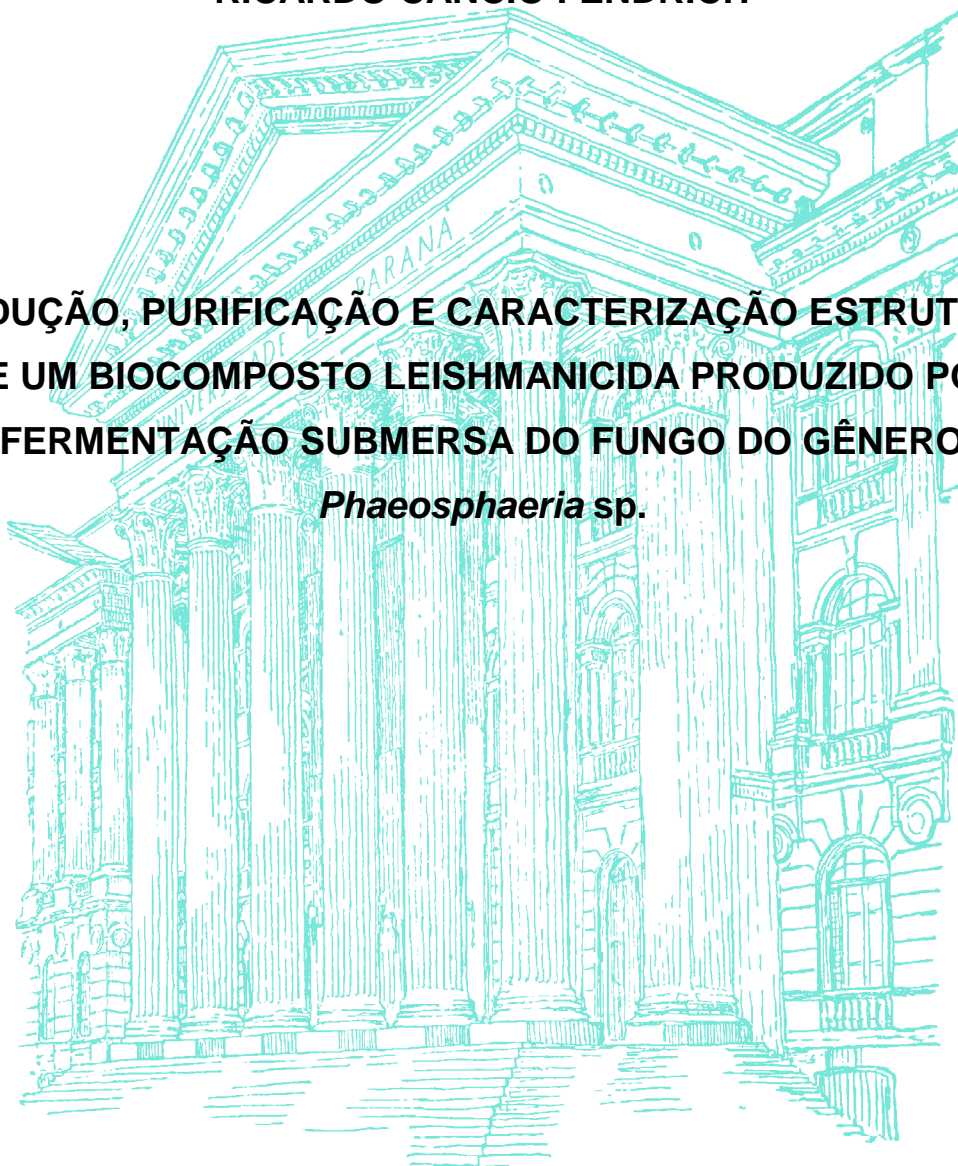


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO CANCIO FENDRICH

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DE UM BIOCOMPOSTO LEISHMANICIDA PRODUZIDO POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO DO GÊNERO
Phaeosphaeria sp.**



CURITIBA

2015

RICARDO CANCIO FENDRICH

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DE UM BIOCOMPOSTO LEISHMANICIDA PRODUZIDO POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO DO GÊNERO
Phaeosphaeria sp.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof^o Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2015

F331p

Fendrich, Ricardo Cancio

Produção, purificação e caracterização estrutural de um bio composto leishmanicida produzido por fermentação submersa do fungo do gênero/ Ricardo Cancio Fendrich. – Curitiba, 2015.

315 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol – Co-orientador: Vanete Thomaz Soccol.

Bibliografia: p. 258-290.

1. Leishmaniose - Tratamento. 2. Medicamentos - Desenvolvimento. 3. Phaeosphaeria sp. 4. Análise química. I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Soccol, Vanete Thomaz . IV. Título.

CDD: 615.1901

TERMO DE APROVAÇÃO

RICARDO CANCIO FENDRICH

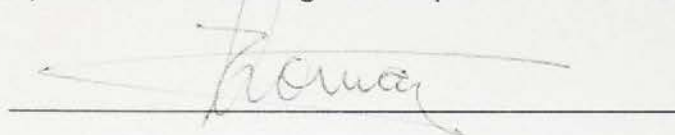
"PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM BIOCÓMPUESTO LEISHMANICIDA PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO DO GÊNERO *Phaeosphaeria* sp."

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Orientador – Departamento de Eng^a de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR

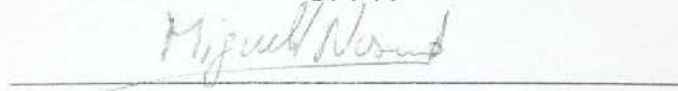


Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

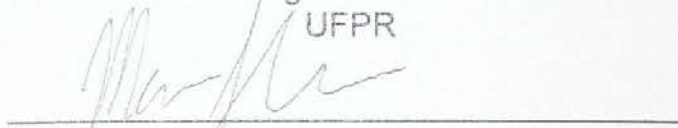
Coorientadora – Departamento de Eng^a de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR



Prof. Dr. Andersson Barison
UFPR



Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
UFPR



Prof. Dr. Marco Aurelio Krieger
IBMP Fiocruz/PR



Curitiba, 04 de Novembro de 2015.

Jeana Palat
Confere com o original
mat: 204905

DEDICATÓRIA

À
Minha querida mãe Ana Maria,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha sincera gratidão e apreço às seguintes pessoas:

Ao Prof^o Dr. Carlos Ricardo Soccol pelo acolhimento, orientação e exemplo de dedicação ao desenvolvimento de inovações no Brasil. Especial agradecimento por seu otimismo de fazer a Ciência sempre continuar em frente.

À Prof^a Dra. Vanete Thomaz Soccol pelo seu precioso norteamento pessoal ao engajamento da pesquisa sobre leishmanioses. A Professora, e ao Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (UFPR), agradeço pelo acesso às instalações e materiais de laboratório, isolados de *Leishmania* sp. e o apoio constante na bancada.

Ao Prof^o Dr. Miguel Daniel Nosedá e ao Prof^o Dr. Andersson Barison pelas contribuições na Banca de Qualificação e auxílio em espectroscopia de RMN. Agradeço a minha formação em recurso humanos em RMN pelas contribuições pessoais e profissionais de cada um.

Agradeço em igual apreço aos professores(as): Dra. Luciana Porto Souza Vandenberghe, Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski, Dr. Júlio César de Carvalho, Dr. Luiz Alberto Letti e Dra. Adriane B. P. Medeiros, do Departamento Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR. À Dra. Edilene Alcantara Castro, Dra. Rosângela Paulino e Dra. Marcia Shimada, do Departamento de Patologia Básica, UFPR. À Dra. Maria Eugênia Nosedá e ao Dr. Marcelo Müller, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR. À Dra. Francinete Ramos Campos e Dr. Obdulio Gomes Miguel, do Departamento de Farmácia, UFPR.

À Prof^a Dra. Jaísa Fernandes Soares, do Departamento Química (UFPR), pelas contribuições em espectroscopia e formação de recursos humanos em RMN.

Agradeço pelas fundamentais contribuições e colaborações ao trabalho de: Dr. André Luiz Gonçalves; Dra. Silvana Maria Alban (CPPI); Dr. Luciano Henrique Campestrini; Msc. Mitiyo Miyaoka (UFPR); Dr. João Minozzo (CPPI); Msc. Alceu Bisetto Junior (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná); Prof^o Paulo Fontoura (UFPR) e Prof^a Maria Cristina Vasconcelos (PUCPR).

Também à Prof^a Dra. Cristine Rodrigues (UFPR) pelas análises de HPLC-MS e ao Dr. Francisco Destefanis Vitola (Cogubras) pelo isolamento do fungo.

Além do apoio dos amigos e colegas; nada seria possível sem a participação de: Alan Diego da Conceição Santos; Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali; Ana Carolina Oliveira; André Melo; André Silva; Caroline; Claudia Ovando; Deborah Guedes; Fernanda Campos; Flávia Aparecida Fonseca; Franciele Goelzer; Gilberto Vinícius; Jefferson Costa; Joelma Leão; Juliana Seger; Kamille Schmitt Pereira; Laís Guanaes; Lígia Barizon; Lívia de Macedo Dutra; Loize Bombardelli Gomes; Luciana; Ludmilla Troiano; Maislian de Oliveira; Márcia Wibrantz; Maria de Fátima Santos; Neli Maziero; Paulo Kirnev; Paulo Urbano; Poliana Alves; Renata Abreu; Thiago (Laboratório de massas LTQMS; UFPR); Valesca W. Montibeller; Vinícius e outras queridas pessoas que não consegui repassar o nome por completo.

Às fontes financiadoras de pesquisa: Fundação Araucária, CAPES, FINEP, CNPq, ao programa REUNI e à UFPR. Aos participantes do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, oferecido por Deonir Agustini e aos participantes do Centro de Ressonância Magnética Nuclear.

Finalmente, agradeço a Deus, que está presente em tudo e em todos, à minha Família e à minha Namorada.

“Não tenha medo de crescer lentamente.
Tenha medo apenas de ficar parado.”

Provérbio Chinês

“No matter how hard the past was,
you can always begin again.”

Buddha

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVOS	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1	LEISHMANIOSES	26
3.1.1	Leishmaniose tegumentar	29
3.1.2	Leishmaniose visceral	31
3.1.3	Distribuição geográfica	33
3.1.4	O parasito	36
3.1.5	Ciclo biológico	39
3.1.6	Características eco-epidemiológicas	40
3.1.7	Hospedeiro humano	42
3.2	CONTROLE E TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	46
3.2.1	Antimoniais - Quimioterapia de primeira escolha	48
3.2.2	Anfotericina B	52
3.2.3	Miltefosina	54
3.2.4	Paromomicina	55
3.2.5	Pentamidina	56
3.2.6	Considerações sobre os tratamentos das leishmanioses	57
3.3	PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	60
3.3.1	Pesquisas relativas ao tratamento de leishmanioses	60
3.3.2	Produtos naturais	64
3.3.3	Produtos naturais com atividade leishmanicida	67
3.3.4	Derivados químicos com atividade leishmanicida	69
3.4	BIOPROCESSOS	72
3.5	IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	73
3.6	EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	73
3.7	FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO	75
3.7.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	76
3.7.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	77
3.7.3	Extração em fase sólida	79
3.7.4	Cristalização da molécula	79

3.8	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	80
3.9	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	81
3.10	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	83
3.10.1	Exames preliminares.....	83
3.10.2	Ponto de fusão	83
3.10.3	Perfil de solubilidade	84
3.10.4	Testes químicos	84
3.11	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	85
3.12	RMN - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	87
3.12.1	Instrumentação de Ressonância Magnética Nuclear	88
3.12.2	Aquisição e processamento de dados.....	90
3.12.3	Princípio da técnica	91
3.12.4	Deslocamento químico.....	95
3.12.5	Correlação, Acoplamentos e Multiplicidade	100
3.12.6	Intensidade relativa	103
3.12.7	Sequências de pulsos	104
3.12.8	Simulação de RMN	107
3.13	ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS	108
3.14	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	109
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	111
4.1	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	111
4.2	CULTIVO DO MICRORGANISMO	111
4.3	IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	112
4.3.1	Extração do DNA	112
4.3.2	Reação de PCR	113
4.3.3	Purificação de DNA para reação de sequenciamento.....	114
4.3.4	Sequenciamento de DNA.....	115
4.4	CULTIVO EM BIORREATOR.....	116
4.5	EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO.....	116
4.5.1	Secagem por Liofilização	116
4.5.2	Secagem por Spray dryer	117
4.5.3	Obtenção do extrato.....	117
4.6	FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO	119

4.6.1	CCD analítica e CCD preparativa	119
4.6.2	HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	120
4.6.3	Extração em fase sólida	122
4.6.4	Cristalização da molécula	122
4.7	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	123
4.7.1	Viabilidade celular de <i>Leishmania</i>	123
4.7.2	Identificação das cepas referência de <i>Leishmania</i>	124
4.7.3	SDS-PAGE.....	125
4.7.4	Teste de hemólise	125
4.7.5	Citotoxicidade contra células Vero	126
4.8	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DE ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	126
4.9	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	127
4.9.1	Exames preliminares.....	127
4.9.2	Ponto de fusão	128
4.9.3	Perfil de solubilidade	128
4.9.4	Aplicação de Marcha Fitoquímica	129
4.10	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	130
4.10.1	HPLC-MS	130
4.10.2	IONTRAP	131
4.10.3	qTOF	132
4.11	RMN - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	132
4.11.1	Aquisição e processamento de dados.....	132
4.11.2	RMN - Métodos unidimensionais	136
4.11.3	Experimentos de RMN 2D - Métodos Homonucleares.....	138
4.11.4	Experimentos de RMN 2D - Métodos Heteronucleares.....	141
4.11.5	Simulação de RMN	143
4.12	ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS	144
4.13	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	144
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	146
5.1	IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	146
5.2	CULTIVO DO MICRORGANISMO	148
5.3	CULTIVO EM BIORREATOR.....	151
5.4	EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO.....	152

5.4.1	Sistema de solventes	154
5.5	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO	155
5.5.1	HPLC - Cromatografia Líquida de Alta eficiência	160
5.5.2	Cristalização da molécula	160
5.6	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	162
5.6.1	Testes contra <i>Leishmania</i>	162
5.6.2	Identificação de cepas referência de <i>Leishmania</i>	167
5.6.3	SDS-PAGE.....	167
5.6.4	Teste de hemólise	168
5.7	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	168
5.7.1	Exames preliminares.....	170
5.7.2	Ponto de fusão	171
5.7.3	Solubilidade.....	171
5.7.4	Testes químicos	173
5.8	RMN	173
5.9	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	222
5.9.1	qTOF.....	222
5.9.2	IONTRAP	226
5.9.3	Espectro de baixa resolução LC-MS (single quadrupolo)	232
5.10	ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS	235
5.11	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	236
5.12	CONSIDERAÇÕES.....	238
6	CONCLUSÕES	247
7	RECOMENDAÇÕES.....	248
8	REFERÊNCIAS.....	249
	ANEXOS.....	291

