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 Farmaceûticas 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 Âmparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por fornecer: a) bolsa de doutorado no país (processo n° 2014/01443-6), a qual permitiu minha manutenção em Ribeirão Preto durante mais de 4 anos e supriu todas as necessidades lojísticas para realização do projeto de pesquisa; b) bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE n° 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, consequentemente, da FCFRP-USP, dando a mim está valiosa oportunidade de realizar o doutorado sob sua supervisão. Gratissíssimo 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 *Lm*DHODH. 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 Iara 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. Gratissíssimo por toda orientação, incentivo, suporte e receptividade. Foi uma honra ter feito parte do IPBP e convivído 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 lojístico, 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 expresso 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* (*Lm*DHODH) 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) Ensaios enzimáticos: 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 *Lm*DHODH 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 *Lm*DHODH, 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 *Lm*DHODH, 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 IC_{50} values were determined for 59 plant extracts (ΔIC_{50}: 148.0 $\mu g.mL^{-1}$ a 9.4 $mg.mL^{-1}$) and 57 natural compounds (ΔIC_{50}: 27.0 µM 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 antiparasitc 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 *Lm*DHODH 02

Figura 2 – Resumo gráfico com o fluxo de trabalho (*workflow*) da triagem *in vitro* de inibidores da enzima *Lm*DHODH envolvendo os extratos de Asteraceae..... 10

Figura 3 – Resumo gráfico com o fluxo de trabalho (*workflow*) da triagem *in vitro* de inibidores da enzima *Lm*DHODH envolvendo as substâncias isoladas..... 11

Figura 4 – Espectro de absorção padrão da solução de *Lm*DHODH..... 13

Figura 5 – Etapas experimentais dos ensaios de cinética enzimática com os extratos de Asteraceae..... 15

Figura 6 – Estrutura química das 21 STLs..... 23

Figura 7 – SDS-PAGE-14% do processo de purificação da proteína *Lm*DHODH 29

Figura 8 – Gráficos dos dados gerados nos ensaios de inibição enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH por monitoramento espectrofotométrico..... 30

Figura 9 – Distribuição dos valores de IC_{50} dos 59 extratos frente à enzima *Lm*DHODH..... 33

Figura 10 – Sobreposição da impressão digital metabólica por UHPLC-ESI-HRFTMS (modo de ionização negativo) dos extratos das 59 espécies de Asteraceae (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 Asteraceae (TIC - cromatograma de íons totais)..... 42

Figura 12 – Cromatogramas da amostra 130 (extrato de *Pluchea quitoc*, 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 *Pluchea quitoc*) e duas substâncias identificadas nela, os ácidos 5-*O*-*E*-cafeoilquínico e 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico..... 49

Figura 14 – Espectros de MS/MS (*full-scan*) em $[M-H]^-$ do pico com t_R 1,08 min (A) da amostra 130 (extrato de *Pluchea quitoc* DC.) e do padrão de ácido quínico (B)..... 50

Figura 15 – Espectros de MS/MS (*full-scan*) em $[M-H]^-$ do pico com tR 8,80 min (A) da amostra 130 (extrato de *Pluchea quitoc* DC.) e do padrão de ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico (B)..... 51

Figura 16 – PCA com as variáveis *x* das 59 amostras (em triplicata, modo negativo): gráfico dos valores de *score* (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 *score* (t) da LV-1 (52%, única componente preditiva) *vs* LV-2 (16%, componente ortogonal-1)..... 55

Figura 18 – *S-plot* da análise por OPLS-DA das amostras, em triplicata, no modo de ionização negativo..... 56

Figura 19 – Mapa de calor (*heatmap*) 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 *versus* 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 *versus* 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 *Lm*DHODH..... 31

Tabela 2 – Valores de IC_{50} das 57 substâncias testadas frente à enzima *Lm*DHODH..... 34

Tabela 3 – Validação de seletividade: valores de inibição frente à *Hs*DHODH das substâncias mais ativas contra *Lm*DHODH..... 37

Tabela 4 – Valores de ΔT_m (°C) para as substâncias nas três concentrações testadas com *Lm*DHODH em ambos os experimentos (*ThermoFMN* e *Thermofluor*/*SYPRO)* 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 *in vitro* de *Lm*DHODH..... 54

Tabela 7 – Biomarcadores correlacionados com a inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH e identificados em nível 1..... 60

Tabela 8 – Parâmetros estatísticos dos modelos de OPLS para classificação de novos extratos quanto ao potencial de inibição *in vitro* de *Lm*DHODH..... 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	*Automatic Gain Control*
AIF	*All-Ions Fragmentation*
AM1	*Austin Model 1*
ANN	*Artificial Neural Network* ou Redes Neurais Artificiais
APD	*Applicability Domain* ou Domínio de Aplicabilidade
AsterDB	*Asteraceae Database* ou Banco de dados de Asteraceae
BE	*Backward Eliminaton*
CAS	*Chemical Abstracts Services*
CV	*Cross-Validation* ou Validação Cruzada
DHO	*Dihydroorotate* ou Diidroorotato
DHODH	*Dihydroorotate dehydrogenase* ou Diidroorotato desidrogenase
DNs	Doenças Negligenciadas
DSF	*Differential Scanning Fluorimetry* ou Fluorimetria de Varredura Diferencial
ESI	*Electrospray Ionization* ou Ionização por *Electrocpray* (spray eletrolítico)
EtOH	Etanol
FS	*Forward Selection*
FUM	*Fumarate* ou Fumarato
GA	*Genetic Algorithm* ou Algoritmo Genético
GUI	*Graphical User Interface* ou Interface Gráfica com o Usuário
H-ESI	*Heated Electrospray Ionization*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography* ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HRFTMS	*High Resolution Fourier Transformation Mass Spectrometry*
IC_{50}	Concentração Inibitória de 50% da Atividade Enzimática
InChI	*IUPAC International Chemical Identifier*
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
LowModeMD	*Low Mode Molecular Dynamics*
LOF	*Lack of fit* ou Falta de Ajuste
LOO	*Leave-one-out*
MOE	*Molecular Operating Environment*
m/z	*mass-to-charge ratio* ou razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MLR	*Multiple Linear Regression* ou Regressão Linear Múltipla
Mol file	*Molecular file*
MS	*Mass Spectrometry* ou Espectrometria de Massa
OECD	*Organisation for Economic Co-operation and Development*
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLS	*Orthogonal Partial Least Squares* ou Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais
ORO	*Orotate* ou Orotato
PCA	*Principal Component Analysis* ou Análise de Componentes Principais
PCR	*Polimerase Chain Reaction* ou Reação em cadeia da Polimerase
PLS	*Partial Least Squares* ou Mínimos Quadrados Parciais
QSAR	*Quantitative Structure–Activity Relationship* ou Relação Quantitativa da Estrutura-Atividade
RMSE	*Root Mean Squared Error* ou Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio
rpm	Rotações por Minutos
SQ	*Sum of Squares* ou Soma Quadrática
SMILES	*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*
STLs	Lactonas Sesquiterpênicas (*Sesquiterpene lactones*)
t_R	Tempo de Retenção
UHPLC	*Ultra-High Performance Liquid Chromatography* ou Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV	*Ultraviolet* ou ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
σ	Sigma
Δ	Variação
$\sum$	Somatório
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
™	*Trademark*
®	Marca Registrada
©	*Copyright*

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 *in vitro* de inibidores de *Lm*DHODH **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 *in vitro* da enzima *Lm*DHODH…….. **13**
3.2.1 Expressão e purificação da enzima *Lm*DHODH..... 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 *in vitro* da enzima *Lm*DHODH…….. **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 *in vitro* da enzima *Lm*DHODH…….. 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 *in vitro* da enzima *Lm*DHODH…….. 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 descriminação; afeta regiões tropicais e subtropicais; são passíveis de controle, eliminação e erradicação; relativamente negligenciadas na pesquisa[1,4–6].

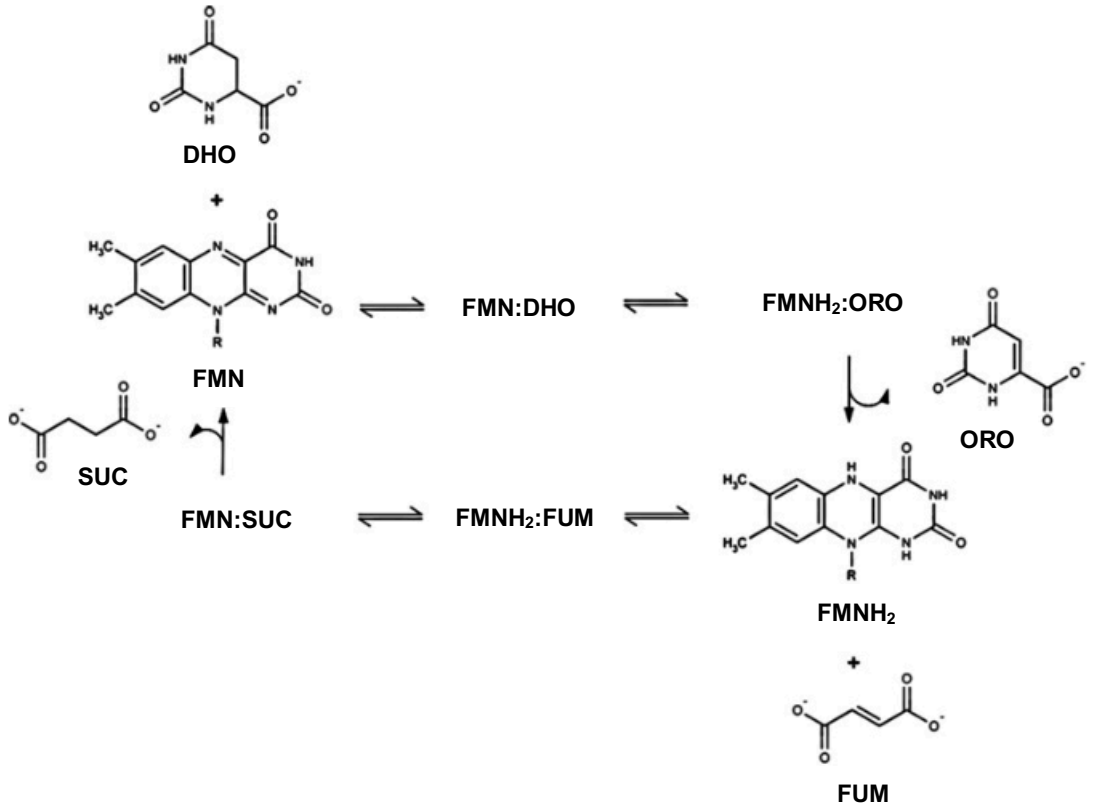
A leishmaniose é um conjunto de doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, distribuídos em mais de 20 espécies destes tripanosomatídeos (ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae), os quais são transmitidos ao hospedeiro humano pela picada de flebotomíneos fêmeas 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 *Lm*DHODH. 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 (*Hs*DHODH) e *Plasmodium falciparum* (*Pf*DHODH)[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 *Lm*DHODH, 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* (*Lm*DHODH)[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 cacterizar 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 Ressonance*); HPLC-UV-MS e GC(*Gas Chomatography*)-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 *Lm*DHODH 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* (*Lm*DHODH), 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 *Lm*DHODH;
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 predizer (classificar) com segurança se determinado extrato de uma espécie de Asteraceae, ainda não testada frente à *Lm*DHODH, 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 predizer a atividade de novas STLs e/ou outras substâncias que atendam ao domínio de aplicabilidade do modelo (APD – *Applicability Domain*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas experimentais da triagem *in vitro* por inibidores de *Lm*DHODH com extratos vegetais e substâncias isoladas estão descritas nas Figuras 2 e 3.

3.1 Amostras empregadas na triagem *in vitro* de inibidores de *Lm*DHODH

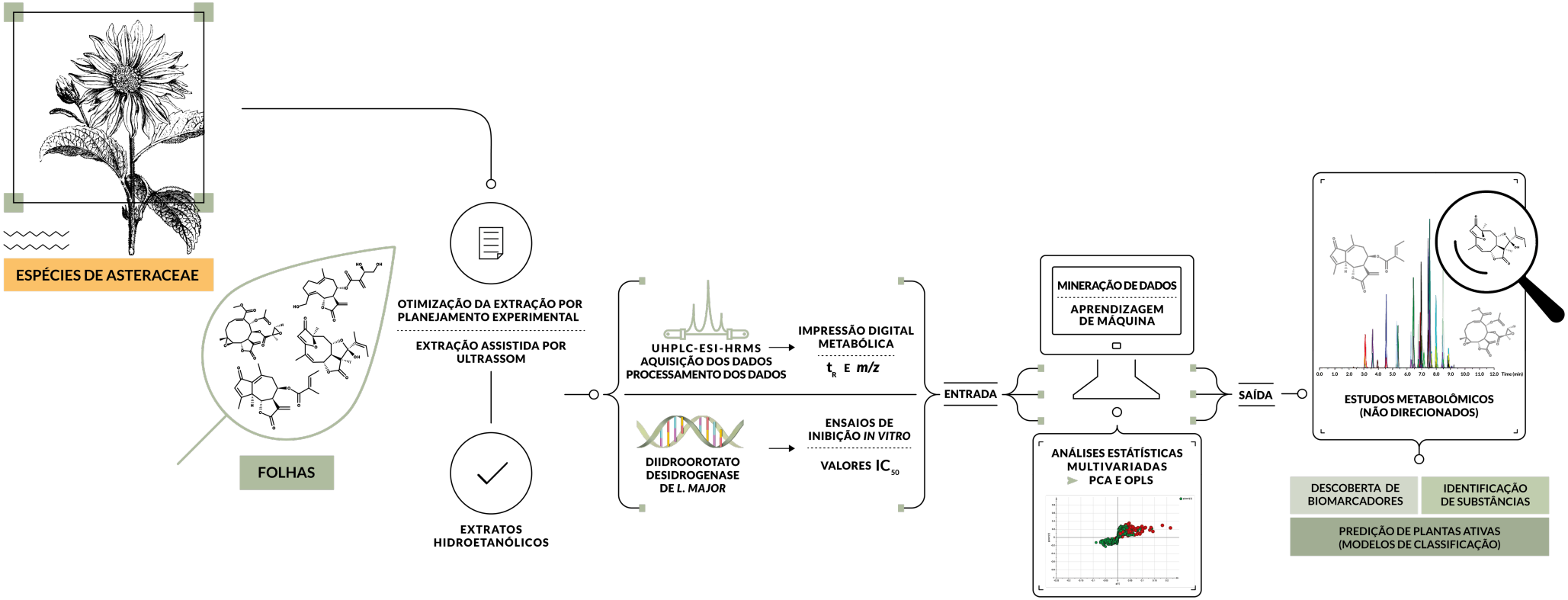
3.1.1 Material vegetal

Os extratos vegetais empregados na triagem *in vitro* de inibidores da enzima *Lm*DHODH aliada a estudos metabolômicos empregando UHPLC-UV-HRFTMS foram obtidos de espécies da família Asteraceae, a grande maioria nativa do Brasil. A lista final contém 150 espécies (Apêndice A), pertencentes a 14 tribos e 47 gêneros da família Asteraceae. As espécies que foram coletadas tiveram suas exsicatas depositadas no herbário SPF do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP, São Paulo-SP). No entanto, a maior parte das amostras de material vegetal utilizadas nas análises foi cedida por colaboradores, principalmente do IB-USP (trabalho de doutorado de Carolina Moriani Siniscalchi, sob a supervisão do Prof. Dr. José Rubens Pirani), as quais foram armazenadas em condições ideais de temperatura, iluminação e umidade no laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP.

Foi requerida e obtida a autorização para coleta e acesso envolvendo o grupo taxonômico Asteraceae: 1) registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico nº 43355-1, emitido em 09/05/2014 pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) do Ministério do Meio Ambiente (MMA); 2) autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010047/2015-8, concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA).

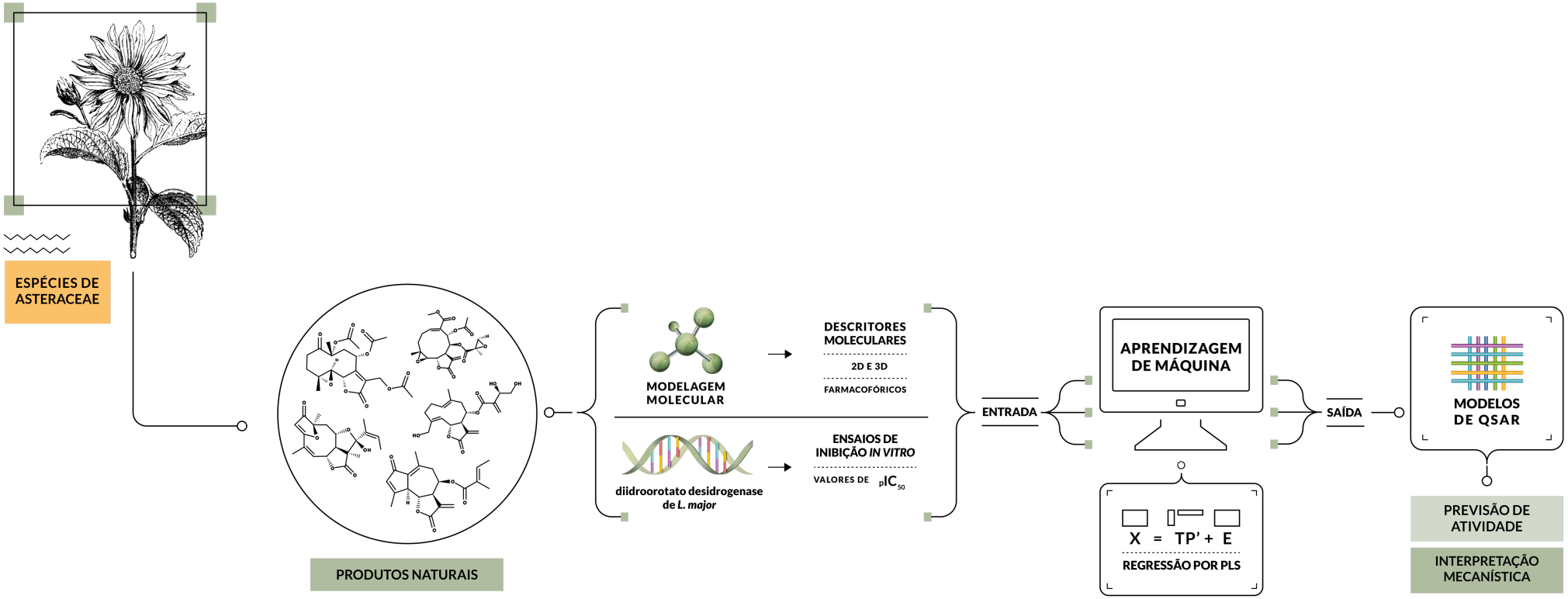
Com relação ao processamento do material vegetal, as folhas coletadas em campo foram estabilizadas e secas em estufa de ar circulante (40 ºC), durante 48-72 h. Após a secagem, o material foi armazenado em sacos plásticos com fechamento hermético contendo sílica azul desidratada e ao abrigo da luz. O material vegetal fornecido pelos colaboradores já veio seco e foi armazenado da mesma forma.

Figura 2 – Resumo gráfico com o fluxo de trabalho (*workflow*) da triagem *in vitro* de inibidores da enzima *Lm*DHODH 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 *Lm*DHODH envolvendo as substâncias isoladas



Fonte: o próprio autor.

3.1.2 Preparo dos extratos

As folhas secas foram pulverizadas em moinho analítico, com auxílio de nitrogênio líquido, obtendo granulometria homogênea da droga vegetal de cada uma das 150 espécies. Os extratos foram obtidos por meio de maceração assistida por ultrassom (frequência/potência ultrassônica de 40 kHz/135 Whatts RMS). A extração foi realizada em tubos de 5 mL empregando-se os seguintes parâmetros: solução extratora composta por EtOH-H_2O na proporção de 4:1 (v:v), razão droga vegetal/solução extratora de 20 mg/mL, e 10 min de maceração assistida por ultrassom. Após cada extração, os tubos foram centrifugados por 15 min a 3.500 rpm e o sobrenadante foi transferido a outro tubo. Em seguida, foram particionados com *n*-hexano para remover o material graxo (*clean up*) e submetidos a secagem em evaporador rotativo a vácuo (Savant SPD 2010-220, Thermo, EUA). Após secagem, os extratos foram armazenados a -4 ºC. Os rendimentos de todos os extratos preparados estão descritos no Apêndice A.

Estes extratos compõem a biblioteca de extratos (*AsterLib II*). As condições empregadas neste procedimento analítico de preparo de amostras foram finamente ajustadas por meio de um estudo prévio de Planejamento Experimental, aplicando Metodologia de Superfície de Resposta sob Planejamento Composto Central. Esta etapa de otimização e padronização do processo extrativo[1], a qual não constitui parte dos objetivos deste projeto, foi realizada em parceria com a Dra. Annylorry Lima Rosa, responsável pela elaboração da *AsterLib II*[139].

3.1.3 Substâncias isoladas

A triagem de substâncias com potencial de inibição *in vitro* de *Lm*DHODH foi realizada com 57 produtos naturais, provenientes, em sua maioria, da biblioteca de substâncias (*AsterLib I*)[139]. Estas substâncias foram isoladas de espécies de Asteraceae que compõem a biblioteca de extratos (*AsterLib II*) ou adquiridas comercialmente (Sigma-Aldrich®, Alemanha). A lista das 57 substâncias testadas encontra-se na Tabela 2 (item 4.2.2) e suas estruturas químicas na Figura 6 (item 3.4.1.1) e Apêndice B, sendo que apenas nove não são encontradas em Asteraceae.

---

[1]Os resultados desta etapa geraram o resumo "*Response Surface Methodology (RSM) applied to extraction optimization towards plant metabolomics*" que foi apresentado na forma de pôster no "*5th BCNP - Brazilian Conference on Natural Products*" realizado entre 26-29 de outubro de 2015, em Atibaia, SP. O trabalho foi premiado, recebendo certificado de premiação do comitê científico internacional do evento.

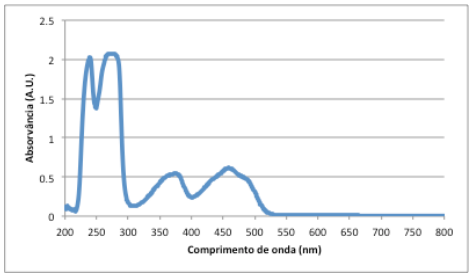
3.2 Avaliação do potencial de inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH

3.2.1 Expressão e purificação da enzima *Lm*DHODH

Os procedimentos para expressão heteróloga utilizando cepas de *Escherichia coli* e purificação das enzimas por cromatografia de afinidade em matriz de agarose contendo íons de níquel foram realizados de acordo com os protocolos anteriormente estabelecidos e rotineiramente utilizados no Laboratório de Cristalografia de Proteínas (LCP)[140] da FCFRP-USP para a enzima *Lm*DHODH[21,141], sob supervisão da Profa. Dra. Maria Cristina Nonato, membro da equipe deste projeto, com vasta experiência nesse tema, o que agrega confiabilidade e segurança no delineamento desta investigação.

Após a purificação por cromatografia de afinidade desta flavoproteína, sua concentração foi determinada monitorando espectrofotometricamente a flavina mononucleotídeo (FMN). O coeficiente de extinção molar da *Lm*DHODH baseado no FMN é $\varepsilon^{LmDHODH}$ = 11,722 mol^{-1} L cm^{-1} em 458 nm[142]. Após obter o espectro de absorção da solução de proteína com varredura realizada entre 200 e 800 nm (Figura 4) em leitor de microplacas (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384), a concentração da mesma foi determinada empregando a lei de Lambert-Beer, com o valor da absorvância em 458 nm.

Figura 4 – Espectro de absorção padrão da solução de *Lm*DHODH



Fonte: o próprio autor.

3.2.2 Avaliação do potencial inibitório dos extratos de Asteraceae

O potencial inibitório *in vitro* dos extratos de Asteraceae frente à enzima *Lm*DHODH foi avaliado por meio de estudos de cinética enzimática na presença dos mesmos, obtendo dois tipos de resultados: porcentagem de inibição da atividade enzimática e concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC_{50}). A avaliação da atividade enzimática foi realizada indiretamente por meio do

monitoramento espectrofotométrico da redução do reagente colorimétrico DCIP (2,6-dicloroindofenol), de coloração azul, que deixa de absorver em 610 nm quando reduzido a $DCIPH_2$, tornando-se incolor. A redução do reagente DCIP é estequiometricamente equivalente à oxidação de diidroorotato (DHO), um dos substratos da enzima[143]. Calcula-se então o consumo de substrato e/ou formação de produto em função do tempo e, consequentemente, a velocidade de reação.

Os ensaios para determinação da porcentagem de inibição enzimática foram realizados com extratos das 150 espécies descritas no Apêndice A. Após triagem do potencial inibitório dos 150 extratos em três concentrações, 59 foram selecionados para determinação dos valores de IC_{50}. O fluxograma apresentado na Figura 5 resume as etapas experimentais dos ensaios de cinética enzimática realizados em leitor de microplacas (Molecular Devices®, SpectraMax Plus 384), por meio de varreduras realizadas por 60 s em temperatura ambiente, 25 ºC. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após obter os dados de absorvância em função do tempo, de acordo com o procedimento descrito na Figura 5, partindo-se do coeficiente de extinção molar do DCIP (ε_{610nm}= 21,5 $mM^{-1}.cm^{-1}$) foi possível calcular a quantidade de DCIP reduzido e, consequentemente, a quantidade de produto formado em função do tempo, utilizando a Equação 1:

$$[ORO]_f = \frac{A}{\varepsilon b} \tag{1}$$

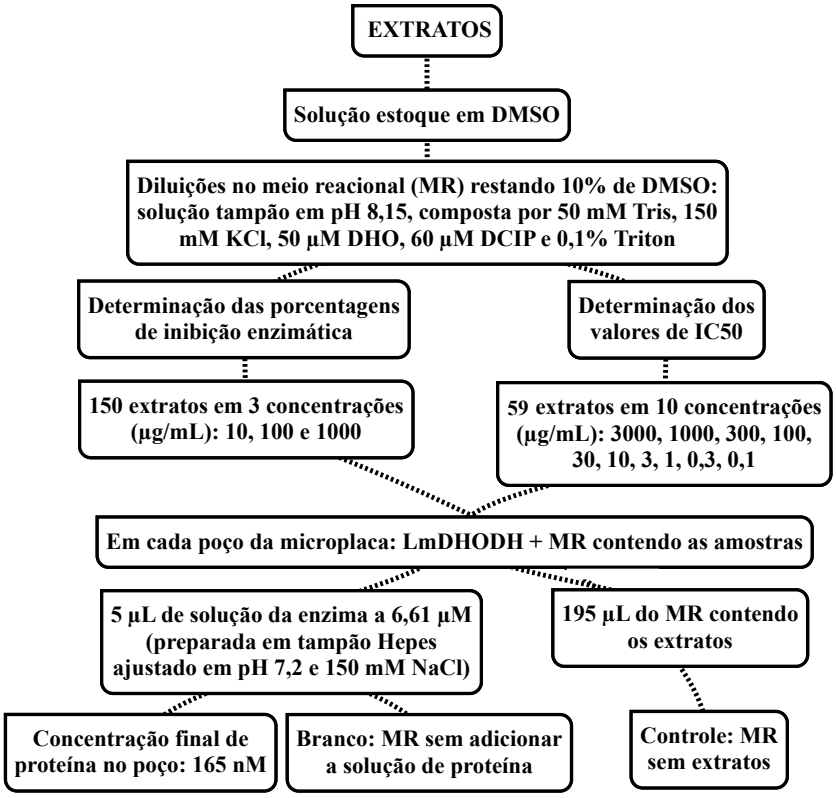
onde $[ORO]_f$ corresponde à concentração de orotato formado, A corresponde à absorbância medida, ε corresponde ao coeficiênte de extinção molar do DCIP no comprimento de onda monitorado e b o caminho ótico. Com os valores de $[ORO]_f$ em função do tempo (0-60s), foi realizada uma regressão linear, obtendo-se assim a equação da reta ($y = ax + b$) em que o coeficiente angular (*slope*) corresponde à velocidade média da reação na ausência (V_r) e na presença (V_i) dos extratos. A V_r foi utilizada como controle, correspondendo à velocidade com 100% da atividade enzimática. A porcentagem de inibição ($\%_{Inibição}$) foi determinada utilizando a Equação 2:

$$\%_{Inibição} = 100 - \left(\frac{100V_i}{V_r}\right) \tag{2}$$

onde V_r é a velocidade de reação determinada na ausência de inibidor, curva referência, e V_i é a velocidade da reação na presença do inibidor. Os cálculos de

velocidade da reação e porcentagem de inibição foram realizados no software Microsoft Excel e as análises estatísticas no software Prism 6.0 (*GraphPad*, EUA).

Figura 5 - Etapas experimentais dos ensaios de cinética enzimática com os extratos de Asteraceae



Fonte: o próprio autor.

Para a determinação da IC_{50} os ensaios de inibição foram realizados variando as concentrações dos inibidores testados, também em triplicata (Figura 5). Para cada extrato, as porcentagens de atividade enzimática em função do logaritmo da concentração foram submetidas a análise de regressão não-linear utilizando a Equação 3, "*log(inhibitor) versus response-variable slope*", no Prism 6.0.

$$Y = min + \frac{max - min}{1 + 10^{(logIC50 - X)} \times Hillslope} \quad (3)$$

onde *Y* é a porcentagem de atividade, *X* é o logaritmo da concentração, *max* e *min* são, respectivamente, os valores máximo e mínimo de porcentagem de atividade e *Hillslope* é o coeficiente de Hill (coeficiente de cooperatividade), cujo valor é variável.

3.2.3 Avaliação do potencial inibitório das substâncias isoladas

A avaliação do potencial inibitório das 57 substâncias puras foi realizada da mesma forma descrita para os extratos no item 3.2.2, obtendo os valores de IC_{50}

para cada um dos inibidores a partir dos valores de porcentagem de atividade enzimática em treze concentrações, que não foram as mesmas para todas as substâncias e foram definidas após teste inicial a 100 μM. Os valores de IC_{50} foram transformados para dimensão molar e utilizados na forma do logaritmo decádico negativo (pIC_{50}), para melhor visualização das potências relativas. As substâncias mais ativas contra *Lm*DHODH foram testadas frente à *Hs*DHODH para validação da seletividade, de acordo com Pinheiro et al. (2013)[144]. As estruturas químicas das 57 substâncias estão disponíveis na Figura 6 e no Apêndice B.

3.2.3.1 Ensaios de termoestabilidade baseados em fluorimetria de varredura diferencial

Esta etapa envolveu somente as 21 STLs. Os experimentos de DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*) foram realizados em um termociclador - sistema de PCR em tempo real Mx3005P (*Agilent Technologies*, EUA) - equipado com filtros específicos para medir o sinal de fluorescência do FMN no ensaio *ThermoFMN* ou a fluorescência na presença do corante fluorescente SYPRO Orange (*Invitrogen*, EUA) no ensaio *Thermofluor*. O experimento foi montado em uma placa para PCR de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 20 μL de enzima a 10 μM e diferentes ligantes em três diferentes concentrações (1.000, 500 e 100 μM), em triplicatas. Para o ensaio *Thermofluor*, também foi adicionado 0,1% de SYPRO Orange. A variação da intensidade de fluorescência foi monitorada utilizando os filtros FAM (492 nm) e ROX (610 nm), excitação e emissão, respectivamente, para o ensaio *Thermofluor*[145–147]. No experimento de *ThermoFMN*[142], o filtro foi FAM SyBr verde I, 492 nm (excitação) e 516 nm (emissão). A temperatura variou de 25 a 95 °C (1 °C/min) e as medições de fluorescência foram realizadas. A intensidade da fluorescência foi descrita em função da temperatura, que geralmente descreve uma curva sigmoidal. O ponto de inflexão da curva permite determinar a temperatura de fusão da proteína, T_m.

3.3 Estudos metabolômicos

Esta etapa envolveu apenas os 59 extratos previamente selecionados para determinação dos valores de IC_{50} (item 3.2.2), para obtenção das suas impressões digitais e posterior análises quimiométricas de correlação com os dados de inibição enzimática. Esta abordagem foi delineada e executada dentro de critérios já bem estabelecidos para estudos de metabolômica vegetal, desde o preparo de amostras[98–100], condução dos experimentos para aquisição dos dados[85,148–150], processamento e análise dos dados[79,104,105], tendo cuidado de fornecer todas as informações mínimas padronizadas[79,109–112,151,152].

3.3.1 Aquisição dos dados

A plataforma analítica empregada para obtenção da impressão digital metabólica das amostras foi um cromatógrafo líquido de ultraeficiência (UHPLC, Acella, *Thermo Scientific*, EUA) acoplado a espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização a pressão atmosférica (*API* source – *Atmospheric Pressure Ioniza*tion) por *electrospray* (H-ESI – *Heated-Electrospray*) e analisador de massas de alta resolução (HRFTMS – *High Resolution Fourier Transformation Mass Spectrometry*) do tipo *Orbitrap* (*Exactive Plus*, *Thermo Scientific*).

Os 59 extratos, obtidos conforme descrito no item 3.1.2, foram solubilizados a 1,0 $mg.mL^{-1}$ em acetonitrila (grau LC-MS, Sigma-Aldrich, Alemanha) e água (mili-Q) 1:1 (v:v), filtrados em filtro PTFE de 0,2 µm e analisados aleatoriamente, em triplicata, por um método previamente desenvolvido (planejamento experimental) e devidamente validado[139]. Diversos brancos foram injetados do início ao fim da sequência de análises. Os dados foram gravados usando o software Xcalibur 2.1.0 (*Thermo Scientific*). Os seguintes parâmetros foram estabelecidos:

a) cromatografia: coluna Kinetex XB-C18 (*coreshell*, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm, Phenomenex, EUA); fase móvel composta por água (fase A, ácido fórmico 0,05%, mili-Q) e acetonitrila (fase B, ácido fórmico 0,05%, grau LC-MS, Sigma-Aldrich, Alemanha); vazão da fase móvel de 400 $\mu L.min^{-1}$; eluição em modo gradiente: 0-15 min em 5-50% de B, 15-20 min em 50% de B e 20-30 em 50-100% de B; volume de injeção: 4 µL; temperatura da coluna: 30 °C (temperatura do *rack*: 25 °C).

b) espectrometria de massas: o espectrômetro foi operado nos modos positivo e negativo, devidamente calibrados utilizando padrões de baixa massa molecular e a solução Thermo calmix (Sigma-Aldrich); poder de resolução de 70.000; tempo de varredura de 2,5 scans.s^{-1}, com faixa de massa entre 150-2.000 *u*; fragmentação ativa na célula de colisão (*HCD – Higher Energy Collisional Dissociation*, energia de colisão: 35 unidades) para todos os íons gerados (AIF – *all ion fragmentation*); tempo máximo de injeção de 250 ms, com controle automático de ganho (AGC – *Automatic Gain Control*) fixado em $3x10^6$; aquisição em modo centroide; principais parâmetros da fonte de ionização (H-ESI): tensão (DDP - diferença de potencial) no spray de 3,6 kV (modo positivo) e 3,2 kV (modo negativo); temperatura do capilar de 320 °C; fluxo do gás de bainha (*sheath gas*) de 30 (modo positivo) e 11 (modo negativo) unidades arbitrárias; fluxo do gás auxiliar (*auxiliary gas*) de 10 unidades arbitrárias e nível de *S-lens* RF de 55.

3.3.2 Processamento dos dados

No que se pode denominar de pré-processamento[104], os dados brutos obtidos no formato “fechado” (arquivos .raw) foram inicialmente separados nos modos positivo e negativo, no software Xcalibur e, então, empregando-se a plataforma em linha de comando ProteoWizard[153,154] (função *MSconvert*), foi realizada a conversão dos dados para o formato “aberto” mzXML; correção inicial da linha de base, com exclusão dos íons com intensidade inferior a 10^4; redução do tempo de varredura (*scan time*) para 0-30 min (foram removidos 10 min referentes ao período de limpeza da coluna); e compressão dos dados.

O processamento dos dados[79,104,105], propriamente dito, foi realizado no software MZmine 2.23 (*MZmine Development Team*, Finlândia)[155–157], empregando os parâmetros descritos em detalhes no Apêndice C. Resumidamente, foram efetuadas as etapas de correção/suavização da linha de base; detecção de massas (íons) e remoção de ruído; remoção de falsos picos obtidos em equipamentos que utilizam transformada de *Fourier*; desconvolução dos cromatogramas; agrupamento dos picos referentes a isótopos de uma mesma substância; alinhamento dos picos referentes às mesmas substâncias em diferentes

extratos analisados e preenchimento de espaços vazios. O ajuste de cada etapa foi realizado com base nos valores predefinidos no software[155,156,158], nos cromatogramas obtidos, nas características do analisador de massas (poder de resolução e exatidão de massa) e por tentativa e erro. No Apêndice D e E, esta etapa de processamento dos dados está representada por duas capturas de tela da interface gráfica (GUI – *Graphical User Interface*) do software MZmine.

3.3.3 Análises quimiométricas dos dados

Os conjuntos de dados processados foram, então, submetidos a métodos de análise estatística multivariada, não supervisionado (PCA – *Principal Component Analysis*) e supervisionado (OPLS-DA – *Orthogonal Partial Least Squares–Discriminant Analysis*), utilizando o software SIMCA-P+ 13.0 (*Umetrics*, Suécia)[159]. No Apêndice F, esta etapa está representada por uma captura de tela da interface gráfica deste software. A análise dos dados foi precedida por pré-tratamento com normalização do tipo Pareto (centragem na média, seguida por escalonamento empregando a raiz quadrada do desvio padrão), para os valores de área cromatográfica dos picos (variáveis *x*) ao longo de todos os extratos (amostras). A PCA foi utilizada para análise exploratória das impressões digitais metabólicas por LC-MS, visando detectar padrões de agrupamento e *outliers* nas amostras. A análise por OPLS foi recorrida para correlacionar os dados químicos (variáveis *x*, picos cromatográficos com informações de área, tempo de retenção e massa acurada em alta resolução) com os dados de atividade biológica (variável *y*, valores de IC_{50} para inibição *in vitro* de *Lm*DHODH), com duas finalidades: descoberta de biomarcadores e obtenção de modelos de regressão para predição (classificação) de extratos ativos/inativos frente à enzima. Em ambas as abordagens, os extratos com valor de IC_{50} abaixo de 500 $mg.ml^{-1}$ foram considerados ativos, e acima deste mesmo valor foram considerados inativos.

3.3.3.1 Descoberta de biomarcadores

Após excluir amostras detectadas como *outliers* pela PCA, os dados foram modelados por OPLS-DA, com validação cruzada, buscando determinar quais eram as variáveis (picos/substâncias) discriminantes, ou seja, efetivamente importantes e possivelmente responsáveis pelo potencial biológico em questão. Para garantir a

obtenção de um modelo estatístico final de alta performance, que extraísse informações biológicas de fato relevantes, foram comparados resultados obtidos sem e com seleção de variáveis: a) modelo com todas as variáveis obtidas após o processamentos dos dados; b) modelo contendo somente variáveis selecionadas por meio do parâmetro VIP (*Variable Importance in the Projection*, VIP > 0,5), gerado no software SIMCA-P; c) modelo contendo somente variáveis selecionadas por meio de Algoritmo Genético (GA) no software Weka 3.8.0 (Universidade de Waikato, Nova Zelândia)[160,161], utilizando parâmetros predefinidos (tamanho da população = 20; número de gerações = 20; probabilidade de cruzamentos = 0,6; probabilidade de mutações = 0,033). Foram gerados modelos para os dados nos modos de ionização negativo e positivo, separadamente e também concatenados.

Os parâmetros estatísticos para avaliação e comparação dos modelos foram[2]: a) coeficiente de determinação da calibração (R^2) e validação cruzada (Q^2); b) raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_C$) e validação cruzada ($RMSE_{CV}$). O melhor modelo foi utilizado para pesquisa de biomarcadores, selecionando como variáveis discriminantes somente aquelas cujo coeficiente de regressão foi significante (intervalo de confiança não incluiu o valor zero) e o valor de VIP foi superior a 1,0. A etapa de desreplicação para identificação destas substâncias foi realizada conforme será descrito no item 3.3.4.

3.3.3.2 Modelo de predição

O objetivo nesta etapa foi obter um modelo capaz de predizer (classificar) com segurança se novos extratos, de espécies de Asteraceae ainda não testadas frente à *Lm*DHODH, são ativos ou inativos, com base exclusivamente na sua impressão digital por UHPLC-ESI-HRFTMS. Os 59 extratos foram divididos em conjunto treino (n = 44) e teste (n = 15), de forma a permitir que o conjunto teste reproduzisse a faixa de IC_{50} e representasse adequadamente a diversidade botânica (tribos e gêneros) do conjunto treino. O método de aprendizagem de máquina utilizado foi novamente o OPLS, aplicando ao conjunto treino para calibração (e validação cruzada) as mesmas condições que forneceram o melhor modelo no item 3.3.3.1.

---

[2]Os parâmetros estatísticos para avaliação e validação de métodos quimiométricos em metabolômica ainda não são tão bem estabelecidos quanto para a área de QSAR. A avaliação dos modelos metabolômicos seguiu algumas das mesmas referências utilizadas nos estudos de QSAR, por isso estão melhor descritos e discutidos na descrição destes modelos.

O modelo obtido foi, então, submetido a validação externa com o conjunto teste, para avaliar a sua real capacidade preditiva, por meio da porcentagem de acerto. O modelo também foi avaliado pelos parâmetros estatísticos descritos no item 3.3.3.1. Para reforçar a validação, assegurando que os resultados não foram obtidos ao acaso, o procedimento descrito foi repetido para uma nova distribuição das amostras entre conjunto treino e teste. Por fim, foi realizado um teste de aleatorização dos valores de *y*.

3.3.4 Identificação de metabólitos

Primeiramente, buscou-se identificar o máximo de substâncias presentes nos 59 extratos, nos modos de ionização negativo e positivo. Em seguida, a desreplicação teve como foco as variáveis consideradas discriminantes pelos modelos descritos no item 3.3.3.1. A identificação dos metabólitos seguiu critérios já bem estabelecidos para padronização de estudos metabolômicos, descrevendo quatro níveis de identificação[109,112,113,152].

A primeira fase da desreplicação foi realizada por meio do software MZmine, utilizando um banco de dados *in house* contendo as informações de tempo de retenção (t_R) e massa monoisotópica em alta resolução (massa acurada, exatidão < 5 ppm) das 120 substâncias *AsterLib I*, as quais foram injetadas no mesmo método de análise dos extratos (Apêndice G). A identidade das substâncias desreplicadas nesta etapa foi confirmada pelo padrão de fragmentação dos espectros de MS/MS. A segunda fase de desreplicação baseou-se exclusivamente na massa monoisotópica, envolvendo o banco de dados *in house AsterDB*[121,122], o qual contém informações de mais de 2.500 metabólitos já isolados e/ou identificados na família Asteraceae. A última etapa utilizou os bancos de dados online do *Dictionary of Natural Products* (DNP)[162], *SciFinder*[163] e *ChemSpyder*[164], se baseando unicamente na fórmula molecular.

3.4 Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) de lactonas sesquiterpênicas para inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH

Esta parte do trabalho foi desenvolvida durante a realização da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE/FAPESP, processo n° 2016/18579-3), entre dezembro de 2016 e setembro de 2017, no Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica (IPBP – *Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie*) da Universidade de Münster (*Westfälische Wilhelms-Universität Münster*), Münster (Alemanha), sob a supervisão do Prof. Dr. Thomas J. Schmidt.

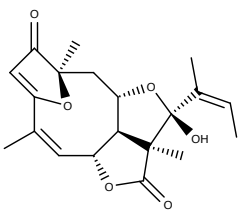
3.4.1 Estudos de QSAR baseado em descritores moleculares

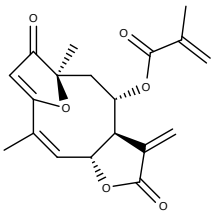
3.4.1.1 Modelagem molecular e otimização da geometria

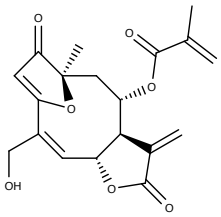
As estruturas 2D das 21 STLs (Figura 6) foram desenhas utilizando o software *MarvinSketch* 15.1.19 (*Chemaxon*, Hungria)[165], obtendo os arquivos em formato *mol file*. Para garantir a acurácia dos dados das substâncias (estrutura química, configuração estereoquímica, nome IUPAC e número de registro CAS), foram consultados os artigos originais contendo as informações de isolamento, elucidação estrutural e configuração absoluta; bem como as bases de dados online do *SciFinder*[163] e *ChemSpyder*[164].

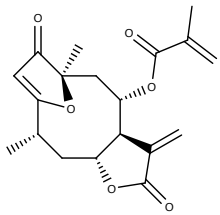
Os modelos moleculares tridimensionais de todas as substâncias foram gerados no software MOE 2016.08 (*Chemical Compounting Group*, Canadá)[166], por meio de minimização da energia por mecânica molecular utilizando campo de força MMFF94x (Apêndice H). Nesta etapa, foram localizadas geometrias moleculares correspondentes a mínimos locais na superfície de energia potencial (SEP) das moléculas[167]. Estas geometrias foram então otimizadas por análise conformational (Apêndice I), utilizando *LowModeMD* (configurações padrão do MOE, com *energy window* de 3 kcal.mol^{-1} acima do mínimo global). Este procedimento visou prover conformações atômicas 3D energeticamente plausíveis e, eventualmente, encontrar o mínimo global de energia da SEP. Finalmente, com o intuído de possibilitar também o cálculo de descritores 3D, o confôrmero resultante com menor energia de campo de força para cada molécula foi novamente otimizado, agora empregando minimização por mecânica quântica (método semi-empírico AM1), a qual disponibiliza os orbitais atômicos[167] (Apêndice J).

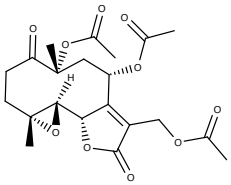
Figura 6 – Estrutura química das 21 STLs (para identidade das substâncias vide Tabela 2)

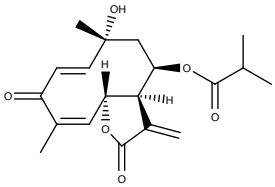

STL1

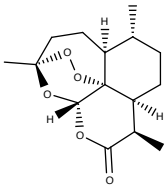

STL2

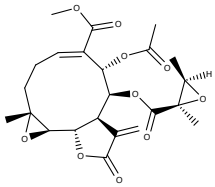

STL3

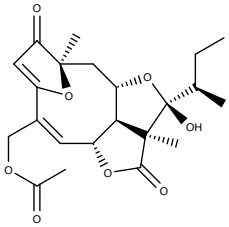

STL4

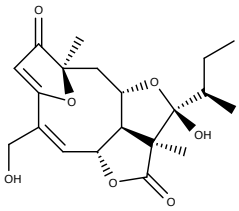

STL5

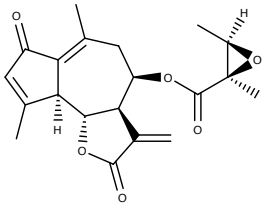

STL6

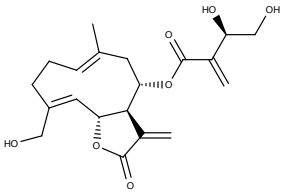

STL7

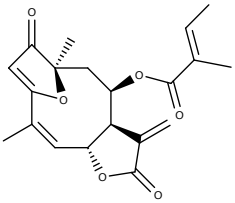

STL8

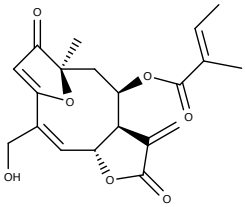

STL9

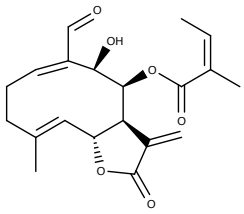

STL10

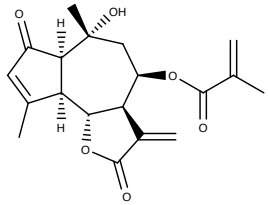

STL11

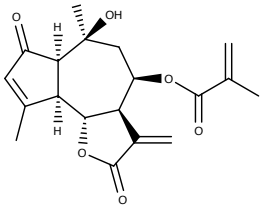

STL12

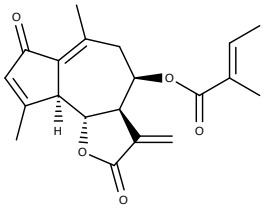

STL13

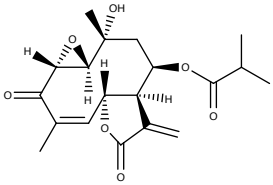

STL14

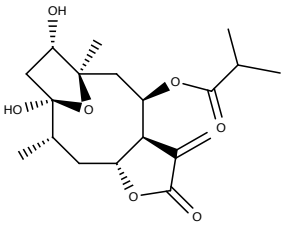

STL15

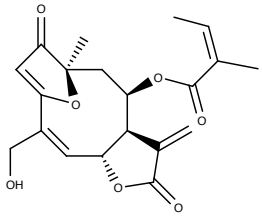

STL16


STL17


STL18


STL19


STL20


STL21

Fonte: o próprio autor (estruturas químicas desenhadas no software MarvinScketch).

3.4.1.2 Geração de descritores

O cálculo dos descritores e todos passos seguintes do estudo de QSAR foram realizados utilizando a suíte de aplicativos QuaSAR no software MOE[166] (Apêndice K). Foram calculados descritores moleculares 2D e 3D para as 21 STLs, totalizando 324 variáveis independentes (variáveis *x*)[167]:

a) descritores 2D (n = 198): *physical properties; Hueckel theory descriptors; subdivided surface areas; atom counts* e *bond counts; Kier & Hall connectivity* e *Kappa shape indices; adjacency* e *distance matrix descriptors; pharmacophore feature descriptors* e *partial charge descriptors*.
b) descritores 3D (n = 126): *potential energy descriptors; MOPAC descriptors; surface area, volume* e *shape descriptors*, e *conformation dependent charge descriptors*.

3.4.1.3 Seleção de descritores e construção dos modelos

A primeira etapa de seleção de variáveis foi realizada utilizando o aplicativo estatístico *QSAR-Contingency* no MOE[167] para se reduzir o número de descritores antes de gerar os modelos (calibração). Foram realizadas análises de correlação (entre as variáveis *x* e *y*) e de contingência (dentre as variáveis *x*). Foram incluídos na segunda etapa de seleção de descritores e calibração somente os descritores com coeficientes de correlação (r^2) acima de 0,2 e de contingência (C) acima de 0,6.

As 21 moléculas foram divididas em conjunto treino (n = 15) e teste (n = 6), de forma a permitir que o conjunto teste reproduzisse a faixa de pIC_{50} e representasse adequadamente a diversidade estrutural do conjunto treino[134]. A segunda etapa de seleção de descritores foi associada à construção dos modelos, a qual foi alcançada por meio de regressão linear pelo método PLS implementado no MOE (Apêndice L), empregando validação cruzada (CV) do tipo *leave-one-out* (LOO). Os dados foram transformados (coluna a coluna) utilizando o desvio padrão, de modo a apresentarem variância unitária. Três métodos de seleção de variáveis foram separadamente conduzidos, em busca das melhores combinações de descritores para os modelos de QSAR: *forward selection* (FS), *backward elimination* (BE) e algoritmo genético (GA). Cada um destes métodos foi aplicado ao conjunto treino utilizando três diferentes blocos de descritores, levando em consideração: a) somente descritores 2D (n = 165); b) somente descritores 3D (n = 113); c)

descritores 2+3D (n = 278). Para cada bloco de descritor, os métodos de seleção foram desenvolvidos permitindo número máximo de descritores igual a 2 e 3.

Forward selection é um método clássico que inicia com nenhuma variável independente no modelo e adiciona os descritores um a um por tentativa e erro[138]. O primeiro descritor incluído na regressão foi aquele com a maior correlação (r^2) com a atividade biológica e novas variáveis são então progressivamente adicionadas ao modelo. O parâmetro estatístico recorrido para quantificar o ganho na qualidade do ajuste dos modelos com a combinação de descritores selecionada foi o coeficiente de determinação (R^2) da CV, atribuído como Q^2, junto com a raiz quadrada do erro quadrático médio da CV ($RMSE_{CV}$). *Backward elimination* também é um método clássico, porém, ao contrário do FS, este inicia a regressão com todos os descritores e segue removendo um a um[131]. As variáveis são eliminadas com base nos valores normalizados de seu coeficiente de regressão e quando sua remoção do modelo gera melhor qualidade de ajuste, traduzida pelos parâmetros Q^2 e $RMSE_{CV}$.

Algoritmo genético é um método de seleção baseado em inteligência artificial, tendo como inspiração a teoria da evolução. Os descritores representam os “genes”, combinados em diferentes formas nos “cromossomos” (modelos). Uma população inicial de modelos é gerada aleatoriamente, da qual uma nova amostragem de modelos (“nova geração”) é criada (“reprodução”) por meio da troca de descritores entre os modelos “ancestrais/parentes” (“cruzamento/*crossing over*”) ou por modificações aleatórias (“mutações”). Desta forma, a nova geração de modelos substitui a anterior e o algoritmo segue estes “ciclos evolutivos” mantendo somente os melhores modelos com base nas funções estatísticas para qualidade do ajuste[168,169]. Neste estudo, lançou-se mão de seleção de variáveis dirigida por GA combinado com regressão linear múltipla (GA-MLR), como implementado no MOE (*script* GA.svl disponível para usuários do MOE via *Web site* da CGC/MOE, Apêndice M)[170]. Os modelos foram avaliados por meio da falta de ajuste (LOF), sendo que o critério de término foi a ocorrência de um valor de LOF pré-determinado ou a realização do número máximo de 1.000 ciclos. O número máximo de gerações foi 50.000 e a probabilidade de mutação 0,5. A população final de modelos, contendo no máximo 100 equações, foi submetida a CV LOO e as combinações de descritores dos modelos com os maiores valores de Q^2 foram selecionadas para modelagem adicional, empregando agora regressão por PLS, com número máximo de variáveis latentes igual ao número de descritores do modelo.

3.4.1.4 Validação dos modelos

A validação cruzada *leave-one-out* foi aplicada para avaliar a previsibilidade interna dos modelos, estimando os erros de predição. Neste procedimento, remove-se uma molécula do conjunto treino para ser utilizada como teste e as restantes são empregadas na calibração do modelo. Isso é realizado para o conjunto treino, até que todas as moléculas foram utilizadas como conjunto treino[161] e, uma vez completado o processo, os valores médios de Q^2 e $RMSE_{CV}$ são descritos. Os melhores modelos para cada método de seleção de variáveis e bloco de descritores foram selecionados por meio dos parâmetros estatísticos Q^2, $RMSE_{CV}$ e valor *F* (Fisher).

Validação externa foi aplicada somente para modelos com $R^2 > 0,6$, $Q^2 > 0,5$ e baixos valores de RMSE, utilizando o conjunto teste, i.e. um conjunto externo de moléculas sem participação na calibração, para estimar os erros de predição externa[171–173]. O domínio de aplicabilidade do modelo selecionado (teste de APD – *Applicability Domain*, software Knime 3.4.1, KNIME AG, Suíça[174]) foi definido por similaridade (distância Euclidiana), para garantir que as substâncias do conjunto teste pudessem ser utilizadas com segurança para as predições[175,176].

Uma série de três testes de aleatorização dos valores de *y* foram realizados como estratégia final de validação. As variáveis dependentes (atividade biológica) do conjunto treino foram aleatoriamente reatribuídas às moléculas e a regressão por PLS repetida mantendo-se a ordem original das variáveis independentes (descritores). As equações resultantes da regressão foram também utilizadas para predizer a atividade do conjunto teste, cujas variáveis *y* não foram aleatorizadas.

Portanto, qualidade do ajuste, robustez e poder de predição dos modelos foram estimadas por meio das seguintes funções estatísiticas[126,133,137, 173,177,178]:

a) coeficiente de determinação da calibração (R^2, Equação 4), validação cruzada (Q^2, Equação 5) e validação externa (P^2_{F1}, Equação 6; e P^2_{F2}, Equação 7);
b) raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_C$, Equação 8), validação cruzada ($RMSE_{CV}$, Equação 9) e validação externa ($RMSE_P$, Equação 10).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i \left(y_{e(i)} - y_{cc(i)}\right)^2}{\sum_i \left(y_{e(i)} - \bar{y}_e\right)^2} \quad (4)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_i \left(y_{e(i)} - y_{pi(i)}\right)^2}{\sum_i \left(y_{e(i)} - \bar{y}_e\right)^2} \quad (5)$$

$$P_{F1}^2 = 1 - \frac{\sum_i \left(y_{et(i)} - y_{pt(i)}\right)^2}{\sum_i \left(y_{et(i)} - \bar{y}_e\right)^2} \quad (6)$$

$$P_{F2}^2 = 1 - \frac{\sum_i \left(y_{et(i)} - y_{pt(i)}\right)^2}{\sum_i \left(y_{et(i)} - \bar{y}_{et}\right)^2} \quad (7)$$

$$RMSE_C = \sqrt{\frac{\sum_i \left(y_{e(i)} - y_{cc(i)}\right)^2}{n - k - 1}} \quad (8)$$

$$RMSE_{CV} = \sqrt{\frac{\sum_i \left(y_{e(i)} - y_{pi(i)}\right)^2}{n}} \quad (9)$$

$$RMSE_P = \sqrt{\frac{\sum_i \left(y_{et(i)} - y_{pt(i)}\right)^2}{n}} \quad (10)$$

Os termos que compõem as Equações 4-10 estão definidos a seguir:

i - índice de notação da *i*-ésima amostra;
n - número de moléculas no conjunto treino ou tese;
k - número de parâmetros (descritores) no modelo;
y_e - valor experimental (observado) de *y* do conjunto treino;
y_{et} - valor experimental (observado) de *y* do conjunto teste;
y_{cc} - valor calculado de y para a calibração;
y_{pi} y_{pt} - respectivamente, valor previsto de *y* da validação interna e externa;
$\bar{y}_e$ $\bar{y}_{et}$ - respectivamente, as medias de y_e e y_{et}.

Para o modelo final validado, foi aplicado novamente o teste de APD com o intuito de selecionar seis substâncias dentre as 57 inicialmente testadas, pertencentes a outras classes de metabólitos secundários que não as STLs. Estas seis substâncias, complemente diferentes das que foram utilizadas para calibração e validação do modelo, foram utilizadas para a avaliação externa do modelo escolhido.

3.4.2 Estudos de QSAR 3D baseado em descritores farmacofóricos

Esta abordagem foi realizada de acordo com Schomburg et al. (2013)[179]. As duas substâncias mais ativas, STL18 (27 μM) e STL5 (31 μM), foram sobrepostas por meio do alinhamento de farmacóforos, empregando o aplicativo "*Pharmacophore Elucidator*" nas configurações padrão do MOE[166] (Apêndice N). As geometrias moleculares minimizadas por AM1 previamente obtidas (item 3.4.1.1) foram empregadas neste alinhamento, o qual gera um modelo farmacofórico e executa uma coleção "consultas de farmacóforos" (*pharmacophore queries*), induzindo o alinhamento das moléculas. As representações gráficas das superfícies moleculares foram geradas para comparação utilizando o aplicativo "*Surface and Maps*", também no MOE[167].

