UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS APOLINÁRIO CHIBLI

**Triagem de inibidores da enzima DHODH de *Leishmania major*
em Asteraceae: estudos metabolômicos e da relação
estrutura-atividade quantitativa (QSAR)**

Ribeirão Preto
2018

LUCAS APOLINÁRIO CHIBLI

**Triagem de inibidores da enzima DHODH de *Leishmania major*
em Asteraceae: estudos metabolômicos e da relação
estrutura-atividade quantitativa (QSAR)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 05/07/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Chibli, Lucas Apolinário

Triagem de inibidores da enzima DHODH de *Leishmania major* em Asteraceae: estudos metabolômicos e da relação estrutura-atividade (QSAR). Ribeirão Preto, 2018.

188 p.; 30cm.

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

Orientador: Da Costa, Fernando Batista

1. Farmacognosia. 2. Quimioinformática. 3. Metabolômica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Apolinário Chibli

Triagem de inibidores da enzima DHODH de *Leishmania major* em Asteraceae:
estudos metabolômicos e da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR)

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu ver, a gratidão se traduz em atitudes bem mais do que em palavras. Porém, palavras que trazem em si sinceridade têm força e valia. Sendo assim, por princípio, sou grato à Divindade, nosso Pai Criador, que é a própria Vida! E por falar na Vida, agradeço à quem me trouxe a ela com segurança e amor, minha família (Omar, Vivette, Pedro, Anuar, avós, tias, tios e primos), e à quem me acompanha por ela com amor, carinho, paciência e alegria, minha amada esposa Paula.

Passo agora a agradecer profissionalmente, ou seja, a tudo e a todos que foram fundamentais para a realização do meu curso de doutorado e para o desenvolvimento desta tese. Sou grato, portanto:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por fornecer: a) bolsa de doutorado no país (processo nº 2014/01443-6), a qual permitiu minha manutenção em Ribeirão Preto durante mais de 4 anos e supriu todas as necessidades logísticas para realização do projeto de pesquisa; b) bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE nº 2016/18579-3), por 9 meses, a qual se tratou de uma oportunidade única, agregando inestimável valor ao desenvolvimento deste trabalho e à minha formação profissional e pessoal. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, por ter aberto as portas do seu grupo de pesquisa (AsterBioChem) e, conseqüentemente, da FCFRP-USP, dando a mim esta valiosa oportunidade de realizar o doutorado sob sua supervisão. Gratíssimamente por toda orientação, incentivo, dicas, conselhos, conversas, risadas e por ter sido a “ponte de ligação” para a realização do estágio de pesquisa no exterior. Uma grande honra para mim ter sido seu orientado/aluno.

À Profa. Dra. Maria Cristina Nonato (FCFRP-USP), pela participação e colaboração efetiva na etapa de bioensaios com a enzima *LmDHODH*. MUITÍSSIMO obrigado por ter aceitado o convite de nos ajudar, disponibilizando todo seu conhecimento, eficiência e as instalações “de ponta” do seu laboratório de pesquisa (LCP). Obrigado também aos integrantes do LCP, especialmente a Lara e o Felipe, por toda ajuda e amizade. Foi uma honra ter sido um “agregado” deste laboratório.

Ao Prof. Dr. Thomas J. Schmidt (IPBP, Universidade WWU-Münster, Alemanha), por ter aceitado minha proposta de pesquisa, possibilitando a realização deste “doutorado sanduíche” em um instituto de altíssima qualidade. Gratíssímo por toda orientação, incentivo, suporte e receptividade. Foi uma honra ter feito parte do IPBP e convivido com pessoas tão amigáveis, inteligentes e capacitadas.

Ao Prof. Dr. José Rubens Pirani (IB-USP, São Paulo) e à Dra. Carolina Moriani Siniscalchi, pelo fornecimento do material vegetal (folhas de diversas espécies de Asteraceae), principalmente referente ao gênero *Chresta*. Obrigado por esta valiosíssima contribuição, sem a qual este trabalho não seria possível.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, com sua coordenação e secretaria (Rosana, Eleni e Rafael), por todo suporte e pela oportunidade de dar mais esse passo na minha carreira profissional. Parabéns pelo excelente padrão de pós-graduação alcançado nesta unidade. À Universidade de São Paulo, pelo apoio e ótima infraestrutura para realização dos trabalhos.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP (Waltinho, Mário, Angélica e Luisão), por todo apoio técnico e logístico, sempre com muita eficiência e boa vontade. Em especial à Gelly, a quem me aproximei mais, pessoa trabalhadora e de bom coração. Grato por toda ajuda e carinho minha amiga.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, especialmente os integrantes do AsterBioChem (atuais e ex-integrantes: Rejane, Dani, Danni, Rosana, Bruno, Tiago, Felipe, Anny, Federico, Gari, Marcelo, Ricardo, Jolindo, Marina e Felipe), por toda amizade, apoio, incentivo e ótimos momentos de convivência. Vocês foram importantes desde a prova para ingresso no doutorado até a redação da tese. Sabemos a luta que é para chegarmos até aqui e nessas horas torna-se claro para qualquer um, com mínimo bom senso, que ninguém constrói nada sozinho. Muitíssimo obrigado por tudo, desejo prosperidade a todos! Em especial à minha amiga Lory, à quem expressei todo meu sincero carinho e amizade.

À todos demais amigos e colegas que, direta ou indiretamente, deram sua contribuição de amizade e UNIÃO, tornando mais fácil esta caminhada. Deixo também à você, que está lendo esta tese, os meus agradecimentos, com o pensamento de que possa encontrar algo novo e útil nesta obra, que marca o fim de um ciclo profissional e pessoal de mais de 4 anos (janeiro/2014 – maio/2018).

*“Some believe it is only great power
that can hold evil in check.
But that is not what I have found.
I have found that it is the small everyday deeds
of ordinary folks that keep the darkness at bay.
Small acts of kindness and love.”
Gandalf “Mithrandir” (The Hobbit)*

RESUMO

CHIBLI, L. A. **Triagem de inibidores da enzima DHODH de *Leishmania major* em Asteraceae: estudos metabolômicos e da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR)**. 2018. 188f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A flavoenzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) catalisa a quarta reação da via *de novo* de biossíntese de pirimidinas, se destacando como alvo molecular chave para parasitos causadores de Doenças Negligenciadas (DNs). Tendo em vista a demanda por novas alternativas terapêuticas para estas doenças, o objetivo deste trabalho foi a triagem *in vitro* de inibidores da enzima DHODH de *Leishmania major* (*LmDHODH*) em Asteraceae. Esta triagem foi acompanhada por abordagem metabolômica em UHPLC-ESI-HRFTMS para os extratos vegetais e estudos de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) para as substâncias isoladas. As etapas experimentais realizadas e os resultados obtidos foram: 1) Ensaio enzimático: os valores de IC_{50} foram determinados para 59 extratos (ΔIC_{50} : 148,0 $\mu g.mL^{-1}$ a 9,4 $mg.mL^{-1}$) e 57 substâncias isoladas (ΔIC_{50} : 27,0 μM a 2,6 mM). As substâncias mais ativas frente à *LmDHODH* apresentaram seletividade, ao exercer inibição irrelevante sobre DHODH humana. Adicionalmente, estudos de termoestabilidade confirmaram que as lactonas sesquiterpênicas (STLs) são, de fato, capazes de se ligar a esta enzima; 2) Estudos metabolômicos: as impressões digitais metabólicas por LC-MS foram obtidas com sucesso para os 59 extratos e o processamento dos dados forneceu 3.694 substâncias. A desreplicação por meio de uma biblioteca de padrões identificou com segurança 49 metabólitos secundários. Por meio da correlação *in silico* com os dados de inibição enzimática, foram determinados com êxito os principais biomarcadores dos extratos e obteve-se um modelo de regressão confiável para predição do potencial de inibição de novos extratos provindos de espécies ainda não testadas frente à *LmDHODH*, classificando-os como ativos ou inativos com base exclusivamente na sua impressão digital por UHPLC-ESI-HRFTMS; 3) Estudos de QSAR com 21 STLs: o modelo de QSAR baseado em descritores moleculares apresentou robustez e confiabilidade ($R^2 / Q^2 / P^2 > 0,6$ e $RMSE < 0,3$), revelando que uma maior inibição desta enzima requer a distribuição balanceada das regiões hidrofóbicas através da superfície molecular, maior largura das moléculas e menor hidrofobicidade. O modelo 3D baseado em descritores farmacofóricos também foi útil (R^2 : 0,79; Q^2 : 0,55) e confirmou a importância da orientação adequada dos ligantes, propriedades superficiais e formato das moléculas, refletindo propriedades de um possível sítio de ligação para as STLs na enzima. Portanto, alguns dos produtos naturais testados nesta triagem *in vitro* são, de fato, capazes de inibir seletivamente a enzima *LmDHODH*, tratando-se de uma descoberta relevante, visto que uma infinidade de metabólitos secundários leishmanicidas já foram descritos, porém, para a maioria deles, o mecanismo de ação segue desconhecido. Os resultados evidenciaram (1) as espécies de Asteraceae como importante fonte na busca por novos inibidores desta enzima e (2) as substâncias mais ativas como ponto de partida para novas estruturas guias (*lead compounds*) visando novos fármacos antiparasitários para o tratamento de DNs, especialmente a leishmaniose.

Palavras-chave: Diidroorotato desidrogenase. *Leishmania major*. Asteraceae. Metabolômica. *Quantitative Structure-Activity Relationships*.

ABSTRACT

CHIBLI, L. A. **Screening of inhibitors of *Leishmania major* DHODH in Asteraceae: metabolomic studies and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR)**. 2018. 188f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The flavoenzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) catalyzes the fourth reaction of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway, standing out as a key molecular target for trypanosomatid parasites causing Neglected Diseases (NDs). In view of the global demand for new therapies for such diseases, this study aimed for the *in vitro* screening of inhibitors of *Leishmania major* DHODH (*Lm*DHODH) in Asteraceae, accompanied by metabolomic approach with UHPLC-ESI-HRFTMS for plant extracts and QSAR studies (Quantitative Structure-Activity Relationships) for isolated compounds. The experimental steps performed and the results obtained were: 1) Enzymatic assays: the IC₅₀ values were determined for 59 plant extracts (Δ IC₅₀: 148.0 μ g.mL⁻¹ a 9.4 mg.mL⁻¹) and 57 natural compounds (Δ IC₅₀: 27.0 μ M a 2.6 mM). The most active compounds showed selectivity against *Lm*DHODH by exercising irrelevant inhibition of human DHODH. In addition, thermostability studies have confirmed that sesquiterpene lactones (STLs) are indeed capable of binding to this enzyme; 2) Metabolomic studies: the metabolic fingerprints by LC-MS were successfully obtained for the 59 extracts and 3,694 peaks/compounds were provided after data processing. The dereplication using a library of natural compounds has safely identified 49 secondary metabolites. By means of *in silico* correlation with the enzymatic inhibition data, the main biomarkers of the extracts were successfully determined and a reliable regression model was obtained to predict the inhibition potential of new extracts from species not yet tested against *Lm*DHODH, classifying it as active or inactive based solely on their fingerprint by UHPLC-ESI-HRFTMS; 3) QSAR studies with 21 STLs: a reliable QSAR model based on molecular descriptors was obtained (R^2 / Q^2 / P^2 > 0.6 and RMSE < 0.3), which indicated that stronger inhibition requires a balanced distribution of the hydrophobic regions across the molecular surface, as well as higher width and lower hydrophobicity of the molecules. A pharmacophore-based 3D-QSAR approach also afforded a useful model (R^2 : 0.79; Q^2 : 0.55), which confirmed the importance of proper orientation of the ligands, molecular surface features and shape for stronger inhibition, reflecting properties of a putative common binding site. Thus, some of the natural products tested in this *in vitro* screening are actually capable of selectively inhibiting *Lm*DHODH. This constitutes a relevant finding, since an infinity of leishmanicidal compounds have been described, however, for most of them, the mechanism of action remains unknown. The results highlighted (1) Asteraceae species as important sources of new *Lm*DHODH inhibitors and (2) the most active metabolites as promising starting points for new led compounds aiming new antiparasitic drugs for treatment of NDs caused by trypanosomatids, especially leishmaniasis.