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	POPULAÇÃO MUNDIAL ATINGIDA FONTES: WHO; WHO/C.BLACK; WHO; WHO/C.BLACK	26
FIGURA 2 –	ILUSTRAÇÃO DE LESÕES CARACTERÍSTICAS DE (1) LC; (2) LCD; (3) LMC E (4) CRIANÇA COM HEPATOESPLENOMEGALIA, LV FONTE: OLLIARO et al. (2013); (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006A); WHO	32
FIGURA 3 –	STATUS DE ENDEMICIDADE DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, 2012 FONTE: WHO (2013).....	34
FIGURA 4 –	STATUS DE ENDEMICIDADE DE LEISHMANIOSE VISCERAL, 2012 FONTE: WHO (2013)	34
FIGURA 5 –	NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO BRASIL (1990 A 2013) E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE NÚMERO DE CASOS NO BRASIL (2007) FONTE: ADAPTADO DE WHO (2012), ALVAR et al. (2012)	35
FIGURA 6 –	NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL (1990 A 2013) E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE NÚMERO DE CASOS ANUAL NO BRASIL (2007) FONTE: ADAPTADO DE WHO (2012), ALVAR et al. (2012)	35
FIGURA 7 –	FORMAS PROMASTIGOTA (A) E FORMA AMASTIGOTA (B) DE <i>Leishmania</i> FONTE: O AUTOR (A); CREATIVE COMMONS (B).....	36
FIGURA 8 –	CICLO DE TRANSMISSÃO DE <i>Leishmania</i> – A TRANSMISSÃO DO PARASITO É REALIZADA POR UM VETOR FLEBOTOMÍNEO, QUE AO FAZER REPASTO SANGUÍNEO, CAPTA O PARASITO INTRACELULAR NA FORMA AMASTIGOTA. DENTRO DO TRATO DIGESTIVO; AMASTIGOTAS SE DIFERENCIAM EM PROMASTIGOTAS E ENTÃO PODEM PASSAR A UM MAMÍFERO PELA PICADA; PROMASTIGOTAS ENTRAM NO SISTEMA FAGOCITÁRIO MONONUCLEAR, DIFERENCIANDO-SE EM AMASTIGOTAS E POSSIVELMENTE INTERFERINDO NO EQUILÍBRIO IMUNE FOTOS: CDC, WIKIPEDIA, CREATIVE COMMONS INFOGRAFIA: O AUTOR.....	39
FIGURA 9 –	REPRESENTAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO COM <i>Leishmania</i> FONTE: O AUTOR (2015).....	43
FIGURA 10 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS FATORES QUE INFLUENCIAM A SEVERIDADE DA MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA FONTE: O AUTOR (2015).....	45
FIGURA 11 –	FORMAS DE CONTROLE DE LEISHMANIOSE	46
FIGURA 12 –	MEDICAMENTOS DE PRIMEIRA ESCOLHA NO	

	TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES (1) ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (2) STIBOGLUCONATO FONTE: FRÉZARD et al. (2008)	49
FIGURA 13 –	FÁRMACOS DE SEGUNDA ESCOLHA NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES (1) ANFOTERICINA B; (2) MILTEFOSINA; (3) PAROMOMICINA; (4) PENTAMIDINA FONTE: (DRUGBANK, 2015)	51
FIGURA 14 –	ALGUMAS FRENTES DE ATUAÇÃO NA ÁREA DE PESQUISA E CONTROLE DE LEISHMANIOSES FONTE: O AUTOR (INFOGRAFIA); FIGURAS: GOOGLE IMAGES	61
FIGURA 15 –	ESQUEMA DE MIGRAÇÃO DE FASE MÓVEL EM CCD FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2015)	77
FIGURA 16 –	ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO SEPARADO EM REGIÕES FONTE: (ELOWITZ, 2013)	82
FIGURA 17 –	INSTRUMENTAÇÃO DO LABORATÓRIO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR FONTE: DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR	89
FIGURA 18 –	FID E APLICAÇÃO DA TRANSFORMADA DE FOURIER FONTE: JACOBSEN (2007)	91
FIGURA 19 –	REPRESENTAÇÃO DE ESTADOS QUÂNTICOS DE ENERGIA PARA NUCLÍDEOS COM SPIN $\frac{1}{2}$ FONTE: PUDDEPHAT (2015), GOOGLE IMAGES	94
FIGURA 20 –	REPRESENTAÇÃO DE ESTADOS QUÂNTICOS DE ENERGIA DE ACORDO COM O SPIN NUCLEAR FONTE: PUDDEPHAT (2015)	94
FIGURA 21 –	VETOR MAGNETIZAÇÃO M_0 EM PRESENÇA DE (A) CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO E (B) CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO B_0 E CAMPO MAGNÉTICO OSCILANTE B_1 FONTE: PUDDEPHAT (2015)	95
FIGURA 22 –	PRECESSÃO DE UM NUCLÍDEO FONTE: PUDDEPHAT (2015)	96
FIGURA 23 -	FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA DO NÚCLEO CARBONO ^{13}C (4,7 T) FONTE: JACOBSEN (2007)	97
FIGURA 24 –	INFLUÊNCIA DO MOVIMENTO ELETRÔNICO NOS ORBITAIS MOLECULARES SOBRE O CAMPO MAGNÉTICO EFETIVO EM UM ANEL AROMÁTICO FONTE: ADAPTADO DE (FLIEGL et al., 2011)	98
FIGURA 25 -	FAIXAS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE (A) HIDROGÊNIO, ^1H E (B) CARBONO (^{13}C), DE ACORDO COM O AMBIENTE QUÍMICO DE ALGUNS GRUPOS FUNCIONAIS FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2015)	100

FIGURA 26 -	ACOPLAMENTOS COMUNS FONTE: (CRASTO, 2014).....	102
FIGURA 27 -	DEFINIÇÃO DE ÂNGULO DIEDRO FONTE: WIKIPEDIA, CREATIVE COMMONS	103
FIGURA 28 -	CAMINHO ÓTICO PERCORRIDO PELO FEIXE UV FONTE: O AUTOR (2015)	108
FIGURA 29 -	COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE VIBRAÇÃO DETECTADAS POR INFRAVERMELHO (IR) E ESPECTROSCOPIA RAMAN FONTE: (SHRESTHA, 2014).....	109
FIGURA 30 -	FREQUÊNCIAS DE INFRAVERMELHO CARACTERÍSTICAS PARA CERTOS GRUPOS FUNCIONAIS.....	110
FIGURA 31 -	FLUXOGRAMA DE ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL, A COMEÇAR DA IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO ATÉ ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO ATIVO FONTE: ADAPTADO DE PINO et al. (2013)	111
FIGURA 32 -	MÉTODOS GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA CROMATOGRAFIA (HPLC) UTILIZANDO COLUNA DE FASE REVERSA (A) OUGHLISSI-DEHAK et al. ; (2008) ; (B) WEN et al. (2005) E (C) YANG et al. (2007)	121
FIGURA 33 -	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DE ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	127
FIGURA 34 -	FLUXOGRAMA DO TESTE DE SOLUBILIDADE (CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS IDENTIFICADOS POR LETRAS) FONTE: ADAPTADO DE PAVIA et al. (2009).....	129
FIGURA 35 -	FLUXOGRAMA DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO	134
FIGURA 36 -	PADRÃO DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR SENSÍVEL A FASE: COMPARAÇÃO ENTRE COSY E COSY FASE SENSITIVO DE ACETATO DE ETILA FONTE: (FACEY, 2008).....	139
FIGURA 37 -	DENDROGRAMA GERADO COM O ALGORITMO NEIGHBOR JOINING COM BASE NAS SEQUENCIAS ITS DE ISOLADOS DO GÊNERO <i>Phaeosphaeria</i> , POR MEIO DO PROGRAMA NCBI BLAST TREE VIEW. NOTA: <i>Septoriella</i> <i>phragmitis</i> FOI UTILIZADO COMO OUTGROUP	147
FIGURA 38 -	CULTIVO <i>IN VITRO</i> COM EXPLANTE DE GRAMÍNEA DEMONSTRANDO FORMAÇÃO DE PYCNIDIA (ESTRUTURA ESPECIALIZADA).....	149
FIGURA 39 -	OBSERVAÇÃO DE (A) PYCNIDIUM EM MICROSCÓPIO ÓPTICO 400X EM CONTRASTE DE FASE, DEMONSTRANDO OSTÍOLO E LIBERAÇÃO DE ESPOROS, DE ACORDO COM (B) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA FONTE: (A) O AUTOR (2015) (B) (EARTHLIFE, 2015).....	149
FIGURA 40 -	CINÉTICA DE CRESCIMENTO FÚNGICO EM BIORREATOR	152
FIGURA 41 -	FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	154

FIGURA 42 –	ETAPAS DE OBTENÇÃO DE EXTRATO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRA PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	155
FIGURA 43 -	CARACTERÍSTICA DOS CRISTAIS FORMADOS (AMOSTRA PALHA)	161
FIGURA 44 -	ATIVIDADE (100 µg/mL) DE EXTRATOS FRACIONADOS POR COLUNA CROMATOGRÁFICA SOBRE <i>L.braziliensis</i> CONTROLE ANTIMONIAL: G2000 µg/mL (INIBIÇÃO 48%) C- : CONTROLE NEGATIVO (SEM AMOSTRA)	164
FIGURA 45 -	ATIVIDADE (100 µg/mL) DE EXTRATOS FRACIONADOS POR COLUNA CROMATOGRÁFICA SOBRE <i>L.infantum</i> CONTROLE ANTIMONIAL: G2000 µg/mL (INIBIÇÃO 22,7%) C- : CONTROLE NEGATIVO (SEM AMOSTRA)	164
FIGURA 46 –	ATIVIDADE DE EXTRATOS BRUTOS E COMPOSTOS BRUTOS CONTRA <i>L. (V.) braziliensis</i> ATIVIDADE (100 – 50 – 10 µg/mL) DE EXTRATOS FRACIONADOS POR COLUNA CROMATOGRÁFICA CONTROLE ANTIMONIAL: ACL (INIBIÇÃO 17-40%)	166
FIGURA 47 –	PROPOSTA ESTRUTURAL DE COMPOSTO ATIVO LEISHMANICIDA FONTE: O AUTOR (2015)	169
FIGURA 48 -	TAUTOMERIA CETOENÓLICA	172
FIGURA 49 -	ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO (A) EXTRATO BRUTO; (B) COMPOSTO BRUTO; (C) COMPOSTO PURO (200,13 MHz) (REFERENCIADO PELO TMS)	175
FIGURA 50 -	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO PURO CONCENTRADO E EXPANSÕES DE SINAIS SINGLETOS EM ESCALA (600,13 MHz) REFERENCIADO PELO TMS. ASSINALAMENTO DOS SINAIS DE ACORDO COM CRITÉRIO DE NUMERAÇÃO DE HARRIS et al. (1993)	176
FIGURA 51 -	EXPANSÕES DO ESPECTRO RMN DE ¹ H DO COMPOSTO PURO CONCENTRADO (CONSIDERANDO MESMA INTENSIDADE), COM INDICAÇÃO DO PRIMEIRO FRAGMENTO PROPOSTO (DUPLA TRANS) (600,13 MHz) REFERENCIADO PELO TMS. ASSINALAMENTO DOS SINAIS DE ACORDO COM CRITÉRIO DE NUMERAÇÃO DE HARRIS et al. (1993)	178
FIGURA 52 –	ESPECTROS DE CARBONO (50,32 MHz) (A) RMN DE ¹³ C; (B) DEPT 45; (C) DEPT 90; (D) DEPT135 NOTA: AMOSTRA BCO_B01	179
FIGURA 53 –	EXPANSÃO DO ESPECTRO RMN DE ¹ H (COMPOSTO PURO, 600 MHz); DOIS SINGLETOS δ _H 2,38 (J=3, CH ₃); δ _H 2,41 (J=3, CH ₃) SOBREPOSTOS AOS SINAIS δ _H 2,35 (H _A	

	DE CH ₂ , δ_C 34,2) E δ_H 2,44 (H _A DE CH ₂ , δ_C 32,9) EXPANSÕES BIDIMENSIONAIS DE EXPERIMENTOS HMQC; HSQC; HETCOR DE CORRELAÇÃO DIRETA (¹ J _{C,H}) .. 183
FIGURA 54 -	HETCOR ¹ J _{CH} – DEMONSTRANDO VALORES DE CARBONOS CH ₂ (34,2; 32,9 E 30,1 PPM) E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS. RESPECTIVAMENTE HIDROGÊNIOS (2,35 E 2,86); (3,39 E 2,44) E (2,23 E 1,54). TAMBÉM APRESENTA A CORRELAÇÃO DA METINA CH 1,83 COM 31,9..... 185
FIGURA 55 -	EXPANSÃO DA REGIÃO HSQC DE 3 METILENOS (2,35 E 2,86); (3,39 E 2,44) E (2,23 E 1,54) E 1 METINA (1,83)..... 185
FIGURA 56 -	MAPA DE CORRELAÇÃO DO EXPERIMENTO HETCOR LONG RANGE (OTIMIZADO 15 HZ) PARA CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA (200,13 MHZ), COMPOSTO PURO..... 188
FIGURA 57 -	PRIMEIROS FRAGMENTOS PROPOSTOS 189
FIGURA 58 -	COMPARAÇÃO ENTRE (A) FRAGMENTO ELUCIDADO DO COMPOSTO ATIVO E (B) ALFA-HUMULENO..... 191
FIGURA 59 -	BIOSSÍNTESE DO ALFA-HUMULENO VIA AÇÃO DA ENZIMA (2E,6E)-FARNESIL-DIFOSFATO-LIASE E ALFA- HUMULENO SINTASE FONTE: ADAPTADO DE TALAPATRA E TALAPATRA (2015, P.467) E (KEGG, 2015) .. 191
FIGURA 60 -	COMPARAÇÃO ENTRE (A) FRAGMENTO ELUCIDADO DO COMPOSTO ATIVO; (B) ESQUELETO TIPO-HUMULENO ISOLADO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>Lactarius</i> <i>hirtipes</i> ; FONTE: (A) O AUTOR (2015) E (B) (LIN; JI-KAI, 2002) NOTA: NUMERAÇÃO ESPECÍFICA DE LIN; JI-KAI (2002)..... 192
FIGURA 61 -	AÇÃO DA ENZIMA ALFA-HUMULENO,NADPH:OXIGÊNIO 10-OXIDOREDUTASE FONTE: ADAPTADO DE (KEGG, 2015)..... 193
FIGURA 62 -	DERIVADO ANTRAQUINONA DA VIA DOS POLICETÍDEOS.. 196
FIGURA 63 -	CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DOS HIDROGÊNIOS δ_H 7,15 E δ_H 7,12 AOS CARBONOS DAS METILAS δ_C 27,4 E δ_C 27,31, RESPECTIVAMENTE, POR DOIS EXPERIMENTOS HMBC 198
FIGURA 64 -	HETCOR LONG RANGE (PARÂMETRO CNST2 15HZ)..... 199
FIGURA 65 -	EXPANSÃO DE FREQUÊNCIAS HARMÔNICAS INDICANDO DOIS ANÉIS BENZÊNICOS 1,2,4,5-TETRA-SUBSTITUÍDOS POR VIBRAÇÕES C-H FORA DO PLANO..... 200
FIGURA 66 -	PROPOSTAS (1) LIGAÇÃO META ÉSTER (2) LIGAÇÃO ORTO ÉSTER E (3) LIGAÇÃO ORTO ÉTER 201
FIGURA 67 -	DERIVADOS DE POLICETÍDEOS FONTE: (A) (ABE et al., 2015) ; (B) FLAVIOLIN; (C) HIPOTÉTICO 202