Para geração dos descritores farmacofóricos, as moléculas foram individualmente sobrepostas ao duplo alinhamento das STLs 18 e 5. Cada estrutura sobreposta foi então visualmente examinada para determinar a presença ou ausência de cada grupo do modelo farmacofórico, gerando variáveis indicativas pela atribuição de valor 1 para presença e 0 para ausência de determinado grupo farmacofórico. Desta forma, quatro variáveis indicativas (F1-F4) foram obtidas e utilizadas como descritores para o estudo de QSAR, juntamente com índice de alinhamento global (S), o qual mede a qualidade da sobreposição de cada molécula com o alinhamento dual das STLs 18 e 5. A distribuição das substâncias em conjunto treino (n = 15) e teste (n = 6) foi a mesma empregada no QSAR clássico (item 3.4.1.3). A calibração dos modelos se deu por meio de regressão por PLS implementada no MOE, inicialmente incluindo somente os descritores farmacofóricos (F1-F4 e S) e, em seguida, levando em consideração também o descritor 3D interno (i3D) mais importante no estudo clássico de QSAR. As estratégias de validação dos modelos e os parâmetros estatísticos para avaliação da qualidade de ajuste foram os mesmos descritores anteriormente (item 3.4.1.4).

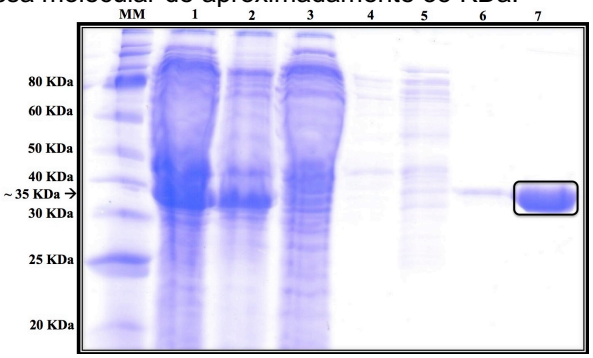
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do potencial de inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH

4.1.1 Avaliação do potencial inibitório dos extratos de Asteraceae

Em uma das purificações de proteína realizadas, foi empregada uma análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 14% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE – 14%), visando confirmar a obtenção da enzima *Lm*DHODH. A revelação do gel foi efetuada com o corante "*Coomassie brilliant blue*" e constatou-se que efetivamente o procedimento de purificação padronizado e amplamente utilizado no LCP permite a purificação desta enzima (Figura 7).

Figura 7 – SDS-PAGE-14% do processo de purificação da proteína *Lm*DHODH. MM - padrão de massa molecular; 1 - sobrenadante da solução de bactérias contendo proteína após sonicação; 2 *pellet* ressuspendido da solução de bactérias contendo proteína após sonicação; 3 - primeiro efluente da coluna após adição da solucão de proteína; 4 - eluato obtido com tampão de purificação (TP) sem imidazol; 5 - eluato obtido com TP 25 mM imidazol; 6 - eluato obtido com TP 50 mM imidazol; 7 - eluato obtido com TP 100 mM imidazol. A proteína é eluída no TP com 100 mM imidazol como pode ser comprovado pela banda demarcada. *Lm*DHODH migra com massa molecular de aproximadamente 35 KDa.

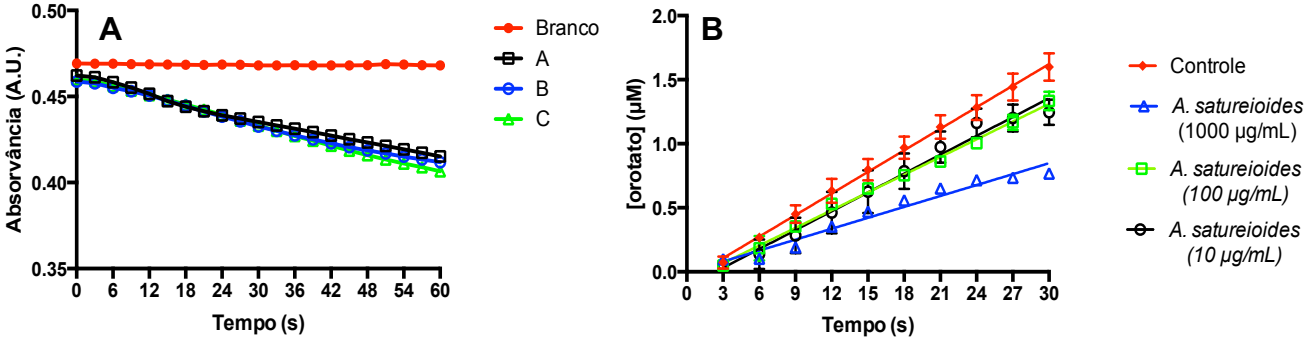


Fonte: o próprio autor.

A avaliação da atividade enzimática na presença e ausência dos extratos foi realizada indiretamente pelo monitoramento espectrofotométrico durante 60 s da redução do reagente colorimétrico DCIP, de coloração azul, que deixa de absorver em 610 nm quando reduzido a $DCIPH_2$, tornando-se incolor (Figura 8A). A redução do DCIP ocorre por mecanismo de dupla-troca com a oxidação de DHO (diidroorotato) em ORO (orotato) catalisada pela enzima DHODH[180]. Utilizando o coeficiente de extinção molar do DCIP calculou-se a quantidade deste que foi reduzido e, consequentemente, a quantidade de orotato formado em função do

tempo (Figura 8B). A partir destas informações, foram realizadas regressões lineares para obter a velocidade da reação (coeficiente angular da reta) na presença e ausência dos extratos e, a partir destas, foram calculadas as porcentagens de inibição (e atividade) enzimática, listadas no Apêndice O para os 150 extratos. As porcentagens de inibição dos extratos (%inibição = 100 - %atividade) variaram de 0 a 81 (1.000 µg.mL^{-1}), 0 a 79 (100 µg.mL^{-1}) e 0 a 51 (10 µg.mL^{-1}). Não existem na literatura relatos de estudos de inibição de *Lm*DHODH com extratos vegetais, muito menos algum que conste a triagem de 150 espécies diferentes. Portanto, fica evidenciado o caráter inovador e promissor destes resultados, que apresentaram valores de inibição enzimática acima de 50% em extratos vegetais, matriz biológica onde as substâncias ativas estão em relativas baixas concentrações.

Figura 8 – Gráficos dos dados gerados nos ensaios de inibição enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH por monitoramento espectrofotométrico. (A) Gráfico da redução do reagente colorimétrico DCIP decorrente da atividade enzimática de *Lm*DHODH na presença do extrato de *Baccharis jelskii* a 100 µg/mL: em vermelho trata-se do branco (MR contendo o extrato, sem adição da enzima); as letras A, B e C tratam-se das três réplicas realizadas; (B) atividade enzimática da *Lm*DHODH na presença do extrato de *Achyrocline satureioides* (10, 100 e 100 µg/mL): monitoramento indireto da formação de ORO em função do tempo, uma vez que a redução do DCIP ocorre por mecanismo de dupla-troca com a oxidação de DHO em ORO catalisada pela DHODH; cada ponto do gráfico corresponde à média ± desvio padrão; controle: MR contendo 10% DMSO, na presença da enzima.



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software Prism 6.0).

A maior parte dos extratos apresentou inibição dependente da concentração, apesar de que, em muitos destes casos, as concentrações 1.000 (a) e 100 (b) µg.mL^{-1} não foram estatisticamente diferentes, somente estas em relação à concentração 10 µg.mL^{-1} (c). Porém, alguns extratos exibiram maior potencial inibitório concentração c, o que pode ter sido causado pela maior solubilidade das substâncias químicas destes extratos quando estes estavam em menor concentração[181]. Em relações dose-resposta, mais especificamente para este caso, de relações concentração-resposta, o fenômeno em que baixas concentrações exercem maior efeito do que altas concentrações é conhecido como hormese. Este

fenômeno foi descartado após os ensaios de determinação de IC_{50}, nos quais se utilizou 10 concentrações para gerar curvas concentração-resposta e não foi observado padrão bifásico característico de hormese, ou seja, curvas em formato de U (*U-shaped*). Existe a possibilidade desta inibição em baixas concentrações ter sido somente aparente, ou seja, uma resposta compensatória do sistema biológico (meio reacional), decorrente da quebra inicial da homeostase alvo-ligante[182].

Partindo dos resultados de inibição dos 150 extratos, determinou-se os valores de IC_{50} de 59 extratos (Tabela 1). Para cada um dos extratos, um gráfico de porcentagem de atividade enzimática em função do logaritmo da concentração foi traçado, obtendo-se uma curva do tipo sigmóide, descrita por quatro parâmetros: atividade enzimática máxima (100%) e mínima (0%), o ponto de inflexão da curva, que corresponde ao log da concentração de inibidor responsável por 50% da perda de atividade enzimática ($logIC_{50}$) e o coeficiente de Hill, também chamado de coeficiente de cooperatividade. As curvas utilizadas para o cálculo de IC_{50} de todos os extratos estão apresentadas no Apêndice P.

Tabela 1 (continua) – Valores de IC_{50} dos extratos das 59 espécies de Asteraceae frente à enzima *Lm*DHODH

Código[a]	Espécie[b]	$LogIC_{50}$ [c]	IC_{50} ($\mu g.mL^{-1}$)
1	*Achillea millefolium* Ledeb.	3,75 ± 0,03	5624
2	*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.	2,54 ± 0,09	344
3	*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen	3,07 ± 0,02	1176
4	*Ageratum conyzoides L.*	3,03 ± 0,10	1067
5	*Aldama arenaria* Baker	3,11 ± 0,04	1288
9	*Aldama filifolia* Sch. Bip. Ex Baker	3,04 ± 0,03	1102
10	*Aldama gardneri* (Baker) E.E. Schill. & Panero	2,89 ± 0,07	774
11	*Aldama robusta* (Gardner) E.E. Schill. & Panero	2,85 ± 0,06	711
12	*Anteremanthus hatschbachii* H. Rob.	2,70 ± 0,06	499
13	*Arctium lappa* L.	2,87 ± 0,06	745
14	*Arnica montana L.*	3,04 ± 0,09	1095
15	*Artemisia absinthium* L.	3,18 ± 0,10	1516
16	*Artemisia annua* L.	3,19 ± 0,08	1566
17	*Baccharis albilanosa* A.S. Oliveira & Deble	3,14 ± 0,04	1382
31	*Baccharis glaziovii* Baker	3,22 ± 0,01	1668
38	*Baccharis organensis* Baker	2,64 ± 0,10	433
53	*Bidens pilosa* L.	2,58 ± 0,06	378
54	*Blanchetia heterotricha* DC.	2,59 ± 0,06	390
55	*Calea cuneifolia* DC.	2,63 ± 0,09	427
58	*Chresta exsucca* DC.	3,34 ± 0,02	2211

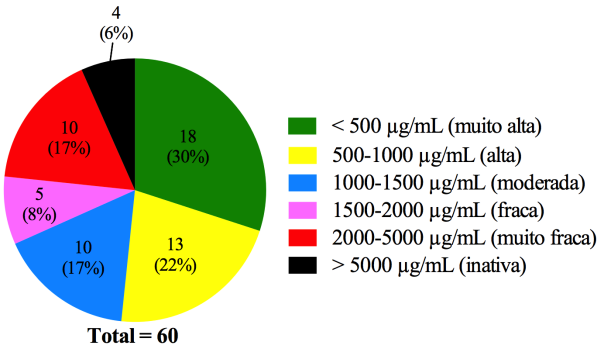
Tabela 1 (conclusão) – Valores de IC_{50} dos extratos das 59 espécies de Asteraceae frente à enzima *Lm*DHODH

Código[a]	Espécie[b]	$LogIC_{50}$ [c]	IC_{50} (µg/mL)
60	*Chresta hatschbachii* H. Rob.	2,60 ± 0,10	385
61	*Chresta martii* (DC.) H. Rob.	2,93 ± 0,09	846
63	*Chresta plantaginifolia* (Less.) Gardner	2,30 ± 0,10	207
64	*Chresta pycnocephala* DC.	2,90 ± 0,10	742
70	*Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC.	2,45 ± 0,05	282
71	*Chuquiraga spinosa* Less.	3,24 ± 0,10	1732
72	*Cichorium intybus* L.	2,72 ± 0,06	524
73	*Cynara scolymus* L.	3,48 ± 0,07	3002
74	*Dasyphyllum brasiliensis* var. *latifolium* (D. Don) Cabrera	3,50 ± 0,09	3194
78	*Echinacea purpurea* (L.) Moench	3,45 ± 0,09	2822
79	*Emilia sonchifolia* L. DC.	2,59 ± 0,05	389
80	*Eremanthus argenteus* MacLeish & H. Schumach	2,53 ± 0,08	337
83	*Eremanthus capitatus* (Spreng.) MacLeish	2,94 ± 0,04	879
86	*Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch. Bip	2,83 ± 0,04	670
89	*Eremanthus polycephalus* (DC.) MacLeish	3,50 ± 0,20	3545
104	*Heterocoma gracilis* Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir sp. nov	3,00 ± 0,10	997
105	*Lactuca sativa* L.	3,58 ± 0,07	3782
108	*Lychnophora mellobarretoi* G.M. Barroso	3,26 ± 0,02	1802
110	*Lychnophora salicifolia* Mart.	2,36 ± 0,20	229
111	*Lychnophora santosii* H. Rob.	3,00 ± 0,10	1011
113	*Matricaria chamomilla* L.	3,53 ± 0,08	3410
116	*Mikania cordifolia* (L.f.) Willd.	2,58 ± 0,02	379
121	*Mikania sessilifolia* DC.	2,70 ± 0,17	501
126	*Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. Hind	3,00 ± 0,10	1012
128	*Piptolepis monticola* Loeuille sp. nov	3,77 ± 0,06	5942
130	*Pluchea quitoc* D.C.	2,17 ± 0,08	148
134	*Schlechtendalia luzulaefolia* Less.	2,38 ± 0,08	238
135	*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson	2,70 ± 0,03	504
136	*Soaresia velutina* Sch. Bip.	3,70 ± 0,10	5221
138	*Solidago microglossa* DC.	3,32 ± 0,09	2109
139	*Sonchus oleraceus* L.	3,32 ± 0,04	2079
140	*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruskei	2,93 ± 0,09	849
141	*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni	2,80 ± 0,10	610
142	*Tanacetum parthenium* L.	3,12 ± 0,04	1330
143	*Taraxacum officinale* Weber ex FH Wigg.	4,00 ± 0,10	9578
145	*Tridax procumbens* L.	2,36 ± 0,06	232
146	*Vernonanthura beyrichii* (Less.) H. Rob.	2,57 ± 0,07	371
148	*Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip ex Walp.	3,30 ± 0,07	2020
150	*Vernonanthura polyanthes* (Spreng.) A.J. Vega & M. Dematt.	2,55 ± 0,06	359

[a]Mesmos códigos dos apêndices A e O. [b]As 59 espécies foram amostradas do conjunto inicial de 150 de forma a obter uma boa distribuição da %inibição, ou seja, obter um novo conjunto com espécies que apresentaram inibição alta, moderada e baixa. Esse critério foi utilizado para também obter uma distribuição homogênea dos valores de IC_{50}, os quais foram posteriormente correlacionados com os dados metabolômicos dos extratos para geração de um modelo de predição do potencial de inibição *in vitro* frente à *Lm*DHODH. [c]Valores de $LogIC_{50}$ correspondem à média ± desvio padrão do ajuste (*fit*) de 3 determinações (triplicata) utilizando 10 concentrações diferentes por extrato. Os cálculos foram realizados software Prism 6.0., empregando regressão não-linear do tipo "*log(inhibitor) versus response-variable slope*".

Os valores de IC_{50} dos extratos variaram de 148 µg.mL^{-1} a 9,4 mg.mL^{-1}. Obteve-se uma ampla faixa destes valores, com uma boa distribuição global como pode ser observado na Figura 9. Nesta etapa, 30% das amostras testadas apresentaram IC_{50} abaixo de 500 µg.mL^{-1}, sendo fontes promissoras de possíveis inibidores desta enzima ou de substâncias guia na busca por novos protótipos. Como destacado anteriormente, estes resultados[3] são inéditos, contendo não somente valores de porcentagem de inibição, mas também de IC_{50} para 59 espécies de Asteraceae.

Figura 9 – Distribuição dos valores de IC_{50} dos 59 extratos frente à enzima *Lm*DHODH. Os valores dentro de cada faixa do gráfico correspondem ao número de espécies e suas respectivas porcentagens.



Fonte: o próprio autor (gráfico gerado utilizando o software Prism).

Estes resultados sugerem a inibição da enzima DHODH como um dos possíveis mecanismos de ação de espécies da família Asteraceae, visto que diversas destas plantas já foram testadas contra diferentes linhagens de células de tripanosomatídeos e algumas foram ativas. Uma revisão da literatura para atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* das 59 espécies estudadas está apresentada no Apêndice Q, juntamente com a respectiva referência bibliográfica.

Devido à alta complexidade química destes extratos, é importante destacar que estudos já realizados pelo nosso grupo de pesquisa, com estas mesmas espécies, demonstraram a ausência de substâncias precipitadoras de proteínas[40,183]. Do ponto de vista quimiotaxonômico, sabe-se que os taninos (condensados e hidrolisáveis), conhecidamente potenciais precipitadores de proteínas[184–186], não ocorrem comumente em Asteraceae[187,188]. Os resultados de identificação dos metabólitos na desreplicação dos extratos, apresentados mais à frente, vão de encontro a esta informação. Algumas substâncias fenólicas podem se comportar de forma análoga aos taninos[189], porém, não ocorreu nenhum tipo de turvação no meio reacional ao adicionar os extratos, o que poderia indicar que o mesmo estivesse causando a precipitação da proteína.

[3]Os resultados desta etapa geraram o resumo "*Inhibition of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase by Asteraceae species*" que foi apresentado na forma de pôster no "*PSE Young Scientists' Meeting: Trends in Natural Product Research*" realizado entre 28 de junho e 01 de julho de 2017, em Lille (França). O trabalho foi premiado como melhor pôster do evento.

4.1.2 Avaliação do potencial inibitório das substâncias isoladas

Os valores de IC_{50} variaram de 27 µM a 2,6 mM (Tabela 2), para o conjunto de 57 substâncias testadas (Figura 6 e Apêndice B), pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários: 21 STLs, oito diterpenos, uma saponina, três alcaloides, 10 derivados fenólicos, 11 flavonoides e duas cumarinas. As curvas utilizadas para o cálculo de IC_{50} de todas substâncias estão apresentadas no Apêndice R. As maiores atividades foram apresentadas pelas STLs 18 (27 µM) e 5 (31 µM), o diterpeno DIT1 (31 µM) e o flavonoide FLA6 (30 µM). Estas quatro substâncias, todas com IC_{50} abaixo de 50 µM, passam a constituir interessantes substâncias guia na busca por novos protótipos para inibição da enzima *Lm*DHODH[11,190,191].

Estes resultados indicam que produtos naturais podem de fato inibir esta enzima, se tratando de uma relevante descoberta, pois uma infinidade de metabólitos secundários de plantas com atividade leishmanicida já foi descrita, ativos tanto contra a forma promastigota como amastigota[52,192,193], no entanto, para a maioria delas o mecanismo de ação segue desconhecido[194,195]. Uma revisão da literatura para atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* das 57 substâncias testadas está apresentada no Apêndice S, com a respectiva referência bibliográfica. Diversas destas substâncias já foram testadas contra diferentes linhagens de células de tripanosomatídeos e algumas demonstraram ser importantes descobertas, com valores de IC_{50} abaixo de 10 µM[191].

Tabela 2 (continua) – Valores de IC_{50} das 57 substâncias testadas frente à enzima *Lm*DHODH

Substância	Nome	Classe/ Subclasse[a]	$LogIC_{50}$[b]	IC_{50} (µM)	pIC_{50}[c]
STL1	16-*α*-(1-metilprop-1-*Z*-enila)-eremantolido	STL/ERE	2,50 ± 0,10	346	3,5
STL2	15-desóxi-goiasensolido	STL/FHL	2,44 ± 0,02	278	3,6
STL3	goiasensolido	STL/FHL	2,20 ± 0,10	156	3,8
STL4	4*β*,5-desidro-15-desóxigoiasensolido	STL/FHL	2,16 ± 0,08	145	3,8
STL5	glaucolido B	STL/GLA	1,49 ± 0,03	31	4,5
STL6	tagitinina C	STL/HEL	2,63 ± 0,08	426	3,4
STL7	artemisina	STL/HEL	2,23 ± 0,04	172	3,8
STL8	enidrina	STL/MEL	2,77 ± 0,02	585	3,2
STL8	enidrina	STL/MEL	2,77 ± 0,02	585	3,2
STL9	15-acetóxi-eremantolido B	STL/ERE	3,08 ± 0,08	1200	2,9
STL10	15-hidróxi-eremantolido B	STL/ERE	2,89 ± 0,02	769	3,1

Tabela 2 (continuação) – Valores de IC_{50} das 57 substâncias testadas frente à enzima *Lm*DHODH

Substância	Nome	Classe/ Subclasse[a]	$LogIC_{50}$[b]	IC_{50} (μM)	pIC_{50}[c]
STL11	2-oxo-8*β*-epóxiangeloilóxi-guaia-1(10),3,11(13)-trien-6*α*,12-olido	STL/GUA	2,77 ± 0,02	585	3,2
STL12	cnicina	STL/GER	2,56 ± 0,03	361	3,4
STL13	tiglato de atripliciolido	STL/FHL	2,94 ± 0,04	872	3,1
STL14	tiglato de budleína A	STL/GUA	2,42 ± 0,03	263	3,6
STL15	angelato de acantospermolido	STL/MEL	2,81 ± 0,03	644	3,2
STL16	2-oxo-8*β*-metacriloiloxi-10*α*-hidroxi-guaia-3,11(13)-dien-6*α*,12-olido	STL/GUA	2,23 ± 0,03	168	3,8
STL17	2-oxo-8*β*-metacriloiloxi-10*β*-hidroxi-guaia-3,11(13)-dien-6*α*,12-olido	STL/GUA	2,82 ± 0,02	662	3,2
STL18	2-oxo-8*β*-tigloiloxi-guaia-1(10),3,11(13)-trien-6*α*,12-olido	STL/GUA	1,43 ± 0,08	27	4,6
STL19	epóxido de tagitinina C	STL/HEL	2,01 ± 0,05	103	4,0
STL20	tagitinina A	STL/FHL	2,90 ± 0,03	796	3,1
STL21	budleína A	STL/FHL	2,81 ± 0,04	653	3,2
DIT1	ácido *ent*-caurenóico	DIT/CAU	1,50 ± 0,10	31	4,5
DIT2	ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico	DIT/PIM	3,12 ± 0,04	1315	2,9
DIT3	*ent*-8(14),15-pimaradien-3β-ol	DIT/PIM	2,65 ± 0,04	449	3,3
DIT4	ácido cinamoilgrandiflórico	DIT/CAU	3,15 ± 0,04	1417	2,8
DIT5	ácido *ent*-agático reduzido	DIT/LAB	2,94 ± 0,02	876	3,1
DIT6	ácido *ent*-agático	DIT/LAB	2,85 ± 0,04	707	3,1
DIT7	ácido poliáltico	DIT/LAB	3,42 ± 0,07	2624	2,6
DIT8	ácido 3-acetóxicopálico	DIT/LAB	2,97 ± 0,04	932	3,0
STE1	(-)-*β*-sitosterol	STE	2,62 ± 0,05	415	3,4
SAP1	aescina	SAP	2,68 ± 0,03	478	3,3
ALK1	cernumidina	ALK/GND	2,78 ± 0,02	610	3,2
ALK2	escopolamina	ALK/TRO	2,91 ± 0,06	795	3,1
ALK3	emetina	ALK/TIQ	3,03 ± 0,03	1074	3,0
PHE1	ácido ferúlico	PHE/CID	2,62 ± 0,06	413	3,4
PHE2	ácido cinâmico	PHE/CID	2,60 ± 0,07	392	3,4
PHE3	ácido protocatecuico	PHE/SBA	2,96 ± 0,03	922	3,0
PHE4	ácido cafeico	PHE/CID	3,24 ± 0,05	1753	2,8
PHE5	ácido 5-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	3,05 ± 0,06	1125	2,9
PHE6	ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	1,86 ± 0,06	73	4,1
PHE7	ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	2,81 ± 0,02	642	3,2
PHE8	ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	3,11 ± 0,03	1277	2,9
PHE9	ácido 4-*O*-cafeoil-2-C-metil-*D*-eritrônico	PHE/CAD	2,62 ± 0,06	418	3,4
PHE10	ácido *O*-cumárico	PHE/CID	2,91 ± 0,02	806	3,1
FLA1	tamaraxetina	FLA/FOL	1,97 ± 0,02	94	4,1
FLA2	canferol	FLA/FOL	2,60 ± 0,20	389	3,4
FLA3	apigenina 7-*O*-glicosídeo	FLA/FNE[d]	2,02 ± 0,04	105	4,0
FLA4	santina	FLA/FOL	2,42 ± 0,05	262	3,6
FLA5	7,3',4'-trimetóxi-5-hidróxiflavona	FLA/FNE	2,34 ± 0,03	217	3,7
FLA6	miricetina	FLA/FOL	1,48 ± 0,04	30	4,5

Tabela 2 (conclusão) – Valores de IC_{50} das 57 substâncias testadas frente à enzima *Lm*DHODH

Substância	Nome	Classe/ Subclasse[a]	$LogIC_{50}$[b]	IC_{50} (μM)	pIC_{50}[c]
FLA7	catequina	FLA/FOL	1,99 ± 0,02	98	4,1
FLA8	peltatosídeo	FLA/FNE[d]	2,30 ± 0,02	199	3,7
FLA9	spiraeosídeo	FLA/FNE[d]	2,21 ± 0,06	163	3,8
FLA10	galangina	FLA/FOL	2,68 ± 0,02	481	3,4
FLA11	rutina	FLA/FOL[d]	3,18 ± 0,04	1531	2,8
COU1	7-hidróxicumarina	PHE/COU	2,67 ± 0,05	467	3,3
COU2	Coumarina	PHE/COU	2,81 ± 0,04	642	3,2

[a]Classe/subclasse: PHE: polifenol (SBA: ácido benzoico simples, CID: derivado do ácido cinâmico, CAD: derivado do ácido cafeico, COU: cumarina); FLA: flavonoide (FNE: flavona, FOL: flavonol); STL: lactona sesquiterpênica (FHL: furanohelianfolido, ERE: eremantolido, GER: germacrolido, GUA: guaianolido, HEL: heliangolido, GLA: glaucolido, MEL: melampolido, HIR: hirsutinolido); DIT: diterpeno (CAU: caurano, PIM: pimarano, LAB: labdano); STE: esteroide; SAP: saponina; ALK: alcaloide (GND: guanidínico, TRO: tropânico, TIQ: tetrahidroisoquinolidínico

[b]Valores de $LogIC_{50}$ correspondem à média ± desvio padrão do ajuste (*fit*) de 3 determinações utilizando 13 concentrações diferentes por substância. Os cálculos foram realizados no software Prism 6.0, empregando regressão não-linear do tipo "*log(inhibitor) versus response-variable slope*".

[c]Os valores de pIC_{50} foram convertidos dos valores de IC_{50} na unidade de $mol.L^{-1}$, sendo que $pIC_{50} = -\log_{10}(IC_{50}/M)$, onde M é a unidade de mol/L e com isso esses valores tratam-se de números sem unidade.

[d]Metabólito na forma glicosilada (glicosídeo ou heterosídeo).

Os resultados para as substâncias mais ativas estão de acordo com dados de dois estudos *in silico* que realizaram docagem (*docking*) e triagem virtual (*virtual screening*) com terpenoides[57] e derivados fenólicos[196] para vários potenciais alvos moleculares de *Leishmania* spp. Ambos os estudos incluíram *Lm*DHODH como um dos alvos de docagem e apontaram germacranolidos (STLs), guaianolidos (STLs), limonoides (triterpenoides), flavonoides, chalconas e lignanas como as substâncias com maior potencial para inibição seletiva desta enzima, indicando-os como promissoras substâncias guia na busca por novos fármacos leishmanicidas. Atualmente, somente dois artigos científicos apresentam dados de inibição *in vitro* para *Lm*DHODH, nenhum deles envolvendo produtos naturais[30,144]. Cheleski et al. (2010)[30] forneceram novos *insights* para a descoberta de inibidores de Classe 1A e descreveram a constante cinética de afinidade (K_i^{app}) para dois análogos do orotato. Pinheiro et al. (2013)[144] descreveram a porcentagem de inibição da atividade enzimática na presença de três isotiocianatos e um valor de IC_{50} de 28 μM para a substância 4-nitrofenilisotiocianato.

A seletividade das substâncias mais ativas para o alvo molecular focalizado foi validada, uma vez que os valores de inibição frente à *Hs*DHODH foram irrelevantes (abaixo de 50%, Tabela 3). À 100 μM, exceto para a substância FLA7, os valores de inibição para a enzima humana foram estatisticamente mais baixos do que para *Lm*DHODH.

Tabela 3 – Validação de seletividade: valores de inibição frente à *Hs*DHODH das substâncias mais ativas contra *Lm*DHODH

Substância[a]	Inibição (%) a 100 μM[b]	
	*Lm*DHODH	*Hs*DHODH
STL5	41 ± 4	0 ± 5***
STL7	44 ± 5	0 ± 5***
STL18[c]	64 ± 1	3 ± 3****
STL19	42 ± 6	12 ± 1**
DIT1	40 ± 5	28 ± 5*
PHE6	38 ± 2	10 ± 8**
FLA1	46 ± 6	29 ± 2**
FLA3	47 ± 5	10 ± 3***
FLA6	67 ± 2	41 ± 8**
FLA7	52 ± 10	38 ± 2
FLA9	35 ± 3	16 ± 3**

Fonte: o próprio autor.
[a]Todas as substâncias com IC_{50} < 200 μM contra *Lm*DHODH foram testados frente à *Hs*DHODH.
[b]Os valores de inibição correspondem a média ± desvio padrão.
[c]A substância STL18 foi testada a 150 μM, porque a concentração 100 μM não foi incluída no delineamento experimental para determinação de IC_{50}; ****P < 0,0001, ***P < 0,001, **P < 0,01 e *P < 0,05 são os níveis de significância para a diferença estatística entre a média do valor de inibição de cada substância contra *Hs*DHODH e *Lm*DHODH, obtidos por teste-*t* não pareado (software Prism 6.0).

Dois aspectos estruturais e mecanísticos agregam grande potencial à descoberta de novos inibidores desta enzima e destacam a relevância dos resultados obtidos nesta primeira triagem de produtos naturais para este alvo molecular: a) possibilidade de transposição de inibidores de *Lm*DHODH para enzimas homólogas de Classe 1A de tripanossomatídeos; b) possibilidade de encontrar inibidores específicos para DHODH Classe 1A. Estes dois aspectos serão brevemente discutidos no parágrafo seguinte.

As enzimas DHODH de classe 1A de tripanossomatídeos possuem sítios ativos altamente conservados em termos de conformação e natureza estérica, compartilhando o mesmo mecanismo de ação e elevado nível de identidade

sequencial. No caso desta última, para *L. major*, chega a 83-96% com outras espécies de *Leishmania* e até 76% com enzimas homólogas presentes em organismos do gênero *Trypanosoma*[141,144]. Consistentemente, foi demonstrado que inibidores de DHODH de *T. cruzi* (*Tc*DHODH) podem ser transpostos para outras enzimas Classe 1A, incluindo *Lm*DHODH[30]. Porém, o nível de identidade sequencial cai consideravelmente quando comparadas as enzimas de Classe 1A e 2, chegando a 27% e deixando, portanto, o caminho livre para inibição seletiva[144]. O ciclo catalítico FMN-dependente da DHODH consiste em duas meia-reações que envolvem dois substratos diferentes[14,20]. Nas enzimas de Classe 1A ambos substratos, DHO e fumarato, se ligam no mesmo sítio ativo, o sítio pirimidínico[197,198]. Em quanto isso, em DHODH Classe 2 o segundo substrato, quinona, interage com o sítio de ligação da ubiquinona, um segundo sítio catalítico hidrofóbico, o qual foi também descrito como alvo dos inibidores de Classe 2 existentes[27,28,199]. O primeiro estudo focado na inibição de DHODH Classe 1A (*Lactococcus lactis*) indicou a possibilidade de se obter inibidores seletivos, tendo como alvo o sítio ativo pirimidínico[29]. Os inibidores Classe 1A-específicos se limitam atualmente a análogos do benzoato de pirimidina e orotato, nenhum de origem vegetal e todos interagem neste mesmo sítio do DHO, por mecanismo competitivo, excetuando um inibidor não-competitivo, o 3,5-dihidroxibenzoato [19,30,31,200].

A série de 21 STLs testadas (Figura 5) compreendeu os seguintes subtipos de esqueletos: 13 germacranolidos (incluindo três heliangolidos, sete furanoheliangolidos, dois melampolidos, um germacrolido), quatro guaianolidos, um glaucolido and trê eremantolidos. Os valores de pIC_{50} (Tabela 2) variaram de 2,9 a 4,6 (Δ = 1,7 unidades logarítmicas), possuindo distribuição Gaussiana (valor-P > 0,05, *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* realizado utilizando o software Prism 6.0). Esta constitui uma faixa de valores finais aceitável (Δ > 1,0 unidades logarítmicas)[201] e significativamente maior que o erro experimental, cujo desvio padrão foi menor que 5%, com um máximo de 0,1 unidades logarítmicas. Evidenciou-se assim a confiabilidade dos dados experimentais, provendo suficiente representatividade e qualidade para os modelos e suas predições. As STLs 18 e 5 foram as mais ativas e promissoras quanto à inibição de *Lm*DHODH. A primeira e mais ativa, 2-oxo-8*β*-tigloilóxi-guaia-1(10),3,11(13)-trien-6*α*,12-olido, é um guaianolido com anel α-metileno-γ-lactônico (11,13-en, 6α,12), dois sistemas α,β-

insaturados com uma carbonila cetônica da porção ciclopentenona e um grupamento tigloila no C_8. A segunda trata-se do glaucolido B, um glaucolido, também classificado como germacrolido, com anel γ-lactônico oxigenado (7,11-en, 11,13-dihidro, 6α,12), um epóxido no C_4 e três grupos acetila em C_8, C_{10} e C_{13}.

Análises preliminares comparando visualmente a estrutura molecular das STLs não foram conclusivas quanto à determinação das características estruturais importantes para explicar as variações da inibição da enzima *Lm*DHODH entre os subtipos de esqueletos. Grupamentos reativos clássicos para a maioria das atividades biológicas desta classe de metabólitos secundários não demonstraram exercer influência significativa nesta seletividade biológica. Nem mesmo as carbonilas cetônicas α,β- ou $\alpha,\beta,\gamma,\delta$-insaturadas das porções ciclopentenona e α-metileno-γ-lactona, as quais possibilitam adição de Michael com resíduos livres de proteínas contendo sulfidrila (e.g. cisteína) ou outros grupos nucleofílicos, como também grupos epóxidos e aldeídos livres não se mostraram determinantes para a atividade em questão [50,51,202]. Os furanoheliangolidos STL3 (156 μM) e STL20 (103 μM) apresentaram valores similares de IC_{50}, apesar de possuírem várias diferenças estruturais importantes, incluindo a presença ou ausência de uma carbonila cetônica $\alpha,\beta,\gamma,\delta$-insaturada do grupamento ciclopentenona. Em contrapartida, um única modificação na configuração do C_{10} nos guaianolidos STL16 (enantiômero *R*, OH na posição α) e STL17 (enantiômero *S*, OH na posicão β), foi suficiente para aumentar o IC_{50} de 168 para 662 μM. Para este fim, visando entender apropriadamente as relações estrutura-atividade, os estudos de QSAR foram realizados lançando mão de duas abordagens: QSAR clássico empregando descritores 2D e 3D interno (i3D); e QSAR 3D baseado em farmacóforos (*pharmacophore-based 3D-QSAR*).

4.1.2.1 Ensaios de termoestabilidade baseados em fluorimetria de varredura diferencial

Os estudos de termoestabilidade foram realizados pelo DSF, monitorando o desdobramento da proteína baseado no aumento da temperatura, para determinar a temperatura de fusão da proteína, T_m. Estes ensaios são de grande utilidade, uma vez que variações consideráveis de T_m (ΔT_m > 1 °C) indicam que a substância se ligou efetivamente à enzima. Duas abordagens diferentes de DSF foram utilizadas:

Thermofluor[145–147] usando o corante fluorescente *SYPRO Orange* e a metodologia alternativa *ThermoFMN*[142]. Os resultados de T_m obtidos para a enzima sem qualquer ligante, 56,80 ± 0,13 °C para *ThermoFMN* e 52,97 ± 0,42 °C para *Thermofluor*, foram semelhantes aos anteriormente descritos para *Lm*DHODH[142].

Todas as 11 substâncias selecionadas aleatoriamente do conjunto de 21 STLs apresentaram ΔT_m negativo em ambos os experimentos, nas concentrações de 1.000, 500 e 100 µM (Tabela 4). Tais valores negativos não significam que as substâncias não estão ligadas à proteína; em vez disso, indicam que o ligante está desestabilizando a mesma, isto é, influenciando de tal maneira que o processo de desenovelamento ocorre mais rapidamente. Uma vez que a intenção em relação às substâncias testadas é inibir a enzima do parasita, a desestabilização observada neste experimento não é preocupante. Todos os ligantes apresentaram dependência de concentração, aumentando a variação de T_m com o aumento da concentração. Outra informação que merece destaque é o fato de que, em ambos os ensaios, as STLs do mesmo subtipo esquelético se agruparam em função do ΔT_m, com exceção dos furanoheliangolidos (Apêndices T e U).

Tabela 4 – Valores de ΔT_m (°C) para as substâncias nas três concentrações testadas com *Lm*DHODH em ambos os experimentos (*ThermoFMN* e *Thermofluor*/*SYPRO*). Os valores de ΔT_m foram calculados pela substraindo o T_m obtido para a enzima na presença da substância pelo T_m obtido na ausência da substância (56,80 ± 0,13 °C para *ThermoFMN* e 52,97 ± 0,42 °C para *Thermofluor*). Somente valores de ΔT_m > 1,00 °C (células verdes) e < -1.00 °C (células vermelhas) foram consideradas variações efetivas.

	Orotato		STL3		STL4		STL5	
	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO
1000 µM	6,12	1,62	-1,13	-6,51	-0,27	-0,45	-0,70	-0,64
500 µM	4,32	1,43	-0,84	-4,19	-0,22	-0,27	-0,41	-0,47
100 µM	1,29	0,39	-0,32	-0,73	-0,27	-0,18	-0,21	-0,27
	STL7		STL8		STL9		STL10	
	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO
1000 µM	-0,40	-0,52	-1,32	-1,60	-0,76	-1,39	-0,61	-1,83
500 µM	-0,35	-0,22	-1,10	-1,28	-0,65	-1,80	-0,32	-0,96
100 µM	-0,13	-0,14	-0,49	-0,43	-0,41	-0,86	-0,15	-0,13
	STL11		STL13		STL15		STL20	
	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO	FMN	SYPRO
1000 µM	-0,85	-1,01	-1,21	-5,97	-1,48	-0,07	-0,52	-0,19
500 µM	-0,64	-0,75	-0,85	-2,52	-1,07	-0,17	-0,32	-0,06
100 µM	-0,26	-0,38	-0,35	-0,47	-0,48	-0,09	-0,26	-0,07

Fonte: o próprio autor.

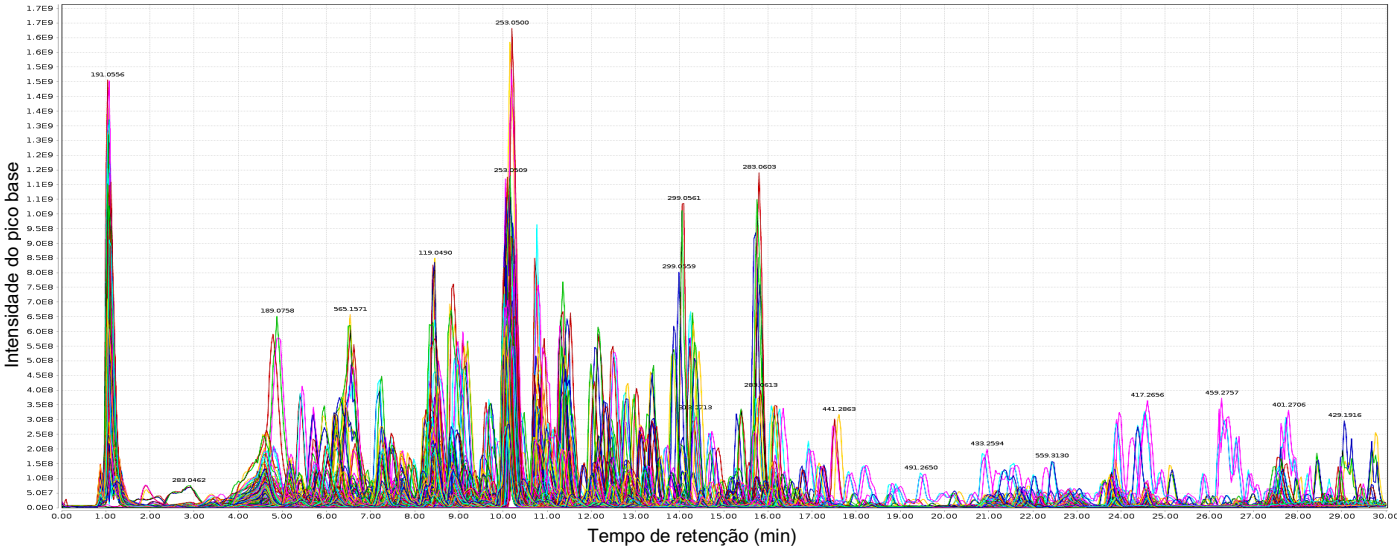
O conhecido inibidor/produto de reação, orotato, também foi testado. Como esperado, apresentou um ΔT_m positivo (Tabela 4); além disso, o ensaio *ThermoFMN* apresentou resultados mais elevados, o que pode ser explicado devido ao fato de que o orotato se liga ao sítio ativo (sítio da pirimidina), onde a FMN é encontrada. Para algumas substâncias, tais como STL3 e STL13, o T_m observado na concentração de 1.000 μM no *Thermofluor* foi de até -6,51 e -5,97 °C, respectivamente. Essa variação foi a mais alta observada e poderia significar uma forte ligação, uma vez que foi ainda maior, em módulo, do que o orotato (1,62 °C), adicionalmente, é importante ressaltar que as duas STLs são furanoheliangolidos. No ensaio *ThermoFMN*, os maiores valores de ΔT_m na concentração de 1.000 μM foram impostos pelos melampolidos, STL8 (-1,32 °C) e STL15 (-1,48 °C), mas ambos não superaram a orotato (6,12 °C).

As duas abordagens diferentes de DSF também foram aplicadas para inferir um possível sítio de ligação. No ensaio *Thermofluor*, é utilizado o corante *SYPRO*, que é fluorescente quando exposto a um ambiente hidrofóbico. Portanto, com o aumento da temperatura, observa-se um aumento no sinal de fluorescência devido à interação do corante com os sítios hidrofóbicos que são expostos quando a proteína é desenovelada[145–147]. Enquanto isso, o experimento *ThermoFMN* é realizado na ausência de corante, explorando o grupo protético FMN das flavoproteínas como um marcador fluorescente. Quando complexada no sítio ativo da enzima enovelada, a intensidade de fluorescência da FMN é diferente daquela observada quando encontra-se livre. Assim, é possível monitorar o aumento do sinal de fluorescência da FMN enquanto ela está sendo liberada do complexo enzimático, como resultado do processo de desenovelamento da proteína[142]. Diferente do que foi observado para o orotato, a maioria das outras substâncias testadas apresentou uma maior variação no experimento *Thermofluor*; isso pode significar que eles estão apresentando ligação em um sítio diferente do da FMN, o qual se trata do sítio ativo (sítio da pirimidina).

4.2 Estudos metabolômicos

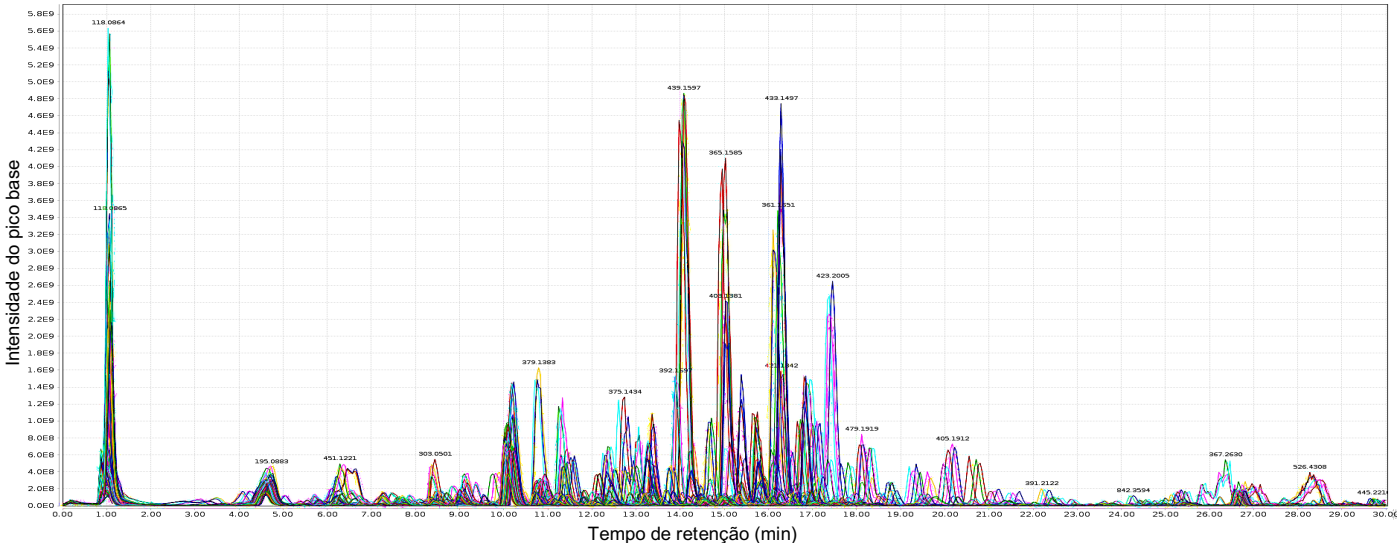
As impressões digitais metabólicas em UHPLC-ESI-HRFTMS foram obtidas para os extratos de todas as 59 espécies, em triplicata, nos modos de ionização negativo (Figura 10) e positivo (Figura 11). O processamento dos dados de LC-MS resultou em 1.656 picos (substâncias) no modo de ionização negativo e 2.038 no positivo.

Figura 10 – Sobreposição da impressão digital metabólica por UHPLC-ESI-HRFTMS (modo de ionização negativo) dos extratos das 59 espécies de Asteraceae (TIC - cromatograma de íons totais)



Fonte: o próprio autor (figura gerada no software MZmine).

Figura 11 – Sobreposição da impressão digital metabólica por UHPLC-ESI-HRFTMS (modo de ionização positivo) dos extratos das 59 espécies de Asteraceae (TIC - cromatograma de íons totais)

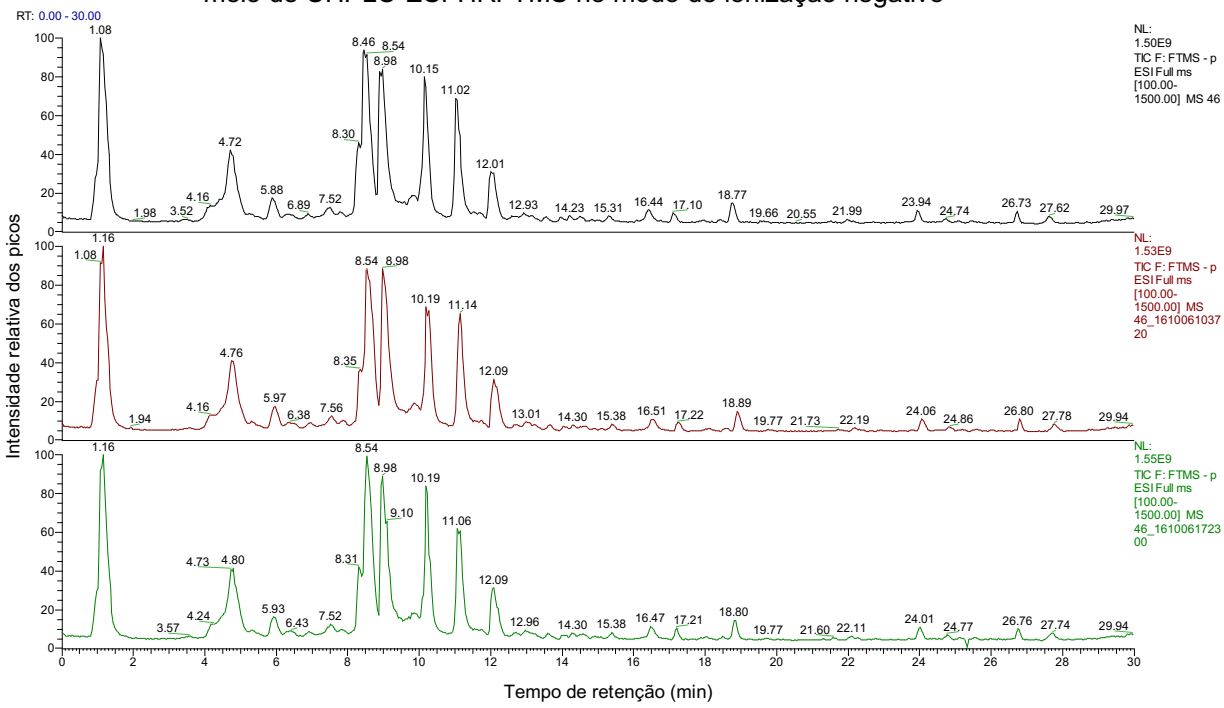


Fonte: o próprio autor (figura gerada no software MZmine).

O método analítico de LC-MS (item 3.3.1) desta abordagem metabolômica para estudo de Asteraceae foi previamente validado e, desde então, tem sido rotineiramente utilizado pelo grupo de pesquisa AsterBioChem[139]. Todas figuras de mérito (adequabilidade do sistema, robustez, seletividade, exatidão, precisão, linearidade e limite de detecção) foram avaliadas e aprovadas de acordo com normas nacionais e internacionais de validação de métodos bioanalíticos[203], visto a elevada complexidade química que os objetos de análise.

No que diz respeito à precisão, considerando que as 59 amostras foram analisadas em triplicata, vale destacar que o método mostrou adequada repetitividade dos resultados (Figura 12), com coeficiente de variação (CV) de 20% para a área dos picos e de 5% para o t_R[139]. A precisão das análises está ilustrada novamente mais à frente na Figura 16, que apresenta o gráfico dos valores de *score* das 59 amostras, em triplicata, na PCA com suas variáveis *x* no modo de ionização negativo (modo positivo no Apêndice V). É possível visualizar que as réplicas das amostras (*scores*), em sua grande maioria, estão bem próximas no novo espaço formado pelas duas primeiras dimensões geradas na PCA.

Figura 12 – Cromatogramas da amostra 130 (extrato de *Pluchea quitoc*, triplicata), obtidos por meio de UHPLC-ESI-HRFTMS no modo de ionização negativo



Fonte: o próprio autor (figura gerada no software Xcalibur).

A associação de técnicas de alta performance cromatográfica, espectrométrica e quimiométrica, forneceu um universo de 3.694 substâncias (modo negativo e positivo somados). Destes milhares de metabólitos detectados, a possibilidade de inserir no processo de desreplicação informações de t_R e massa monoisotópica em alta resolução de 120 substâncias (*AsterLib I*), as quais foram injetadas no mesmo método de análise dos extratos, permitiu identificar em nível 1, com alta confiabilidade, 49 substâncias (Tabela 5). A identidade das variáveis desreplicadas nesta etapa foi confirmada pelo padrão de fragmentação dos espectros de MS/MS (Figuras 13-15).

Tendo em vista o que era possível anteriormente por procedimentos de fitoquímica clássica, este é um número considerável de identificações, posto que identificar todos os picos detectados não é necessário, quanto mais possível[113,204,205]. Isto evidencia o potencial de aplicação deste tipo de abordagem[66,67,69,70,97,206], somado ao fato de que a maioria das substâncias identificadas não faz parte dos constituintes majoritários dos extratos (Figuras 10 e 11) e, portanto, sua detecção só foi possível em virtude da utilização de técnicas com alta sensibilidade.

Nos cromatogramas das Figuras 10 e 11 é possível observar também que os constituintes detectados estão bem distribuídos a longo dos 30 min de corrida cromatográfica. Assim, o método empregado mostrou-se abrangente, sendo capaz de abarcar metabólitos com diferentes t_R e, consequentemente, diferentes classes químicas. Esta observação, associada ao elevado número de picos detectados e aos bons rendimentos obtidos no preparo das amostras (Apêndice A), também demonstra a eficiência do processo extrativo, etapa que desempenha papel central em qualquer procedimento analítico, inclusive em metabolômica vegetal[98,99].

As condições experimentais empregadas no processo de extração realizado (item 3.1.2) haviam sido previamente otimizadas[139] por meio de ferramentas quimiométricas[136,207,208], visando extrair o máximo de substâncias possível, qualitativamente e quantitativamente, obtendo assim amostras representativas para os estudos metabolômicos. A metodologia padronizada envolveu extração assistida por ultrassom, uma ferramenta que vem sendo crescentemente requisitada no preparo de amostras[209–212], visto que, além de considerar as interações soluto-solvente, considera também a dissociação do soluto da matriz biológica[99]. Portanto, esta técnica simples, rápida e barata supera o poder extrativo dos

sistemas clássicos de extração sólido-líquido, como a maceração, otimizando o rendimento e o consumo de solventes[213,214]. Outro aspecto igualmente importante é que este não gera aumento na temperatura do sistema, extraindo com segurança moléculas termolábeis e instáveis[210,215].

Durante o desenvolvimento do método analítico confirmou-se que a faixa de tempo entre 16-30 min nos cromatogramas é caracterizada principalmente por diterpenos, com algumas STLs[139]. A biblioteca com as 120 substâncias utilizadas como padrões para identificação foi composta por ácidos fenólicos, flavonoides e STLs, com poucos diterpenos. Isso explica o fato de que as variáveis apresentadas na Tabela 5 possuem t_R máximo de 15,7 min, ou seja, entre 16-30 min nada foi identificado.

As substâncias apresentadas na Tabela 5 representam as principais vias biossintéticas do metabolismo secundário de Asteraceae[188,216–218]: via dos terpenos (seis STLs), via mista acetato-chiquimato (26 flavonoides) e via do chiquimato (17 derivados fenólicos). As STLs são os principais marcadores taxonômicos dessa família, visto que já foram identificadas mais de 5.000 estruturas distribuídas em mais de 30 diferentes subtipos de esqueletos[49–51,202,219]. Portanto, é possível afirmar de forma geral, que a via do mevalonato é a via mais marcante nestas plantas, que possuem, além das STLs, diversos tipos de diterpenos (e.g. *ent*-cauranos e *ent*-pimaranos), dentre outros terpenoides[47,220–222]. Ainda assim, 88% da tabela de desreplicação consiste em ácidos fenólicos e flavonoides, pois as espécies estudadas são ricas também nestas classes de metabólitos secundários[39,96,223–225], os quais possuem maior potencial de ionização (ionizam mais facilmente, em maior proporção/intensidade) do que os diterpenos e outros terpenoides[226–230].

Com relação ao potencial biológico das 49 substâncias isoladas que foram identificadas nos extratos, é importante destacar os seguintes aspectos:

a) 13 delas fazem parte do conjunto de 57 produtos naturais testados para inibição de *Lm*DHODH (item 4.1.2). Destas, somente quatro foram relativamente mais ativas[11,190,191]: ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico (IC_{50} 73 μM), apigenina 7-*O*-glicosídeo (IC_{50} 105 μM), 1*β*,2*α*-epóxi tagitinina C (IC_{50} 103 μM) e spiraeosídeo (IC_{50} 163 μM). Na etapa seguinte dos estudos, em que se correlacionou os dados

metabolômicos com os de inibição enzimática para a pesquisa de biomarcadores, veremos que os modelos obtidos selecionaram duas substâncias destas 13 já testadas, sendo uma delas o ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico, que apresentou bom potencial de inibição, constituindo uma interessante guia na busca por novos inibidores desta enzima. Estes resultados potencializam ainda mais o impacto deste trabalho e o potencial de aplicação desta abordagem na descoberta de PNs bioativos[67,69];

b) diversas dessas substâncias já foram testadas contra diferentes linhagens celulares de tripanossomatídeos e algumas demonstraram ser importantes descobertas, com valores de IC_{50} abaixo de 10 μM[56,231–260]. Estas informações da literatura demonstram o potencial da família Asteraceae na descoberta de novas alternativas terapêuticas para DNs, validando a escolha destas plantas para a triagem *in vitro* de inibidores de *Lm*DHODH.

