145	C ₂₈ H ₄₈ O ₁₀	543.3175	5.4	11.79	483.2951 (74.6) 161.0451 (100) 113.0255 (25.4)	Indeterminada
46	46.9	331.1531	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	331.1551	5.9	4.13	299.1302 (100) 255.1278 (17.3) 123.0807 (23.4)	Indeterminada
47	47.1	331.1523	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	331.1551	8.5	9.53	299.1309 (37.2) 229.0885 (72.4) 208.0383 (53.9) 185.0974 (100)	Indeterminada
Tabela 9 (Continuação)								
48	48.6	343.0802	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.0823	6.2	1.26	328.0604 (69.8) 313.0351 (100)	Eupatorina/Eupatrina
49	49.3	283.0640	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0612	- 9.7	38.09	268.0384 (100) 240.0433 (1)	Acacetina
50	49.7	335.2223	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.2228	1.6	1.20	317.2145 (4.1) 305.2157 (3.0) 273.2268 (4.0) 261.2264 (3.9)	Indeterminada

Pico	TR (min)	<i>m/z</i> experimental	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)	mSigma a	MS/MS Fragmentos (% int)	Substância proposta
------	-------------	----------------------------	----------------------	-------------------------	---------------	-------------	--------------------------------	---------------------

* Confirmação com injeção de padrão.

5.7.1 Derivados de ácidos fenólicos

A família do ácido clorogênico é formada por derivados do ácido hidroxicinâmico, mais precisamente de ésters formados entre o ácido quínico e certos ácidos *trans*-cinâmicos, mais frequentemente cafeico, *p*-coumárico, ferúlico, e sinápico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A família Asteraceae é reconhecidamente fonte desses ácidos, para os quais são descritas várias atividades biológicas, entre elas a atividade antioxidante, antiviral e carcinogênica (Jaiswal et al., 2011a).

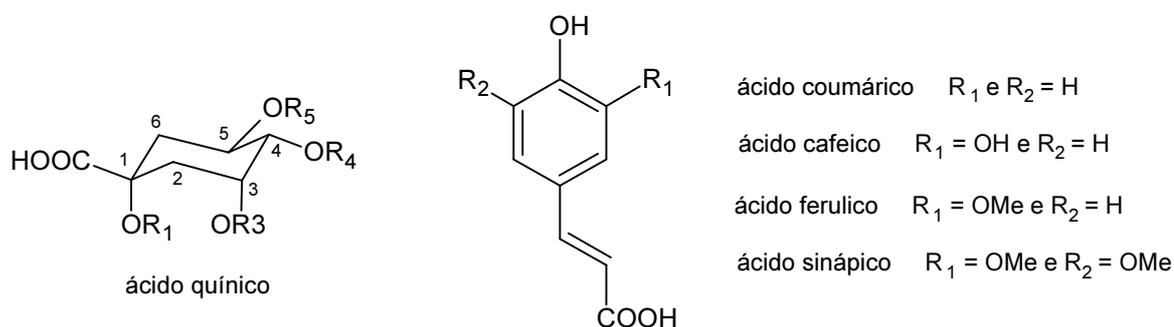


FIGURA 35 – Ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico.

Os analitos eluídos nos picos 2, 4 e 6 do cromatograma correspondem aos ácidos neoclorogênico, clorogênico e criptoclorogênico, respectivamente (FIGURA 36). Na análise do espectro de massas desses ácidos cafeoilquínicos foram detectados os íons $[M-H]^-$ (m/z 353) e à perda da unidade de ácido do ácido cafeico $[M-H-162]^-$ (m/z 191). O espectro de massas dos ácidos neoclorogênico e clorogênico mostraram pico base com m/z 191 $[M-H-162]^-$, atribuído ao ácido quínico, enquanto o ácido criptoclorogênico forneceu m/z 173 [quínico-H-H₂O]. Os ácidos neoclorogênico e clorogênico podem ser diferenciados pela intensidade do íon m/z 179, atribuído à perda do ácido cafeico desprotonado, o qual apresenta 80% de intensidade no primeiro e apenas 5% no segundo (Clifford et al. 2003, Vallverdú-Queralt et al., 2010). Foi realizada injeção e co-injeção com padrão de ácido clorogênico para confirmação do tempo de retenção e perfil de fragmentação, o que confirmou os dados. O pico 21 do cromatograma (m/z 381) corresponde ao analito derivado do ácido clorogênico – clorogenato de etila (FIGURA 36), devido ao perfil de fragmentação observado e comparação com dados dos bancos de massas.

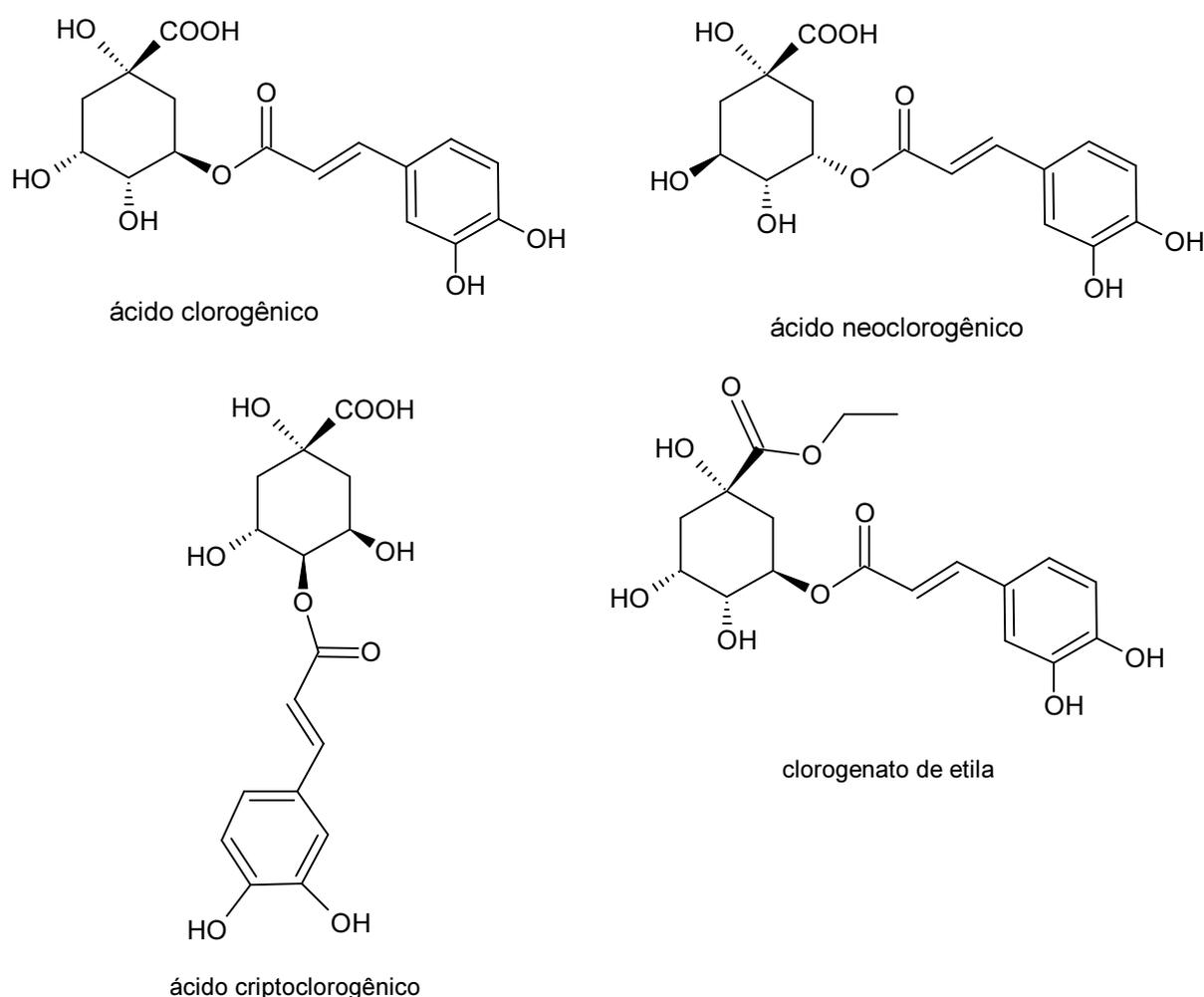
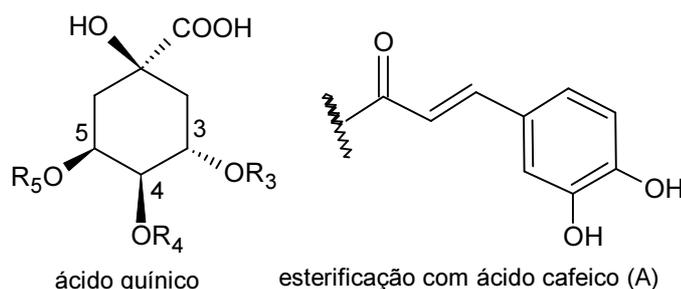


FIGURA 36 – Ácido clorogênico e seus derivados encontrados em *B. platypoda*.

Três isômeros de ácido dicafeoilquínico (m/z 515) foram identificados, correspondendo aos picos cromatográficos 19, 20 e 25, todos apresentando perda de fragmento neutro de 162Da. Foram observados nos espectros de massas os íons atribuídos a $[M-H]^-$ (m/z 515), com perda de uma unidade de ácido cafeico $[M-H-162]^-$ (m/z 353) e ácido quínico desprotonado (m/z 191) (Vallverdú-Queralt et al., 2010). Tanto o perfil de tempo de retenção quanto o perfil de fragmentação estão de acordo com o descrito por Aboy e colaboradores (2012) para *Baccharis trimera*, por Clifford e colaboradores (2005) e por Jaiswal e colaboradores (2014b), de forma que a sequência de eluição observada corresponde aos ácidos 3,4-O-[*E*]-dicafeoilquínico (intensidade no íon m/z 173 no MS^2 de 100%), 3,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico (intensidade no íon m/z 191 no MS^2 de 100%) e 4,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico, respectivamente (intensidade no íon m/z 173 no MS^2 de 90%). O pico 30 (m/z 677), após comparação com banco de dados e literatura foi caracterizado como sendo o

ácido tricafeoilquínico, o que é comum em plantas da família Asteraceae (Liao et al., 2010; Jaiswal et al., 2011a).



ácido 3,4-dicafeoilquínico R_3 e $R_4 = A$; $R_5 = H$

ácido 3,5-dicafeoilquínico R_3 e $R_5 = A$; $R_4 = H$

ácido 4,5-dicafeoilquínico R_4 e $R_5 = A$; $R_3 = H$

ácido tricafeoilquínico R_3, R_4 e $R_5 = A$

FIGURA 37 – Ácidos cafeoilquínicos encontrados em *B. platypoda*.

De acordo com o esquema de fragmentação proposto por Clifford e colaboradores (2003) o analito detectado pico 23 do cromatograma (m/z 529) foi caracterizado como sendo um dos isômeros do ácido feruloil-cafeoilquínico e segundo Jaiswal e colaboradores (2010 e 2014a) a formação do íon com m/z 173 de elevada intensidade indica a presença do resíduo de feruloil na posição 4 do ácido quínico (verificar FIGURA 35 para posicionamento dos substituintes). O analito correspondente ao pico 36 do cromatograma (m/z 705) foi caracterizado como ácido diferuloil-cafeoilquínico, já que essa massa caracteriza o íon da molécula desprotonada desse subgrupo de derivados do ácido clorgênico [CGA-H]⁻ (Jaiswal & Kuhnert, 2010).