Keywords: Dihydroorotate dehydrogenase. *Leishmania major*. Asteraceae. Metabolomics. Quantitative Structure-Activity Relationships.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema geral da reação catalisada pela flavoenzima <i>LmDHODH</i>	02
Figura 2 – Resumo gráfico com o fluxo de trabalho (<i>workflow</i>) da triagem <i>in vitro</i> de inibidores da enzima <i>LmDHODH</i> envolvendo os extratos de <i>Asteraceae</i>	10
Figura 3 – Resumo gráfico com o fluxo de trabalho (<i>workflow</i>) da triagem <i>in vitro</i> de inibidores da enzima <i>LmDHODH</i> envolvendo as substâncias isoladas.....	11
Figura 4 – Espectro de absorção padrão da solução de <i>LmDHODH</i>	13
Figura 5 – Etapas experimentais dos ensaios de cinética enzimática com os extratos de <i>Asteraceae</i>	15
Figura 6 – Estrutura química das 21 STLs.....	23
Figura 7 – SDS-PAGE-14% do processo de purificação da proteína <i>LmDHODH</i>	29
Figura 8 – Gráficos dos dados gerados nos ensaios de inibição enzimática <i>in vitro</i> de <i>LmDHODH</i> por monitoramento espectrofotométrico.....	30
Figura 9 – Distribuição dos valores de IC ₅₀ dos 59 extratos frente à enzima <i>LmDHODH</i>	33
Figura 10 – Sobreposição da impressão digital metabólica por UHPLC-ESI-HRFTMS (modo de ionização negativo) dos extratos das 59 espécies de <i>Asteraceae</i> (TIC - cromatograma de íons totais)	42
Figura 11 – Sobreposição da impressão digital metabólica por UHPLC-ESI-HRFTMS (modo de ionização positivo) dos extratos das 59 espécies de <i>Asteraceae</i> (TIC - cromatograma de íons totais).....	42
Figura 12 – Cromatogramas da amostra 130 (extrato de <i>Pluchea quitoc</i> , triplicata), obtidos através de UHPLC-ESI-HRFTMS no modo de ionização negativo.....	43
Figura 13 – Cromatogramas obtidos através de UHPLC-ESI-HRFTMS no modo de ionização negativo para a amostra 130 (extrato de <i>Pluchea quitoc</i>) e duas substâncias identificadas nela, os ácidos 5-O- <i>E</i> -cafeoilquínico e 4,5-di-O- <i>E</i> -cafeoilquínico.....	49
Figura 14 – Espectros de MS/MS (<i>full-scan</i>) em [M-H] ⁻ do pico com t _R 1,08 min (A) da amostra 130 (extrato de <i>Pluchea quitoc</i> DC.) e do padrão de ácido quínico (B).....	50

Figura 15 – Espectros de MS/MS (<i>full-scan</i>) em $[M-H]^-$ do pico com t_R 8,80 min (A) da amostra 130 (extrato de <i>Pluchea quitoc</i> DC.) e do padrão de ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico (B).....	51
Figura 16 – PCA com as variáveis x das 59 amostras (em triplicata, modo negativo): gráfico dos valores de <i>score</i> (t) da PC-1 (12%) vs PC-2 (5%).....	53
Figura 17 – OPLS com as variáveis x e y das amostras (em triplicata, modo negativo): gráfico dos valores de <i>score</i> (t) da LV-1 (52%, única componente preditiva) vs LV-2 (16%, componente ortogonal-1).....	55
Figura 18 – <i>S-plot</i> da análise por OPLS-DA das amostras, em triplicata, no modo de ionização negativo.....	56
Figura 19 – Mapa de calor (<i>heatmap</i>) das 51 substâncias selecionadas como possíveis biomarcadores dos 59 extratos no modo de ionização negativo.....	58
Figura 20 – Gráficos de dispersão dos valores de pIC_{50} experimental <i>versus</i> previsto (esquerda) e seus respectivos gráficos de resíduo (direita) para o modelo selecionado (Equação 12)	69
Figura 21 – Gráfico de correlação entre os valores de pIC_{50} calculado na calibração e previsto na validação cruzada.....	71
Figura 22 – Matriz de correlação (r) entre a atividade e os descritores do modelo selecionado (Equação 12)	72
Figura 23 – Representações gráficas das superfícies moleculares das STLs 18, 5 e 9	77
Figura 24 – Farmacóforos em comum selecionados para o alinhamento das STLs 18 (azul) e 5 (cinza).....	78
Figura 25 – Gráficos de dispersão dos valores de pIC_{50} experimental <i>versus</i> previsto (esquerda) e seus respectivos gráficos de resíduo (direita) para o modelo selecionado (Equação 13)	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de IC ₅₀ dos extratos das 59 espécies de Asteraceae frente à enzima <i>LmDHODH</i>	31
Tabela 2 – Valores de IC ₅₀ das 57 substâncias testadas frente à enzima <i>LmDHODH</i>	34
Tabela 3 – Validação de seletividade: valores de inibição frente à <i>HsDHODH</i> das substâncias mais ativas contra <i>LmDHODH</i>	37
Tabela 4 – Valores de ΔT_m (°C) para as substâncias nas três concentrações testadas com <i>LmDHODH</i> em ambos os experimentos (<i>ThermoFMN</i> e <i>Thermofluor/SYPRO</i>)	40
Tabela 5 – Substâncias identificadas na desreplicação dos 59 extratos de Asteraceae analisados por UHPLC-ESI-HRFTMS.....	47
Tabela 6 – Parâmetros estatísticos dos modelos de OPLS-DA para descoberta de biomarcadores dos extratos para inibição <i>in vitro</i> de <i>LmDHODH</i>	54
Tabela 7 – Biomarcadores correlacionados com a inibição <i>in vitro</i> da enzima <i>LmDHODH</i> e identificados em nível 1.....	60
Tabela 8 – Parâmetros estatísticos dos modelos de OPLS para classificação de novos extratos quanto ao potencial de inibição <i>in vitro</i> de <i>LmDHODH</i>	61
Tabela 9 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR obtidos por FS-PLS.....	64
Tabela 10 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR obtidos por BE-PLS.....	64
Tabela 11 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR obtidos pelo método de seleção GA-MLR seguido de regressão por PLS....	65
Tabela 12 – Descritores dos melhores modelos obtidos nos três blocos de descritores, selecionados por GA.....	65
Tabela 13 – Valores dos descritores para as 21 STLs, valores de pIC ₅₀ observados (experimentais) e previstos obtidos com o modelo de QSAR selecionado (Equação 12) e seus respectivos resíduos.....	68
Tabela 14 – Parâmetros estatísticos dos modelos obtidos por diferentes combinações dos descritores do modelo selecionado (Equação 12)	72
Tabela 15 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR 3D com os descritores farmacofóricos.....	79
Tabela 16 – Valores dos descritores para as 21 STLs, valores de pIC ₅₀ observados (experimentais) e previstos obtidos com o modelo de QSAR 3D selecionado (Equação 13) e seus respectivos resíduos...	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC	<i>Automatic Gain Control</i>
AIF	<i>All-Ions Fragmentation</i>
AM1	<i>Austin Model 1</i>
ANN	<i>Artificial Neural Network</i> ou Redes Neurais Artificiais
APD	<i>Applicability Domain</i> ou Domínio de Aplicabilidade
AsterDB	<i>Asteraceae Database</i> ou Banco de dados de Asteraceae
BE	<i>Backward Elimination</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Services</i>
CV	<i>Cross-Validation</i> ou Validação Cruzada
DHO	<i>Dihydroorotate</i> ou Diidroorotato
DHODH	<i>Dihydroorotate dehydrogenase</i> ou Diidroorotato desidrogenase
DNs	Doenças Negligenciadas
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> ou Fluorimetria de Varredura Diferencial
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> ou Ionização por <i>Electropray</i> (spray eletrolítico)
EtOH	Etanol
FS	<i>Forward Selection</i>
FUM	<i>Fumarate</i> ou Fumarato
GA	<i>Genetic Algorithm</i> ou Algoritmo Genético
GUI	<i>Graphical User Interface</i> ou Interface Gráfica com o Usuário
H-ESI	<i>Heated Electrospray Ionization</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HRFTMS	<i>High Resolution Fourier Transformation Mass Spectrometry</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% da Atividade Enzimática
InChI	<i>IUPAC International Chemical Identifier</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LowModeMD	<i>Low Mode Molecular Dynamics</i>
LOF	<i>Lack of fit</i> ou Falta de Ajuste
LOO	<i>Leave-one-out</i>
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
m/z	<i>mass-to-charge ratio</i> ou razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> ou Regressão Linear Múltipla
Mol file	<i>Molecular file</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i> ou Espectrometria de Massa
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLS	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i> ou Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais
ORO	<i>Orotate</i> ou Orotato
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> ou Análise de Componentes Principais
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> ou Reação em cadeia da Polimerase
PLS	<i>Partial Least Squares</i> ou Mínimos Quadrados Parciais
QSAR	<i>Quantitative Structure–Activity Relationship</i> ou Relação Quantitativa da Estrutura-Atividade
RMSE	<i>Root Mean Squared Error</i> ou Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio
rpm	Rotações por Minutos
SQ	<i>Sum of Squares</i> ou Soma Quadrática
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
STLs	Lactonas Sesquiterpênicas (<i>Sesquiterpene lactones</i>)
<i>t_R</i>	Tempo de Retenção
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> ou Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV	<i>Ultraviolet</i> ou ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
σ	Sigma
Δ	Variação
Σ	Somatório
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
TM	<i>Trademark</i>
®	Marca Registrada
©	<i>Copyright</i>

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
Lista de símbolos.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	08
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	09
3.1 Amostras empregadas na triagem <i>in vitro</i> de inibidores de <i>LmDHODH</i>	09
3.1.1 Material vegetal.....	09
3.1.2 Preparo dos extratos.....	12
3.1.3 Substâncias isoladas.....	12
3.2 Avaliação do potencial de inibição <i>in vitro</i> da enzima <i>LmDHODH</i>.....	13
3.2.1 Expressão e purificação da enzima <i>LmDHODH</i>	13
3.2.2 Avaliação do potencial inibitório dos extratos de Asteraceae.....	13
3.2.3 Avaliação do potencial inibitório das substâncias isoladas.....	15
3.2.3.1 Ensaios de termoestabilidade baseados em fluorimetria de varredura diferencial.....	16
3.3 Estudos metabolômicos.....	17
3.3.1 Aquisição dos dados.....	17
3.3.2 Processamento dos dados.....	18
3.3.3 Análises quimiométricas dos dados.....	19
3.3.3.1 Descoberta de biomarcadores.....	19
3.3.3.2 Modelos de predição.....	20
3.3.4 Identificação de metabólitos.....	21
3.4 Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) de lactonas sesquiterpênicas para inibição <i>in vitro</i> da enzima <i>LmDHODH</i>.....	22
3.4.1 Estudos de QSAR baseado em descritores moleculares.....	22
3.4.1.1 Modelagem molecular e otimização da geometria.....	22
3.4.1.2 Geração de descritores.....	24

3.4.1.3 Seleção dos descritores e construção dos modelo.....	24
3.4.1.4 Validação dos modelos.....	26
3.4.2 Estudos de QSAR 3D baseado em descritores farmacofóricos.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Avaliação do potencial de inibição <i>in vitro</i> da enzima <i>LmDHODH</i>.....	29
4.1.1 Avaliação do potencial inibitório dos extratos de Asteraceae.....	29
4.1.2 Avaliação do potencial inibitório das substâncias isoladas.....	34
4.1.2.1 Ensaios de termoestabilidade baseados em fluorimetria de varredura diferencial.....	39
4.2 Estudos metabolômicos.....	42
4.2.1 Descoberta de biomarcadores e desreplicação.....	52
4.2.2 Modelo de predição.....	61
4.3 Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) de lactonas sesquiterpênicas para inibição <i>in vitro</i> da enzima <i>LmDHODH</i>.....	63
4.3.1 Estudos de QSAR baseado em descritores moleculares.....	63
4.3.2 Estudos de QSAR 3D baseado em descritores farmacofóricos.....	75
5 CONCLUSÕES.....	83
6 REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICES.....	102

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Negligenciadas (DNs), de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) compreendem um grupo de 20 doenças infecciosas extremamente severas, especialmente as causadas por protozoários, como a tripanossomíase africana (*Trypanosoma brucei*), doença de Chagas (*T. cruzi*) e leishmaniose (*Leishmania* spp.), as quais afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente em regiões de clima tropical como África e América Latina, sendo prevalentes em cerca de 149 países[1–3]. São endêmicas em populações pobres vivendo em condições precárias de higiene e saúde e recebem essa classificação pela falta de investimentos e atenção dos programas de saúde pública. Os critérios para classificar uma doença como DN propostos pela OMS são: afeta população em estado de pobreza; elevada morbidade e mortalidade; gera cicatrizes e discriminação; afeta regiões tropicais e subtropicais; são passíveis de controle, eliminação e erradicação; relativamente negligenciadas na pesquisa[1,4–6].

A leishmaniose é um conjunto de doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, distribuídos em mais de 20 espécies destes tripanosomatídeos (ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae), os quais são transmitidos ao hospedeiro humano pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas (ordem Diptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotominae)[7,8]. Esta doença é uma das seis mais importantes no mundo, visto que mais de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas com risco de infecção[1,4]. Existem diversas manifestações clínicas desta doença, sendo as principais a visceral, cutânea e mucocutânea. Estas provocam, respectivamente, infecção visceral disseminada, lesões ulceradas na pele, e inflamação e destruição da mucosa. *Leishmania major* é uma das 15 espécies, aproximadamente, causadoras de leishmaniose cutânea, a mais comum entre as três formas desta doença, com mais de um milhão de casos relatados nos últimos cinco anos[1,8].

O controle efetivo das DNs somente é possível por meio da combinação de diversas abordagens de saúde pública, custando bilhões de dólares por ano aos países afetados[9,10]. A demanda por novas alternativas terapêuticas para estas doenças é uma necessidade global, pois as poucas terapias disponíveis são associadas a severos efeitos adversos e alta toxicidade[3,9–11]. Novos alvos

moleculares de parasitos causadores destas doenças têm sido descobertos, constituindo interessantes alternativas para a triagem e planejamento de novos fármacos antiparasitários[12,13]. Entre eles destaca-se a flavoenzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), a qual catalisa a quarta reação da via *de novo* de biossíntese de pirimidinas (Figura 1)[14,15].

A sobrevivência e proliferação de tripanosomatídeos nos hospedeiros mamíferos dependem em grande parte da síntese *de novo*, uma vez que a via de salvação possui apenas uma limitada atividade nestes parasitos[16]. Os nucleotídeos de pirimidina exercem função vital nas células, especialmente na síntese de DNA e RNA[17]. Consequentemente, experimentos com *knock out* do gene de DHODH em *T. cruzi* levaram à inviabilidade celular[18] e *knockdown* da expressão de DHODH em *T. brucei* inibiu o crescimento do parasito[19].

Figura 1 – Esquema geral da reação catalisada pela flavoenzima *LmDHODH*. DHO: diidroorotato; FMN: flavina mononucleotídeo; ORO: orotato; FUM: fumarato; SUC: succinato.

Fonte: Adaptado de Reis et al. (2016)[20].

Encontrada em todos os organismos, esta enzima pode ser dividida em Classe 1, a qual é subdividida em 1A e 1B, e Classe 2. Enzimas de Classe 1 estão presentes em bactérias Gram-positivo e organismos eucariontes unicelulares.