Tabela 5 (continua) – Substâncias identificadas na desreplicação dos 59 extratos de Asteraceae analisados por UHPLC-ESI-HRFTMS

ID[a]	t_R (min)[a]	m/z[b]		Erro de massa (ppm)[c]	FM[d]	Desreplicação		
		$[M-H]^-$	$[M+H]^+$			Identidade (nome usual)	Nível[e]	Classe/ Subclasse[f]
54	1,08	191,0555007		0,325	$C_7H_{12}O_6$	ácido quínico	1	—
948	4,12	353,0881866		2,625	$C_{16}H_{18}O_9$	ácido 5-*O*-*E*-cafeoilquínico[g]	1	PHE/CAD
427	5,08	353,0880969		2,371	$C_{16}H_{18}O_9$	ácido 4-*O*-*E*-cafeoilquínico	1	PHE/CAD
182	5,11	593,1518603		2,045	$C_{27}H_{30}O_{15}$	vicenina 2	1	FLA/FNE
252	5,45	367,1037183		2,203	$C_{17}H_{20}O_9$	ácido metil 4-*O*-*E*-cafeoilquínico	1	PHE/CAD
239	5,77	311,0777995		3,547	$C_{14}H_{16}O_8$	ácido 4-*O*-cafeoil-2-C-metil-D-eritrônico[g]	1	PHE/CAD
63	6,40	367,1038136		2,462	$C_{17}H_{20}O_9$	ácido 5-*O*-*E*-feruloilquínico	1	PHE/FED
1008	6,69	367,1038654		2,603	$C_{17}H_{20}O_9$	ácido metil 5-*O*-*E*-cafeoilquínico	1	PHE/CAD
315	6,73	163,0392155	165,0548655	1,851	$C_9H_8O_3$	ácido cumárico[g]	1	PHE/CID
56	7,33	609,1467390		1,932	$C_{27}H_{30}O_{16}$	rutina[g]	1	FLA/FOL[h]
946	7,35	193,0500024		0,420	$C_{10}H_{10}O_4$	ácido ferúlico[g]	1	PHE/CID
55A	7,59	463,0888315	465,1044815	2,543	$C_{21}H_{20}O_{12}$	luteolina-7-*O*-glicosídeo	1	FLA/FNE[h]
938	7,70		463,0874404	0,456	$C_{21}H_{18}O_{12}$	flavonol 3-*β*-glicosilado[i]	3	FLA/FOL[h]
1454	7,70	579,1365511		1,938	$C_{29}H_{26}NO_{12}$	quercetina-3-*O*-arabino-ramnosídeo	1	FLA/FOL[h]
61	7,73	477,0681169		2,513	$C_{21}H_{18}O_{13}$	quercetina-3-*O*-glicuronosídeo	1	FLA/FOL[h]
232	7,81	447,0937650	449,1094150	2,295	$C_{21}H_{20}O_{11}$	canferol-3-*O*-glicosídeo	1	FLA/FOL[h]
440	8,12	593,1522870		2,763	$C_{27}H_{30}O_{15}$	canferol-3-*O*-rutinosídeo	1	FLA/FOL[h]
1444	8,12	623,1624959		2,060	$C_{28}H_{32}O_{16}$	isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo	1	FLA/FOL[h]
290	8,45	447,0936061		1,941	$C_{21}H_{20}O_{11}$	quercetina 3-*O*-*α*-D-ramnosídeo	1	FLA/FOL[h]
20	8,47	515,1196291		1,313	$C_{25}H_{24}O_{12}$	ácido 1,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico	1	PHE/CAD
213	8,52	353,0878401		1,646	$C_{16}H_{18}O_9$	ácido 3-*O*-cafeoil-2-(2-propil)-2-hidróxibutanodióico	1	PHE/CAD
672	8,55	515,1195474		1,155	$C_{25}H_{24}O_{12}$	ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico[g]	1	PHE/CAD
521	8,56	463,0884762	465,1041262	1,778	$C_{21}H_{20}O_{12}$	spiraeosídeo[g]	1	FLA/FOL[g]
619	8,56	431,0985513		1,688	$C_{21}H_{20}O_{10}$	apigenina-7-*O*-glicosídeo[g]	1	FLA/FNE[g]
942	8,58	515,1194680		1,001	$C_{25}H_{24}O_{12}$	ácido 3,4-di-*O*-*E*-cafeoilquínico[g]	1	PHE/CAD
952	8,68		207,0652404	2,395	$C_{11}H_{10}O_4$	ácido 3,4-dimetóxicinâmico	1	PHE/CID
17	8,80	515,1196270		1,309	$C_{25}H_{24}O_{12}$	ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico[g]	1	PHE/CAD
983	9,22	263,1290028		2,532	$C_{15}H_{20}O_4$	budleína B	1	STL/GER
455	9,67	367,1037916		2,403	$C_{17}H_{20}O_9$	ácido 3-*O*-cafeoil-2-(2-butil)-2-hidróxibutanodióico	1	PHE/CAD
879	10,56	593,1311356		2,726	$C_{30}H_{26}O_{13}$	tilirosídeo	1	FLA/FOL[j]
464	10,78	395,1349792		1,949	$C_{19}H_{24}O_9$	hirsutinolido	1	STL/HIR
883	10,86	677,1518745		1,813	$C_{34}H_{30}O_{15}$	ácido 3,4,5-tri-*O*-*E*-cafeoilquínico	1	PHE/CAD

Tabela 5 (conclusão) – Substâncias identificadas na desreplicação dos 59 extratos de Asteraceae analisados por UHPLC-ESI-HRFTMS

ID[a]	t_R (min)[a]	m/z[b]		Erro de massa (ppm)[c]	FM[d]	Desreplicação		
		$[M-H]^-$	$[M+H]^+$			Identidade (nome usual)	Nível[e]	Classe/ Subclasse[f]
117	10,95	285,0407623		2,969	$C_{15}H_{10}O_6$	luteolina	1	FLA/FNE
57	11,09	301,0358031		3,229	$C_{15}H_{10}O_7$	quercetina	1	FLA/FOL
398	11,32		363,1440776	0,830	$C_{19}H_{22}O_7$	1*β*,2*α*-epóxi tagitinina C[g]	1	STL/HEL
293	11,47	315,0515368		3,351	$C_{16}H_{12}O_7$	3-*O*-metilquercetina	1	FLA/FOL
834	11,48	315,0514671		3,130	$C_{16}H_{12}O_7$	isoramnetina	1	FLA/FOL
551	11,78	271,0615045	273,0771545	3,146	$C_{15}H_{12}O_5$	naringenina	1	FLA/FVN
463	11,81	301,0717654	303,0874154	1,828	$C_{16}H_{14}O_6$	hesperetina	1	FLA/FVN
943	11,92	269,0458086		3,000	$C_{15}H_{10}O_5$	apigenina	1	FLA/FNE
196	12,31		381,1900146	3,455	$C_{20}H_{28}O_7$	viguilenina	1	STL/HEL
687	12,40	285,0408322		3,213	$C_{15}H_{10}O_6$	canferol[g]	1	FLA/FOL
169	12,49	299,0565070		3,146	$C_{16}H_{12}O_6$	hispidulina	1	FLA/FNE
896	13,28	377,1597595	379,1754095	0,710	$C_{20}H_{26}O_7$	15-hidróxi-eremantholido B[g]	1	STL/ERE
428	13,41	299,0564547	301,0721047	2,971	$C_{16}H_{12}O_6$	3,4´,5-trihidróxi-7-metóxiflavona	1	FLA/FNE
300	15,25	283,0615893		3,312	$C_{16}H_{12}O_5$	genkwanina	1	FLA/FNE
449	15,28	343,0821304		1,025	$C_{18}H_{16}O_7$	galangina[g]	1	FLA/FOL
1152	15,45	327,1240234		2,361	$C_{19}H_{20}O_5$	2-oxo-8*β*-metacriloilóxi-guaia-3,10(14),11(13)-trien-6*α*,12-olido	1	STL/GUA
546	15,70	255,0661786	257,0818286	1,737	$C_{15}H_{12}O_4$	pinocembrina	1	FLA/FVN

Fonte: o próprio autor.

[a]Código de identificação das variáveis *x*, gerado no software MZmine durante o processamento dos dados de LC-MS. As variáveis estão distribuídas por ordem crescente do seu t_R.

[b]Valor de massa acurada correspondente à média do valor da variável ao longo de todas amostras nas quais foi identificada. $[M-H]^-$: massa experimental no modo negativo, ou seja, subtraída do valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da); $[M+H]^+$: massa experimental no modo positivo, ou seja, acrescida ao valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da).

[c]Exatidão de massa relativa (erro em ppm) calculada por meio da diferença entre os valores de massa acurada (experimental) e massa exata monoisotópica (calculada a partir da fórmula molecular no ChemCalc[261]. As variáveis cujo erro de massa foi superior a 5 ppm foram desconsideradas.

[d]Fórmula molecular obtida por meio da massa acurada, utilizando o ChemCalc.

[e]Níveis de identificação[109]: 1 – substância identificada por meio de um banco de dados *in house* contendo as informações de t_R e massa monoisotópica em alta resolução de 120 substâncias pertencentes à biblioteca de substâncias isoladas da família Asteraceae (AsterLib I), as quais foram injetadas no mesmo método de análise dos extratos. Confirmação da identidade por padrão de fragmentação dos espectros de MS/MS; 2 – substância putativamente anotada a partir do nosso banco de dados *in house* AsterDB[121] e dos bancos de dados online do *DNP*[162], *SciFinder*[163] e *ChemSpyder*[164], com base na massa monoisotópica em alta resolução e dados espectrais/físico-químicos, sem padrões químicos de referência; 3 – classe da substância anotada putativamente a partir dos bancos de dados citados anteriormente, sendo esta baseada unicamente na fórmula molecular (massa monoisotópica em alta resolução); 4 – substância não identificada (n.i.).

[f]Classe/subclasse: PHE: polifenol (SBA: ácido benzoico simples, CID: derivado do ácido cinâmico, CAD: derivado do ácido cafeico, FED: derivado do ácido ferúlico); FLA: flavonoide (FNE: flavona, FOL: flavonol, FVN: flavanona); STL: lactona sesquiterpênica (ERE: eremantolido, GER: germacrolido, GUA: guaianolido, HEL: heliangolido, HIR: hirsutinolido);

[g]Estas substâncias fazem parte do conjunto de 57 substâncias testadas para inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH.

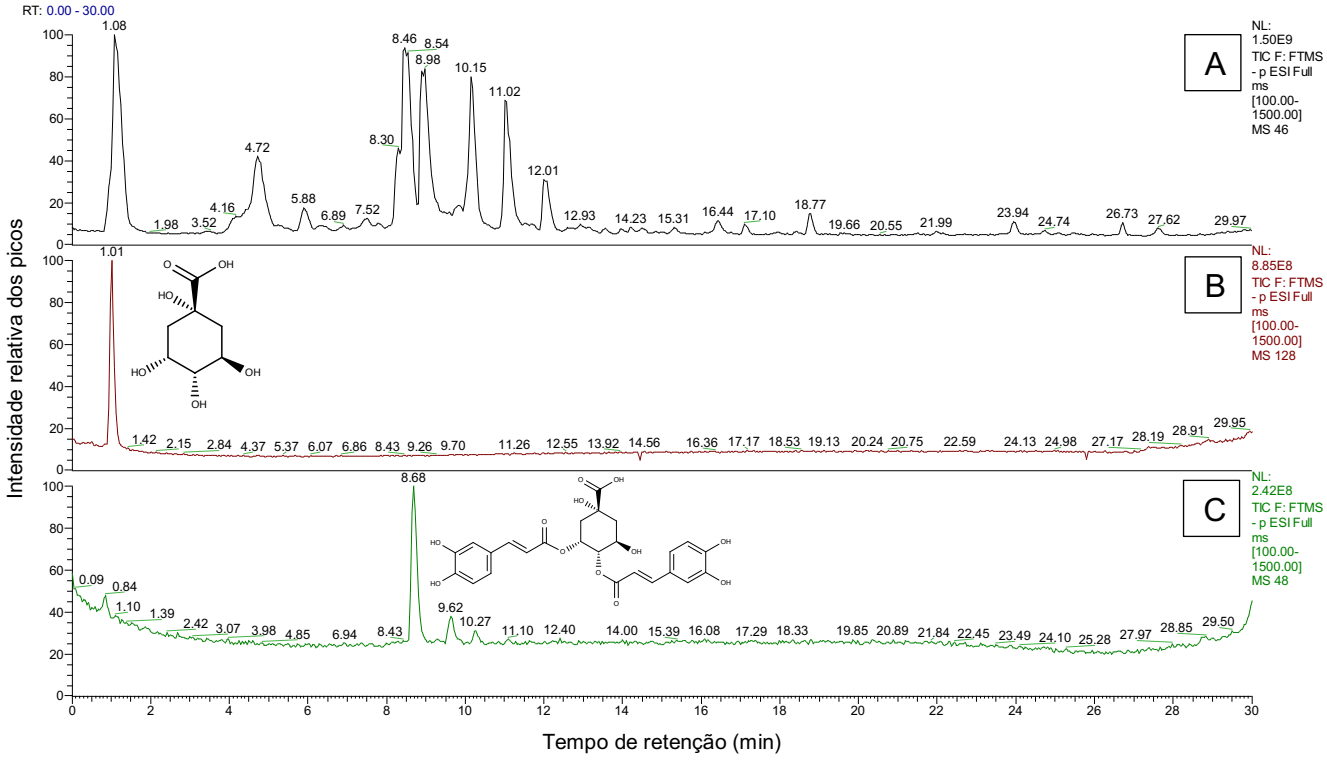
[h]Metabólito na forma glicosilada (glicosídeo ou heterosídeo).

[i]Variável 938 (modo positivo) é um flavonol glicosilado, mas obteve três *hits* na biblioteca de substâncias AsterLibI: isoquercetrina, hiperosídeo ou isoquercitrin.

[j]Flavonoide/flavonol na forma de glicosídeo acilado (canferol-3-glicosídeo-6'-*p*-cumaroila).

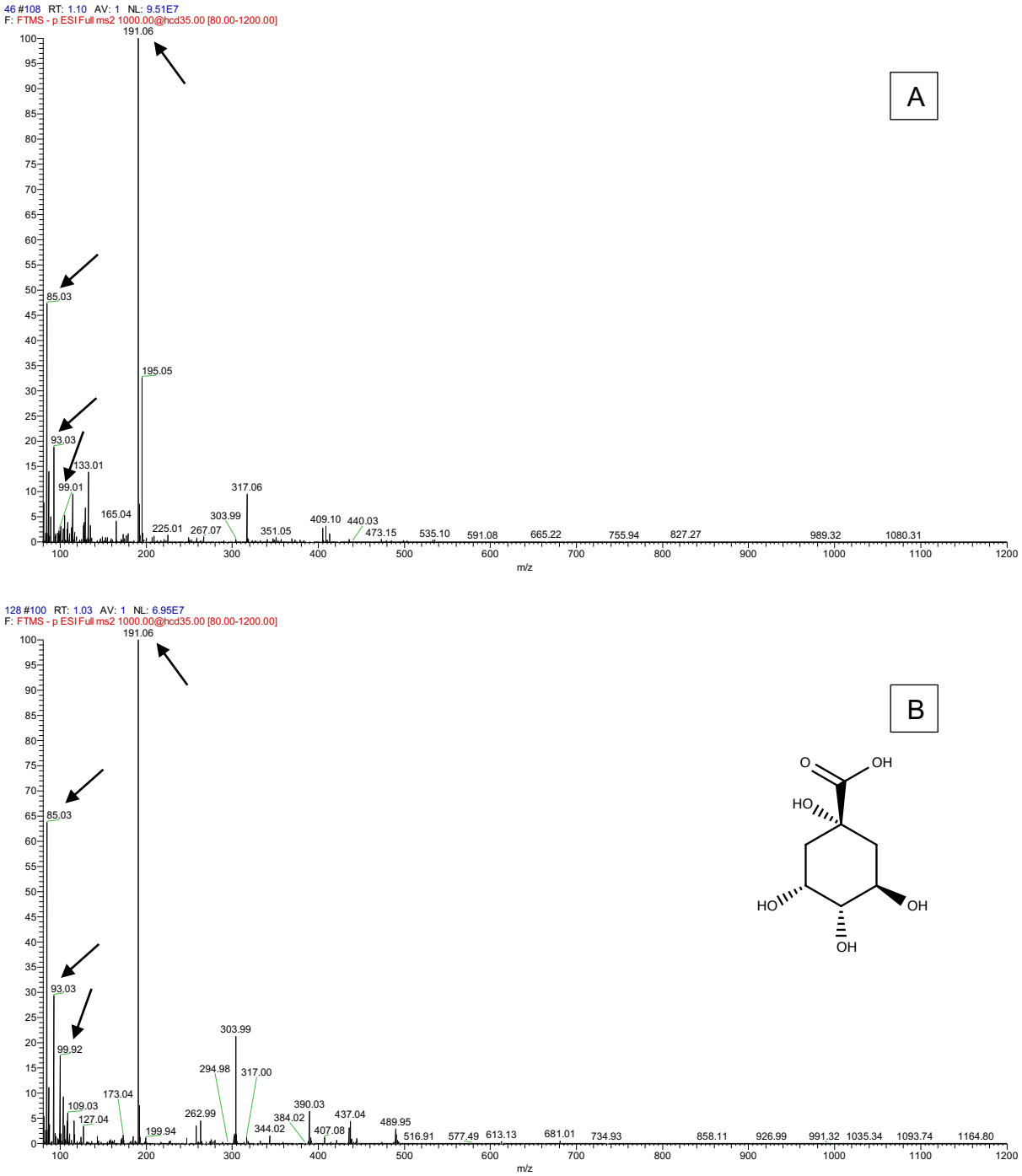
A Figura 13 ilustra o processo de desreplicação do extrato de *Pluchea quitoc* DC., espécie de Asteraceae cujo extrato apresentou a maior atividade frente à enzima *Lm*DHODH, com IC_{50} de 148 $\mu g.ml^{-1}$. Na Figura 13 está demonstrada identificação dos ácidos quínico e 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico, cuja presença no extrato em questão foi confirmada pela comparação dos espectros de MS/MS dos padrões e do seus respectivos picos na amostra (Figuras 14 e 15). Na faixa de t_R entre 8,0 e 9,0 min (Figura 13), foram identificados alguns flavonoides e derivados do ácido cafeico (Tabela 5), dentre eles os isômeros ácidos 1,5-, 3,4-, 3,5- e 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico, cuja identidade só possível determinar associando a ordem de t_R dos padrões com o padrão de fragmentação nos seus espectros MS/MS[262–264], como pode ser visualizado na Figura 14.

Figura 13 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-HRFTMS no modo de ionização negativo para a amostra 130 (A, extrato de *Pluchea quitoc*) e os padrões dos ácidos quínico (B) e 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico (C)



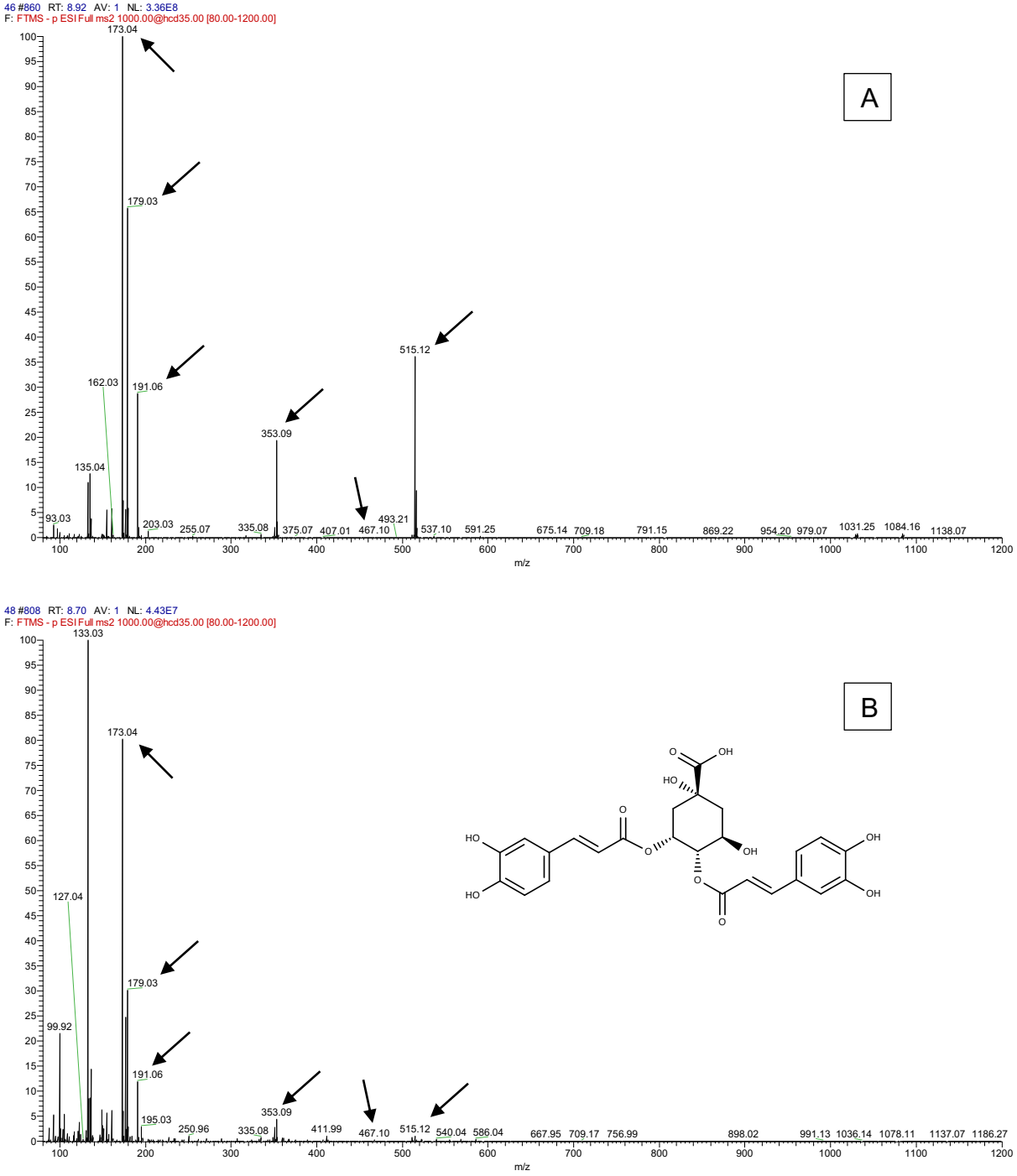
Fonte: o próprio autor (figura gerada no software Xcalibur).

Figura 14 – Espectros de MS/MS (*full-scan*) em $[M-H]^-$ do pico com t_R 1,08 min (A) da amostra 130 (extrato de *Pluchea quitoc* DC.) e do padrão de ácido quínico (B). As setas estão indicando o pico do íon molecular $[M-H]^-$ *m/z* 191,06 e os fragmentos em comum (fragmentos: *m/z* 99,02, 93,03 e 85,03).



Fonte: o próprio autor (figura gerada no software Xcalibur).

Figura 15 – Espectros de MS/MS (*full-scan*) em $[M-H]^-$ do pico com t_R 8,80 min (A) da amostra 130 (extrato de *Pluchea quitoc* DC.) e do padrão de ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico (B). Em ambos, observa-se o íon molecular $[M-H]^-$ *m/z* 515,12 e o mesmo padrão de fragmentação (fragmentos: *m/z* 467,10, 353,09, 191,06, 179,03 e 173,04).



Fonte: o próprio autor (figura gerada no software Xcalibur).

4.2.1 Descoberta de biomarcadores e desreplicação

O processamento dos dados metabolômicos forneceu matrizes de dados multivariados (planilhas em formato CSV – *comma-separated values*), cujas colunas correspondem às amostras (59 extratos, em triplicata) e as linhas às variáveis *x* (picos com área, t_R e *m/z*), sendo que no modo de ionização negativo foram obtidas 1.656 e no positivo 2.038. Inicialmente, os dados nos dois modos de ionização foram analisados separadamente e depois concatenados. Porém, neste último, os resultados foram piores e por isso não foram apresentados.

O pré-tratamento dos dados, com centragem na média e escalonamento, é fundamental em estudos *in silico* correlacionando dados metabolômicos e atividade biológica, pois coloca todas as variáveis *x* em uma mesma faixa de resposta, com base em um fator de escalonamento, tornando-as igualmente importantes e impedindo que variáveis com valores maiores tenham maior peso no modelo a ser gerado. A normalização por Pareto (fator de escalonamento = raíz quadrada do desvio padrão) foi utilizada, pois reduz a importância relativa de variáveis com valores maiores e, diferentemente do autoescalonamento (ou variação unitária, fator de escalonamento = desvio padrão), não altera totalmente a estrutura dos dados e não acentua os erros de medida (ruídos)[265,266].

As análises exploratórias por PCA, em ambos os modos de ionização, não permitiram identificar grupos bem definidos dentro das amostras ($R^2 < 0,3$ e $Q^2 < 0,2$), os quais houvessem sido gerados exclusivamente por diferenças qualitativas e quantitativas de seus constituintes químicos (Figura 16 e Apêndice V). Isto se explica pelo fato de que o conjunto amostral é filogeneticamente diverso, contendo 59 espécies pertencentes a 14 tribos e 47 gêneros diferentes da família Asteraceae, possuindo, por consequência, grande complexidade química. No entanto, as análises exploratórias não tem como função identificar grupos.

Porém, esta análise não supervisionada foi extremamente útil no sentido de detectar *outliers*. A Figura 16 corresponde ao gráfico de *scores* das 59 amostras na PCA realizada com as variáveis *x* no modo de ionização negativo (modo positivo no Apêndice V), após a exclusão das amostras discrepantes. Observa-se que todas as amostras remanescentes estão dentro dos limites da elipse de tolerância estabelecida com 99% de significância ($\alpha = 0,01$). Este intervalo de confiança é definido por *Hotelling's* T^2 (teste-t multivariado do software SIMCA-P)[108,267], que

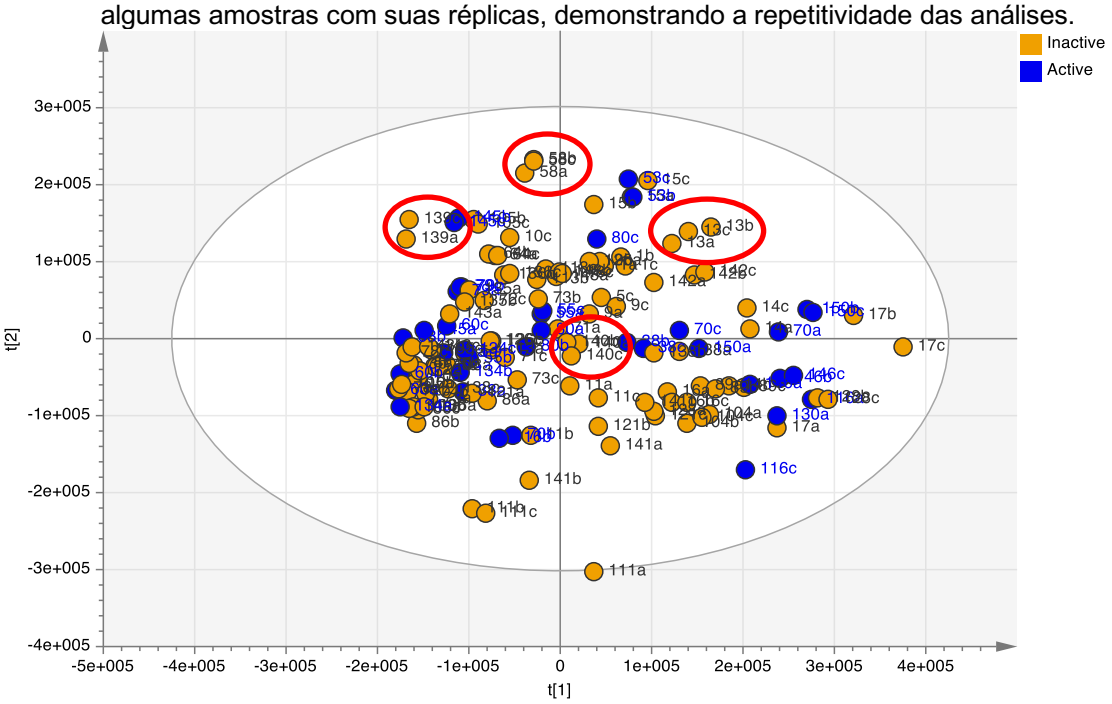
consiste em uma faixa de T^2 para cada componente selecionada no gráfico, sendo T^2:

$$T^2 = \Sigma\ ((t_i - t_{média})^2 / s^2) \qquad (11)$$

onde:

t_i - valor de *score* da amostra *i*;
$t_{média}$ - média dos valores de *score* de todas as amostras;
s^2 - variância dos valores de *score* de todas as amostras.

Figura 16 – PCA com as variáveis *x* das 59 amostras (em triplicata, modo negativo): gráfico dos valores de *score* (t) da PC-1 (12%) *vs* PC-2 (5%). Amostras ativas (azul): IC_{50} < 500 $mg.ml^{-1}$, amostras inativas (alaranjado): IC_{50} > 500 $mg.ml^{-1}$. Elipse de tolerância (*Hotellings* T^2) estabelecida com α = 0,01. Demarcações em vermelho destacam algumas amostras com suas réplicas, demonstrando a repetitividade das análises.



Fonte: o próprio autor (figura gerada no software SIMCA).

O desempenho de cada modelo de OPLS na calibração e validação cruzada está traduzido pelos parâmetros estatísticos apresentados na Tabela 6. A escolha do número de variáveis latentes (LVs ou componentes) utilizado foi baseada na progressão dos valores acumulados de variância explicada (R^2 e Q^2) e do erro ($RMSE_{CV}$) ao longo das LVs adicionadas aos modelos (Apêndices X e Y). A adição de componentes foi finalizada quando a diferença desses valores entre uma componente e a seguinte se tornou insignificante, evitando, assim, utilizar LVs que possivelmente explicassem ruído[132,136,137,267].

Para ambos os modos de ionização, o modelo obtido sem seleção de variáveis foi selecionado para a descoberta de biomarcadores, pois desempenhou

melhor em termos de calibração e validação cruzada (Tabela 6), além de requerer um número igual ou inferior de componentes do que os outros modelos para exercer uma performance igual ou superior na busca por agrupar separadamente as amostras ativas e inativas, indicando quais as substâncias que possivelmente fossem as responsáveis por essa diferenciação.

O fato dos modelos sem seleção de variáveis terem superado ambas as tentativas de selecionar atributos que porventura fossem mais correlacionados com a atividade biológica em questão, revela o êxito no processamento dos dados de LC-MS. Os parâmetros estabelecidos em cada etapa realizada no software MZmine (Apêndice C) permitiram o cumprimento do objetivo do (pré-)processamento dos dados, que visa reduzir a sua dimensionalidade original, removendo o máximo de ruído e dados de baixa qualidade, extraindo, portanto, o máximo de informações químico-biológicas relevantes[79,102,104,105].

Tabela 6 – Parâmetros estatísticos dos modelos de OPLS-DA para descoberta de biomarcadores dos extratos para inibição *in vitro* de *Lm*DHODH

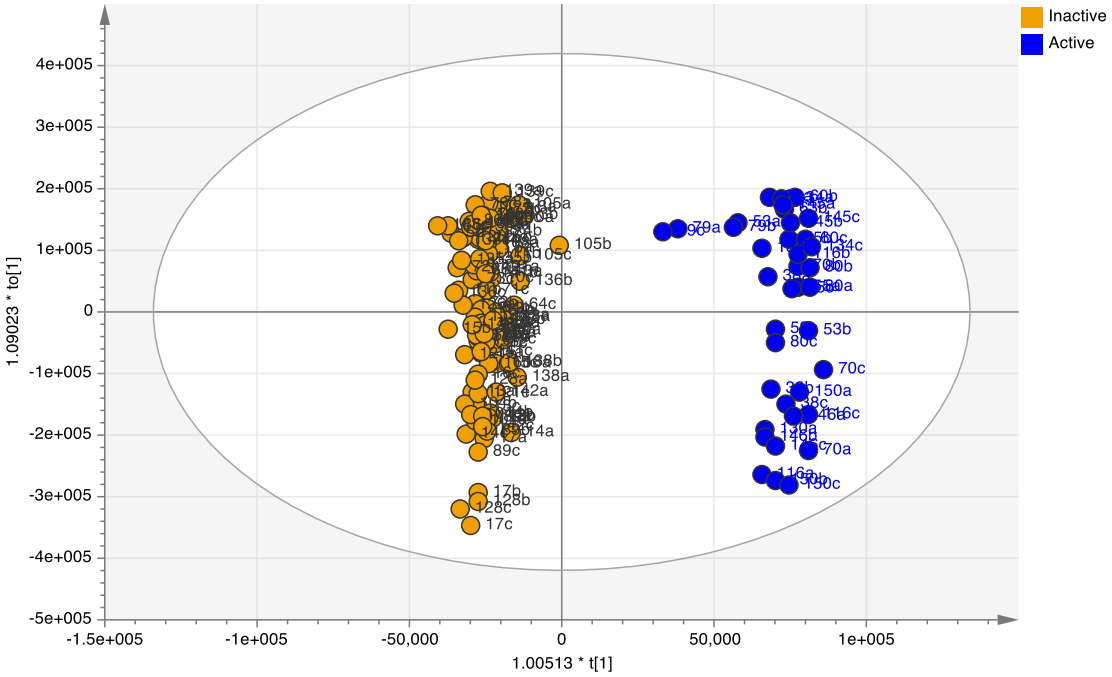
Modelos	N° de componentes[a]	R^2 [b]	Q^2 [b]	$RMSE_{CV}$[b]
Modo negativo				
Sem seleção	8	0,970	0,782	0,205
Seleção por VIP > 0,5	8	0,961	0,786	0,203
Seleção por AG	8	0,931	0,687	0,250
Modo positivo				
Sem seleção	8	0,985	0,943	0,106
Seleção por VIP > 0,5	9	0,980	0,936	0,113
Seleção por AG	13	0,929	0,802	0,201

Fonte: o próprio autor. [a]Número de componentes (uma preditiva e as demais ortogonais) foi determinado com base na progressão dos valores acumulados de R^2, Q^2 e $RMSE_{CV}$ dos modelos; [b]Coeficiente de determinação da calibração (R^2) e validação cruzada (Q^2), e raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_{CV}$).

Considerando a alta complexidade dos extratos vegetais, os valores de R^2 e Q^2 maiores que 0,5 já são considerados aceitáveis em estudos metabolômicos [132,171,203,268,269]. Foram obtidos valores de $R^2 > 0,9$ e $Q^2 > 0,7$, indicando boa qualidade de ajuste e previsibilidade interna, respectivamente. Os baixos valores de dispersão na validação cruzada ($RMSE_{CV}$) endossam a robustez e capacidade preditiva deste modelo[171,178]. O sucesso na modelagem dos dados significa que existe de fato uma diferença na constituição química dos extratos dos dois grupos, enquanto há similaridades nos extratos dentro do mesmo grupo. Ao fazer uso do OPLS-DA, método de análise linear supervisionado que decompõe os dados *x* com

y, obteve-se máxima correlação entre os *scores* de *x* (picos/substâncias) e *y* (inibição *in vitro* de *Lm*DHODH, atribuindo às amostras as classes “ativa” ou “inativa”)[267,268,270]. Realmente, foi possível separar as amostras ativas das inativas em virtude das informações químicas correlacionadas com seu potencial de inibição enzimática, como pode ser visualizado na Figura 17, que apresenta o gráfico de *scores* das amostras no modo negativo (modo positivo no Apêndice Z).

Figura 17 – OPLS com as variáveis *x* e *y* das amostras (em triplicata, modo negativo): gráfico dos valores de *score* (t) da LV-1 (52%, única componente preditiva) *vs* LV-2 (16%, componente ortogonal-1). Amostras ativas (azul): IC_{50} < 500 mg.ml^{-1}, amostras inativas (alaranjado): IC_{50} > 500 mg.ml^{-1}. Elipse de tolerância (*Hotellings* T^2) estabelecida com α = 0,05.



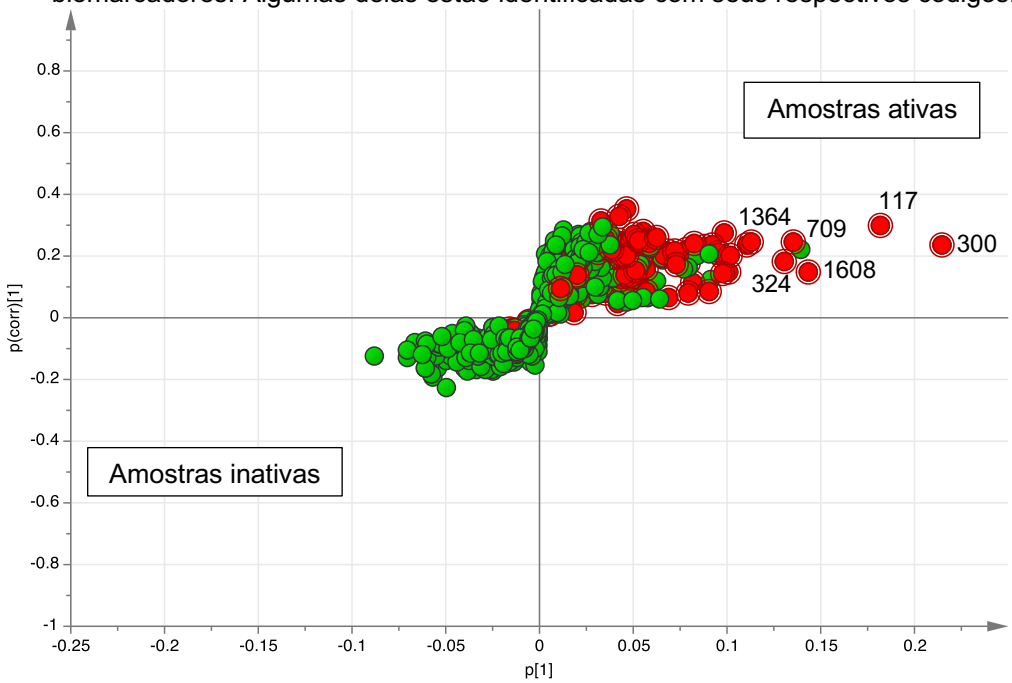
Fonte: o próprio autor (figura gerada no software SIMCA).

As variáveis discriminantes para o agrupamento das amostras ativas constituem os possíveis biomarcadores do potencial de inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH exercido por estes extratos. A determinação destas substâncias, neste tipo de abordagem *in silico*[70,71,97], acontece por meio da associação dos *loadings* das variáveis *x* (Apêndices AA e AB) com os *scores* das amostras (Figura 17 e Apêndice Z). Porém, muitas variáveis foram apontadas como supostos marcadores biológicos e, portanto, foi aplicado um “filtro estatístico” para selecionar somente aquelas altamente correlacionadas com a inibição enzimática, ou seja, com maior significância e confiabilidade.

Por fim, obteve-se 51 variáveis discriminantes no modo de ionização negativo (destacadas em vermelho na Figura 18) e 30 no positivo (Apêndice AC), nas quais o intervalo de confiança (estimativo de *Jack-knife*)[271–273] do seu coeficiente de regressão não incluiu o valor zero, o que garante que ele seja significativo (acima do ruído); já o VIP, valor que expressa a sua importância no modelo para explicar a variável resposta, foi superior a 1,0. O parâmetro VIP, gerado pelo algoritimo presente no software SIMCA-P, é calculado para cada variável *x* basicamente por meio da somatória do produto da multiplicação de w^2 (*squared OPLS weight*) pela variância explicada (R^2) em cada componente[267,274].

O gráfico do tipo *S-plot* permite fácil visualização da análise OPLS discriminante de duas classes, de modo que tem sido bastante utilizado em estudos metabolômicos[270,275–279]. Este gráfico de dispersão com formato de "S" relaciona a magnitude das variáveis *x* (valores de *loading*, p) com sua respectiva significância (correlação com a variável *y*, p(corr)1) na componente preditiva (LV-1) do modelo. As variáveis situadas nas extremidades do gráfico em "S" são consideradas supostos biomarcadores, pois possuem maior influência no modelo e confiabilidade[270]. A Figura 18 traz o *S-plot* da análise por OPLS-DA das amostras no modo negativo (modo positivo no Apêndice AC).

Figura 18 – *S-plot* da análise por OPLS-DA das amostras, em triplicata, no modo de ionização negativo. Em vermelho estão destacadas as 51 variáveis *x* discriminantes para a classe de extratos ativos, e que foram estatisticamente significantes, constituindo possíveis biomarcadores. Algumas delas estão identificadas com seus respectivos códigos.

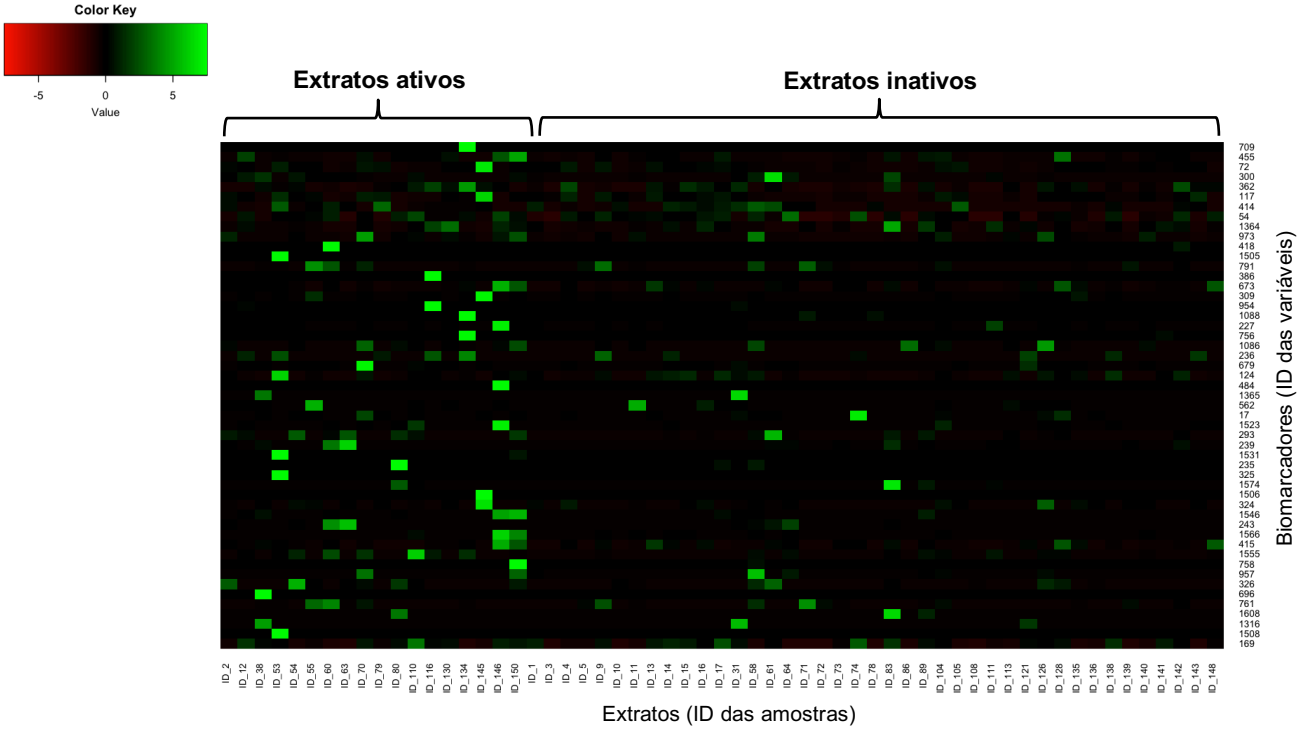


Fonte: o próprio autor (figura gerada no software SIMCA).

A lista completa das variáveis discriminantes que foram consideradas possíveis biomarcadores para a inibição *in vitro* de *Lm*DHODH encontra-se nos Apêndices AD (modo negativo) e AE (modo positivo), juntamente com o respectivo nível de identificação alcançado na desreplicação. Independentemente da identidade química das substâncias correlacionadas com a inibição enzimática apresentada pelos extratos de Asteraceae, é possível fazer algumas observações importantes a partir das informações contidas nos Apêndices AD e AE:

a) os biomarcadores são comuns à maioria dos extratos ativos, com poucas exceções, mesmo em espécies de tribos diferentes. No modo negativo somente oito das 51 substâncias ocorreram em menos da metade das 18 amostras ativas e, no modo positivo, somente uma entre as 30 variáveis discriminantes;
b) os biomarcadores não ocorreram exclusivamente nas amostras ativas. As diferenças quantitativas entre as duas classes de amostras, considerando a área sob os picos, foi o que tornou estas variáveis selecionadas de fato discriminantes. Esta observação pode ser confirmada na Figura 19, que consiste no mapa de calor (*heatmap*) gerado com os valores de área dos picos das 51 substâncias nas 59 amostras (modo positivo no Apêndice AF). As médias das amostras foram estatisticamente diferentes com $P < 0,05$ no modo negativo e $P < 0,01$ no modo positivo (ANOVA com teste-t);
c) alguns biomarcadores são constituintes majoritários, como é o caso do ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico no extrato de *Pluquea quitoc* DC. (Figura 13). A maioria, porém, faz parte dos constituintes minoritários dos extratos, possuindo valores de área sob os picos bem próxima ou abaixo da média da área de todos os picos ao longo dos 59 extratos, que para o modo negativo foi $4,87 \times 10^{7}$ (faixa de área dos picos: 0 a $1,79 \times 10^{10}$) e para o modo positivo foi $5,33 \times 10^{7}$ (faixa de área dos picos: 0 a $5,26 \times 10^{10}$). O fato do modelo de OPLS-DA ter selecionado alguns constituintes minoritários como biomarcadores da atividade biológica em estudo ressalta a eficiência e alta performance desta abordagem metabolômica aliada a métodos *in silico* de processamento e análise dos dados. Sugere ainda que estas substâncias sejam potentes inibidores de *Lm*DHODH ou que, ao menos, atuem sinergicamente com outros metabólitos bioativos.

Figura 19 – Mapa de calor (*heatmap*) das 51 substâncias selecionadas como possíveis biomarcadores dos 59 extratos no modo de ionização negativo. Utilizou-se os valores de área dos picos (para identidade das amostras vide Tabela 1 e das variáveis discriminantes Apêndice AD), demonstrando que os biomarcadores apresentam maior área de picos nas amostras ativas (à esquerda) do que nas inativas (à direita). A escala de cores utilizada foi vermelho-verde, indicando menor-maior área sob os picos das substâncias nas amostras.



Fonte: o próprio autor (figura gerada no software R, R Core Team[280]).

Na desreplicação dos biomarcadores, considerando a classificação em 4 níveis de identificação, para as 51 variáveis selecionadas no modo negativo (Apêndice AD), obteve-se oito substâncias em nível 1 (pelas informações de t_R e massa monoisotópica em alta resolução de 120 substâncias da *AsterLib* I, que foram injetadas no mesmo método de análise dos extratos); 0 (zero) em nível 2 (anotação putativa a partir do *AsterDB*[121,122] e dos bancos de dados online *DNP*[162], *SciFinder*[163] e *ChemSpyder*[164], com base na massa monoisotópica em alta resolução e dados espectrais/físico-químicos, sem padrões químicos de referência); 35 no nível 3 (classe da substância anotada putativamente a partir dos bancos de dados citados anteriormente, baseando-se unicamente na fórmula molecular); e oito no nível 4 (substância não identificada). No modo de ionização positivo, dentre as 30 variáveis selecionadas (Apêndice AE), foram identificadas uma em nível 1; 0 (zero) em nível 2; 11 em nível 3; e 18 em nível 4. As substâncias que não puderam ser identificadas, nem quanto à sua classe química, mesmo utilizando abrangentes bases de dados online, podem se tratar de substâncias inéditas.

A Tabela 7 contém os biomarcadores identificados com nível 1, nos modos negativo e positivo. Como apresentado anteriormente, na desreplicação inicial dos extratos (Tabela 5), foram identificadas 49 substâncias em nível 1 a partir dos padrões (*AsterLib* I) e destas, 13 já haviam sido testadas frente à *Lm*DHODH (item 4.1.2). Ao desreplicar exclusivamente as variáveis discriminantes, o modelo gerado e validado para os dados no modo de ionização negativo selecionou duas substâncias destas 13 já testadas: ácido 4-*O*-cafeoil-2-C-metil-*D*-eritrônico (IC_{50} 418 µM) e ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico (IC_{50} 73 µM). Somente este último apresentou bom potencial de inibição, constituindo uma interessante guia na busca por novos inibidores desta enzima. Portanto, o modelo para descoberta de biomarcadores conseguiu selecionar substâncias as quais são realmente capazes de exercer algum nível de inibição sobre *Lm*DHODH. Tal resultado eleva ainda mais o impacto destes resultados inéditos e o potencial de aplicação desta abordagem metabolômica aliada a métodos *in silico* para a descoberta de marcadores biológicos dos extratos de espécies de Asteraceae com potencial de inibição desta enzima, podendo ainda esta mesma abordagem ser extrapolada para outros alvos biológicos.

Tabela 7 – Biomarcadores correlacionados com a inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH e identificados em nível 1

ID[a]	Coeficiente[b]	VIP[b]	t_R (min)	m/z[c]		Erro de massa (ppm)[d]	FM[e]	Desreplicação		
				$[M-H]^-$	$[M+H]^+$			Identidade[f]	Nível[g]	Amostra[h]
455	4,33E-06	1,16	9,67	367,1037916	—	2,403	$C_{17}H_{20}O_9$	ácido 3-*O*-cafeoil-2-(2-butil)-2-hidróxi butanodióico	1	18/18;32/41
300	3,75E-06	8,39	15,25	283,0615893	—	3,312	$C_{16}H_{12}O_5$	genkwanina	1	14/18;22/41
117	3,11E-06	7,15	10,95	285,0407623	—	2,969	$C_{15}H_{10}O_6$	luteolina	1	18/18;34/41
54	2,75E-06	2,60	1,08	191,0555007	—	0,325	$C_7H_{12}O_6$	ácido quínico	1	18/18;36/41
17	1,82E-06	1,88	8,80	515,1196270	—	1,309	$C_{25}H_{24}O_{12}$	ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico[i]	1	18/18;37/41
293	1,80E-06	3,61	11,47	315,0515368	—	3,351	$C_{16}H_{12}O_7$	3-*O*-metilquercetina	1	18/18;33/41
239	1,80E-06	1,17	5,77	311,0777995	—	3,547	$C_{14}H_{16}O_8$	ácido 4-*O*-cafeoil-2-C-metil-D-eritrônico[i]	1	01/18;00/41
178	1,78E-06	2,24	12,48	—	301,0707805	1,442	$C_{16}H_{12}O_6$	hesperetina	1	14/18;22/41
169	1,32E-06	3,22	12,50	299,0565070	—	3,146	$C_{16}H_{12}O_6$	hispidulina	1	17/18;31/41

Fonte: o próprio autor.

[a]Código de identificação das variáveis *x*, gerado no software MZmine durante o processamento dos dados de LC-MS.

[b]As variáveis estão distribuídas na tabela por ordem decrescente do seu coeficiente de regressão, que expressa diretamente sua correlação com a variável *y*. Constam aqui somente aquelas variáveis cujo intervalo de confiança do seu coeficiente não incluiu o valor zero e o VIP foi superior a 1,0.

[c]Valor de massa acurada (experimental) correspondente à média do valor da variável ao longo de todas amostras nas quais foi identificada. $[M-H]^-$: massa experimental no modo negativo, ou seja, subtraída do valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da); $[M+H]^+$: massa experimental no modo positivo, ou seja, acrescida ao valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da).

[d]Exatidão de massa relativa (erro em ppm) calculada por meio da diferença entre os valores de massa acurada (experimental) e massa exata monoisotópica (calculada a partir da fórmula molecular no ChemCalc[261]. As variáveis cujo erro de massa foi superior a 5 ppm foram desconsideradas.

[e]Fórmula molecular obtida por meio da massa acurada, utilizando o ChemCalc.

[f]Nome usual ou classe/subclasse das substâncias atribuídas às respectivas variáveis de acordo com o nível de identificação alcançado.

[g]Níveis de identificação[109]: 1 – substância identificada por meio de um banco de dados *in house* contendo as informações de t_R e massa monoisotópica em alta resolução de 120 substâncias pertencentes à biblioteca de substâncias isoladas da família Asteraceae (AsterLib I), as quais foram injetadas no mesmo método de análise dos extratos, Confirmação da identidade por padrão de fragmentação dos espectros de MS/MS; 2 – substância putativamente anotada a partir do nosso banco de dados *in house* AsterDB[121,122] e dos bancos de dados online do *DNP*[162], *SciFinder*[163] e *ChemSpyder*[164], com base na massa monoisotópica em alta resolução e dados espectrais/físico-químicos, sem padrões químicos de referência; 3 – classe da substância anotada putativamente a partir dos bancos de dados citados anteriormente, sendo esta baseada unicamente na fórmula molecular (massa monoisotópica em alta resolução); 4 – substância não identificada (n.i.).

[h]No conjunto de 59 extratos, 18 foram considerados ativos (IC_{50} < 500 $\mu g.ml^{-1}$) e 41 inativos (IC_{50} > 500 $\mu g.ml^{-1}$).

[i]Estas variáveis foram testadas para inibição de *Lm*DHODH: ácido 4,5-di-O-E-cafeoilquínico (var 17) com IC_{50} de 73 µM e ácido 4-*O*-cafeoil-2-C-metil-D-eritrônico (var 239) com IC_{50} de 418 µM.

4.2.2 Modelo de predição

Um novo modelo de OPLS foi gerado por meio do conjunto treino (n = 44 extratos, em triplicata), tendo como base o melhor modelo obtido no item 4.2.1 para descoberta de biomarcadores, o qual foi com os dados no modo de ionização negativo sem seleção de variáveis. Inicialmente, a análise exploratória por PCA permitiu a detecção e exclusão de *outliers*, de modo que as amostras remanescentes estão todas dentro dos limites do intervalo de confiança definido por *Hotelling's* T^2 (99% de significância, Apêndice AG)[108,267]. O desempenho do modelo na calibração, validação cruzada e externa está traduzido pelos parâmetros estatísticos apresentados na Tabela 8. A escolha do número de componentes utilizadas foi baseada na progressão dos valores acumulados de R^2, Q^2 e $RMSE_{CV}$ ao longo das LVs adicionadas aos modelos (Apêndice AH)[136].

Tabela 8 – Parâmetros estatísticos dos modelos de OPLS para classificação de novos extratos quanto ao potencial de inibição *in vitro* de *Lm*DHODH

Modelos	Descrição	N° de componentes[a]	R^2 [b]	Q^2 [b]	$RMSE_{CV}$[b]	Validação externa (% de acerto)[c]
1	Conjunto treino/teste 1	7	0,962	0,722	0,238	60
2	Conjunto treino/teste 2	5	0,920	0,544	0,292	60
3	Aleatorização de *y*	2	0,444	-0,240	0,502	—[d]

Fonte: o próprio autor.
[a]Número de componentes (uma preditiva e as demais ortogonais) foi determinado com base na progressão dos valores acumulados de R^2, Q^2 e $RMSE_{CV}$ dos modelos.
[b]Coeficiente de determinação da calibração (R^2) e validação cruzada (Q^2), e raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_{CV}$).
[c]Valor da porcentagem de classificação correta dos extratos do conjunto teste na validação externa.
[d]Modelos com $Q^2 < 0,5$ não se adequaram ao critério de validação interna, portanto, não foi necessário avaliar a predição externa nestes casos.

Os dados foram modelados com sucesso (modelo 1, Tabela 8), obtendo um modelo robusto ($RMSE_{CV} < 0,3$), bem ajustado ($R^2 > 0,6$) e com boa capacidade preditiva interna ($Q^2 > 0,5$). Consequentemente, foi possível separar as amostras ativas das inativas em virtude das informações químicas correlacionadas com seu potencial de inibição enzimática (gráfico de *scores* das amostras, Apêndice AI). A previsibilidade externa e real do modelo também foi validada, pelo conjunto teste (n = 15 extratos, em triplicata). A taxa de acerto do modelo ao classificar as amostras que não participaram da etapa de calibração foi de 60%, o que corresponderia a um P^2 (coeficiente de determinação da validação externa) de 0,6, assegurando,

portanto, sua aplicabilidade e excluindo a possibilidade de super-ajuste e instabilidade[171,173].

Para reforçar ainda mais a validação do modelo, outras duas abordagens foram executadas para assegurar que os resultados não foram obtidos ao acaso. Primeiro, o procedimento descrito anteriormente para o modelo 1 foi repetido para uma nova distribuição das amostras entre conjunto treino (n = 44, em triplicata) e teste (n = 15, em triplicata), obtendo o modelo 2 (Tabela 8). O desempenho do modelo 2 foi comparável ao do modelo 1, apresentando todos os parâmetros acima do mínimo aceitável[171,173], incluindo a mesma taxa de acerto na classificação das amostras do conjunto teste. O sucesso nessa abordagem demonstra a qualidade dos dados, permitindo boa reprodutibilidade dos resultados independentemente da configuração dos conjuntos treino e teste. Por fim, o teste de aleatorização das variáveis *y* comprovou a estabilidade do modelo e excluiu a possibilidade de correlação aleatória (ao acaso). O modelo 3 (Tabela 8), obtido após redistribuição aleatória das classes das amostras (ativa ou inativa) para o conjunto treino, mantendo a ordem original das variáveis *x* (área dos picos, com t_R e *m/z*), foi estatisticamente irrelevante ($R^2 < 0,5$; $Q^2 < 0$ e $RMSE_{CV} > 0,5$).

Portanto, o modelo obtido foi devidamente validado pelos parâmetros estatísticos apresentados, atestando a utilização do mesmo para predição com segurança de extratos de novas espécies de Asteraceae, ainda não testadas frente à *Lm*DHODH, classificando-os como ativos ou inativos com base exclusivamente na sua impressão digital por UHPLC-ESI-HRFTMS.

4.3 Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) de lactonas sesquiterpênicas para inibição *in vitro* da enzima *Lm*DHODH

4.3.1 Estudo de QSAR baseado em descritores moleculares

Uma vez que a suposição fundamental dos estudos de QSAR é que todas as substâncias estudadas partilham do mesmo mecanismo de ação, se ligando ao mesmo sítio da enzima, somente as 21 STLs foram empregadas neste estudo de modelagem molecular. A seleção de variáveis foi realizada em duas etapas para evitar correlação ao acaso e super-ajuste (*overfitting*), dois problemas majoritários em modelagem, afetando diretamente a qualidade dos modelos[281].

O primeiro passo de seleção foi realizado antes da calibração e eliminou 23 e 13 descritores 2D e 3D, respectivamente, tendo estes sido detectados como sendo não informativos (baixa correlação com a atividade, $r^2 < 0,2$) ou redundantes (alta correlação com outros descritores, $C < 0,6$)[282]. Os melhores modelos, em termos de Q^2, $RMSE_{CV}$ e valor-*F*, com 2 e 3 descritores, obtidos na segunda etapa da seleção de variáveis em cada bloco de descritores estão apresentados na Tabela 9 (FS), 10 (BE) e 11 (GA). O GA superou os outros dois métodos, fornecendo modelos indiscutivelmente melhores. De fato, como pode ser observado nas Tabelas 9 e 10, nenhum modelo confiável e útil foi obtido empregando-se FS e BE. Por isto, se faz produtivo somente a análise dos rendimentos do GA. Os descritores selecionados, suas respectivas classes e frequências na geração final e mais evoluída de modelos do GA estão reportadas na Tabela 12.

De modo geral, podem ser apontados dois aspectos principais da Tabela 11: a) os melhores resultados foram obtidos à partir do bloco de descritores 2D+3D, seguido pelos 3D e finalmente os 2D; b) os modelos com 3 descritores apresentaram melhor performance do que aqueles com 2. Este segundo aspecto pode parecer óbvio e até mesmo problemático, uma vez que a porcentagem de variiancia explicada (R^2) tende a aumentar artificialmente com o maior número de parâmetros no modelo, indicando a possibilidade de *overfitting*[132]. Entretanto, esta possibilidade foi monitorada por validação cruzada, visto que o Q^2 diminui nestas condições de super-ajuste do modelo, sendo esta a razão pela qual esta função foi utilizada ao invés do R^2 para selecionar os melhores modelos[138,283].

Tabela 9 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR obtidos por FS-PLS

Tipo de descritores	Número de descritores	Descritores	Parâmetros estatísticos[a]						
			R^2	Q^2	P^2_{F2}	P^2_{F1}	$RMSE_C$	$RMSE_{CV}$	$RMSE_P$
2D	3	a_acc, GCUT_SLOGP_0, PEOE_RPC+	0,504	-0,052	—[b]	—	0,337	0,420	—
	2	a_acc, GCUT_SLOGP_0	0,487	0,073	—[b]	—	0,328	0,394	—
3D	3	vsurf_ID8, vsurf_IW6, vsurf_D8	0,798	0,509	-0,097	0,135	0,215	0,287	0,836
	2	vsurf_ID8, vsurf_IW6	0,770	0,531	0,120	0,306	0,220	0,280	0,447
2D+3D	3	vsurf_ID8, GCUT_SLOGP_0, vsurf_D8	0,643	0,365	—[b]	—	0,286	0,326	—
	2	vsurf_ID8, GCUT_SLOGP_0	0,624	0,285	—[b]	—	0,281	0,346	—

Fonte: o próprio autor.
[a]Coeficiente de determinação da calibração (R^2), validação cruzada (Q^2), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto teste (P^2_{F2}), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto treino (P^2_{F1}), raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_C$), validação cruzada ($RMSE_{CV}$) e validação externa ($RMSE_P$). Os melhores modelos foram selecionados com base no Q^2, $RMSE_{CV}$ e valor-*F*.
[b]Modelos com $Q^2 < 0,5$ não se adequaram ao critério de validação, portanto, não foi apresentada a predição externa nestes casos.