De forma geral, nos ácidos da família do ácido clorgênico (CQA, pCoQA, FQA, diCQA, FCQA, CFQA e seus isômeros), a posição de ligação de grupos acila no ácido quínico pode ser diferenciada pela massa do fragmento principal. Grupos acila ligados na posição 4-OH fornecem o pico base com m/z 173, que corresponde ao [ácido quínico-H₂O-H]⁻. Grupos acila conectados nas posições 3-OH ou 5-OH, dão origem ao pico base com m/z 191, que corresponde ao [ácido quínico-H]⁻. No caso da ligação em 3-OH, o íons de m/z 179, correspondente à [ácido cafeico-H]⁻, é mais pronunciado (Gu et al., 2012).

Os analitos referentes aos picos, 27, 29 e 33a do cromatograma, com m/z 453, foram caracterizados como sendo isômeros do ácido cafeoil-

dimetoxicinamoilquinico, uma vez que o íon de m/z 381 é sempre observado no espectro de MS² (Clifford et al., 2006; Jaiswal & Kuhnert, 2010).

Os picos 5 e 15 foram caracterizados como isômeros de coumaroil hexose, tendo em vista a semelhança dos dados obtidos no experimento de MS² com dados depositados para essa substância no banco de dados MetFrag e também com perfil de fragmentação apresentado por Brannan e colaboradores (2015), Ramirez-Ambrosi e colaboradores (2013) e Barros e colaboradores (2012), onde o íon de m/z 163 corresponde ao [ácido coumárico-H]⁻.

O analito correspondente ao pico 10 do cromatograma, após comparação dos dados de fragmentação com bancos de dados, foi caracterizado como sendo o ácido cafeico, o qual já foi isolado de várias espécies de *Baccharis*, entre elas *B. genistelloides*, *B. marítima* e *B. uncinella* (Grecco et al., 2010b; Liao et al., 2010). Foi realizada injeção do padrão e co-injeção com extrato para confirmação da identificação, onde se observou mesmo tempo de retenção e perfil de fragmentação para padrão e amostra. Os analitos relativos aos picos 7 e 31 do cromatograma foram caracterizados, após análise nos bancos de dados de massas e comparação com a literatura, como sendo derivados do ácido cafeico: cafeoil-gluconolactona e cafeato de etila, respectivamente. Observa-se, em ambos os casos, a formação do fragmento correspondente ao ácido cafeico desprotonado (m/z 179), do [ácido caféico-H₂O-H]⁻ (m/z 161).

5.7.2 Flavonas e seus heterosídeos

O gênero *Baccharis* é conhecido pela produção de flavonas (Sharp et al., 2001). Flavonas são um subtipo de flavonoide que é encontrado em frutas e vegetais e cujo consumo traz vários benefícios à saúde. Devido à presença de grupos hidroxila, carbonila e dupla ligação conjugada, essas substâncias são capazes de sofrer diferentes tipos de reações químicas (redução, rearranjo, condensação, substituição, etc). A grande diversidade química do grupo lhe proporciona multiplicidade de atividades biológicas (Singh et al., 2014b). Foram detectadas 10 flavonas no extrato de *B. platypoda*, cuja caracterização está descrita abaixo.

O pico 11 do cromatograma, cujo analito apresenta pico base no espectro de massas correspondente a [M-H]⁻ (m/z 593), e mostrou fragmentos com m/z 503 [(M-H)-90]⁻ (^{0,3}X₀⁻) e 473 [(M-H)-120]⁻ (^{0,2}X₀⁻), que são fragmentos provenientes da fragmentação na porção glicosídica da substância, entre. Também foram

observados íons com m/z 383 $[(M-H)-90]^-$ e 353 $[(M-H)-120]^-$, indicando a mesma fragmentação em outro resíduo de hexose. Além disso, os sinais observados em m/z 383 (aglicona + 113) e m/z 353 (aglicona + 83) são característicos de flavonas 6,8-*C*-diglicosiladas com apigenina como aglicona (MM = 270). Desta forma a substância foi caracterizada como sendo apigenina-6,8-*C*-diglicosídeo, ou seja, um dos isômeros da vicenina-2 (Benayad et al., 2014; Guimarães et al., 2013; Abu-Reidah et al., 2012).

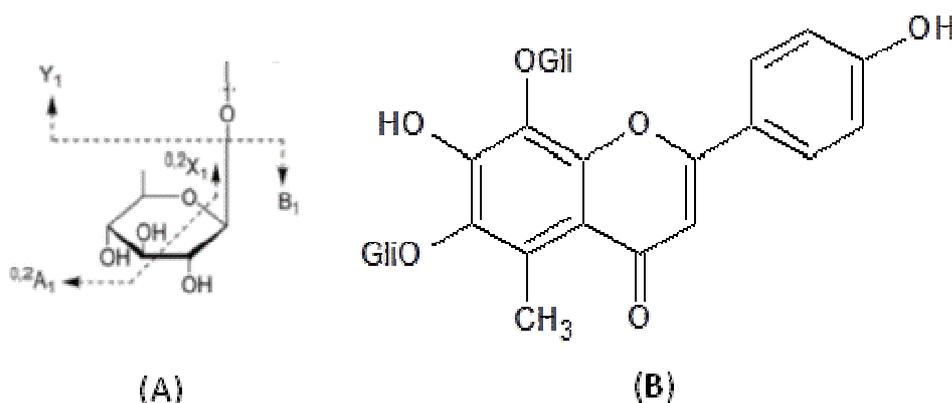


FIGURA 38 – (A) Esquema de fragmentação do anel glicosídico e sua nomenclatura; (B) Estrutura da Vicenina-2.

Os analitos correspondentes aos picos 14, 16 e 17 (m/z 563, $[M-H]^-$) apresentaram o mesmo perfil de fragmentação descrito para o isômero da vicenina, observando-se os íons característicos da apigenina como aglicona, com a diferença de perda de uma pentose e uma hexose, conforme descrito por Abu-Reidah e colaboradores (2012) e Benayad e colaboradores (2014). Desta forma, as substâncias foram caracterizados como sendo isômeros de apigenina-6,8-di-*C*-pentosil-hexosídeo. Em condições cromatográficas semelhantes, descrita por Ferreres e colaboradores (2003), sugere-se que a ordem de eluição dessas flavonas sejam primeiro a apigenina-6,8-di-*C*-pentosil-hexosídeo, seguida do shaftosídeo e por fim o isoshaftosídeo.

As agliconas do tipo flavona eluíram após de 36 minutos. A FIGURA 39 mostra, esquematicamente, as principais fragmentações sofridas por esse grupo de flavonoides, permitindo a caracterização dos fragmentos e comprovação da identidade.

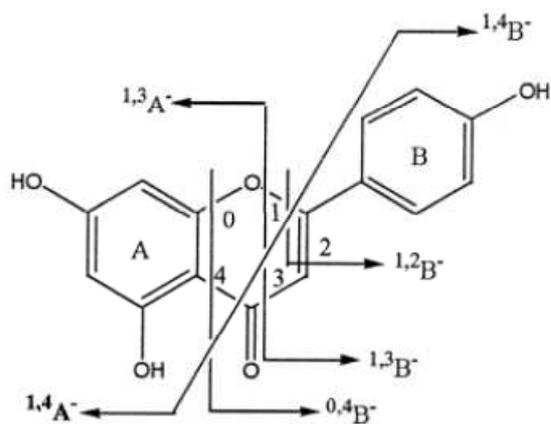


FIGURA 39 – Esquema de fragmentação das flavonas e sua nomenclatura (Fonte: Fabre et al., 2001).

Dados de m/z obtidos para a substância detectada no pico 34, $[M-H]^-$ m/z 285 como pico base e fragmentos com m/z 241, 217 e 174, foram comparados com bancos de dados que sugeriram a luteolina como substância. Os dados também eram semelhantes ao descrito por Sun e colaboradores (2007). Foi feita injeção do padrão para comprovação do perfil de fragmentação e tempo de retenção, confirmando a caracterização.

Os dados de fragmentação da substância referente ao pico 38b, $[M-H]^-$ m/z 269, foram comparados com banco de dados de massas, que sugeriram a apigenina como substância. A comparação do perfil de fragmentação - m/z 151 ($^{1,3}A^-$) e 117 ($^{1,3}B^-$) - com o descrito por Fabre e colaboradores (2001) também indicava a apigenina, o que foi comprovado pela injeção e co-injeção do padrão e confirmação do tempo de retenção.

O analito referente ao pico 39, m/z 299 $[M-H]^-$, com formação do fragmento de m/z 284 como pico base, correspondente à perda de metila, foi caracterizado como sendo o crisoeriol,. A eluição próxima ou co-eluição com a apigenina é outra característica dessa flavona (Plazoniaé et al., 2009; Lech et al., 2014). O analito referente ao pico 43, também de m/z 299 $[M-H]^-$ e pico base m/z 284 apresentou maior fragmentação e a comparação com banco de dados, sugeriu a diosmetina – um isômero de posição do crisoeriol, como sendo o constituinte.

O perfil de fragmentação dos analitos referentes aos picos 48 e 49, m/z 343 e 283 $[M-H]^-$, respectivamente, foi comparado com banco de dados e as substâncias caracterizadas como sendo a eupatorina e a acacetina.

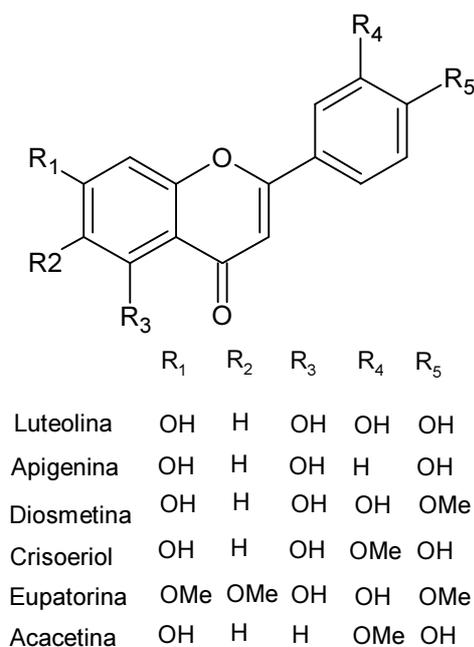


FIGURA 40 – Estrutura das agliconas de flavonas encontradas em *B. platypoda*.

5.7.3 Flavonóis e seus heterosídeos

A literatura disponível até o momento indica que flavones metiladas e flavonóis são as principais classes de compostos fenólicos em espécies do gênero *Baccharis* (Sartor et al., 2013). Nos dados obtidos para *B. platypoda* foram encontrados 5 flavonoides desse grupo.

O analito referente ao pico 22, m/z 477 $[M-H]^-$, forneceu como íon base em experimento de MS^2 o fragmento de m/z 315 e a comparação desses dados com a literatura e banco de dados mostrou que se tratava de um O-glicosídeo de isoramnetina (Carazzone et al. 2013). Por sua vez a isoramnetina foi caracterizada com sendo o pico 38a, após comparação com banco de dados e injeção do padrão para confirmação do tempo de retenção.

Outro heterosídeo caracterizado foi a rutina (dissacarídeo da quercetina), registrada no pico 24 m/z 609, após a comparação dos dados obtidos com banco de dados, sendo realizada a injeção e co-injeção de padrão para confirmação do tempo de retenção.

O analito referente ao pico 26, m/z 433 $[M-H]^-$ foi caracterizado como quercetina-3-arabinosídeo após comparação do perfil de fragmentação obtido com dados do MetFrag e observação da intensidade do sinal $[M-H]^-$ (Ablajan & Tuoheti, 2013). No espectro de MS^2 foi formado o íon de m/z 301 $[aglicona-H]^-$, com perda de 132 atribuído ao resíduo de arabinose. Por sua vez a genina quercetina, registrada

no pico 32 (m/z 301), também foi caracterizada por comparação em banco de dados e confirmada após injeção de padrão e obtenção de mesmo tempo de retenção.