Tripanosomatídeos expressam DHODH Classe 1A, uma proteína homodimérica localizada no citosol. As DHODHs Classe 2 são enzimas monoméricas encontradas na membrana mitocondrial interna de eucariontes, tais como humanos (*HsDHODH*) e *Plasmodium falciparum* (*PfDHODH*)[14,21,22].

A reação catalisada pela DHODH consiste na oxidação estéreo-seletiva do (S)-dihidroorotato (DHO) em orotato (ORO), como representado na Figura 1. O ciclo catalítico desta enzima é dependente de FMN (flavina mononucleotídeo) e consiste em duas meia reações (mecanismo “pingue-pongue” ou de dupla troca). A primeira meia-reação é redutiva, com o DHO reduzindo o FMN. Enquanto a segunda meia-reação é oxidativa, reoxidando o FMN reduzido por meio de um substrato oxidante, cuja natureza varia de acordo com a classe de DHODH. Para as enzimas da classe 1A este segundo substrato é o fumarato[14,20,23].

Inibidores seletivos de DHODH Classe 2 constituem fármacos consolidados para o tratamento de diversas doenças, como artrite reumatoide (Leflunomide/Arava®); câncer e imunossupressão (Brequinar); e malária (Atavacone/Malarone®)[24–28]. Em contrapartida, poucos inibidores Class 1A-seletivos foram descobertos, estando limitados atualmente a análogos do benzoato de pirimidina e orotato, nenhum deles de origem vegetal[29–31]. Não há ainda nenhum resultado relevante na literatura para a inibição de *LmDHODH*, enfatizando a relevância e caráter inovativo desta triagem sem precedentes de produtos naturais (PN), extratos e substâncias, as quais foram em grande parte isoladas de espécies de Asteraceae.

Os PN de origem vegetal, microbiológica e marinha sempre desempenharam papel central na descoberta de novos fármacos. Em um universo de 1.562 novas substâncias aprovadas pelo FDA (*Food and Drugs Administration*, EUA) até o ano de 2014, 50% são PN ou derivados (com presença de farmacóforos ou mimetizando substâncias naturais). Paclitaxel (taxol®, *Taxus brevifolia*, anticancerígeno), vincristina (*Catharanthus roseus*, anticancerígeno), podofilotoxina (etoposide, *Podophyllum hexandrum*, anticancerígeno), morfina (*Papaver somniferum*, anestésico), quinina (*Chichona* sp., antimalárico) e artemisinina (*Artemisia annua*, antimalárico) são alguns exemplos de metabólitos secundários vegetais, também denominados por PN, que constituem fármacos conhecidos [32–37].

Produtos naturais derivados de plantas constituem um ponto de partida extremamente importante na busca por novas terapias para DNs, devido à vasta

diversidade química e potencial antiparasitário amplamente conhecidos[5,6]. A família Asteraceae (Compositae) é composta por cerca de 1.300 gêneros e 23.000 espécies, tratando-se de uma das famílias dominantes no planeta, ausente somente na Antártica[38]. É extensamente utilizada na medicina tradicional, com espécies que possuem importantes atividades farmacológicas e biológicas já confirmadas, dentre elas a antiparasitária, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana[39–42]. A atividade antiprotozoária foi confirmada em diversas destas plantas (Apêndice Q) e seus metabólitos secundários (Apêndice S)[43–47], exemplificado pela famosa atividade antimalárica da *Artemisia annua* L. e seu princípio ativo artemisinina (Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2015)[48].

As lactonas sesquiterpênicas (STLs) são terpenoides com uma estrutura isoprenoide contendo uma função lactona, e consistem nos principais marcadores taxonômicos de Asteraceae, visto que mais de 5.000 estruturas distribuídas em mais de 30 diferentes subtipos de esqueletos já foram identificadas em taxa desta família vegetal[49–51]. Atividades *in vitro* leishmanicida e tripanosomicida têm sido descritas para várias STLs[52–56], porém, para a maioria delas, o mecanismo de ação ainda não foi elucidado. Estudos *in silico* apontaram germacranolidos e guaianolidos como potenciais inibidores de DHODH de *Leishmania major* (LmDHODH)[57].

Com o advento da era “*big data*”, o desenvolvimento de grandes bibliotecas de substâncias sintéticas e das triagens de alto rendimento (HTS – *High-Throughput Screening*) empregando inúmeros alvos moleculares fez com que empresas reduzissem os investimentos em P&D na área de PN, aproximadamente no início dos anos 2000[58–61]. Porém, a descoberta de fármacos de origem natural ganhou novo fôlego a partir da compatibilização de bibliotecas de PN com tecnologias de HTS[58,62,63]. As bibliotecas de PN constituem coleções de extratos, frações ou substâncias puras, contidas em sistemas que permitam fácil acesso e análise, como microplacas com 96-384 poços[62,64,65].

Devido à elevada complexidade química das bibliotecas de extratos, sua utilização em triagens por novos fármacos, seja em escala maior (indústria) ou menor (academia), tem sido otimizada por meio de estudos metabolômicos aliados a métodos *in silico* (ferramentas de quimioinformática/quimiometria)[66–68]. Trata-se de uma abordagem que possibilita uma análise em alta performance da constituição química, com rápida identificação dos metabólitos (desreplicação); e correlação com dados de atividade biológica por meio de métodos estatísticos multivariados

supervisionados (e.g. PLS – *Partial Least Squares* e OPLS – *Orthogonal Partial Least Squares*) para identificar substâncias ativas (biomarcadores), falsos positivos, pró-fármacos, sinergismos e mecanismos de ação [69–73].

O metaboloma consiste no conjunto de todos os metabólitos presentes em um organismo ou matriz biológica complexa. O sufixo “oma” vem do grego “todos” ou “completo”, razão pela qual foi inicialmente utilizado nos termos genoma, transcriptoma e proteoma, nos quais se baseiam as respectivas plataformas biotecnológicas “ômicas” (“*omics*”)[74–77]. Os estudos metabolômicos envolvem diferentes abordagens, sendo estas as principais[74,76,78,79]:

- a) impressão digital metabólica (*fingerprint*, método não direcionado): análise rápida de alta performance de todos os metabólitos detectáveis na amostra sob determinadas condições, com ou sem identificação dos mesmos (sem quantificação);
- b) perfil metabólico (método direcionado): identificação e, geralmente, quantificação de um grupo pré-definido de metabólitos de interesse;
- c) metabolômica (propriamente dita, método não direcionado): análise abrangente qualitativa e quantitativa de todos (ou máximo possível) os metabólitos presentes na amostra, por meio de técnicas analíticas de alta performance.

A metodologia de impressão digital metabólica, de acordo com a técnica de análise a ser utilizada, gera um registro instantâneo da constituição química das amostras sob determinadas condições e este tipo de abordagem tem se demonstrado extremamente útil na análise de agrupamento ou classificação, como, por exemplo, diferenciar amostras ativas e inativas frente à determinado organismo patogênico ou alvo molecular[79–82]. Atualmente, devido à rapidez, abrangência, altíssima sensibilidade e performance (resolução e exatidão), a técnica de escolha para este tipo de estudo tem sido a cromatografia líquida de ultraeficiência (UHPLC - *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI ou outra fonte de ionização à pressão atmosférica) e analisador de massa de alta resolução (HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*), como *Orbitrap* ou *Q-TOF* (*quadrupole + time-of-flight*)[83–88].

Porém, nenhuma técnica é capaz, por si só, de caracterizar todos os metabólitos de uma matriz biológica complexa, de forma que, quando o objetivo é percorrer ao máximo o metaboloma, se faz necessário combinar diferentes

tecnologias, dentre elas a ressonância magnética nuclear (NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*); HPLC-UV-MS e GC(*Gas Chromatography*)-MS[86,89–92].

A literatura científica sobre metabolômica, e sua ampla gama de aplicações[82,93–97], abarca por completo cada etapa do fluxo de trabalho (*workflow*): preparo de amostras[98–100] e aquisição[83,85,101], processamento [102–105] e análise[106–108] dos grandes conjuntos de dados gerados. Adicionalmente, diversos esforços já foram realizados no intuito de padronizar e estabelecer critérios mínimos para execução dos experimentos e descrição das condições empregadas e dos resultados obtidos, especialmente na desreplicação para identificação de substâncias[109–114].

Desreplicação nada mais é do que uma análise qualitativa, ou seja, processo de identificação de determinadas substâncias presentes nas amostras, sem que necessitem ser isoladas. A viabilidade deste procedimento está atrelada à disponibilidade de bancos de dados e outras ferramentas de quimioinformática [65,68,91,113,115–118]. Bancos de dados podem ser definidos como conjuntos de informações relacionados a um ou mais assuntos (e.g. propriedades físico-químicas de substâncias, como dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos), organizados para permitir que interessados possam consulta-los local ou remotamente[60,119–122]. A quimioinformática, por sua vez, pode ser definida como a área na fronteira entre a química e a informática, abrangendo o delineamento, geração, organização, manipulação, recuperação, análise, disseminação, visualização e uso de dados químicos[120,123].

As substâncias que tomaram parte nesta primeira triagem de produtos naturais para inibição de *LmDHODH* vieram da biblioteca de substâncias do grupo de pesquisa AsterBioChem (*AsterLib I*) e foram isoladas de espécies de *Asteraceae* que compõem a biblioteca de extratos (*AsterLib II*). Informações destas duas bibliotecas somadas a dados da literatura integram o banco de dados *in-house AsterDB (Asteraceae Database)*[121,122]. Para explorar a atividade biológica e extrair informações de fontes tão complexas como estas bibliotecas de PN[62,63], ferramentas de quimioinformática, amplamente utilizadas na área de Química Farmacêutica para substâncias sintéticas, têm sido recorridas com êxito, especialmente a Modelagem Molecular (*Molecular Modelling*), Triagem Virtual (*Virtual Screening*) e QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*)[68,124].

Os descritores moleculares, coração da modelagem de QSAR, estão em constante evolução, com novas formas de representar as informações estruturais sendo constantemente desenvolvidas, aumentando e diversificando as aplicações[125–127]. Diferentes abordagens têm sido utilizadas para revelar os mecanismos subjacentes à atividade antiparasitária de produtos naturais, permitindo melhor compreensão desta seletividade biológica[128–130].

A disponibilidade de métodos modernos de mineração de dados (*data mining*) para redução e seleção de variáveis, construção e validação de modelos aumentaram os padrões de exigência nos estudos de QSAR[131,132]. A interpretação e aplicabilidade destes modelos dependem de sua confiabilidade e poder de predição, os quais requerem parâmetros estatísticos bem estabelecidos e boas práticas em QSAR[126,133–135].

O método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS – *Partial Least Squares*) tem se destacado como a principal técnica de regressão para análise de dados multivariados. É obtido de maneira semelhante à Análise de Componente Principais (PCA – *Principal Component Analysis*), porém, este método supervisionado decompõe as matrizes de ambas as variáveis, x (independente) e y (dependente), alcançando máxima correlação entre os dois conjuntos de *scores*. De fato, a regressão por PLS é a técnica de aprendizado de máquina (*machine learning*), i.e. método estatístico dirigido por dados, mais aplicada para modelagem de QSAR, proporcionando modelos robustos que levam em consideração os erros tanto dos descritores como dos dados de atividade[136,137]. Outros métodos para construção de modelos (calibração) sejam eles mais simples, como a Regressão Linear Múltipla (*Multiple Linear Regression*, MLR), ou mais complexos, tais como as Redes Neurais Artificiais (*Artificial Neural Networks*, ANN), também podem ser aplicados efetivamente[138].

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi realizar a triagem de extratos e substâncias puras isoladas de Asteraceae com potencial de inibição *in vitro* da enzima DHODH classe 1A de *L. major* (*LmDHODH*), acompanhada por abordagem metabolômica em UHPLC-UV-HRFTMS aliada a métodos *in silico* para os extratos vegetais e estudos de QSAR (*Quantitative-Structure Activity Relationship*) para as substâncias isoladas.

Objetivos específicos:

- a) Avaliar o potencial dos extratos vegetais e substâncias puras isoladas das espécies de Asteraceae para inibição *in vitro* da enzima *LmDHODH*;
- b) Obter as impressões digitais metabólicas das espécies de Asteraceae por UHPLC-ESI-HRFTMS e, quando possível, realizar desreplicação;
- c) Correlacionar os dados obtidos, por meio de análises quimiométricas, para determinar nos extratos quais as substâncias que mais contribuem para a atividade (biomarcadores) e, quando possível, desreplicá-las;
- d) Desenvolver e validar um modelo de regressão capaz de prever (classificar) com segurança se determinado extrato de uma espécie de Asteraceae, ainda não testada frente à *LmDHODH*, é ativo ou inativo com base exclusivamente na sua impressão digital por UHPLC-ESI-HRFTMS;
- e) Estabelecer modelos confiáveis de QSAR visando interpretação mecanística de quais e como as características estruturais de STLs influenciam a inibição desta enzima, além de prever a atividade de novas STLs e/ou outras substâncias que atendam ao domínio de aplicabilidade do modelo (APD – *Applicability Domain*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 2 – Resumo gráfico com o fluxo de trabalho (*workflow*) da triagem *in vitro* de inibidores da enzima *LmDHODH* envolvendo os extratos de Asteraceae

Fonte: o próprio autor.