Tabela 10 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR obtidos por BE-PLS

Tipo de descritores	Número de descritores	Descritores	Parâmetros estatísticos[a]						
			R^2	Q^2	P^2_{F2}	P^2_{F1}	$RMSE_C$	$RMSE_{CV}$	$RMSE_P$
2D	3	Q_VSA_PPOS, TPSA, Q_VSA_NEG	0,405	-0,012	—[b]	—	0,369	0,412	—
	2	Q_VSA_PPOS, TPSA	0,390	0,004	—[b]	—	0,358	0,409	—
3D	3	vsurf_W2, vsurf_HB2, DCASA	0,366	0,126	—[b]	—	0,381	0,383	—
	2	vsurf_W2, vsurf_HB2	0,260	-0,023	—[b]	—	0,394	0,414	—
2D+3D	3	—[c]	—	—	—	—	—	—	—
	2	—[c]	—	—	—	—	—	—	—

Fonte: o próprio autor.
[a]Coeficiente de determinação da calibração (R^2), validação cruzada (Q^2), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto teste (P^2_{F2}), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto treino (P^2_{F1}), raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_C$), validação cruzada ($RMSE_{CV}$) e validação externa ($RMSE_P$). Os melhores modelos foram selecionados com base no Q^2, $RMSE_{CV}$ e valor-*F*.
[b]Modelos com $Q^2 < 0,5$ não se adequaram ao critério de validação, portanto, não foi apresentada a predição externa nestes casos. [c] O método BE selecionou somente descritores 3D no bloco de descritores 2D+3D.

Tabela 11 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR obtidos pelo método de seleção GA-MLR seguido de regressão por PLS

Tipo de descritores	Número de descritores	Descritores	Parâmetros estatísticos[a]						
			R^2	Q^2	P^2_{F2}	P^2_{F1}	$RMSE_C$	$RMSE_{CV}$	$RMSE_P$
2D	3	GCUT_SLOG_0, PEOE_VSA_FPNEG, Q_VSA_FPOL	0,628	0,313	—[b]	—	0,292	0,339	—
	2	GCUT_SLOG_0, PEOE_VSA_FPNEG	0,468	0,030	—[b]	—	0,334	0,403	—
3D	3	vsurf_ID8, vsurf_IW6, MNDO_LUMO	0,900	0,719	0,365	0,500	0,151	0,217	0,379
	2	vsurf_ID8, vsurf_IW6	0,770	0,531	0,120	0,306	0,220	0,280	0,447
2D+3D	3	vsurf_ID8, GCUT_SLOGP_2, std_dim2	0,833	0,687	0,660	0,732	0,196	0,229	0,278
	2	vsurf_ID8, GCUT_SLOGP_2	0,769	0,543	0,488	0,596	0,220	0,277	0,341

Fonte: o próprio autor.
[a]Coeficiente de determinação da calibração (R^2), validação cruzada (Q^2), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto teste (P^2_{F2}), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto treino (P^2_{F1}), raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_C$), validação cruzada ($RMSE_{CV}$) e validação externa ($RMSE_P$). Os melhores modelos foram selecionados com base no Q^2, $RMSE_{CV}$ e valor-*F*.
[b]Modelos com $Q^2 < 0,5$ não se adequaram ao critério de validação, portanto, não foi apresentada a predição externa nestes casos.

Tabela 12 – Descritores dos melhores modelos obtidos nos três blocos de descritores, selecionados por GA

Descritores	Classes[a]	Frequência na geração final[b]		
		Bloco 2D	Bloco 3D	Bloco 2D+3D
GCUT_SLOGP_0	2D: *adjacency and distance matrix descriptors*	47	—	2
GCUT_SLOGP_2	2D: *adjacency and distance matrix descriptors*	0	—	52
PEOE_RPC+	2D: *adjacency and distance matrix descriptors*	15	—	0
PEOE_VSA_FPNEG	2D: *adjacency and distance matrix descriptors*	6	—	1
MNDO_LUMO	3D: *MOPAC descriptors*	—	1	1
std_dim2	3D: *surface area, volume and shape descriptors*	—	1	2
vsurf_ID8	3D: *surface area, volume and shape descriptors*	—	97	147
vsurf_IW6	3D: *surface area, volume and shape descriptors*	—	98	94

Fonte: o próprio autor. [a]Classificação de acordo com MOE[167].
[b]Estes valores de frequência correspondem ao número de modelos no qual cada descritor apareceu na geração final e mais evoluida de modelos. O valor máximo é exatamente o número máximo de modelos em uma geração, sendo este igual a 100 para os blocos 2D e 3D e 150 para o bloco 2D+3D. Os resultados são para o GA com 3 descritores. Foram obtidas 20.700, 9.500 e 19.700 gerações para os blocos de descritores 2D, 3D e 2D+3D, respectivamente. Foram permitidas no máximo 50.000 gerações.

Primeiramente, alguns esclarecimentos a respeito das definições e conceitos dos parâmetros estatísticos empregados na avaliação, análise comparativa e validação dos modelos de QSAR obtidos por GA. Os coeficientes de determinação ou coeficientes quadrático de correlação (*squared correlation coefficients*) entre os valores experimentais e previstos (R^2, Q^2, P^2_{F1} e P^2_{F2}) são os coeficientes de correlação de determinação múltipla, cuja melhor definição é a variância explicada, i.e. a proporção de variação na atividade que pode ser explicada pelo modelo[138]. Estes índices são calculados utilizando as Equações 4-7, com formulação diferente da empregada para o coeficiente quadrático de correlação de Pearson (*squared Pearson correlation coefficient*) entre os valores experimentais e previstos (r^2), o qual também é denominado coeficiente quadrático de correlação. Diferentemente do r^2, o R^2 pode assumir valor negativo quando o ajuste do modelo é ruim ao ponto de tornar o valor da razão entre a soma quadrática do resíduo e a soma quadrática total (SQRes/SQT) maior do que 1[171,173,178]. Isto será melhor explicado e exemplificado mais à frente na discussão dos resultados, quando estiver justificando o uso de ambos P^2_{F1} and P^2_{F2}. O RMSE, da forma que foi calculado para a calibração (Equação 8), também é denominado desvio padrão residual (*residual standard deviation*, RSD), e permite estimar a qualidade preditiva com maior confiabilidade, uma vez que este contabiliza os graus de liberdade dos resíduos[136,178].

O melhor modelo somente com descritores 2D obtido por GA não atendeu aos critérios de validação interna ($Q^2 > 0,5$), portanto, a validação externa não foi realizada (Tabela 11). O melhor modelo com três descritores 3D apresentou valores de R^2 e Q^2 um pouco maiores do que o melhor modelo com descritores 2D+3D. Porém, este último superou o anterior em termos de validação externa, com valores de P^2_{F1} e P^2_{F2} significativamente superiores. Na realidade, o melhor modelo com três descritores 3D não desempenhou bem na validação externa (P^2_{F1} e $P^2_{F2} < 0.6$)[173]. Consequentemente, o melhor modelo com descritores 2D+3D foi escolhido, acrescido ao fato de que a interessante associação de um descritor 2D e dois i3D fornece informações estruturais simples, porém, diversificadas, abrangendo ambas as características topológicas e geométricas das moléculas. O modelo proposto está expresso na Equação 12:

$$pIC_{50} = 5{,}567(\pm 0{,}545) - 1{,}026(\pm 0{,}023)\ vsurf_ID8 - 0{,}477(\pm 0{,}010)\ GCUT_SLOGP_2 + 0{,}263(\pm 0{,}020)\ std_dim2 \quad (12)$$

(n = 15; R^2 = 0,833; Q^2 = 0,687; $RMSE_C$ = 0,196; $RMSE_{CV}$ = 0,229; valor-*F* = 24,921 and $F_{3;11;0,05}$ = 3,587; os dados foram normalizados para variância unitária)

Informações importantes para avaliar a performance do modelo final escolhido estão apresentadas na Tabela 13, constando os valores dos três descritores selecionados, valores experimentais e previstos de pIC_{50} e os resíduos correspondes para cada uma das 21 STLs. Na Figura 20 encontram-se os gráficos dos valores experimentais *versus* previstos e de distribuição dos resíduos para calibração, CV e validação externa. Os resíduos foram pequenos (Tabela 13), variando de -0,4 a 0,3 unidades logarítmicas (pIC_{50} 2,9-4,6 unidades logarítmicas), e homoscedásticos, ou seja, distribuídos aleatoriamente, sem nenhuma tendência (Figura 20). Consequentemente, as medidas de dispersão, RMSE, foram todas abaixo de 0,3 (Tabela 11), endossando a previsibilidade e robustez do modelo escolhido. A possibilidade de *overfitting* foi inicialmente refutada, uma vez que o $RMSE_P$ (0,3 unidades logarítmicas) foi superior ao erro de medida experimental (desvio padrão $\leq$ 0.1 unidades logarítmicas). Adicionalmente, a similaridade entre o RMSE para treino, validação interna e externa demonstra que o modelo possui suficiente generalizabilidade[171,173].

O RMSE é uma função bastante significativa, pois diz respeito à exatidão e precisão do modelo, sendo até mesmo mais útil do que o R^2 para indicar a aplicabilidade do modelo. Não obstante, o R^2 constitui uma medida direta do sucesso da modelagem dos dados, algo que o RMSE indica somente indiretamente[173,284]. Com R^2 de 0,833 e Q^2 de 0,687, a qualidade do ajuste e previsibilidade interna do modelo (Equação 12) foram atestadas. O modelo foi capaz de explicar boa e aceitável porcentagem de variação na inibição de *Lm*DHODH ao longo do conjunto de STLs testadas, sendo 83 e 69% de variância explicada na calibração e CV, respectivamente.

A previsibilidade externa e real do modelo também foi validada, com P^2_{F2} de 0,660 e P^2_{F1} de 0,732, assegurando sua aplicabilidade e excluindo a possibilidade de super-ajuste e instabilidade[171,173]. De acordo com o teste de APD realizado para as substâncias do conjunto teste, por meio das distâncias Euclidianas, 100% das predições foram consideradas confiáveis.

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

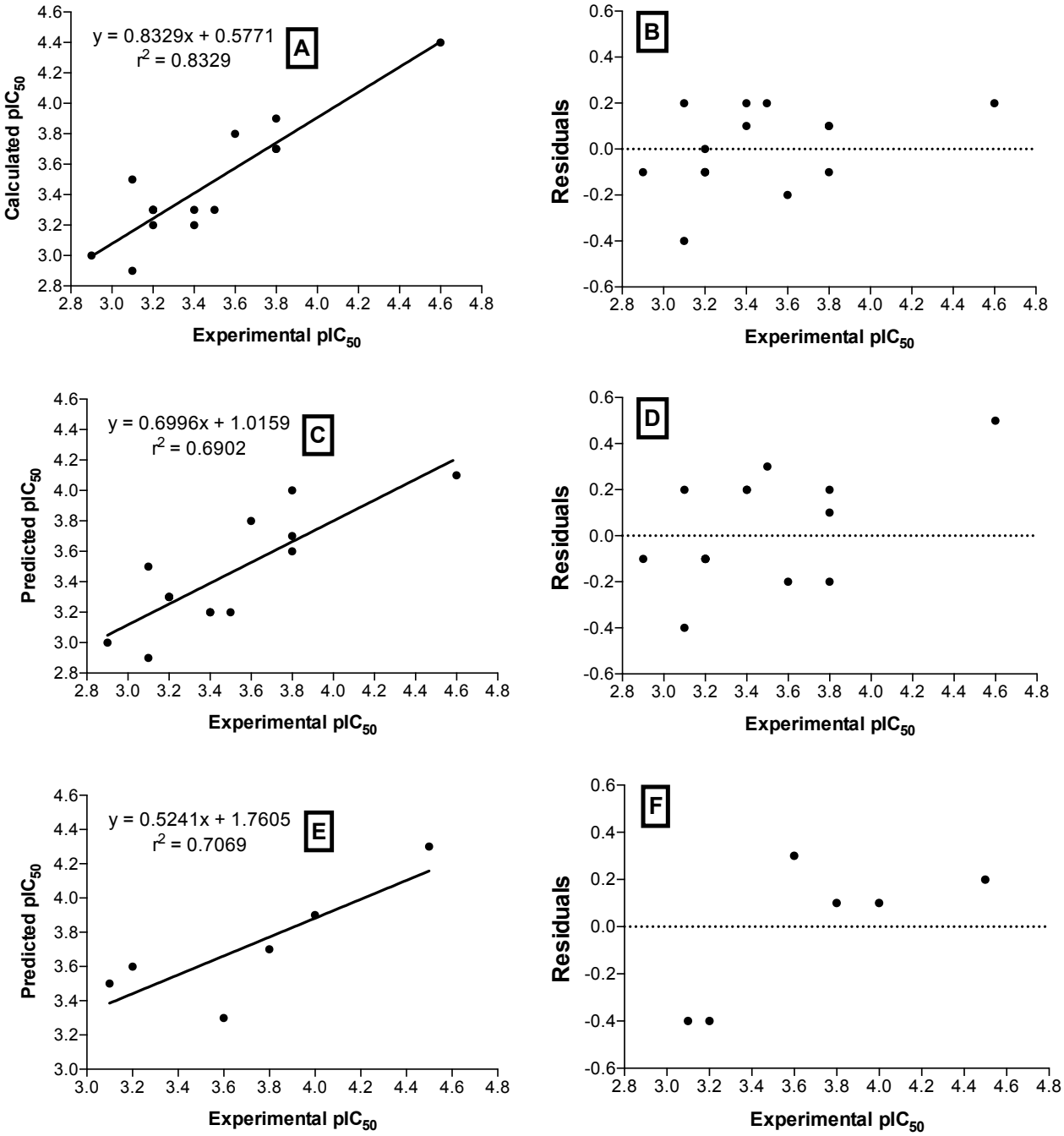
STLs	Descritores			pIC_{50} observado	Calibração		Validação cruzada		Validação externa	
	vsurf_ID8	GCUT_ SLOGP_2	std_dim2		pIC_{50} calculado	Resíduos[b]	pIC_{50} previsto	Resíduos[b]	pIC_{50} previsto	Resíduos[b]
1	-0,03700	1,98919	2,30379	3,5	3,3	0,2	3,3	0,2	—	—
2	0,00695	1,93629	1,01976	3,6	3,8	-0,2	3,8	-0,2	—	—
3[a]	-0,00005	1,93574	1,24835	3,8	—	—	—	—	3,7	0,1
4	0,02542	1,90478	0,95860	3,8	3,7	0,1	3,7	0,1	—	—
5[a]	-0,03700	2,20850	1,22684	4,5	—	—	—	—	4,3	0,2
6	0,06853	2,02062	1,18584	3,4	3,3	0,1	3,3	0,1	—	—
7	-0,00251	2,06694	1,39626	3,8	3,7	0,1	3,7	0,1	—	—
8	-0,03700	2,11098	2,55070	3,2	3,2	0,0	3,2	0,0	—	—
9	-0,03700	1,86383	2,51880	2,9	3,0	-0,1	3,0	-0,1	—	—
10	-0,01236	1,89524	2,43954	3,1	2,9	0,2	2,9	0,2	—	—
11	-0,03700	2,16815	2,62646	3,2	3,3	-0,1	3,3	-0,1	—	—
12	-0,00260	1,89577	1,90020	3,4	3,2	0,2	3,2	0,2	—	—
13	0,00692	1,97904	1,53373	3,1	3,5	-0,4	3,5	-0,4	—	—
14[a]	-0,00005	2,13136	2,06284	3,6	—	—	—	—	3,3	0,3
15	-0,01635	1,80644	1,78908	3,2	3,3	-0,1	3,3	-0,1	—	—
16	-0,01954	1,93849	1,07533	3,8	3,9	-0,1	3,9	-0,1	—	—
17	-0,01954	1,96546	2,02626	3,2	3,3	-0,1	3,3	-0,1	—	—
18	-0,03700	2,03610	0,72293	4,6	4,4	0,2	4,4	0,2	—	—
19[a]	0,03332	1,98348	0,70216	4,0	—	—	—	—	3,9	0,1
20[a]	-0,01313	1,99187	1,80004	3,1	—	—	—	—	3,5	-0,4
21[a]	-0,00005	2,06351	1,54362	3,2	—	—	—	—	3,6	-0,4

Fonte: o próprio autor.

[a]Substâncias do conjunto teste, os quais não foram empregados na construção do modelo.

[b] Resíduo é a diferença (Δ) entre os valores observados e previsto de pIC_{50}.

Figura 20 – Gráficos de dispersão dos valores de pIC_{50} experimental *versus* previsto (esquerda) e seus respectivos gráficos de resíduo (direita) para o modelo selecionado (Equação 12). A e B: calibração; C e D: validação cruzada; E e F: validação externa. O r2 é o coeficiente quadrático de correlação de Pearson para a regressão, o qual é calculado utilizando expressão diferente das Equações 4-7 do coeficiente de determinação.



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software Prism 6.0).

As duas expressões de P^2 aplicadas diferem somente quanto ao cálculo da soma quadrática total (SQT), a primeira emprega a media do valor experimental de *y* do conjunto treino (F1, Equação 6) e a segunda do conjunto teste (F2, Equação 7). Ambos os parâmetros possuem desvantagens, mas foram recorridos por

incorporarem diferentes aspectos para a validação dos modelos. Valores aceitáveis de P^2_{F1}, como o que foi obtido (Tabela 11), validam a capacidade preditiva externa e também indicam que o conjunto teste abrangeu adequadamente a faixa de atividade do modelo, ao ponto que as médias do conjunto treino e teste são bem semelhantes[178]. Por este razão, a expressão F1 é sugerida pela Organização para a Cooperração e Desenvolvimento Econômico (OECD)[134]. Entretanto, foi comprovado que esta função pode produzir valores super estimados[177], tornando o P^2_{F2} um parâmetro mais confiável para avaliar o poder preditivo do modelo[178]. Conformemente, o valor de P^2_{F2} (0,660) foi menor que o de P^2_{F1} (0,732), mas ainda assim suficientemente bom para validar a aplicabilidade do modelol[173].

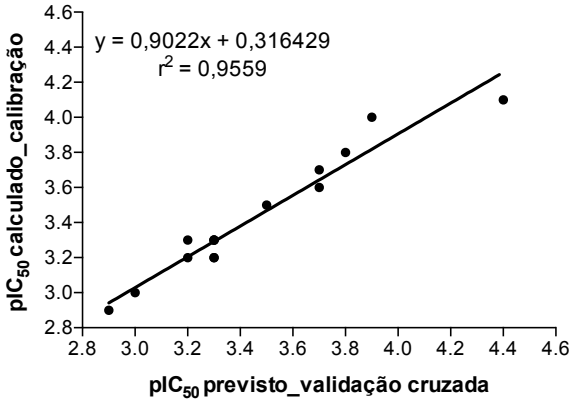
Na Figura 20, o r^2 não é o coeficiente de determinação, mas o coeficiente quadrático de correlação de Pearson (*squared Pearson correlation coefficient*), o qual é obtido pela regressão linear entre os valores experimental e previsto. Portanto, o r^2 não é computado diretamente do modelo original e a regressão linear do valor experimental sobre o valor previsto maximiza o r^2 para o modelo secundário, superestimando a performance de predição. Isso se torna um problema, especialmente para a validação externa, pois o conjunto teste não é idêntico ao conjunto treino. A Figura 20E exemplifica bem este fato: para a calibração e CV os valores do r^2 são quase os mesmos do R^2 e Q^2, mas para o conjunto teste (validação externa) o r^2 (0,707) é maior que o P^2 (0,660). O r^2 mede especificamente o grau de correlação entre os valores previstos e experimentais, não diz respeito ao nível de exatidão do modelo e, portanto, não se trata de um indicador apropriado para a previsibilidade de um modelo de QSAR[171,173,178]. Nenhuma das substâncias do conjunto treino foi detectada como *outlier*, como pode ser observado graficamente na Figura 21, onde está demonstrado que os valores de pIC_{50} calculados na calibração e previstos na CV pelo modelo para o conjunto treino foram altamente correlacionados (r^2 = 0,96).

A significância estatística do modelo final foi comprovada utilizando a razão *F* para teste de hipótese[285]. O valor-*F* calculado (24,921) foi superior ao valor-*F* tabelado, para 3 (regressão) e 11 (resíduos) graus de liberdade, de modo que a hipótese H1 foi aceita com 95% de significância (α = 0,05). Isto significa que o modelo é capaz de predizer a atividade melhor do que o valor médio[136]. A série de três testes de aleatorização de *y*, realizados como última etapa de validação, provou a estabilidade do modelo e excluiu a possibilidade de correlação aleatória (ao

acaso), visto que os modelos de PLS obtidos foram estatisticamente irrelevantes ($R^2 < 0,15$, $Q^2 < 0,01$ e $P^2 < 0,01$).

Vale ressaltar que os resultados em termos de descritores selecionados, parâmetros estatísticos e melhores modelos obtidos nos três blocos de descritores foram reprodutíveis ao realizar as análises de QSAR com outras duas distribuições das substâncias em conjunto treino e teste. Na avaliação externa do modelo escolhido (Apêndice AJ), para evidenciar ainda mais sua aplicabilidade prática, este foi capaz de predizer com considerável precisão e exatidão a atividade de seis substâncias completamente diferentes, apresentando baixo erro (RMSE = 0,35).

Figura 21 – Gráfico de correlação entre os valores de pIC_{50} calculado na calibração e previsto na validação cruzada



Fonte: o próprio autor (gráfico gerado no software Prism 6.0).

O modelo (Equação 12) foi validado com êxito pelos parâmetros estatísticos, atestando o mesmo para interpretação mecanística, visando revelar as relações entre as características estruturais das STLs e a inibição da enzima *Lm*DHODH. Pode-se notar por meio da matriz de correlação (Figura 22) que as intercorrelações entre os três descritores é inexpressiva, assumindo valor máximo de |0,53|. A maior correlação com a atividade foi atribuída ao descritor 3D vsurf_ID8, o qual também apresentou o maior coeficiente de regressão na Equação 12 e foi, de longe, o mais importante entre todas as 278 representações matemáticas das estruturas moleculares 2D e 3D aplicadas nesta abordagem clássica de QSAR. O vsurf_ID8 foi o descritor mais frequentemente utilizado na última e mais evoluída geração de modelos do GA, para os blocos de descritores 3D e 2D+3D (Tabela 12), compondo todos os melhores modelos após quase 50.000 gerações. De fato, vsurf_ID8 por si só foi capaz de explicar 58% da variação de atividade, com R^2 de 0,578 (modelo 1,

Tabela 11). Os outros dois descritores, GCUT_SLOGP_2 e std_dim2, possuem baixa correlação com a atividade (Figura 22) e, individualmente, constituíram modelos sem sucesso (modelos 2 e 3, Tabela 14). Ainda assim, quando separadamente associados com vsurf_ID8, cada um deles foi capaz de acrescentar porcentagem considerável de variação explicada ao modelo 1 (modelos 4 e 5) e a combinação final deste trio de descritores resultou no melhor modelo de todos (modelo 7), expresso na Equação 12.

Figura 22 – Matriz de correlação (r) entre a atividade e os descritores do modelo selecionado (Equação 12)

	1	2	3	4
1. pIC_{50}	1,00	0,03	0,19	-0,76
2. GCUT_SLOGP_2	0,03	1,00	-0,14	-0,53
3. std_dim2	0,19	-0,14	1,00	0,12
4. vsurf_ID8	-0,76	-0,53	0,12	1,00

Fonte: o próprio autor.

Tabela 14 – Parâmetros estatísticos dos modelos obtidos por diferentes combinações dos descritores do modelo selecionado (Equação 14)

Modelos	Descritores	Parâmetros estatísticos[a]						
		R^2	Q^2	P^2_{F2}	P^2_{F1}	$RMSE_C$	$RMSE_{CV}$	$RMSE_P$
1	vsurf_ID8	0,578	0,391	0,289	0,440	0,286	0,320	0,401
2	GCUT_SLOGP_2	0,001	-0,295	-0,269	-0,001	0,440	0,466	0,536
3	std_dim2	0,038	-0,302	-0,024	0,193	0,432	0,467	0,482
4	vsurf_ID8, GCUT_SLOGP_2	0,769	0,543	0,488	0,596	0,220	0,277	0,341
5	vsurf_ID8, std_dim2	0,663	0,485	0,555	0,650	0,266	0,294	0,317
6	GCUT_SLOGP_2, std_dim2	0,041	-0,500	-0,015	0,200	0,449	0,502	0,480
7[b]	vsurf_ID8, GCUT_SLOGP_2, std_dim2	0,833	0,687	0,660	0,732	0,196	0,229	0,278
8	vsurf_ID8, SLogP, std_dim2	0,664	0,393	0,526	0,626	0,277	0,373	0,319
9	vsurf_ID8, LogP, std_dim2	0,664	0,393	0,583	0,671	0,277	0,373	0,301

Fonte: o próprio autor.
[a]Coeficiente de determinação da calibração (R^2), validação cruzada (Q^2), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto teste (P^2_{F2}), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto treino (P^2_{F1}), raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_C$), validação cruzada ($RMSE_{CV}$) e validação externa ($RMSE_P$).
[b]Modelo 7 é o modelo final selecionado, com um descritor 2D e dois i3D, apresentado aqui para compração com os demais da tabela.

Qual a gama de informação química que pode ser extraída dos descritores selecionados para explicar a seletividade biológica dentre as STLs envolvendo a inibição de *Lm*DHODH? Descritores bidimensionais são calculados a partir da

fórmula estrutural 2D (grafo molecular ou *molecular graph*), portando informações simples e úteis acerca da topologia molecular. Descritores tridimensionais internos são oriundos das coordenadas 3D, invariantes à roto-translação da molécula, codificando estritamente informação geométrica (conformacional)[282,286,287]. Ambos os tipos de índices se baseiam na distância entre os átomos, porém, o primeiro considera o número de ligações e o segundo as distâncias geométricas interatômicas[126].

Os índices GCUT são classificados como descritores 2D do tipo "matriz de adjacência e distância (*adjacency and distance matrix*)[167], descrevem a molécula inteira, assim como as métricas BCUT[288], porém, o GCUT utiliza para o cálculos uma matriz de distância modificada ao invés de informações de ordem de ligação[289,290]. O GCUT_SLOGP emprega o valor de SlogP de cada átomo como os elementos da diagonal, modificando a matriz de grafo molecular, da qual os descritores são calculados por interpolação linear. O GCUT_SLOGP_2 corresponde ao maior valor dentro do segundo terço (2/3) da lista de autovalores (*eigenvalues*) da matriz[167]. Este tipo de descritores topológicos representando propriedades de teória dos grafos moleculares possibilitam interpretação lógica e têm sido aplicados com sucesso na caracterização de similaridade/dissimilaridade estrutural, como também em estudos de QSAR/QSPR[289–292], devido ao fato de serem simples, possuirem boa correlação com pelo menos uma propriedade e fazer uso de conceitos estruturais familiares[293]. Os resultados da Tabela 14 corroboram com esta informação, visto que o modelo 7, contendo esta métrica, foi o melhor modelo entre todos os 150 selecionados pelo GA com três descritores, além de superar visivelmente o modelo 6 (com dois descritores, sem o GCUT_SLOGP_2), com maiores valores de R^2, Q^2 e P^2.

Apesar de se tratar de um índice topoestrutural, GCUT_SLOGP é também um descritor molecular híbrido combinando uma propriedade física dos átomos, o SlogP, sendo este o modelo de contribuição atômica para LogP (o/a) (log do coeficiente de partição octanol/água)[294]. O fato de que nenhum outro tipo de descritor GCUT, envolvendo outra propriedade, e.g. GCUT_PEOE (*partial equalization of orbital electronegativities*)[295], foi capaz de prover bons modelos levou à hipótese de que SlogP e LogP (o/a), parâmetros de hidrofobicidade, fossem também importantes para a atividade. Para investigar isso, os modelos 8 e 9 (Tabela 14) foram ajustados trocando GCUT_SLOGP_2 (modelo 7) por SlogP e LogP (o/a). Os resultados foram

virtualmente os mesmos para os modelos 8 e 9, os quais foram capazes de sustentar valores aceitáveis de R^2 e P^2, mas com Q^2 menor. Ainda assim, os modelos demonstraram que de fato SlogP e LogP (o/a) possuem alguma influência na seletividade biológica em questão.

As métricas vsurf são classificadas como descritores i3D do tipo "área superficial, volume e formato"[167]. Estes descritores do tipo VolSurf[296] fornecem interpretações diretas acerca da interação das moléculas com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas da enzima, que são mediadas por propriedades de área superficial de van de Waals, tais como formato, hidrofobicidade e ligações de hidrogênio. A fonte fundamental de informação de tais descritores são os mapas de campo molecular 3D (*3D molecular field maps*), gerados pelo cálculo de campos de interação utilizando sondas com propriedade polar (água), hidrofóbica (DRY) ou aceptora de ligação de hidrogênio[296,297]. O vsurf_ID (momento de energia de interação hidrofóbica ou *hydrophobic interaction energy moment*) é calculado à partir do mapa de interação 3D gerado pela sonda DRY. O momento de energia de interação hidrofóbica mensura o nível de desequilíbrio entre o centro de massa da molécula e as regiões hidrofóbicas da superfície molecular. Elevados valores de vsurf_ID implicam em distribuição heterogênea das porções hidrofóbicas, enquanto baixos valores indicam tanto distribuição homogênea como concentração destas regiões ao redor do baricentro da molécula. Este descritor é subdividido em 8 índices, o vsurf_ID8 corresponde a um limiar de energia de interação em torno de -1,6 kcal/mol[298,299].

Os descritores i3D std_dim (*standard dimension*) também são do tipo "área superficial, volume e formato"[167], sendo equivalente ao desvio padrão ao longo de um eixo da componente principal. Estes índices são obtidos por meio da matriz de covariância das coordenadas atômicas e o std_dim1 ("comprimento") corresponde à raiz quadrada do maior autovalor, o std_dim2 ("largura") do segundo e o std_dim3 ("altura") do terceiro maior autovalor, sendo que esta última também mede a planaridade da molécula[300,301].

Enfim, as características estruturais suficientemente importantes para desencadear maior potencial de inibição da enzima *Lm*DHODH em STLs são:

a) menores valores de GCUT_SLOGP_2 (coeficiente de regressão negativo no modelo, Equação 12): sugere indiretamente menor hidrofobicidade;

b) menores valores de vsurf_ID8 (coeficiente de regressão negativo no modelo, Equação 12): distribuição balanceada das regiões hidrofóbicas, provendo, consequentemente, uma distribuição mais homogênea das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas por meio da superfície molecular e reduzindo a área acessível à água. Esta propriedade de superfície parece otimizar a interação de STLs com resíduos específicos e localizados, hidrofóbicos e hidrofílicos, na superfície de um sítio ativo hipotético da enzima[297,302];
c) maiores valores de std_dim2 (coeficiente de regressão positivo no modelo, Equação 12): maior largura da molécula, os átomos devem estar mais espaçados um do outro, especialmente na segunda maior coordenada atômica. A seleção do std_dim2 revela a importância do formato da molécula para a atividade e, juntamente com o momento de energia de interação hidrofóbica, consiste em um descritor estérico, destacando a influência da correta orientação da molécula, fator que desempenha um papel importante na interação com o sítio ativo da enzima[300].

O resultado desta abordagem clássica se adequa às diretrizes de boas práticas em QSAR[133,138,173], pois está associado com dados de atividade biológica bem definidos e domínio de aplicabilidade estabelecido; fez uso de algoritmos não ambíguos; possui medidas apropriadas de qualidade de ajuste, robustez e previsibilidade; por fim, forneceu interpretação mecanística clara e direta.

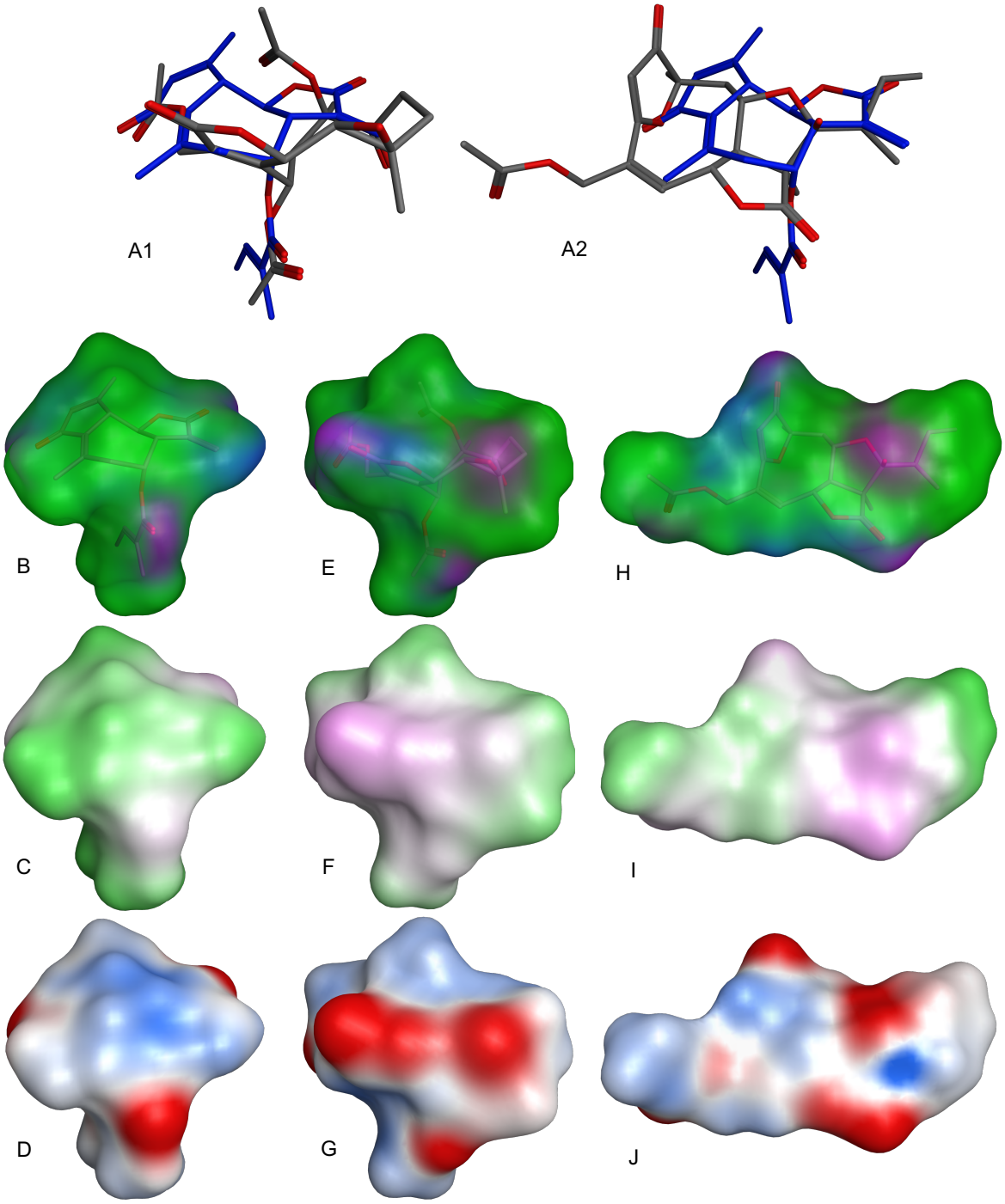
4.3.2 Estudos de QSAR 3D baseado em descritores farmacofóricos

Partindo do conhecimento gerado na abordagem clássica, decidiu-se sobrepor as substâncias mais ativas, STLs 18 (27 μM) e 5 (31 μM), utilizando o aplicativo "*Pharmacophore Elucidator*" no MOE[166] para realizar um alinhamento baseado em farmacóforos. Inicialmente, gera-se um modelo farmacofórico e então realiza-se arranjos 3D das características moleculares mais importantes, alinhando as estruturas com base nelas (Figura 23, A1)[167]. Portanto, este procedimento constitui uma hipótese de alinhamento e orientação para ligantes em um sítio de ligação putativo na enzima. Tudo isso sobre a suposição fundamental de que todas

as substâncias estudadas compartilham o mesmo mecanismo de ação, se ligando ao mesmo sítio. As substâncias 18 e 5 possuem estruturas bastante diferentes, ainda assim são equivalentemente potentes. Não obstante, a representação gráfica de suas superfícies moleculares (Figura 23, B-G) demonstrou que compartilham de importantes similaridades 3D em termos de formato (tamanho) e distribuição de regiões hidrofóbicas, hidrofílicas, aceptora de ligação de H, potencial eletrostático positivo e negativo por meio da superfície molecular. Adicionalmente, nenhuma semelhança considerando tais importantes propriedades para ligação em um alvo hipotético em comum foi detectada com a sobreposição das STLs 18 e 9 (1.200 μM), a substância menos ativa da série (Figura 23, H-J).

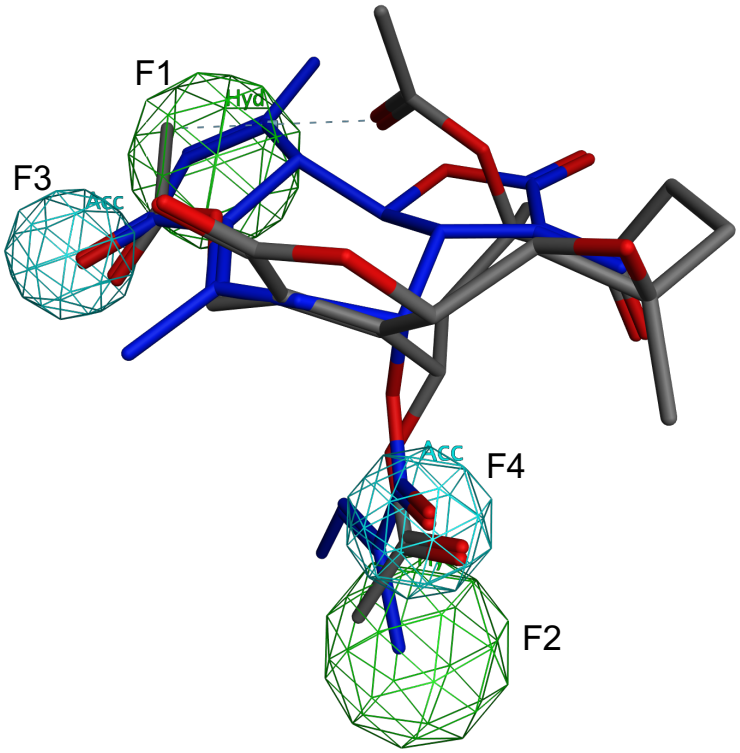
As características farmacofóricas em comum às STLs 18 e 5, retratadas na Figura 24, foram equivalentes, porém não são exatamente os mesmos grupos: o elemento hidrofóbico F1 corresponde a ciclopentenona (STL18) e grupo acetila no CH_2-13 (STL5); o elemento hidrofóbico F2 é constituído pelos grupamentos tigloila (STL18) e acetila (STL5); o grupo aceptor de ligação de H F3 consiste em oxigênio carbonílico da ciclopentenona (STL18) e oxigênio carbonílico do grupo acetila no CH_2-13 (STL5) e o grupo aceptor de ligação de H F4 corresponde ao oxigênio carbonílico dos grupamentos tigloila (STL18) e acetila (STL5). O mais importante, porém, é que ambas as estruturas sustentam estes grupamentos na mesma posição/orientação, de modo que são capazes de interagir com as mesmas regiões hidrofóbicas e doadoras de ligação de H do sítio ativo da enzima.

Figura 23 – Representações gráficas das superfícies moleculares das STLs 18, 5 e 9. Os mapas de superfície molecular foram gerados na exata mesma orientação de ligação hipotetizada por meio do alinhamento utilizando o aplicativo "*Pharmacophore Elucidator*" no MOE para as STLs 18 e 5 (A1, azul: 18 e cinza: 5) e STL 9 (A2, azul: 18 e cinza: 9). Comparação das representações de superfície molecular (B-D: 18, E-G: 5, H-J: 9) empregando os seguintes padrões de cor: B, E e H – par de elétrons livre ativo (rosa: propensão a ligação de H, verde: hidrofóbico, azul: levemente polar); C, F e I – lipofilicidade (rosa: hidrofílico, branco: neutro, verde: lipofílico); D, G e J: potencial eletrostático (vermelho: negativo, branco: neutro, azul: positivo).



Fonte: o próprio autor (figuras geradas no software MOE).

Figura 24 – Farmacóforos em comum selecionados para o alinhamento das STLs 18 (azul) e 5 (cinza). Esferas dos farmacóforos: grupos hidrofóbicos (verde, F1 e F2) e aceptores de ligação de H (azul, F3 e F4). F1: ciclopentenona (STL18) e grupo acetila no CH_2-13 (STL5); F2: grupamentos tigloila (STL18) e acetila (STL5); F3: oxigênio carbonílico da ciclopentenona (STL18) e oxigênio carbonílico do grupo acetila no CH_2-13 (STL5); F4: oxigênio carbonílico dos grupamentos tigloila (STL18) e acetila (STL5).



Fonte: o próprio autor (figura gerada no software MOE).

O QSAR 3D baseado em farmacóforos utilizou os elementos selecionados para o alinhamento (F1-F4), como variáveis indicadoras (valor 1 ou 0), e o índice de alinhamento global (S) de cada substância com a sobreposição das STLs 18 e 5 (Figura 24). Na Tabela 15 estão apresentados os parâmetros estatísticos dos modelos mais significativos, considerando que esta abordagem visou determinar se tais farmacóforos, que constituem descritores moleculares 3D externos, são realemnte importantes para a atividade a ponto de explicar a variação da inibição nos dados obtidos paras as 21 STLs. Os quarto descritores farmacofóricos (F1-F4) utilizados sozinhos (modelo 1, Tabela 15) ou associados ao S (modelo 2) foram capazes de explicar somente 16 e 17% de variância, respectivamente, apresentando valores bem baixos de R^2 e Q^2. O melhor modelo com somente três destes descritores (modelo 3), obtido por *backward elimination* do modelo 2, também falhou

nos critérios de validação, com parâmetros estatísticos inapropriados. Entretanto, a associação de dois descritores farmacofóricos (F2 e S) com vsurf_ID8, o melhor descritor i3D do QSAR clássico, forneceu um modelo confiável (modelo 4), expresso pela Equação 13.

Tabela 15 – Parâmetros estatísticos dos melhores modelos de QSAR 3D com os descritores farmacofóricos

Modelos	Descritores	Parâmetros estatísticos[a]						
		R^2	Q^2	P^2_{F2}	P^2_{F1}	$RMSE_C$	$RMSE_{CV}$	$RMSE_P$
1	F1, F2, F3, F4	0,161	-0,664	—[b]	—	0,459	0,528	—
2	F1, F2, F3, F4, S	0,172	-0,841	—[b]	—	0,481	0,556	—
3	F2, F3, S	0,140	-0,618	—[b]	—	0,444	0,521	—
4	F2, S, vsurf_ID8	0,791	0,548	0,370	0,503	0,219	0,275	0,378
5	F2, vsurf_ID8, std_dim2	0,718	0,504	0,617	0,698	0,254	0,217	0,295

Fonte: o próprio autor.
[a]Coeficiente de determinação da calibração (R^2), validação cruzada (Q^2), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto teste (P^2_{F2}), validação externa utilizando a media dos valores experimentais do conjunto treino (P^2_{F1}), raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração ($RMSE_C$), validação cruzada ($RMSE_{CV}$) e validação externa ($RMSE_P$). Os melhores modelos foram selecionados com base no Q^2, $RMSE_{CV}$ e valor-*F*.
[b]Modelos com $Q^2 < 0,5$ não se adequaram ao critério de validação, portanto, não foi apresentada a predição externa nestes casos.

$$pIC_{50} = 9.583(\pm 0.093) - 0.949(\pm 0.020)\, vsurf_ID8 - 0.776(\pm 0.022)\, F2 - 0.751(\pm 0.017)\, S \quad (13)$$

(n = 15; R^2 = 0,791; Q^2 = 0,548; $RMSE_C$ = 0,219; $RMSE_{CV}$ = 0,275; valor-*F* = 18,964 and $F_{3;11;0,05}$ = 3,587; os dados foram normalizadas para variância unitária)

Os valores de F1-F4 e S para as 21 STLs, juntamente com os valores de pIC_{50} experimental e previsto e os correspondentes resíduos do modelo 4 (Equação 13) estão demonstrados na Tabela 16. Enquanto a Figura 25 traz os gráficos dos valores experimentais *versus* previstos e seus respectivos gráficos de distribuição dos resíduos para calibração, CV e validação externa. Os resíduos foram pequenos (-0,3 a 0,8 unidades logarítmicas, Tabela 16) e homoscedásticos (Figure 25). Com R^2 igual a 0,791, Q^2 igual a 0,548 e baixos valores de RMSE, a qualidade do ajuste, previsibilidade interna e robustez do modelo 4 foram atestadas. A similaridade entre RMSE do treino, CV e teste demonstra que o modelo possui suficiente generalizabilidade. Considerando as predições para o conjunto teste, o modelo retornou P^2_{F2} de 0,370 e P^2_{F1} de 0,503, possuindo previsibilidade externa insuficiente, especialmente quando comparado com o melhor modelo do QSAR clássico[171,173]. Apesar disso, os farmacóforos provaram codificar informações

importantes para a seletividade biológica em foco. Como demonstrado na Tabela 14 (modelo 1), o vsurf_ID8 por si só possui R^2 de 0,578, Q^2 de 0,391 e P^2_{F2} de 0,289, de forma que a adição dos descritores F2 e S (modelo 4, Tabela 15) aumentou estes valores para 0,791, 0,548 e 0,370, respectivamente. Adicionalmente, quando inserido em um dos melhores modelos com dois descritores i3D do QSAR clássico (modelo 5, Tabela 14), F2 incrementou o R^2 de 0,663 para 0,718, Q^2 de 0,485 para 0,504 e P^2_{F2} de 0,555 para 0,617, provando que tais elementos podem contribuir com informações novas e significantes até mesmo em modelos já devidamente estabelecidos.

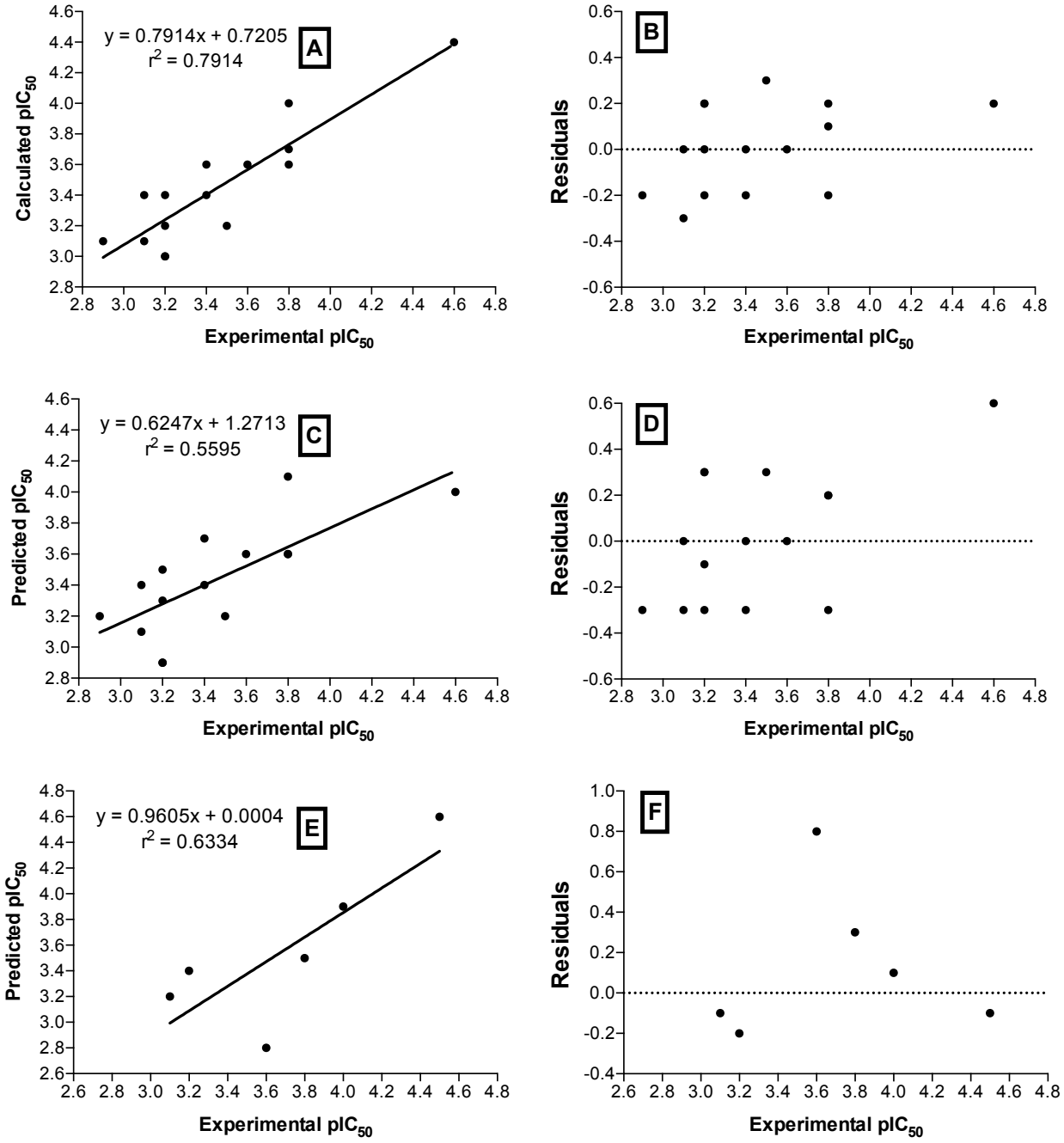
As contribuições estatísticamente significantes destes descritores para o modelo de QSAR 3D enfatizou a eficácia do modelo farmacofórico gerado para o alinhamento das STLs 18 e 5. O modelo mais confiável (Equação 13) destacou como características mais importantes os descritores F2 e S, à parte do vsurf_ID8, o qual continuou sendo negativamente correlacionado com a atividade, significando que maior inibição da enzima *Lm*DHODH requer distribuição balanceada das regiões hidrofóbicas ao longo da superfície molecular[298]. O elemento F2 apresentou coeficiente de regressão negativo, tal que a presença de um grupamento hidrofóbico na posição F2 (Figura 24) tem efeito negativo na inibição desta enzima. Isto pode ser explicado pelo fato de que várias substâncias inativas, com IC_{50} acima de 500 μM, possuem grupo hidrofóbico nesta posição (Tabela 16). O índice S quantifica a qualidade do alinhamento de cada molécula com o alinhamento dual das STLs 18 e 5, combinando energia de deformação interna e medida de similaridade para a sobreposição dos farmacóforos[303,304]. Valores menores de S indicam melhores alinhamentos, de forma que a seleção deste descritor com coeficiente de regressão negativo está em total concordância com a hipótese farmacofórica subjacente, destacando-a como uma potencial orientação das STLs para ligação no sítio ativo da enzima *Lm*DHODH[179,305].

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

STLs	Descritores baseados em farmacóforos					pIC_{50} observado	Calibração		Validação cruzada		Validação externa	
	F1	F2	F3	F4	S		pIC_{50} calculado	Resíduos[b]	pIC_{50} previsto	Resíduos[b]	pIC_{50} previsto	Resíduos[b]
1	0	0	0	0	-85,56	3,5	3,2	0,3	3,2	0,3	—	—
2	0	1	0	1	-115,53	3,6	3,6	0,0	3,6	0,0	—	—
3[a]	0	1	0	1	-117,81	3,8	—	—	—	—	3,5	0,3
4	0	1	0	1	-114,61	3,8	3,7	0,1	3,6	0,2	—	—
5[a]	1	1	1	1	-242,67	4,5	—	—	—	—	4,6	-0,1
6	0	1	0	0	-100,42	3,4	3,4	0,0	3,4	0,0	—	—
7	1	0	0	0	-63,81	3,8	3,6	0,2	3,6	0,2	—	—
8	0	1	0	0	-153,66	3,2	3,0	0,2	2,9	0,3	—	—
9	0	0	0	0	-84,84	2,9	3,1	-0,2	3,2	-0,3	—	—
10	1	0	0	0	-75,82	3,1	3,1	0,0	3,1	0,0	—	—
11	1	1	1	1	-165,06	3,2	3,0	0,2	2,9	0,3	—	—
12	1	0	0	1	-102,90	3,4	3,6	-0,2	3,7	-0,3	—	—
13	1	1	0	1	-127,10	3,1	3,4	-0,3	3,4	-0,3	—	—
14[a]	1	1	1	0	-90,35	3,6	—	—	—	—	2,8	0,8
15	1	1	0	1	-127,90	3,2	3,2	0,0	3,3	-0,1	—	—
16	1	1	1	1	-163,38	3,8	4,0	-0,2	4,1	-0,3	—	—
17	1	1	1	1	-164,92	3,2	3,4	-0,2	3,5	-0,3	—	—
18	1	1	1	1	-179,70	4,6	4,4	0,2	4,0	0,6	—	—
19[a]	1	1	1	1	-127,32	4,0	—	—	—	—	3,9	0,1
20[a]	1	1	0	1	-119,50	3,1	—	—	—	—	3,2	-0,1
21[a]	1	1	1	1	-128,02	3,2	—	—	—	—	3,4	-0,2

Fonte: o próprio autor.
[a]Substâncias do conjunto teste, os quais não foram empregados na construção do modelo.
[b]Resíduo é a diferença (Δ) entre os valores observados e previsto de pIC_{50}.

Figura 25 – Gráficos de dispersão dos valores de pIC_{50} experimental *versus* previsto (esquerda) e seus respectivos gráficos de resíduo (direita) para o modelo selecionado (Equação 13). A e B: calibração; C e D: validação cruzada; E e F: validação externa. O r^2 é o coeficiente quadrático de correlação de Pearson para a regressão, o qual é calculado utilizando expressão diferente das Equações 4-7 do coeficiente de determinação.



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software Prism 6.0).

5 CONCLUSÕES

Pela primeira vez, produtos naturais (extratos e substâncias isoladas) foram testados para inibição de *Lm*DHODH e os resultados indicam que, de fato, estes são capazes de inibi-lá seletivamente (em relação a *Hs*DHODH). 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 *Lm*DHODH (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 *Lm*DHODH. 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 predizer 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.; Kalyuzhniy, 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-quinolinecarbo xylic 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 brasilicum. *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 alkamide 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.; Gloriozova, 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 (CxHyOz) 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 Inititative (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. SistematX, 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.; KaiserB, 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. Screening2* **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 Q2! 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 identi fi cation of novel b -amyloid aggregation inhibitors using Kohonen maps and Counterpropagation Arti fi cial 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 Q2Parameter 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 alpha-amylase and alpha-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. H <scp>ORMESIS</scp> : 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:10.2174/1386207319666160 5.

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 ladyâ€™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. Grael, 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.; Tuenter, 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.; Shirota, 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 dracunculifoliaD.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 classificationy. *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 envirnment 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. Accessing 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.jmgm.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/ci990307l.