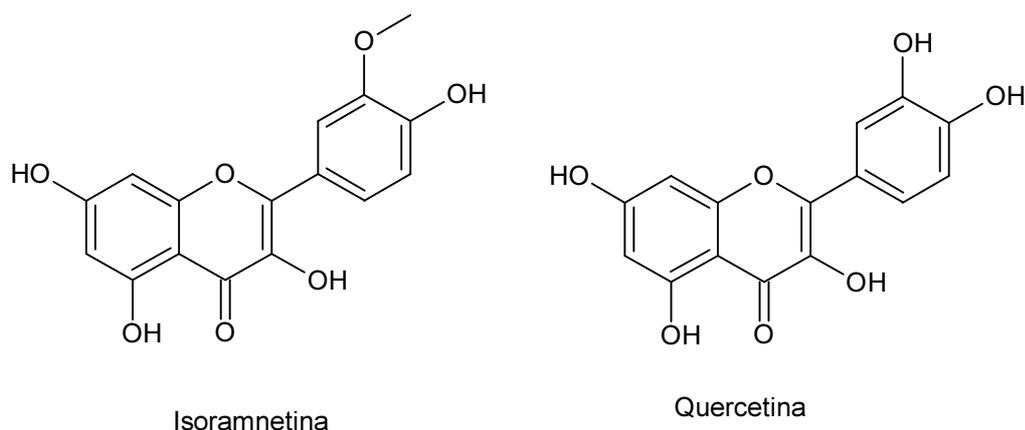


FIGURA 41 – Estrutura das agliconas de flavonóis encontradas em *B. platypoda*.

5.7.4 Flavanonas e flavanonol

Flavanonas podem ser reconhecidas como o ponto de divergência na formação das várias estruturas do grupo dos flavonoides, uma vez que são as precursoras na rota biossintética dos subgrupos (Khan et al., 2014). No extrato de *B. platypoda* foram detectadas 6 flavanonas conforme descrição abaixo.

O analito referente ao pico 18, m/z 303 $[M-H]^-$ e com fragmentos de m/z 151 e 125, foi caracterizado como taxifolina, ou diidroquercetina, após comparação com bancos de dados. Os fragmentos acima correspondem à fragmentação $^{1,3}A^-$, seguida de perda de resíduo CO (Abad-García et al., 2009; Perestrelo et al., 2012). Em seguida a caracterização foi confirmada com a injeção de padrão e obtenção de mesmo tempo de retenção e perfil de fragmentação.

O analito referente ao pico 28, m/z 287 $[M-H]^-$ gerou no experimento de MS^2 o íon de m/z 151, característico de fragmentação do anel A de flavanonas e após comparação com banco de dados e literatura (Es-Safi et al., 2005) foi caracterizado como sendo o eriodictiol.

O analito referente ao pico 33b, m/z 271 $[M-H]^-$ gerou no experimento de MS^2 os íons de m/z 177, 151, 119 que também foram descritos para a narigenina segundo Perestrelo e colaboradores (2012).

O analito referente ao pico 37, m/z 301, que também forma no MS^2 o fragmento de m/z 151 característico de fragmentação do anel A de flavanonas, foi caracterizado após comparação com banco de dados como hespertina, o que foi confirmado com injeção de padrão.

O analito referente ao pico 41, m/z 285 foi caracterizado após comparação com banco de dados como sakuranetina, flavanona que também está presente no extrato de *B. retusa* (Grecco et al., 2012b).

O analito referente ao pico 42, m/z 255 apresentou fragmentação semelhante à descrita por Seo e colaboradores (2013), sendo caracterizado como pinocembrina, flavanona que tem sido encontrada na família Asteraceae (Gobbo-Neto et al., 2008).

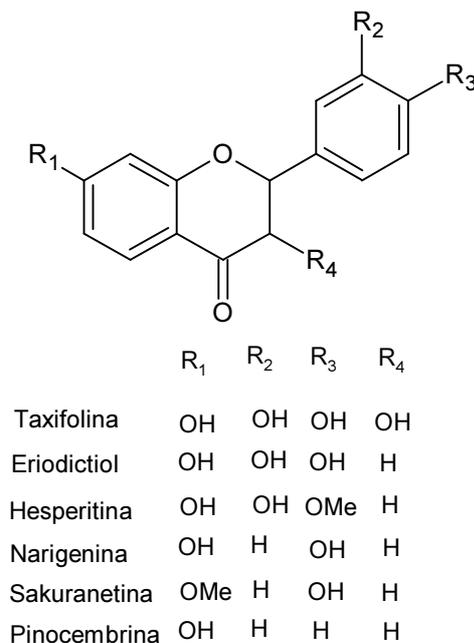


FIGURA 42 - Estrutura das flavanonas e flavonol encontrados em *B. platypoda*

A caracterização das substâncias fenólicas presentes no extrato etanólico de *B. platypoda* contribui para o conhecimento químico da espécie, bem como é a primeira etapa do processo de desreplicação. Esse fluxo de trabalho pretende ser executado no LQPN, adicionando-se ao descrito nesta tese a etapa de bioensaios acoplada à caracterização por LC-MS, o que irá favorecer ainda mais a descoberta de produtos naturais bioativos e que tenham estrutura química inédita.

5.8 Determinação da potencial antioxidante do extrato EX6458

Como dito anteriormente, o gênero *Baccharis* é reconhecido como fonte de compostos fenólicos. Além disso, com o crescente interesse por novos antioxidantes a avaliação de extratos vegetais se torna uma prática importante na busca por substâncias que possam ser utilizadas no tratamento de doenças onde o existe um desequilíbrio redox.

Várias espécies de *Baccharis* são conhecidas por serem fonte de antioxidantes, como é o caso da *B. dracunculifolia* (conhecida como própolis verde brasileira) que é um reconhecido extrato antioxidante utilizado na medicina tradicional no tratamento de inflamações (Guimarães et al., 2012; Figueiredo-Rinhel et al., 2013). Além disso, extratos de partes aéreas de *B. chilco*, *B. pentlandii*, *B. grisebachii* e *B. articulata*, entre outras do gênero, tem mostrado ser fonte de compostos antioxidantes (Sartor et al., 2013). A quantificação de fenóis totais do extrato etanólico das folhas de *B. platypoda* está apresentada na

TABELA 10. Como comparação, pode-se analisar a variação sazonal no teor de polifenóis totais (TFT) para a espécie *B. dentata*, que oscila de 36 a 46 mg de ácido gálico por grama de material vegetal (folhas) seco (Sartor et al., 2013) ou o extrato etanólico de *B. trimera*, que apresentou $261,59 \pm 8,75$ mg de ácido gálico por grama de (Oliveira et al., 2012). O ácido gálico, que é um fenol, é utilizado internacionalmente como padrão de referência para comparação de dados, embora não exista uma tabela de referência para classificar a quantidade determinada em baixa, média ou alta.

O extrato etanólico de *B. platypoda* foi avaliado em quatro métodos *in vitro* para determinar seu potencial antioxidante, três deles baseados na transferência de elétrons (DPPH, TEAC e FRAP) e um deles baseado na transferência de átomos de hidrogênio (ORAC). O valor encontrado nos ensaios é compatível com o descrito na literatura para outras espécies da família Asteraceae.

O trolox foi a substância utilizada como referência por ser um análogo sintético da vitamina E, que é utilizada na prevenção de doenças coronarianas, câncer de mama e próstata, na demência e também no mal de Parkinson (Rajendran et al., 2014).

TABELA 10- Avaliação do teor de fenóis totais e da atividade antioxidante para o extrato etanólico de *B. platypoda*

Amostra	TFT ^{a*}	Ensaio de atividade antioxidante*			
		DPPH ^b	TEAC ^c	ORAC ^d	FRAP ^e
EX6458	107,9 ± 2,9	11,9 ± 2,9	567,8 ± 79,2	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n ≥ 3).

^a TFT = Teor de fenóis totais. Resultado em equivalente de ácido gálico (mg AG/g extrato seco).

^b Ensaio de sequestro do radical DPPH. Resultado em CE₅₀ (µg extrato/ mL).

^c Ensaio para determinação da capacidade antioxidante em equivalente de Trolox. Resultado em equivalente de Trolox (µmol trolox/g extrato seco)

^d Ensaio de capacidade de absorvância de radicais oxigenados. Resultado em equivalente de Trolox (mol trolox/g extrato seco)

^e Ensaio de determinação do poder redutor de ferro. Resultado em equivalente de Fe²⁺ (mmol Fe²⁺/g extrato seco).

Considerando os compostos caracterizados por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS no extrato, foi verificada a presença abundante de ácidos fenólicos, especialmente os da família do clorogênico, era esperada a potencial atividade antioxidante do extrato etanólico (Melguizo-Melguizo et al., 2014). Esses polifenóis podem ter uma atividade isolada, mas o efeito sinérgico deles no extrato não pode ser desconsiderado.

A presença de ácidos orgânicos, especialmente, derivados do ácido clorogênico, bem como de compostos hidrofílicos (como os flavonóis e outros flavonoides glicosilados que foram encontrados no extrato), são fatores que justificam a atividade apresentada (Cádiz-Gurrea et al., 2013; Melguizo-Melguizo et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os problemas apresentados pelos medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses, em especial a toxicidade e surgimento de cepas resistentes, torna-se de extrema urgência a descoberta de uma nova substância ativa para dar início ao processo de desenvolvimento de um novo quimioterápico para essa doença.

A espécie *Baccharis platypoda* é uma espécie brasileira e que foi pouco investigada dos pontos de vista químico e biológico, o que justifica ainda mais seu estudo. A caracterização dos compostos fenólicos presentes no extrato etanólico por HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS mostrou a presença de 19 ácidos fenólicos, 10 flavonas, 5 flavonóis e 6 flavanonas, contribuindo para o conhecimento da quimiodiversidade da espécie. Além disso, o potencial antioxidante do extrato foi avaliado e verificado, que como outras Asteraceae, a espécie é fonte de substâncias antioxidantes, entre as quais vários flavonoides caracterizados (quercetina, luteolina, etc). Entre os flavonoides caracterizados estão alguns com atividade leishmanicida descrita na literatura, como é o caso da luteolina e da quercetina.

O fracionamento biomonitorado do extrato EX6458 resultou no isolamento do diterpeno (1R,3R,4R,8aR)-3-(hidroximetil)-4-[(3E)-5-hidroxi-3-metilpent-3-en-1-il]-4,8,8a-trimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftalen-1-ol, que foi denominado platypodiol. Essa substância apresentou uma fraca atividade no modelo com amastigotas intracelulares (72% de redução da infecção na concentração de 50 µg/mL), mas mostrou que é capaz de atravessar a membrana celular e agir no parasito em seu habitat natural dentro do homem e não apresentou toxicidade para as células THP-1 na concentração de 1 mg/mL.

7 ANEXOS

7.1 Trabalhos apresentados em congressos

ALVES TMA, MOREIRA CPS, DIAS LTS, BERTOLLO CM, ZANI CL. From 5,000 crude plant and fungi extracts screening to leishmanicidal compounds identification: the challenge goes on. In: 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Products Research. 2014, Guimarães/Portugal.

MOREIRA CPS; SANTOS CN; Rocha MN; BERTOLLO CM; ALVES TMA. Isolation of leishmanicidal diterpene produced by one species of Asteraceae. In: Fifth World Congress on Leishmaniasis - WorldLeish, 2013, Porto de Galinhas.