FIGURA 68 -	DERIVADOS POLICETÍDEOS COMUNS (1) ÁCIDO ORSELÍNICO (2) ÁCIDO 6-METIL-SALICÍLICO; E ARQUITETURA DOS GENES POLICETÍDEO SINTASES NECESSÁRIOS PARA SUA PRODUÇÃO FONTE: (SCHMITT; LUMBSCH, 2009)	203
FIGURA 69 -	ESTIMATIVA DAS FORMAS IONIZADAS DA MOLÉCULA	204
FIGURA 70 -	ANEL TROPOLONE	205
FIGURA 71 -	ANÉIS TROPOLONE E POSIÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO	205
FIGURA 72 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS TÍPICOS DE CARBONO EM UMA CICLOHEPTANONA, INCLUINDO CARBONILA FONTE: JACOBSEN (2007)	206
FIGURA 73 -	ESTRUTURA DO COMPOSTO ATIVO IDENTIFICADA ATRAVÉS DO CONJUNTO DE INFORMAÇÕES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS (INFORMAÇÕES REFERENTES A EXPERIMENTOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR)	208
FIGURA 74 -	MOLÉCULAS SIMILARES REPORTADAS NA LITERATURA (A) NÃO NOMEADAS; (B) EPOLONE B FONTE: (A) RAGGATT et al. (1997) (R = H E R = OH); (B) BAILEY et al. (2007).....	210
FIGURA 75 -	PRINCIPAIS SISTEMAS DE SPIN	213
FIGURA 76 -	ESPECTRO REAL: EXPANSÃO DOS SINAIS δ_H 1,80 dd E δ_H 1,83 dddd EM DUAS RESOLUÇÕES DIFERENTES DE PROCESSAMENTO (A) (600MHz, LB 0,3); (B) (600MHz, LB -0,3, GB 0,5)	214
FIGURA 77 -	ESPECTRO SIMULADO: REGIÃO DE SOBREPOSIÇÃO δ_H 1,83 dddd E δ_H 1,80 dd COM VARIAÇÃO DO PARÂMETRO W_A (LARGURA A MEIA ALTURA) (A) $W_A = 4,3$ (B) $W_A=2,5$ (C) $W_A=1,5$ (D) $W_A=0,1$ EQUIVALENTE AO ESPECTRO TEÓRICO.....	214
FIGURA 78 -	ESPECTRO REAL: EXPANSÃO DOS SINAIS δ_H 2,20 dddd E δ_H 2,23 ddd EM DUAS RESOLUÇÕES DIFERENTES DE PROCESSAMENTO (A) (600MHz, LB 0,3); (B) (600MHz, LB -0,3, GB 0,5)	215
FIGURA 79 -	ESPECTRO SIMULADO: REGIÃO DE SOBREPOSIÇÃO δ_H 2,20 dddd E δ_H 2,23 ddd COM VARIAÇÃO DO PARÂMETRO W_A (LARGURA A MEIA ALTURA) (A) $W_A = 4,3$ (B) $W_A=2,5$ (C) $W_A=1,5$ (D) $W_A=0,1$ EQUIVALENTE AO ESPECTRO TEÓRICO.....	215
FIGURA 80 -	EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR TOCSY (MIXING TIME 120 MS) DEMONSTRANDO CORRELAÇÃO 3,39 COM 6,95 E 7,12; TAMBÉM 2,86 COM 6,91 E 7,15. TAMBÉM POSSÍVEL PERCEBER CORRELAÇÃO 2,38 COM 7,15 E DO 2,41 COM 7,12. ALÉM	

	DISSO, TALVEZ SEJAM IMPERCEPTÍVEIS E SOBREPSTAS AS CORRELAÇÕES DO 2,44 (GEMINAL AO 3,39) E DO 2,35 (GEMINAL AO 2,86)	216
FIGURA 81 -	EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR TOCSY (MIXING TIME 100 ms)	217
FIGURA 82 -	CORRELAÇÃO δ_H 3,39 COM δ_H 4,22 (EXPERIMENTO TOCSY MIXING TIME 48 ms)	217
FIGURA 83 -	EXPANSÃO NOESY DO MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ATRAVÉS DO ESPAÇO	218
FIGURA 84 -	EFEITO ANISOTRÓPICO DE DUPLA LIGAÇÃO SOBRE UM DOS HIDROGÊNIOS DE DIASTEROTÓPICOS 3,39	220
FIGURA 85 -	PERDA NEUTRA 164	222
FIGURA 86 -	ESPECTRO TOTAL qTOF (HR-MS) IONIZAÇÃO MODO POSITIVO AMOSTRA: BCO_B01 (METANOL) 50 μ g/mL	223
FIGURA 87 -	ESPECTRO TOTAL qTOF (HR-MS) IONIZAÇÃO MODO NEGATIVO AMOSTRA: BCO_B01 (METANOL) 50 μ g/mL	223
FIGURA 88 -	ADUTO [M+Na](+)	224
FIGURA 89 -	POSSÍVEL ÍON 806 m/z qTOF (IONIZAÇÃO POSITIVA)	224
FIGURA 90 -	REAÇÃO DE ÍON SELECIONADO (571,2600) MODO IONIZAÇÃO POSITIVA 571,2605 \rightarrow 407,2131 (MS ²)	225
FIGURA 91 -	REAÇÃO DE ÍON SELECIONADO (547,2700) MODO IONIZAÇÃO POSITIVA - MS ² 547,2810 \rightarrow 383,2319 (MS ²)	225
FIGURA 92 -	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DE PERDA M-164-28 E M-164-28-28 (COM FORMAÇÃO DE ADUTO SÓDIO)	227
FIGURA 93 -	IONTRAP ESPECTRO TOTAL ESI MODO POSITIVO	230
FIGURA 94 -	IONTRAP ESPECTRO TOTAL ESI MODO NEGATIVO	230
FIGURA 95 -	POSSÍVEIS ÍONS 255 EM IONIZAÇÃO MODO POSITIVO E NEGATIVO	231
FIGURA 96 -	CROMATOGRAMA DE CONTAGEM TOTAL DE ÍONS (TIC, SCAN POSITIVO) SCAN m/z: 100 A 500 u.m.a.; FRAGMENTAÇÃO: 100V; TEMPERATURA COLUNA: 40°C; INJEÇÃO: 1 μ L; TEMPERATURA GÁS: 300°C; FASE MÓVEL ISOCRÁTICA 0,4mL/MIN; - AQUOSA ÁC.ACETICO : METANOL ACIDIFICADO 0,3% AC.ACETICO (82 :18)	232
FIGURA 97 -	COMPOSTO BRUTO ATIVO COM FRAGMENTOS TÍPICOS DE SESQUITERPENOS NAS TRÊS FRAÇÕES DE ACORDO COM (SONG et al., 2012) IONIZAÇÃO ESI POSITIVO - SCAN: 100 A 500 m/z; FRAGMENTAÇÃO: 100V; TEMPERATURA COLUNA: 40°C; INJEÇÃO: 1 μ L; TEMPERATURA GÁS: 300°C; FASE MÓVEL ISOCRÁTICA AQUOSA 0,3% ÁC.ACETICO : METANOL 0,3% AC.ACETICO (82 :18), 0,4 mL/MIN; TEMPO DE RETENÇÃO:	

	(A) 2,917 MINUTOS (B) 7,226 MINUTOS (COMPOSTO PURO) [M-164+H] ⁺ (C) 8,373 MINUTOS.....	233
FIGURA 98 –	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DE ULTRAVIOLETA DA AMOSTRA BCO_B01 (200 – 450nm)	235
FIGURA 99 –	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (4000-400 cm ⁻¹), COM (1) REGIÃO HIDROXILAS, AMINAS, ETC.; (2) ANÉIS AROMÁTICOS OU LIGAÇÕES sp ² ; (3) REGIÃO DE HARMÔNICOS CARACTERÍSTICOS; (4) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (1800-400 cm ⁻¹), COM REGIÃO FINGERPRINT (1450-500 cm ⁻¹)	236
FIGURA 100 –	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (1800-400 cm ⁻¹), COM REGIÃO FINGERPRINT (1450-500 cm ⁻¹)	237
FIGURA 101 -	REAÇÃO DE ÍON SELECIONADO (697,62) IONIZAÇÃO MODO POSITIVO - MS ²	245

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, SEUS RESPECTIVOS AGENTES ETIOLÓGICOS E IMPACTO MEDIDO POR ÍNDICE “DALY” (MEDE A PERDA DE ANOS SAUDÁVEIS PELA POPULAÇÃO)	27
TABELA 2 –	CUSTO ESTIMADO PER CAPTA DE FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE LV E LC (JANEIRO, 2010).....	58
TABELA 3 -	PRODUTOS NATURAIS COM RELATO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA	68
TABELA 4 -	DERIVADOS QUÍMICOS COM RELATO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA	71
TABELA 5 –	ALGUNS NUCLÍDEOS MAGNETICAMENTE ATIVOS E SUAS PROPRIEDADES CORRESPONDENTES	93
TABELA 6 -	PADRÕES DE DESDOBRAMENTO COMUNS, ABREVIÇÃO E ASPECTO	101
TABELA 7 –	REAGENTES PARA O PREPARO DO TAMPÃO CTAB DE EXTRAÇÃO DO DNA DO FUNGO DE ACORDO COM SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ E GAYTÁN-OYARZÚN (2006)	113
TABELA 8 –	COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO REAGENTE PARA REAÇÃO DE POLIMÉRISE EM CADEIA (PCR)	114
TABELA 9 –	SISTEMAS DE SOLVENTE TESTADOS.....	118
TABELA 10 –	EXPERIMENTOS RMN DE ¹³ C UTILIZANDO TRANSFERÊNCIA DE POLARIZAÇÃO E SENTIDO CONVENCIONADO DOS SINAIS	137
TABELA 11 -	OBSERVAÇÕES DE CRESCIMENTO DO FUNGO.....	148
TABELA 12 –	DENOMINAÇÃO DE AMOSTRAS E FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO, TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA E CRISTALIZAÇÃO	159
TABELA 13 -	VALORES ESTIMADOS DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA IC ₅₀	166
TABELA 14 -	TESTE DE HEMÓLISE DE HEMÁCIAS DE COELHO	168
TABELA 15 -	COMPOSTOS ORGÂNICOS RELACIONADOS ÀS CLASSES DE SOLUBILIDADE	172
TABELA 16 –	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹³ C, SENTIDOS DE SINAL EXPERIMENTOS DEPT E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ¹ H CORRELACIONADOS A CARBONO (¹ J _{C,H}) DETERMINADOS POR EXPERIMENTOS HSQC, HETCOR E HMQC	181

TABELA 17 -	DESLOCAMENTO QUÍMICO, MULTIPLICIDADE E ACOPLAMENTOS E VALORES DE CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DETERMINADOS POR HMBC, HETCOR LONG RANGE E COLOC.....	187
TABELA 18 –	COMPARATIVO ENTRE PROPOSTA E MOLÉCULAS DA LITERATURA.....	210
TABELA 19 –	COMPARAÇÃO DE DESLOCAMENTO QUÍMICO COM LITERATURA.....	211
TABELA 20 -	DISTÂNCIA ESPACIAL TEÓRICA ENTRE $\delta_{\text{H}}4,22$ E $\delta_{\text{H}} 1,80$ PARA OS POSSÍVEIS ISÔMEROS SIMULADOS EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL APÓS OTIMIZAÇÃO POR ALGORITMO B3LYP E LAN2DZ	219

RESUMO

Doenças negligenciadas necessitam urgentemente da substituição ou complementação dos atuais tratamentos. Antimoniais pentavalentes, por exemplo, são quimioterapias extremamente tóxicas utilizadas para as leishmanioses. O objetivo deste trabalho foi produzir, extrair, isolar e caracterizar um composto ativo com ação leishmanicida descrita contra formas promastigotas *in vitro*. O composto, produzido por bioprocesso fúngico em biorreator de 10 L teve rendimento de 2,6 mg/g biomassa seca e foi isolado por cristalização após extração com solvente orgânico (diclorometano). A molécula foi analisada por diversos métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos (RMN 1D, RMN 2D, infravermelho, UV). O composto foi identificado como Pycnidione / Eupenifeldin (estereoisômeros). A elucidação estrutural, iniciada a partir de fracionamento bioguiado, só foi possível após completo assinalamento de deslocamentos químicos e correlações bidimensionais homonucleares e heteronucleares. Este é o primeiro relato de atividade leishmanicida para este composto. O extrato inibiu 46% do crescimento de *Leishmania* sp. na concentração de 100 µg/mL e, quando purificado, apresentou 100% de inibição na concentração de 10 µg/mL. A atividade é superior ao medicamento referência usado como controle (Glucantime[®]). A concentração de inibição IC₅₀ foi determinada por regressão sigmoide com atividade de 0,72 µM contra *Leishmania (L.) amazonensis*, 0,66 µM contra *L. (L.) infantum* e 0,58 µM contra *L. (V.) braziliensis*; agentes etiológicos das principais manifestações clínicas de leishmaniose. O fungo, um isolado inicialmente desconhecido, foi identificado como um ascomiceto do gênero *Phaeosphaeria* sp. através de sequenciamento de DNA da região ITS e comparação filogenética. Esta identificação estava de acordo com fungos produtores desta classe de composto ativo, que é incomum e raro, pertencente à classe das bistropolonas pentacíclicas. A obtenção de moléculas isoladas de produtos naturais representam uma potencial fonte para desenvolvimento de um novo fármaco. A elucidação estrutural do composto ativo, portanto, é ponto chave para produção em larga escala por bioprocessos e prosseguimento de pesquisas futuras com reprodutibilidade.

ABSTRACT

Neglected diseases are in urgent need for replacement or completion of current treatments. Pentavalent antimonials, for example, are highly toxic chemotherapies used against leishmaniasis. The objective of this study was to produce, extract, isolate and characterize an active compound with described leishmanicidal activity against *in vitro* promastigotes. The compound, produced by fungal bioprocess in a 10 L bioreactor, yielded 2.6 mg / g dry biomass. It was isolated by crystallization after extraction with organic solvent (dichloromethane). The molecule was analyzed by various chemical, spectrometric and spectroscopic methods (1D NMR, 2D NMR, IR, UV). The compound was identified as Pycnidione / Eupenifeldin (stereoisomers). The structural elucidation, started from bioassay guided fractionation, was only possible after full assignment of chemical shifts and two-dimensional homonuclear and heteronuclear correlations. This is the first report of leishmanicidal activity for this compound. The extract inhibited 46% of *Leishmania* growth at a concentration of 100 µg / mL, and when purified, showed 100% inhibition at a concentration of 10 µg / mL. The activity is higher than the reference product used as control (Glucantime®). The inhibitory concentration IC₅₀ was determined by sigmoidal regression as 0.72 µM against *Leishmania (L.) amazonensis*, 0.66 µM against *L. (L.) infantum* and 0.58 µM against *L. (V.) braziliensis*; etiologic agents of the main clinical manifestations of leishmaniasis. The fungus, an initially unknown isolate, was identified as an ascomycete of the genus *Phaeosphaeria* sp. through DNA sequencing of the ITS region and phylogenetic alignment. This identification was consistent with producing fungi of this active compound class, which is unusual and rare, belonging to the class of pentacyclic bistropolones. Molecules from natural product represent a potential source of novel drugs and leading compounds. The structural elucidation of the active compound, therefore, is a key-point to large-scale production of bio-processes and further reproducible research.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias que interferem no sistema imune de humanos e em alguns outros mamíferos. Elas são endêmicas no Brasil, onde há grande número de casos, e em mais 97 países. Manifesta-se sob a forma tegumentar, causando lesões cutâneas e/ou mucosas e sob a forma visceral, quando compromete o funcionamento dos órgãos. A forma tegumentar, devido às lesões desfigurantes ocasionadas, gera grande impacto social. A forma visceral é mais grave e, se não tratada, leva à óbito.

Os fármacos de primeira escolha atualmente utilizados para o tratamento das leishmanioses consistem em antimoniais, pois são os mais eficazes. Contudo, o longo esquema terapêutico necessário acarreta em graves quadros de toxicidade colateral. Além disto, requer acompanhamento médico continuado até que haja confirmação de cura. Alguns fármacos de segunda escolha já estão mundialmente disponíveis. São utilizados em casos que os antimoniais são ineficientes ou contraindicados e, às vezes, em combinação.

Lamentavelmente, todas as atuais opções de tratamento apresentam efeitos colaterais graves e muitas necessitam de administração parenteral. Como efeito agravante, todas apresentam eficácia variável. Muitos são os fatores que influenciam sobre a severidade da doença e intervêm sobre a resposta das ações terapêuticas. A possibilidade de seleção de cepas resistentes é um viés constante, já relatada para antimoniais no subcontinente indiano e experimentalmente (*in vitro* e *in vivo*) para todas as quimioterapias de segunda escolha.