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

APÊNDICE A (continua) – Lista das 150 espécies da família Asteraceae envolvidas na triagem *in vitro* por inibidores de *Lm*DHODH

Código	Espécie	Tribo	Local de coleta	Rendimento extrativo (%)[a]
1	*Achillea millefolium* Ledeb.	Anthemideae Cass.	Jardinópolis (SP)	22
2	*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.	Gnaphalieae Cass.	Comercial[b]	11
3	*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen	Heliantheae Cass.	Comercial[b]	15
4	*Ageratum conyzoides* L.	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis (SP)	27
5	*Aldama arenaria* Baker	Heliantheae Cass.	Itirapina (SP)	25
6	*Aldama bakeriana* (S. F. Blake) E.E. Schill. & Panero	Heliantheae Cass.	Oliveira (MG)	12
7	*Aldama bracteata* Gardner	Heliantheae Cass.	Curvelo (MG)	20
8	*Aldama discolor* (Baker) E.E. Schill. & Panero	Heliantheae Cass.	Sacramento (MG)	14
9	*Aldama filifolia* Sch. Bip. Ex Baker	Heliantheae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	20
10	*Aldama gardneri* (Baker) E.E. Schill. & Panero	Heliantheae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	9
11	*Aldama robusta* (Gardner) E.E. Schill. & Panero	Heliantheae Cass.	Altinópolis (MG)	17
12	*Anteremanthus hatschbachii* H. Rob.	Vernonieae Cass.	Cristália (MG)	22
13	*Arctium lappa* L.	Cynareae Less.	Jardinópolis (SP)	21
14	*Arnica montana* L.	Heliantheae Cass.	Comercial[b]	22
15	*Artemisia absinthium* L.	Anthemideae Cass.	Jardinópolis (SP)	20
16	*Artemisia annua* L.	Anthemideae Cass.	Jardinópolis (SP)	20
17	*Baccharis albilanosa* A.S. Oliveira & Deble	Astereae Cass.	Manoel Viana (RS)	19
18	*Baccharis alpina* Kunth	Astereae Cass.	Palmas (PR)	34
19	*Baccharis angustifolia* Michx.	Astereae Cass.	Capão Alto (SC)	57
20	*Baccharis aphylla* (Vell.) DC.	Astereae Cass.	Franco da Rocha (SP)	81
21	*Baccharis bicolor* (Joch.Müll.) G. Heiden	Astereae Cass.	Canguçu (RS)	34
22	*Baccharis boliviensis* (Wedd.) Cabrera	Astereae Cass.	Capão Alto (SC)	56
23	*Baccharis buchtienii* H. Rob.	Astereae Cass.	Balsa Nova (PR)	32
24	*Baccharis caespitosa* (Ruiz & Pav.) Pers.	Astereae Cass.	Balsa Nova (PR)	31
25	*Baccharis cenicienta* DC.	Astereae Cass.	Santana do Riacho (MG)	25
26	*Baccharis ciliata* Gardner	Astereae Cass.	Santana do Riacho (MG)	45
27	*Baccharis crispa* Spreng.	Astereae Cass.	Hulha Negra (RS)	22

APÊNDICE A (continuação) – Lista das 150 espécies da família Asteraceae envolvidas na triagem *in vitro* por inibidores de *Lm*DHODH

Código	Espécie	Tribo	Local de coleta	Rendimento extrativo (%)
28	*Baccharis densiflora* Wedd.	Astereae Cass.	Urubici (SC)	34
29	*Baccharis dracunculifolia* DC.	Astereae Cass.	Guaratuba (PR)	51
30	*Baccharis floripa* DC.	Astereae Cass.	Gouveia (MG)	23
31	*Baccharis glaziovii* Baker	Astereae Cass.	Cerrito (RS)	40
32	*Baccharis grisebachii* Hieron.	Astereae Cass.	Santana do Livramento (RS)	43
33	*Baccharis halimifolia* L.	Astereae Cass.	Urubici (SC)	51
34	*Baccharis incarum* (Wedd.) Perkins	Astereae Cass.	Urubici (SC)	42
35	*Baccharis jelskii* Hieron.	Astereae Cass.	Urubici (SC)	18
36	*Baccharis lychnophora* Gardner	Astereae Cass.	Quaraí (RS)	35
37	*Baccharis nitida* (Ruiz & Pav.) Pers.	Astereae Cass.	Capão Alto (SC)	33
38	*Baccharis organensis* Baker	Astereae Cass.	Santana do Riacho (MG)	50
39	*Baccharis papillosa* Rusby	Astereae Cass.	Balsa Nova (PR)	53
40	*Baccharis papillosa* Rusby subsp. *longipedicellata* Joch. Müller	Astereae Cass.	Bom Jardim da Serra (SC)	60
41	*Baccharis pilularis* DC.	Astereae Cass.	Rio de Contas (BA)	32
42	*Baccharis plummerae* A. Gray	Astereae Cass.	Congonhas do Norte (MG)	52
43	*Baccharis quitensis* Kunth	Astereae Cass.	Diamantina (MG)	38
44	*Baccharis rodriguezii* Ariza	Astereae Cass.	Campos do Jordão (SP)	39
45	*Baccharis sergiloides* A. Gray	Astereae Cass.	Grão Pará (SC)	26
46	*Baccharis stylosa* Gardner	Astereae Cass.	Grão Pará (SC)	26
47	*Baccharis tola* Phil.	Astereae Cass.	Grão Pará (SC)	36
48	*Baccharis trimera* (Less.) DC.	Astereae Cass.	Urubici (SC)	29
49	*Baccharis trinervis* (Lam.) Pers.	Astereae Cass.	Alto Caparaó (MG)	15
50	*Baccharis umbellata* G. Heiden & Ribas	Astereae Cass.	Palhoça (SC)	51
51	*Baccharis urvilleana* Brongn.	Astereae Cass.	Torres (RS)	39
52	*Baccharis wrightii* A. Gray	Astereae Cass.	Palhoça (SC)	25
53	*Bidens pilosa* L.	Coreopsideae Lindl.	Jardinópolis (SP)	15
54	*Blanchetia heterotricha* DC.	Vernonieae Cass.	Ribeirão Preto (SP)	31

APÊNDICE A (continuação) – Lista das 150 espécies da família Asteraceae envolvidas na triagem *in vitro* por inibidores de *Lm*DHODH

Código	Espécie	Tribo	Local de coleta	Rendimento extrativo (%)
55	*Calea cuneifolia* DC.	Neurolaeneae Rydb.	Morro do Chapéu (BA)	17
56	*Chresta angustifolia* Gardner	Vernonieae Cass.	Cavalcante (GO)	10
57	*Chresta curumbensis* (Philipson) H. Rob.	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	24
58	*Chresta exsucca* DC.	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	15
59	*Chresta harleyi* H. Rob.	Vernonieae Cass.	Licínio de Almeida (BA)	22
60	*Chresta hatschbachii* H. Rob.	Vernonieae Cass.	Oliveira dos Brejinhos (BA)	30
61	*Chresta martii* (DC.) H. Rob.	Vernonieae Cass.	Jaguarari (BA)	33
62	*Chresta phylicifolia* (nova spp)	Vernonieae Cass.	Conselheiro Pena (MG)	29
63	*Chresta plantaginifolia* (Less.) Gardner	Vernonieae Cass.	Gama (DF)	31
64	*Chresta pycnocephala* DC.	Vernonieae Cass.	Bocaiúva (MG)	37
65	*Chresta scapigera* (Less.) Gardner	Vernonieae Cass.	Gama (DF)	12
66	*Chresta scapigera x C. pycnocephala* (híbrido)	Vernonieae Cass.	Rio Paranaíba (MG)	12
67	*Chresta souzae* H. Rob.	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	15
68	*Chresta speciosa* Gardner	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	20
69	*Chresta sphaerocephala* DC.	Vernonieae Cass.	Rio Paranaíba (MG)	11
70	*Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC.	Vernonieae Cass.	Santo Antônio do Itambé (MG)	16
71	*Chuquiraga spinosa* Less.	Barnadesieae D.Don	Catas Altas (MG)	22
72	*Cichorium intybus* L.	Cichorieae Lam. & DC.	Comercial[b]	34
73	*Cynara scolymus* L.	Cardueae Cass.	Comercial[b]	28
74	*Dasyphyllum brasiliensis* var. *latifolium* (D. Don) Cabrera	Barnadesieae D.Don	Furnas (MG)	22
75	*Dasyphyllum spinensis* (D. Don) Cabrera	Barnadesieae D.Don	Monte Verde (MG)	14
76	*Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera	Barnadesieae D.Don	Bom Retiro (SP)	7
77	*Dasyphyllum varians* (Gardner) Cabrera	Barnadesieae D.Don	Serra do Japi (SP)	10
78	*Echinacea purpurea* (L.) Moench	Heliantheae Cass.	Jardinópolis (SP)	18
79	*Emilia sonchifolia* L. DC.	Senecioneae Cass.	Jardinópolis (SP)	15
80	*Eremanthus argenteus* MacLeish & H. Schumach	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	17
81	*Eremanthus auriculatus* MacLeish & H. Schumach	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	10

APÊNDICE A (continuação) – Lista das 150 espécies da família Asteraceae envolvidas na triagem *in vitro* por inibidores de *Lm*DHODH

Código	Espécie	Tribo	Local de coleta	Rendimento extrativo (%)
82	*Eremanthus brevifolius* Loeuille sp. nov	Vernonieae Cass.	Congonhas do Norte (MG)	42
83	*Eremanthus capitatus* (Spreng.) MacLeish	Vernonieae Cass.	Abaíra (BA)	49
84	*Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch. Bip	Vernonieae Cass.	Joaquim Felício (MG)	17
85	*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish	Vernonieae Cass.	Capitólio (MG)	54
86	*Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch. Bip	Vernonieae Cass.	Pirenópolis (GO)	35
87	*Eremanthus incanus* (Less.) Less	Vernonieae Cass.	Abaíra (BA)	19
88	*Eremanthus pabstii* G.M. Barroso	Vernonieae Cass.	Cristalina (GO)	30
89	*Eremanthus polycephalus* (DC.) MacLeish	Vernonieae Cass.	Grão Mogol (MG)	25
90	*Eremanthus uniflorus* MacLeish & H. Schumach	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	28
91	*Eremanthus veadeiroensis* H. Rob	Vernonieae Cass.	Alto Paraíso de Goiás (GO)	55
92	*Espeletia barclayana* Cuatrec.	Heliantheae Cass.	Cundinamarca (Colômbia)	17
93	*Espeletia cayetana* Cuatrec.	Heliantheae Cass.	Boyacá (Colômbia)	17
94	*Espeletia curialensis* Cuatrec.	Heliantheae Cass.	Boyacá (Colômbia)	17
95	*Espeletia estanislana* Cuatrec.	Heliantheae Cass.	Norte de Santander (Colômbia)	23
96	*Espeletia frontinoensis* Cuatrec.	Heliantheae Cass.	Antioquia (Colômbia)	22
97	*Espeletia garciae* Cuatrec.	Heliantheae Cass.	Antioquia (Colômbia)	17
98	*Espeletia monguana* sp. nov. Diazgranados	Heliantheae Cass.	Boyacá (Colômbia)	17
99	*Espeletia murilloi* var. nov. Cuatrec. var. *iguaquei* Diagranados	Heliantheae Cass.	Boyacá (Colômbia)	20
100	*Espeletia schultzii* Wedd.	Heliantheae Cass.	Mérida (Venezuela)	15
101	*Espeletia semiglobulata* Cuatrec.	Heliantheae Cass.	Mérida (Venezuela)	18
102	*Gorceixia decurrens* Baker	Vernonieae Cass.	Leme do Prado (MG)	13
103	*Heterocoma ekmaniana* (Philipson) Lueville, J. N. Nakaj. & Semir	Vernonieae Cass.	Leme do Prado (MG)	11
104	*Heterocoma gracilis* Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir sp. nov	Vernonieae Cass.	São Gonçalo do Rio Preto (MG)	12
105	*Lactuca sativa* L.	Cichorieae Lam. & DC.	Comercial[b]	25
106	*Lychnophora ericoides* Mart.	Vernonieae Cass.	Diamantina (MG)	9
107	*Lychnophora markgravii* G.M. Barroso	Vernonieae Cass.	Grão Mogol (MG)	21

APÊNDICE A (continuação) – Lista das 150 espécies da família Asteraceae envolvidas na triagem *in vitro* por inibidores de *Lm*DHODH

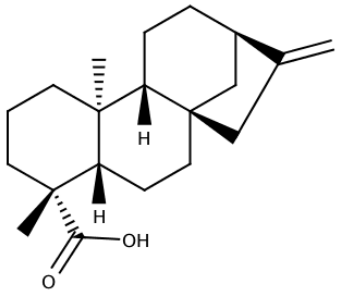
Código	Espécie	Tribo	Local de coleta	Rendimento extrativo (%)
108	*Lychnophora mellobarretoi* G.M. Barroso	Vernonieae Cass.	Santana do Riacho (MG)	22
109	*Lychnophora passerina* (Mart. ex DC.) Gardner	Vernonieae Cass.	Abaíra (BA)	34
110	*Lychnophora salicifolia* Mart.	Vernonieae Cass.	Botumirim (MG)	18
111	*Lychnophora santosii* H. Rob.	Vernonieae Cass.	Mucugê (BA)	35
112	*Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	Vernonieae Cass.	Diamantina (MG)	18
113	*Matricaria chamomilla* L.	Anthemideae Cass.	Jardinópolis (SP)	31
114	*Mikania aff. burchelli*	Eupatorieae Cass.	Cusco (Peru)	28
115	*Mikania angularis* Humb. & Bonpl.	Eupatorieae Cass.	Cusco (Peru)	31
116	*Mikania cordifolia* (L.f.) Willd.	Eupatorieae Cass.	São Paulo (SP)	24
117	*Mikania glomerata* Sprengel	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis (SP)	14
118	*Mikania hirsutissima* DC.	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis (SP)	12
119	*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker	Eupatorieae Cass.	Jardinópolis (SP)	24
120	*Mikania psilostachya* DC.	Eupatorieae Cass.	Ribeirão Preto (SP)	22
121	*Mikania sessilifolia* DC.	Eupatorieae Cass.	São Paulo (SP)	34
122	*Mikania* sp	Eupatorieae Cass.	Una (BA)	23
123	*Mikania thapsoides* DC.	Eupatorieae Cass.	Una (BA)	36
124	*Mikania triangularis* Baker	Eupatorieae Cass.	São Paulo (SP)	15
125	*Minasia scapigera* H. Rob.	Vernonieae Cass.	Diamantina (MG)	14
126	*Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. Hind	Vernonieae Cass.	Mucugê (BA)	17
127	*Paralychnophora bicolor* (DC.) MacLeish	Vernonieae Cass.	Abaíra (BA)	26
128	*Piptolepis monticola* Loeuille sp. nov	Vernonieae Cass.	Santo Antônio do Itambé (MG)	25
129	*Piptolepis schultziana* Loeuille & D.J.N. Hind: Brazil	Vernonieae Cass.	Congonhas do Norte (MG)	23
130	*Pluchea quitoc* D.C.	Inuleae Cass.	Jardinópolis (SP)	23
131	*Prestelia eriopus* Sch. Bip.	Vernonieae Cass.	Santana do Riacho (MG)	7
132	*Proteopsis argentea* Mart. & Zucc. ex Sch. Bip.	Vernonieae Cass.	Grão Mogol (MG)	25
133	*Proteopsis hermogenesii* sp. Ined.	Vernonieae Cass.	Botumirim (MG)	23
134	*Schlechtendalia luzulaefolia* Less.	Barnadesieae D.Don	Manoel Viana (RS)	19

APÊNDICE A (conclusão) – Lista das 150 espécies da família Asteraceae envolvidas na triagem *in vitro* por inibidores de *Lm*DHODH

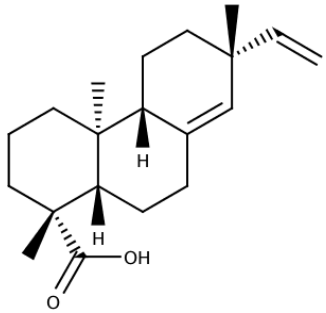
Código	Espécie	Tribo	Local de coleta	Rendimento extrativo (%)
135	*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson	Heliantheae Cass.	Jardinópolis (SP)	13
136	*Soaresia velutina* Sch. Bip.	Vernonieae Cass.	Sobradinho (BA)	30
137	*Solidago chilensis* Meyen	Astereae Cass.	Rio das Antas (SC)	19
138	*Solidago microglossa* DC.	Astereae Cass.	Jardinópolis (SP)	23
139	*Sonchus oleraceus* L.	Cichorieae Lam. & DC.	Jardinópolis (SP)	18
140	*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruskei	Heliantheae Cass.	Ribeirão Preto (SP)	11
141	*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni	Eupatorieae Cass.	Comercial[b]	39
142	*Tanacetum parthenium* L.	Anthemideae Cass.	Jardinópolis (SP)	23
143	*Taraxacum officinale* Weber ex FH Wigg.	Cichorieae Lam. & DC.	Jardinópolis (SP)	21
144	*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray	Heliantheae Cass.	Jardinópolis (SP)	23
145	*Tridax procumbens* L.	Heliantheae Cass.	Ribeirão Preto (SP)	9
146	*Vernonanthura beyrichii* (Less.) H. Rob.	Vernonieae Cass.	Itirapina (SP)	22
147	*Vernonanthura brasiliana* (L.) H. Rob.	Vernonieae Cass.	São João da Boa Vista (SP)	11
148	*Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip ex Walp.	Vernonieae Cass.	Ribeirão Preto (SP)	16
149	*Chrysolaena platensis* (Spreng.) H. Rob.	Vernonieae Cass.	Botucatu (SP)	9
150	*Vernonanthura polyanthes* (Spreng.) A.J. Vega & M. Dematt.	Vernonieae Cass.	Araxá (MG)	17

Fonte: O próprio autor.
[a] Extratos preparados em tubos de 5 mL, utilizando 3 mL de solução extratora e 60 mg de droga vegetal.
[b] Oficina de Ervas, Ribeirão Preto, SP.

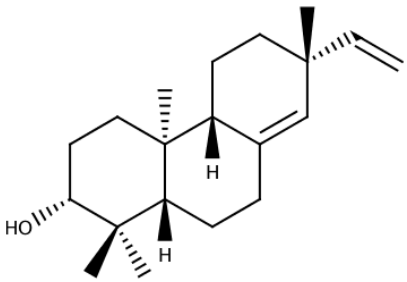
APÊNDICE B (continua) – Estrutura química das substâncias testadas frente à enzima *Lm*DHODH (para as estruturas das STLs consultar a Figura 6)



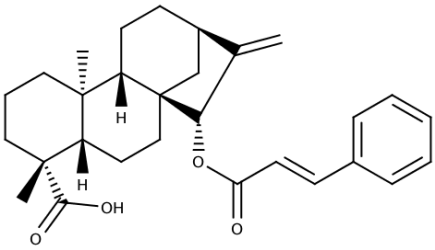
DIT1



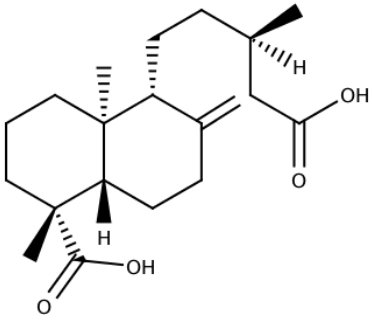
DIT2



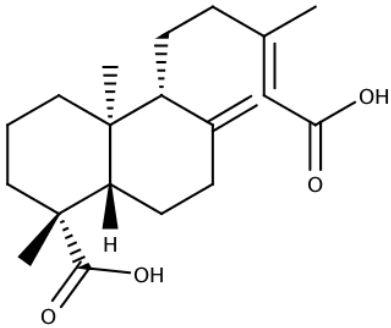
DIT3



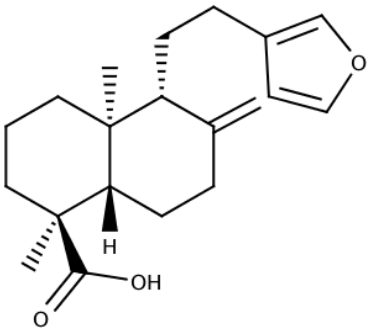
DIT4



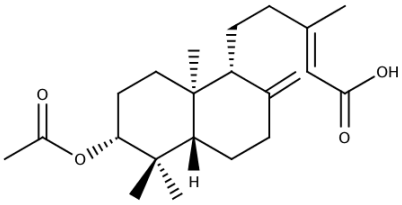
DIT5



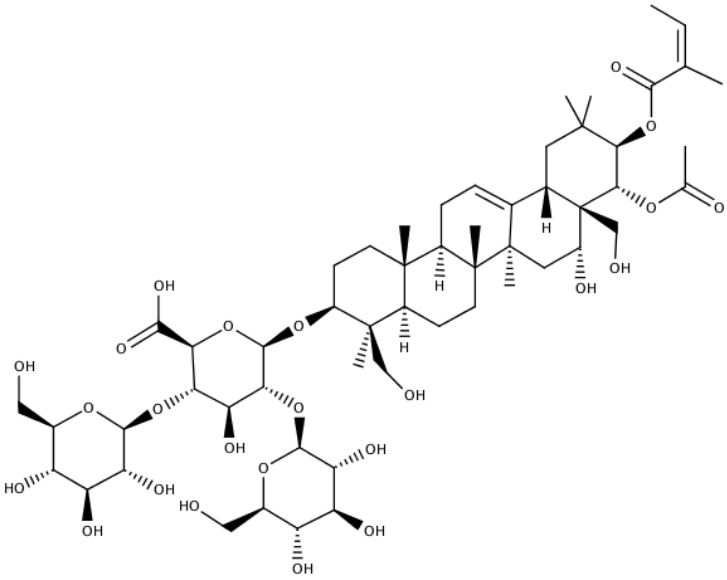
DIT6



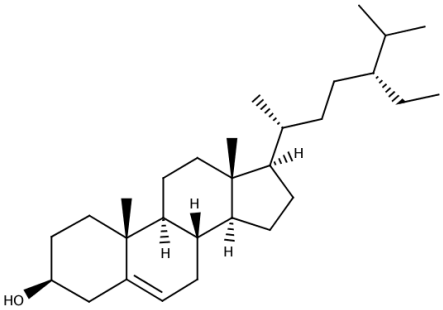
DIT7



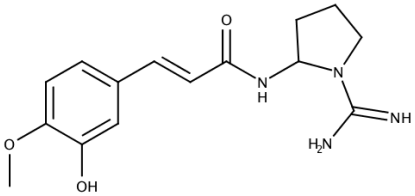
DIT8



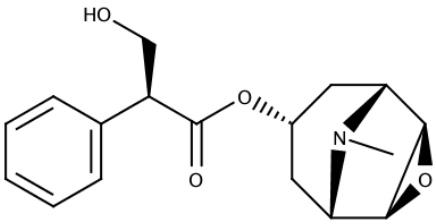
SAP1



STE1

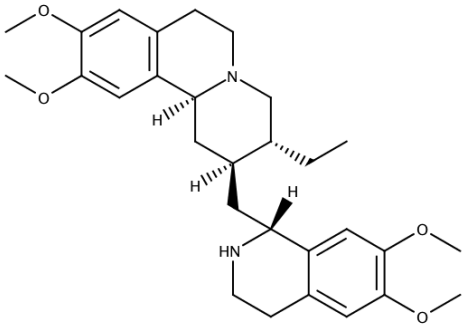


ALK1

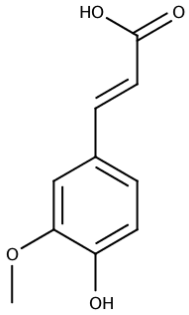


ALK2

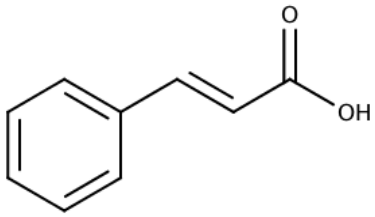
APÊNDICE B (continuação) – Estrutura química das substâncias testadas frente à enzima *Lm*DHODH (para as estruturas das STLs consultar a Figura 6)



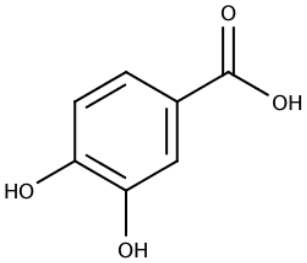
ALK3



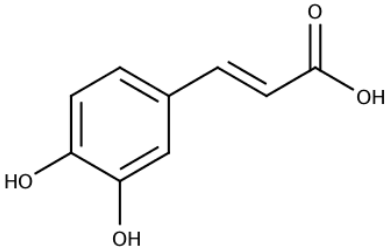
PHE1



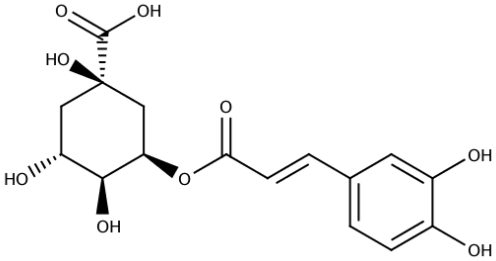
PHE2



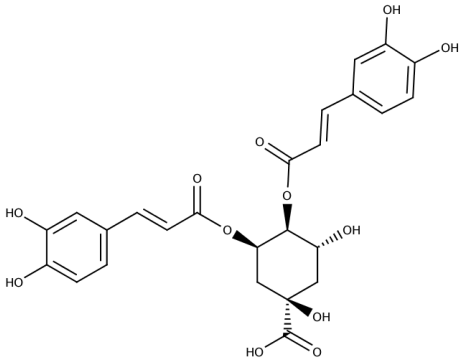
PHE3



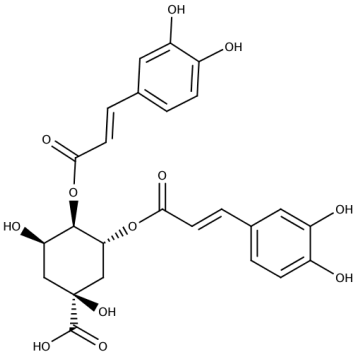
PHE4



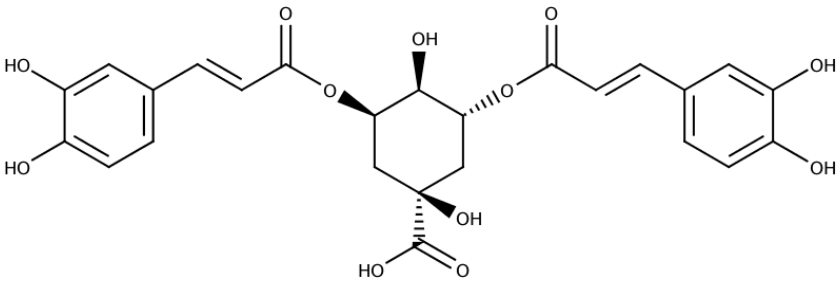
PHE5



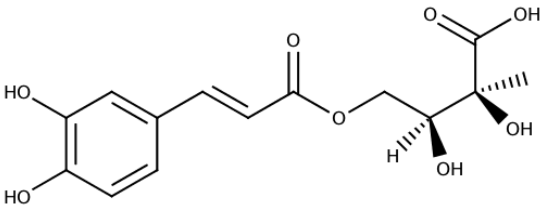
PHE6



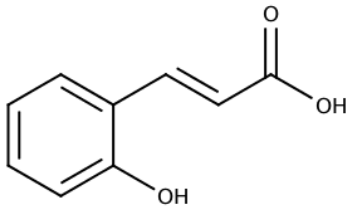
PHE7



PHE8

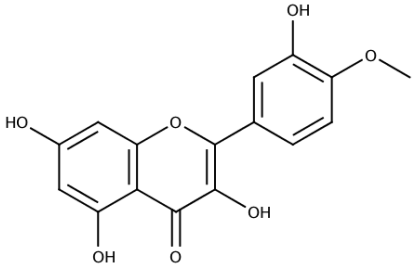


PHE9

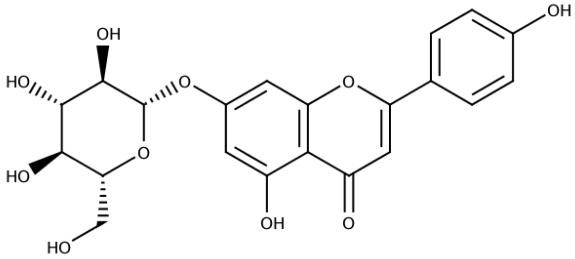


PHE10

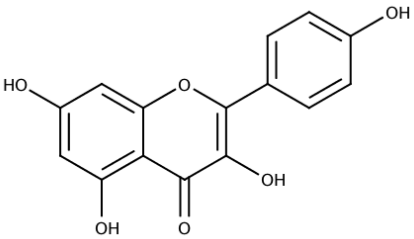
APÊNDICE B (continuação) – Estrutura química das substâncias testadas frente à enzima *Lm*DHODH (para as estruturas das STLs consultar a Figura 6)



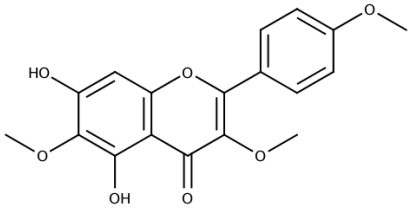
FLA1



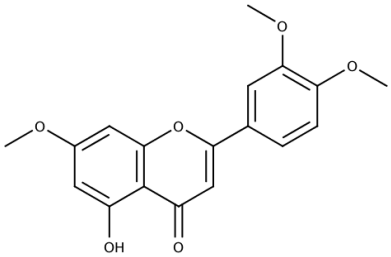
FLA3



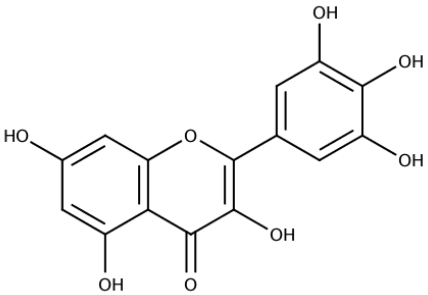
FLA2



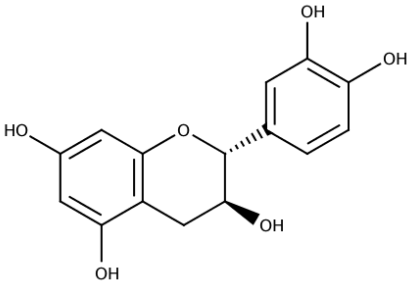
FLA4



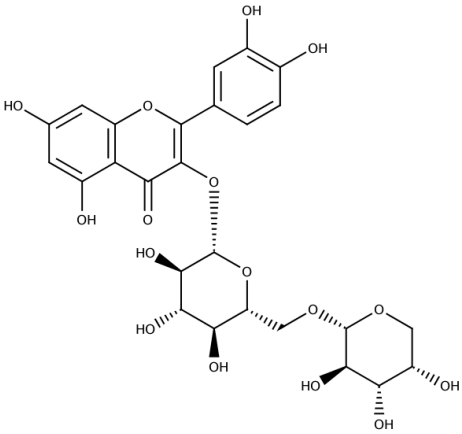
FLA5



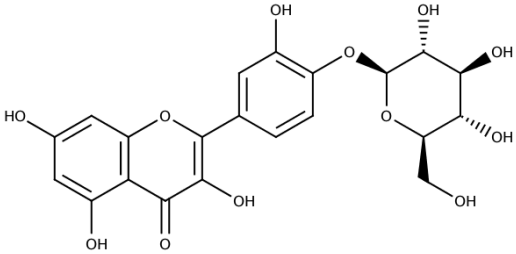
FLA6



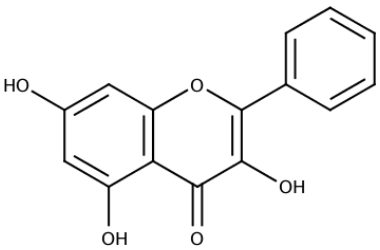
FLA7



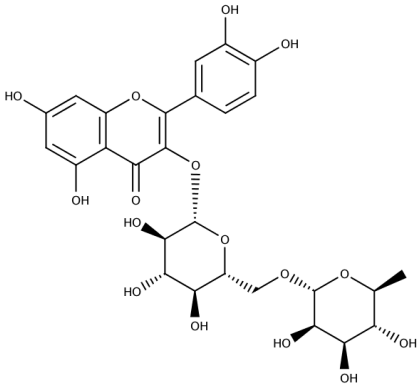
FLA8



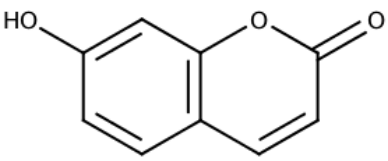
FLA9



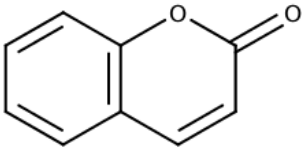
FLA10



FLA11



COU1



COU2

APÊNDICE C – Parâmetros para processamento dos dados no software MZmine

1. Raw data methods

1.1. Import – Importa os dados das análises por UHPLC-ESI-HRFTMS no formato *.mzXML. Importa os dados de cada modo de ionização separadamente.

1.2. Filtering

1.2.1. Scan by scan filtering

Filter: Savitzky-Golay

Number of datapoints: 5

1.2.2. Baseline correction

Chromatogram type: TIC

MS level: 1

Use m/z bins: TRUE (bin width 0.1)

Correction method: Asymmetric baseline corrector

(smoothing: 1.0E4; asymmetry: 0.001)

1.3. Peak detection

1.3.1. Mass detection

Mass detector: Exact mass

Noise level: 1.0E6

1.3.2. FTMS shoulder peaks filter

Mass resolution = 70,000

Peak model function = Lorentzian

1.3.3. Chromatogram builder

Min time span (min) = 0.3

Min height = 1.1E6

m/z tolerance = 0.005

2. Peak list methods

2.1. Peak detection

2.1.1. Chromatogram deconvolution

Algorithm: Local minimum search

Chromatographic threshold: 5%

Search minimum in RT range (min): 0.2

Minimum relative height: 15%

Minimum absolute height: 1.1E6

Min ratio of peak top/edge: 5

Peak duration range (min): 0.0-1.0

2.2. Isotope

2.2.1. Isotopic peak grouper

m/z tolerance: 0.005 (absolute)

m/z tolerance = 5 ppm (relative)

RT tolerance (absolute, min): 0.6

Maximum charge: 2

Representative isotope: most intense

2.3. Alignment - RANSAC

m/z tolerance: 0.005 (absolute)

m/z tolerance = 5 ppm (relative)

RT tolerance (absolute, min): 30

RT tolerance after correction (absolute, min): 0.6

RANSAC iterations: 2000

Minimum number of points: 20%

Threshold value: 0.5

2.4. Gap filling - Peak finder

Intensity tolerance: 1%

m/z tolerance: 0.005

RT tolerance (absolute, min): 0.6

2.5. Identification

2.5.1 Adduct search

- **For positive mode:**

  [M+H+Na] Δ m/z 21.9825

  [M+H+K] Δ m/z 37.9559

  [M+H+Mg] Δ m/z 21.9694

  [M+H+NH_4] Δ m/z 18.0265

  [M+H+ACN] Δ m/z 41.0270

  RT tolerance: 0.6 min

  m/z tolerance: 0.005 (absolute)

  m/z tolerance = 5 ppm (relative)

  Max relative adduct peak height = 50%

- **For negative mode:**

  [M-H+Cl] Δ m/z 35.9774

  [M-H+ACN] Δ m/z 41.0270

  RT tolerance: 0.6 min

  m/z tolerance: 0.005 (absolute)

  m/z tolerance = 5 ppm (relative)

  Max relative adduct peak height = 50%

2.5.2 Complex search

- **For positive mode:**

  Ionization method: [M+H]+

  RT tolerance: 0.6 min

  m/z tolerance: 0.005 (absolute)

  m/z tolerance = 5 ppm (relative)

  Max complex peak height = 50%

- **For negative mode:**

  Ionization method: [M-H]-

  RT tolerance: 0.6 min

  m/z tolerance: 0.005 (absolute)

  m/z tolerance = 5 ppm (relative)

  Max complex peak height = 50%

2.5.3 Fragment search

RT tolerance: 0.6 min

m/z tolerance: 0.005 (absolute)

m/z tolerance = 5 ppm (relative)

Max complex peak height = 50%

Min MS2 peak height: 1.1E6

2.5.4 Custom database search

Database file: AsterLibI.csv; AsterDB.csv

Field order:

m/z tolerance: 0.005

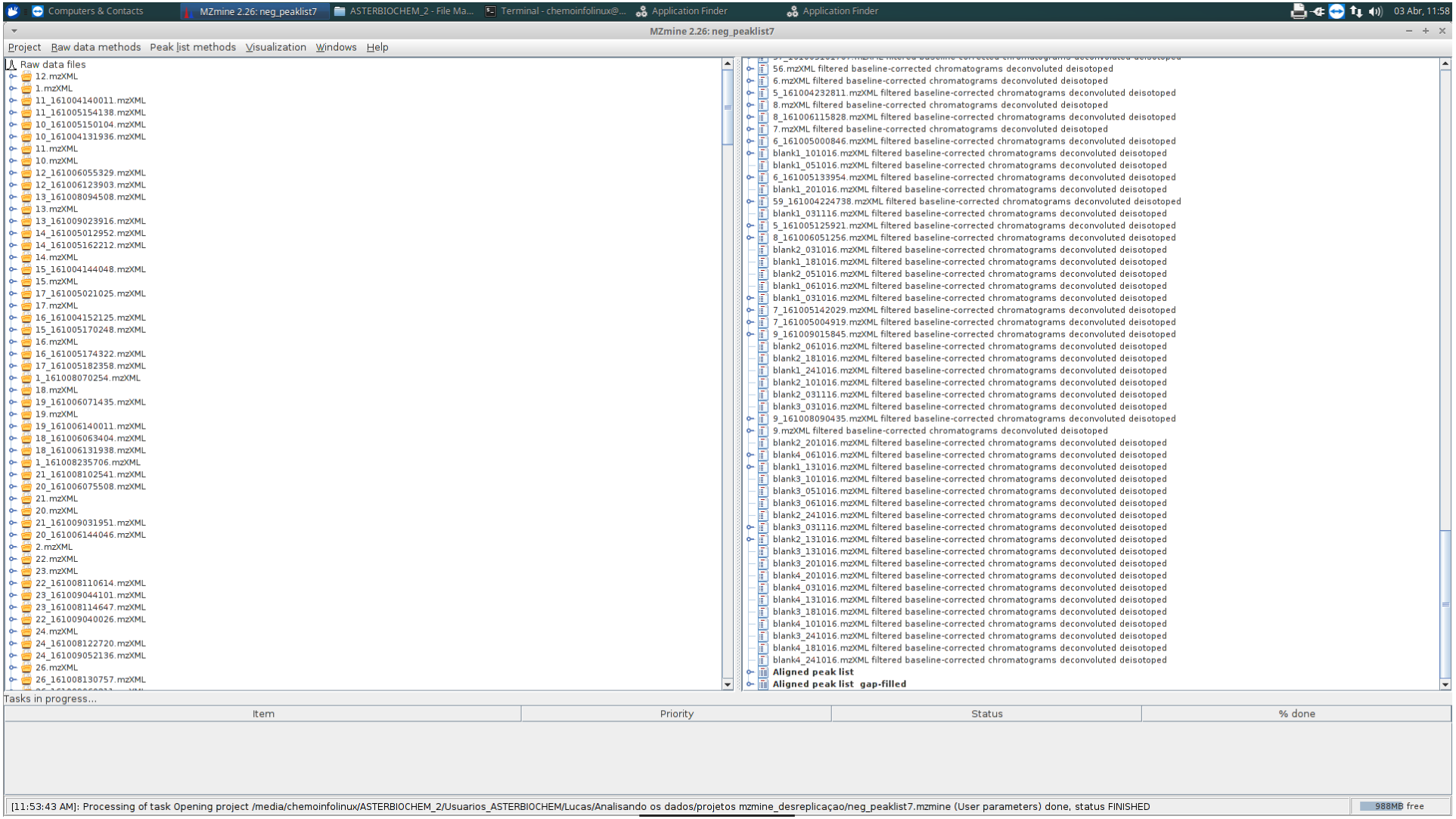
RT tolerance (min): 0.6 (AsterLibI.csv) and 30 min (AsterDB.csv)

2.6. Export

Export to CSV file

Export MZMine ID, m/z, retention time and peak area

APÊNDICE D – Captura de tela da interface gráfica do software MZmine: etapa de processamento dos dados no modo negativo

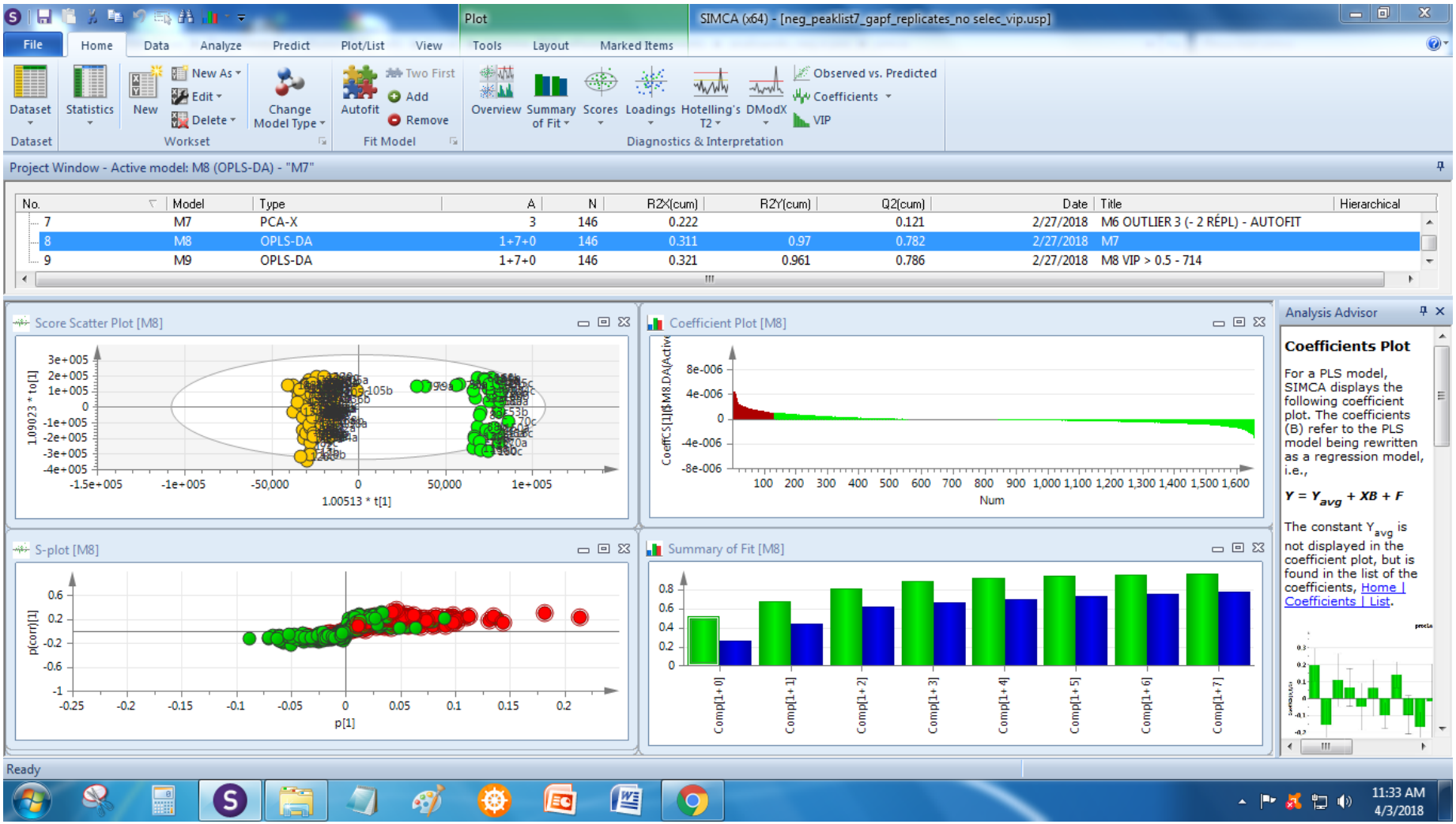


APÊNDICE E – Captura de tela da interface gráfica do software MZmine: lista final dos picos obtidos no processamento dos dados no modo negativo

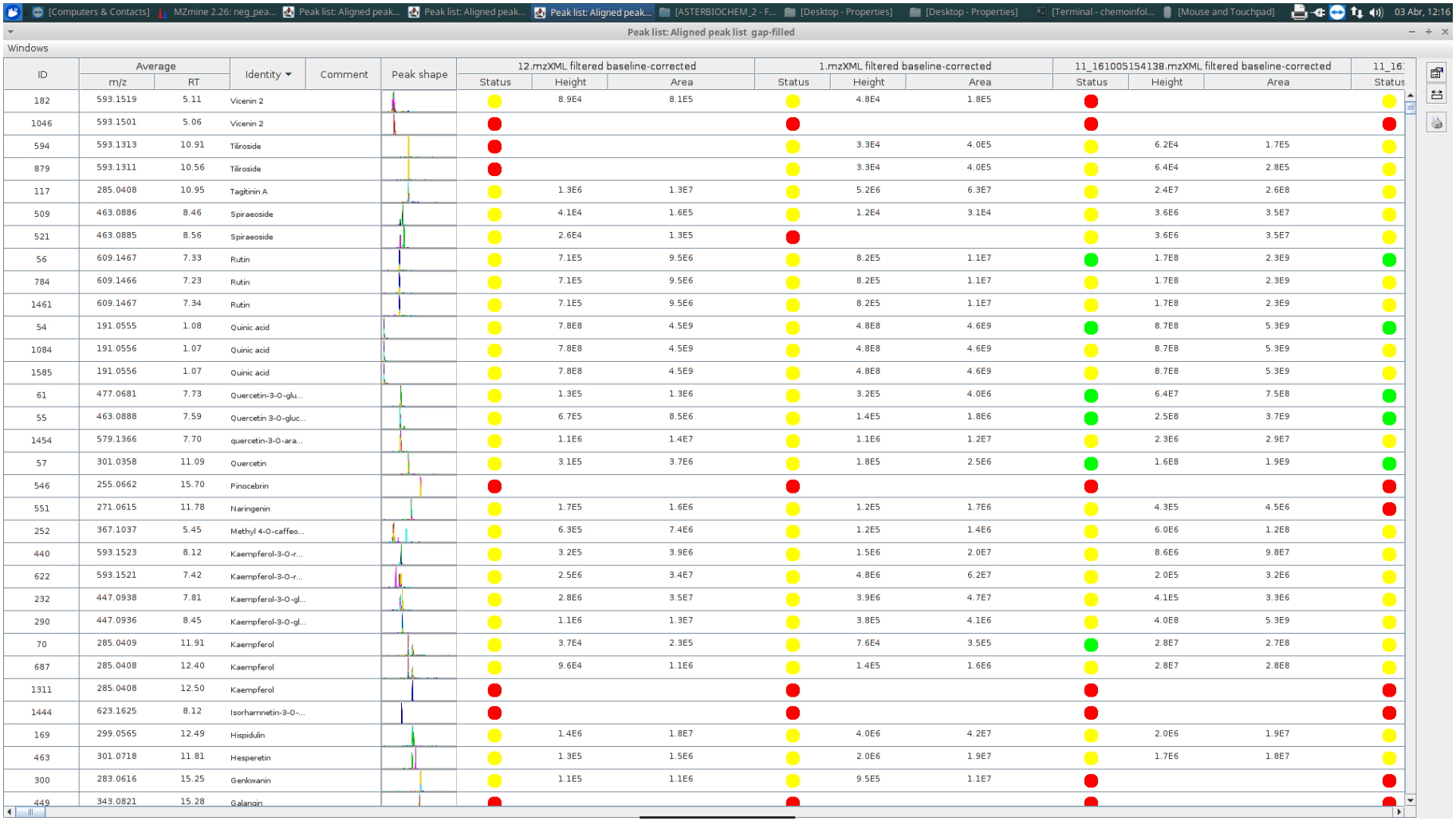
Peak list: Aligned peak list gap-filled

ID	Average		Identity	Comment	Peak shape	12.mzXML filtered baseline-corrected			1.mzXML filtered baseline-corrected			11_161005154138.mzXML filtered baseline-corrected			11_16
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status
1	253.0507	10.26					7.2E8	7.1E9		4.1E8	4.6E9		6.3E8	6.4E9	
2	345.1348	12.72					3.0E8	3.3E9							
3	195.0506	1.11					1.8E8	1.6E9		8.5E7	6.7E8		3.0E8	2.1E9	
4	191.0194	1.21					1.6E8	1.5E9		6.4E7	4.9E8		1.6E8	1.4E9	
5	317.0551	1.18					1.2E8	1.0E9		2.4E7	1.9E8		2.8E7	2.5E8	
6	209.0298	1.21					7.2E7	7.4E8		4.1E6	3.9E7		4.2E6	3.7E7	
7	225.1130	6.56					6.6E7	7.2E8		2.1E7	2.2E8		1.8E7	1.9E8	
8	541.2816	15.32					4.4E7	4.3E8							
9	115.0025	1.13					4.3E7	5.6E8		2.6E7	2.6E8		2.7E7	1.7E8	
10	363.1456	11.00					3.2E7	3.2E8		9.5E4	1.4E6		4.6E4	1.1E5	
11	557.2760	12.39					3.0E7	3.3E8					1.9E4	8.2E4	
12	281.1034	5.65					2.8E7	2.8E8					2.0E4	4.8E4	
13	179.0343	5.31					2.8E7	3.4E8		2.5E7	3.0E8		3.8E7	4.4E8	
14	134.0166	1.13					2.8E7	2.3E8		1.6E7	1.5E8		1.7E7	1.1E8	
15	293.2126	21.09					2.7E7	2.7E8		5.7E7	6.0E8				
16	243.1238	9.02					2.4E7	3.2E8		6.4E6	1.1E8		6.3E6	7.2E7	
17	515.1196	8.80					2.3E7	2.8E8		9.2E7	1.2E9		1.9E8	2.3E9	
18	223.0456	10.15					2.2E7	1.7E8		2.3E4	8.7E4		3.0E4	1.6E5	
19	293.2126	20.91					2.1E7	4.0E8		3.7E7	8.0E8				
20	515.1196	8.47					2.0E7	2.5E8		8.2E7	1.2E9		2.4E8	4.6E9	
21	117.0182	1.27					2.0E7	2.2E8		2.1E7	2.0E8		7.3E6	9.3E7	
22	433.2086	5.89					1.9E7	3.9E8		5.5E6	8.9E7		1.3E6	2.3E7	
23	258.9920	6.18					1.8E7	2.4E8							
24	227.1286	10.73					1.6E7	1.5E8		4.6E4	2.2E5		4.4E4	2.2E5	
25	329.2336	13.10					1.5E7	2.1E8		2.5E7	3.3E8		2.9E7	3.7E8	
26	573.2717	12.91					1.4E7	1.6E8							
27	387.1668	5.69					1.4E7	2.6E8		7.5E6	1.5E8		2.6E7	5.6E8	
28	307.1918	14.83					1.4E7	1.9E8		2.3E7	2.9E8		2.3E5	3.2E6	
29	293.2126	22.02					1.1E7	1.4E8		6.0E7	7.5E8				
30	491.2140	9.31					9.4E6	1.5E8		2.0E4	1.8E5		4.4E5	6.4E6	
31	116.9273	22.71					9.2E6	6.7E7		2.3E6	1.7E7				
32	291.1970	22.34					8.9E6	1.7E8		5.2E7	1.1E9				

APÊNDICE F – Captura de tela da interface gráfica do software SIMCA: análises quimiométricas dos dados no modo negativo



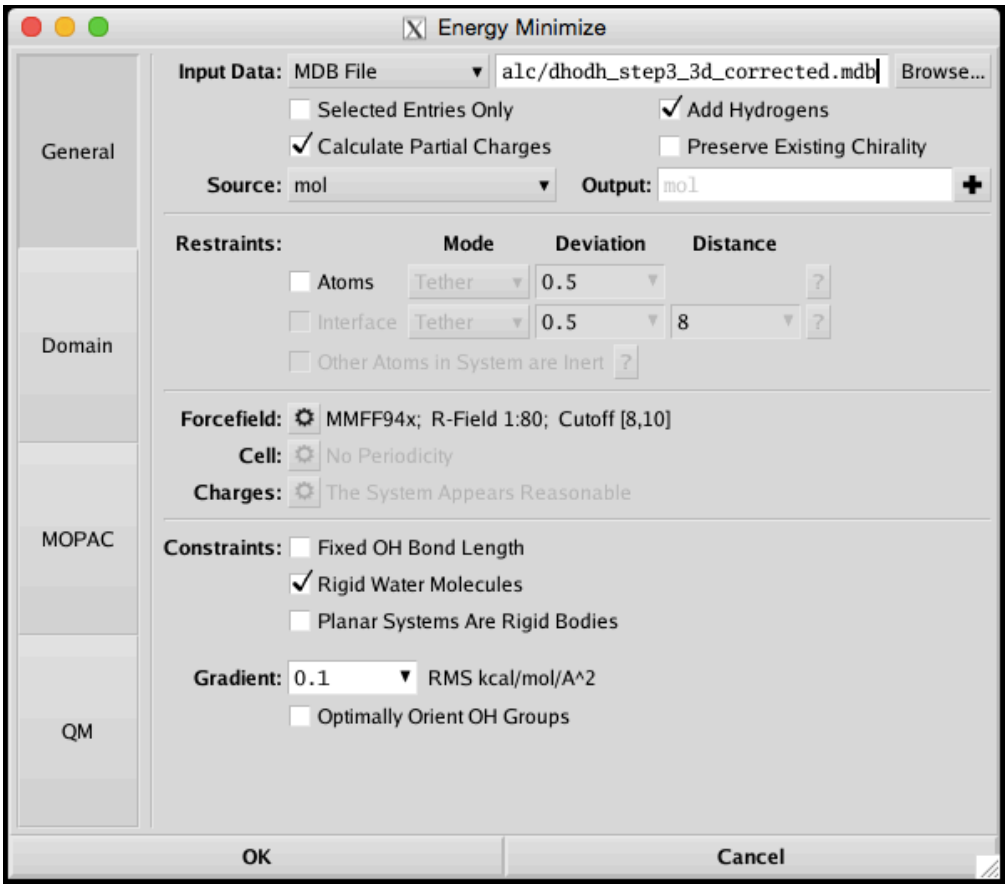
APÊNDICE G – Captura de tela da interface gráfica do software MZmine: etapa de desreplicação dos extratos utilizando a biblioteca de substâncias isoladas de Asteraceae – AsterLib I



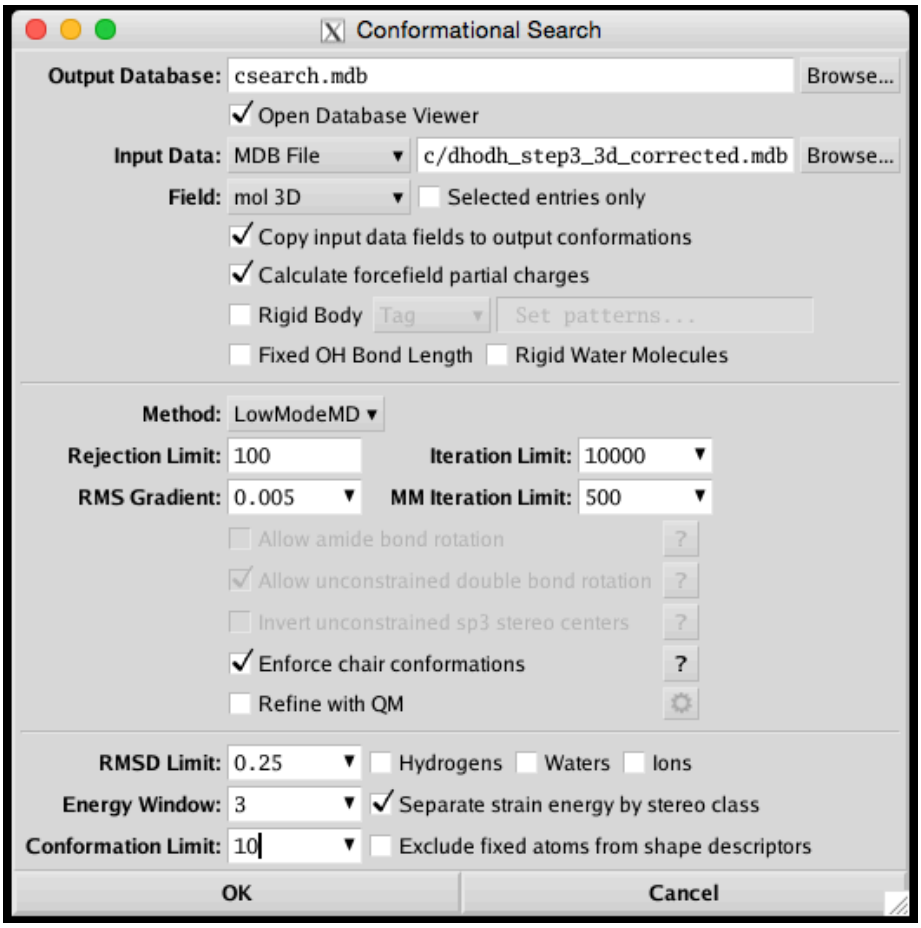
Peak list: Aligned peak list gap-filled

ID	Average m/z	Average RT	Identity	Comment	Peak shape	12.mzXML filtered baseline-corrected Status	Height	Area	1.mzXML filtered baseline-corrected Status	Height	Area	11_161005154138.mzXML filtered baseline-corrected Status	Height	Area	11_16 Status
182	593.1519	5.11	Vicenin 2				8.9E4	8.1E5		4.8E4	1.8E5				
1046	593.1501	5.06	Vicenin 2												
594	593.1313	10.91	Tiliroside							3.3E4	4.0E5		6.2E4	1.7E5	
879	593.1311	10.56	Tiliroside							3.3E4	4.0E5		6.4E4	2.8E5	
117	285.0408	10.95	Tagitinin A				1.3E6	1.3E7		5.2E6	6.3E7		2.4E7	2.6E8	
509	463.0886	8.46	Spiraeoside				4.1E4	1.6E5		1.2E4	3.1E4		3.6E6	3.5E7	
521	463.0885	8.56	Spiraeoside				2.6E4	1.3E5					3.6E6	3.5E7	
56	609.1467	7.33	Rutin				7.1E5	9.5E6		8.2E5	1.1E7		1.7E8	2.3E9	
784	609.1466	7.23	Rutin				7.1E5	9.5E6		8.2E5	1.1E7		1.7E8	2.3E9	
1461	609.1467	7.34	Rutin				7.1E5	9.5E6		8.2E5	1.1E7		1.7E8	2.3E9	
54	191.0555	1.08	Quinic acid				7.8E8	4.5E9		4.8E8	4.6E9		8.7E8	5.3E9	
1084	191.0556	1.07	Quinic acid				7.8E8	4.5E9		4.8E8	4.6E9		8.7E8	5.3E9	
1585	191.0556	1.07	Quinic acid				7.8E8	4.5E9		4.8E8	4.6E9		8.7E8	5.3E9	
61	477.0681	7.73	Quercetin-3-O-glu...				1.3E5	1.3E6		3.2E5	4.0E6		6.4E7	7.5E8	
55	463.0888	7.59	Quercetin 3-O-gluc...				6.7E5	8.5E6		1.4E5	1.8E6		2.5E8	3.7E9	
1454	579.1366	7.70	quercetin-3-O-ara...				1.1E6	1.4E7		1.1E6	1.2E7		2.3E6	2.9E7	
57	301.0358	11.09	Quercetin				3.1E5	3.7E6		1.8E5	2.5E6		1.6E8	1.9E9	
546	255.0662	15.70	Pinocebrin												
551	271.0615	11.78	Naringenin				1.7E5	1.6E6		1.2E5	1.7E6		4.3E5	4.5E6	
252	367.1037	5.45	Methyl 4-O-caffeo...				6.3E5	7.4E6		1.2E5	1.4E6		6.0E6	1.2E8	
440	593.1523	8.12	Kaempferol-3-O-r...				3.2E5	3.9E6		1.5E6	2.0E7		8.6E6	9.8E7	
622	593.1521	7.42	Kaempferol-3-O-r...				2.5E6	3.4E7		4.8E6	6.2E7		2.0E5	3.2E6	
232	447.0938	7.81	Kaempferol-3-O-gl...				2.8E6	3.5E7		3.9E6	4.7E7		4.1E5	3.3E6	
290	447.0936	8.45	Kaempferol-3-O-gl...				1.1E6	1.3E7		3.8E5	4.1E6		4.0E8	5.3E9	
70	285.0409	11.91	Kaempferol				3.7E4	2.3E5		7.6E4	3.5E5		2.8E7	2.7E8	
687	285.0408	12.40	Kaempferol				9.6E4	1.1E6		1.4E5	1.6E6		2.8E7	2.8E8	
1311	285.0408	12.50	Kaempferol												
1444	623.1625	8.12	Isorhamnetin-3-O-...												
169	299.0565	12.49	Hispidulin				1.4E6	1.8E7		4.0E6	4.2E7		2.0E6	1.9E7	
463	301.0718	11.81	Hesperetin				1.3E5	1.5E6		2.0E6	1.9E7		1.7E6	1.8E7	
300	283.0616	15.25	Genkwanin				1.1E5	1.1E6		9.5E5	1.1E7				
449	343.0821	15.28	Galangin												

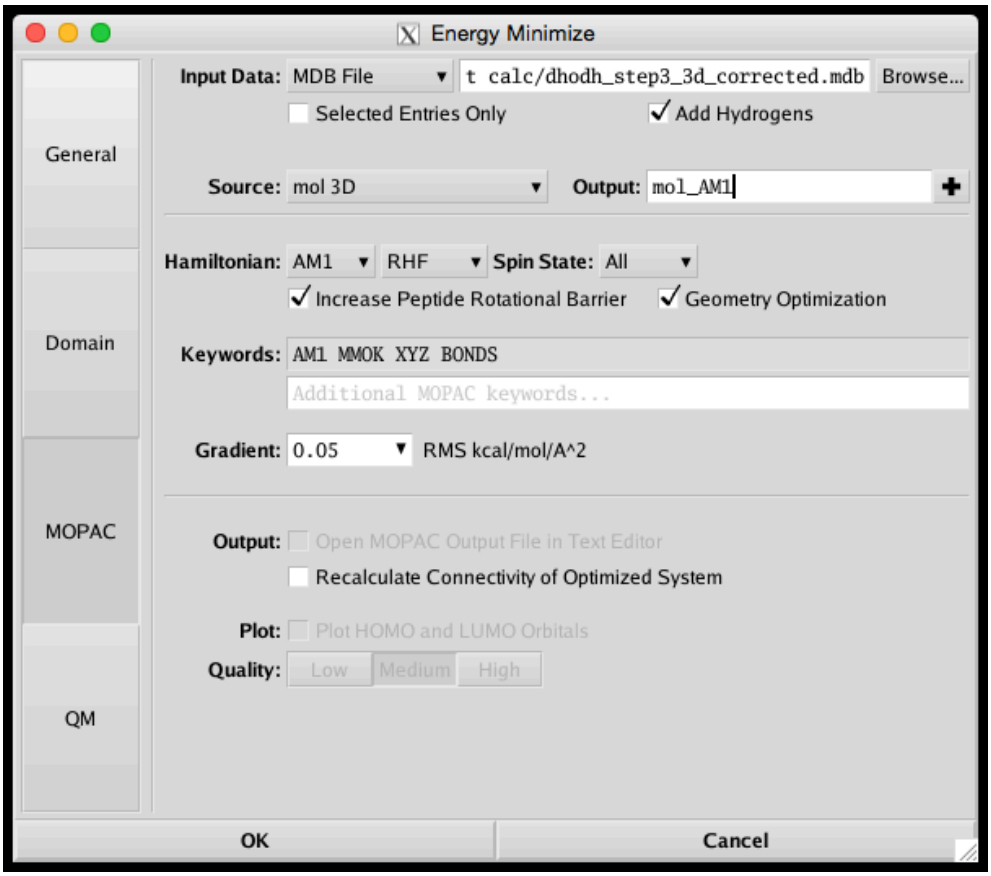
APÊNDICE H – Captura de tela da interface gráfica do software MOE: etapa de minimização da energia por mecânica molecular (MMFF94x)