SANTOS CN; MOREIRA CPS; ROCHA MN; ALVES TMA. Isolation of leishmanicidal natural products produced by one species of Asteraceae. In: XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil., 2012, Bento Gonçalves.

MOREIRA CPS; SANTOS CN; FRANCISCO FLM; RABELLO AL; ZANI CL; ALVES TMA. New strategy for bioassay-guided fractionation of an leishmanicidal extracts. In: 3th Brazilian Conference of Natural Products, 2011, Ouro Preto.

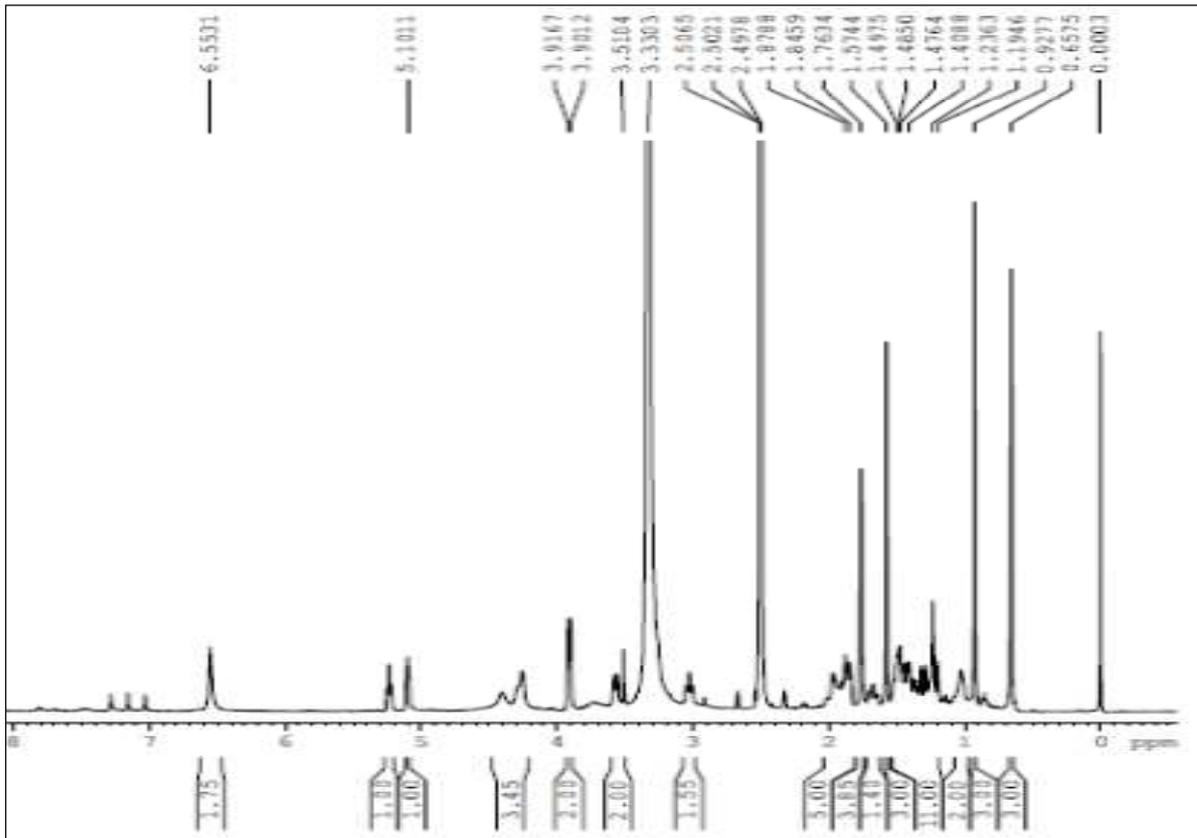
MOREIRA CPS; RABELLO AL; ZANI CL; ALVES TMA. Fracionamento cromatográfico biomonitorado de um extrato de Asteraceae leishmanicida. In: Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2010, Campos do Jordão.

MOREIRA CPS; SALES-JUNIOR PA; ROMANHA AJ; ZANI CL; ALVES TMA. Bioguided fractionation of Trypanocidal Asteraceae plant extract. In: XXVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ XXXVII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease, 2010, Foz do Iguaçu.

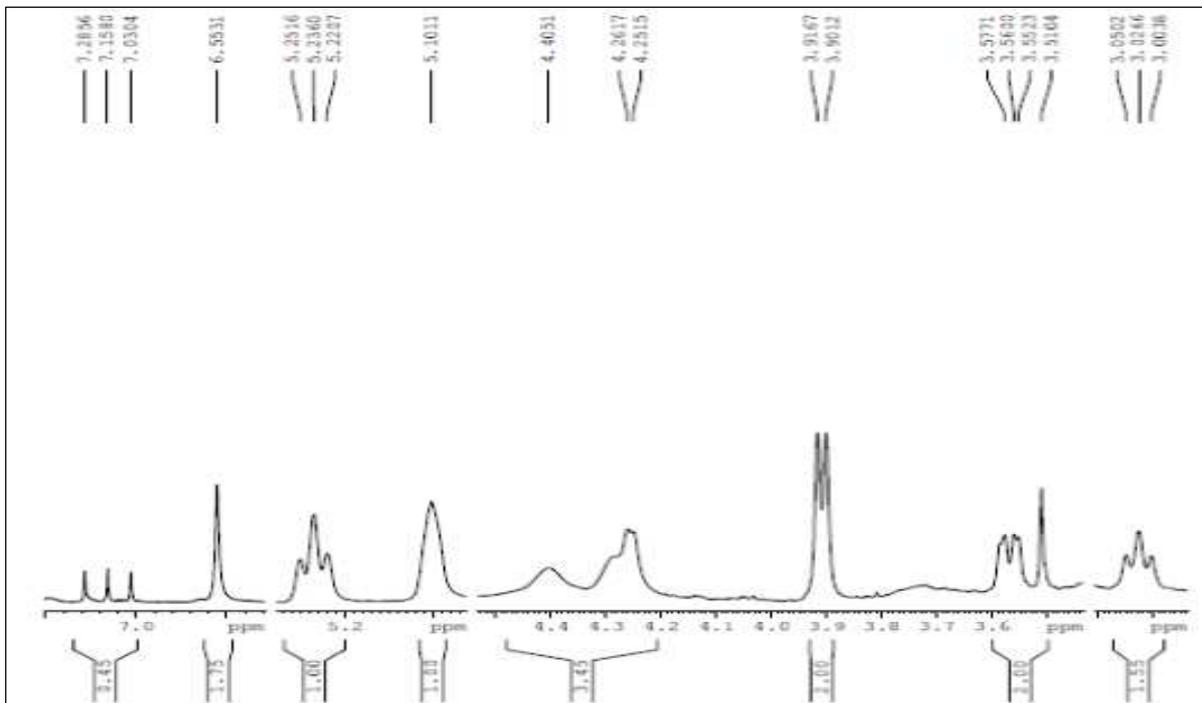
7.2 Trabalho publicado

Moreira CPS, Oliveira DM, Santos CN, Zani CL, Alves TMA. Platypodiol a novel clerodane diterpene from *Baccharis platypoda*. *Tetrahedron Lett.* 2014, 55, 4898–4900. DOI:

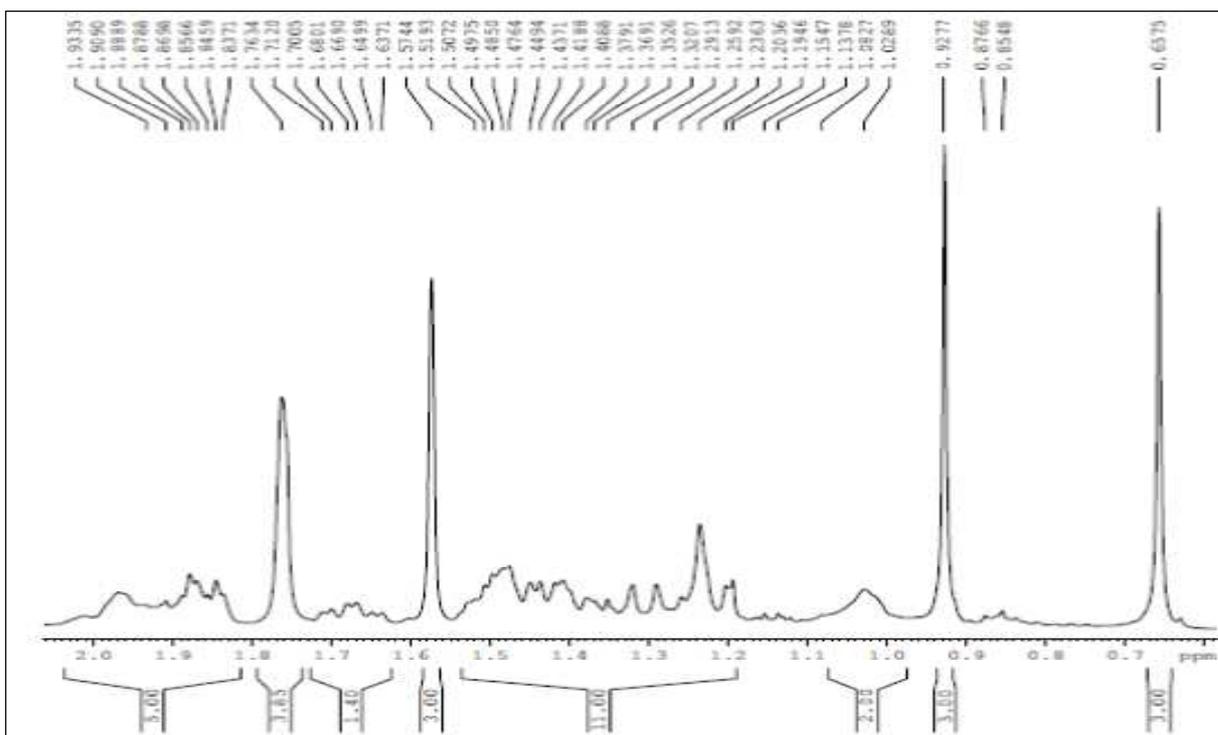
7.3 Espectros de RMN do platypodiol



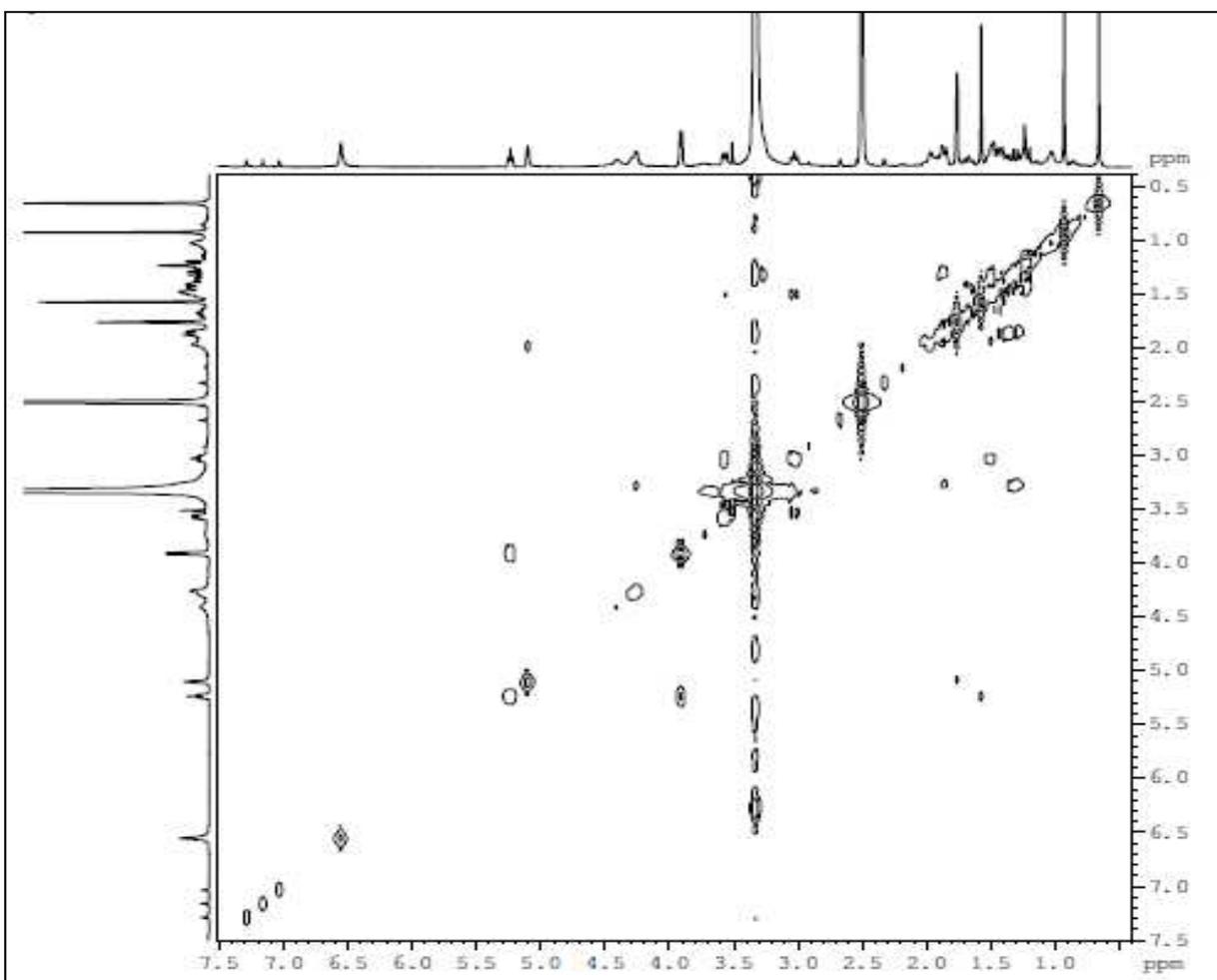
ANEXO 1 – Espectro de RMN de ^1H do platypodiol em DMSO-d_6 (500 MHz).

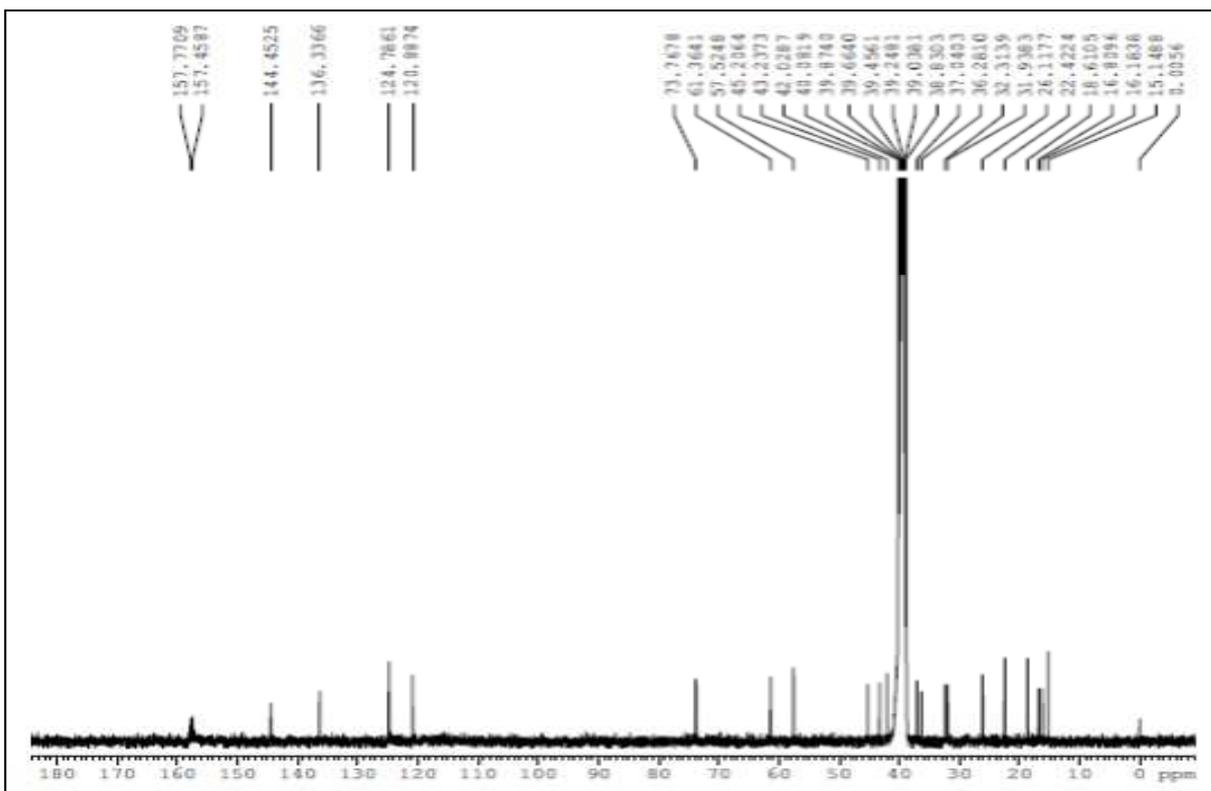
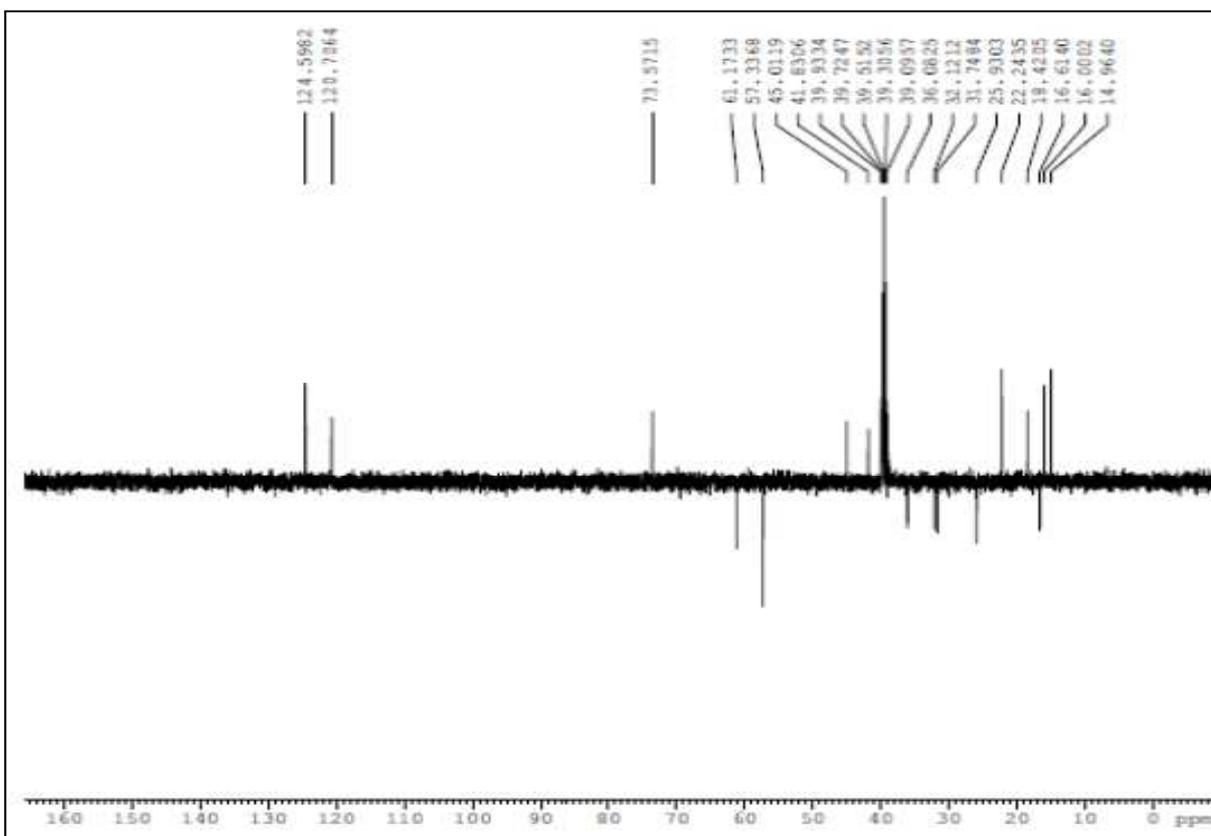


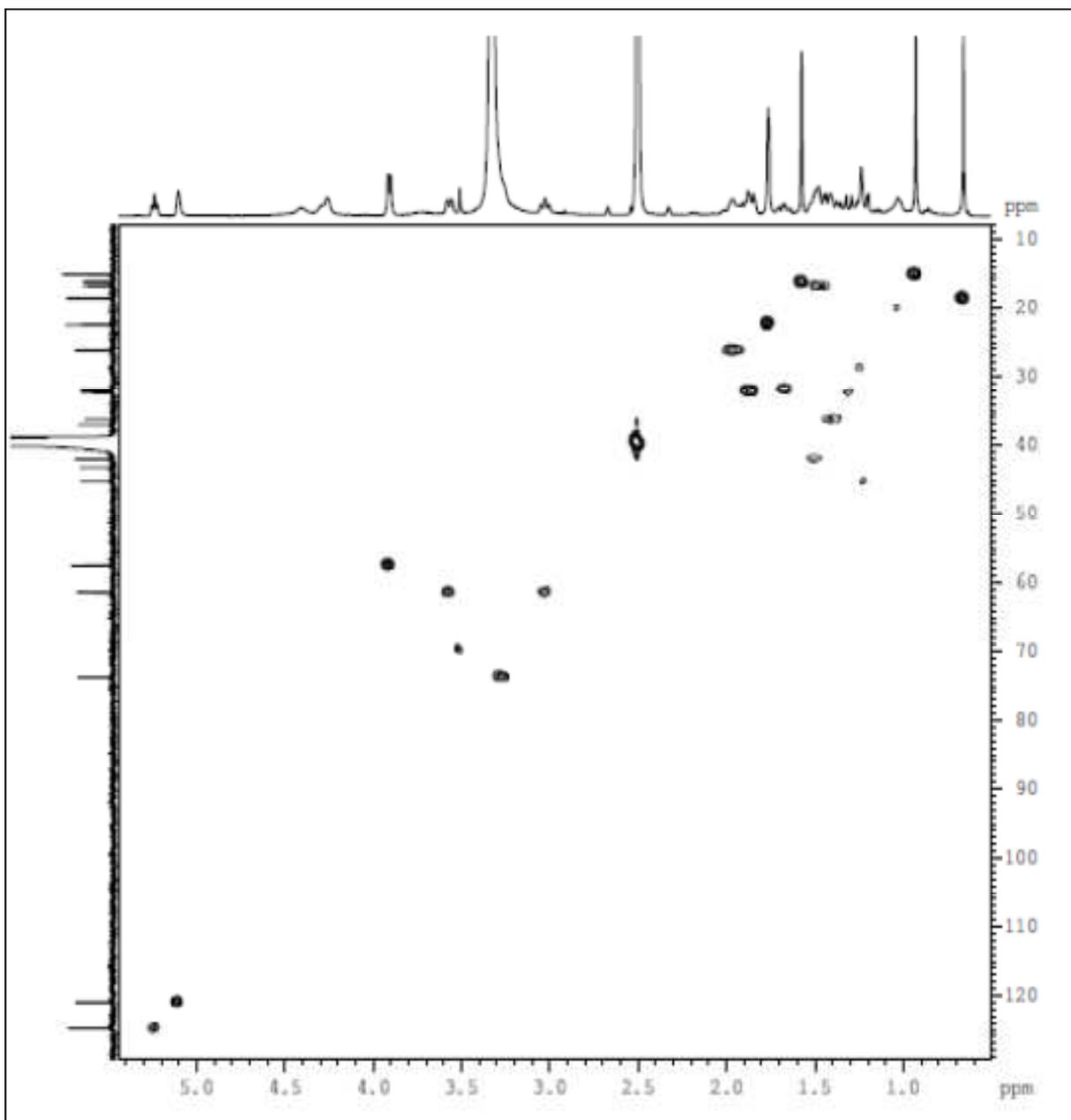
ANEXO 2 – Expansão do espectro de RMN de ^1H do platypodiol em DMSO-d_6 (500 MHz).