Em vista aos problemas enfrentados pelas atuais quimioterapias, a busca, identificação e desenvolvimento de novas substâncias bioativas contra leishmanioses é urgente (DAVIS et al., 2004; PINK et al., 2005; ROCHA et al., 2005; TEMPONE et al., 2008; ALVAR et al., 2012; FREITAS-JUNIOR et al., 2012; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012; GIAROLLA; FERREIRA, 2015; SANGSHETTI et al., 2015; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Segundo Machado-Silva (2015), há também a necessidade de se encontrar novas formas de financiamento para incentivar parcerias de desenvolvimento de inovações em produto.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi extrair, purificar, caracterizar e elucidar a estrutura química do composto bioativo com ação leishmanicida, obtido a partir de biomassa fúngica produzida por fermentação líquida.

Os objetivos específicos foram:

- a) Identificar, utilizando técnicas de biologia molecular, o gênero do fungo produtor da molécula ativa;
- b) Produzir biomassa do fungo por fermentação líquida em biorreator;
- c) Submeter a extrações orgânicas o caldo do cultivo e a biomassa fúngica liofilizada;
- d) Testar e avaliar a atividade leishmanicida dos extratos contra *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- e) Fracionar os extratos ativos e testá-los, visando determinar a fração ativa;
- f) Determinar a concentração dose resposta das frações com atividade;
- g) Isolar e identificar a estrutura química da molécula com atividade leishmanicida;
- h) Propor uma técnica analítica de quantificação da biomolécula para que possa ser aplicada em otimização de bioprocessos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas, não-contagiosas, de transmissão vetorial, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross 1903. Estão distribuídas atualmente em 98 países ao redor de todo mundo (HOTEZ et al., 2014) e afetam principalmente os cidadãos de baixa renda (FIGURA 1). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2015), aproximadamente 310-350 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a doença, a qual tem incidência de dois milhões de novos casos anuais.



FIGURA 1 – POPULAÇÃO MUNDIAL ATINGIDA
FONTES: WHO; WHO/C.BLACK; WHO; WHO/C.BLACK

Em todo o mundo, as leishmanioses têm prevalência estimada em 14 milhões de casos e são registrados, em média, 59 mil óbitos por ano (WHO, 2010, 2015). Acredita-se que o número de casos é subnotificado porque muitos casos ocorrem em regiões pobres do mundo ou permanecem subclínicos (ARRAES et al., 2008) (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

As leishmanioses são elencadas entre as doenças negligenciadas segundo a OMS (WHO, 2010, 2015). São endemias em franca expansão geográfica, problemáticas sobretudo em países em desenvolvimento (SANGSHETTI et al., 2015). Em decorrência da morbidade, afastamento para tratamento, lesões desfigurantes, destrutivas e incapacitantes, pode-se considerar as leishmanioses uma das piores mazelas do mundo (GILEAD SCIENCES, 2013). A doença gera um gigantesco impacto psicológico, social e econômico, especialmente para os mais carentes de assistência (MENEZES et al., 2015).

Considerando um índice que mede a perda de anos saudáveis pela população, não é de surpreender que as leishmanioses apresentem o maior valor entre as Doenças Tropicais Negligenciadas. Em 2010, o índice DALY (Disability Adjusted Life Year) de leishmanioses foi subtotalizado em 3,32 milhões de anos de vida (MURRAY et al., 2012). A maior parte foi contabilizada por anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura (HOTEZ et al., 2014). Mesmo assim, este índice mede apenas a perda de saúde direta e não considera os efeitos lesivos sobre o desenvolvimento de um cidadão infectado, e sobre os impactos econômicos gerados (ALVAR et al., 2012). Entre doenças parasitárias, apenas o número de mortes por malária supera os casos registrados para leishmanioses (WHO, 2015).

TABELA 1 - DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, SEUS RESPECTIVOS AGENTES ETIOLÓGICOS E IMPACTO MEDIDO POR ÍNDICE "DALY" (MEDE A PERDA DE ANOS SAUDÁVEIS PELA POPULAÇÃO)

Doença	Agente etiológico	Índice DALY (milhões de anos)
Leishmanioses	<i>Leishmania</i> spp.	3,32
Esquistossomoses	<i>Schistosoma</i> spp.	3,31
Ancilostomíases	<i>Ancylostoma</i> spp. e <i>Necator</i>	3,23
Filariose linfática	<i>Wuchereria</i>	2,78
Trematodioses de origem alimentar	Classe Trematoda	1,88
Raiva	Família Rhabdoviridae	1,46
Ascaridíase	<i>Ascaris</i>	1,32
Tripanossomíases	<i>Trypanosoma</i> spp.	1,11
Dengue	<i>Flavivirus</i>	0,83
Tricuríase	<i>Trichuris</i>	0,64
Cisticercose	<i>Taenia solium</i>	0,50
Oncocercose	<i>Onchocerca</i>	0,49
Tracoma	<i>Chlamydia trachomatis</i>	0,33
Equinococose	<i>Echinococcus</i>	0,14
Febre amarela	<i>Flavivirus</i>	<0,001

FONTE: ADAPTADO DE HOTEZ et al. (2014)

O abalo financeiro, associado à franca expansão que começa a atingir alguns centros mais ricos, parecem ter motivado algumas ações cooperativas de âmbito mundial no combate de leishmanioses. Nos últimos dez anos houve alguns avanços científicos significativos que foram incluídos no tratamento, diagnóstico e prevenção de leishmanioses (MALLA, 2012). Todavia, apenas em 2007 foi aprovada a resolução 60.13 pela Assembleia da OMS, com objetivo de conter as epidemias. Entretanto, mortalidade e morbidade continuam com tendência crescente principalmente em locais onde são baixos os índices de notificação de casos e de investimento em infraestrutura para diagnóstico e atendimento de pacientes (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A situação se complica, pois os atuais tratamentos são intensivos e muitas vezes requerem hospitalização (ALVAR et al., 2008; FREITAS-JUNIOR et al., 2012; ELMAHALLAWY; AGIL, 2015).

Segundo a OMS, pode-se distinguir onze tipos de manifestações clínicas de leishmanioses, que variam de acordo com características epidemiológicas (WHO, 2010). Podem ser qualificadas, de acordo com a espécie de agente etiológico envolvido em cada região, em leishmanioses do Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e do Novo Mundo (Américas). Entretanto, pode-se resumir em duas formas principais:

- Leishmaniose tegumentar (3.1.1);
- Leishmaniose visceral (3.1.2)

3.1.1 Leishmaniose tegumentar

A manifestação cutânea, denominada leishmaniose cutânea ou tegumentar, caracteriza-se pela formação de lesão em áreas expostas da pele. Apresenta um amplo espectro clínico. Os sintomas, que variam desde lesão localizada até lesões deformantes, podem manifestar-se em pessoas de qualquer idade. Os desdobramentos dependem da resposta imunológica do paciente ao parasitismo (HARTLEY et al., 2014).

A **leishmaniose cutânea (LC)**, que tem como lesão clássica uma pequena pústula, pápula ou nódulo, até a formação ulcerosa (FIGURA 2) (PESSOA; MARTINS, 1988). Leva pelo menos uma semana até progredir completamente. A úlcera, que lembra o formato de uma “cratera de vulcão”, possui bordas elevadas e infiltradas, com induração circundante variável, não pruriginosa e de fundo granuloso (ULIANA, 2012). Pode chegar a cinco centímetros de diâmetro. Costuma ser indolor e precedida pela formação e queda de uma crosta central. Nódulos satélite na borda da lesão são comuns, assim como o surgimento de lesões secundárias (RIDLEY, 1987).

A lesão de leishmaniose cutânea se desenvolve principalmente próximo ao local da picada (ver Ciclo Biológico, 3.1.5) mas não é regra, podendo se desenvolver em qualquer lugar do corpo (NEVES, 1991). As lesões surgem após o período de incubação incerto, variável entre dois a três meses em média (ULIANA, 2012). Eventualmente, o período pode ser breve (duas semanas) ou tardar até dois anos (MASMOUDI et al., 2013).

Ao invés da úlcera, a lesão pode assumir diversas apresentações. Podem ter aspecto de lesões papular, polipoides, nodulares, verrucoides e impetigoides (ULIANA, 2012). Há também o risco de se contrair infecções bacterianas secundárias, que dificultam cicatrização da lesão e provocam formação de secreção purulenta, com edema, rubor e calor locais (ULIANA, 2012). A maioria das lesões cicatrizam espontaneamente num longo processo gradual (WHO, 2010). Geralmente deixam cicatrizes disformes ou com pigmentação alterada (COHEN et al., 2015). Sem o devido tratamento, algumas lesões tendem à cura espontânea em processos que podem demorar meses ou anos, contudo também podem permanecer ativas por vários anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a). A forma localizada pode

acompanhar-se de linfadenopatia, que é um processo patológico que afeta os linfonodos (REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR, 2007).

É possível que em alguns casos o curso das leishmanioses se transforme em manifestações crônicas, complicando o tratamento (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012). Nestes casos as lesões normalmente não são autolimitadas. Apresentam-se como formas severas de leishmaniose tegumentar, como a leishmaniose mucocutânea, a leishmaniose difusa e a leishmaniose disseminada (DESJEUX, 1996).

A **leishmaniose mucocutânea (LMC)**, também denominada espúndia nos países andinos, provoca lesões destrutivas das mucosas e cartilagens, desfigurando a face (RIDLEY, 1987). A característica marcante é a produção de metástase do revestimento da boca e trato respiratório superior por disseminação hematogênica ou linfática (WHO, 2010). A ferida primária tem as mesmas características da LC, mas ao mesmo tempo, ou meses depois, surgem metástases nas mucosas oral (GEMAQUE et al., 2014) e da nasofaringe que destroem a cartilagem do nariz e do palato provocando deformações graves (AMATO et al., 2009). Pode haver enfartamento de cadeia linfonodal, com seu comprometimento (OLIVEIRA GUERRA et al., 2011). A progressão da doença pode levar entre um a vinte anos o aparecimento total dos sintomas (ANTINORI et al., 2008). Eventualmente leva o paciente a óbito (AMATO et al., 2008).

Outra forma severa de manifestação é a **leishmaniose disseminada (LD)**, que não cura espontaneamente (WHO, 2010). O paciente apresenta múltiplas lesões ulceradas espalhadas por todo o corpo, distantes do local da picada, que surgem de repente e podem vir acompanhadas de febre, calafrios e mal-estar (TURETZ et al., 2002). As lesões geralmente são pequenas e respondem bem ao tratamento (MENEZES et al., 2015).

Na **leishmaniose cutaneodifusa (LCD)**, forma rara, o paciente apresenta nódulos espalhados pelo corpo, sobretudo ao redor da face e na superfície externa dos braços e pernas (BARRAL et al., 1995). Ocorre geralmente em pacientes anérgicos (com deficiência na resposta imune celular), o que leva a dificuldades de tratamento (MASMOUDI et al., 2013). Segundo as primeiras descrições por Silva (1958), a principal característica é a presença de lesões queloidianas na pele e lesões no tecido ósseo das extremidades (mãos e pés).

3.1.2 Leishmaniose visceral

A **leishmaniose visceral (LV)**, considerada a forma mais grave, atinge fígado, baço, medula e epitélio intestinal (MARINHO et al., 2015). Uma doença sistêmica que quando não tratada evolui para óbito em mais de 90% dos casos (HABIF, 2012).

O diagnóstico é complicado no início, pois os pacientes não apresentam sintomas específicos, mas geralmente um quadro de astenia e febre insidiosa, que surgem aos poucos e vagarosamente (CHAPPUIS et al., 2007). No decorrer, verifica-se perda de peso e aparecimento de hepatoesplenomegalia proeminente (aumento do baço e do fígado), que persistem por meses. Pode haver hemorragia ou infarto subcapsular espontâneo (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Anemia, trombocitopenia e neutropenia são geralmente observados, refletindo a supressão da medula óssea e o comprometimento esplênico (BADARO et al., 1986) e a hipergamaglobulinemia é comum (GRECH et al., 2000).

Sepse por bactérias é um dos prognósticos comuns para óbito de pacientes com LV (ENDRIS et al., 2014). Sangramentos podem ocorrer, podendo incluir epistaxe (hemorragia nasal), sangramento gengival e petéquias (pequenos pontos vermelhos no corpo, na pele ou mucosas, causado por pequenas hemorragias) (CFSPH, 2009). Disfunção hepática, icterícia e ascite que podem ocorrer em estágios avançados. (HERWALDT, 1999).

O período de incubação da LV é bastante variável, tanto para o homem como para o cão. No homem varia de 10 dias a 24 meses; mas em média de dois a seis meses. A co-infecção com HIV aumenta drasticamente o risco de progressão de infecção por LV que está assintomática. Da mesma forma, a LV acelera a progressão da condição de imunodeficiência promovida pelo vírus (ALVAR et al., 2008). Na LV canina, o período de incubação no cão varia de três meses a vários anos, com média de três a sete meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b) (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). A infecção assintomática por *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 por exemplo, é consideravelmente mais prevalente que a doença clínica (BANETH et al., 2008).

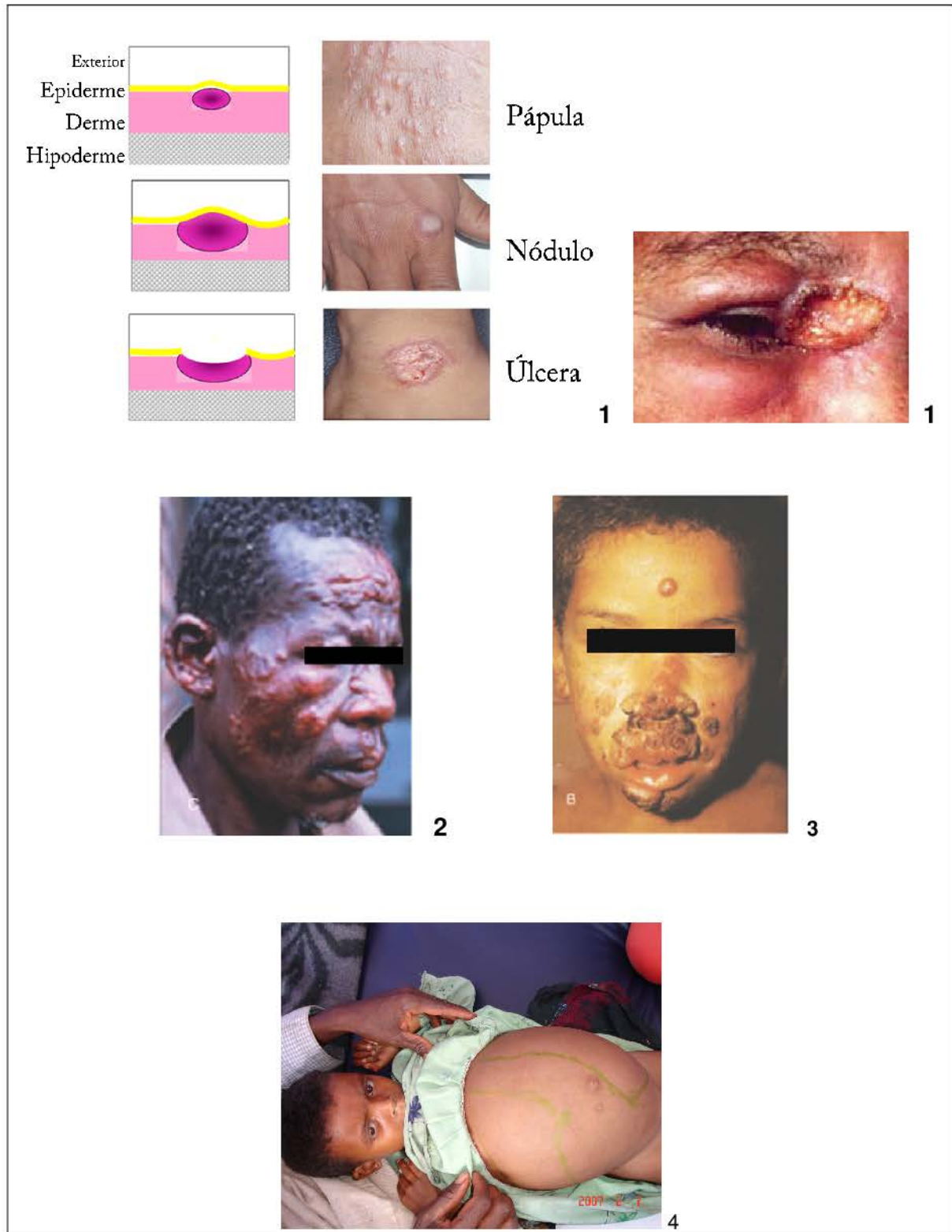


FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DE LESÕES CARACTERÍSTICAS DE (1) LC; (2) LCD; (3) LMC E (4) CRIANÇA COM HEPATOSPLENOMEGALIA, LV
 FONTE: OLLIARO et al. (2013); (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006A); WHO

3.1.3 Distribuição geográfica

As leishmanioses prevalecem em áreas tropicais e subtropicais, mas a mobilidade humana a torna um problema médico também em áreas não-endêmicas (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012).