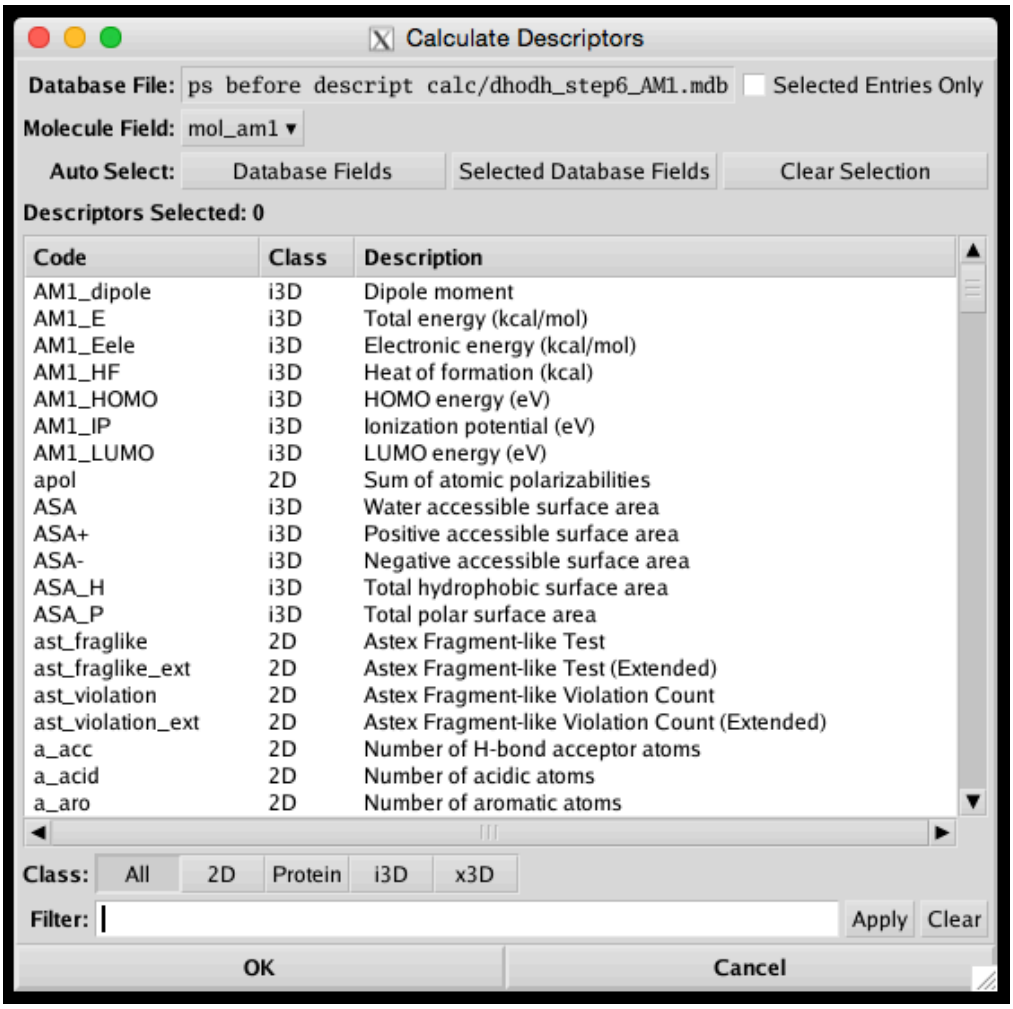
APÊNDICE I – Captura de tela da interface gráfica do software MOE: etapa de análise conformacional (*Low Mode Molecular Dynamics*)



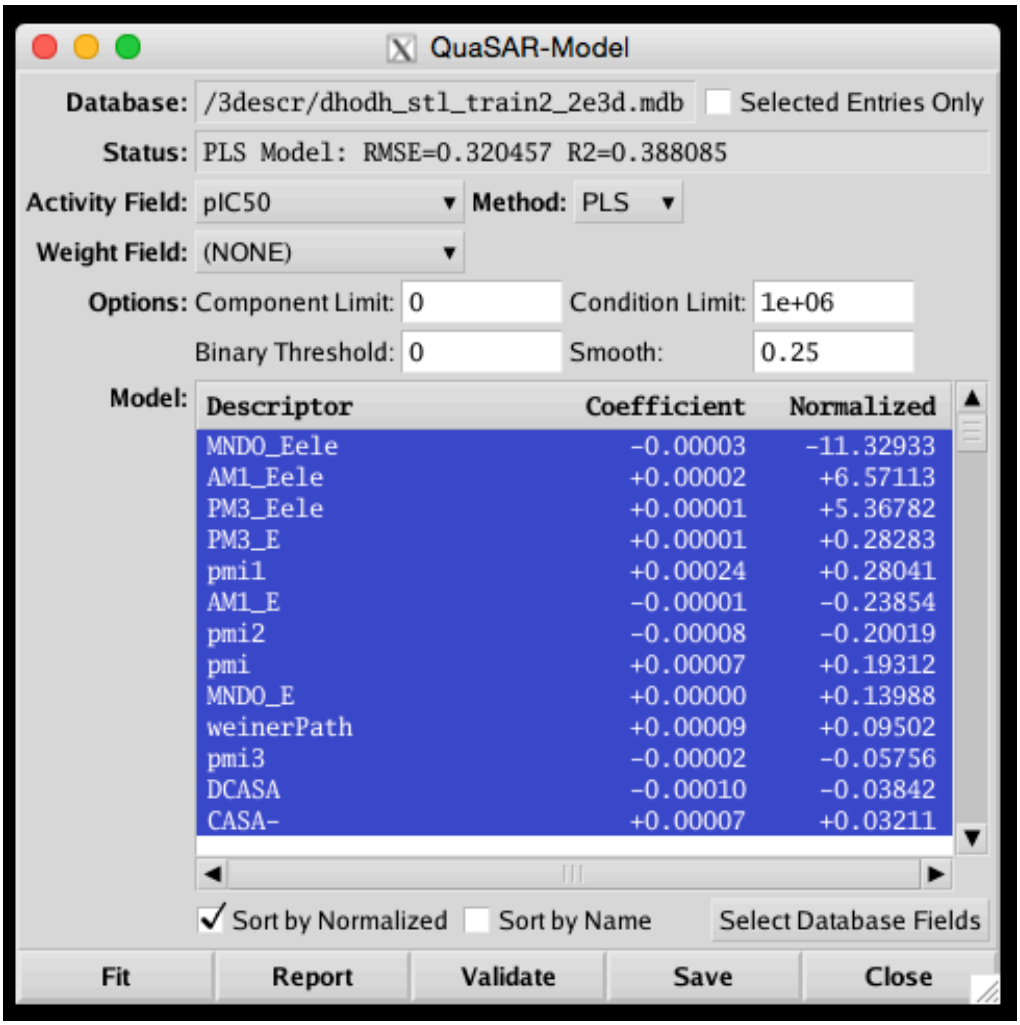
APÊNDICE J – Captura de tela da interface gráfica do software MOE: etapa de minimização da energia por mecânica quântica (MOPAC, AM1)



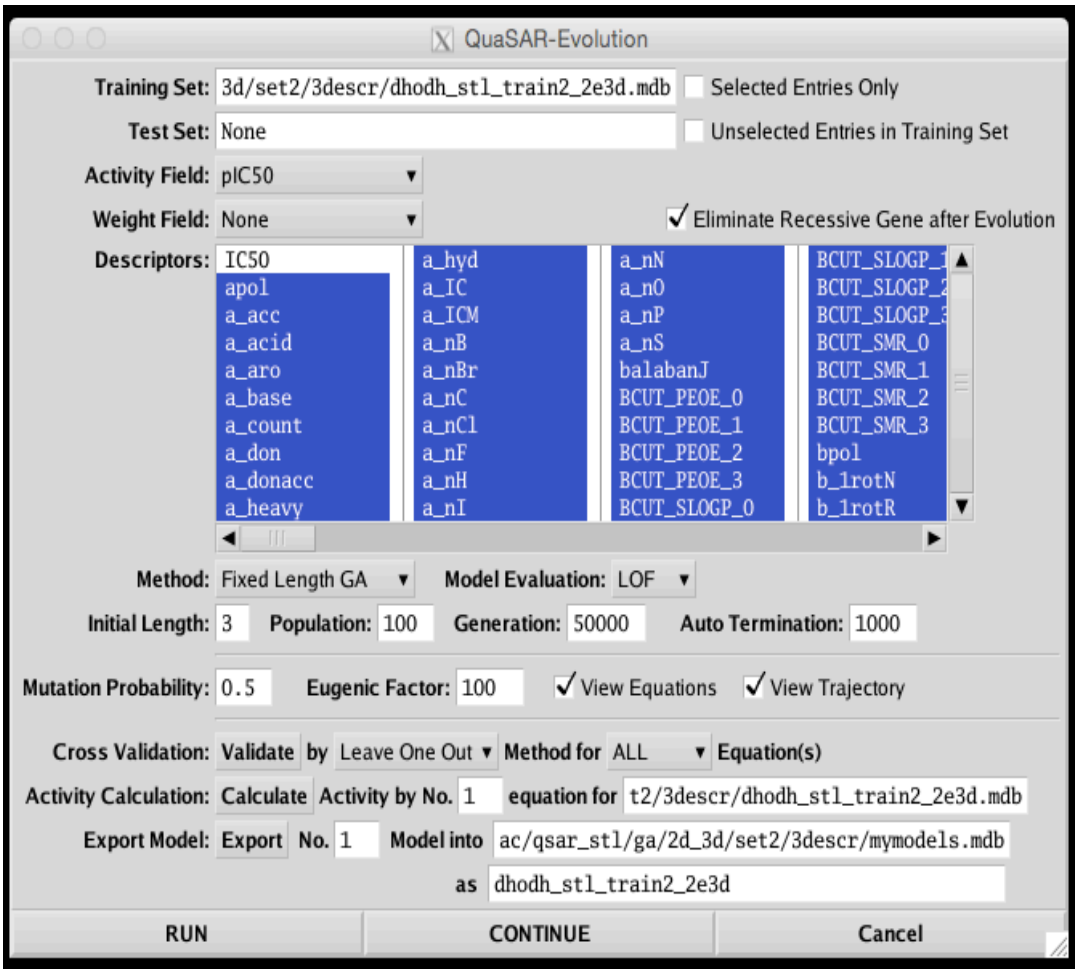
APÊNDICE K – Captura de tela da interface gráfica do software MOE: etapa de cálculo dos descritores 2D e 3D



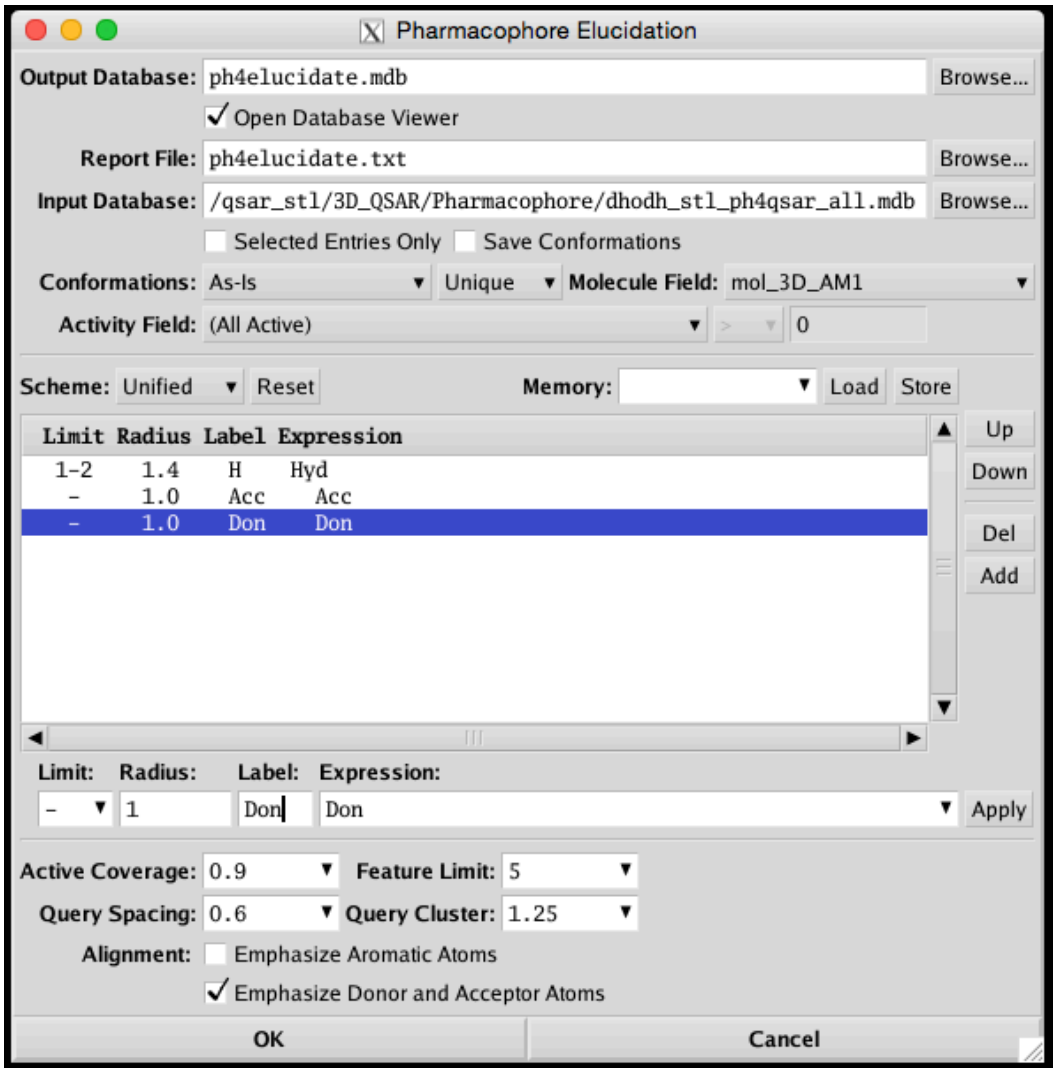
APÊNDICE L – Captura de tela da interface gráfica do software MOE: etapa de calibração (e CV) dos modelos de QSAR por PLS



APÊNDICE M – Captura de tela da interface gráfica do software MOE: etapa de seleção de variáveis por Algoritmo Genético



APÊNDICE N – Captura de tela da interface gráfica do software MOE: etapa de estudo de QSAR-3D baseado em farmacóforos



APÊNDICE O (continua) – Atividade enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH na presença dos extratos de 150 espécies da família Asteraceae

Código	Espécie	Atividade enzimática (%)[a]		
		1.000 µg.mL^{-1}(a)	100 µg.mL^{-1}(b)	10 µg.mL^{-1}(c)
1	*Achillea millefolium* Ledeb.	63 ± 9	69 ± 11	79 ± 6
2	*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.	50 ± 1 ***ab,ac	81 ± 8 ***ab	81 ± 10 ***ab,ac
3	*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen	85 ± 3 ****ab,**ac	100 ± 2 ****ab,**bc	92 ± 2 **ac,**bc
4	*Ageratum conyzoides* L.	62 ± 2 ****ab,****ac	98 ± 3 ****ab,**bc	108 ± 4 ****ac,**bc
5	*Aldama arenaria* Baker	60 ± 5 ****ab,***ac	98 ± 10 ****ab	91 ± 8 ***ac
6	*Aldama bakeriana* (S. F. Blake) E.E. Schill. & Panero	79 ± 5	73 ± 7	71 ± 5
7	*Aldama bracteata* Gardner	64 ± 4 *ac	57 ± 7 *bc	99 ± 17 *ac,bc
8	*Aldama discolor* (Baker) E.E. Schill. & Panero	48 ± 8 **ac	61 ± 2 *bc	86 ± 9 **ac,*bc
9	*Aldama filifolia* Sch. Bip. Ex Baker	82 ± 10	63 ± 7	79 ± 11
10	*Aldama gardneri* (Baker) E.E. Schill. & Panero	82 ± 11	71 ± 4	68 ± 5
11	*Aldama robusta* (Gardner) E.E. Schill. & Panero	51 ± 0 ***ab,ac	77 ± 8 ***ab	86 ± 2 ***ac
12	*Anteremanthus hatschbachii* H. Rob.	69 ± 4 *ab,***ac	81 ± 8 *ab,**bc	104 ± 3 *ab,***ac
13	*Arctium lappa* L.	78 ± 2 ****ac	78 ± 6 ****bc	109 ± 6 ****ac,bc
14	*Arnica montana* L.	73 ± 1 ****ab,ac	97 ± 4 ****ab,***bc	113 ± 4 ****ac,***bc
15	*Artemisia absinthium* L.	54 ± 1***ab,ac	82 ± 1 ***ab	78 ± 10 ***ac
16	*Artemisia annua* L.	43 ± 2 ****ab,ac	92 ± 3 ****ab,*bc	82 ± 6 ****ac,*bc
17	*Baccharis albilanosa* A.S. Oliveira & Deble	94 ± 3 *ab	76 ± 1 *ab	90 ± 13
18	*Baccharis alpina* Kunth	43 ± 1 ****ab,ac	83 ± 4 ****ab	85 ± 9 ****ac
19	*Baccharis angustifolia* Michx.	85 ± 5	87 ± 4	94 ± 4
20	*Baccharis aphylla* (Vell.) DC.	66 ± 5 ***ac	59 ± 3 ***bc	97 ± 9 ***ac,bc
21	*Baccharis bicolor* (Joch.Müll.) G. Heiden	68 ± 3 *ac	77 ± 7	92 ± 9 *ac
22	*Baccharis boliviensis* (Wedd.) Cabrera	72 ± 8	59 ± 5 *bc	77 ± 7 *bc
23	*Baccharis buchtienii* H. Rob.	64 ± 7 *ac	76 ± 7	88 ± 14 *ac
24	*Baccharis caespitosa* (Ruiz & Pav.) Pers.	71 ± 7	100 ± 9	92 ± 13
25	*Baccharis cenicienta* DC.	38 ± 7 ***ab,****ac	82 ± 8 ***ab,*bc	104 ± 3 ****ac,*bc
26	*Baccharis ciliata* Gardner	55 ± 6 *ab,**ac	82 ± 7 *ab	105 ± 17 **ac

APÊNDICE O (continuação) – Atividade enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH na presença dos 150 extratos de espécies de Asteraceae

Código	Espécie	Atividade enzimática (%)[a]		
		1.000 µg.mL^{-1}(a)	100 µg.mL^{-1}(b)	10 µg.mL^{-1}(c)
27	*Baccharis crispa* Spreng.	79 ± 7	91 ± 7	79 ± 6
28	*Baccharis densiflora* Wedd.	61 ± 5 ^{***ac}	73 ± 6 ^{**bc}	106 ± 11 ^{***ac,**bc}
29	*Baccharis dracunculifolia* DC.	57 ± 6 ^{**ab,ac}	84 ± 9 ^{**ab}	93 ± 5 ^{**ac}
30	*Baccharis floripa* DC.	55 ± 7 ^{**ab,ac}	84 ± 11 ^{**ab}	83 ± 3 ^{**ac}
31	*Baccharis glaziovii* Baker	33 ± 1 ^{****ab,ac}	88 ± 4 ^{****ab,bc}	116 ± 5 ^{****ac,bc}
32	*Baccharis grisebachii* Hieron.	71 ± 9 ^{*ac}	89 ± 12	103 ± 15 ^{*ac}
33	*Baccharis halimifolia* L.	56 ± 8 ^{*ac}	79 ± 11	91 ± 12 ^{*ac}
34	*Baccharis incarum* (Wedd.) Perkins	75 ± 7 ^{*ac}	94 ± 14	101 ± 7 ^{*ac}
35	*Baccharis jelskii* Hieron.	71 ± 10	91 ± 6	92 ± 14
36	*Baccharis lychnophora* Gardner	75 ± 9 ^{**ab,ac}	98 ± 5 ^{**ab}	108 ± 8 ^{**ac}
37	*Baccharis nitida* (Ruiz & Pav.) Pers.	76 ± 6	81 ± 7	72 ± 8
38	*Baccharis organensis* Baker	29 ± 2 ^{****ab,ac}	88 ± 3 ^{****ab}	90 ± 4 ^{****ac}
39	*Baccharis papillosa* Rusby	55 ± 9 ^{*ac}	65 ± 4	80 ± 10 ^{*ac}
40	*Baccharis papillosa* Rusby subsp. *longipedicellata* Joch. Müller	53 ± 5 ^{*ab,ac}	73 ± 7 ^{*ab}	69 ± 8 ^{*ac}
41	*Baccharis pilularis* DC.	43 ± 5 ^{**ab,ac}	74 ± 7 ^{**ab}	69 ± 8 ^{**ac}
42	*Baccharis plummerae* A. Gray	64 ± 6 ^{*ab,***ac}	89 ± 10 ^{*ab,bc}	118 ± 11 ^{***ac,*bc}
43	*Baccharis quitensis* Kunth	78 ± 5 ^{*ac}	97 ± 7	106 ± 17 ^{*ac}
44	*Baccharis rodriguezii* Ariza	83 ± 13 ^{*ab,ac}	108 ± 4 ^{*ab}	110 ± 13 ^{*ac}
45	*Baccharis sergiloides* A. Gray	58 ± 8 ^{**ab,***ac}	90 ± 5 ^{**ab,*bc}	113 ± 11 ^{***ac,*bc}
46	*Baccharis stylosa* Gardner	45 ± 2 ^{**ab,***ac}	88 ± 13 ^{**ab}	102 ± 9 ^{***ac}
47	*Baccharis tola* Phil.	78 ± 5 ^{*ab,ac}	108 ± 11 ^{*ab}	106 ± 11 ^{*ac}
48	*Baccharis trimera* (Less.) DC.	45 ± 6 ^{****ab,ac}	104 ± 5 ^{****ab,**bc}	86 ± 4 ^{****ac,**bc}
49	*Baccharis trinervis* (Lam.) Pers.	76 ± 8 ^{**ab}	110 ± 9 ^{**ab}	93 ± 7
50	*Baccharis umbellata* G. Heiden & Ribas	49 ± 7 ^{***ab,**ac}	92 ± 3 ^{***ab}	88 ± 10 ^{**ac}
51	*Baccharis urvilleana* Brongn.	67 ± 4 ^{*ab,***ac}	94 ± 2 ^{*ab}	117 ± 14 ^{***ac}
52	*Baccharis wrightii* A. Gray	78 ± 6 ^{*ac}	74 ± 8 ^{*bc}	95 ± 5 ^{*ac,bc}

APÊNDICE O (continuação) – Atividade enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH na presença dos 150 extratos de espécies de Asteraceae

Código	Espécie	Atividade enzimática (%)[a]		
		1.000 µg.mL^{-1}(a)	100 µg.mL^{-1}(b)	10 µg.mL^{-1}(c)
53	*Bidens pilosa* L.	54 ± 4 **ab,*ac	89 ± 11 **ab	86 ± 12 *ac
54	*Blanchetia heterotricha* DC.	60 ± 6 *ac	62 ± 10	79 ± 7 *ac
55	*Calea cuneifolia* DC.	51 ± 8 ***ab,****ac	85 ± 4 ***ab,**bc	102 ± 5 ****ac,**bc
56	*Chresta angustifolia* Gardner	61 ± 6 **ab,ac	95 ± 8 **ab	95 ± 5 **ac
57	*Chresta curumbensis* (Philipson) H. Rob.	58 ± 5 ***ab,****ac	71 ± 7 ***ab,****bc	88 ± 7 ****ac,****bc
58	*Chresta exsucca* DC.	59 ± 5 **ab,***ac	90 ± 7 **ab	101 ± 7 ***ac
59	*Chresta harleyi* H. Rob.	25 ± 3 **ab,ac	80 ± 12 **ab	84 ± 16 **ac
60	*Chresta hatschbachii* H. Rob.	55 ± 8 ****ab,ac	98 ± 14 ****ab	102 ± 12 ****ac
61	*Chresta martii* (DC.) H. Rob.	57 ± 8 **ab,****ac	61 ± 6 **ab,**bc	76 ± 8 ****ac,**bc
62	*Chresta phylicifolia* (nova spp)	54 ± 5 **ab,ac	80 ± 7 **ab	79 ± 10 **ac
63	*Chresta plantaginifolia* (Less.) Gardner	76 ± 12	96 ± 10	100 ± 9
64	*Chresta pycnocephala* DC.	40 ± 4 *ab,**ac	83 ± 5 *ab	91 ± 13 **ac
65	*Chresta scapigera* (Less.) Gardner	40 ± 6 *ab,***ac	62 ± 7 *ab,*bc	89 ± 11 ***ac,*bc
66	*Chresta scapigera x C. pycnocephala* (híbrido)	53 ± 9 **ab,***ac	78 ± 9 **ab,*bc	95 ± 16 ***ac,*bc
67	*Chresta souzae* H. Rob.	24 ± 5 ****ab,ac	77 ± 7 ****ab,*bc	89 ± 9 ****ac,*bc
68	*Chresta speciosa* Gardner	37 ± 8 **ac	62 ± 7	100 ± 19 **ac
69	*Chresta sphaerocephala* DC.	53 ± 10 *ab,ac	76 ± 10 *ab	75 ± 5 *ac
70	*Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC.	26 ± 0 ****ab,ac	75 ± 1 ****ab,bc	98 ± 7 ****ac,bc
71	*Chuquiraga spinosa* Less.	61 ± 7	79 ± 12	65 ± 10
72	*Cichorium intybus* L.	83 ± 5 **ab	73 ± 1 **ab,*bc	79 ± 1 **bc
73	*Cynara scolymus* L.	53 ± 8 **ab,*ac	95 ± 13 **ab	86 ± 4 *ac
74	*Dasyphyllum brasiliensis* var. *latifolium* (D. Don) Cabrera	50 ± 0 ****ab,ac	84 ± 0 ****ab	91 ± 8 ****ac
75	*Dasyphyllum spinensis* (D. Don) Cabrera	66 ± 4	55 ± 8	54 ± 8
76	*Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera	76 ± 9	76 ± 4	78 ± 9
77	*Dasyphyllum varians* (Gardner) Cabrera	114 ± 3 *ab	73 ± 3 *ab	96 ± 16
78	*Echinacea purpurea* (L.) Moench	72 ± 7 **ab,*ac	88 ± 2 **ab	85 ± 5 *ac

APÊNDICE O (continuação) – Atividade enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH na presença dos 150 extratos de espécies de Asteraceae

Código	Espécie	Atividade enzimática (%)[a]		
		1.000 µg.mL^{-1}(a)	100 µg.mL^{-1}(b)	10 µg.mL^{-1}(c)
79	*Emilia sonchifolia* L. DC.	24 ± 1 ****ab,****ac	75 ± 5 ****ab,**bc	88 ± 4 ****ac,**bc
80	*Eremanthus argenteus* MacLeish & H. Schumach	48 ± 2 ***ab,**ac	101 ± 9 ***ab	82 ± 11 **ac
81	*Eremanthus auriculatus* MacLeish & H. Schumach	73 ± 9 **ac	74 ± 3 **bc	123 ± 17 **ac,bc
82	*Eremanthus brevifolius* Loeuille sp. nov	32 ± 6 *ab,****ac	21 ± 3 *ab,****bc	93 ± 4 ****ac,bc
83	*Eremanthus capitatus* (Spreng.) MacLeish	33 ± 2 **ab,***ac	73 ± 9 **ab,*bc	91 ± 4 ***ac,*bc
84	*Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch. Bip	67 ± 4 **ac	61 ± 9 **bc	98 ± 11 **ac,bc
85	*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish	129 ± 5 **ab,***ac	97 ± 7 **ab	94 ± 3 ***ac
86	*Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch. Bip	62 ± 5 **ab,*ac	98 ± 7 **ab	86 ± 9 *ac
87	*Eremanthus incanus* (Less.) Less	50 ± 8 **ac	66 ± 10	77 ± 6 **ac
88	*Eremanthus pabstii* G.M. Barroso	69 ± 5	63 ± 9 *bc	82 ± 8 *bc
89	*Eremanthus polycephalus* (DC.) MacLeish	49 ± 8 *ab,**ac	67 ± 7 *ab	79 ± 7 **ac
90	*Eremanthus uniflorus* MacLeish & H. Schumach	49 ± 6 **ab,ac	92 ± 11 **ab	79 ± 10 **ac
91	*Eremanthus veadeiroensis* H. Rob	96 ± 0 ****ab,*ac	136 ± 4 ****ab,bc	85 ± 8 *ac,****bc
92	*Espeletia barclayana* Cuatrec.	50 ± 3 **ab,ac	95 ± 9 **ab	97 ± 12 **ac
93	*Espeletia cayetana* Cuatrec.	46 ± 3 ****ab,****ac	98 ± 5 ****ab	93 ± 1 ****bc
94	*Espeletia curialensis* Cuatrec.	125 ± 19 *ab,**ac	94 ± 6 *ab	80 ± 9 **ac
95	*Espeletia estanislana* Cuatrec.	19 ± 4 ****ac	30 ± 5 ***bc	74 ± 9 ****ac,***bc
96	*Espeletia frontinoensis* Cuatrec.	53 ± 9 **ac	78 ± 8	98 ± 16 **ac
97	*Espeletia garciae* Cuatrec.	34 ± 3 *ab,**ac	70 ± 6 *ab	100 ± 12 **ac
98	*Espeletia monguana* sp. nov. Diazgranados	48 ± 8 **ac	74 ± 8 *bc	104 ± 17 **ac,*bc
99	*Espeletia murilloi* var. nov. Cuatrec. var. *iguaquei* Diagranados	42 ± 4 **ab,***ac	79 ± 8 **ab,*bc	100 ± 7 ***ac,*bc
100	*Espeletia schultzii* Wedd.	54 ± 8 *ab,ac	95 ± 11 *ab	94 ± 14 *ac
101	*Espeletia semiglobulata* Cuatrec.	34 ± 11 *ab,**ac	75 ± 16 *ab	88 ± 9 **ac
102	*Gorceixia decurrens* Baker	37 ± 2 ****ab,ac	63 ± 1 ****ab,bc	94 ± 4 ****ac,bc
103	*Heterocoma ekmaniana* (Philipson) Lueville, J. N. Nakaj. & Semir	84 ± 12	87 ± 5	94 ± 9
104	*Heterocoma gracilis* Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir sp. nov	29 ± 5 ****ab,ac	70 ± 6 ****ab,*bc	82 ± 3 ****ac,*bc

APÊNDICE O (continuação) – Atividade enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH na presença dos 150 extratos de espécies de Asteraceae

Código	Espécie	Atividade enzimática (%)[a]		
		1.000 µg.mL^{-1}(a)	100 µg.mL^{-1}(b)	10 µg.mL^{-1}(c)
105	*Lactuca sativa* L.	75 ± 3	84 ± 10	73 ± 3
106	*Lychnophora ericoides* Mart.	47 ± 3 *ab,**ac	71 ± 6 *ab	83 ± 9 **ac
107	*Lychnophora markgravii* G.M. Barroso	53 ± 6 *ac	60 ± 5	70 ± 9 *ac
108	*Lychnophora mellobarretoi* G.M. Barroso	56 ± 7 *ab,ac	75 ± 7 *ab	78 ± 8 *ac
109	*Lychnophora passerina* (Mart. ex DC.) Gardner	50 ± 1 **ab,****ac	70 ± 8 **ab,***bc	98 ± 6 ****ac,***bc
110	*Lychnophora salicifolia* Mart.	31 ± 7 **ab,****ac	73 ± 8 **ab,bc	124 ± 13 ****ac,**bc
111	*Lychnophora santosii* H. Rob.	63 ± 5 **ac	77 ± 7 *bc	98 ± 8 **ac,*bc
112	*Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	28 ± 6 ***ab,ac	78 ± 3 ***ab	95 ± 12 ***ac
113	*Matricaria chamomilla* L.	92 ± 3 **ab,ac	102 ± 1 **ab	100 ± 4 **ac
114	*Mikania aff. burchelli*	45 ± 5 ***ab,****ac	91 ± 11 ***ab,*bc	112 ± 3 ****ac,*bc
115	*Mikania angularis* Humb. & Bonpl.	66 ± 5 **ab,ac	92 ± 5 **ab	92 ± 9 **ac
116	*Mikania cordifolia* (L.f.) Willd.	60 ± 7 **ab,ac	88 ± 6 **ab	88 ± 4 **ac
117	*Mikania glomerata* Sprengel	54 ± 5 **ab,***ac	91 ± 10 **ab	107 ± 12 ***ac
118	*Mikania hirsutissima* DC.	77 ± 9 **ac	87 ± 7 **bc	122 ± 9 **ac,bc
119	*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker	66 ± 1	78 ± 5	71 ± 10
120	*Mikania psilostachya* DC.	61 ± 3 *ab,***ac	76 ± 4 *ab,**bc	100 ± 7 ***ac,**bc
121	*Mikania sessilifolia* DC.	31 ± 6 **ab,***ac	78 ± 3 **ab	89 ± 16 ***ac
122	*Mikania* sp	82 ± 11	92 ± 12	97 ± 9
123	*Mikania thapsoides* DC.	51 ± 3 ***ac	74 ± 6 **bc	116 ± 17 ***ac,**bc
124	*Mikania triangularis* Baker	71 ± 5 **ab	102 ± 7 **ab,*bc	78 ± 9 *bc
125	*Minasia scapigera* H. Rob.	65 ± 9 ***ab,ac	90 ± 0 ***ab	88 ± 2 ***ac
126	*Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. Hind	34 ± 4 **ab,***ac	67 ± 11 **ab,*bc	89 ± 4 ***ac,*bc
127	*Paralychnophora bicolor* (DC.) MacLeish	33 ± 1 ****ab,ac	76 ± 1 ****ab,***bc	95 ± 6 ****ac,**bc
128	*Piptolepis monticola* Loeuille sp. nov	62 ± 4 ***ab,****ac	83 ± 7 ***ab,****bc	108 ± 1 ****ac,bc
129	*Piptolepis schultziana* Loeuille & D.J.N. Hind: Brazil	41 ± 7 *ab	70 ± 10 *ab	62 ± 10
130	*Pluchea quitoc* D.C.	64 ± 2 ***ac	67 ± 5 **bc	80 ± 1 ***ac,**bc

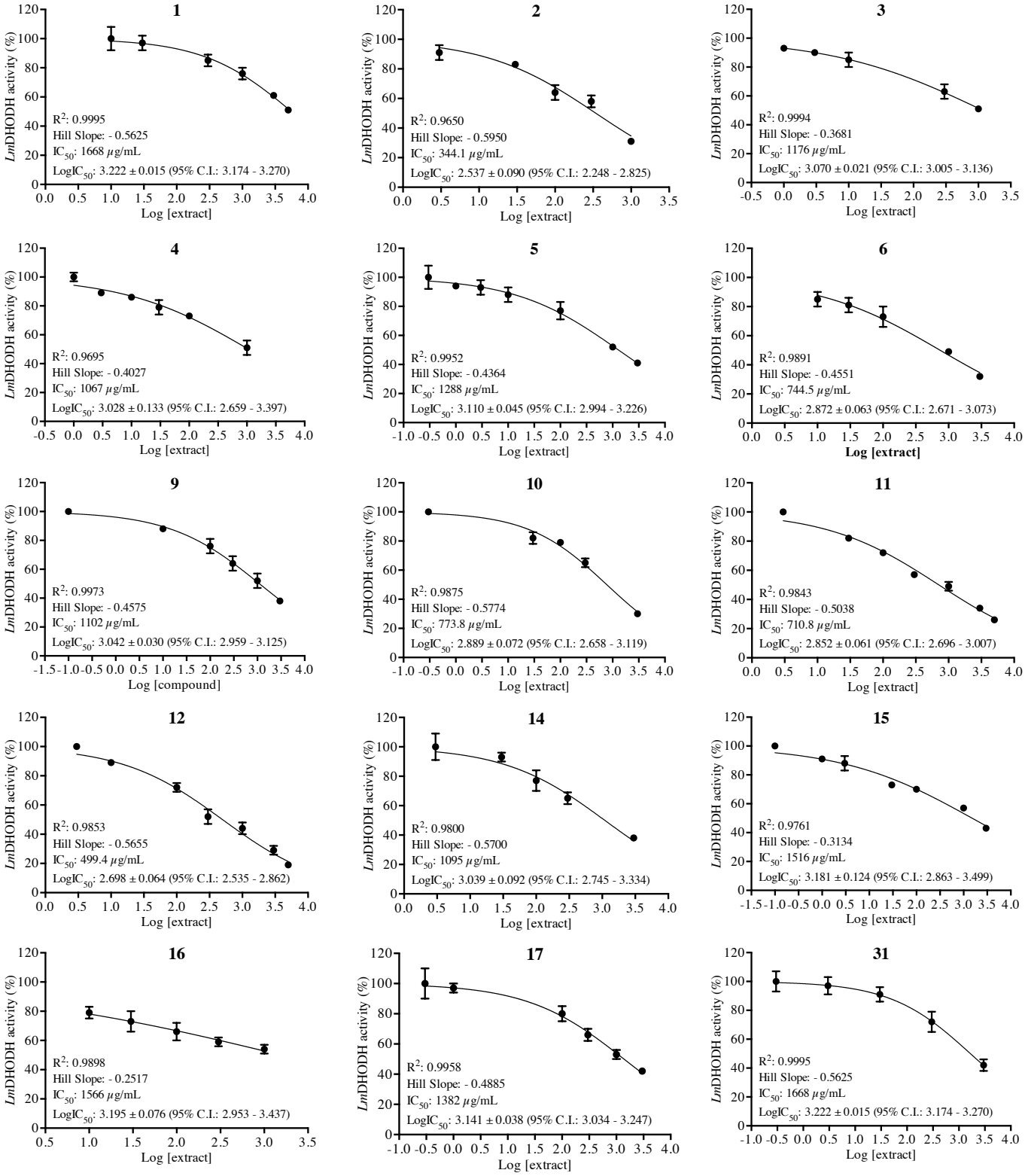
APÊNDICE O (conclusão) – Atividade enzimática *in vitro* de *Lm*DHODH na presença dos 150 extratos de espécies de Asteraceae

Código	Espécie	Atividade enzimática (%)[a]		
		1.000 µg.mL^{-1}(a)	100 µg.mL^{-1}(b)	10 µg.mL^{-1}(c)
131	*Prestelia eriopus* Sch. Bip.	58 ± 10	52 ± 9	78 ± 11
132	*Proteopsis argentea* Mart. & Zucc. ex Sch. Bip.	60 ± 7 **ab	97 ± 6 **ab,bc	49 ± 10 **bc
133	*Proteopsis hermogenesii* sp. Ined.	62 ± 2 *ab,***ac	68 ± 4 *ab,**bc	77 ± 1 ***ac,**bc
134	*Schlechtendalia luzulaefolia* Less.	51 ± 5 **ab,ac	81 ± 7 **ab	76 ± 7 **ac
135	*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson	51 ± 0 ****ab,ac	82 ± 1 ****ab,bc	104 ± 5 ****ac,bc
136	*Soaresia velutina* Sch. Bip.	82 ± 16 *ac	73 ± 5 *bc	116 ± 14 *ac,bc
137	*Solidago chilensis* Meyen	66 ± 6 **ab,***ac	105 ± 12 **ab	124 ± 10 ***ac
138	*Solidago microglossa* DC.	61 ± 1 **ab,****ac	64 ± 1 **ab,****bc	72 ± 0 ****ac,bc
139	*Sonchus oleraceus* L.	72 ± 4 **ab,****ac	81 ± 1 **ab,***bc	97 ± 1 ****ac,***bc
140	*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruskei	55 ± 1 ****ac	62 ± 3 ***bc	93 ± 10 ****ac,***bc
141	*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni	116 ± 10	107 ± 9	87 ± 9
142	*Tanacetum parthenium* L.	73 ± 7	87 ± 8	73 ± 10
143	*Taraxacum officinale* Weber ex FH Wigg.	78 ± 2 **ac	75 ± 4 ***bc	92 ± 5 **ac,***bc
144	*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray	93 ± 8	81 ± 8	75 ± 6
145	*Tridax procumbens* L.	28 ± 2 ****ab,ac	63 ± 5 ****ab,bc	91 ± 8 ****ac,bc
146	*Vernonanthura beyrichii* (Less.) H. Rob.	42 ± 8 ***ab,**ac	88 ± 11 ***ab	84 ± 7 **ac
147	*Vernonanthura brasiliana* (L.) H. Rob.	72 ± 5 **ab,***ac	90 ± 7 **ab	102 ± 8 ***ac
148	*Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip ex Walp.	105 ± 11 **ab,*ac	66 ± 7 **ab	74 ± 8 *ac
149	*Chrysolaena platensis* (Spreng.) H. Rob.	154 ± 16 **ab,***ac	88 ± 7 **ab	68 ± 10 ***ac
150	*Vernonanthura polyanthes* (Spreng.) A.J. Vega & M. Dematt.	94 ± 15	90 ± 15	78 ± 9

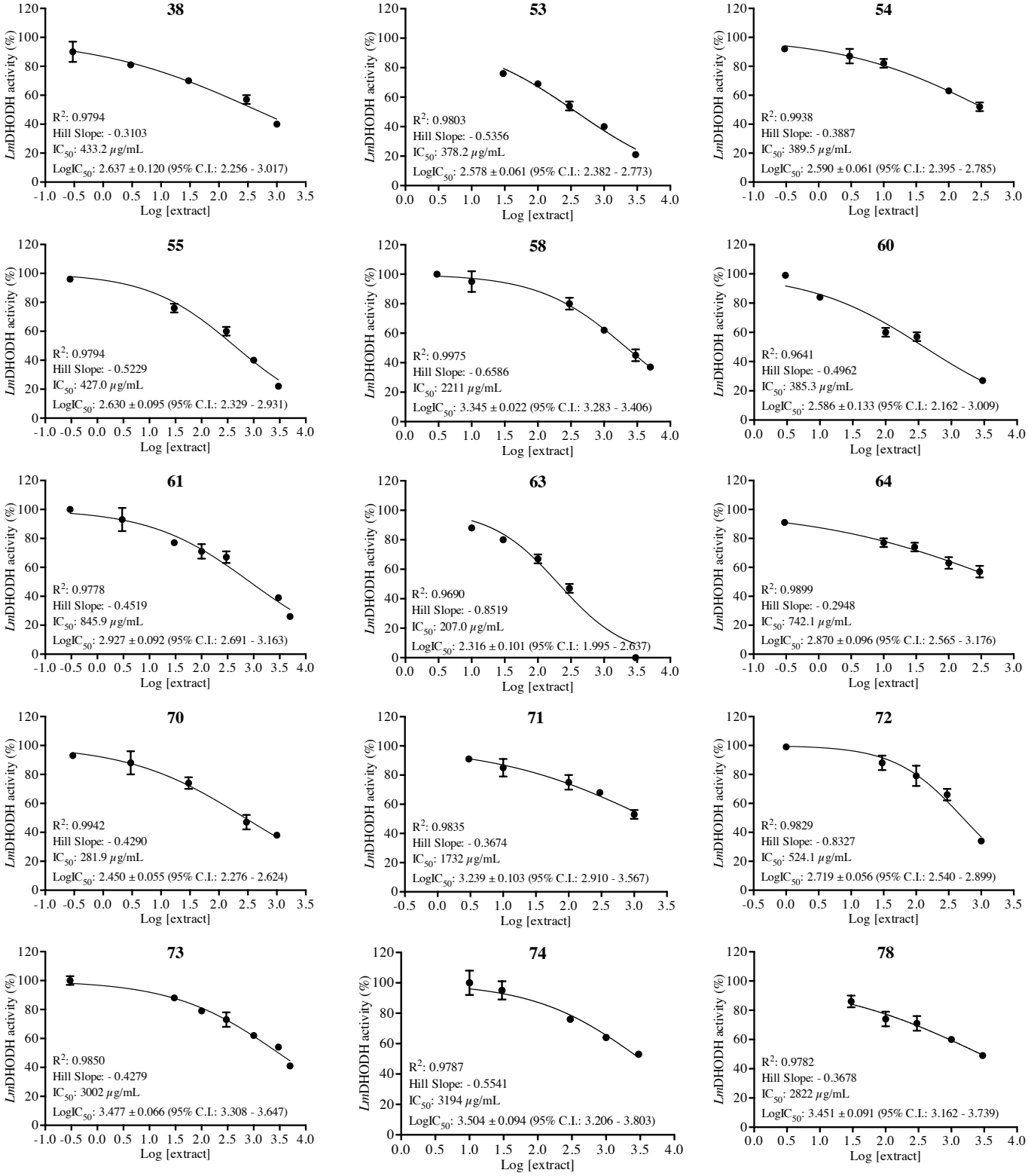
Fonte: o próprio autor.

[a]Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração testada, de modo que os valores de atividade enzimática (%) correspondem à média ± desvio padrão. (a), (b) e (c) trata-se do extratos na concentração de 1000, 100 e 10 µg/mL, respectivamente. Para cada extrato, ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01 e *p < 0,05 representa o nível de significância da diferença estatística existente entre os valores de %atividade entre as 3 concentrações testadas (a, b e c). ANOVA seguida pelo teste de Tukey como pós-teste (*post-hoc*).

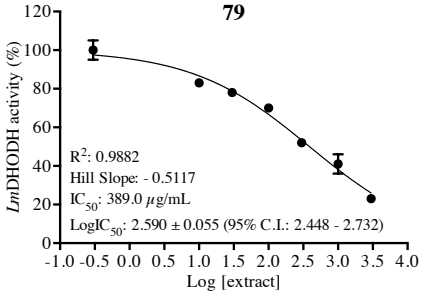
APÊNDICE P (continua) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração dos extratos, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} dos extratos

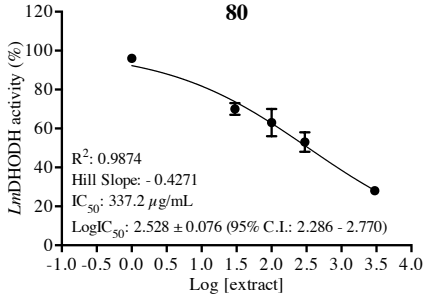


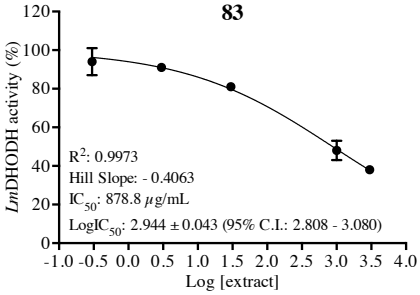
APÊNDICE P (continuação) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração dos extratos, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} dos extratos

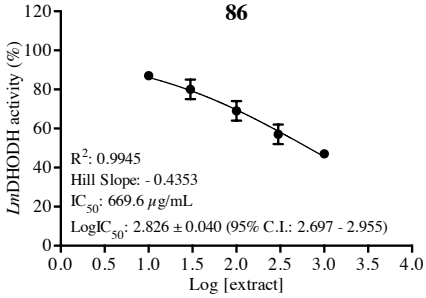


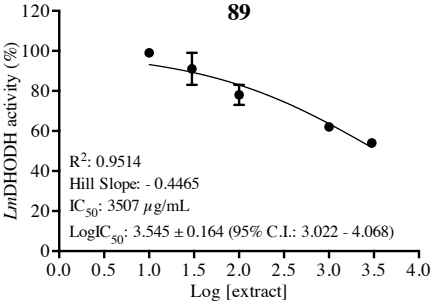
APÊNDICE P (continuação) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração dos extratos, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} dos extratos

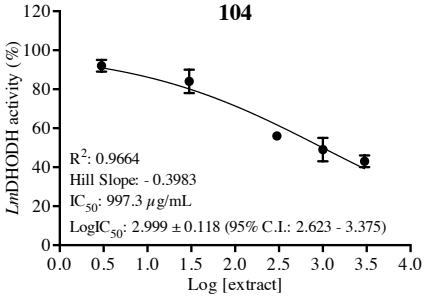


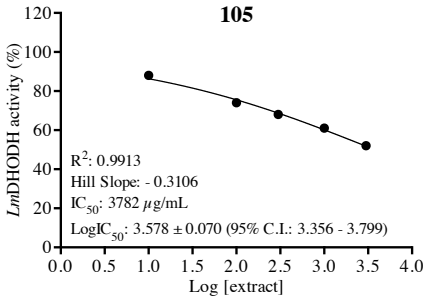


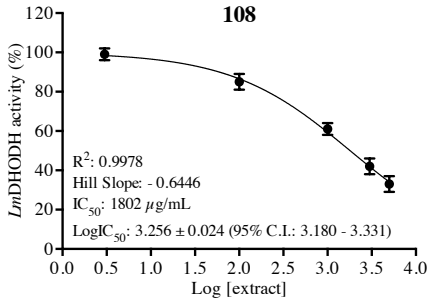


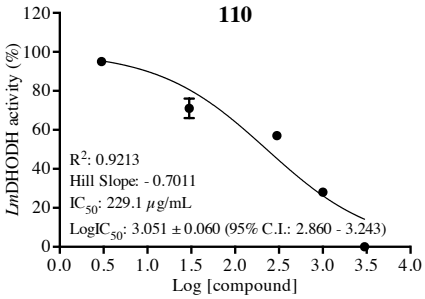


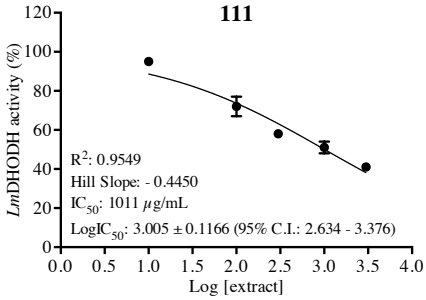


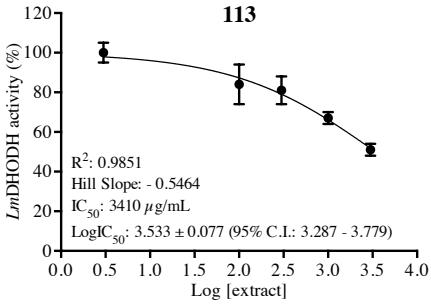


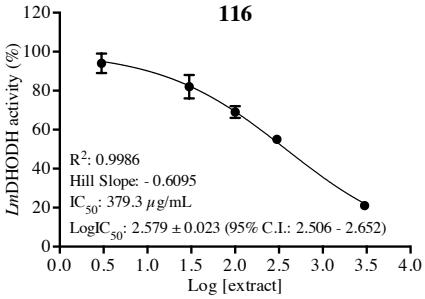


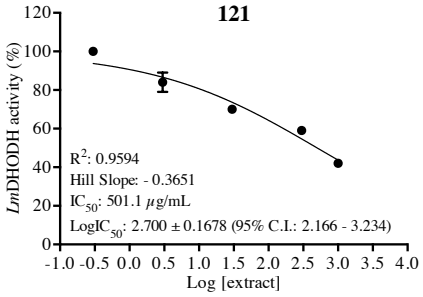


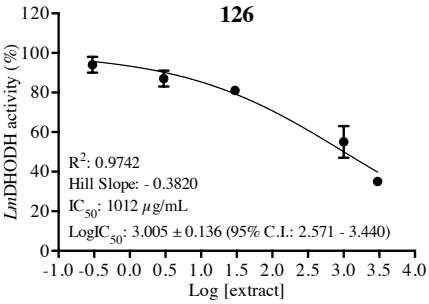


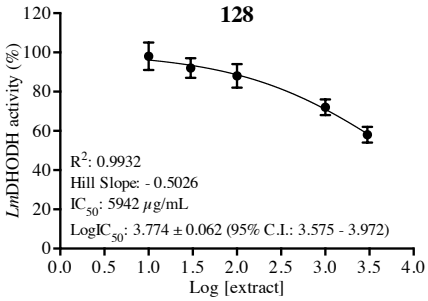




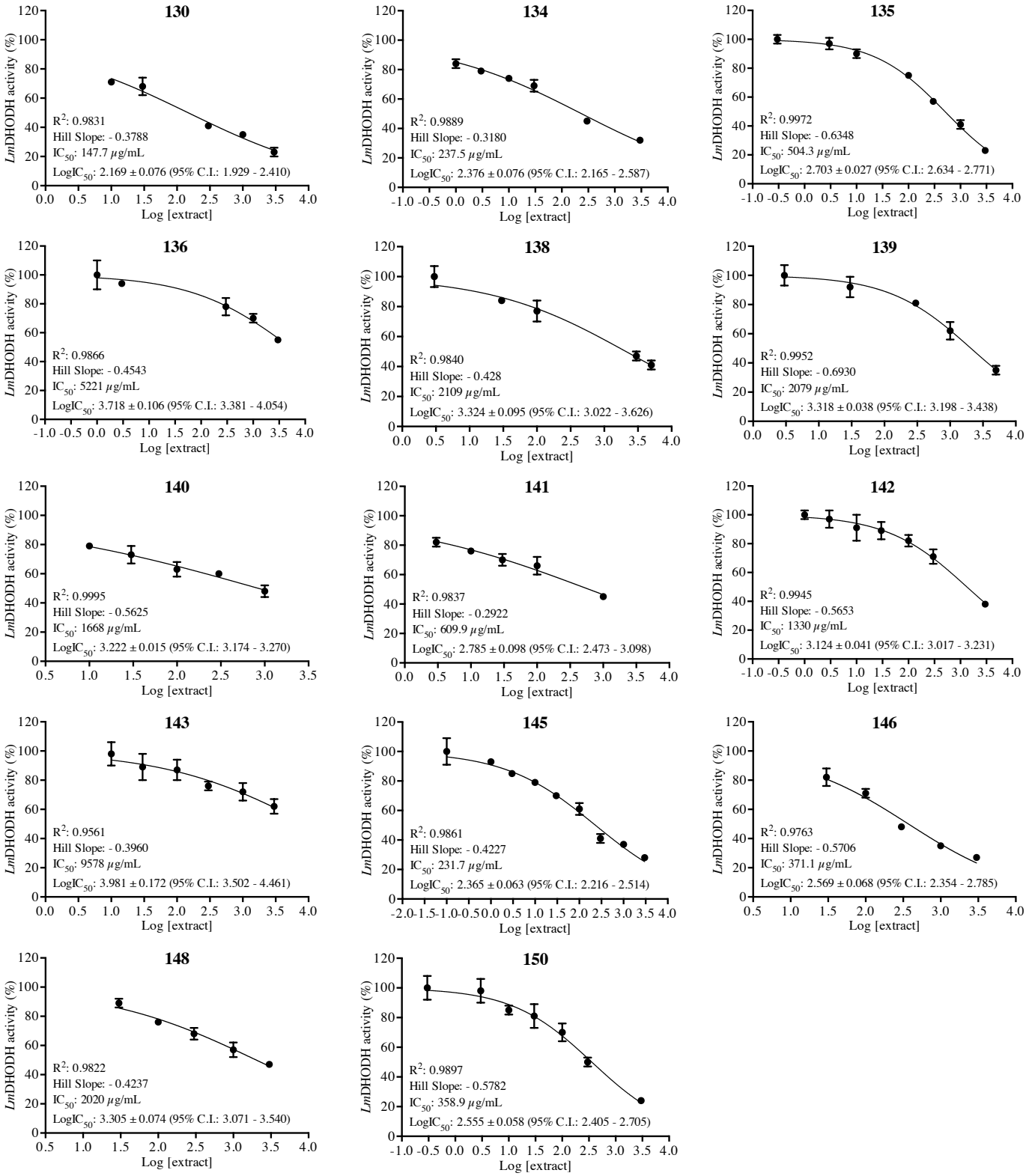








APÊNDICE P (conclusão) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração dos extratos, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} dos extratos



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software Prism 6.0).

APÊNDICE Q (continua) – Revisão da literatura dos dados de atividade *in vitro* e/ou *in vivo* anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* das 59 espécies de Asteraceae testadas frente à *Lm*DHODH

Código[a]	Espécie	*Lm*DHODH IC_{50} ($\mu g.mL^{-1}$)	Atividade *in vitro/in vivo* anti-tripanosomatídeo		
			L. major	*Leishmania*	*Trypanosoma*
1	*Achillea millefolium* Ledeb.	5624	[1]	[2]	[3]
2	*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.	344	—	—	[4-6]
3	*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen	1176	—	—	—
4	*Ageratum conyzoides L.*	1067	—	[7-10]	[7-10]
5	*Aldama arenaria* Baker	1288	—	—	[11]
9	*Aldama filifolia* Sch. Bip. Ex Baker	1102	—	—	—
10	*Aldama gardneri* (Baker) E.E. Schill. & Panero	774	—	—	—
11	*Aldama robusta* (Gardner) E.E. Schill. & Panero	711	—	—	—
12	*Anteremanthus hatschbachii* H. Rob.	499	—	—	—
13	*Arctium lappa* L.	745	—	—	—
14	*Arnica montana L.*	1095	—	—	[12,13]
15	*Artemisia absinthium* L.	1516	[14,15]	[16-19]	[19-22]
16	*Artemisia annua* L.	1566	—	[23-30]	[28-32]
17	*Baccharis albilanosa* A.S. Oliveira & Deble	1382	—	—	—
31	*Baccharis glaziovii* Baker	1668	—	—	—
38	*Baccharis organensis* Baker	433	—	—	—
53	*Bidens pilosa* L.	378	—	[33]	—
54	*Blanchetia heterotricha* DC.	390	—	—	—
55	*Calea cuneifolia* DC.	427	—	—	—
58	*Chresta exsucca* DC.	2211	—	[34]	[34]
60	*Chresta hatschbachii* H. Rob.	385	—	—	—
61	*Chresta martii* (DC.) H. Rob.	846	—	—	—

APÊNDICE Q (continuação) – Revisão da literatura dos dados de atividade in vitro e/ou in vivo anti-Leishmania e anti-Trypanosoma das 59 espécies de Asteraceae testadas frente à LmDHODH

Código[a]	Espécie	*Lm*DHODH IC_{50} (µg.mL^{-1})	Atividade *in vitro/in vivo* anti-tripanosomatídeo		
			L. major	*Leishmania*	*Trypanosoma*
63	*Chresta plantaginifolia* (Less.) Gardner	207	—	—	—
64	*Chresta pycnocephala* DC.	742	—	—	—
70	*Chronopappus bifrons* (DC. ex Pers.) DC.	282	—	—	—
71	*Chuquiraga spinosa* Less.	1732	—	—	—
72	*Cichorium intybus* L.	524	—	—	[35]
73	*Cynara scolymus* L.	3002	—	—	—
74	*Dasyphyllum brasiliensis* var. *latifolium* (D. Don) Cabrera	3194	—	—	—
78	*Echinacea purpurea* (L.) Moench	2822	[6-38]	[37]	[37]
79	*Emilia sonchifolia* L. DC.	389	—	—	—
80	*Eremanthus argenteus* MacLeish & H. Schumach	337	—	—	—
83	*Eremanthus capitatus* (Spreng.) MacLeish	879	—	—	—
86	*Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch. Bip	670	—	—	—
89	*Eremanthus polycephalus* (DC.) MacLeish	3545	—	—	—
104	*Heterocoma gracilis* Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir sp. nov	997	—	—	—
105	*Lactuca sativa* L.	3782	—	—	—
108	*Lychnophora mellobarretoi* G.M. Barroso	1802	—	—	—
110	*Lychnophora salicifolia* Mart.	229	—	—	[39]
111	*Lychnophora santosii* H. Rob.	1011	—	—	—
113	*Matricaria chamomilla* L.	3410	—	[40,41]	—
116	*Mikania cordifolia* (L.f.) Willd.	379	—	[42]	[42-44]
121	*Mikania sessilifolia* DC.	501	—	—	—
126	*Paralychnophora atkinsiae* D.J.N. Hind	1012	—	—	—
128	*Piptolepis monticola* Loeuille sp. nov	5942	—	—	—

APÊNDICE Q (conclusão) – Revisão da literatura dos dados de atividade in vitro e/ou in vivo anti-Leishmania e anti-Trypanosoma das 59 espécies de Asteraceae testadas frente à LmDHODH

Código[a]	Espécie	*Lm*DHODH IC_{50} (µg.mL^{-1})	Atividade *in vitro/in vivo* anti-tripanosomatídeo		
			L. major	*Leishmania*	*Trypanosoma*
130	*Pluchea quitoc* D.C.	148	—	—	[45]
134	*Schlechtendalia luzulaefolia* Less.	238	—	—	—
135	*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson	504	—	[46]	[46,47]
136	*Soaresia velutina* Sch. Bip.	5221	—	—	—
138	*Solidago microglossa* DC.	2109	—	—	—
139	*Sonchus oleraceus* L.	2079	—	[8]	[8]
140	*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruskei	849	—	—	—
141	*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni	610	—	—	—
142	*Tanacetum parthenium* L.	1330	[48]	[48-52]	[53,54]
143	*Taraxacum officinale* Weber ex FH Wigg.	9578	—	[12]	[12]
145	*Tridax procumbens* L.	232	[55]	[8,55-61]	[8,62,63]
146	*Vernonanthura beyrichii* (Less.) H. Rob.	371	—	—	—
148	*Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip ex Walp.	2020	—	—	—
150	*Vernonanthura polyanthes* (Spreng.) A.J. Vega & M. Dematt.	359	—	[64-66]	—

[a]Mesmos códigos da Tabela 1 e dos Apêndices A e O.