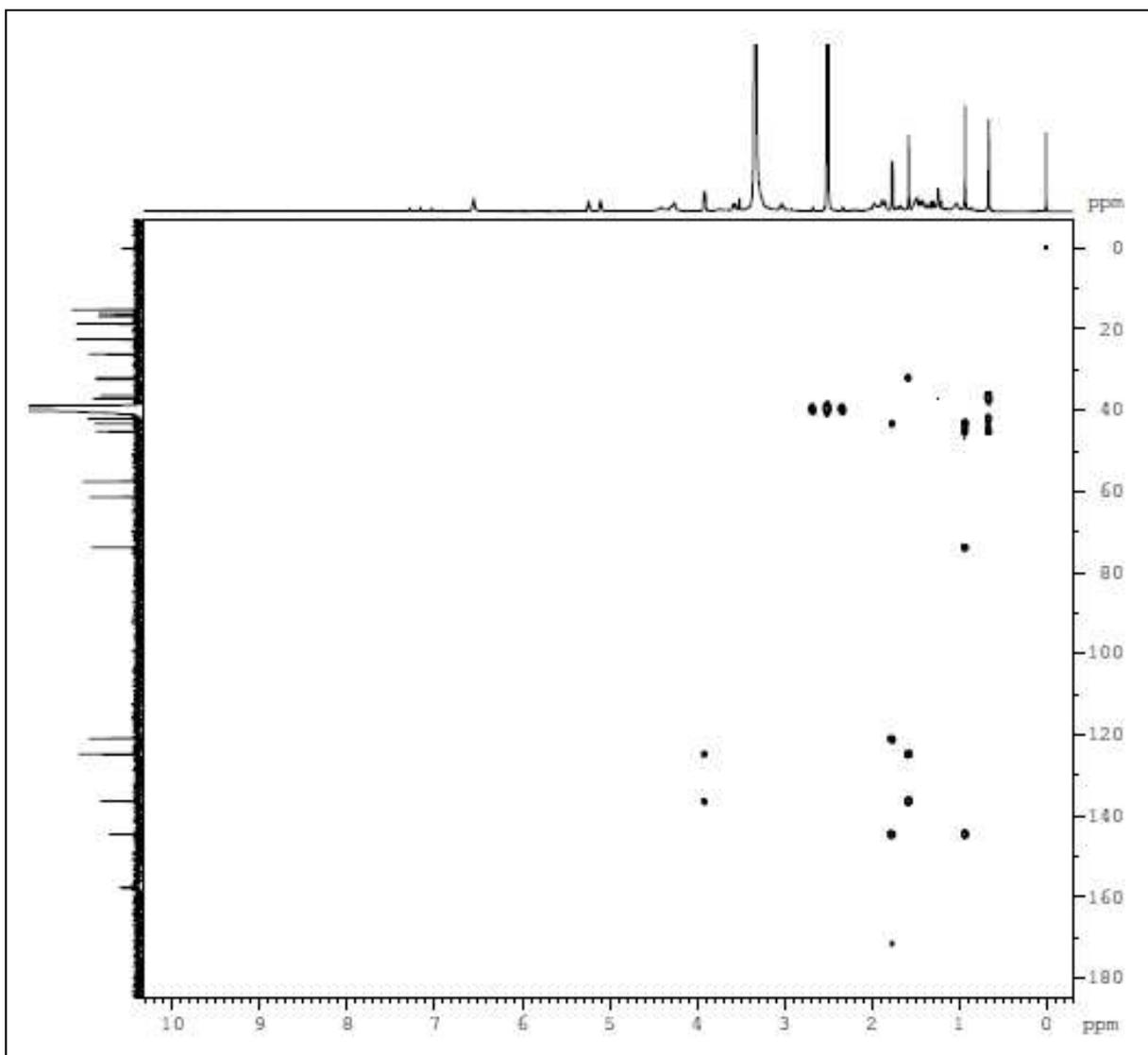
ANEXO 3 – Expansão do espectro de RMN de ^1H do platypodiol em DMSO-d_6 (500 MHz).



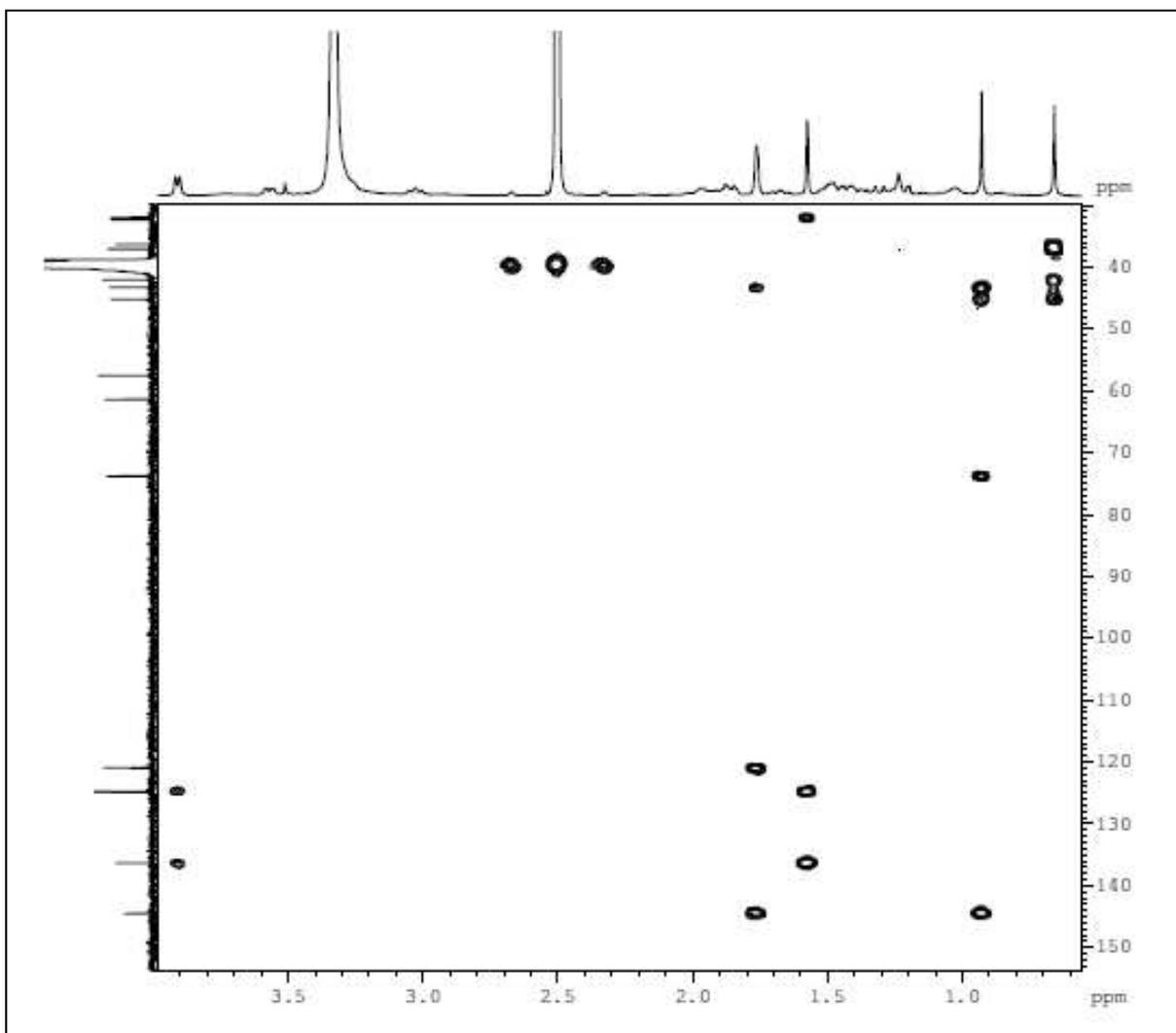
ANEXO 4 – Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY do platypodiol em DMSO-d_6 (500 MHz).ANEXO 5 – Espectro de RMN de ^{13}C do platypodiol em DMSO-d_6 (125 MHz).ANEXO 6 - Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT) do platypodiol em DMSO-d_6 (125 MHz).