Figura 3 – Resumo gráfico com o fluxo de trabalho (*workflow*) da triagem *in vitro* de inibidores da enzima *LmDHODH* envolvendo as substâncias isoladas

Fonte: o próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 CONCLUSÕES

Pela primeira vez, produtos naturais (extratos e substâncias isoladas) foram testados para inibição de *LmDHODH* e os resultados indicam que, de fato, estes são capazes de inibi-la seletivamente (em relação a *HsDHODH*). Esta é uma relevante descoberta, visto que uma infinidade de metabólitos secundários leishmanicidas já foram descritos, porém, para a maioria deles, o mecanismo de ação segue desconhecido. Os resultados obtidos reafirmam o potencial antiparasitário de espécies da família Asteraceae, evidenciando (1) os extratos vegetais como uma interessante fonte na busca por novos inibidores seletivos desta enzima e (2) as substâncias mais ativas como ponto de partida para novas estruturas guias (*lead compounds*) na busca por novos fármacos antiparasitários para o tratamento de DNs causadas por tripanossomatídeos, especialmente a leishmaniose.

Os modelos empíricos obtidos através de ferramentas metabolômicas e quimiométricas possibilitaram (1) a descoberta de inibidores de *LmDHODH* (biomarcadores) em Asteraceae e (2) a predição da atividade de novos extratos de espécies de Asteraceae ainda não testadas *in vitro*, classificando-as como ativas ou inativas. Portanto, estes resultados evidenciam o potencial de aplicação desta abordagem metabolômica aliada a métodos *in silico*, cujos modelos fornecidos poderão (1) ser extrapolados para outras DHODH Classe 1A e (2) ser utilizados rotineiramente pelo grupo de pesquisa para triagem de novos extratos ativos e de seus marcadores biológicos, evitando o desperdício de tempo e dinheiro com experimentos baseados em “tentativa e erro”, testando em vão extratos inativos e substâncias que, após longo processo de isolamento, mostrem-se incapazes de inibir tal enzima. Neste tipo de abordagem é essencial a aplicação de técnicas analíticas de alta performance, visto que a maioria dos biomarcadores foram metabólitos minoritários.

Os ensaios de DSF, devido à variação observada de T_m , foram capazes de confirmar que as STLs são capazes de se ligar efetivamente à enzima *LmDHODH*. Além disso, sugeriu que tais inibidores pudessem atuar em um sítio diferente do sítio ativo. Ambas as abordagens de QSAR foram capazes de esclarecer novos e úteis requisitos estruturais das STLs para inibição deste alvo. No entanto, apenas o QSAR clássico com descritores 2D e 3D forneceu um modelo confiável, capaz de prever a atividade de novas STLs e outras substâncias estruturalmente relacionadas.

6 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO) - Neglected Diseases. Available online: http://www.who.int/neglected_diseases/en/ (accessed on Aug 2, 2017).
2. World Health Organization (WHO). Recommendations for the Adoption of Additional Diseases As Neglected Tropical Diseases Available online: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/Adoption_additional_NTDs.pdf. (accessed on Aug 2, 2017).
3. Molyneux, D. H. Neglected tropical diseases: Now more than just “other diseases”- the post-2015 agenda. *Int. Health* **2014**, 6, 172–180, doi:10.1093/inthealth/ihu037.
4. Molyneux, D. H. The “Neglected Tropical Diseases”: now a brand identity; responsibilities, context and promise. *Parasit. Vectors* **2012**, 5, 23, doi:10.1186/1756-3305-5-23.
5. Schmidt, T. J.; Khalid, S. A.; Romanha, A. J.; Alves, T. M. A.; Biavatti, M. W.; Brun, R.; Da Costa, F. B.; de Castro, S. L.; Ferreira, V. F.; de Lacerda, M. V. G.; Lago, J. H. G.; Leon, L. L.; Lopes, N. P.; das Neves Amorim, R. C.; Niehues, M.; Ogungbe, I. V.; Pohlit, A. M.; Scotti, M. T.; Setzer, W. N.; Soeiro, M. N. C.; Steindel, M.; Tempone, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 2176–228.
6. Schmidt, T. J.; Khalid, S. A.; Romanha, A. J.; Alves, T. M. A.; Biavatti, M. W.; Brun, R.; Da Costa, F. B.; de Castro, S. L.; Ferreira, V. F.; de Lacerda, M. V. G.; Lago, J. H. G.; Leon, L. L.; Lopes, N. P.; das Neves Amorim, R. C.; Niehues, M.; Ogungbe, I. V.; Pohlit, A. M.; Scotti, M. T.; Setzer, W. N.; Soeiro, M. N. C.; Steindel, M.; Tempone, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 2128–75.
7. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2016**, 285–296, doi:10.1186/1750-9378-2-15.Voir.
8. Goto, H.; Lindoso, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, 26, 293–307, doi:10.1016/j.idc.2012.03.001.
9. World Health Organization (WHO). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. Available online: http://www.who.int/neglected_diseases/LOP_WHO_meeting_investment_impact_control_NTD.pdf (accessed on Aug 2, 2017).
10. Moran, M.; Guzman, J.; Ropars, A.; McDonald, A.; Jameson, N.; Omune, B.; Ryan, S.; Wu, L. Neglected disease research and development: How much are we really spending? *PLoS Med.* **2009**, 6, 0137–0146, doi:10.1371/journal.pmed.1000030.
11. Nwaka, S.; Ramirez, B.; Brun, R.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R. In vitro antiplasmodial and cytotoxic activities of asymmetrical pyridinium derivatives. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, 3, e440, doi:10.1371/journal.pntd.0000440.
12. Cavalli, A.; Bolognesi, M. L. Neglected tropical diseases: Multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against Trypanosoma and Leishmania. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7339–7359, doi:10.1021/jm9004835.
13. Skinner-Adams, T. S.; Sumanadasa, S. D. M.; Fisher, G. M.; Davis, R. A.; Doolan, D. L.; Andrews, K. T. Defining the targets of antiparasitic compounds. *Drug Discov. Today* **2016**, 21, 725–739, doi:10.1016/j.drudis.2016.01.002.
14. Nonato, M. C.; Costa-Filho, A. The dihydroorotate dehydrogenases. In *Handbook of Flavoproteins: Volume 1 – Oxidases, Dehydrogenases and Related Systems*; HILLE, R., MILLER, S., PALFEY, B., Eds.; De Gruyter: Berlin, 2012; pp. 297–308.
15. Cordeiro, A. T.; Feliciano, P. R.; Nonato, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase. *Acta Crystallogr.*

- Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2006**, 62, 1049–1051, doi:10.1107/S1744309106038966.
16. Hashimoto, M.; Morales, J.; Fukai, Y.; Suzuki, S.; Takamiya, S.; Tsubouchi, A.; Inoue, S.; Inoue, M.; Kita, K.; Harada, S.; Tanaka, A.; Aoki, T.; Nara, T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 417, 1002–1006, doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.073.
 17. Jones, M. E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, 49, 253–79.
 18. Annoura, T.; Nara, T.; Makiuchi, T.; Hashimoto, T.; Aoki, T. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. *J. Mol. Evol.* **2005**, 60, 113–27, doi:10.1007/s00239-004-0078-8.
 19. Arakaki, T. L.; Buckner, F. S.; Gillespie, J. R.; Malmquist, N. A.; Phillips, M. A.; Kalyuzhnyi, O.; Luft, J. R.; Detitta, G. T.; Verlinde, C. L. M. J.; Van Voorhis, W. C.; Hol, W. G. J.; Merritt, E. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. *Mol. Microbiol.* **2008**, 68, 37–50, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06131.x.
 20. Reis, R. A. G.; Ferreira, P.; Medina, M.; Nonato, M. C. The mechanistic study of *Leishmania major* dihydro-orotate dehydrogenase based on steady- and pre-steady-state kinetic analysis. *Biochem. J.* **2016**, 473, 651–660, doi:10.1042/BJ20150921.
 21. Feliciano, P. R.; Cordeiro, A. T.; Costa-Filho, A. J.; Nonato, M. C. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. *Protein Expr. Purif.* **2006**, 48, 98–103, doi:10.1016/j.pep.2006.02.010.
 22. Cordeiro, A. T.; Feliciano, P. R.; Pinheiro, M. P.; Nonato, M. C. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania major*. *Biochimie* **2012**, 94, 1739–1748, doi:10.1016/j.biochi.2012.04.003.
 23. Reis, R. A. G.; Calil, F. A.; Feliciano, P. R.; Pinheiro, M. P.; Nonato, M. C. The dihydroorotate dehydrogenases: Past and present. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, 632, 175–191, doi:10.1016/j.abb.2017.06.019.
 24. Chen, S. F.; Ruben, R. L.; Dexter, D. L. Mechanism of action of the novel anticancer agent 6-fluoro-2-(2'-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)-3-methyl-4-quinolinecarboxylic acid sodium salt (NSC 368390): inhibition of de novo pyrimidine nucleotide biosynthesis. *Cancer Res* **1986**, 46, 5014–5019.
 25. Fry, M.; Pudney, M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 1545–1553, doi:10.1016/0006-2952(92)90213-3.
 26. Goldenberg, M. New Drugs a Novel Immunomodulator of Active Rheumatoid Arthritis. *Clin. Ther.* **1999**, 21, 1837–1852.
 27. Munier-Lehmann, H.; Vidalain, P.-O.; Tangy, F.; Janin, Y. L. On dihydroorotate dehydrogenases and their inhibitors and uses. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 3148–67, doi:10.1021/jm301848w.
 28. Christopherson, R. I.; Lyons, S. D.; Wilson, P. K. Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 961–71.
 29. Palfey, B. A.; Björnberg, O.; Jensen, K. F. Specific inhibition of a family 1A dihydroorotate dehydrogenase by benzoate pyrimidine analogues. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2861–4.
 30. Cheleski, J.; Rocha, J. R.; Pinheiro, M. P.; Wiggers, H. J.; Da Silva, A. B. F.; Nonato, M. C.; Montanari, C. A. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5899–5909, doi:10.1016/j.ejmech.2010.09.055.

31. Barbosa, A. de M.; Costa, S. dos S.; da Rocha, J. R.; Montanari, C. A.; Giorgio, S. Evaluation of the leishmanicidal and cytotoxic effects of inhibitors for microorganism metabolic pathway enzymes. *Biomed. Pharmacother.* **2015**, *74*, 95–100, doi:10.1016/j.biopha.2015.07.040.
32. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461–477, doi:10.1021/np068054v.
33. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661, doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
34. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022–37, doi:10.1021/np030096l.
35. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–35, doi:10.1021/np200906s.
36. Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52–60, doi:10.1021/np9604893.
37. Patridge, E.; Gareiss, P.; Kinch, M. S.; Hoyer, D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 204–207, doi:10.1016/j.drudis.2015.01.009.
38. Funk, V. A.; Susanna, A.; Stuessy, T. F.; Bayer, R. J. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*; International Association for Plant Taxonomy: Vienna, 2009; ISBN 9783950175431.
39. Chagas-Paula, D. A.; Oliveira, R. B. De; da Silva, V. C.; Gobbo-Neto, L.; Gasparoto, T. H.; Campanelli, A. P.; Faccioli, L. H.; Da Costa, F. B. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *136*, 355–62, doi:10.1016/j.jep.2011.04.067.
40. Chagas-Paula, D.; Oliveira, T.; Faleiro, D. Outstanding anti-inflammatory potential of selected Asteraceae species through the potent dual inhibition of Cyclooxygenase-1 and 5-Lipoxygenase. *Planta* **2015**, 1296–1307.
41. Chagas-Paula, D. A.; Oliveira, T. B.; Zhang, T.; Edrada-Ebel, R.; Da Costa, F. B. Prediction of anti-inflammatory plants and discovery of their biomarkers by machine learning algorithms and metabolomic studies. *Planta Med.* **2015**, *81*, 450–458, doi:10.1055/s-0034-1396206.
42. Oliveira, R. B.; Chagas-Paula, D. A.; Secatto, A.; Gasparoto, T. H.; Faccioli, L. H.; Campanelli, A. P.; da Costa, F. B. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2013**, *23*, 497–505, doi:10.1590/S0102-695X2013005000032.
43. Nour, A. M. M.; Khalid, S. a; Kaiser, M.; Brun, R.; Abdallah, W. E.; Schmidt, T. J. The antiprotozoal activity of sixteen asteraceae species native to Sudan and bioactivity-guided isolation of xanthanolides from *Xanthium brasiliicum*. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1363–8, doi:10.1055/s-0029-1185676.
44. Ambrósio, S. R.; Arakawa, N. S.; Esperandim, V. R.; Albuquerque, S. De; Costa, F. B. Da Trypanocidal Activity of Pimarane Diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **2008**, *1415*, 1413–1415, doi:10.1002/ptr.
45. Nour, A. M. M.; Khalid, S. A.; Kaiser, M.; Brun, R.; Abdalla, W. E.; Schmidt, T. J. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *129*, 127–130, doi:10.1016/j.jep.2010.02.015.
46. Althaus, J. B.; Kaiser, M.; Brun, R.; Schmidt, T. J. Antiprotozoal activity of *Achillea ptarmica* (Asteraceae) and its main alkalamide constituents. *Molecules* **2014**, *19*, 6428–6438, doi:10.3390/molecules19056428.
47. Nogueira, M. S.; Da Costa, F. B.; Brun, R.; Kaiser, M.; Schmidt, T. J. ent-pimarane and