A transmissão endêmica ocorre em 98 países, especialmente nas Américas, onde ocorre sua expansão. Mais de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Brasil, Peru, Síria, Afeganistão, Arábia Saudita e Irã, como localizado na FIGURA 3 (ALVAR et al., 2012). O mesmo ocorre com a LV, em que seis países respondem por pelo menos nove a cada dez casos: Brasil, Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia (ROHOUSOVA et al., 2015) (FIGURA 4) (ALVAR et al., 2012; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

As duas principais formas da doença atingem fortemente o Brasil, que registra casos em todas as Regiões, como pode ser verificado nos mapas de distribuição geográfica de leishmaniose cutânea (FIGURA 5) e visceral (FIGURA 6). A LCD afeta especialmente a região amazônica (SILVEIRA, 2009).

No Brasil, a taxa média de incidência anual da LV é de cerca de 2 casos por 100.000 habitantes, com presença registrada em 26 das 27 Unidades da Federação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b). Já a LTA contou com 554.475 casos notificados, entre 1988 e 2007, e uma média anual de 27.723 casos autóctones, sendo a incidência média de 17,3 casos por 100.000 habitantes (ALVAR et al., 2012).

Medidas adotadas não foram capazes de controlar a expansão geográfica das áreas de transmissão de LV no Brasil (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Estão sendo registrados novos casos em metrópoles e cidades de grande porte (HARHAY et al., 2011). Houve o aumento da incidência de casos de leishmaniose visceral para áreas urbanas de médio e grande porte, com vários registros recentes, tais como Pedregulho (SP) (ABREU et al., 2015), Formiga (MG) (MENEZES, J. A. et al., 2015), Divinópolis (MG) (NASCIMENTO et al., 2013); Belo Horizonte (MG) (ARAUJO et al., 2013), Campo Grande (MS) (CUNHA et al., 2014), Teresina (PI) (DRUMOND; COSTA, 2011), extremo Oeste de Santa Catarina (MAZIERO et al., 2014) e Foz do Iguaçu (PR) (DIAS et al., 2013).

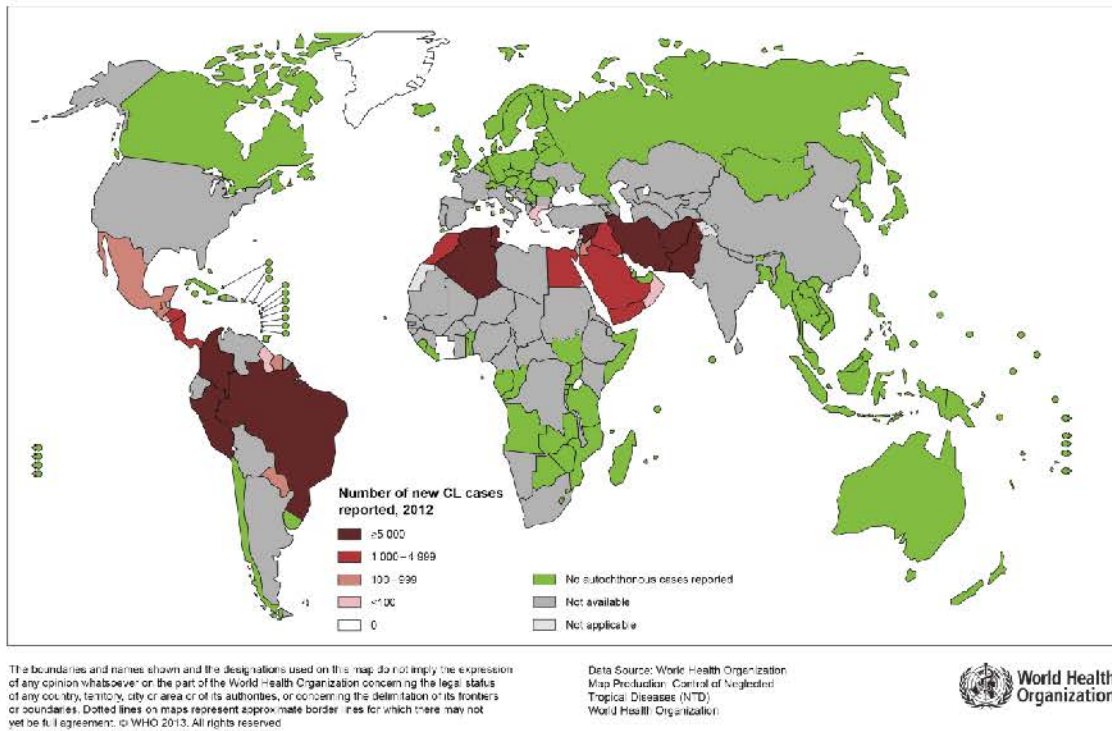


FIGURA 3 – STATUS DE ENDEMICIDADE DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, 2012
FONTE: WHO (2013)

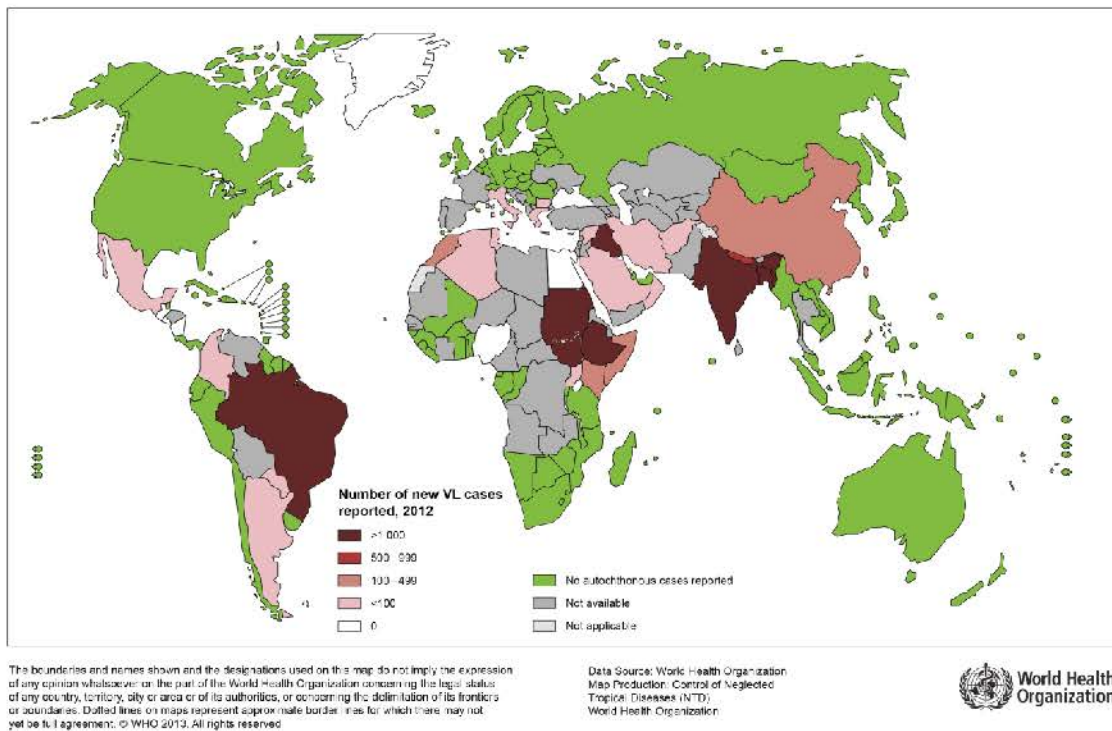


FIGURA 4 – STATUS DE ENDEMICIDADE DE LEISHMANIOSE VISCERAL, 2012
FONTE: WHO (2013)

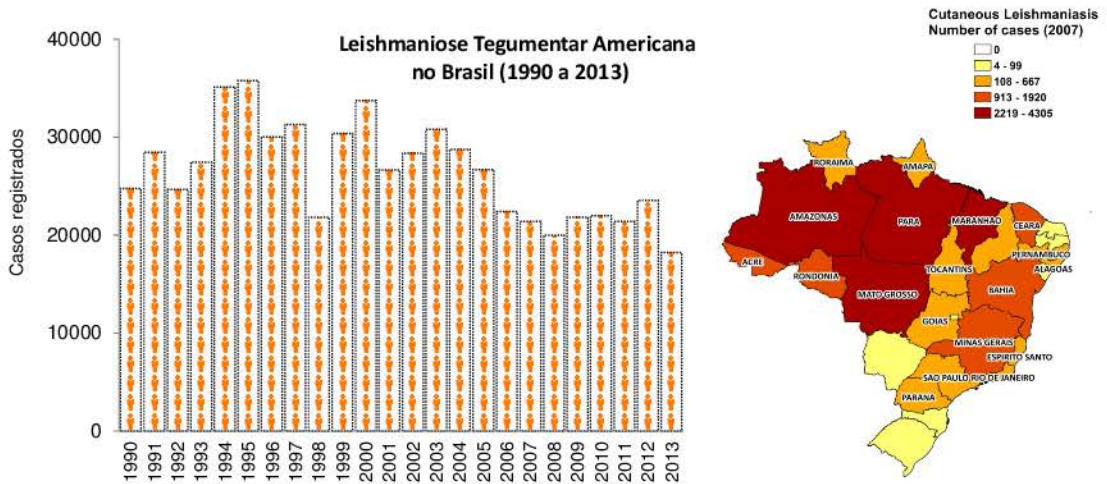


FIGURA 5 – NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO BRASIL (1990 A 2013) E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE NÚMERO DE CASOS NO BRASIL (2007)
 FONTE: ADAPTADO DE WHO (2012), ALVAR et al. (2012)

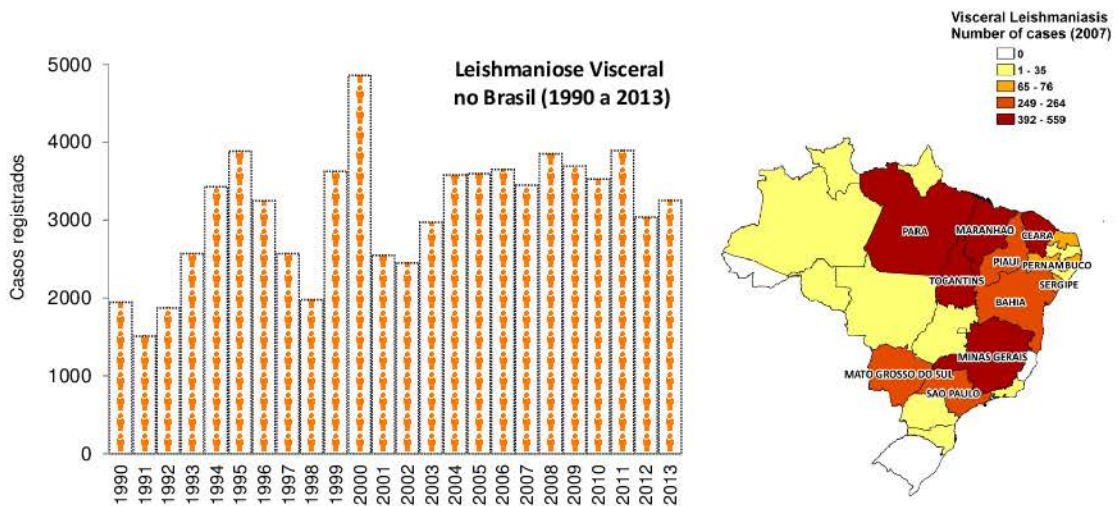


FIGURA 6 – NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL (1990 A 2013) E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE NÚMERO DE CASOS ANUAL NO BRASIL (2007)
 FONTE: ADAPTADO DE WHO (2012), ALVAR et al. (2012)

3.1.4 O parasito

Leishmania é o agente etiológico das leishmanioses. Este protozoário foi descrito pela primeira vez no final do século XIX, independentemente, por Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna (WHO, 2010). O termo genérico foi cunhado por Ronald Ross (1903).

Protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à Ordem Kinetoplastida Hinigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976; e à Família Trypanosomatidae Doflein, 1901, *emend.* Grobben, 1905.

Caracterizam-se por possuir flagelo e cinetoplasto. O flagelo, único, está inserido na bolsa flagelar, uma invaginação da membrana plasmática (SILVA, M. S. DA et al., 2013). Anteriormente ao cinetossoma do flagelo fica o cinetoplasto, uma mitocôndria única e ramificada que contém grande conteúdo DNA mitocondrial (kDNA) (SIMPSON, 1973, 1986; SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Se estende por todo o corpo celular em uma densa rede de milhares de minicírculos e dezenas de maxicírculos (PASSOS-SILVA et al., 2010).

O parasito possui ciclo de vida digenético (heteroxeno), isto é, possui dois estágios de multiplicação e alterna seu desenvolvimento entre pelo menos dois tipos de hospedeiro: vertebrado e invertebrado (BATES, 2008). Multiplica-se por divisão binária e se diferencia entre duas formas morfológicas de acordo com o microambiente em que se encontra, alterando metabolismo, fisiologia e formato (LAINSON; SHAW, 1987). Dentro do tubo digestivo do inseto vetor, encontra-se na forma promastigota (FIGURA 7 – A) e, parasitando as células de mamíferos, sob a forma amastigota (FIGURA 7 – B) (KILLICK-KENDRICK, 1990).

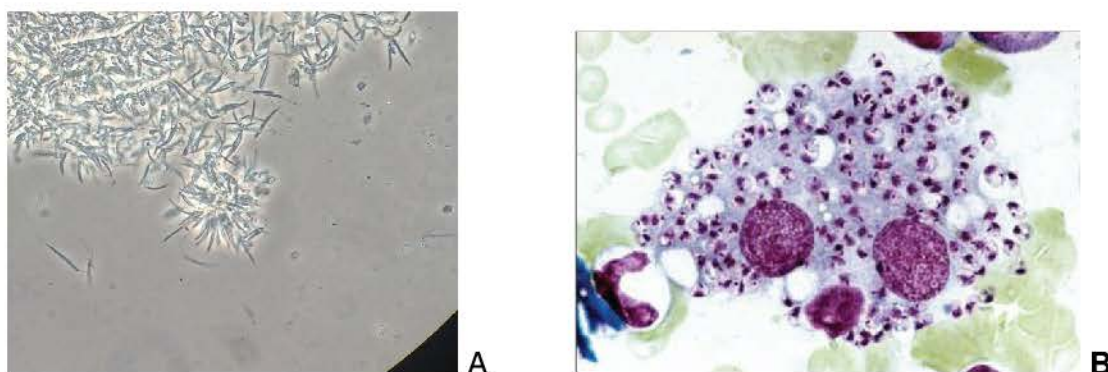


FIGURA 7 – FORMAS PROMASTIGOTA (A) E FORMA AMASTIGOTA (B) DE *LEISHMANIA*
FONTE: O AUTOR (A); CREATIVE COMMONS (B)

A forma **promastigota** possui um flagelo situado em uma das extremidades. O tamanho do flagelo é proporcional ao tamanho da célula, a qual possui formato alongado, conferindo-lhe mobilidade na busca de fontes de energia. A movimentação constante do flagelo depende da respiração e de sua associação às mitocôndrias. Esta forma, além de ser encontrada *in vivo* no trato digestivo do inseto vetor, também pode ser cultivada *in vitro* em meios de cultura bifásicos (NICOLE et al., 1903).