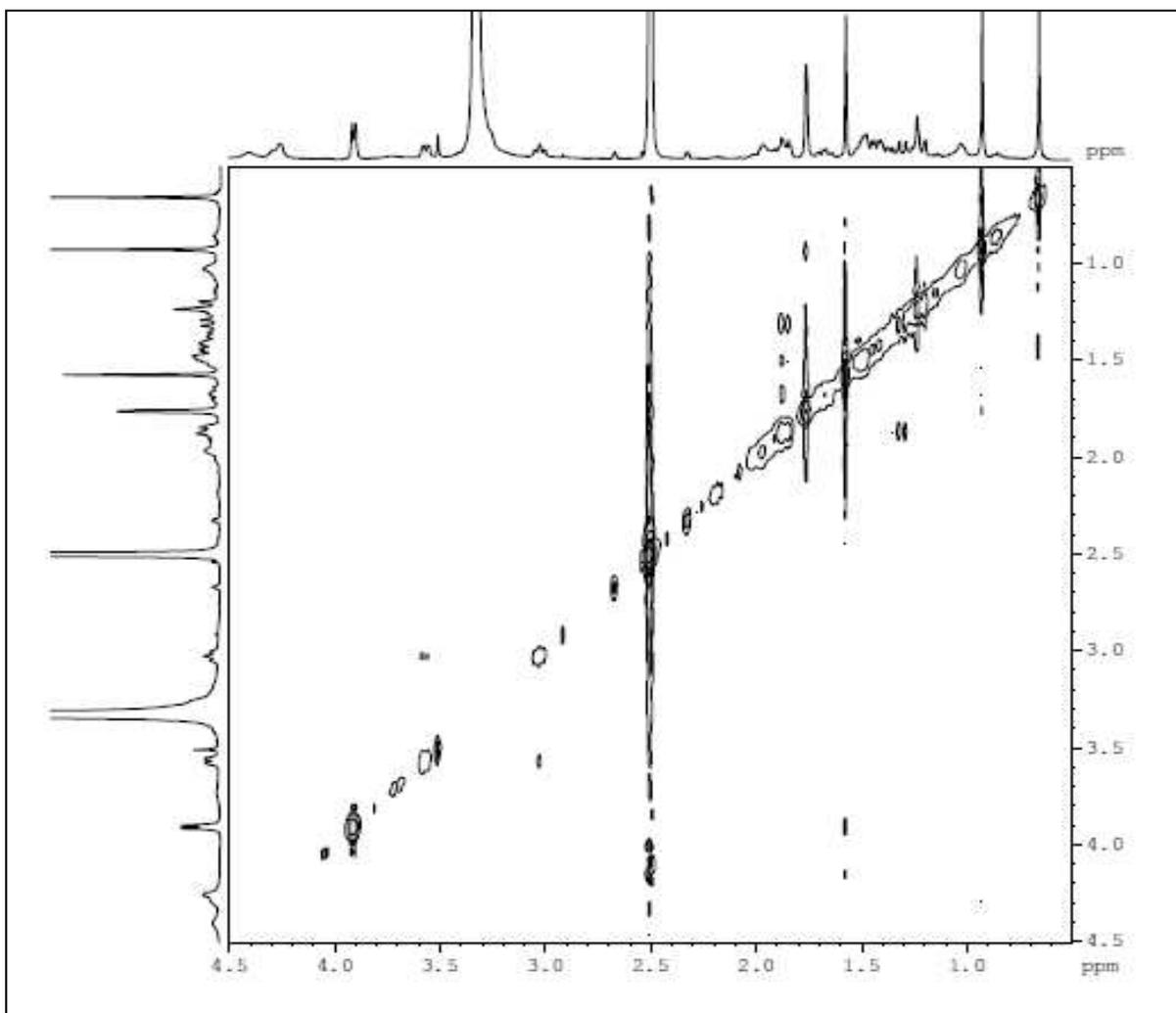
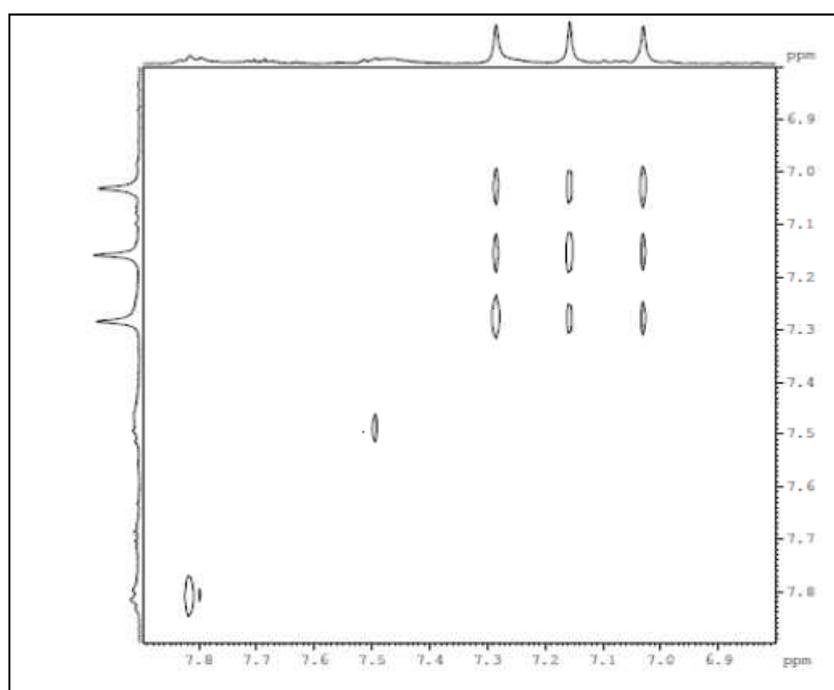
ANEXO 7 – Mapa de contorno HSQC do platypodiol em DMSO-d₆.



ANEXO 8 – Mapa de contorno HMBC do platypodiol em DMSO-d₆.



ANEXO 9 – Expansão do mapa de contorno HMBC do platypodiol em DMSO-d₆.

ANEXO 10 – Mapa de contorno NOESY do platypodiol em DMSO-d₆.ANEXO 11– Expansão do mapa de contorno NOESY do platypodiol em DMSO-d₆

8 REFERÊNCIAS

Abad-García B, Garmón-Lobato S, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. On line characterization of 58 phenolic compounds in *Citrus* fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*. 2012, 99, 213–224.

Ablajan K, Tuoheti A. Fragmentation characteristics and isomeric differentiation of flavonol O-rhamnosides using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2013, 27, 451–460.

Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Quirantes-Piné, R, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A, Fernández-gutiérrez A. HPL-ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Research International*. 2012, 46, 108-117.

Akhila A, Rani K, Thakur RS. Biosynthesis of the clerodane furano-diterpene lactone skeleton in *Tinospora cordifolia*. *Phytochemistry*. 1991, 30(8), 2573-2576.

Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmac J*. 2013, 21, 143–152.

Ali A, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, Kolodziej H. Structure/Antileishmanial activity relationship study of naphthoquinones and dependency of the mode of action on the substitution patterns. *Planta Med*. 2011, 77, 2003–2012.

Barros L, Dueñas M, Pinela J, Carvalho AM, Buelga CS, Ferreira ICFR. Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers' varieties in northeastern Portugal homegardens. *Plant Foods Hum Nutr*. 2012, 67, 229–234.

Benayad Z, Gómez-Cordovés C, Es-Safi NE. Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) germinated seeds by LC–DAD–ESI/MS analysis. *J Food Compost Anal*. 2014, 35, 21–29.

Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996, 239(1), 70–76.

Borges FAX, Forzza RC. A tribo Astereae (Asteraceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Bol. Bot. Univ.* 2008, 26(2), 131-154.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol.* 1995, 28(1), 25–30.

Brannan RG, Peters T, Talcott ST. Phytochemical analysis of ten varieties of pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) fruit pulp. *Food Chem.* 2015, 168, 656–661.

BRASIL. Agência Fiocruz de Notícias. Doenças Negligenciadas. Disponível em <http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em 13 de agosto de 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em 16 de julho de 2014b.

Bucar F, Wube A, Schmid M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Nat. Prod. Rep.* 2013, 30, 525-544.

Cádiz-Gurrea ML, Fernández-Arroyo S, Joven J, Segura-Carretero A. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Res Int.* 2013, 50, 197–204.

Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(4), 818-822.

Carazzone C, Mascherpa D, Gazzani G, Papetti A. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2013, 138, 1062–1071.

Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013, 51, 15-25.

Carvalho PB, Ferreira EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia.* 2001, 72, 599-618.

Chen M, Christensen SB, Blom J, et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 37, 2550-2556.

Chen M, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994, 38, 1339-1344.

Chen M, Zhail, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* e *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45, 2023-2029.

Chen L, Sutherland IA. How to achieve rapid separations in counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 2006, 1114, 29–33.

Cifuentes DA, Borkowski EJ, Sosa ME, Gianello JC, Giordano OS, Tonn CE. Clerodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. *Phytochemistry.* 2002, 61, 899-905.

Clinfford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2900-2911.

Clinfford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3821-3832.

Clinfford MN, Knight S, Surucu B, Kuhnert N. Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 1957-1969.

Cotta BB, Oliveria DM, Siqueira EP, Souza-Fagundes EM, Pimenta AMC, Santos DM, Rabello A, Zani CL. New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. *Fitoterapia*. 2011, 82, 969–975.

Davis AJ, Kedzierski L. Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005, 6(2), 163-169.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases *initiative*. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl.html>. Acesso em 25 de julho de 2014.

El-Elimat T, Figueroa M, Ehrmann BM, Cech NB, Pearce CJ, Oberlies NH. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 1709–1716.

Emerenciano VP, Militão JSLT, Campos CC, Romoff P, Kaplan MAC, Brant AJC. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem Syst Ecol.* 2001, 29: 947-957.

Es-Safi NE, Kerhoas L, Einhorn J, Ducrot PH. Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside and luteolin 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside. *Int J Mass Spectrom.* 2005, 247, 93–100.

Fabre N, Rustan I, Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001, 12, 707–715.

Fabri RL, Nogueira MS, Dutra LB, Bouzada MLM, Scio E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2011, 13(2), 183-189.

Ferreres F, Silva BM, Andrade PB, Seabra RM, Ferreira MA. Approach to the study of C-glycosyl flavones by Ion Trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.* 2003, 14, 352–359.

Figueiredo-Rinhel ASG, Kabeya LM, Bueno PCP, Jorge-Tioossi RF, Azzolini AECS, Bastos JK, Lucisano-Valim YM. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *J Ethnopharmacol.* 2013, 150, 655–664.

Foucault AP, Chevolut L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J Chromatogr A.* 1998, 808, 3–22.

Fournet A, Angelo A, Muñoz V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* 1992a, 37, 159-164.

Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol.* 2012, 2, 1-19.

Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop.* 1992, 51, 237–245.

Gobbo-Neto L, Santos MD, Albarella L, Zollo F, Pizza C, Lopes NP. Glycosides, caffeoylquinic acids and flavonoids from the polar extract of leaves of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol.* 2008, 36, 473-475.

Gramiccia M, Gradoni, L. The current status of zoonotic leishmanises and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005, 35, 1169-1180.

Grecco SS, Reimão JQ, Tempone AG, Sartorelli P, Romoff P, Ferreira MJP, Fávero OA, Lago JHG. Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Parasitol Res.* 2010, 106, 1245–1248.

- Grecco SS, Gimenes L, Ferreira MJP, Romoff P, Favero OA, Zalewski CA, Lago JHG. Triterpenoids and phenolic derivatives from *Baccharis uncinella* C.DC. (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol.* 2010b, 38, 1234–1237.
- Grecco SS, Reimão JQ, Tempone AG, Sartorelli P, Cunha RLOR, Romoff P, Ferreira MJP, Fávero OA, Lago JHG. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Exp Parasitol.* 2012, 130, 141–145.
- Grecco SS, Ferreira MJP, Romoff P, Favero OA, Lago JHG. Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol.* 2012b, 42, 21–24.
- Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Calhella RC, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild *Roman chamomile*: A comparison between the herb and its preparations. *Food Chem.* 2013, 136, 718–725.
- Guimarães NSS, Mello JC, Paiva JS, Bueno PCP, Berretta AA, Torquato RJ, Nantes IL, Rodrigues T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food Chem Toxicol.* 2012, 50, 1091-1097.
- Hartman T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* 2007, 68, 2831-2846.
- Harvey AL. Natural products as a screening resource. *Curr Opin Chem Biol.* 2007, 11, 480-84.
- Hasan CM, Healey TM, Waterman PG. Kolavane and kaurane diterpenes from the stem bark of *Xylopiya aethiopica*. *Phytochemistry* 1982, 21(6), 1365-1368.
- Ito Y, Oka H. Improved High-Speed Counter-Current Chromatography with three multilayer coils connected in series. *J. Chromatogr.* 1990, 498, 169-178.
- Ito, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1065, 145–168.

Jain K, Jain NK. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discov Today*. 2013, 18 (23/24), 1272-1281.

Jaiswal R, Sovdat T, Vivian F, Kuhnert N. Profiling and characterization by LC-MSⁿ of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in Mate (*Ilex paraguariensis*). *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 5471–5484.

Jaiswal R, Kuhnert N. Hierarchical scheme for liquid chromatography/multi-stage spectrometric identification of 3,4,5-triacylchlorogenic acids in green *Robusta coffee* beans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010, 24, 2283–2294.

Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry*. 2011a, 72, 781–790.

Jaiswal R, Deshpande S, Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of *Rudbeckia hirta*, *Helianthus tuberosus*, *Carlina acaulis* and *Symphotrichum novae-angliae* leaves by LC-MSⁿ. *Phytochem. Anal.* 2011b, 22, 432–441.