Referências do Apêndice Q

1. Nilforoushzadeh, M. A.; Shirani-bidabadi, L.; Zolfaghari-baghbaderani, A.; Saberi, S.; Siadat, A. H.; Mahmoudi, M. Comparison of Thymus vulgaris (Thyme), Achillea millefolium (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in balb/c mice. J. Vector Borne Dis. 2008, 45, 301–306.
2. Santos, A. O.; Santin, A. C.; Yamaguchi, M. U.; Cortez, L. E. R.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Nakamura, C. V Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of Achillea millefolium. Ann. Trop. Med. Parasitol. 2010, 104, 475–483, doi:10.1179/136485910X12786389891281.

3. Santoro, G. F.; Cardoso, M. G.; Guimarães, L. G. L.; Mendonça, L. Z.; Soares, M. J. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from Achillea millefolium L., Syzygium aromaticum L. and Ocimum basilicum L. on epimastigotes and trypomastigotes. Exp. Parasitol. 2007, 116, 283–290, doi:10.1016/j.exppara.2007.01.018.
4. Baldissera, M. D.; Oliveira, C. B.; Rech, V. C.; Rezer, J. F. P.; Sagrillo, M. R.; Alves, M. P.; da Silva, A. P. T.; Leal, D. B. R.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Da Silva, A. S.; Mendes, R. E.; Monteiro, S. G. Treatment with essential oil of Achyrocline satureioides in rats infected with Trypanosoma evansi: Relationship between protective effect and tissue damage. Pathol. Res. Pract. 2014, 210, 1068–1074, doi:10.1016/j.prp.2014.06.008.
5. Baldissera, M. D.; Oliveira, C. B.; Zimmermann, C. E. P.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Bolzan, L. P.; Vaucher, R. de A.; Santurio, J. M.; Sagrillo, M. R.; da Silva, A. S.; Monteiro, S. G. In vitro trypanocidal activity of macela (Achyrocline satureioides) extracts against Trypanosoma evansi. Korean J. Parasitol. 2014, 52, 311–315, doi:10.3347/kjp.2014.52.3.311.
6. Do Carmo, G. M.; Baldissera, M. D.; Vaucher, R. A.; Rech, V. C.; Oliveira, C. B.; Sagrillo, M. R.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Alves, M. P.; França, R. T.; Lopes, S. T. A.; Schwertz, C. I.; Mendes, R. E.; Monteiro, S. G.; Da Silva, A. S. Effect of the treatment with Achyrocline satureioides (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by Trypanosoma evansi. Exp. Parasitol. 2015, 149, 39–46, doi:10.1016/j.exppara.2014.12.005.
7. Teixeira, T. L.; Teixeira, S. C.; Vieira, C.; Souza, M. A. De Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. Pathog. Glob. Health 2014, 108, 30–36, doi:10.1179/2047773213Y.0000000120.
8. 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 brasilicum. Planta Med. 2009, 75, 1363–1368, doi:10.1055/s-0029-1185676.
9. 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.
10. Harel, D.; Khalid, S. A.; Kaiser, M.; Brun, R.; Wünsch, B.; Schmidt, T. J. Encecalol angelate, an unstable chromene from Ageratum conyzoides L.: Total synthesis and investigation of its antiprotozoal activity. J. Ethnopharmacol. 2011, 137, 620–625, doi:10.1016/j.jep.2011.06.015.
11. 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.
12. Montesino, N. L.; Kaiser, M.; Brun, R.; Schmidt, T. J. Search for antiprotozoal activity in herbal medicinal preparations; new natural leads against neglected tropical diseases. Molecules 2015, 20, 14118–14138, doi:10.3390/molecules200814118.
13. Schmidt, T. J.; Brun, R.; Willuhn, G.; Khalid, S. A. Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. Planta Med. 2002, 68, 750–751, doi:10.1055/s-2002-33799.
14. Azizi, K.; Shahidi-Hakak, F.; Asgari, Q.; Hatam, G. R.; Fakoorziba, M. R.; Miri, R.; Moemenbellah-Fard, M. D. In vitro efficacy of ethanolic extract of Artemisia absinthium (Asteraceae) against Leishmania major L. using cell sensitivity and flow cytometry assays. J. Parasit. Dis. 2016, 40, 735–740, doi:10.1007/s12639-014-0569-5.

15. Azizi, K.; Shahidi-hakak, F.; Moemenbellah-fard, M. D. Antiulcer Activity after Oral Administration of the Wormwood Ethanol Extract on Lesions due to Leishmania major Parasites in BALB / C Mice. 2016, 8, 33–41, doi:10.18311/ajprhc/2016/.
16. Monzote, L.; Piñón, A.; Sculli, R.; Setzer, W. Chemistry and leishmanicidal activity of the essential oil from Artemisia absinthium from Cuba. Nat. Prod. Commun. 2014, 9, 1799–1804.
17. Sariego, I.; Monzote, L.; Scull, R.; Diaz, A.; Caballero, Y. Activity of essential oils from cuban plants against Leishmania donovani and Trichomonas vaginalis. Int. J. Essent. Oil Ther. 2008, 2, 172–174.
18. Tariku, Y.; Hymete, A.; Hailu, A.; Rohloff, J. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of Artemisia absinthium and Echinops kebericho. Chem. Biodivers. 2011, 8, 614–623, doi:10.1002/cbdv.201000331.
19. Bailen, M.; Julio, L. F.; Diaz, C. E.; Sanz, J.; Martínez-Díaz, R. A.; Cabrera, R.; Burillo, J.; Gonzalez-Coloma, A. Chemical composition and biological effects of essential oils from Artemisia absinthium L. cultivated under different environmental conditions. Ind. Crops Prod. 2013, 49, 102–107, doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.055.
20. Nibret, E.; Wink, M. Volatile components of four Ethiopian Artemisia species extracts and their in vitro antitrypanosomal and cytotoxic activities. Phytomedicine 2010, 17, 369–374, doi:10.1016/j.phymed.2009.07.016.
21. Kifleyohannes, T.; Terefe, G.; Tolossa, Y. H.; Giday, M.; Kebede, N. Effect of crude extracts of Moringa stenopetala and Artemisia absinthium on parasitaemia of mice infected with Trypanosoma congolense. BMC Res. Notes 2014, 7, 390, doi:10.1186/1756-0500-7-390.
22. Martínez-Díaz, R. A.; Ibáñez-Escribano, A.; Burillo, J.; de las Heras, L.; del Prado, G.; Agulló-Ortuño, M. T.; Julio, L. F.; González-Coloma, A. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated Artemisia absinthium Linnaeus (Asteraceae) essential oil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2015, 110, 693–699, doi:10.1590/0074-02760140129.
23. Sen, R.; Bandyopadhyay, S.; Dutta, A.; Mandal, G.; Ganguly, S.; Saha, P.; Chatterjee, M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani promastigotes. J. Med. Microbiol. 2007, 56, 1213–1218, doi:10.1099/jmm.0.47364-0.
24. Sen, R.; Ganguly, S.; Saha, P.; Chatterjee, M. Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis. Int. J. Antimicrob. Agents 2010, 36, 43–49, doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.008.
25. Islamuddin, M.; Farooque, A.; Dwarakanath, B. S.; Sahal, D.; Afrin, F. Extracts of Artemisia annua leaves and seeds mediate programmed cell death in Leishmania donovani. J. Med. Microbiol. 2012, 61, 1709–1718, doi:10.1099/jmm.0.049387-0.
26. Islamuddin, M.; Chouhan, G.; Farooque, A.; Dwarakanath, B. S.; Sahal, D.; Afrin, F. Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of Artemisia annua in Murine Visceral Leishmaniasis. PLoS Negl. Trop. Dis. 2015, 9, doi:10.1371/journal.pntd.0003321.
27. Islamuddin, M.; Chouhan, G.; Want, M. Y.; Tyagi, M.; Abdin, M. Z.; Sahal, D.; Afrin, F. Leishmanicidal activities of Artemisia annua leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. Front. Microbiol. 2014, 5, 1–15, doi:10.3389/fmicb.2014.00626.
28. Loo, C. S. N.; Lam, N. S. K.; Yu, D.; Su, X. zhuan; Lu, F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. Pharmacol. Res. 2017, 117, 192–217, doi:10.1016/j.phrs.2016.11.012.

29. Bilia, A.; Kaiser, M.; Vincieri, F.; Tasdemir, D. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of organic and aqueous extracts of Artemisia annua. Nat. Prod. Commun. 2008, 2, 1963–1966.
30. Malebo, H. M.; Tanja, W.; Cal, M.; Swaleh, S. A. M.; Omolo, M. O.; Hassanali, A. activity of selected Tanzanian medicinal plants. 2009, 11, 226–234.
31. Worku, N.; Mossie, A.; Stich, A.; Daugschies, A.; Trettner, S.; Hemdan, N. Y. A.; Birkenmeier, G. Evaluation of the In Vitro Efficacy of Artemisia annua , Rumex abyssinicus , and Catha edulis Forsk Extracts in Cancer and Trypanosoma brucei Cells. ISRN Biochem. 2013, 2013, 1–10, doi:10.1155/2013/910308.
32. Mishina, Y. V.; Krishna, S.; Haynes, R. K.; Meade, J. C. Artemisinins inhibit Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei rhodesiense in vitro growth. Antimicrob. Agents Chemother. 2007, 51, 1852–1854, doi:10.1128/AAC.01544-06.
33. García, M.; Monzote, L.; Montalvo, A. M.; Scull, R. Screening of medicinal plants against Leishmania amazonensis. Pharm. Biol. 2010, 48, 1053–8, doi:10.3109/13880200903485729.
34. Schinor, E. C.; Salvador, M. J.; Tomaz, J. C.; Furusho, E. M.; Alfieri, S. C.; Albuquerque, S. De; Ito, I. Y.; Dias, D. A. Biological activities and chemical composition of crude extracts from Chresta exsucca. Brazilian J. Pharm. Sci. 2006, 42, 83–89, doi:10.1590/S1516-93322006000100009.
35. Abdel-Sattar, E.; Maes, L.; Salama, M. M. In vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. Phyther. Res. 2010, 24, 1322–1328, doi:10.1002/ptr.3108.
36. Soudi, S.; Mahmoud, S.; Zavaran, A.; Ghaemi, A. Antileishmanial Effect of Echinacea purpurea Root Extract Cultivated in Iran. Iran. J. Pharm. Res. 2007, 6, 147–149.
37. Canlas, J.; Hudson, J. B.; Sharma, M.; Nandan, D. Echinacea and trypanasomatid parasite interactions: Growth-inhibitory and anti-inflammatory effects of Echinacea. Pharm. Biol. 2010, 48, 1047–1052, doi:10.3109/13880200903483468.
38. Sarkari, B.; Sattari, H.; Moein, M.; Tamadon, A.; Rad, R.; Asgari, Q. Effect of topical gel prepared with hydroalcoholic extract of Echinacea purpurea on treatment of Leishmania major-induced cutaneous leishmaniasis in BALB/C mice. J. Pharm. Negat. Results 2016, 7, 12, doi:10.4103/0976-9234.177054.
39. Jordão, C. O.; Vichnewski, W.; de Souza, G. E. P.; Albuquerque, S.; Lopes, J. L. C. Trypanocidal activity of chemical constituents fromLychnophora salicifolia Mart. Phyther. Res. 2004, 18, 332–334, doi:10.1002/ptr.1366.
40. Ríos, Y.; Otero, A.; Muñoz, D.; Echeverry, M.; Robledo, S.; Yepes, M. Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla). Rev. Colomb. Ciencias Químicas y Farm. 2008, 37, 200–211.
41. Andrade, M. A.; Azevedo, C. dos S.; Motta, F. N.; Santos, M. L. dos; Silva, C. L.; Santana, J. M. de; Bastos, I. M. D. Essential oils: in vitro activity against Leishmania amazonensis, cytotoxicity and chemical composition. BMC Complement. Altern. Med. 2016, 16, 444, doi:10.1186/s12906-016-1401-9.
42. Laurella, L. C.; Frank, F. M.; Sarquiz, A.; Alonso, M. R.; Giberti, G.; Cavallaro, L.; Catalán, C. A.; Cazorla, S. I.; Malchiodi, E.; Martino, V. S.; Sülsen, V. P. In vitro Evaluation of Antiprotozoal and Antiviral Activities of Extracts from Argentinean Mikania Species. Sci. World J. 2012, 2012, 1–6, doi:10.1100/2012/121253.

43. Rojas de Arias, A.; Ferro, E.; Inchausti, A.; Ascurra, M.; Acosta, N.; Rodriguez, E.; Fournet, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. J. Ethnopharmacol. 1995, 45, 35–41, doi:10.1016/0378-8741(94)01193-4.

44. Muelas-Serrano, S.; Nogal, J. J.; Martínez-Díaz, R. A.; Escario, J. A.; Martínez-Fernández, A. R.; Gómez-Barrio, A. In vitro screening of American plant extracts on Trypanosoma cruzi and Trichomonas vaginalis. J. Ethnopharmacol. 2000, 71, 101–107, doi:10.1016/S0378-8741(99)00185-3.

45. Zani, C. L.; Alves, T. M.; Oliveira, A. B.; Murta, S. M. F.; Ceravolo, I. P.; Romanha, A. J. Trypanocidal components of Pluquea quitoc L. Phyther. Res. 1994, 8, 375–377.

46. Ulloa, J. L.; Spina, R.; Casasco, A.; Petray, P. B.; Martino, V.; Sosa, M. A.; Frank, F. M.; Muschietti, L. V. Germacranolide-type sesquiterpene lactones from Smallanthus sonchifolius with promising activity against Leishmania mexicana and Trypanosoma cruzi. Parasites and Vectors 2017, 10, 1–11, doi:10.1186/s13071-017-2509-6.

47. Frank, F. M.; Ulloa, J.; Cazorla, S. I.; Maravilla, G.; Malchiodi, E. L.; Grau, A.; Martino, V.; Catalán, C.; Muschietti, L. V. Trypanocidal activity of smallanthus sonchifolius: Identification of active sesquiterpene lactones by bioassay-guided fractionation. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013, 2013, 1–8, doi:10.1155/2013/627898.

48. Moein, M.; Nazemosadat, Z.; Hatam, G.; Namazian, M. Evaluation of Tanacetum parthenium cytotoxicity on Leishmania infatum and L. major. Planta Med. 2016, 82, P821, doi:10.1055/s.

49. Rabito, M. F.; Britta, E. A.; Pelegrini, B. L.; Scariot, D. B.; Almeida, M. B.; Nixdorf, S. L.; Nakamura, C. V.; Ferreira, I. C. P. In vitro and in vivo antileishmania activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from Tanacetum parthenium (L.) Schultz-Bip. Exp. Parasitol. 2014, 143, 18–23, doi:10.1016/j.exppara.2014.04.014.

50. da Silva, B. P.; Cortez, D. A.; Violin, T. Y.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V.; Ueda-Nakamura, T.; Ferreira, I. C. P. Antileishmanial activity of a guaianolide from Tanacetum parthenium (L.) Schultz Bip. Parasitol. Int. 2010, 59, 643–646, doi:10.1016/j.parint.2010.08.005.

51. Tiuman, T. S.; Ueda-nakamura, T.; Tiuman, T. S.; Prado, B.; Filho, D. Antileishmanial Activity of Parthenolide , a Sesquiterpene Lactone Isolated from Tanacetum parthenium Antileishmanial Activity of Parthenolide , a Sesquiterpene Lactone Isolated from Tanacetum parthenium. Antimicrob. Agents Ch. 2005, 49, 176–182, doi:10.1128/AAC.49.11.176.

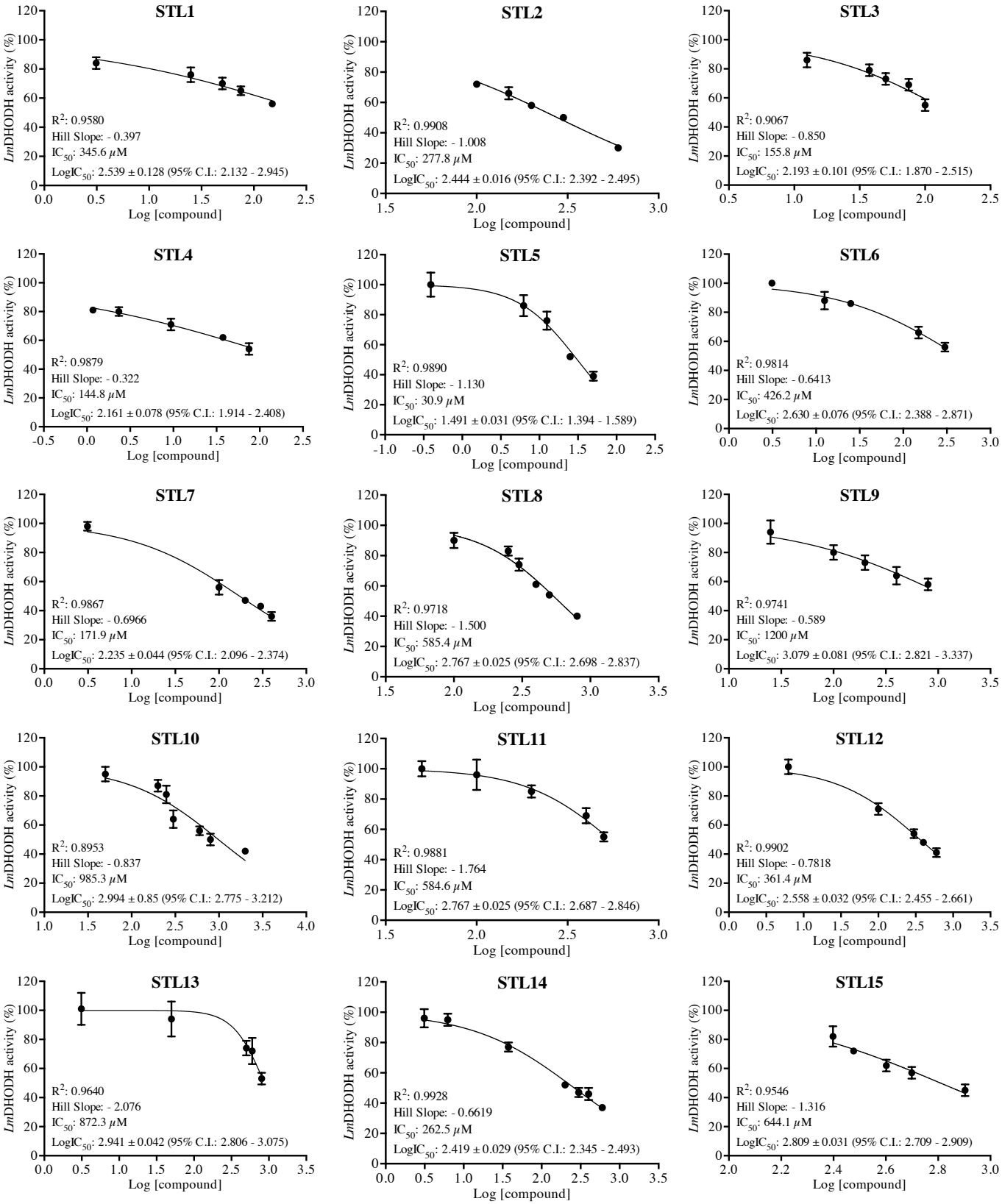
52. Tiuman, T. S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V. Studies on the effectiveness of Tanacetum parthenium against Leishmania amazonensis. Acta Protozool. 2005, 44, 245–251, doi:10.1590/S0074-02761999000600015.

53. Cogo, J.; Caleare, A. D. O.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Ferreira, I. C. P.; Nakamura, C. V. Trypanocidal activity of guaianolide obtained from Tanacetum parthenium (L.) Schultz-Bip. and its combinational effect with benznidazole. Phytomedicine 2012, 20, 59–66, doi:10.1016/j.phymed.2012.09.011.

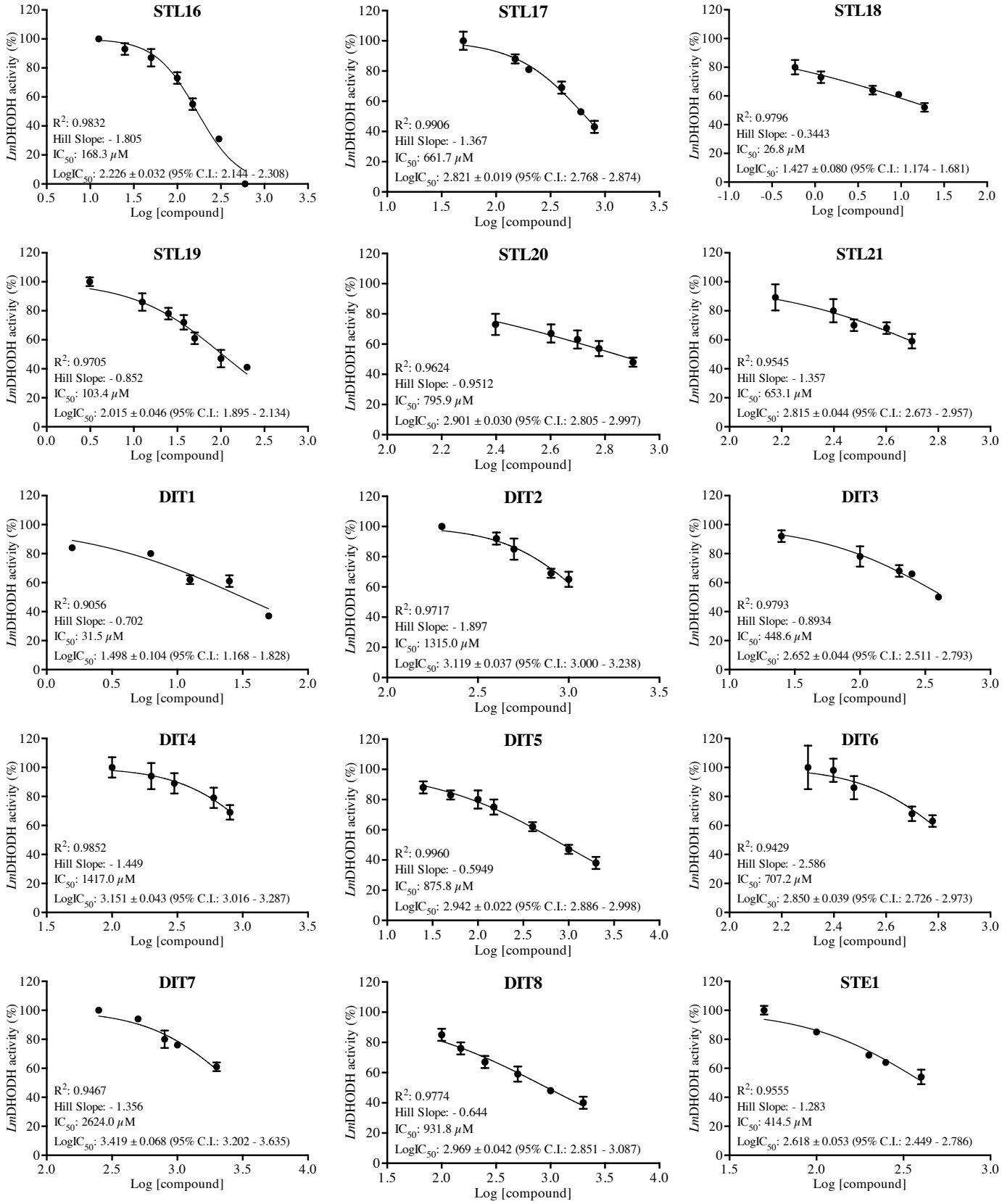
54. Izumi, E.; Morello, L. G.; Ueda-Nakamura, T.; Yamada-Ogatta, S. F.; Filho, B. P. D.; Cortez, D. A. G.; Ferreira, I. C. P.; Morgado-Díaz, J. A.; Nakamura, C. V. Trypanosoma cruzi: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from Tanacetum parthenium (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. Exp. Parasitol. 2008, 118, 324–330, doi:10.1016/j.exppara.2007.08.015.

55. Getti, G.; Durgadoss, P.; Domínguez-Carmona, D.; Martin-Quintal, Z.; Peraza-Sánchez, S.; Peña-Rodriguez, L. M.; Humber, D. Leishmanicidal activity of Yucatecan medicinal plants on Leishmania species responsible for cutaneous leishmaniasis. J. Parasitol. 2009, 95, 456–460, doi:10.1645/GE-1675.1.
56. Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Drier-Jonas, S.; Jiménez-Arellanes, M. A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. Asian Pac. J. Trop. Med. 2017, 1–6, doi:10.1016/j.apjtm.2017.10.016.
57. Gubbiveeranna, V.; Nagaraju, S. Ethnomedicinal, phytochemical constituents and pharmacological activities of Tridax procumbens: A review. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2016, 8, 1–7.
58. Martín-Quintal, Z.; García-Miss, M. del R.; Mut-Martín, M.; Matus-Moo, A.; Torres-Tapia, L. W.; Peraza-Sánchez, S. R. The Leishmanicidal Effect of (3S)-16,17- Didehydrofalcarinol, an Oxylipin Isolated from Tridax procumbens, is Independent of NO Production. Phyther. Res. 2010, 24, 1004–1008, doi:10.1002/ptr.
59. Martín-Quintal, Z.; Moo-Puc, R.; González-Salazar, F.; Chan-Bacab, M. J.; Torres-Tapia, L. W.; Peraza-Sánchez, S. R. In vitro activity of Tridax procumbens against promastigotes of Leishmania mexicana. J. Ethnopharmacol. 2009, 122, 463–467, doi:10.1016/j.jep.2009.01.037.
60. Gamboa-Leon, R.; Vera-Ku, M.; Peraza-Sanchez, S. R.; Ku-Chulim, C.; Horta-Baas, A.; Rosado-Vallado, M. Antileishmanial activity of a mixture of Tridax procumbens and Allium sativum in mice. Parasite 2014, 21, 15, doi:10.1051/parasite/2014016.
61. Peraza-Sánchez, S. R.; Cen-Pacheco, F.; Noh-Chimal, A.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Dumonteil, E.; García-Miss, M. R.; Mut-Martín, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. Fitoterapia 2007, 78, 315–318, doi:10.1016/j.fitote.2007.03.013.
62. Abubakar, A.; Shamaki, B.; Ogbadoyi, E. The effect of Tridax procumbens treatment on Trypanosoma brucei brucei infections in mice. Planta Med. 2008, 74, 1011–1012.
63. Cáceres, A.; López, B.; González, S.; Berger, I.; Tada, I.; Maki, J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. J. Ethnopharmacol. 1998, 62, 195–202, doi:10.1016/S0378-8741(98)00140-8.
64. do Nascimento, A. M.; Soares, M. G.; da Silva Torchelsen, F. K. V; de Araujo, J. A. V.; Lage, P. S.; Duarte, M. C.; Andrade, P. H. R.; Ribeiro, T. G.; Coelho, E. A. F.; do Nascimento, A. M. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant Vernonia polyanthes and their potential as source of bioactive substances. World J. Microbiol. Biotechnol. 2015, 31, 1793–1800, doi:10.1007/s11274-015-1932-0.
65. Braga, F. G.; Bouzada, M. L. M.; Fabri, R. L.; de O. Matos, M.; Moreira, F. O.; Scio, E.; Coimbra, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. J. Ethnopharmacol. 2007, 111, 396–402, doi:10.1016/j.jep.2006.12.006.
66. Moreira, R. R. D.; Martins, G. Z.; Varandas, R.; Cogo, J.; Perego, C. H.; Roncoli, G.; Sousa, M. do C.; Nakamura, C. V.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C. Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of Vernonia polyanthes Less (Asteraceae). Nat. Prod. Res. 2017, 31, 2905–2908, doi:10.1080/14786419.2017.1299723.

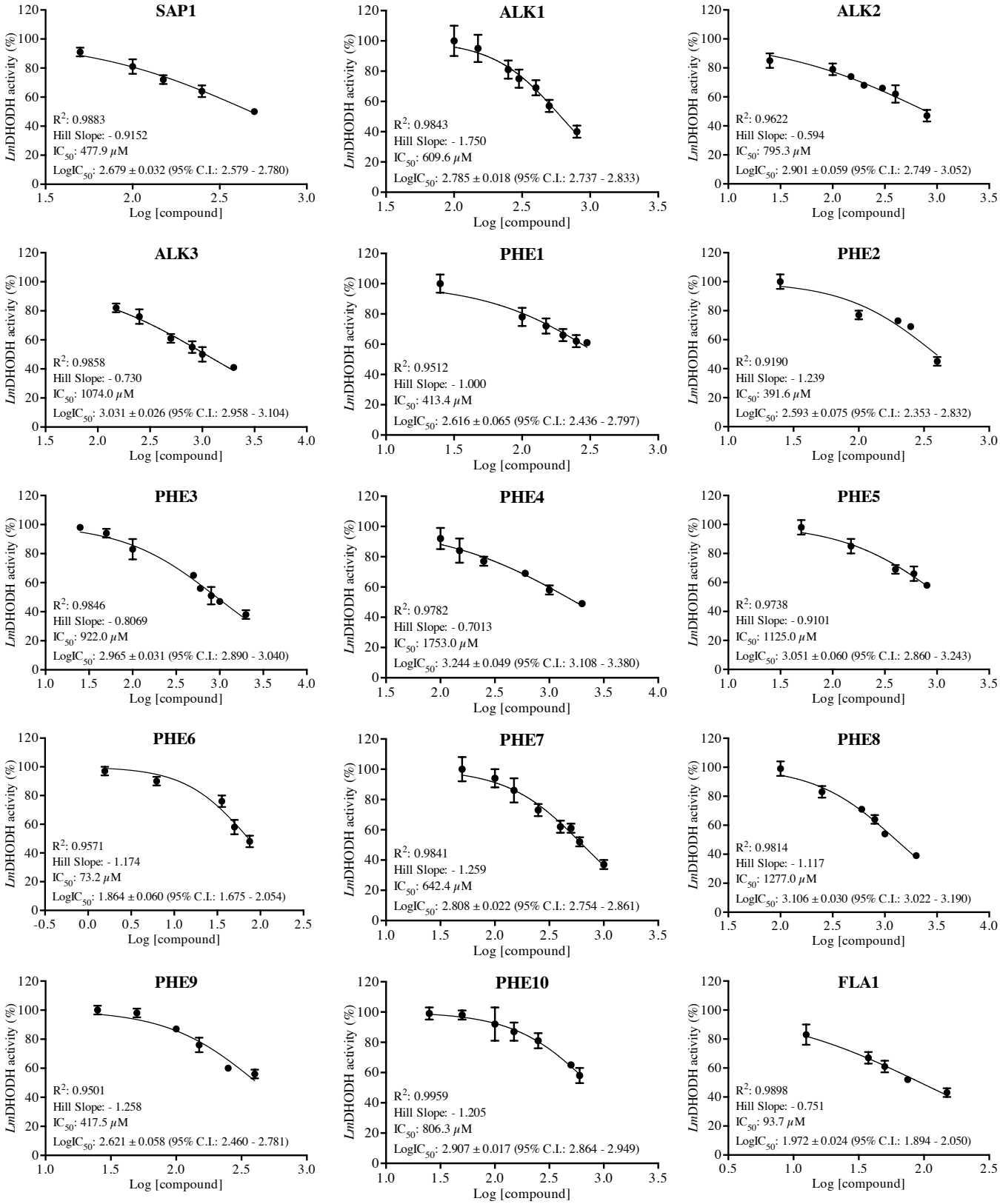
APÊNDICE R (continua) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração das substâncias, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} das substâncias



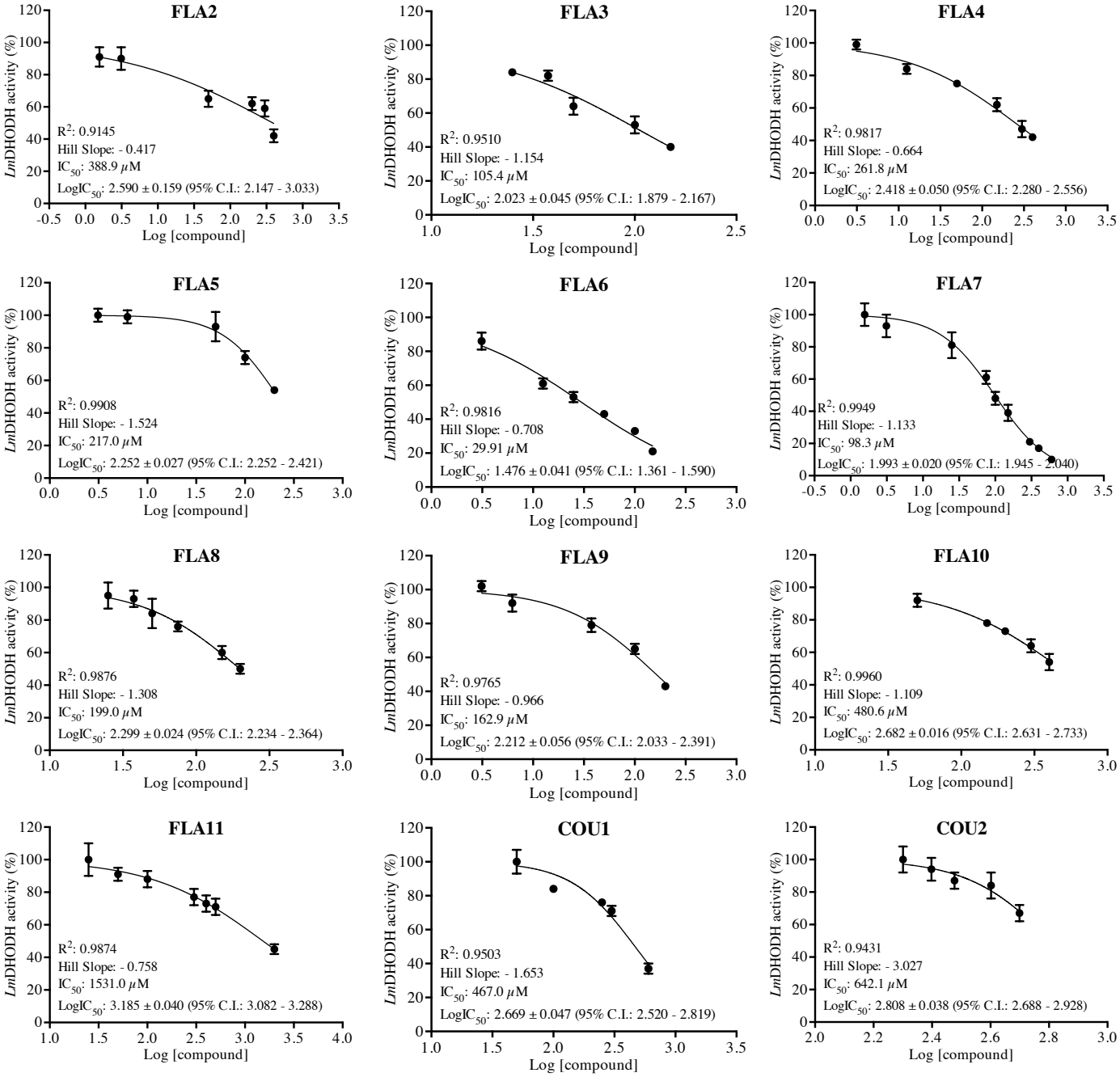
APÊNDICE R (continuação) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração das substâncias, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} das substâncias



APÊNDICE R (continuação) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração das substâncias, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} das substâncias



APÊNDICE R (conclusão) – Gráficos da porcentagem de atividade da enzima *Lm*DHODH em função do logaritmo da concentração das substâncias, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para os cálculos de IC_{50} das substâncias



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software Prism 6.0).

APÊNDICE S (continua) – Revisão da literatura dos dados de atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* das 57 substâncias testadas frente à *Lm*DHODH

Substância	Nome	Classe/ Subclasse[a]	Relatado em Asteraceae	Atividade *in vitro* reportada na literatura (IC_{50}, μM)		
				L. major	*Leishmania* spp.[b]	*Trypanosoma* spp.[c]
STL1	16-*α*-(1-metilprop-1-*Z*-enila)-eremantolido	STL/ERE	✓	—	—	—
STL2	15-desóxi-goiasensolido	STL/FHL	✓	—	—	514,00 (*Tcr*[f])[1]
STL3	goiasensolido	STL/FHL	✓	—	0,45 (*Ldon*[e])[2]	0,07 (*Tbr*[f])[2] 1,08 (*Tcr*[e])[1]
STL4	4*β*,5-desidro-15-desóxigoiasensolido	STL/FHL	✓	—	—	—
STL5	glaucolido B	STL/GLA	✓	—	46,10 (*Lama*[d])[3] 27,90 (*Lbra*[d])[3]	—
STL6	tagitinina C	STL/HEL	✓	—	9,20 (*Lbra*[d])[4]	—
STL7	artemisina	STL/HEL	✓	0,75[d][5] 0,30[e][5]	30,80(*Ldon*[d])[6,7]	20,40 (*Tbru*[f])[6,7] 13,40 (*Tcru*[g])[6,7]
STL8	enidrina	STL/MEL	✓	—	—	0,84[g], 33,40[f], 5,17[e] (*Tcru*)[8]
STL8	enidrina	STL/MEL	✓	—	—	—
STL9	15-acetóxi-eremantolido B	STL/ERE	✓	—	—	—
STL11	2-oxo-8*β*-epóxiangeloilóxi-guaia-1(10),3,11(13)-trien-6*α*,12-olido	STL/GUA	✓	—	—	—
STL12	cnicina	STL/GER	✓	—	15,21 (*Ldon*[e])[9]	1,30 (*Tbru*[f])[9] 16,80 (*Tcru*[f])[9]
STL13	tiglato de atripliciolido	STL/FHL	✓	—	—	—
STL14	tiglato de budleína A	STL/GUA	✓	—	—	—
STL15	angelato de acantospermolido	STL/MEL	✓	—	—	—
STL16	2-oxo-8*β*-metacriloiloxi-10*α*-hidroxi-guaia-3,11(13)-dien-6*α*,12-olido	STL/GUA	✓	—	—	—
STL17	2-oxo-8*β*-metacriloiloxi-10*β*-hidroxi-guaia-3,11(13)-dien-6*α*,12-olido	STL/GUA	✓	—	—	—
STL18	2-oxo-8*β*-tigloiloxi-guaia-1(10),3,11(13)-trien-6*α*,12-olido	STL/GUA	✓	—	—	—
STL19	epóxido de tagitinina C	STL/HEL	✓	—	6,00 (*Lbra*[d])[4]	—

APÊNDICE S (continuação) – Revisão da literatura dos dados de atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* das 57 substâncias testadas frente à *Lm*DHODH

Substância	Nome	Classe/ Subclasse[a]	Relatado em Asteraceae	Atividade *in vitro* reportada na literatura (IC_{50}, μM)		
				L. major	*Leishmania* spp.[b]	*Trypanosoma* spp.[c]
STL20	tagitinina A	STL/FHL		—	20,40 (*Lbra*[d])[4]	—
STL21	budleína A	STL/FHL	✓	—	5,14 (*Ldon*[e])[2], 28,00 (*Linf*[d])[306][10]	0,07 (*Tbru*[f])[2] 1,75 (*Tcru*[e])[2]
DIT1	ácido *ent*-caurenóico	DIT/CAU	✓	—	93,26[d],11,66[e](*Lama*)[11]	167,20[g], 596,00[f], 16,5[e] (*Tcru*)[12]
DIT2	ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico	DIT/PIM	✓	—	—	385,70 (*Tcru*[e])[13]
DIT3	*ent*-8(14),15-pimaradien-3β-ol	DIT/PIM	✓	—	—	540,70 (*Tcru*[e])[13]
DIT4	ácido cinamoilgrandiflórico	DIT/CAU	✓	—	—	—
DIT5	ácido *ent*-agático reduzido	DIT/LAB	—	—	—	—
DIT6	ácido *ent*-agático	DIT/LAB	—	—	83,72[d],50,83[e](*Lama*)[11]	86,80[g], 823,30[f], 14,90[e] (*Tcru*)[12]
DIT7	ácido poliáltico	DIT/LAB	✓	—	110,60[d],47,40[e] (*Lama*)[11], 27,43 (*Ldon*[e])[14]	167,70[g], 965,10[f], 28,40[e] (*Tcru*)[12], 12,23 (*Tbru*[e])[14]
DIT8	ácido 3-acetóxicopálico	DIT/LAB	—	—	—	—
STE1	(-)-*β*-sitosterol	STE	✓	—	27,80 (*Ldon*[e])[15]	86,10 (*Tbru*[f])[15], 35,40 (*Tcru*[f])[15]
SAP1	aescina	SAP	—	—	1,37[e], > 14,14[d] (*Linf*)[16]	—
ALK1	cernumidina	ALK/GND	—	—	—	—
ALK2	escopolamina	ALK/TRO	—	—	> 100[d], > 25[e] (*Lama*)[17]	> 100 (*Tbru*[f])[18]
ALK3	emetina	ALK/TIQ	—	—	0,06 (*Ldon*[d])[19]	0,04 (*Tbru*[f])[18], 0,43 (*Tcon*[f])[18]
PHE1	ácido ferúlico	PHE/CID	✓	—	154,59 (*Ldon*[e])[20], 1,70[d], 7,90[e] (*Lama*)[21]	427,70 (*Tbru*[f])[20], 154,59 (*Tcru*[f])[20]
PHE2	ácido cinâmico	PHE/CID	✓	—	37,82 (*Ldon*[e])[20], 15,50 (*Lama*[e][22]	222,90 (*Tbru*[f])[20], 202,63 (*Tcru*[f])[20]
PHE3	ácido protocatecuico	PHE/SBA	✓	—	—	111,60 (*Tbru*[f])[23]

APÊNDICE S (continuação) – Revisão da literatura dos dados de atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* das 57 substâncias testadas frente à *Lm*DHODH

Substância	Nome	Classe/ Subclasse[a]	Relatado em Asteraceae	Atividade *in vitro* reportada na literatura (IC_{50}, µM)		
				L. major	*Leishmania* spp.[b]	*Trypanosoma* spp.[c]
PHE4	ácido cafeico	PHE/CID	✓	—	31,10 (*Ldon*[e])[20], 5,20[d],16,00[e](*Lama*)[21]	6,11 (*Tbru*[f])[20], 166,63 (*Tcru*[f])[20]
PHE5	ácido 5-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	✓	—	—	—
PHE6	ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	✓	—	—	286,20 (*Tcru*[f])[1]
PHE7	ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	✓	—	—	—
PHE8	ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico	PHE/CAD	✓	—	—	—
PHE9	ácido 4-*O*-cafeoil-2-C-metil-*D*-eritrônico	PHE/CAD	✓	—	—	—
PHE10	ácido *O*-cumárico	PHE/CID	✓	—	36,55 (*Ldon*[e])[20], 13,80 (*Lama*[e])[20]	264,98 (*Tbru*[f])[20], 182,75 (*Tcru*[f])[20]
FLA1	tamaraxetina	FLA/FOL	✓	—	53,15 (*Ldon*[e])[20]	46,83 (*Tbru*[f])[20], 20,25 (*Tcru*[f])[20]
FLA2	canferol	FLA/FOL	✓	—	10,14 (*Ldon*[e])[20], 53,65 (*Lbra*[e])[24], 71,29 (*Lper*[e]) [24]	32,16 (*Tbru*[f])[20], 83,55 (*Tcru*[f])[20]
FLA3	apigenina 7-*O*-glicosídeo	FLA/FNE[h]	✓	—	4,86 (*Ldon*[e])[20]	52,50 (*Tbru*[f])[20], 69,38 (*Tcru*[f])[20]
FLA4	santina	FLA/FOL	✓	—	6,00 (*Lmex*[d])[25], 63,15 (*Lama*[d])[26]	47,40[g],42,10[f](*Tcru*)[25]
FLA5	7,3',4'-trimetóxi-5-hidróxiflavona	FLA/FNE	✓	—	—	217,30 (*Tcru*[f])[27]
FLA6	miricetina	FLA/FOL	✓	—	4,08 (*Ldon*[e])[20]	49,96 (*Tbru*[f])[20], 94,27 (*Tcru*[f])[20]
FLA7	catequina	FLA/FOL	✓	—	103,35 (*Ldon*[e])[20], 152,68 (*Lama*[d])[28]	49,95 (*Tbru*[f])[20], 310,06 (*Tcru*[f])[20]
FLA8	peltatosídeo	FLA/FNE[h]	—	—	—	—
FLA9	spiraeosídeo	FLA/FNE[h]	—	—	—	—
FLA10	galangina	FLA/FOL	✓	—	5,55 (*Ldon*[e])[20]	61,06 (*Tbru*[f])[20], 73,27 (*Tcru*[f])[20]
FLA11	rutina	FLA/FOL[h]	✓	—	49,14 (*Ldon*[e])[20], 4,40 (*Lama*[e])[22]	6,90 (*Tbru*[f])[20], 49,14 (*Tcru*[f])[20]

APÊNDICE S (conclusão) – Revisão da literatura dos dados de atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* das 57 substâncias testadas frente à *Lm*DHODH

Substância	Nome	Classe/ Subclasse[a]	Relatado em Asteraceae	Atividade *in vitro* reportada na literatura (IC_{50}, μM)		
				L. major	*Leishmania* spp.[b]	*Trypanosoma* spp.[c]
COU1	7-hidróxicumarina	PHE/COU	✓	—	172,07 (*Ldon*[e])[20]	319,48 (*Tbru*[f])[20], 555,07 (*Tcru*[f])[20]
COU2	Coumarina	PHE/COU	✓	—	342,13 (*Ldon*, *Lama*, *Lbra*)[29]	—

[a]Classe/subclasse: PHE: polifenol (SBA: ácido benzoico simples, CID: derivado do ácido cinâmico, CAD: derivado do ácido cafeico, COU: cumarina); FLA: flavonoide (FNE: flavona, FOL: flavonol); STL: lactona sesquiterpênica (FHL: furanohelianfolido, ERE: eremantolido, GER: germacrolido, GUA: guaianolido, HEL: heliangolido, GLA: glaucolido, MEL: melampolido, HIR: hirsutinolido); DIT: diterpeno (CAU: caurano, PIM: pimarano, LAB: labdano); STE: esteroide; SAP: saponina; ALK: alcaloide (GND: guanidínico, TRO: tropânico, TIQ: tetrahidroisoquinolidínico
[b]*Ldon*: *L. donovani*; *Lama*: *L. amazonenses*; *Lbra*: *L. brasiliensis*; *Linf*: *L. infantum*; *Lper*: *L. peruviana*; *Lmex*: *L. mexicana*.
[c]*Tbru*: *T. brucei*; *Tcru*: *T. cruzi*; *Tcon*: *T. congolense*.
[d]Linhagem celular: promastigotas.
[e]Linhagem celular: amastigotas.
[f] Linhagem celular: tripomastigotas.
[g]Linhagem celular: epimastigotas.
[h]Metabólito na forma glicosilada (glicosídeo ou heterosídeo).

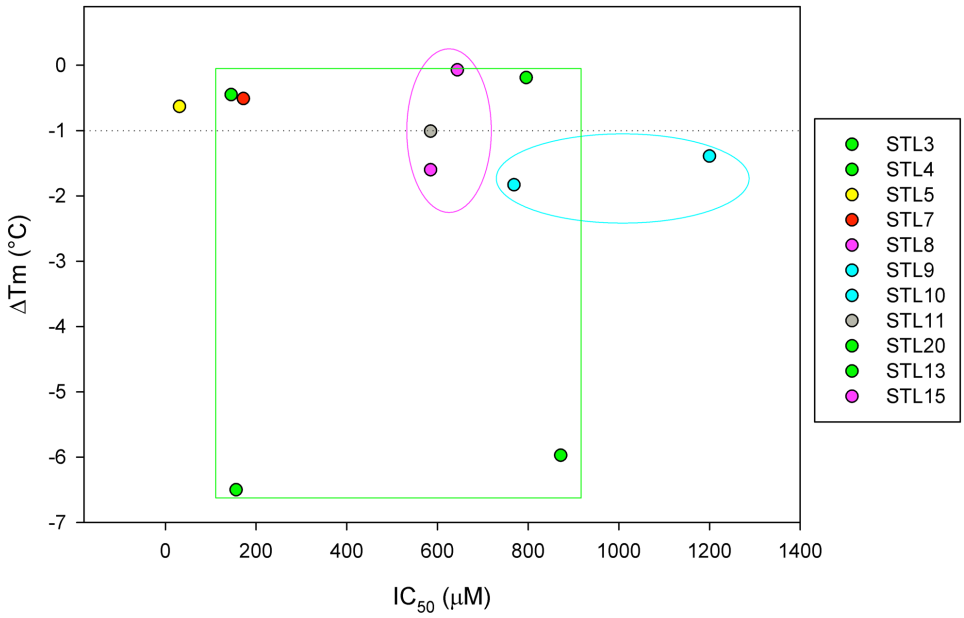
Referências do Apêndice R

1. Grael, 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.
2. 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.
3. 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, doi:10.1080/14786419.2015.1126260.
4. 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.
5. Yang, D.; Liew, F. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. Parasitology 1993, 106, 7–11.

6. Mishina, Y. V.; Krishna, S.; Haynes, R. K.; Meade, J. C. Artemisinins inhibit Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei rhodesiense in vitro growth. Antimicrob. Agents Chemother. 2007, 51, 1852–1854, doi:10.1128/AAC.01544-06.
7. Loo, C. S. N.; Lam, N. S. K.; Yu, D.; Su, X. zhuan; Lu, F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. Pharmacol. Res. 2017, 117, 192–217, doi:10.1016/j.phrs.2016.11.012.
8. Frank, F. M.; Ulloa, J.; Cazorla, S. I.; Maravilla, G.; Malchiodi, E. L.; Grau, A.; Martino, V.; Catalán, C.; Muschietti, L. V. Trypanocidal activity of smallanthus sonchifolius: Identification of active sesquiterpene lactones by bioassay-guided fractionation. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013, 2013, 1–8, doi:10.1155/2013/627898.
9. 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.
10. 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.
11. dos Santos, A. O.; Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; da Veiga-Júnior, V. F.; Vataru Nakamura, C. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2013, 108, 59–64, doi:10.1590/S0074-02762013000100010.
12. Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Veiga, V. F.; Pinto, A. C.; Nakamura, C. V. Terpenes from copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. J. Med. Chem. 2012, 55, 2994–3001, doi:10.1021/jm201451h.
13. 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.
14. Mizuno, C. S.; Souza, A. B.; Tekwani, B. L.; Ambrósio, S. R.; Veneziani, R. C. S. Synthesis and biological evaluation of polyalthic acid derivatives for the treatment of neglected diseases. Bioorganic Med. Chem. Lett. 2015, 25, 5529–5531, doi:10.1016/j.bmcl.2015.10.062.
15. 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.
16. Van De Ven, H.; Ludwig, A.; Vermeersch, M.; Vandenbroucke, R. E.; Matheeussen, A.; Apers, S.; Weyenberg, W.; De, S. C. De; Cos, P.; Maes, L. Intracellular drug delivery in Leishmania-infected macrophages : evaluation of saponin-loaded PLGA nanoparticles. J. Drug Target. 2011, 32, 1–13, doi:10.3109/1061186X.2011.595491.
17. Andrade-Neto, V. V.; Cunha-Júnior, E. F.; Do Canto-Cavalheiro, M. M.; Atella, G. C.; De Almeida Fernandes, T.; Costa, P. R. R.; Torres-Santos, E. C. Antileishmanial activity of ezetimibe: Inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles, and efficacy in experimental cutaneous leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 2016, 60, 6844–6852, doi:10.1128/AAC.01545-16.
18. Merschjohann, K.; Sporer, F.; Steverding, D.; Wink, M. Karin Merschjohann 1 , Frank Sporer 2 , Dietmar Steverding 1 , Michael Wink 2, *. Planta Med. 2001, 67, 623–627.

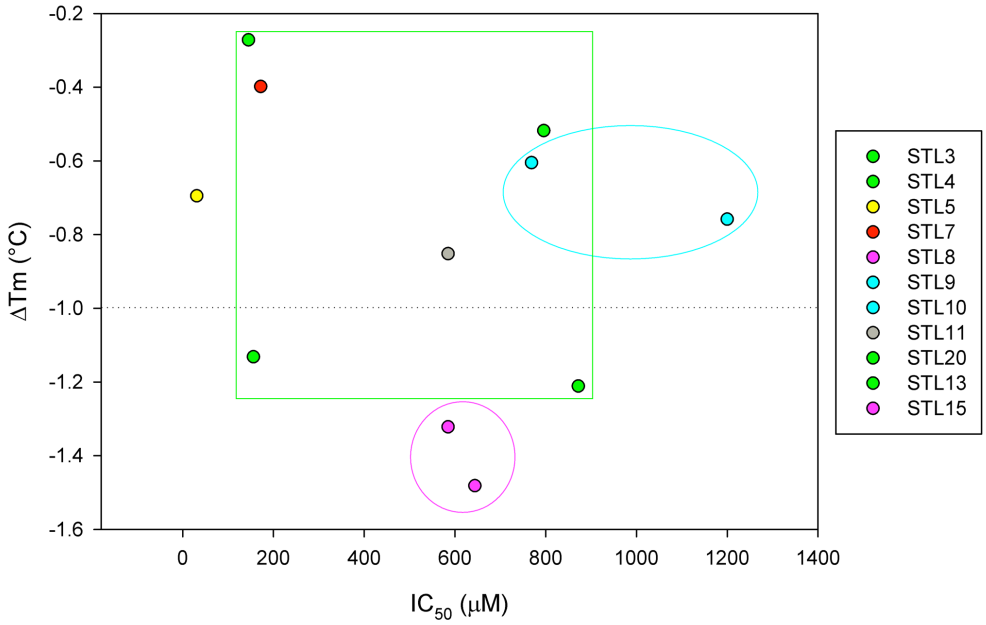
19. Muhammad, I.; Dunbar, D. C.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Bedir, E.; Takamatsu, S.; Ferreira, D.; Walker, L. A. Antiparasitic alkaloids from Psychotria klugii. J. Nat. Prod. 2003, 66, 962–967, doi:10.1021/np030086k.
20. Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T. J.; Tosun, F.; Rüedi, 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, 1352–64, doi:10.1128/AAC.50.4.1352-1364.2006.
21. 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.
22. 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.
23. Koide, T.; Nose, M.; Inoue, M.; Ogihara, Y.; Yabu, Y.; Ohta, N. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. Planta Med 1998, 64, 27–30, doi:10.1055/s-2006-957360.
24. 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.
25. 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.
26. Mai, L. H.; Chabot, G. G.; Grellier, P.; Quentin, L.; Dumontet, V.; Poulain, C.; Espindola, L. S.; Michel, S.; Vo, H. T. B.; Deguin, B.; Grougnet, R. Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Caledonian Gardenia species (Rubiaceae). Eur. J. Med. Chem. 2015, 93, 93–100, doi:10.1016/j.ejmech.2015.01.012.
27. Jordão, C. O.; Vichnewski, W.; de Souza, G. E. P.; Albuquerque, S.; Lopes, J. L. C. Trypanocidal activity of chemical constituents fromLychnophora salicifolia Mart. Phyther. Res. 2004, 18, 332–334, doi:10.1002/ptr.1366.
28. Ribeiro, T. G.; Nascimento, A. M.; Henriques, B. O.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Franca, J. R.; Duarte, M. C.; Lage, P. S.; Andrade, P. H. R.; Lage, D. P.; Rodrigues, L. B.; Costa, L. E.; Martins, V. T.; Faraco, A. A. G.; Coelho, E. A. F.; Castilho, R. O. Antileishmanial activity of standardized fractions of Stryphnodendron obovatum (Barbatimão) extract and constituent compounds. J. Ethnopharmacol. 2015, 165, 238–242, doi:10.1016/j.jep.2015.02.047.
29. 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.

APÊNDICE T – Experimento *Thermofluor*: gráfico mostrando IC_{50} *vs.* ΔT_m para as onze STLs na concentração de 1.000 µM. As cores foram atribuídas de acordo com o subtipo de esqueleto das STLs: verde para furanoheliangolido (STLs 3, 4, 13 e 20), amarelo para glaucolido (STL5), vermelho para heliangolido (STL7), rosa para melampolido (STLs 8 e 15), ciano para eremantolido (STLs 9 and 10) e cinza para guaianolido (STL11).



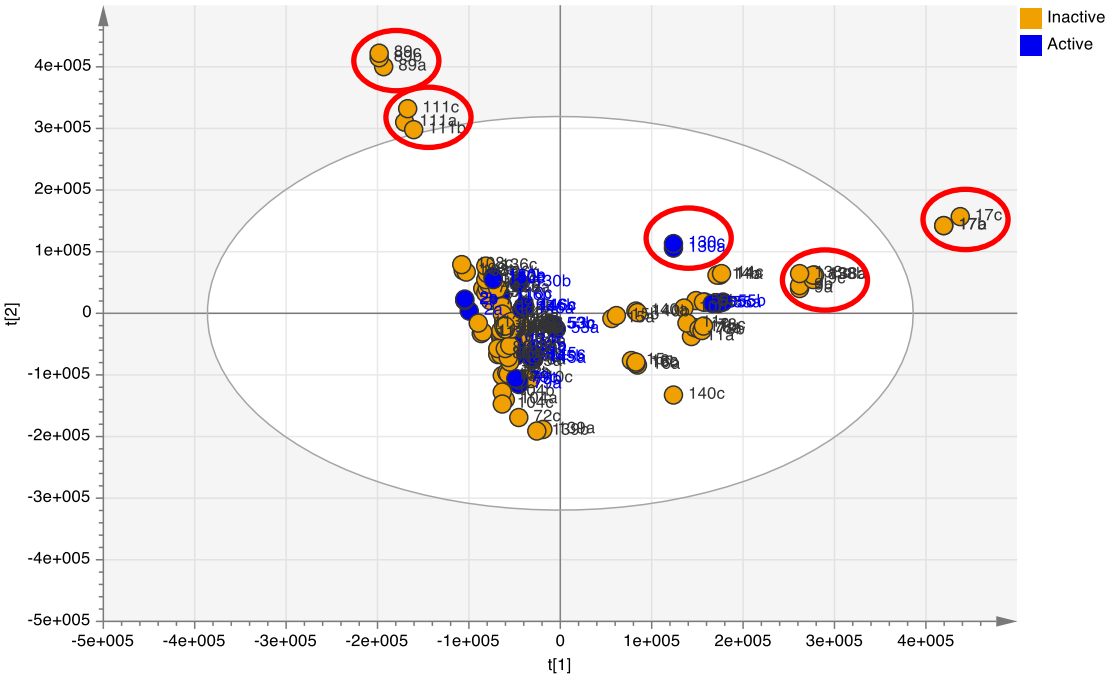
Fonte: o próprio autor (figura gerada no software Excel).