A forma **amastigota** possui formato ovalado ou esférico, com cinetoplasto próximo ao núcleo, geralmente em forma de bastão. O flagelo possui tamanho reduzido e fica internalizado, garantindo pouco ou nenhum movimento, mas que pode participar de processos importantes na organização celular ou percepção sensorial desta fase (GLUENZ; GINGER; MCKEAN, 2010). Essas formas são encontradas dentro de células do hospedeiro ou associadas à fragmentos de membrana celular das mesmas após apoptose celular (CHANG et al., 2003). Repetidamente, a própria multiplicação de amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos induz o processo apoptótico (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998).

Apesar de as distinções morfológicas serem praticamente imperceptíveis, a variação de características entre espécies de *Leishmania* é enorme. Infectividade, preferência celular e/ou tecidual, metabolismo e constituição celular são características que variam conforme o estágio de desenvolvimento e *habitat* em que a espécie se encontra. Algumas diferenças podem ser deduzidas, por exemplo, por análises de isoenzimas (THOMAZ-SOCCOL et al., 2000), métodos moleculares (NEJAD-MOGHADDAM; ABOLHASSANI, 2009) ou anticorpos monoclonais (EROGLU et al., 2015).

Embora algumas manifestações clínicas estejam mais frequentemente associadas a alguma espécie ou subgênero do parasito em particular, nenhuma manifestação é exclusiva de uma espécie (WHO, 2010). Dentre cerca de trinta e seis espécies de *Leishmania*, pelo menos vinte podem infectar o ser humano, o qual é considerado hospedeiro acidental. Foram descritas quinze que são patogênicas para humanos (WHO, 2010).

No Velho Mundo, leishmanioses dermatrópicas são relacionadas a cinco espécies do subgênero *Leishmania* Saf'janova, 1982: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) killicki*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) infantum* (CAMPINO et al., 2005) (WHO, 2010). As formas viscerotrópicas são ocasionadas por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (WHO, 2010).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas onze espécies dermatrópicas causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais (SHAW, 2002). No Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). As principais espécies dermatrópicas causadoras de comprometimento humano são do subgênero *Viannia* Lainson & Shaw, 1987: *Leishmania (V.) braziliensis* Vianna, 1911; *L. (V.) peruviana* Velez, 1913; *L. (V.) guyanensis* Floch, 1954; *L. (V.) panamensis* Lainson & Shaw, 1972; *L. (V.) lainsoni* Silveira et al., 1987; *L. (V.) naiffi* Lainson et al., 1990; *L. (V.) shawi* Shaw et al., 1991; e do Subgênero *Leishmania* Saf'janova, 1982: *L. (L.) mexicana* Biagi, 1953; *L. (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972; *L. (L.) venezuelensis* Bonfante-Garrido, 1980; *L. (L.) pifanoi* Medina & Romero, 1959.

Dentre tantas espécies, três são de interesse por suas amplas distribuições geográficas e visto que geram manifestações clínicas distintas:

- *L. (V.) braziliensis* - principal agente etiológico de LC e LMC; possui transmissão endêmica (CASTRO et al., 2007);
- *L. (L.) amazonensis* - causa lesões cutâneas e eventualmente lesões múltiplas difusas (anérgicas) e ocorre desde a América Central até o norte, nordeste e sudeste da América do Sul (ISHIKAWA et al., 2002);
- *L. (L.) infantum* - agente etiológico de LV no Velho e no Novo Mundo, as áreas de transmissão estão em expansão geográfica; afeta grande número de crianças e idosos (WHO, 2010).

3.1.5 Ciclo biológico

Apesar de diferenças eco-epidemiológicas, todos os ciclos naturais de transmissão de *Leishmania* ocorrem por intermédio de um vetor, que realiza a transmissão do parasito entre vertebrados e invertebrados (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003) (FIGURA 8). A doença não é contagiosa e não se transmite diretamente de uma pessoa para outra, nem de um animal para outro, nem dos animais para as pessoas (LEWIS; WARD, 1987).

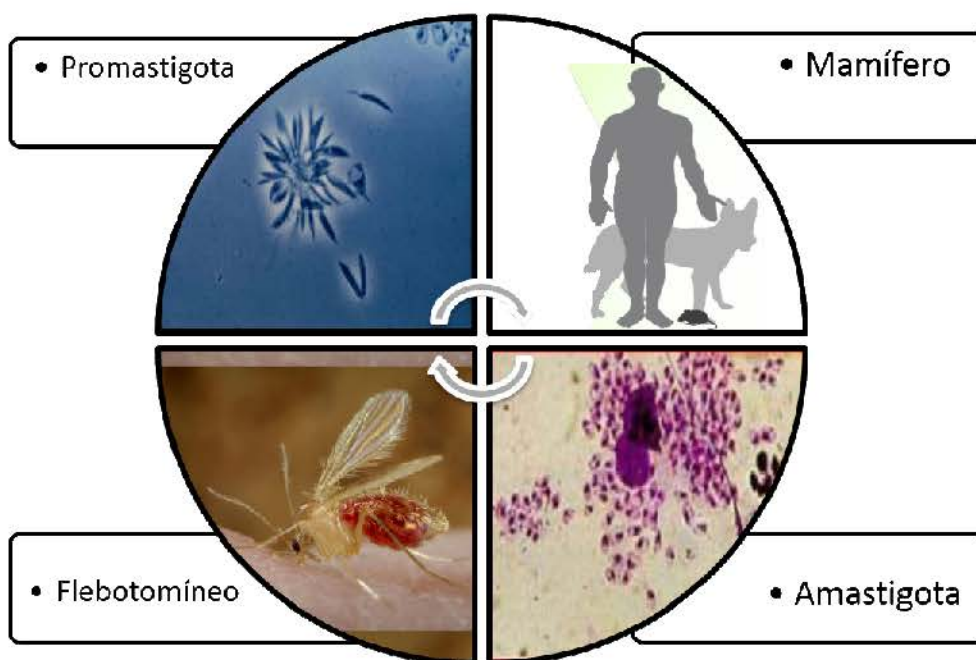


FIGURA 8 – CICLO DE TRANSMISSÃO DE *Leishmania* – A TRANSMISSÃO DO PARASITO É REALIZADA POR UM VETOR FLEBOTOMÍNEO, QUE AO FAZER REPASTO SANGUÍNEO, CAPTA O PARASITO INTRACELULAR NA FORMA AMASTIGOTA. DENTRO DO TRATO DIGESTIVO; AMASTIGOTAS SE DIFERENCIAM EM PROMASTIGOTAS E ENTÃO PODEM PASSAR A UM MAMÍFERO PELA PICADA; PROMASTIGOTAS ENTRAM NO SISTEMA FAGOCITÁRIO MONONUCLEAR, DIFERENCIANDO-SE EM AMASTIGOTAS E POSSIVELMENTE INTERFERINDO NO EQUILÍBRIO IMUNE
FOTOS: CDC, WIKIPEDIA, CREATIVE COMMONS
INFOGRAFIA: O AUTOR

Os vetores, fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), se infectam ao realizarem um repasto sanguíneo (picada) em algum mamífero reservatório infectado (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). As formas amastigotas, após diferenciação celular dentro do intestino do vetor, multiplicam-se como promastigotas. Os vetores, mediante outro repasto, podem então transmitir o protozoário para outros mamíferos, incluindo o ser humano. As formas promastigotas são regurgitadas sob a pele do hospedeiro, onde são fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear (LAINSON, R; SHAW, 1987; BATES, 2007).

Dentro das células do hospedeiro, notadamente macrófagos, promastigotas transformam-se em amastigotas ao escapar do sistema imune. Amastigotas se multiplicam também por fissão binária e, ao serem liberadas, infectam novas células mimetizando o processo de apoptose celular (CRAUWELS et al., 2015). Há sucessão até que cada organismo responda ao parasitismo de modo próprio, resultando ou não em manifestação patológica (RIDLEY, 1987).

3.1.6 Características eco-epidemiológicas

Os ciclos biológicos de transmissão de *Leishmania* possuem diferenças admiráveis, pois tiveram peculiaridades estabelecidas ao longo do processo evolutivo. Cada área endêmica possui um padrão de transmissão característico, resultando em grande diversidade epidemiológica (LAINSON; SHAW, 1987). São muito diversas as espécies de reservatórios e de vetores, os quais variam de acordo com a região geográfica e espécie de *Leishmania* envolvida (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). O processo é mantido em múltiplos ecossistemas, condicionado a fatores ambientais, antrópicos e evolutivos (LAINSON; SHAW, 1987). No Brasil, alguns aspectos sobre agentes etiológicos, reservatórios e vetores ainda são desconhecidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A maioria dos ciclos são de natureza exclusivamente zoonótica, no qual animais participam como reservatório (zoonoses) e o homem não faz parte da cadeia de transmissão (hospedeiro acidental) (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Em

casos específicos, em algumas regiões, como no subcontinente indiano, tornam-se antroponozoonoses, pois o homem assume também a função reservatório (ASHFORD, 2000; LAINSON, 2010).

Os ciclos podem ser classificados de acordo com a zona de ocorrência, sendo considerado silvestre quando a zoonose ocorre em áreas de vegetação primária com participação de animais selvagens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a). Quando a transmissão está associada à exploração desordenada de florestas e matas é classificado em ocupacional ou de lazer. E, quando a transmissão se estabelece em áreas de colonização, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio, é considerado rural ou periurbano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a).

É importante ressaltar que na área urbana, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal potencial reservatório de *L. (L.) infantum* (PENNISI, 2015), inclusive no Brasil (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). No ciclo silvestre participam canídeos silvestres e marsupiais.

Existe uma relação bastante seletiva entre parasito e vetor, que é normalmente o resultado entre fatores ecológicos e moleculares (LAINSON; SHAW, 1987). Isto resulta em certo grau de especificidade, no qual determinadas espécies de vetores são capazes de transmitir apenas uma ou duas espécies de parasito (BATES, 2008). Contudo, em distintas regiões de transmissão, mais de uma espécie de vetor podem estar envolvidos para uma única espécie de parasito.

Entre aproximadamente 1.000 espécies de flebotomíneos conhecidos, entre as 90 espécies responsáveis pela manutenção dos ciclos de transmissão (WHO, 2015), cerca de 30 têm importância em saúde pública nas Américas (SHARMA; SINGH, 2008). Flebotomíneos são intimamente associados a vários parasitos e reservatórios, em diferentes ciclos de transmissão (FORATTINI, 1973; NASCIMENTO et al., 2013).

Dentro da classificação sistemática, os flebotomíneos vetores são pertencentes à ordem Diptera, família Phlebotomidae, gêneros *Lutzomyia*, nas Américas; e *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África (FORATTINI, 1973). Popularmente são conhecidos por mosquito-palha, birigui, tatuquira, cangalhinha, anjinho e outros, ou, em inglês, *sandfly* (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Em casos raros é possível que o mesmo flebotomíneo seja o vetor de outros patógenos, como no caso de *Lutzomyia verrucarum*, que é vetor de *Leishmania*

peruviana, assim como de *Bartonella bacilliformis*, uma bactéria que causa a doença de Carrión, febre de Oroya ou verruga peruana (COHNSTAEDT et al., 2012).

Entre os reservatórios, também denominados de hospedeiro natural, muitas espécies de vertebrados estão envolvidos nos diferentes nichos ecológicos (LAINSON, 2010). A maior parte são roedores, marsupiais, dasipodídeos (mamíferos desdentados, que compreende os tatus) ou outros animais silvestres, que variam conforme a espécie do parasito transmitido (SANTIAGO et al., 2007) (SOUZA et al., 2014). Quase sempre os reservatórios permanecem assintomáticos (ASHFORD, 2000), sendo a manifestação patológica geralmente imperceptível.

3.1.7 Hospedeiro humano

Na FIGURA 9 são ilustradas as principais etapas até que ocorra a manifestação patológica de leishmaniose em humanos. Apenas uma pequena fração dos indivíduos infectados irão desenvolver a doença e, em alguns, pode ser completamente assintomática (ULIANA, 2012).

O acesso do parasito ao organismo é realizado através da pele, que é o maior órgão do corpo humano. A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Ela mantém a homeostase interna do organismo, separando o ambiente externo do interno e por meio de atividades imune e endócrina (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2013). Elementos cutâneos podem exercer poderosas ações sistêmicas e em alguns casos, comprometer o funcionamento regular do organismo (KUMAR, 2013).

Espécies de *Leishmania*, como a maioria dos agentes infecciosos, desenvolveram mecanismos que lhes conferem evadir a resposta criada pelo sistema imune desde os primeiros momentos da infecção (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; VANNIER-SANTOS et al., 2002). Algumas formas promastigotas são destruídas por macromoléculas do sistema complemento, entretanto algumas continuam vivas e evadem o sistema imune inato (GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

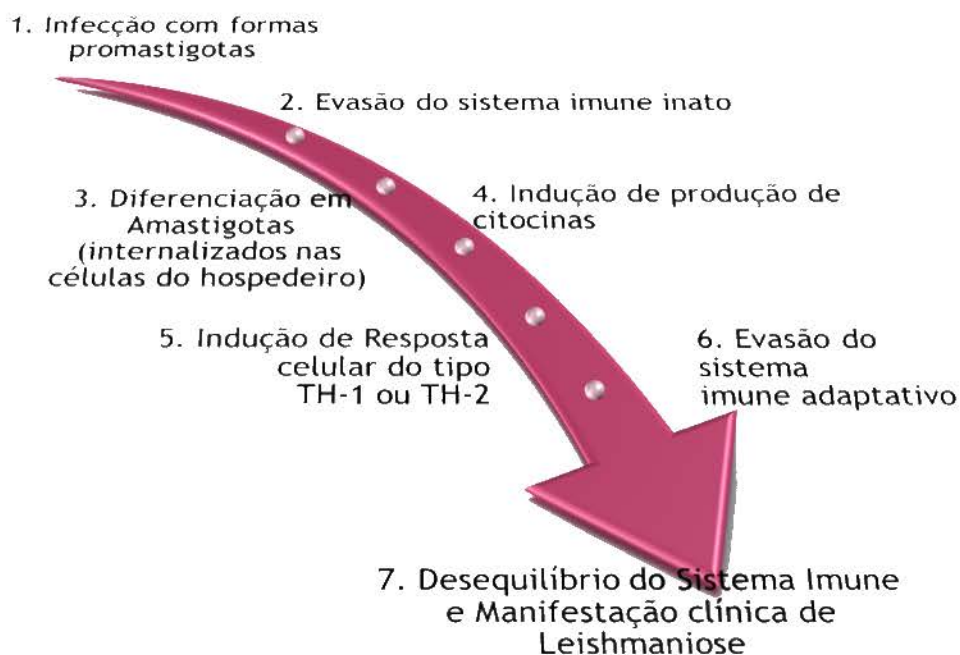


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO COM *LEISHMANIA*
FONTE: O AUTOR (2015)

Inicialmente, formas promastigotas são fagocitadas por neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o local da picada no tecido epitelial. Neutrófilos infectados liberam os parasitos, que em seguida são fagocitados por macrófagos e outras células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SOUZA-LEMOS et al., 2008). Os parasitos transformam-se em amastigotas, que se multiplicam dentro do vacúolo (BURCHMORE; BARRETT, 2001).