- ent-kaurane diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and their antiprotozoal activity. *Molecules* **2016**, *21*, 1–14, doi:10.3390/molecules21091237.
48. Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1217–1220, doi:10.1038/nm.2471.
 49. Seaman, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.* **1982**, *48*, 121–592.
 50. Schmidt, T. J. Structure-Activity Relationships of Sesquiterpene Lactones. *Stud. Nat. Prod. Chem. - Bioact. Nat. Prod. (Part M)* **2006**, *33*, 309–392, doi:10.1016/S1572-5995(06)80030-X.
 51. Padilla-Gonzalez, G. F.; Antunes, F.; Santos, D.; Batista, F.; Costa, D.; Da Costa, F. B. Critical Reviews in Plant Sciences Sesquiterpene Lactones: More Than Protective Plant Compounds With High Toxicity Sesquiterpene Lactones: More Than Protective Plant Compounds With High Toxicity. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **2016**, *351*, 18–37, doi:10.1080/07352689.2016.1145956.
 52. Schmidt, T. J.; Khalid, S. A.; Romanha, A. J.; Alves, T. M. A.; Biavatti, M. W.; Brun, R.; Da Costa, F. B.; de Castro, S. L.; Ferreira, V. F.; de Lacerda, M. V. G.; Lago, J. H. G.; Leon, L. L.; Lopes, N. P.; das Neves Amorim, R. C.; Niehues, M.; Ogungbe, I. V.; Pohlit, A. M.; Scotti, M. T.; Setzer, W. N.; Soeiro, M. N. C.; Steindel, M.; Tempone, A. G. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases - Part I. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2128–2175, doi:10.2174/092986712800229087.
 53. Fuchino, H.; Koide, T.; Takahashi, M.; Sekita, S.; Satake, M. New sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their leishmanicidal activities. *Planta Med.* **2001**, *67*, 647–653, doi:10.1055/s-2001-17349.
 54. Sülsen, V. P.; Frank, F. M.; Cazorla, S. I.; Anesini, C. A.; Malchiodi, E. L.; Freixa, B.; Vila, R.; Muschietti, L. V.; Martino, V. S. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 2415–2419, doi:10.1128/AAC.01630-07.
 55. De Toledo, J. S.; Ambrósio, S. R.; Borges, C. H. G.; Manfrim, V.; Cerri, D. G.; Cruz, A. K.; Da Costa, F. B. In vitro leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. *Molecules* **2014**, *19*, 6070–9, doi:10.3390/molecules19056070.
 56. Schmidt, T. J.; Da Costa, F. B.; Lopes, N. P.; Kaiser, M.; Brun, R. Silico prediction and experimental evaluation of furanoheliangolide sesquiterpene lactones as potent agents against *trypanosoma brucei rhodesiense*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 325–332, doi:10.1128/AAC.01263-13.
 57. Ogungbe, I. V.; Setzer, W. N. In-silico *Leishmania* target selectivity of antiparasitic terpenoids. *Molecules* **2013**, *18*, 7761–847, doi:10.3390/molecules18077761.
 58. David, B.; Wolfender, J.-L.; Dias, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem. Rev.* **2015**, *14*, 299–315, doi:10.1007/s11101-014-9367-z.
 59. Li, J. W.-H.; Vederas, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science (80-.)*. **2009**, *325*, 161–5, doi:10.1126/science.1168243.
 60. Hu, Y.; Bajorath, J. Learning from “big data”: compounds and targets. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 357–60, doi:10.1016/j.drudis.2014.02.004.
 61. Mignani, S.; Huber, S.; Tom??s, H.; Rodrigues, J.; Majoral, J. P. Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets? *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 239–249, doi:10.1016/j.drudis.2015.09.007.
 62. Camp, D.; Davis, R. a; Campitelli, M.; Ebdon, J.; Quinn, R. J. Drug-like properties: guiding principles for the design of natural product libraries. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 72–81, doi:10.1021/np200687v.

63. Quinn, R. J.; Carroll, A. R.; Pham, N. B.; Baron, P.; Palframan, M. E.; Suraweera, L.; Pierens, G. K.; Muresan, S. Developing a drug-like natural product library. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 464–8, doi:10.1021/np070526y.
64. Quinn, R. J.; Carroll, A. R.; Pham, N. B.; Baron, P.; Palframan, M. E.; Suraweera, L.; Pierens, G. K.; Muresan, S. Developing a drug-like natural product library. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 464–468, doi:10.1021/np070526y.
65. Lei, Z.; Jing, L.; Qiu, F.; Zhang, H.; Huhman, D.; Zhou, Z.; Sumner, L. W. Construction of an Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectral Library of Plant Natural Products and Comparative Spectral Analyses. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7373–7381, doi:10.1021/acs.analchem.5b01559.
66. Henrich, C. J.; Beutler, J. a Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1284–98, doi:10.1039/c3np70052f.
67. Boufridi, A.; Quinn, R. J. Turning metabolomics into drug discovery. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 1334–1338, doi:10.5935/0103-5053.20160083.
68. Lagunin, A. A.; Goel, R. K.; Gawande, D. Y.; Pahwa, P.; Glorizova, T. A.; Dmitriev, A. V.; Ivanov, S. M.; Rudik, A. V.; Konova, V. I.; Pogodin, P. V.; Druzhilovsky, D. S.; Poroikov, V. V. Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1585–1611, doi:10.1039/C4NP00068D.
69. Yuliana, N. D.; Jahangir, M.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. *Phytochem. Rev.* **2013**, *12*, 293–304, doi:10.1007/s11101-013-9297-1.
70. Yuliana, N. D.; Khatib, A.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Metabolomics for Bioactivity Assessment of. *Phyther. Res.* **2011**, *25*, 157–169.
71. Chagas-Paula, D. A.; Zhang, T.; da Costa, F. B.; Edrada-Ebel, R. A. A metabolomic approach to target compounds from the asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. *Metabolites* **2015**, *5*, 404–430, doi:10.3390/metabo5030404.
72. Koehn, F. E. High impact technologies for natural products screening. *Prog. Drug Res.* **2008**, *65*, 177–210.
73. Eugster, P. J.; Boccard, J.; Debrus, B.; Bréant, L.; Wolfender, J. L.; Martel, S.; Carrupt, P. A. Retention time prediction for dereplication of natural products (C_xH_yO_z) in LC-MS metabolite profiling. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 196–207, doi:10.1016/j.phytochem.2014.10.005.
74. Krastanov, A. Metabolomics - The state of art. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2010**, *24*, 1537–1543, doi:10.2478/V10133-010-0001-y.
75. Rochfort, S. Biology and Implications for Natural Products Research. **2005**, 1813–1820.
76. Villas-Bôas, S. G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 613–46, doi:10.1002/mas.20032.
77. Hall, R. Plant Metabolomics: The Missing Link in Functional Genomics Strategies. *Plant Cell Online* **2002**, *14*, 1437–1440, doi:10.1105/tpc.140720.
78. Ernst, M.; Silva, D. B.; Silva, R. R.; Vêncio, R. Z. N.; Lopes, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 784–806, doi:10.1039/c3np70086k.
79. Beisken, S.; Eiden, M.; Salek, R. M. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15*, 97–109, doi:10.1586/14737159.2015.974562.
80. Xu, J.; Xu, Q. S.; Chan, C. O.; Mok, D. K. W.; Yi, L. Z.; Chau, F. T. Identifying bioactive components in natural products through chromatographic fingerprint. *Anal. Chim. Acta*

- 2015**, 870, 45–55, doi:10.1016/j.aca.2015.02.030.
81. de Souza, M. C.; Rosa, A. L.; Poschenrieder, C.; Tolrà, R.; Da Costa, F. B. Fingerprinting metabolomics in tropical mistletoes: A case study with facultative aluminum-accumulating species. *Phytochem. Lett.* **2018**, 25, 90–94, doi:10.1016/j.phytol.2018.04.013.
 82. Martucci, M. E. P.; De Vos, R. C. H.; Carollo, C. A.; Gobbo-Neto, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* schreb. *PLoS One* **2014**, 9, e93149, doi:10.1371/journal.pone.0093149.
 83. Lei, Z.; Huhman, D. V.; Sumner, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 25435–25442, doi:10.1074/jbc.R111.238691.
 84. Bedair, M.; Sumner, L. W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, 238–250, doi:10.1016/j.trac.2008.01.006.
 85. Allwood, J. W.; Goodacre, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Anal.* **2010**, 21, 33–47, doi:10.1002/pca.1187.
 86. Rodriguez-Aller, M.; Gurny, R.; Veuthey, J.-L.; Guillarme, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1292, 2–18, doi:10.1016/j.chroma.2012.09.061.
 87. Vos, R. C. H. De; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J. J. B.; Bino, R. J.; Hall, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **2007**, 2, 778–791, doi:10.1038/nprot.2007.95.
 88. Glauser, G.; Veyrat, N.; Rochat, B.; Wolfender, J.-L.; Turlings, T. C. J. Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: a systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1292, 151–9, doi:10.1016/j.chroma.2012.12.009.
 89. Forcisi, S.; Moritz, F.; Kanawati, B.; Tziotis, D.; Lehmann, R.; Schmitt-kopplin, P. Liquid chromatography – mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1292, 51–65, doi:10.1016/j.chroma.2013.04.017.
 90. Holčapek, M.; Jirásko, R.; Lísa, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1259, 3–15, doi:10.1016/j.chroma.2012.08.072.
 91. Wolfender, J.; Marti, G.; Queiroz, E. F. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14, 1808–1832.
 92. Zubarev, R. a; Makarov, A. Orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 5288–96, doi:10.1021/ac4001223.
 93. Bundy, J. G.; Davey, M. P.; Viant, M. R. Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. *Metabolomics* **2009**, 5, 3–21, doi:10.1007/s11306-008-0152-0.
 94. Viant, M. R.; Sommer, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review. *Metabolomics* **2012**, 9, 144–158, doi:10.1007/s11306-012-0412-x.
 95. Padilla-gonzález, G. F.; Diazgranados, M.; Costa, F. B. Da Biogeography shaped the metabolome of the genus *Espeletia*: a phytochemical perspective on an Andean adaptive radiation. **2017**, 1–11, doi:10.1038/s41598-017-09431-7.
 96. Sampaio, B. L.; Edrada-ebel, R.; Batista, F.; Costa, D. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Nat. Publ. Gr.* **2016**, 1–11, doi:10.1038/srep29265.
 97. Cheng, C.; Macintyre, L.; Abdelmohsen, U. R.; Horn, H.; Polymenakou, P. N.; Edrada-Ebel, R.; Hentschel, U. Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from Mediterranean sponges. *PLoS One*

- 2015**, 10, 1–21, doi:10.1371/journal.pone.0138528.
98. Kim, H. K.; Verpoorte, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem. Anal.* **2010**, 21, 4–13, doi:10.1002/pca.1188.
 99. Mushtaq, M. Y.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R.; Wilson, E. G. Extraction for metabolomics: Access to the metabolome. *Phytochem. Anal.* **2014**, 25, 291–306, doi:10.1002/pca.2505.
 100. Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Metabolomics: What you see is what you extract. *Phytochem. Anal.* **2014**, 25, 289–290, doi:10.1002/pca.2513.
 101. De Vos, R. C. H.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J. J. B.; Bino, R. J.; Hall, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 778–91, doi:10.1038/nprot.2007.95.
 102. Yi, L.; Dong, N.; Yun, Y.; Deng, B.; Ren, D.; Liu, S.; Liang, Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 914, 17–34, doi:10.1016/j.aca.2016.02.001.
 103. Gürdeniz, G.; Kristensen, M.; Skov, T.; Dragsted, L. O. The Effect of LC-MS Data Preprocessing Methods on the Selection of Plasma Biomarkers in Fed vs. Fasted Rats. *Metabolites* **2012**, 2, 77–99, doi:10.3390/metabo2010077.
 104. Katajamaa, M.; Oresic, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1158, 318–28, doi:10.1016/j.chroma.2007.04.021.
 105. Castillo, S.; Gopalacharyulu, P.; Yetukuri, L.; Orešič, M. Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2011**, 108, 23–32, doi:10.1016/j.chemolab.2011.03.010.
 106. Gorrochategui, E.; Jaumot, J.; Lacorte, S.; Tauler, R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, 82, 425–442, doi:10.1016/j.trac.2016.07.004.
 107. Gromski, P. S.; Muhamadali, H.; Ellis, D. I.; Xu, Y.; Correa, E.; Turner, M. L.; Goodacre, R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 879, 10–23, doi:10.1016/j.aca.2015.02.012.
 108. Trygg, J.; Holmes, E.; Lundstedt, T. Chemometrics in metabonomics. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 469–79, doi:10.1021/pr060594q.
 109. Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L.; Hankemeier, T.; Hardy, N.; Harnly, J. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, 3, 211–221, doi:10.1007/s11306-007-0082-2.Proposed.
 110. Fiehn, O.; Sumner, L. W.; Rhee, S. Y.; Ward, J.; Dickerson, J.; Lange, B. M.; Lane, G.; Roessner, U.; Last, R.; Nikolau, B. Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies. *Metabolomics* **2007**, 3, 195–201, doi:10.1007/s11306-007-0068-0.
 111. Fiehn, O.; Robertson, D.; Griffin, J.; vab der Werf, M.; Nikolau, B.; Morrison, N.; Sumner, L. W.; Goodacre, R.; Hardy, N. W.; Taylor, C.; Fostel, J.; Kristal, B.; Kaddurah-Daouk, R.; Mendes, P.; van Ommen, B.; Lindon, J. C.; Sansone, S. A. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, 3, 175–178, doi:10.1007/s11306-007-0070-6.
 112. Kind, T.; Fiehn, O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* **2007**, 8, 105, doi:10.1186/1471-2105-8-105.
 113. Creek, D. J.; Dunn, W. B.; Fiehn, O.; Griffin, J. L.; Hall, R. D.; Lei, Z.; Mistrik, R.; Neumann, S.; Schymanski, E. L.; Sumner, L. W.; Trengove, R.; Wolfender, J.-L. Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence?