APÊNDICE U – Experimento *ThermoFMN*: gráfico mostrando IC_{50} *vs.* ΔT_m para as onze STLs na concentração de 1.000 µM. As cores foram atribuídas de acordo com o subtipo de esqueleto das STLs: verde para furanoheliangolido (STLs 3, 4, 13 e 20), amarelo para glaucolido (STL5), vermelho para heliangolido (STL7), rosa para melampolido (STLs 8 e 15), ciano para eremantolido (STLs 9 and 10) e cinza para guaianolido (STL11).



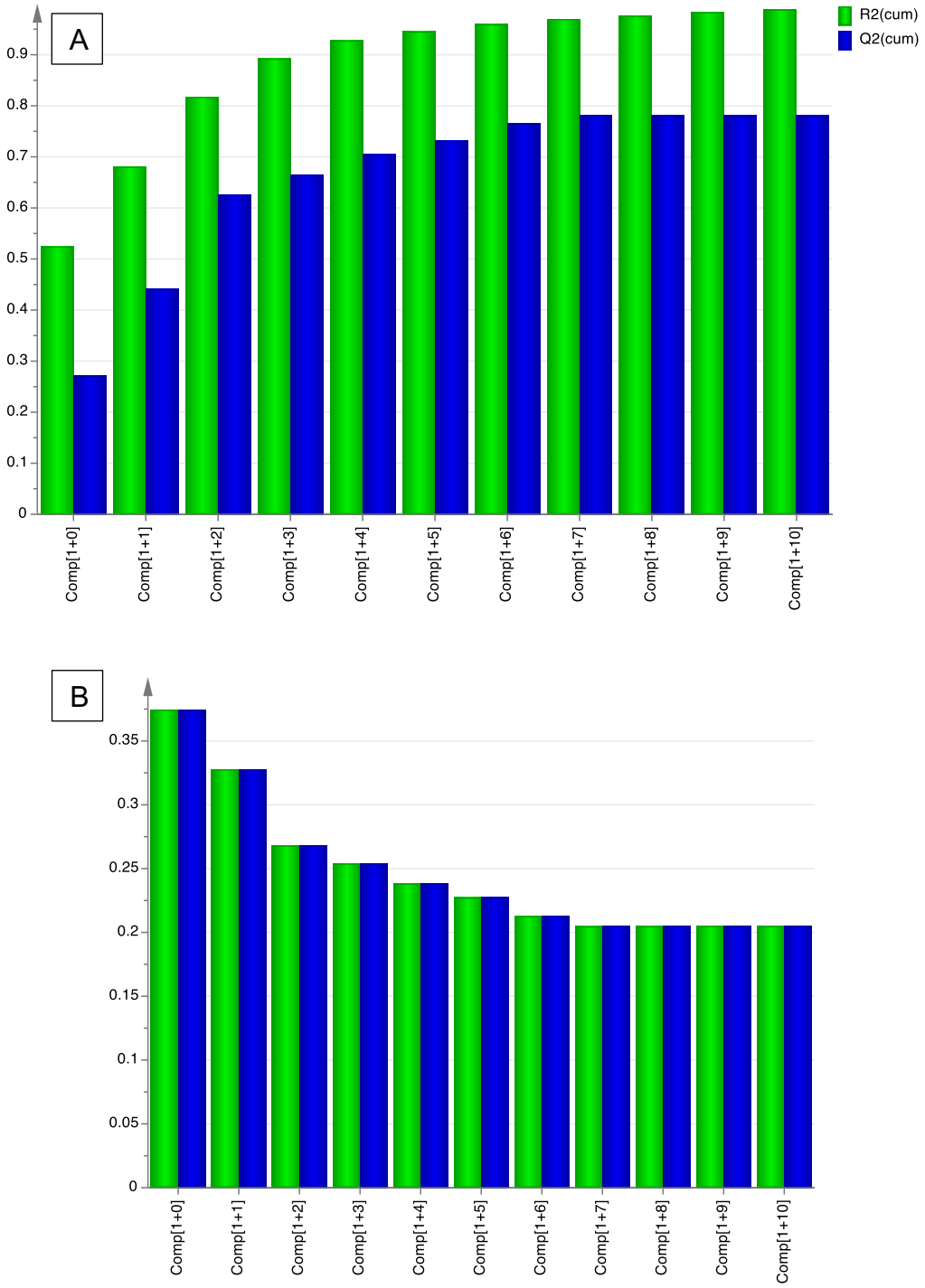
Fonte: o próprio autor (figura gerada no software Excel).

APÊNDICE V – PCA com as variáveis *x* das 59 amostras (em triplicata, modo positivo): gráfico dos valores de *score* (t) da PC-1 (13%) *vs* PC-2 (9%). Amostras ativas (azul): IC_{50} < 500 mg.ml^{-1}, amostras inativas (alaranjado): IC_{50} > 500 mg.ml^{-1}. Elipse de tolerância (*Hotellings* T^2) estabelecida com α = 0,01. Demarcações em vermelho destacam algumas amostras com suas réplicas, demonstrando a repetitividade das análises.



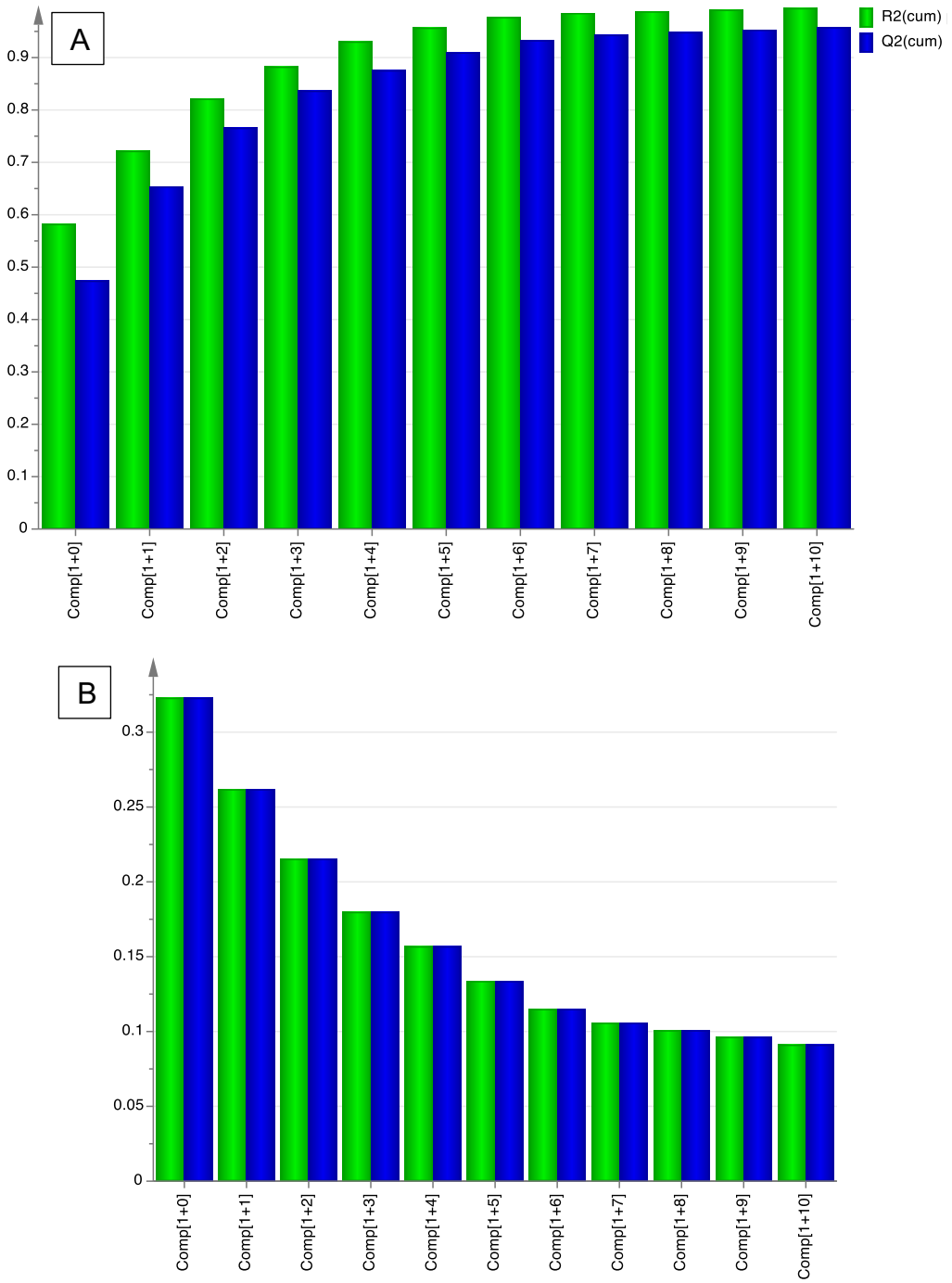
Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE X – Gráfico dos valores acumulativos de R^2 e Q^2 (A) e de $RMSE_{CV}$ (B) nas dez primeiras componentes do modelo de OPLS com os dados no modo de ionização negativo



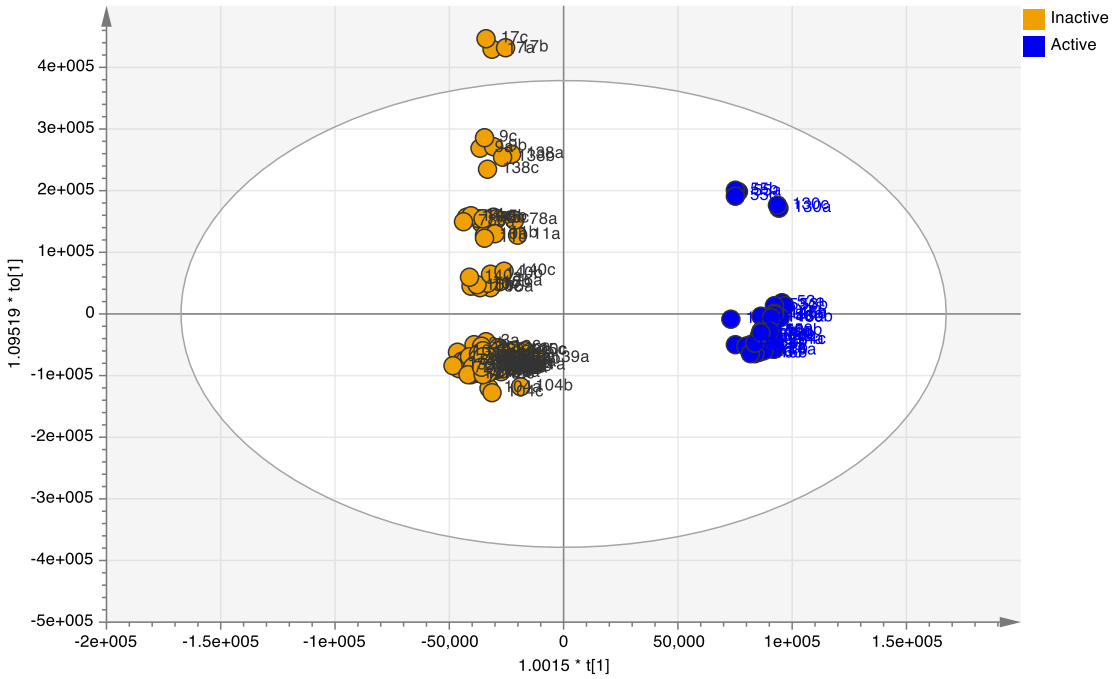
Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE Y – Gráfico dos valores acumulativos de R^2 e Q^2 (A) e de $RMSE_{CV}$ (B) nas dez primeiras componentes do modelo de OPLS com os dados no modo de ionização positivo



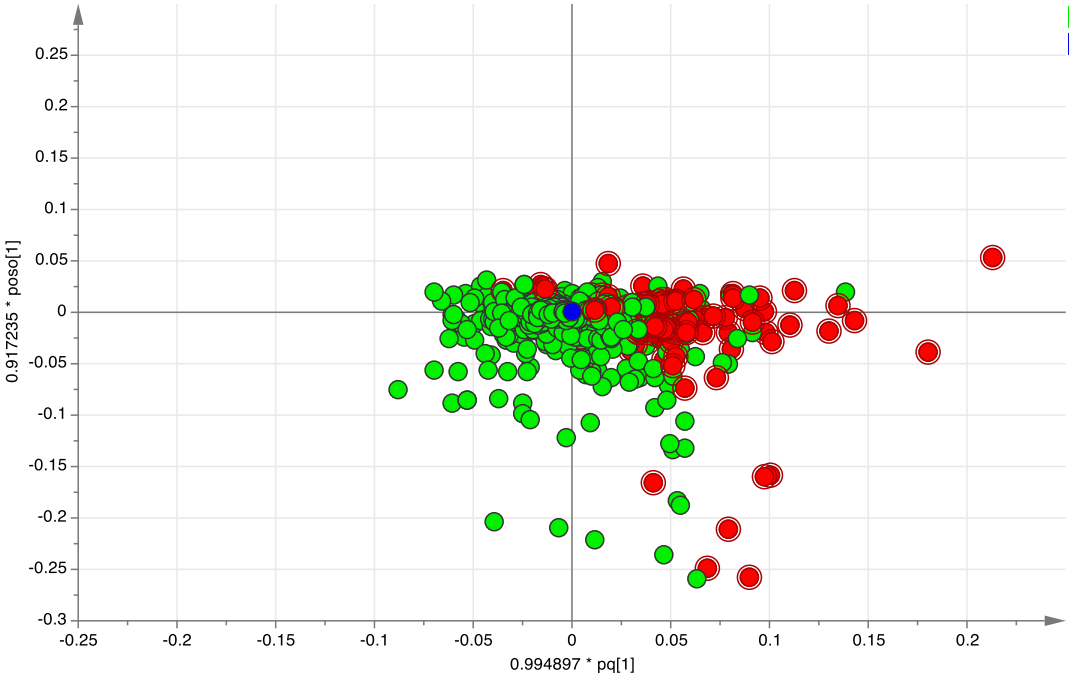
Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE Z – OPLS com as variáveis *x* e *y* das amostras (em triplicata, modo positivo): gráfico dos valores de *score* (t) da LV-1 (58%, única componente preditiva) *vs* LV-2 (14%, componente ortogonal-1). Amostras ativas (azul): IC_{50} < 500 $mg.ml^{-1}$, amostras inativas (alaranjado): IC_{50} > 500 $mg.ml^{-1}$. Elipse de tolerância (*Hotellings* T^2) estabelecida com α = 0,01.



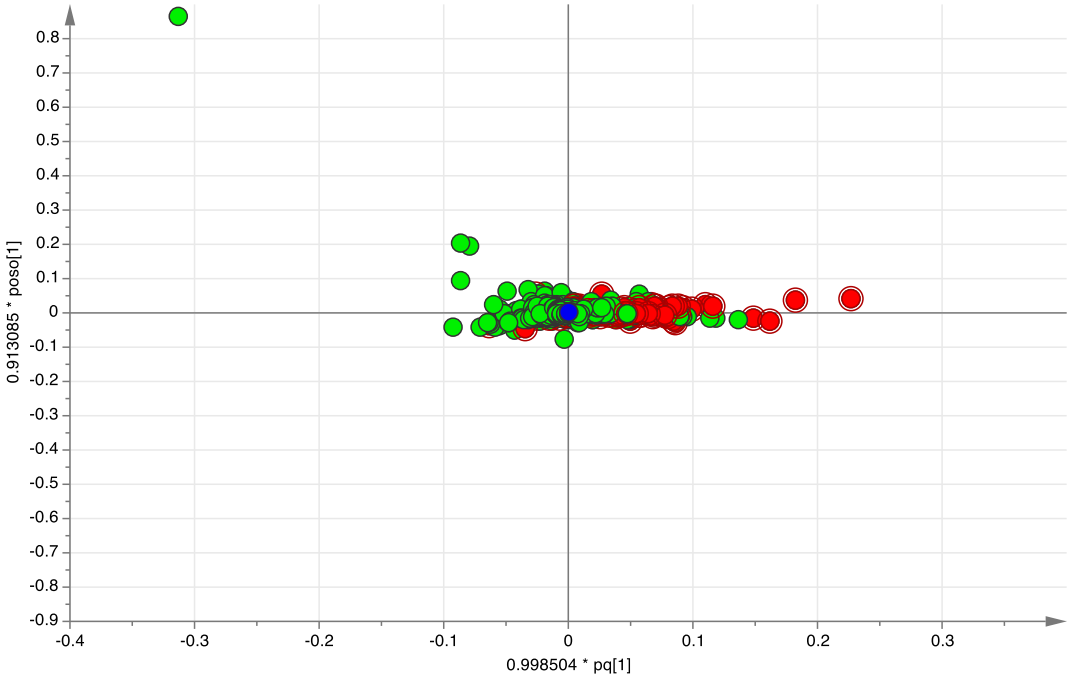
Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE AA – OPLS das amostras, em triplicata (modo negativo): gráfico dos valores de *loading* das variáveis *x* (p) e y (q) para LV-1 (52%, única componente preditiva) *vs* LV-2 (16%, componente ortogonal-1). Em vermelho estão destacadas as 51 variáveis *x* consideradas discriminantes para a classe de extratos ativos, que foram estatisticamente significantes, constituindo possíveis biomarcadores.



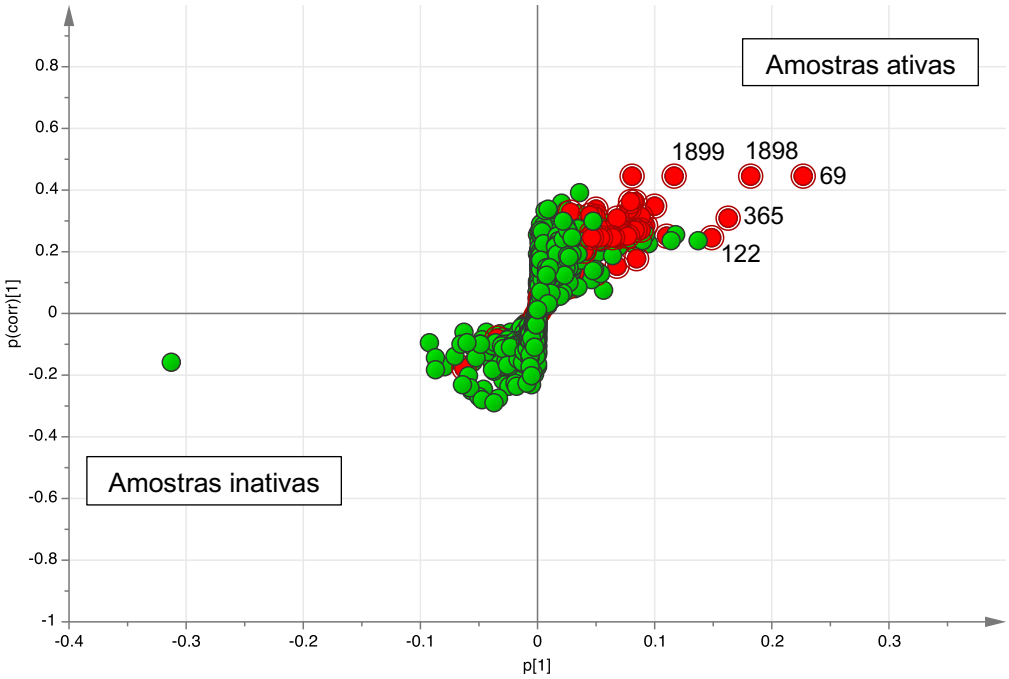
Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE AB – OPLS das amostras, em triplicata (modo positivo): gráfico dos valores de *loading* das variáveis *x* (p) e y (q) para LV-1 (58%, única componente preditiva) *vs* LV-2 (14%, componente ortogonal-1). Em vermelho estão destacadas as 30 variáveis x consideradas discriminantes para a classe de extratos ativos, que foram estatisticamente significantes, constituindo possíveis biomarcadores.



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE AC – *S-plot* da análise por OPLS-DA das amostras, em triplicata, no modo de ionização positivo. Em vermelho estão destacadas as 30 variáveis *x* discriminantes para a classe de extratos ativos, e que foram estatisticamente significantes, constituindo possíveis biomarcadores. Algumas delas estão identificadas com seus respectivos códigos.



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE AD (continua) – Biomarcadores correlacionados com a inibição da enzima *Lm*DHODH (modo de ionização negativo)

ID[a]	Coeficiente[b]	VIP[b]	t_R (min)	m/z[c] $[M-H]^-$	Erro de massa (ppm)[d]	FM[e]	Desreplicação		
							Identidade[f]	Nível[g]	Amostra[h]
709	4,34E-06	5,24	8,66	187,0968632	0,908	$C_9H_{16}O_4$	FAT; PKT (0/35/5076/1549)	3	18/18; 35/41
455	4,33E-06	1,16	9,67	367,1037916	2,403	$C_{17}H_{20}O_9$	ácido 3-*O*-cafeoil-2-(2-butil)-2-hidroxibutanodióico	1	18/18; 32/41
72	4,03E-06	1,71	11,80	327,2179726	2,509	$C_{18}H_{32}O_5$	FAT; PKT (0/58/551/128)	3	18/18; 34/41
300	3,75E-06	8,39	15,25	283,0615893	3,312	$C_{16}H_{12}O_5$	genkwanina	1	14/18; 22/41
362	3,47E-06	1,82	5,88	121,0284278	4,315	$C_7H_6O_2$	SBA; PKT (1/6/382/95)[i]	3	18/18; 33/41
117	3,11E-06	7,15	10,95	285,0407623	2,969	$C_{15}H_{10}O_6$	luteolina	1	18/18; 34/41
414	2,86E-06	1,63	8,40	461,0733576	2,936	$C_{21}H_{18}O_{12}$	PHE/PPR-COU; FLA heterosídeo (3/28/89/57)	3	18/18; 36/41
54	2,75E-06	2,60	1,08	191,0555007	0,325	$C_7H_{12}O_6$	ácido quínico	1	18/18; 36/41
1364	2,62E-06	4,64	7,46	443,0624135	2,201	$C_{21}H_{16}O_{11}$	PKT/APK; FLA (0/2/15/8)	3	01/18; 00/41
973	2,51E-06	2,17	11,07	207,0658378	0,499	$C_{11}H_{12}O_4$	n.i. (2/165/4589/2062)	4	18/18; 33/41
418	2,39E-06	2,24	9,88	609,1255268	1,797	$C_{30}H_{26}O_{14}$	FLA acilado heterosídeo (0/29/96/42)	3	16/18; 30/41
1505	2,33E-06	3,08	1,06	387,1148912	2,642	$C_{13}H_{24}O_{13}$	n.i. (0/0/1/1)	4	18/18; 34/41
791	2,32E-06	1,98	8,37	477,1041310	1,736	$C_{22}H_{22}O_{12}$	FLA/FOL,FNE heterosídeo (3/95/224/149)	3	18/18; 34/41
386	2,29E-06	3,79	10,62	269,0456934	2,573	$C_{15}H_{10}O_5$	PKT/APK; FLA (2/165/672/260)	3	18/18; 33/41
673	2,29E-06	1,13	8,40	461,0733924	3,011	$C_{21}H_{18}O_{12}$	PHE/PPR-COU; FLA heterosídeo (3/28/89/57)	3	18/18; 36/41
309	2,23E-06	1,58	8,32	477,1041835	1,846	$C_{22}H_{22}O_{12}$	FLA/FOL,FNE heterosídeo (3/95/224/149)	3	18/18; 35/41
954	2,13E-06	2,37	6,29	467,1198278	1,872	$C_{21}H_{24}O_{12}$	PHE/PPR-CID; FLA heterosídeo (0/16/80/34)	3	17/18; 25/41
1088	2,08E-06	2,09	1,20	191,0194375	1,353	$C_6H_8O_7$	OAC (1/10/202/79)[j]	3	18/18; 35/41
227	2,07E-06	3,78	8,58	187,0968774	0,832	$C_9H_{16}O_4$	FAT; PKT (0/35/5076/1550)	3	18/18; 36/41
756	2,02E-06	3,01	6,76	755,1829359	0,789	$C_{36}H_{36}O_{18}$	FLA/FOL,FNE acilado heterosídeo (0/27/65/35)	3	01/18; 03/41
1086	2,01E-06	4,32	1,18	317,0550786	4,801	$C_{15}H_{12}O_7N$	n.i. (0/0/0/1)	4	18/18; 33/41
236	1,97E-06	1,21	10,45	531,1152390	2,580	$C_{25}H_{24}O_{13}$	FLA heterosídeo (0/17/54/21)	3	17/18; 26/41
679	1,96E-06	1,07	11,20	409,1870597	1,991	$C_{21}H_{30}O_8$	STL/FHL,GER,EUD (6/58/290/75)	3	18/18; 30/41
124	1,96E-06	1,43	1,10	165,0396287	1,712	$C_5H_{10}O_6$	SAC/MSA (0/5/95/45)	3	18/18; 35/41
484	1,90E-06	1,36	9,08	475,0887207	2,247	$C_{22}H_{20}O_{12}$	FLA heterosídeo (2/32/109/40)	3	17/18; 34/41
1365	1,90E-06	3,36	7,77	445,0783138	2,751	$C_{21}H_{18}O_{11}$	PHE/PPR-COU; FLA/FNE heterosídeo (2/16/96/49)	3	18/18; 31/41

APÊNDICE AD (conclusão) – Biomarcadores correlacionados com a inibição da enzima *Lm*DHODH (modo de ionização negativo)

ID[a]	Coeficiente[b]	VIP[b]	t_R (min)	m/z[c] $[M-H]^-$	Erro de massa (ppm)[d]	FM[e]	Desreplicação		
							Identidade (número de *hits* nos bancos de dados)[f]	Nível[g]	Amostra[h]
562	1,82E-06	2,34	15,84	305,1762565	3,175	$C_{18}H_{26}O_4$	TER/SQT,DIT (0/63/3478/700)	3	15/18; 28/41
17	1,82E-06	1,88	8,80	515,1196270	1,309	$C_{25}H_{24}O_{12}$	ácido 4,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico	1	18/18; 37/41
1523	1,80E-06	1,98	4,91	299,0776277	3,117	$C_{13}H_{16}O_8$	SBA heterosídeo; PHE/PPR-CID (0/13/187/52)	3	17/18; 31/41
293	1,80E-06	3,61	11,47	315,0515368	3,351	$C_{16}H_{12}O_7$	3-*O*-metilquercetina	1	18/18; 33/41
239	1,80E-06	1,17	5,77	311,0777995	3,547	$C_{14}H_{16}O_8$	ácido 4-*O*-cafeoil-2-C-metil-D-eritrônico	1	01/18; 00/41
1531	1,77E-06	1,79	10,83	362,2189026	2,822	$C_{17}H_{33}O_7N$	n.i. (0/0/42/6)	4	01/18; 00/41
235	1,70E-06	1,11	10,92	547,1468603	1,798	$C_{29}H_{26}O_{10}N$	n.i. (0/0/02)	4	14/18; 22/41
325	1,67E-06	4,75	17,53	441,2859853	1,711	$C_{24}H_{42}O_7$	FAT heterosídeo (0/4/171/34)	3	01/18; 00/41
1574	1,62E-06	1,78	9,63	611,2355717	2,598	$C_{29}H_{40}O_{14}$	TER/DIT heterosídeo (0/7/36/11)	3	15/18; 28/41
1506	1,59E-06	2,17	1,07	341,1091216	2,149	$C_{12}H_{22}O_{11}$	SAC/OSA (2/170/901/491)	3	18/18; 34/41
324	1,57E-06	5,70	8,71	507,1512352	1,936	$C_{24}H_{28}O_{12}$	n.i. (0/26/102/24)	4	18/18; 33/41
1546	1,53E-06	2,36	11,11	459,0937603	2,225	$C_{22}H_{20}O_{11}$	FLA heterosídeo (1/19/102/38)[k]	3	15/18; 22/41
243	1,51E-06	1,60	10,61	533,1306687	2,158	$C_{25}H_{26}O_{13}$	PHE/SBA; FLA heterosídeo (0/28/112/39)	3	16/18; 24/41
1566	1,50E-06	1,93	8,80	551,2499018	1,204	$C_{28}H_{40}O_{11}$	TER/DIT heterosídeo (0/19/87/38)	3	17/18; 28/41
415	1,47E-06	2,30	5,82	341,1243649	2,111	$C_{16}H_{22}O_8$	PKT; TER/MOT,IRI,SQT glicosídeo (0/36/562/131)	3	18/18; 32/41
1555	1,46E-06	2,46	10,89	531,2241845	2,184	$C_{28}H_{36}O_{10}$	TER/SQT,DIT,TRT,STE (0/37/221/95)	3	13/18; 21/41
758	1,44E-06	2,08	7,89	755,1828134	0,627	$C_{36}H_{36}O_{18}$	FLA/FOL,FNE heterosídeo (0/27/65/35)	3	02/18; 03/41
957	1,43E-06	1,41	7,02	327,0879021	3,166	$C_{18}H_{16}O_6$	n.i. (2/254/1743/682)	4	01/18; 00/41
326	1,41E-06	3,94	10,42	521,1667887	1,699	$C_{25}H_{30}O_{12}$	n.i. (0/41/119/41)	4	01/18; 01/41
696	1,39E-06	3,32	8,87	485,0721092	0,223	$C_{23}H_{18}O_{12}$	FLA/FVN acilado (0/2/15/5)	3	17/18; 32/41
761	1,38E-06	2,05	6,63	223,0246332	1,652	$C_{10}H_8O_6$	PKT; PHE/SBA,PPR (0/17/251/96)	3	11/18; 23/41
1608	1,34E-06	5,29	9,22	253,0509761	3,512	$C_{15}H_{10}O_4$	FLA (0/83/720/295)	3	16/18; 34/41
1316	1,33E-06	2,20	1,49	351,0727473	3,238	$C_{16}H_{16}O_9$	PHE/PPR-CID,LIG,COU heterosídeo (0/6/83/37)	3	18/18; 34/41
1508	1,32E-06	1,29	6,81	545,1879466	1,677	$C_{24}H_{34}O_{14}$	PHE/SBA,PPR heterosídeo (0/2/30/4)	3	16/18; 28/41
169	1,32E-06	3,22	12,50	299,0565070	3,146	$C_{16}H_{12}O_6$	hispidulina	1	17/18; 31/41

Fonte: o próprio autor.

[a]Código de identificação das variáveis *x*, gerado no software MZmine durante o processamento dos dados de LC-MS.

[b]As variáveis estão distribuídas na tabela por ordem decrescente do seu coeficiente de regressão, que expressa diretamente sua correlação com a variável *y*. Constam aqui somente aquelas variáveis cujo intervalo de confiança do seu coeficiente não incluiu o valor zero e o VIP foi superior a 1,0.
[c]Valor de massa acurada (experimental) correspondente à média do valor da variável ao longo de todas amostras nas quais foi identificada. $[M-H]^-$: massa experimental no modo negativo, ou seja, subtraída do valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da); $[M+H]^+$: massa experimental no modo positivo, ou seja, acrescida ao valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da).
[d]Exatidão de massa relativa (erro em ppm) calculada por meio da diferença entre os valores de massa acurada (experimental) e massa exata monoisotópica (calculada a partir da fórmula molecular no ChemCalc[261]. As variáveis cujo erro de massa foi superior a 5 ppm foram desconsideradas.
[e]Fórmula molecular obtida por meio da massa acurada, utilizando o ChemCalc.
[f]Nome usual ou classe/subclasse das substâncias atribuídas às respectivas variáveis de acordo com o nível de identificação alcançado. FAT: ácido graxo; PKT: policetídeo (APK: policetídeo aromático); PHE: polifenol (SBA: ácido benzoico simples, PPR: fenilpropanoide, CID: derivado do ácido cinâmico, COU: cumarina, LIG: lignana); FLA: flavonoide (FNE: flavona, FOL: flavonol, FVN: flavanona); TER: terpeno (MOT: monoterpeno, IRI: iridoide, SQT: sesquiterpeno, DIT: diterpeno, TRT: triterpeno, STE: esteroide, STL: lactona sesquiterpênica – ERE: eremantolido, EUD: eudesmanolido, FHL: furanoheliangolido, GER: germacrolido, GLA: glaucolido, GUA: guaianolido, HEL: heliangolido, MEL: melampolido); SAC: sacarídeo (MSA: monossacarídeo, OSA: oligossacarídeo, PSA: polissacarídeo); OAC: ácido orgânico. Entre parênteses estão, respectivamente, os números de *hits* na biblioteca de substâncias isoladas AsterLibl e nos bancos de dados AsterDB, DNP, SciFinder e ChemSpyder.
[g]Níveis de identificação[109]: 1 – substância identificada por meio de um banco de dados *in house* contendo as informações de t_R e massa monoisotópica em alta resolução de 120 substâncias pertencentes à biblioteca de substâncias isoladas da família Asteraceae (AsterLib I), as quais foram injetadas no mesmo método de análise dos extratos. Confirmação da identidade por padrão de fragmentação dos espectros de MS/MS; 2 – substância putativamente anotada a partir do nosso banco de dados *in house* AsterDB[121] e dos bancos de dados online do *DNP*[162], *SciFinder*[163] e *ChemSpyder*[164], com base na massa monoisotópica em alta resolução e dados espectrais/físico-químicos, sem padrões químicos de referência; 3 – classe da substância anotada putativamente a partir dos bancos de dados citados anteriormente, sendo esta baseada unicamente na fórmula molecular (massa monoisotópica em alta resolução); 4 – substância não identificada (n.i.).
[h]No conjunto de 59 extratos, 18 foram considerados ativos (IC_{50} < 500 $\mu g.ml^{-1}$) e 41 inativos (IC_{50} > 500 $\mu g.ml^{-1}$).
[i]Variável 362 obteve somente um *hit* no nosso banco de dados *in house* AsterDB: 3-hidroxibenzaldeído.
[j]Variável 1088 obteve somente um *hit* no nosso banco de dados *in house* AsterDB: ácido cítrico.
[k]Variável 1546 obteve somente um *hit* no nosso banco de dados *in house* AsterDB: apigenina 7-*O*-*β*-D-metilglicuronosídeo.

APÊNDICE AE (continua) – Biomarcadores correlacionados com a inibição da enzima *Lm*DHODH (modo de ionização positivo)

ID[a]	Coeficiente[b]	VIP[b]	t_R (min)	m/z[c] $[M+H]^+$	Erro de massa (ppm)[d]	FM[e]	Desreplicação		
							Identidade[f]	Nível[g]	Amostra[h]
1073	6.21E-06	1.65	1.16	250.1651123	1.347	$C_{11}H_{23}O_5N$	n.i. (0/0/413/176)	4	18/18; 41/41
120	3.82E-06	2.52	1.10	162.1126844	2.073	$C_7H_{15}O_3N$	n.i. (0/0/2847/1419)	4	15/18; 37/41
365	3.78E-06	7.36	11.25	317.0655927	1.693	$C_{16}H_{12}O_7$	PHE/SBA,PPR-CID; FLA (7/111/366/138)	3	18/18; 41/41
1666	2.83E-06	1.03	7.32	473.2010692	2.579	$C_{22}H_{32}O_{11}$	PKT/APK glycoside (0/7/56/13)	3	18/18; 41/41
299	2.79E-06	3.78	1.33	146.0811951	3.606	$C_6H_{11}O_3N$	n.i. (0/0/2303/1468)	4	18/18; 41/41
81	2.57E-06	1.17	1.12	236.1495183	1.188	$C_{10}H_{21}O_5N$	n.i. (0/0/592/181)	4	18/18; 41/41
7	2.33E-06	1.74	1.29	130.0865408	2.036	$C_6H_{11}O_2N$	n.i. (0/0/2622/1674)	4	18/18; 38/41
1900	2.32E-06	1.95	29.75	609.2707699	1.311	$C_{34}H_{40}O_{10}$	n.i. (0/13/75/17)	4	18/18; 41/41
77	2.20E-06	4.33	8.66	163.0390693	2.776	$C_9H_6O_3$	COU [i]; PKT/APK (1/16/330/133)	3	18/18; 41/41
895	1.88E-06	2.63	10.85	625.1553978	0.533	$C_{31}H_{28}O_{14}$	FLA acylated glycosides (0/30/59/28)	3	18/18; 41/41
302	1.87E-06	1.21	12.79	577.1556702	0.105	$C_{27}H_{28}O_{14}$	FLA acylated glycosides (0/16/36/25)	3	15/18; 37/41
1464	1.86E-06	1.23	8.31	366.1760783	0.899	$C_{15}H_{27}O_9N$	n.i. (0/0/56/9)	4	01/18; 00/41
122	1.85E-06	6.68	14.33	315.0864402	1.347	$C_{17}H_{14}O_6$	n.i. (6/223/1193/491)	4	18/18; 41/41
797	1.84E-06	1.09	18.47	304.3000741	1.157	$C_{21}H_{37}N$	n.i. (0/0/195/30)	4	18/18; 40/41
508	1.83E-06	3.74	1.09	268.1041584	3.433	$C_9H_{17}O_8N$	n.i. (0/0/74/41)	4	18/18; 41/41
1948	1.81E-06	3.52	13.36	405.1544709	1.168	$C_{21}H_{24}O_8$	n.i. (5/79/665/182)	3	18/18; 41/41
178	1.78E-06	2.24	12.48	301.0707805	1.442	$C_{16}H_{12}O_6$	Hesperetin	1	14/18; 22/41
500	1.71E-06	1.21	2.90	188.0709361	1.162	$C_{11}H_9O_2N$	n.i. (0/0/25201364)	4	18/18; 41/41
1300	1.69E-06	1.77	8.30	287.0550827	1.679	$C_{15}H_{10}O_6$	FLA; PKT/APK (6/155/455/175)	3	18/18; 41/41
301	1.68E-06	1.08	7.61	451.1228896	2.548	$C_{21}H_{22}O_{11}$	n.i. (2/99/226/175)	4	18/18; 41/41
1669	1.65E-06	3.75	21.61	391.2115412	1.339	$C_{22}H_{30}O_6$	n.i. (1/167/1359/414)	4	18/18; 41/41
1780	1.62E-06	3.09	11.23	318.0691627	3.416	$C_{23}H_9O_2$	n.i. (0/0/0/0)	4	07/18; 11/30
1670	1.55E-06	3.53	18.42	426.2493403	0.383	$C_{22}H_{35}O_7N$	n.i. (0/0/124/27)	4	09/18; 11/41
1949	1.49E-06	2.91	16.45	465.1755068	1.218	$C_{23}H_{28}O_{10}$	TER/DIT,SQT; STL (11/38/227/73)	3	18/18; 41/41
280	1.48E-06	2.30	8.28	287.0550667	1.735	$C_{15}H_{10}O_6$	FLA; PKT/APK (6/155/455/175)	3	18/18; 41/41

APÊNDICE AE (conclusão) – Biomarcadores correlacionados com a inibição da enzima *Lm*DHODH (modo de ionização positivo)

ID[a]	Coeficiente[b]	VIP[b]	t_R (min)	m/z[c] $[M+H]^+$	Erro de massa (ppm)[d]	FM[e]	Desreplicação		
							Identidade (número de *hits* nos bancos de dados)[f]	Nível[g]	Amostra[h]
75	1.45E-06	3.84	8.70	517.1344762	0.242	$C_{25}H_{24}O_{12}$	PHE/PPR-CID[j]; FLA glycosides (2/27/168/100)	3	18/18; 37/41
1681	1.39E-06	1.92	10.05	163.0389946	3.236	$C_9H_6O_3$	COU[k]; PKT/APK (1/16/330/133)	3	18/18; 39/41
74	1.37E-06	2.71	16.97	345.0968634	1.640	$C_{18}H_{16}O_7$	n.i. (4/225/849/335)	4	15/18; 28/41
1951	1.27E-06	2.48	13.47	445.1478031	4.625	$C_{23}H_{24}O_9$	n.i. (0/28/294/68)	4	09/18; 10/41
1671	1.23E-06	3.00	16.69	349.2003503	3.299	$C_{20}H_{28}O_5$	n.i. (7/690/2210/623)	4	12/21; 21/41

Fonte: o próprio autor.

[a]Código de identificação das variáveis *x*, gerado no software MZmine durante o processamento dos dados de LC-MS.

[b]As variáveis estão distribuídas na tabela por ordem decrescente do seu coeficiente de regressão, que expressa diretamente sua correlação com a variável *y*. Constam aqui somente aquelas variáveis cujo intervalo de confiança do seu coeficiente não incluiu o valor zero e o VIP foi superior a 1,0.

[c]Valor de massa acurada (experimental) correspondente à média do valor da variável ao longo de todas amostras nas quais foi identificada. $[M-H]^-$: massa experimental no modo negativo, ou seja, subtraída do valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da); $[M+H]^+$: massa experimental no modo positivo, ou seja, acrescida ao valor de um H^+ monoisotópico (1,007825 Da).

[d]Exatidão de massa relativa (erro em ppm) calculada por meio da diferença entre os valores de massa acurada (experimental) e massa exata monoisotópica (calculada a partir da fórmula molecular no ChemCalc[261]. As variáveis cujo erro de massa foi superior a 5 ppm foram desconsideradas.

[e]Fórmula molecular obtida por meio da massa acurada, utilizando o ChemCalc.

[f]Nome usual ou classe/subclasse das substâncias atribuídas às respectivas variáveis de acordo com o nível de identificação alcançado. FAT: ácido graxo; PKT: policetídeo (APK: policetídeo aromático); PHE: polifenol (SBA: ácido benzoico simples, PPR: fenilpropanoide, CID: derivado do ácido cinâmico, COU: cumarina, LIG: lignana); FLA: flavonoide (FNE: flavona, FOL: flavonol, FVN: flavanona); TER: terpeno (MOT: monoterpeno, IRI: iridoide, SQT: sesquiterpeno, DIT: diterpeno, TRT: triterpeno, STE: esteroide, STL: lactona sesquiterpênica – ERE: eremantolido, EUD: eudesmanolido, FHL: furanoheliangolido, GER: germacrolido, GLA: glaucolido, GUA: guaianolido, HEL: heliangolido, MEL: melampolido); SAC: sacarídeo (MSA: monossacarídeo, OSA: oligossacarídeo, PSA: polissacarídeo); OAC: ácido orgânico. Entre parênteses estão os números de *hits* na biblioteca de substâncias isoladas AsterLibI e nos bancos de dados AsterDB, DNP, SciFinder e ChemSpyder.

[g]Níveis de identificação[109]: 1 – substância identificada por meio de um banco de dados *in house* contendo as informações de t_R e massa monoisotópica em alta resolução de 120 substâncias pertencentes à biblioteca de substâncias isoladas da família Asteraceae (AsterLib I), as quais foram injetadas no mesmo método de análise dos extratos, Confirmação da identidade por padrão de fragmentação dos espectros de MS/MS; 2 – substância putativamente anotada a partir do nosso banco de dados *in house* AsterDB[121] e dos bancos de dados online do *DNP*[162], *SciFinder*[163] e *ChemSpyder*[164], com base na massa monoisotópica em alta resolução e dados espectrais/físico-químicos, sem padrões químicos de referência; 3 – classe da substância anotada putativamente a partir dos bancos de dados citados anteriormente, sendo esta baseada unicamente na fórmula molecular (massa monoisotópica em alta resolução); 4 – substância não identificada (n.i.).

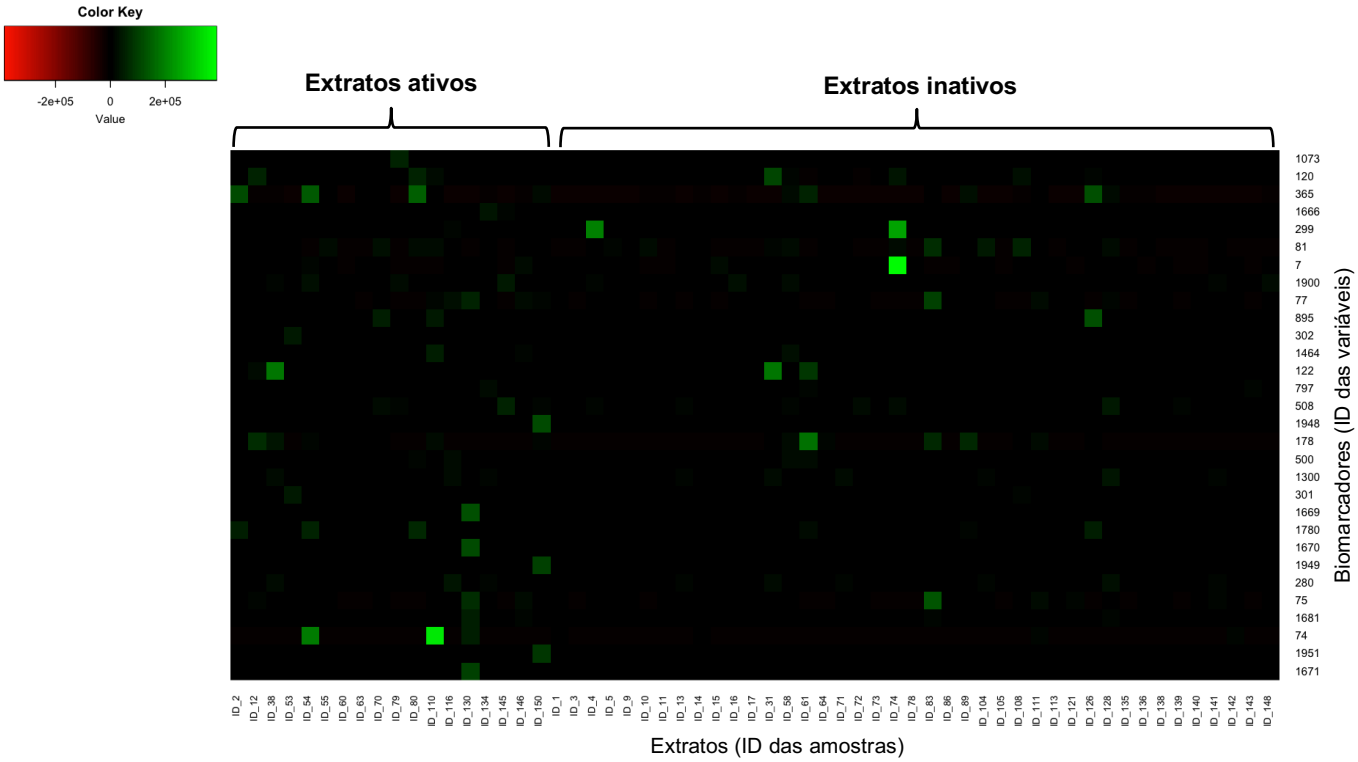
[h]No conjunto de 59 extratos, 18 foram considerados ativos (IC_{50} < 500 $\mu g.ml^{-1}$) e 41 inativos (IC_{50} > 500 $\mu g.ml^{-1}$).

[i]Variável 77 obteve somente dois *hits* no nosso banco de dados *in house* AsterDB: 4-umbeliferona e 4-hidroxicumarina.

[j]Variável 75 obteve somente dois *hits* no nosso banco de dados *in house* AsterDB: ácidos 3,4- e 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico.

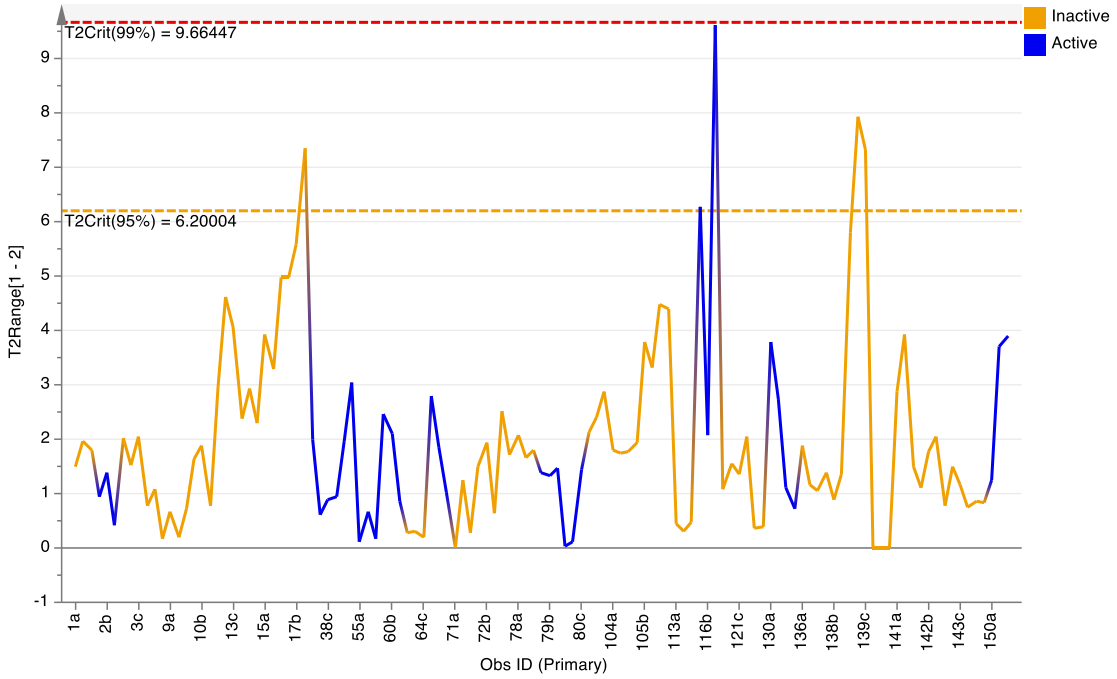
[k]Variável 1681 obteve somente dois *hits* no nosso banco de dados *in house* AsterDB: 4-umbeliferona e 4-hidroxicumarina.

APÊNDICE AF – Mapa de calor (*heatmap*) das 30 substâncias selecionadas como possíveis biomarcadores dos 59 extratos no modo de ionização positivo. Utilizou-se os valores de área dos picos (para identidade das amostras vide Tabela 1 e das variáveis discriminantes Apêndice AE), demonstrando que os biomarcadores apresentam maior área de picos nas amostras ativas (à esquerda) do que nas inativas (à direita). A escala de cores utilizada foi vermelho-verde, indicando menor-maior área sob os picos das substâncias nas amostras.



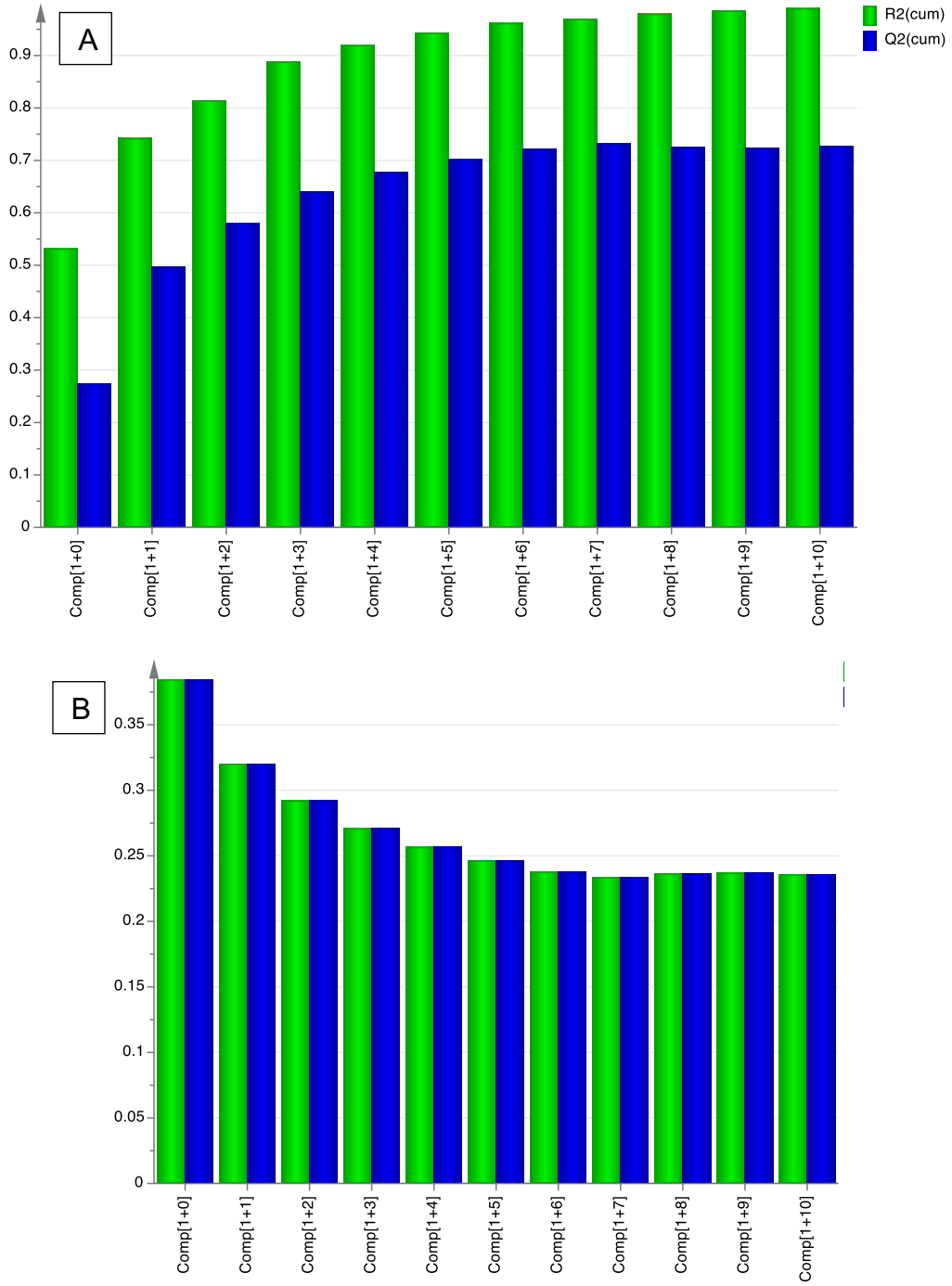
Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software R).

APÊNDICE AG – PCA com as variáveis *x* das amostras do conjunto treino (em triplicata, modo negativo): gráfico da faixa-T^2 (intervalo de confiança) definida por *Hotelling's* T^2 (teste-t multivariado do software SIMCA). Amostras que ultrapassam a linha vermelha (α = 0,01) são *outliers* que devem ser removidos do modelo. Amostras ativas (azul): IC_{50} < 500 mg.ml^{-1}, amostras inativas (alaranjado): IC_{50} > 500 mg.ml^{-1}.



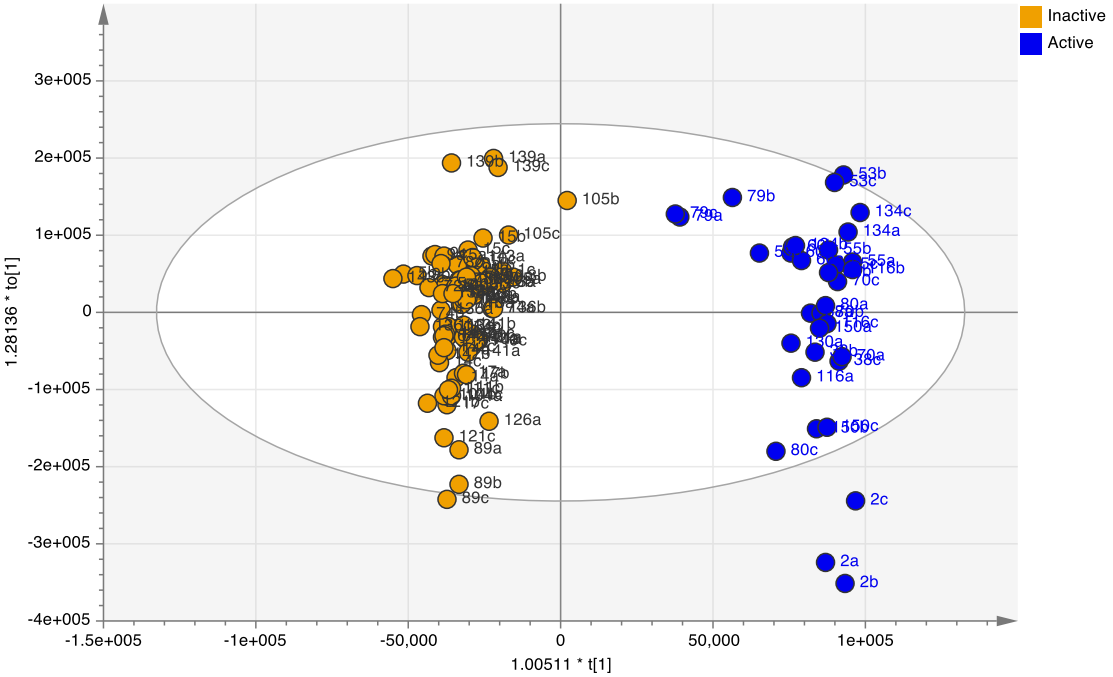
Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE AH – Gráfico dos valores acumulativos de R^2 e Q^2 (A) e de $RMSE_{CV}$ (B) nas dez primeiras componentes do modelo de OPLS para predição dos extratos ativos contra *Lm*DHODH.



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE AI – OPLS com as variáveis *x* e *y* das amostras do conjunto treino (em triplicata, modo negativo): gráfico dos valores de *score* (t) da LV-1 (53%, única componente preditiva) *vs* LV-2 (20%, componente ortogonal-1). Amostras ativas (azul): IC_{50} < 500 $mg.ml^{-1}$, amostras inativas (alaranjado): IC_{50} > 500 $mg.ml^{-1}$. Elipse de tolerância (*Hotellings* T^2) estabelecida com α = 0,01.



Fonte: o próprio autor (gráficos gerados no software SIMCA).

APÊNDICE AJ – Avaliação externa do modelo de QSAR expresso pela Equação 12: conjunto das seis substâncias e suas informações de descritores moleculares, teste de APD e atividade (valores de pIC_{50}).

Substância	Descritores			Teste de APD[a]			Atividade (pIC_{50})		
	vsurf_ID8	GCUT_ SLOGP_2	std_dim2	Domínio	APD	Resultado	Observado	Predito	Resíduo[b]
ALK2	1,21039	0,09017	1,74146	0,263	0,512	confiável	3,1	2,8	0,3
DIT1	1,17950	-0,03700	1,56251	0,391	0,512	confiável	4,5	3,6	0,9
DIT3	0,85427	-0,03700	1,53272	0,391	0,512	confiável	3,3	3,7	-0,4
DIT4	1,26249	0,12293	2,23382	0,233	0,512	confiável	2,8	3,1	-0,3
DIT6	1,02893	-0,01458	1,67673	0,242	0,512	confiável	3,2	3,6	-0,4
FLA2	0,35842	0,16510	1,79947	0,479	0,512	confiável	3,4	3,0	0,4

Fonte: o próprio autor.

[a]Teste de domínio de aplicabilidade (APD) baseado nas distâncias euclidianas entre as substâncias do conjunto treino e de avaliação externa; APD: limite do domínio de aplicabilidade do modelo, sendo APD = d + Zσ, onde d e σ são a média e o desvio padrão das distâncias euclidianas entre todos os pares de amostras do conjunto treino, respectivamente. O parâmetro Z (0,5) é um valor empírico de corte; Domínio: distância de uma substância do conjunto de avaliação externa ao vizinho mais próximo no conjunto treino. A substância é considerada confiável para predição quando o valor do domínio é menor que o valor do APD.

[b]O resíduo é a diferença (Δ) entre os valores de pIC_{50} observados e previstos.