Durante o processo de evasão do sistema imune, uma série de eventos coordenados participam (KOLODZIEJ; RADTKE; KIDERLEN, 2008). Há a interferência do parasito na sinalização celular durante a diferenciação celular em formas amastigotas (KIMA, 2014). Quando internalizadas conseguem bloquear a indução e regulação de células chave do hospedeiro que tem as funções de proteção, funcionando como se fosse um “cavalo-de-tróia” (SHAPIRA; ZINOVIEV, 2011). Entre elas encontram-se neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema imune. Envolve a mudança de perfil de expressão de citocinas, que são

polipeptídeos produzidos em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias (NARAYAN et al., 2009). Funções chave são bloqueadas pelo parasito, entre elas a produção de óxido nítrico (NO), Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa, tumour necrosis factor-alpha), interleucina-12 (IL-12), espécies reativas de oxigênio (ROS, radical oxygen species) (OLIVIER et al., 2012).

O pré-requisito para sobrevivência de *Leishmania* nestes fagócitos é a inibição de mecanismos efetores microbicidas celulares (VAN ZANDBERGEN et al., 2006). Desta forma, os parasitos conseguem evadir o sistema imune adaptativo (NATARAJAN et al., 2014). Algumas interações são fundamentais para esta finalidade, entre elas: interação de macromoléculas de superfície celular com *Leishmania*, principalmente LPG (lipofosfoglicanas), e criação de uma cascata de eventos imunomoduladores, conforme verificado em modelo animal por Paranaíba (2015).

Através da resposta inflamatória local e sistêmica (resposta de fase aguda), o hospedeiro exhibe sua capacidade de defesa. Durante esta fase há a interação entre células e moléculas em que o parasito explora ao máximo as possibilidades de infecciosidade, patogenia e virulência para evadir, contrariar ou anular essas defesas (GARCÍA-ALMAGRO, 2005). Neste sentido, muitos modelos são especulados para explicar detalhadamente como os parasitos exploram a maquinaria de autofagia do hospedeiro para reduzir a eliminação de parasitos mediada por células (CRAUWELS et al., 2015).

Um modelo clássico e simples foi utilizado por anos para explicar a evolução da doença (PINHEIRO, 2004). Segundo este modelo, a infecção se instala conforme a reação de resposta imune celular do hospedeiro é do tipo Th-1 ou do tipo Th-2. Cada estado imunológico possui um perfil de expressão e regulação de citocinas, INF-gama e óxido nítrico. Caso ocorra apresentação de antígeno Th1 CD4+, as células são ativadas a produzir IL-2, INF-gama e TNF-alfa; fatores que promovem a ativação regulada de macrófagos e células T especializadas. Desta maneira, englobam e destroem o parasito sem que ocorra resposta imune exarcebada e prejudicasse o hospedeiro. Caso a resposta fosse do tipo Th-2 CD4+ a infecção persistiria (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

De forma geral, o desequilíbrio do sistema imune resulta na manifestação clínica de leishmanioses. A ocorrência de dermo-, muco- ou viscerotropismo, ou seja, a preferência do parasito pela pele, mucosas ou órgãos internos, respectivamente, será o resultado de um conjunto de fatores, como esquematizado na FIGURA 10. Entre os fatores que interagem estão: espécie de *Leishmania* envolvida (ISHIKAWA et al., 2002) (PEACOCK et al., 2007), fatores ambientais (PATZ et al., 2000), fatores do próprio vetor (CARREGARO et al., 2013), estado nutricional do hospedeiro (KUMAR et al., 2014), estado imunológico do hospedeiro (BARRATT et al., 2010) (NATARAJAN et al., 2014) (GURUNG; KANNEGANTI, 2015) e fatores genéticos (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

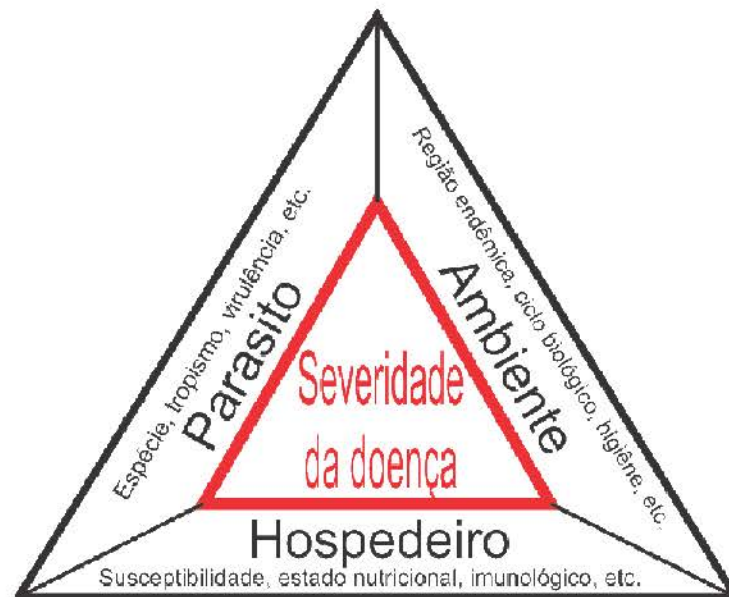


FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS FATORES QUE INFLUENCIAM A SEVERIDADE DA MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA
FONTE: O AUTOR (2015)

3.2 CONTROLE E TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Devido à complexidade de transmissão das leishmanioses, é pouco provável a obtenção de controle da doença com uma única intervenção. Uma combinação de estratégias devem ser adaptadas em cada contexto, como esboçado na FIGURA 11. No entanto, todas as possíveis estratégias de controle de leishmaniose apresentam certas deficiências ou até mesmo impossibilidades. Desta forma, as pesquisas continuam perseverantes e novas drogas ainda são urgentemente necessárias (DAVIS et al., 2004; PINK et al., 2005; ROCHA et al., 2005; TEMPONE et al., 2008; ALVAR et al., 2012; FREITAS-JUNIOR et al., 2012; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012; GIAROLLA; FERREIRA, 2015; SANGSHETTI et al., 2015; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

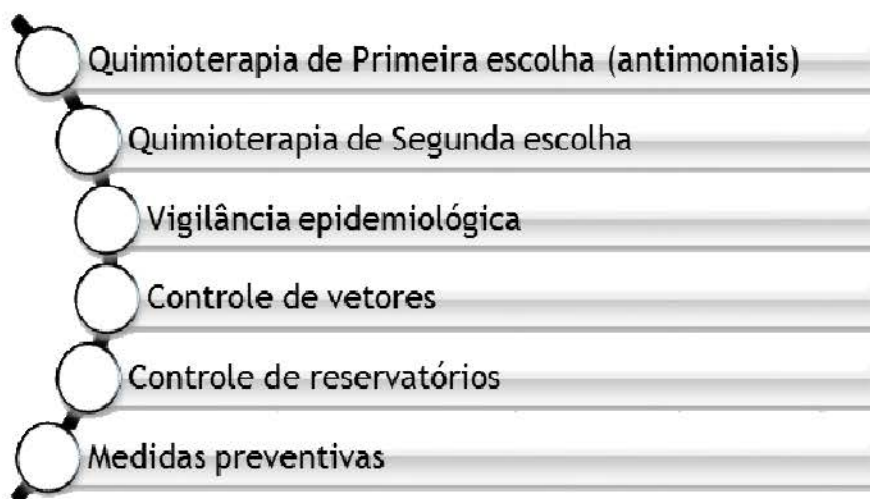


FIGURA 11 – FORMAS DE CONTROLE DE LEISHMANIOSE

O tratamento de leishmanioses com medicamentos ainda é o método atual e simples de resolução deste problema de saúde pública (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007) (MASMOUDI et al., 2013). Todas as formas de leishmaniose são tratáveis com antimoniais, que são a quimioterapia de primeira escolha. Entretanto, em algumas circunstâncias ou complicações, é necessário recorrer aos quimioterápicos de segunda escolha (VÁSQUEZ et al., 2006).

Um componente essencial nos programas de controle da doença é um sistema intensivo de vigilância que registre e atue na detecção de casos, presente

em 33 países (ALVAR et al., 2012). No Brasil, as leishmanioses estão na lista de Doenças de Notificação Compulsória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b).

Habitualmente, o controle de leishmanioses leva em consideração o diagnóstico e tratamento de casos confirmados, controle integrado de vetor e, se necessário, controle de reservatório animal (FAULDE et al., 2009). No entanto, o controle de reservatórios é complexo, pois a eliminação de mamíferos da natureza causa desequilíbrios nos ecossistemas e discussões éticas sobre o assunto (ASEVEDO, 2012). Mesmo assim, o respaldo técnico-científico é de que não há até o momento tratamento ou prevenção eficaz para reservatórios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). O Ministério da Saúde, frente ao decreto federal do senado, nº 51.838 de 14 de março de 1963 recomenda a eutanásia de animais com Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Tal decreto é reforçado pela portaria interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento de cães com a doença com produtos de uso humano ou que não estejam registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O acompanhamento epidemiológico com objetivo de prever medidas a serem tomadas é fundamental e adotado em diversas situações (GRAMICCIA; GRADONI, 2005) (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Quando possível, vacinas serão capazes de prevenir a infecção, mas a sua criação não está prevista para logo, mesmo que algumas tentativas já estejam em testes de fase clínica (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; HOTEZ et al., 2015). Antes, será necessário obter reprodutibilidade de eficiência vacinal e eliminar problemas de sorologia cruzada. O êxito seria uma façanha ante as complexas variações epidemiológicas de leishmanioses (DUMONTEIL, 2007; CARSON et al., 2009; DUNNING, 2009). Segundo Rezvan e Moafi (2015), numa revisão bibliográfica sobre diversas abordagens vacinais, a maioria delas não realizaram os testes necessários para validação das vacinas pela OMS.

Medidas profiláticas ainda são um dos melhores métodos de controle. A indicação é diminuir os riscos de ser picado por um flebotomíneo infectado. No entanto, essas medidas são inteiramente dependentes da situação e da taxa de ocorrência local (CDC, 2015). Sugere-se evitar atividades em ambientes externos, especialmente nas horas do amanhecer e do entardecer, quando os insetos são geralmente mais ativos. Deve-se manter a casa e quintal limpos e o livre dos

criadores de insetos, que normalmente são locais úmidos com acúmulo de material orgânico. Além disto, deve-se minimizar a quantidade de pele exposta usando roupas adequadas (FAULDE et al., 2009). Se possível, deve-se aplicar repelentes, entre os quais são mais indicados os que contenham DEET (N,N-diethylmetatoluamide) na fórmula (CDC, 2015). Sugere-se que ambientes fechados tenham redes protetoras ou ar condicionado, considerando o tamanho ínfimo de flebotomíneos adultos (2 a 4 mm) (FAIMAN et al., 2011). Caso necessário, deve-se tratar as áreas de convivência, as vestimentas e as redes protetoras com inseticidas piretróides, similares aos utilizados na dedetização para controle vetorial (LI et al., 2015). Entretanto, o uso indiscriminado favorece a criação de resistência por certas linhagens de flebotomíneos e pode ser tóxico para humanos (FISHER et al., 2015).

3.2.1 Antimoniais - Quimioterapia de primeira escolha

Antimoniais orgânicos foram utilizados pela primeira vez no tratamento de leishmanioses há mais de um século (WHO, 2010). O primeiro a ser usado foi introduzido por Gaspar Vianna, em 1912, no Brasil, para o tratamento de LC e LMC (REZENDE, 2009). Era formulado na forma trivalente (Sb III), conhecido como tártaro emético (LIMA et al., 2007). Em 1922, Bramachari introduziu uma das primeiras formulações mais seguras, a urea stibamina (WHO, 2010). Antimônio pertence ao mesmo grupo periódico do arsênio, assumindo principalmente os estados de oxidação trivalente e pentavalente.

Antimoniais continuam como os medicamentos de primeira escolha, tanto na América Latina (TUON et al., 2008), como no Velho Mundo (MASMOUDI et al., 2013). Os principais medicamentos atualmente comercializados são quimicamente equivalentes e consistem em Antimônio Pentavalente (Sb V complexado) (FIGURA 12). Algumas formulações genéricas já existem (SOTO et al., 2004), mas apenas antimoniato de meglumina está registrado na Lista de Medicamentos de Referência da ANVISA.

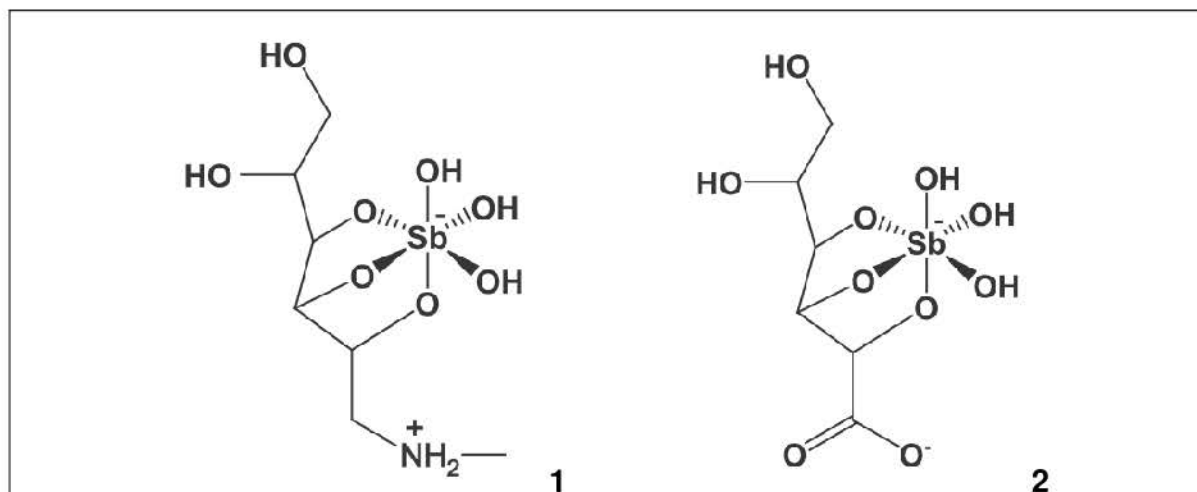


FIGURA 12 – MEDICAMENTOS DE PRIMEIRA ESCOLHA NO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES (1) ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (2) STIBOGLUCONATO FONTE: FRÈZARD et al. (2008)

Glucantime (antimoniato de meglumina) é fabricado pela Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. e comercializado principalmente no continente Americano. Pentostam (estibogluconato de sódio) é fabricado pela Glaxo Smith Kline e comercializado em alguns países da Europa, Ásia e África (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015). São recomendados como referência, pois são os mais efetivos (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

Entretanto, são contra-indicados em muitos casos devido à limitações. Tanto antimoniato de meglumina como estibogluconato de sódio levam a efeitos colaterais semelhantes (SOTO et al., 2004). Entre os efeitos graves estão febre, mialgia, hepatite, pancreatite e arritmias cardíacas. Também são registrados casos de anorexia, vômito, náusea, dor abdominal, artralgia, dor de cabeça, gosto metálico e letargia (MASMOUDI et al., 2005). Mudanças eletrocardiográficas ocorrem dependendo da dose e da duração do tratamento. Em determinados casos graves pode levar à cardiopatia crônica ou à morte súbita devido à insuficiência renal (SANGSHETTI et al., 2015).

Portanto, os antimoniais são contra-indicados para pacientes coinfectados com HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004), mulheres grávidas (FIGUEIRO-FILHO et al., 2004), doentes com insuficiência hepática e renal e naqueles em uso de drogas anti-arrítmicas (VÁSQUEZ et al., 2006). Crianças revelaram em ensaios clínicos uma taxa de resposta ao tratamento inferior aos adultos, devido à taxa de eliminação de antimônio significativamente mais elevada (PALACIOS et al., 2001; CRUZ et al.,

2007; RUBIANO et al., 2012). Antimoniais ainda podem exercer interferências sobre o sistema imune do paciente (MAURER-CECCHINI et al., 2009). A quimioterapia induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (KOCYIGIT et al., 2002).