- Metabolomics* **2014**, *10*, 350–353, doi:10.1007/s11306-014-0656-8.
114. Salek, R. M.; Steinbeck, C.; Viant, M. R.; Goodacre, R.; Dunn, W. B. The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *Gigascience* **2013**, *2*, 13, doi:10.1186/2047-217X-2-13.
 115. Zani, C. L.; Carroll, A. R. Database for Rapid Dereplication of Known Natural Products Using Data from MS and Fast NMR Experiments. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1758–1766, doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01093.
 116. Williams, A. From chemistry to biology database curation. *Drug Discov. Today Technol.* **2015**, *14*, 1–2, doi:10.1016/j.ddtec.2015.02.001.
 117. Chen, Y.; de Bruyn Kops, C.; Kirchmair, J. Data Resources for the Computer-Guided Discovery of Bioactive Natural Products. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *acs.jcim.7b00341*, doi:10.1021/acs.jcim.7b00341.
 118. Smyth, W. F.; Smyth, T. J. P.; Ramachandran, V. N.; O'Donnell, F.; Brooks, P. Dereplication of phytochemicals in plants by LC-ESI-MS and ESI-MSn. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *33*, 46–54, doi:10.1016/j.trac.2011.09.015.
 119. Philip Chen, C. L.; Zhang, C. Data-intensive applications, challenges, techniques and technologies: A survey on Big Data. *Inf. Sci. (Ny)*. **2014**, *275*, 314–347, doi:10.1016/j.ins.2014.01.015.
 120. Gasteiger, J. The central role of chemoinformatics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2006**, *82*, 200–209, doi:10.1016/j.chemolab.2005.06.022.
 121. Da Costa, F. B.; Rodrigues, R. P.; Oliveira, T. B.; Scotti, M. T. AsterDB: Asteraceae Data Base Available online: <http://143.107.203.160:8080/> (accessed on Feb 10, 2018).
 122. Scotti, M.; Herrera-Acevedo, C.; Oliveira, T.; Costa, R.; Santos, S.; Rodrigues, R.; Scotti, L.; Da-Costa, F. Sistemax, an Online Web-Based Cheminformatics Tool for Data Management of Secondary Metabolites. *Molecules* **2018**, *23*, 103, doi:10.3390/molecules23010103.
 123. Gasteiger, J.; Engel, T. *Chemoinformatics: A Textbook*; 2003; ISBN 3527306811.
 124. Gasteiger, J. Chemoinformatics: Achievements and challenges, a personal view. *Molecules* **2016**, *21*, doi:10.3390/molecules21020151.
 125. Cramer, R. D. The inevitable QSAR renaissance. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2012**, *26*, 35–38, doi:10.1007/s10822-011-9495-0.
 126. Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I. I.; Cronin, M.; Dearden, J. C.; Gramatica, P.; Martin, Y. C.; Todeschini, R.; Consonni, V.; Kuz, V. E.; Cramer, R. D.; Benigni, R.; Yang, C.; Rathman, J. F.; Terfloth, L.; Gasteiger, J.; Richard, A. M.; Tropsha, A. Perspective QSAR Modeling: Where have you been? Where are you going to? QSAR Modeling: Where have you been? Where are you going to? *J. Med. Chem.* **2014**, doi:org/10.1021/jm4004285.
 127. Grisoni, F.; Reker, D.; Schneider, P.; Friedrich, L.; Consonni, V.; Todeschini, R.; Koeberle, A.; Werz, O.; Schneider, G. Matrix-based Molecular Descriptors for Prospective Virtual Compound Screening. *Mol. Inform.* **2017**, *36*, 1–7, doi:10.1002/minf.201600091.
 128. Schmidt, T. J.; Nour, A. M. M.; Khalid, S. a; Kaiser, M.; Brun, R. Quantitative structure--antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. *Molecules* **2009**, *14*, 2062–76, doi:10.3390/molecules14062062.
 129. Scotti, M. T.; Scotti, L.; Ishiki, H. M.; Peron, L. M.; de Rezende, L.; do Amaral, A. T. Variable-selection approaches to generate QSAR models for a set of antichagasic semicarbazones and analogues. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2016**, *154*, 137–149, doi:10.1016/j.chemolab.2016.03.023.
 130. Zimmermann, S.; Fouché, G.; De Mieri, M.; Yoshimoto, Y.; Usuki, T.; Nthambeleni, R.; Parkinson, C. J.; Van Der Westhuyzen, C.; Kaiser, M.; Hamburger, M.; Adams, M.

- Structure-Activity relationship study of sesquiterpene lactones and their semi-synthetic amino derivatives as potential antitrypanosomal products. *Molecules* **2014**, *19*, 3523–3538, doi:10.3390/molecules19033523.
131. Goodarzi, M.; Heyden, Y. Vander; Funar-Timofei, S. Towards better understanding of feature-selection or reduction techniques for Quantitative Structure-Activity Relationship models. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2013**, *42*, 49–63, doi:10.1016/j.trac.2012.09.008.
 132. Westad, F.; Marini, F. Validation of chemometric models - A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *893*, 14–24, doi:10.1016/j.aca.2015.06.056.
 133. Tropsha, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inform.* **2010**, *29*, 476–488, doi:10.1002/minf.201000061.
 134. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) *Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationship [QSAR] models. Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment*; Paris, 2007;
 135. European Chemical Agency (ECHA) *Practical Guide 5 - How to use and report (Q)SARs*; Helsinki, 2016;
 136. Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, England, 2003; ISBN 9780470746462.
 137. Wold, S.; Sjostrom, M. PLS-regression : a basic tool of chemometrics. **2001**, 109–130.
 138. Yousefinejad, S.; Hemmateenejad, B. Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: A historical perspective. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *149*, 177–204, doi:10.1016/j.chemolab.2015.06.016.
 139. Rosa, A. L. Aplicação de ferramentas computacionais e analíticas na construção de bibliotecas de produtos naturais da família Asteraceae. Tese, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2018.
 140. Laboratório de Cristalografia de Proteínas - LCP - Profa. Dra. Maria Cristina Nonato. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP Available online: <http://www.lcprp.com.br/paginas/index.php> (accessed on Apr 16, 2018).
 141. Pinheiro, M. P.; Iulek, J.; Cristina Nonato, M. Crystal structure of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase from Y strain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *369*, 812–7, doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.074.
 142. Pádua, R. A. P.; Tomaleri, G. P.; Reis, R. A. G.; David, J. S.; Silva, V. C.; Pinheiro, M. P.; Nonato, M. C. ThermoFMN - A thermofluor assay developed for ligand-screening as an alternative strategy for drug discovery. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 1864–1871, doi:10.5935/0103-5053.20140157.
 143. Miller, R. W. Dihydroorotate Dehydrogenase (Neurospora). **1978**, *1288*, 63–69.
 144. Pinheiro, M. P.; Emery, F. D. S.; Nonato, M. C. Target sites for the design of anti-trypanosomatid drugs based on the structure of dihydroorotate dehydrogenase. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 2615–27, doi:10.2174/1381612811319140011.
 145. Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–2221, doi:10.1038/nprot.2007.321.
 146. Lo, M. C.; Aulabaugh, A.; Jin, G.; Cowling, R.; Bard, J.; Malamas, M.; Ellestad, G. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 153–159, doi:10.1016/j.ab.2004.04.031.
 147. Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B. A.; Lane, P.; Salemme, F. R. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J. Biomol. Screening* **2001**, *6*, 429–440.

148. Forcisi, S.; Moritz, F.; Kanawati, B.; Tziotis, D.; Lehmann, R.; Schmitt-Kopplin, P. Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1292*, 51–65, doi:10.1016/j.chroma.2013.04.017.
149. Sumner, L. W.; Lei, Z.; Nikolau, B. J.; Saito, K. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 212–229, doi:10.1039/C4NP00072B.
150. Naz, S.; Vallejo, M.; García, A.; Barbas, C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 99–105, doi:10.1016/j.chroma.2014.04.071.
151. Goodacre, R.; Broadhurst, D.; Smilde, A. K.; Kristal, B. S.; Baker, J. D.; Beger, R.; Bessant, C.; Connor, S.; Capuani, G.; Craig, A.; Ebbels, T.; Kell, D. B.; Manetti, C.; Newton, J.; Paternostro, G.; Somorjai, R.; Sjöström, M.; Trygg, J.; Wulfert, F. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics* **2007**, *3*, 231–241, doi:10.1007/s11306-007-0081-3.
152. Rocca-Serra, P.; Salek, R. M.; Arita, M.; Correa, E.; Dayalan, S.; Gonzalez-Beltran, A.; Ebbels, T.; Goodacre, R.; Hastings, J.; Haug, K.; Koulman, A.; Nikolski, M.; Oresic, M.; Sansone, S. A.; Schober, D.; Smith, J.; Steinbeck, C.; Viant, M. R.; Neumann, S. Data standards can boost metabolomics research, and if there is a will, there is a way. *Metabolomics* **2016**, *12*, 1–13, doi:10.1007/s11306-015-0879-3.
153. Kessner, D.; Chambers, M.; Burke, R.; Agus, D.; Mallick, P. ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 2534–2536, doi:10.1093/bioinformatics/btn323.
154. ProteoWizard Available online: <http://proteowizard.sourceforge.net/index.shtml> (accessed on Jan 6, 2018).
155. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395, doi:10.1186/1471-2105-11-395.
156. Katajamaa, M.; Miettinen, J.; Orešič, M. MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 634–636, doi:10.1093/bioinformatics/btk039.
157. MZmine MZmine 2 Available online: <http://mzmine.github.io/> (accessed on Feb 6, 2018).
158. MZmine MZmine 2 Manual 2015.
159. Umetrics SIMCA Available online: <https://umetrics.com/products/simca> (accessed on Feb 6, 2018).
160. Weka - The University of Waikato Available online: <https://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/> (accessed on Feb 10, 2018).
161. Witten, I. H.; Frank, E.; Hall, M. A. *Data mining: practical machine learning tools and techniques*; 3. ed.; Elsevier: Burlington, USA, 2011; ISBN 978-0-12-374856-0.
162. Dictionary of Natural Products Available online: <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml> (accessed on Feb 10, 2018).
163. SciFinder: a CAS solution Available online: <https://origin-scifinder.cas.org/> (accessed on Feb 10, 2018).
164. ChemSpyder: search and share chemistry Available online: <http://www.chemspider.com/> (accessed on Feb 10, 2018).
165. ChemAxon. Available online: <http://www.chemaxon.com/> (accessed on Jun 12, 2017).
166. Chemical Computing Group, Molecular Operating Environment (MOE). rel. 2016.08, Chemical Computing Group Inc, 1997-2016.

167. Chemical Computing Group, Molecular Operating Environment (MOE). rel. 2016.08, Chemical Computing Group Inc, 1997-2016. Available online: file:///Applications/moe2016/html/index.htm (accessed on Jun 12, 2017).
168. Niazi, A.; Leardi, R. Genetic algorithms in chemometrics. *J. Chemom.* **2012**, *26*, 345–351, doi:10.1002/cem.2426.
169. Leardi, R. Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: A review. *J. Chemom.* **2001**, *15*, 559–569, doi:10.1002/cem.651.
170. Chemical Computing Group, Molecular Operating Environment (MOE). rel. 2016.08, Chemical Computing Group Inc, 1997-2016. MOE script GA.svl available for MOE users at the MOE svl exchange website. Available online: http://www.chemcomp.com/Support-SVL_Exchange.htm (accessed on Jun 12, 2017).
171. Alexander, D. L. J.; Tropsha, A.; Winkler, D. A. Beware of R^2 : Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 1316–1322, doi:10.1021/acs.jcim.5b00206.
172. Todeschini, R.; Ballabio, D.; Grisoni, F. Beware of Unreliable Q^2 ! A Comparative Study of Regression Metrics for Predictivity Assessment of QSAR Models. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 1905–1913, doi:10.1021/acs.jcim.6b00277.
173. Gramatica, P.; Sangion, A. A Historical Excursus on the Statistical Validation Parameters for QSAR Models: A Clarification Concerning Metrics and Terminology. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 1127–1131, doi:10.1021/acs.jcim.6b00088.
174. KNIME Available online: <https://www.knime.com/> (accessed on Jun 12, 2017).
175. Melagraki, G.; Afantitis, A.; Sarimveis, H.; Panayiotis, A. In Silico Exploration for Identifying Structure – Activity Relationship of MEK Inhibition and Oral Bioavailability for Isothiazole Derivatives. **2010**, 397–406, doi:10.1111/j.1747-0285.2010.01029.x.
176. Afantitis, A.; Melagraki, G.; Koutentis, P. A.; Sarimveis, H.; Kollias, G. Ligand - based virtual screening procedure for the prediction and the identification of novel β -amyloid aggregation inhibitors using Kohonen maps and Counterpropagation Artificial Neural Networks. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 497–508, doi:10.1016/j.ejmech.2010.11.029.
177. Schüürmann, G.; Ebert, R.; Chen, J.; Wang, B.; Kühne, R. External Validation and Prediction Employing the Predictive Squared Correlation Coefficient - Test Set Activity Mean vs Training Set Activity Mean. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *49*, 2140–2145, doi:10.1021/ci800253u.
178. Consonni, V.; Ballabio, D.; Todeschini, R. Comments on the Definition of the Q^2 Parameter for QSAR Validation. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1669–1678.
179. Schomburg, C.; Schuehly, W.; Da Costa, F. B.; Klempnauer, K. H.; Schmidt, T. J. Natural sesquiterpene lactones as inhibitors of Myb-dependent gene expression: Structure-activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 313–320, doi:10.1016/j.ejmech.2013.02.018.
180. Cheleski, J.; Rocha, J. R.; Pinheiro, M. P.; Wiggers, H. J.; da Silva, A. B. F.; Nonato, M. C.; Montanari, C. A novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5899–909, doi:10.1016/j.ejmech.2010.09.055.
181. Souza, P. M. de; Sales, P. M. de; Simeoni, L. A.; Silva, E. C.; Silveira, D.; Magalhaes, P. de O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta Med.* **2012**, *78*, 393–399, doi:10.1055/s-0031-1280404.
182. Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. ORMESIS : The Dose-Response Revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 175–197, doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223.
183. Chagas-Paula, D. A. Estudos metabolômicos de Astedraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações através de métodos in silico. Tese, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de

Ribeirão Preto, 2013.