Jaiswal R, Matei MF, Subedi P, Kuhnert N. Does roasted coffee contain chlorogenic acid lactones or/and cinnamoylshikimate esters? *Food Res Int.* 2014, 61, 214–227.

Jaiswal R, Halabi EA, Karar MGE, Kuhnert N. Identification and characterisation of the phenolics of *Ilex glabra* L. Gray (Aquifoliaceae) leaves by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*. 2014b, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.018>

Jakupovic J, Schuster A, Ganzer U, Bohlmann F, Boldt PE. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 1990, 29(7), 2217-2222.

Khan MK, Huma ZE, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J Food Compos Anal.* 2014, 33, 85-104.

Koehn FE, Carter G. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005, 4, 206-220.

Konishi Y, Kiyota T, Draghici C, Gao JM, Yeboah F, Acoca S, Jarussophon S, Purisima E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. *Anal Chem.* 2007, 79(3), 1187-1197.

Krimmel B, Swoboda F, Solar S, Reznicek G. OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – a gamma radiolysis study. *Radiat. Phys. Chem.* 2010, 79, 1247-1254.

Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 2011, 89, 217–233.

Laporta O, Perez-Fons L, Mallavia R, Caturla N, Micol V. Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chem.* 2007, 101(4), 1425–1437.

Lech K, Witkos K, Jarosz M. HPLC–UV–ESI MS/MS identification of the color constituents of sawwort (*Serratula tinctoria* L.). *Anal Bioanal Chem.* 2014, 406, 3703–3708.

Liao SG, Zhang LH, Li CB, Lan YY, Wang AM, Huang Y, Zhen L, Fu XZ, Zhou W, Qi XL, Guan ZZ, Wang YL. Rapid screening and identification of caffeic acid and its esters in *Erigeron breviscapus* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010, 24, 2533–2541.

Lu T, Menelaou MA, Vargas D, Fronczek FR, Fischer NH. Polyacetylenes and diterpenes from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry.* 1993, 32(6), 1483-1488.

Marcili A, Sperança MA, Costa AP, Madeira MF, Soares HS, Sanches COCC, Acosta ICL, Giroto A, Minervino AHH, Horta MC, Shaw JJ, Gennari SM. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. *Infect Genet Evol.* 2014, 25, 44–51.

Martinez MJA, Bessa L, Benito PB. Biological active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). *Studies in Natural Products Chemistry.* 2005, 39, 703-759.

McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. 2007, 68, 2015-2022.

Melguizo-Melguizo D, Diaz-de-Cerio E, Quirantes-Piné R, Švarc-Gajic J, Segura-Carretero A. The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. *J Funct Foods*. 2014, 10, 192–200.

Mehta SR, Zhang XQ, Badaro R, Spina C, Day J, Chang KP, Schooley RT. Flow cytometric screening for anti-leishmanials in a human macrophage cell line. *Exp Parasitol*. 2010, 126(4), 617-620.

Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005, 100(7), 783-787.

Moreira CPS, Oliveira DM, Santos CN, Zani CL, Alves TMA. Platypodiol a novel clerodane diterpene from *Baccharis platypoda*. *Tetrahedron Lett*. 2014, 55, 4898–4900.

Muzitano MF, Cruz EA, Almeida AP, Silva SAG, Kaiser CR, Guette C, Rossi-Bergmann B, Costa SS. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Med*. 2006a, 72, 81–83.

Muzitano MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser CR, Rossi-Bergmann B, Costa SS. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*. 2006b, 67: 2071–2077.

Nagashima F, Suzuki M, Takaoka S, Asakawa Y. Clerodane-type Diterpenoids from the Japanese Liverwort *Jungermannia infusca* (MITT.) STEPH. *Chem. Pharm. Bull*. 2000, 48(11), 1818-1821.

Ogunkolade BW, Colomb-Valet I, Monjour L, Rhodes-Feuillette A, Abita JP, Frommel D. Interactions between the human monocytic leukaemia THP- 1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. *Acta Trop*. 1990, 47, 171–176.

Oliveira CB, Comunello LN, Lunardelli A, Amaral RH, Pires MGS, Silva GL, Manfredini V, Vargas CR, Gnoatto SCB, Oliveira JR, Gosmann G. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules*. 2012, 17, 1113-1123.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*. 2001, 49(10), 4619–4626.

Passero LFD, Bonfim-Melo A, Corbett CEP, Laurenti MD, Toyama MH, Toyama DO, Romoff P, Fávero OA, Grecco SS, Zalewsky CA, Lago JHG. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). *Parasitol Res*. 2011, 108, 529–536.

Pereira IO, Assis DM, Juliano MA, Cunha RLOR, Barbieri CL, Sacramento LVS, Marques MJ, Santos MH. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors. *J Med Food*. 2011, 14(6), 557–562.

Perestrelo R, Lu Y, Santos SAO, Silvestre AJD, Neto CP, Câmara JS, Rocha SM. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC–DAD–ESI–MSⁿ. Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chem*. 2012, 135, 94–104.

Pinheiro CA, Rocha MN, Nogueira PM, Nogueira TCM, Jasmim LF, Souza MVN, Soares RP. Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-*t*-butyloxycarbonyl-protected diamines. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2011, 71, 273-278.

Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (Review). *Int J Mol Med*. 2008, 22, 277-286.

Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*. 2014, 436, 332–347.

Ramirez-Ambrosi M, Abad-Garcia B, Vilorio-Bernal M, Garmon-Lobato S, Berrueta LA, Gallo B. A new ultrahigh performance liquid chromatography with diodearray

detection coupled to electrospray ionization and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry analytical strategy for fast analysis and improved characterization of phenolic compounds in apple products. *J Chromatogr A*. 2013, 1316, 78– 91.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jésus MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova*. 2003, 26(4), 550-555.

REFLORA. Lista de espécies da flora do Brasil. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=6D18962916484D3E0B4738B4D4095A79>. Acesso em 18 de julho de 2014.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med*. 1996, 20, 933-956.

Sartor T, Xavier VB, Falcão MA, Mondin CA, Santos MA, Cassel E, Astarita LV, Santarém ER. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. *Ind Crops Prod*. 2013, 51, 355–359.

Sartorelli P, Andrade SP, Melhem MSC, Prado FO, Tempone AG. Isolation of antileishmanial sterol from the fruits of *Cassia fistula* using bioguided fractionation. *Phytother. Res*. 2007, 21, 644–647.

Seger C, Sturm S, Stuppner H. Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques – state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations. *Nat. Prod. Rep*. 2013, 30, 970-987.

Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine*. 2011, 18, 1056-1069.

Seo ON, Kim GS, Park S, Lee, JH, Kim, YH, Lee WS, Lee SJ, Kim CY, Jin JS, Choi SK, Shin SC. Determination of polyphenol components of *Lonicera japonica* Thunb. Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: contribution to the overall antioxidant activity. *Food Chem*. 2012, 134, 572-577.

Seo ON, Kim GS, Kim, YH, Park S, Jeong SW, Lee SJ, Jind JS, Shin SC. Determination of polyphenol components of Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Contribution to overall antioxidant activity. *J Func Food*. 2013, 5, 1741-1750.

Sereno D, Silva AC, Mathieu-Daude F, Ouaiissi. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int*. 2007, 56, 3-7.

Sharp H, Bartholomew B, Bright C, Latif Z, Sarker SD, Nash RJ. 6-Oxygenated favones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol*. 2001, 29, 105-107.

Silva Filho AA, Resende DO, Fukui MJ, Santos FF, Pauletti PM, Cunha WR, Silva MLA, Gregório LE, Bastos JK, Nanayakkara NPD. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia*. 2009, 80, 478–482.

Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status os available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*. 2012, 5(6), 485-497.

Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh KR, Vinod K. Tiwari. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg. Med. Chem*. 2014a, 22, 18–45.

Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*. 2014b, 84, 206-239.

Siqueira EP, Oliveira DM, Johann S, Cisalpino PS, Cota BB, Rabello A, Alves TMA, Zani CL. Bioactivity of the compounds isolated from *Blepharocalyx salicifolius*. *Rev Bras Farmacog*. 2011, 21(4), 645-651.

Siqueira-Neto JL, Song OR, Oh H, Sohn JH, Yang G, Nam J, Jang J, Cechetto J, Lee CB, Moon S, Genovesio A, Chatelain E, Christophe T, Freitas-Junior LH. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010, 4(5), e675.

Smyth WF, Smyth TJP, Ramachandran VN, O'Donnell F, Brooks P. Dereplication of phytochemicals in plants by LC-ESI-MS and ESI-MSⁿ. *Trends Analyt Chem.* 2012, 33, 46-54.

Steinmann D, Ganzera M. Recent advances on HPLC/MS in medical plant analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2011, 55, 744-757.

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,* 2007, 12, 679-693.

Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, Chakravarty J, Vaillant M, Verma N, Pandey K, Kumari P, Lal CS, Arora R, Sharma B, Ellis S, Strub-Woungaft N, Balasegaram M, Olliaro P, Das P, Modabber F. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled Trial. *Lancet.* 2011, 377, 477-486.

Tempone AG, Sartorelli P, Teixeira D, Prado FO, Calixto IARL, Lorenzi H, Melhem MSC. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008, 103(5), 443-449.

Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis.* 2011, 15, e525-e532.

Tistaert C, Dejaegher B, Chataigné G, Rivière C, Hoai NN, Van MC, Quetin-Leclercq J, Heyden YV. Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part II: Fingerprint alignment, data analysis and peak identification. *Anal Chim Acta.* 2012, 721, 35– 43.

Tokoroyama T, Fujimori K, Shimizu T, Yamagiwa Y, Monden M, Iio H. A general method for the synthesis of clerodane diterpenoids. Stereospecific total synthesis of (±)-15,16-epoxy-cis-cleroda-3, 13(16),14-triene and (±)-maingayic acid^{1,2}. *Tetrahedron.* 1988, 44(21), 6607-6622.

- Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. Characterization of flavonoids subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*. 2007, 12, 593-606.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., Tada, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*. 1982 42, 1530-1536.
- Unekwu HR, Audu JA, Makun MH, Chidi EE. Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic extract of selected wild edible Nigerian mushrooms. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014, 4(Suppl 1), S153-S157.
- Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Medina-Remó A, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2010, 24, 2986–2992.
- Vasconcelos Ribeiro PR, Girão DC, Pimenta ATA, Braz-Filho R, Guedes MLS, Silveira ER, Lima MAS. Clerodane and patchoulene terpenes as new constituents from *Baccharis salzmannii* DC. *Biochem Syst Ecol*. 2013, 50, 101–105.
- Verardo V, Arráez-Román D, Seguro-Carretero A, Marconi E, Fernández-Gutiérrez A, Caboni MF. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOF-MS). *J Cereal Sci*. 2010, 52, 170-176.
- Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova*. 2005, 28(1), 85-94.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2^a ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
- Weisz A, Ito Y. Performance comparison of three types of high-speed counter-current chromatographs for the separation of components of hydrophilic and hydrophobic color additives. *J. Chromatogr. A*. 2011, 1218, 6156– 6164.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em 2 maio de 2014.

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2004, 279, 39925-39932.

Yanagida A, Yamakawa Y, Noji R, Oda A, Shindo H, Ito Y, Shibusawa, Y. Comprehensive separation of secondary metabolites in natural products by high-speed counter-current chromatography using a three-phase solvent system. *J. Chromatogr. A*. 2007, 1151, 74–81.

Yang S, Wu S, Qin X, Luo X, Wu D. Neoclerodane diterpenes from *Amoora stellato-squamosa*. *Helvet. Chim. Acta* 2004, 87 (5), 1279-1286.

Zheng W, Wang S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*. 2001, 49(11), 5165–5170.