184. Hagerman, A. E.; Butler, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 809–812, doi:10.1021/jf60218a027.
185. Van Buren, J. P.; Robinson, W. B. Formation of complexes between protein and tannic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 772–777, doi:10.1021/jf60164a003.
186. Wall, M. E.; Wani, M. C.; Brown, D. M.; Fullas, F.; Olwald, J. B.; Josephson, F. F.; Thornton, N. M.; Pezzuto, J. M.; Beecher, C. W.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. a; Kinghorn, a D. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine* **1996**, *3*, 281–5, doi:10.1016/S0944-7113(96)80067-5.
187. Heinrich, M.; Robles, M.; West, J. E.; Ortiz de Montellano, B. R.; Rodriguez, E. Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38*, 539–565, doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.539.
188. Zdero, C.; Bohlmann, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Plant Syst. Evol.* **1990**, *171*, 1–14, doi:10.1007/BF00940593.
189. Prigent, S. V. E.; Gruppen, H.; Visser, A. J. W. G.; Van Koningsveld, G. A.; De Jong, G. A. H.; Voragen, A. G. J. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5088–5095, doi:10.1021/jf021229w.
190. Cos, P.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. Vanden; Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 290–302, doi:10.1016/j.jep.2006.04.003.
191. Don, R.; Ioset, J. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* **2014**, *141*, 140–146, doi:10.1017/S003118201300142X.
192. Ioset, J. Natural Products for Neglected Diseases: A Review. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 643–666.
193. Scotti, M. T.; Scotti, L.; Ishikib, H.; Ribeiro, F. F.; Cruz, R. M. D. Da; De Oliveira, M. P.; Mendonça, F. J. B. Natural products as a source for antileishmanial and antitrypanosomal agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2016**, *19*, 537–553, doi:10.2174/13862073196661605.
194. Bernal, F. A.; Coy-Barrera, E. In-silico analyses of sesquiterpene-related compounds on selected Leishmania enzyme-based targets. *Molecules* **2014**, *19*, 5550–5569, doi:10.3390/molecules19055550.
195. Glaser, J.; Schultheis, M.; Hazra, S.; Hazra, B.; Moll, H.; Schurigt, U.; Holzgrabe, U. Antileishmanial lead structures from nature: Analysis of structure-activity relationships of a compound library derived from caffeic acid bornyl ester. *Molecules* **2014**, *19*, 1394–1410, doi:10.3390/molecules19021394.
196. Ogungbe, I. V.; Erwin, W. R.; Setzer, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: molecular docking to potential protein targets. *J. Mol. Graph. Model.* **2014**, *48*, 105–17, doi:10.1016/j.jmgm.2013.12.010.
197. Inaoka, D. K.; Sakamoto, K.; Shimizu, H.; Shiba, T.; Kurisu, G.; Nara, T.; Aoki, T.; Kita, K.; Harada, S. Structures of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry* **2008**, *47*, 10881–10891, doi:10.1021/bi800413r.
198. Cheleski, J.; Wiggers, H. J.; Citadini, A. P.; da Costa Filho, A. J.; Nonato, M. C.; Montanari, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* **2010**, *399*, 13–22, doi:10.1016/j.ab.2009.11.018.

199. Liu, S.; Neidhardt, E. a; Grossman, T. H.; Ocain, T.; Clardy, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure* **2000**, *8*, 25–33.
200. Wolfe, A. E.; Thymark, M.; Gattis, S. G.; Fagan, R. L.; Hu, Y. C.; Johansson, E.; Arent, S.; Larsen, S.; Palfey, B. A. Interaction of benzoate pyrimidine analogues with class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5741–5753, doi:10.1021/bi7001554.
201. Gedeck, P.; Rohde, B.; Bartels, C. QSAR – How Good Is It in Practice ? Comparison of Descriptor Sets on an Unbiased Cross Section of Corporate Data Sets. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1924–1936, doi:10.1021/ci050413p.
202. Da Costa, F. B.; Terfloth, L.; Gasteiger, J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 345–53, doi:10.1016/j.phytochem.2004.12.006.
203. FDA Food and Drug Administration - Guidance for Industry: Bioanalytical method validation 2013, 34.
204. Gaudêncio, S. P.; Pereira, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 779–810, doi:10.1039/C4NP00134F.
205. Wolfender, J.; Marti, G.; Queiroz, E. F. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication , Quality Control and Metabolomics. **2010**, 1808–1832.
206. Fillet, M.; Friederich, M. The emergence of metabolomics as a key discipline in the drug discovery process. *Drug Discov. Today Technol.* **2015**, *13*, 19–24, doi:10.1016/j.ddtec.2015.01.006.
207. Pereira-Filho, E. R. *Planejamento Fatorial em Química*; EdUFSCar: São Carlos, 2015;
208. Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; De Barros Neto, B. *Statistical Design - Chemometrics*; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2006; ISBN 9780444521811.
209. Klein-Júnior, L. C.; Viaene, J.; Salton, J.; Koetz, M.; Gasper, A. L.; Henriques, A. T.; Vander Heyden, Y. The use of chemometrics to study multifunctional indole alkaloids from *Psychotria nemorosa* (Palicourea comb. nov.). Part I: Extraction and fractionation optimization based on metabolic profiling. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1463*, 60–70, doi:10.1016/j.chroma.2016.07.030.
210. Luque de Castro, M. D.; Delgado-Povedano, M. M. Ultrasound: a subexploited tool for sample preparation in metabolomics. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *806*, 74–84, doi:10.1016/j.aca.2013.10.053.
211. Li, L.; Zhao, C.; Chang, Y.; Lu, X.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Zhao, J.; Xu, G. Metabolomics study of cured tobacco using liquid chromatography with mass spectrometry: Method development and its application in investigating the chemical differences of tobacco from three growing regions. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 1067–1074, doi:10.1002/jssc.201301138.
212. Sousa, A. D.; Maia, A. I. V.; Rodrigues, T. H. S.; Canuto, K. M.; Ribeiro, P. R. V.; de Cassia Alves Pereira, R.; Vieira, R. F.; de Brito, E. S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *79*, 91–103, doi:10.1016/j.indcrop.2015.10.045.
213. Mili, P. S.; Rajkovi, K. M.; Stamenkovi, O. S.; Veljkovi, V. B. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrason. - Sonochemistry* **2013**, *20*, 525–534, doi:10.1016/j.ultsonch.2012.07.017.
214. Yang, Y. C.; Wei, M. C.; Huang, T. C.; Lee, S. Z.; Lin, S. S. Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from *Radix Scutellariae*. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *45*, 182–190,

- doi:10.1016/j.indcrop.2012.11.041.
215. Wei, M. C.; Yang, Y. C. Extraction characteristics and kinetic studies of oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis diffusa* under ultrasound-assisted extraction conditions. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *130*, 182–192, doi:10.1016/j.seppur.2014.04.029.
 216. Gobbo-Neto, L.; Bauermeister, A.; Sakamoto, H.; Gouvea, D.; Lopes, J.; Lopes, N. Spatial and Temporal Variations in Secondary Metabolites Content of the Brazilian Arnica Leaves (*Lychnophora ericoides* Mart., Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 2382–2390-, doi:10.21577/0103-5053.20170092.
 217. Ccana-Ccapatinta, G. V.; Monge, M.; Ferreira, P. L.; Da Costa, F. B. Chemistry and medicinal uses of the subfamily Barnadesioideae (Asteraceae). *Phytochem. Rev.* **2017**, doi:10.1007/s11101-017-9544-y.
 218. Hensel, A.; Maas, M.; Sendker, J.; Lechtenberg, M.; Petereit, F.; Deters, A.; Schmidt, T.; Stark, T. *Eupatorium perfoliatum* L.: Phytochemistry, traditional use and current applications. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *138*, 641–651, doi:10.1016/j.jep.2011.10.002.
 219. Seaman, F. C.; Fischer, N. H.; Stuessy, T. F. Systematic implications of sesquiterpene lactones in the subtribe melampodiinae. *Biochem. Syst. Ecol.* **1980**, *8*, 263–271, doi:10.1016/0305-1978(80)90057-5.
 220. Ambrósio, S. R.; Oki, Y.; Heleno, V. C. G.; Chaves, J. S.; Nascimento, P. G. B. D.; Lichston, J. E.; Constantino, M. G.; Varanda, E. M.; Da Costa, F. B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2052–60, doi:10.1016/j.phytochem.2008.03.019.
 221. Ambrosio, S. R.; Schorr, K.; Da Costa, F. B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 221–224, doi:10.1016/S0305-1978(03)00139-X.
 222. Budesinsky, M.; Souto, N. P.; Holuba, M. Sesquiterpenic lactones of some species of genus *Vernonia* Schreb. **1994**, *59*, 913–928.
 223. Padilla-Gonzalez, G. F.; Diazgranados, M.; Ccana-Ccapatinta, G.; Casoti, R.; Da Costa, F. B. Caffeic acid derivatives and further compounds from *Espeletia barclayana* Cuatrec. (Asteraceae, Espeletiinae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2017**, *70*, 291–293, doi:10.1016/j.bse.2016.12.016.
 224. Igual, M. O.; Martucci, M. E. P.; Da Costa, F. B.; Gobbo-Neto, L. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2013**, *51*, 94–97, doi:10.1016/j.bse.2013.08.018.
 225. Clifford, M. N.; Jaganath, I. B.; Ludwig, I. A.; Crozier, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, 1391–1421, doi:10.1039/C7NP00030H.
 226. Silva, D. B.; Turatti, I. C. C.; Gouveia, D. R.; Ernst, M.; Teixeira, S. P.; Lopes, N. P. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, doi:10.1038/srep04309.
 227. Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 432–455, doi:10.1039/C5NP00073D.
 228. Amaral, J. G.; Bauermeister, A.; Pilon, A. C.; Gouvea, D. R.; Sakamoto, H. T.; Gobbo-Neto, L.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation pathway and structural characterization of new glycosylated phenolic derivatives from *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae) by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2017**, *52*, 783–787, doi:10.1002/jms.3982.
 229. Da Cunha Pinto, A.; Vessecchi, R.; Da Silva, C. G.; Amorim, A. C. L.; Dos Santos Júnior, H. M.; Rezende, M. J. C.; Gates, P. J.; Rezende, C. M.; Lopes, N. P. Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of isopimarane diterpenes from

- Velloziaceae. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2016**, *30*, 61–68, doi:10.1002/rcm.7411.
230. Sartori, L. R.; Vessecchi, R.; Humpf, H.-U.; Da Costa, F. B.; Lopes, N. P. A systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28*, 723–30, doi:10.1002/rcm.6839.
 231. Passero, L. F. D.; Bonfim-Melo, A.; Corbett, C. E. P.; Laurenti, M. D.; Toyama, M. H.; De Toyama, D. O.; Romoff, P.; Fávero, O. A.; Dos Grecco, S. S.; Zalewsky, C. A.; Lago, J. H. G. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). *Parasitol. Res.* **2011**, *108*, 529–536, doi:10.1007/s00436-010-2091-8.
 232. Montrieux, E.; Perera, W. H.; García, M.; Maes, L.; Cos, P.; Monzote, L. In vitro and in vivo activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 2925–2932, doi:10.1007/s00436-014-3954-1.
 233. Lima, T. C.; Souza, R. J.; Santos, A. D. C.; Moraes, M. H.; Biondo, N. E.; Barison, A.; Steindel, M.; Biavatti, M. W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 551–557, doi:10.1080/14786419.2015.1030740.
 234. Lagnika, L.; Weniger, B.; Attioua, B.; Jensen, O.; Anthaume, C.; Sanni, A.; Kaiser, M.; Lobstein, A.; Vonthron-Senecheau, C. Trypanocidal activity of diarylheptanoids from *Schrankia leptocarpa* DC. *South African J. Bot.* **2012**, *83*, 92–97, doi:10.1016/j.sajb.2012.06.011.
 235. Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T. J.; Tosun, F.; Rüedi, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1352–1364, doi:10.1128/AAC.50.4.1352.
 236. Graef, C. F. F.; Albuquerque, S.; Lopes, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 73–82, doi:10.1016/j.fitote.2004.10.013.
 237. Monzote, L.; Córdova, W. H. P.; García, M.; Piñón, A.; Setzer, W. N. In-vitro and in-vivo activities of phenolic compounds against cutaneous leishmaniasis. *Rec. Nat. Prod.* **2016**, *10*, 269–276.
 238. Amin, A.; Tuentner, E.; Exarchou, V.; Upadhyay, A.; Cos, P.; Maes, L.; Apers, S.; Pieters, L. Phytochemical and Pharmacological Investigations on *Nymphoides indica* Leaf Extracts. *Phyther. Res.* **2016**, *30*, 1624–1633, doi:10.1002/ptr.5663.
 239. Bravo B, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez T., A.; Muñoz O., V.; Callapa, J.; Le Men-Olivier, L.; Massiot, G.; Lavaud, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 71–74, doi:10.1016/S0031-9422(98)00497-X.
 240. Sidana, J.; Neeradi, D.; Choudhary, A.; Singh, S.; Foley, W. J.; Singh, I. P. Antileishmanial polyphenols from *Corymbia maculata*. *J. Chem. Sci.* **2013**, *125*, 765–775, doi:10.1007/s12039-013-0440-8.
 241. Lima, T. C.; Souza, R. D. J.; De Moraes, M. H.; Steindel, M.; Biavatti, M. W. A new furanoheliangolide sesquiterpene lactone from *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (Asteraceae) and evaluation of its trypanocidal and leishmanicidal activities. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 367–375, doi:10.5935/0103-5053.20160186.
 242. Smith, P.; Ho, C. K.; Takagi, Y.; Djaballah, H.; Shuman, S. Nanomolar Inhibitors of *Trypanosoma brucei* RNA triphosphatase. *MBio* **2016**, *7*, 1–10, doi:10.1128/mBio.00058-16.Editor.
 243. Maldonado, E. M.; Salamanca, E.; Giménez, A.; Sterner, O. Antileishmanial metabolites from *Lantana balansae*. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2016**, *26*, 180–183, doi:10.1016/j.bjp.2015.11.007.

244. Sen, G.; Mukhopadhyay, S.; Ray, M.; Biswas, T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 1066–1075, doi:10.1093/jac/dkn053.
245. Sarkar, S.; Mandal, S.; Sinha, J.; Mukhopadhyay, S.; Das, N.; Basu, M. K. Quercetin: Critical evaluation as an antileishmanial agent in vivo in hamsters using different vesicular delivery modes. *J. Drug Target.* **2002**, *10*, 573–578, doi:10.1080/106118021000072681.
246. de Sousa, L. R. F.; Wu, H.; Nebo, L.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. das G. F.; Kiefer, W.; Schirmeister, T.; Vieira, P. C. Natural products as inhibitors of recombinant cathepsin L of *Leishmania mexicana*. *Exp. Parasitol.* **2015**, *156*, 42–48, doi:10.1016/j.exppara.2015.05.016.
247. Marín, C.; Boutaleb-Charki, S.; Díaz, J. G.; Huertas, O.; Rosales, M. J.; Pérez-Cordon, G.; Guitierrez-Sánchez, R.; Sánchez-Moreno, M. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1069–74, doi:10.1021/np8008122.
248. De Oliveira, A. B.; Saúde, D. A.; Perry, K. S. P.; Duarte, D. S.; Raslan, D. S.; Boaventura, M. A. D.; Chiari, E. Trypanocidal Sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phyther. Res.* **1996**, *10*, 292–295.
249. Suzuki, A.; Shiota, O.; Mori, K.; Sekita, S.; Fuchino, H.; Takano, A.; Kuroyanagi, M. Leishmanicidal Active Constituents from Nepalese Medicinal Plant Tulsi (*Ocimum sanctum* L.). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2009**, *57*, 245–251, doi:10.1248/cpb.57.245.
250. Schinor, E. C.; Salvador, M. J.; Mieko, E.; Pral, F.; Celina, S. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **2007**, *43*.
251. Mittra, B.; Saha, A.; Chowdhury, A. R.; Pal, C.; Mandal, S.; Mukhopadhyay, S.; Bandyopadhyay, S.; Majumder, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.* **2000**, *6*, 527–41.
252. Kirmizibekmez, H.; Atay, I.; Kaiser, M.; Brun, R.; Cartagena, M. M.; Carballeira, N. M.; Yesilada, E.; Tasdemir, D. Antiprotozoal activity of *Melampyrum arvense* and its metabolites. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 142–6, doi:10.1002/ptr.3233.
253. Taleb-Contini, S. H.; Salvador, M. J.; Balanco, J. M. F.; Albuquerque, S.; de Oliveira, D. C. R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (asteraceae). *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 250–4, doi:10.1002/ptr.1431.
254. Sülsen, V. P.; Cazorla, S. I.; Frank, F. M.; Redko, F. C.; Anesini, C. A.; Coussio, J. D.; Malchiodi, E. L.; Martino, V. S.; Muschietti, L. V. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 654–659, doi:77/4/654 [pii].
255. Fonseca-Silva, F.; Inacio, J. D. F.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Menna-Barreto, R. F. S.; Almeida-Amaral, E. E. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1–17, doi:10.1371/journal.pntd.0004442.
256. Sun, Y. N.; No, J. H.; Lee, G. Y.; Li, W.; Yang, S. Y.; Yang, G.; Schmidt, T. J.; Kang, J. S.; Kim, Y. H. Phenolic constituents of medicinal plants with activity against *trypanosoma brucei*. *Molecules* **2016**, *21*, 1–11, doi:10.3390/molecules21040480.
257. Mamoon-Ur-Rashid; Ali, S.; Alamzeb, M.; Igoli, J.; Clements, C.; Shah, S. Q.; Ferro, V. A.; Gray, A. I.; Khan, M. R. Phytochemical and antitrypanosomal investigation of the fractions and compounds isolated from *Artemisia elegantissima*. *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 983–987.
258. Sosa, A. M.; Amaya, S.; Salamanca Capusiri, E.; Gilabert, M.; Bardón, A.; Giménez, A.; Vera, N. R.; Borkosky, S. A. Active sesquiterpene lactones against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 2611–2615.

259. Camacho, M. del R.; Phillipson, J. D.; Croft, S. L.; Yardley, V.; Solis, P. N. In vitro antiprotozoal and cytotoxic activities of some alkaloids, quinones, flavonoids, and coumarins. *Planta Med.* **2004**, *70*, 70–72, doi:10.3969/j.issn.1007-3426.2012.03.024.
260. Filho, A. A. da S.; Resende, D. O.; Fukui, M. J.; Santos, F. F.; Pauletti, P. M.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A.; Gregório, L. E.; Bastos, J. K.; Nanayakkara, N. P. D. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Fitoterapia* **2009**, *80*, 478–482, doi:10.1016/j.fitote.2009.06.007.
261. ChemCalc Available online: <http://www.chemcalc.org/> (accessed on Feb 10, 2018).
262. Clifford, M.; Johnston, K.; Knigh, S.; Kuhnert, N. A hierarchical scheme for LC- MSn identification of chlorogenic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911.
263. Clifford, M. N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3821–3832, doi:10.1021/jf050046h.
264. Fang, N.; Yu, S.; Prior, R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3579–3585, doi:10.1021/jf0201327.
265. van den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **2006**, *7*, 142, doi:10.1186/1471-2164-7-142.
266. Mizuno, H.; Ueda, K.; Kobayashi, Y.; Tsuyama, N.; Todoroki, K.; Min, J. Z.; Toyo'oka, T. The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31*, 1–7, doi:10.1002/bmc.3864.
267. Bylesjö, M.; Rantalainen, M.; Cloarec, O.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Trygg, J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemom.* **2006**, *20*, 341–351, doi:10.1002/cem.
268. Eriksson, L.; Trygg, J.; Wold, S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. *J. Chemom.* **2008**, *22*, 594–600, doi:10.1002/cem.1187.
269. González, O.; Blanco, M. E.; Iriarte, G.; Bartolomé, L.; Maguregui, M. I.; Alonso, R. M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 10–27, doi:10.1016/j.chroma.2014.03.077.
270. Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E. J.; Edlund, U.; Shockcor, J. P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 115–122, doi:10.1021/AC0713510.
271. Severiano, A.; Carriço, J. A.; Robinson, D. A.; Ramirez, M.; Pinto, F. R. Evaluation of Jackknife and Bootstrap for defining confidence intervals for pairwise agreement measures. *PLoS One* **2011**, *6*, 6–8, doi:10.1371/journal.pone.0019539.
272. Martens, H.; Martens, M. Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). *Food Qual. Prefer.* **2000**, *11*, 5–16, doi:10.1016/S0950-3293(99)00039-7.
273. Efron, B.; Gong, G. A Leisurely Look at the Bootstrap , the Jackknife , and Cross-Validation Author (s): Bradley Efron and Gail Gong Source : The American Statistician , Vol . 37 , No . 1 , (Feb . , 1983), pp . 36-48 Published by: American Statistical Association Stable. *Am. Stat.* **1983**, *37*, 36–48.
274. MKS-Umetrics SIMCA: User Guide 2012.
275. Gika, H. G.; Theodoridis, G. a; Plumb, R. S.; Wilson, I. D. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 12–25, doi:10.1016/j.jpba.2013.06.032.

276. Ordoudi, S. A.; Cagliani, L. R.; Lalou, S.; Naziri, E.; Tsimidou, M. Z.; Consonni, R. ¹H NMR-based metabolomics of saffron reveals markers for its quality deterioration. *Food Res. Int.* **2015**, *70*, 1–6, doi:10.1016/j.foodres.2015.01.021.
277. Patel, D.; Thompson, M. D.; Manna, S. K.; Krausz, K. W.; Zhang, L.; Nilubol, N.; Gonzalez, F. J.; Kebebew, E. Unique and novel urinary metabolomic features in malignant versus benign adrenal neoplasms. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 5302–5310, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3156.
278. Shang, N.; Saleem, A.; Musallam, L.; Walshe-Roussel, B.; Badawi, A.; Cuerrier, A.; Arnason, J. T.; Haddad, P. S. Novel approach to identify potential bioactive plant metabolites: Pharmacological and metabolomics analyses of ethanol and hot water extracts of several Canadian medicinal plants of the cree of eeyou istchee. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0135721.
279. Vasilev, N.; Boccard, J.; Lang, G.; Grömping, U.; Fischer, R.; Goepfert, S.; Rudaz, S.; Schillberg, S. Structured plant metabolomics for the simultaneous exploration of multiple factors. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–15, doi:10.1038/srep37390.
280. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018.
281. Arakawa, M.; Hasegawa, K.; Funatsu, K. The recent trend in QSAR modeling - Variable selection and 3D-QSAR methods. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* **2007**, *3*, 254–262, doi:10.2174/157340907782799417.
282. Jurs, P. C. Quantitative Structure-Property Relationships. In *Handbook of Chemoinformatics: From Data to Knowledge.*; Gasteiger, J., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, Germany, 2003; pp. 1314–1335.
283. Hawkins, D. M.; Basak, S. C.; Mills, D. Assessing Model Fit by Cross-Validation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 579–586, doi:10.1021/CI025626I.
284. Roy, K.; Das, R. N.; Ambure, P.; Aher, R. B. Be aware of error measures. Further studies on validation of predictive QSAR models. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2016**, *152*, 18–33, doi:10.1016/j.chemolab.2016.01.008.
285. Golbraikh, A.; Tropsha, A. Beware of q^2 ! *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *20*, 269–276.
286. Raevsky, O. A. Molecular structure descriptors in the computer-aided design of biologically active compounds. *Russ. Chem. Rev.* **1999**, *68*, 505–524, doi:RC990505.
287. Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of Molecular Descriptors*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, Germany, 2000; ISBN 3527299130.
288. Pearlman, R. S.; Smith, K. M. Novel software tools for chemical diversity. *Perspect. Drug Discov.* **1998**, *9*, 339–353, doi:10.1023/A:1027232610247.
289. Stanton, D. T. Evaluation and Use of BCUT Descriptors in QSAR and QSPR Studies. *J. Chem. Inf. Model.* **1999**, *39*, 11–20, doi:10.1021/ci980102x.
290. Moorthy, N. S. H. N.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. a Prediction of the relationship between the structural features of andrographolide derivatives and α -glucosidase inhibitory activity: a quantitative structure-activity relationship (QSAR) study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 78–87, doi:10.3109/14756361003724760.
291. Villalobos, T. P. J.; Ibarra, R. G.; Acosta, J. J. M. 2D, 3D-QSAR and molecular docking of 4(1H)-quinolones analogues with antimalarial activities. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *46*, 105–124, doi:10.1016/j.jmglm.2013.10.002.
292. Moorthy, N. S. H. N.; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. Ligand based analysis on HMG-CoA reductase inhibitors. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *140*, 102–116, doi:10.1016/j.chemolab.2014.11.009.
293. Randić, M. Generalized molecular descriptors. *J. Math. Chem.* **1991**, *7*, 155–168, doi:10.1007/BF01200821.

294. Wildman, S. A.; Crippen, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39, 868–873, doi:10.1021/ci9903071.
295. Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, 36, 3219–3228, doi:10.1016/0040-4020(80)80168-2.
296. Cruciani, G.; Crivori, P.; Carrupt, P. A.; Testa, B. Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: The VolSurf approach. *J. Mol. Struct. Theochem* **2000**, 503, 17–30.
297. Cruciani, G.; Pastor, M.; Guba, W. VolSurf: A new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 11, doi:10.1016/S0928-0987(00)00162-7.
298. Lee, H. S.; Kim, M. K.; Lee, C.; Kim, J.; Choo, I. H.; Woo, Jong, I.; Chong, Y. Chemometric studies on brain-uptake of PET agents via VolSurf analysis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, 29, 61–68.
299. Moorthy, N. S. H. N.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. a Analysis of van der Waals surface area properties for human ether-a-go-go-related gene blocking activity: computational study on structurally diverse compounds. *SAR QSAR Environ. Res.* **2012**, 23, 521–36.
300. Shahapurkar, S.; Kawathekar, N.; Chaturvedi, S. C. Quantitative structure activity relationship studies of diaryl thiophen derivatives as selective COX-2 inhibitors. *Pharmazie* **2005**, 60, 254–258.
301. Rawal, R. K.; Prabhakar, Y. S.; Katti, S. B. Molecular surface features in modeling the HIV-1 RT inhibitory activity of 2-(2,6-disubstituted phenyl)-3-(substituted pyrimidin-2-yl)-thiazolidin-4-ones. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26, 398–406, doi:10.1002/qsar.200630040.
302. Moorthy, N. S. H. N.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. Comparative structural analysis of alpha-glucosidase inhibitors on difference species: A computational study. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2012**, 345, 265–274, doi:10.1002/ardp.201100047.
303. Labute, P.; Williams, C.; Feher, M.; Sourial, E.; Schmidt, J. M. Flexible alignment of small molecules. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1483–1490, doi:10.1021/jm0002634.
304. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, 9, 532–549.
305. Chan, S. L.; Labute, P. Training a Scoring Function for the Alignment of Small Molecules - Journal of Chemical Information and Modeling (ACS Publications). *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 1724–1735.
306. Wulsten, I. F.; Costa-Silva, T. A.; Mesquita, J. T.; Lima, M. L.; Galuppo, M. K.; Taniwaki, N. N.; Borborema, S. E. T.; Da Costa, F. B.; Schmidt, T. J.; Tempone, A. G. Investigation of the anti-Leishmania (*Leishmania*) infantum activity of some natural sesquiterpene lactones. *Molecules* **2017**, 22, doi:10.3390/molecules22050685.

APÊNDICES