O antimônio acumula-se, em geral, em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins e fígado, além de possuir grande afinidade pelo baço e pelo sangue (RATH et al., 2003). Os mecanismos de ação ainda não são totalmente compreendidos. Não está esclarecido se ambos os estados de oxidação apresentam atividade biológica ou se há formação de pró-droga com bioconversão ao estado trivalente (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005). De forma geral, os antimoniais interferem na bioenergética das formas amastigotas, tanto na glicólise, quanto na oxidação dos ácidos graxos. Essa inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (SERENO; HOLZMULLER; LEMESRE, 2000).

O esquema terapêutico de antimoniais varia de acordo com a forma clínica diagnosticada, mas necessita administração parenteral diária (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Recomenda-se convencionalmente entre 10 a 20 mg/Sb+5/kg/dia, com prescrição de 15 mg/Sb+5/kg/dia para LC e 20 mg/Sb+5/kg/dia para LMC e forma difusa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a). O tempo mínimo deve ser de vinte dias e prolongado para trinta quando acomete mucosas ou em casos não responsivos.

Os casos devem ser acompanhados mesmo após o fim do tratamento, pois o critério de cura é clínico (COUTO et al., 2014). Propõe-se acompanhamento durante os três meses consecutivos ao tratamento e reavaliações após 12 e/ou 24 meses do término (REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR, 2007). Pacientes que tenham recidiva após o tratamento inicial devem seguir para mais uma rodada de tratamento, ou para o uso de **farmacos de segunda escolha** (PANDEY; PANDEY; PUN, 2012) tais como anfotericina B, miltefosina, paromomicina ou pentamidina (FIGURA 13).

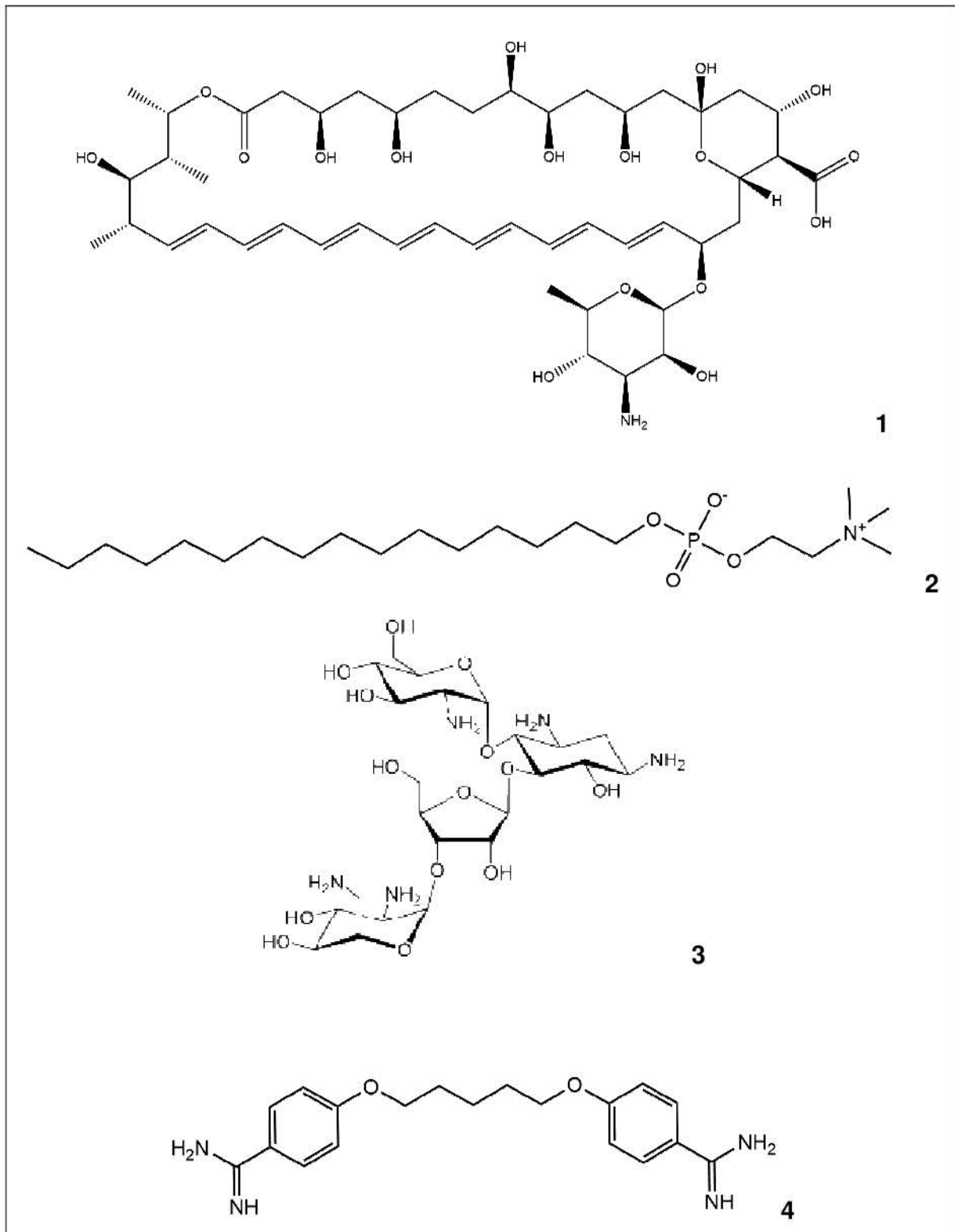


FIGURA 13 – FÁRMACOS DE SEGUNDA ESCOLHA NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSES (1) ANFOTERICINA B; (2) MILTEFOSINA; (3) PAROMOMICINA; (4) PENTAMIDINA
FONTE: (DRUGBANK, 2015)

3.2.2 Anfotericina B

Anfotericina B (FIGURA 13-1) é um antibiótico poliênico, macrolídeo, com propriedades antifúngicas e anti-*Leishmania*, originalmente extraído da bactéria filamentosa *Streptomyces nodosus* (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). A estrutura e a configuração absoluta da molécula foi determinada por cristalografia de raios X (MECHLENSKI et al., 1970). Atua alterando a permeabilidade da membrana celular, formando complexos com esteróis substituídos, gerando poros que alteram o equilíbrio de íons e desencadeiam a morte do parasito (KAUR; RAJPUT, 2014).

A via natural para a síntese desta molécula inclui vias de policetideo sintases (ROBINSON, 1991). Linke et al. (1974); Liu (1984) e Khan et al. (2011) definiram alguns aspectos de produção em relação a variáveis de rotas de biosíntese e de síntese de derivados químicos. As primeiras metodologias de purificação fizeram uso de *high-speed liquid chromatography* (MECHLINSKI; SCHAFFNER, 1974). Um dos processos de produção atuais foi estabelecido por Schaffner e Kientzler (2000).

Segundo Brown et al. (2005), a anfotericina B é utilizada na maioria das vezes nos casos de leishmanioses quando há ineficiência dos antimoniais. Segundo Molina (2007), a formulação lipossomal de anfotericina B é apenas um apoio secundário ao uso de antimoniais. Collazos (2008), acredita que o medicamento é útil na prevenção de recidivas de LV enquanto se aguarda convallescência imunológica. Atualmente, tem sido indicado como primeira escolha em alguns locais, como nos Estados Unidos (VAKIL; FUJINAMI; SHAH, 2015).

Apesar de possuir propriedade química anfotérica, a estrutura cristalina é insolúvel em água (STILLER; VANDEPUTTE; WACHTEL, 1955). Logo, para melhor biodisponibilidade de aplicação, diversas formulações foram desenvolvidas, entre as quais muitas apresentam taxas de cura entre 90 a 95% (BARRATT; LEGRAND, 2005).

A formulação micelar desoxicolato (Fungizone®) é muito efetiva (SEIFERT, 2011). Contudo, entre os efeitos colaterais está grave nefrotoxicidade (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Formulações lipossomais, também efetivas no tratamento, são um avanço na minimização de efeitos colaterais (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007). São relatados muitos êxitos de tratamento, mesmo em casos complicados como o

tratamento de LC provocada por *L. (V.) braziliensis* (BROWN et al., 2005), LC em crianças (DEL ROSAL et al., 2010) e LV em pacientes imunodeprimidos (BERN et al., 2006). Um exemplo de destaque é o AmBisome (Gilead), que é a formulação de primeira escolha para gestantes e pacientes nefropatas (DAVIS; MURRAY; HANDMAN, 2004).

Apesar de eficazes, as formulações tem uso limitado devido à rota de administração recomendada, que é por vagarosa infusão intravenosa (ELMAHALLAWY; AGIL, 2015). Hospitalização é recomendada para monitorar os pacientes continuamente ao longo da administração do tratamento (SANGSHETTI et al., 2015); indicação válida mesmo para pacientes que façam uso de preparações lipossomais e têm a vantagem de necessitar de apenas uma ou duas aplicações (MENEZES et al., 2015). Durante a administração podem ocorrer eventos como arrepios, calafrios, febre e hipóxia (HANN; PRENTICE, 2001). Na prática, para formulação desoxicolato, são aproximadamente 42 aplicações até que se complete a dose cumulativa total sugerida (SWEETMAN, 2009). A dose recomendada dessa formulação é de 1 mg/kg/dia, em dias alternados (DAVIS; MURRAY; HANDMAN, 2004).

O uso de formulações em quimioterapia prolongada é inviável em muitos países (DAVIS; MURRAY; HANDMAN, 2004). Formulações lipossomais, entretanto, são exorbitantemente caras (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Alguns estudos sugerem aplicação concomitante de anfotericina e outros fármacos (TRINCONI et al., 2014) ou a constante melhoria de novas formulações (WASAN et al., 2009).

3.2.3 Miltefosina

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Impavido, Knight Therapeutics) (FIGURA 13-2) é o primeiro medicamento com administração por via oral com atividade contra LV e LC (SOTO; SOTO, 2006) (JIMENEZ-LOPEZ et al., 2010). Este medicamento é membro representativo da segunda geração de derivados de Alquilfosfolípeos (APL) sintéticos (AZZOUZ et al., 2005). APLs pertencem à família de agentes citostáticos (LANGEN et al., 1992), em que edelfosina é o principal representante de primeira geração.

Dorlo e colaboradores (2012) revisaram as potencialidades de miltefosina contra leishmanioses. Jimenez-Lopez e colaboradores (2010) citaram também atividade em relação a outros protozoários *in vitro*. A partir de maio de 2005, governos da Índia, Nepal e Bangladesh iniciaram campanhas para a eliminação de leishmaniose visceral utilizando miltefosina. Em 2014, foi considerado como primeira escolha nos Estados Unidos (VAKIL; FUJINAMI; SHAH, 2015).

Em contraste com a maioria dos agentes quimioterápicos correntemente utilizados, miltefosina não têm como alvo o DNA ou o citoesqueleto, mas o metabolismo de lipídeos (RAKOTOMANGA et al., 2007). Atuam sobre a membrana celular (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2008). Segundo Wright (2004), o mecanismo pode ser explicado pela sinalização para morte programada, através dos componentes de membrana celular. Em consequência, exibe potente ação leishmanicida pela interferência nas vias metabólicas dos parasitos (BARRATT; SAINT-PIERRE-CHAZALET; LOISEAU, 2009), em especial sobre a biossíntese de fosfolípeos e lipídeos (KAUR; RAJPUT, 2014).

Cerca de um terço dos pacientes tratados com miltefosina apresentam toxicidade gastrointestinal, devendo ser co-administrada com alimentos. Também são relatadas ação nefrotóxica, hepatotóxica e teratogênica (FREITAS-JUNIOR et al., 2012), indução de trombocitopenia e síndrome de Stevens-Johnson (PALADIN THERAPEUTICS INC., 2015). Não deve ser administrada em grávidas. Um método analítico foi desenvolvido por Kip et al. (2015) com intuito de monitorar a ação tóxica e farmacocinética de miltefosina pela medição da concentração intracelular do fármaco em células mononucleares de sangue periférico de humanos.

3.2.4 Paromomicina

Paromomicina (FIGURA 13-3) é um antibiótico aminoglicosídeo isolado pela primeira vez em 1950, a partir do meio líquido do cultivo de *Streptomyces krestomuceticus* (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJER, 2009). Compostos desta classe tem registro de ação para infecções clínicas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, giardíase, criptosporidiose e amebíase (SCHLECHT; BRUNO, 2012). No entanto, apenas paromomicina possui atividade leishmanicida, sugerida por Kellina (1961).

É utilizada em formulação parentérica para o tratamento de VL e LC (SANGSHETTI et al., 2015) e em algumas formulações tópicas para tratamento de LC (BEN SALAH et al., 2013). A dose necessária é de 11 mg/kg por dia, durante cerca de 21 dias via intramuscular (SUNDAR et al., 2007). Aguiar et al. (2010) investigaram a atividade de combinação topical de paromomicina e miltefosina. Morais-Teixeira et al. (2015) testaram a combinação paromomicina, antimonioato de meglumina e miltefosina. Ambos obtiveram maior eficácia na redução da carga parasitária e do tamanho da lesão que o tratamento monoterápico.

Paromomicina inibe o crescimento de promastigotas e amastigotas intracelulares de modo dose-dependente (JHINGRAN et al., 2009). O mecanismo de atividade ainda é desconhecido. O fármaco atua principalmente sobre o potencial de membrana mitocondrial e desregulação das vias respiratórias (MAAROUF et al., 1997); sobre a síntese de macromoléculas e alteração de fluidez de membrana (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007); e sobre a síntese protéica e metabolismo lipídico (JHINGRAN et al., 2009). Segundo Shalev et al. (2015), os elementos estruturais importantes para atividades inibitórias de aminoglicosídeos são a seletividade pelos ribossomos citossólicos de *Leishmania*.

Apesar de já ter sido testado em fase clínica IV para tratamento de leishmanioses e licenciado na Índia em 2006 para uso combinado contra VL (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJER, 2009), o sulfato de paromomicina leva à nefrotoxicidade, ototoxicidade e hepatotoxicidade (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Embora a abordagem de aplicação tópica seja atraente, a sua utilização também pode ocasionar os mesmos problemas (KALANTARI et al., 2014).

Segundo Jhingran et al. (2009), que determinou os mecanismos de absorção e ação sobre *L. donovani*, há muitas brechas para o escape do parasito à ação do fármaco. Experimentalmente, mostra-se possível a indução de seleção de parasitos resistentes (*L. donovani* e *L. infantum*) *in vitro* (HENDRICKX et al., 2012) e *in vivo* (HENDRICKX et al., 2015).

3.2.5 Pentamidina

Pentamidina (FIGURA 13-4) é uma diamidina catiônica, recomendada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) como fármaco de segunda linha contra leishmanioses (OPAS, 2013). É uma alternativa para casos intolerantes ou sem resposta aos antimoniais e alguns casos de leishmaniose tegumentar com comprometimento de mucosa (SAMPAIO et al., 1988).

Mehta e Shaha (2004), demonstraram que a pentamidina se acumula na mitocôndria e, por isso, podem aumentar a eficácia de inibidores do complexo II da cadeia respiratória. Resultados de Zsila (2015) implicam que, além de ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos também podem ser alvos farmacológicos para drogas diarilamidinas, como a pentamidina.

A utilização da diamidina pentamidina é limitada por problemas de toxicidade irreversível e eficácia variável (MANZANO et al., 2011). Relapso de tratamento foi observado em aproximadamente 10% dos pacientes (LAI A FAT et al., 2002). A pentamidina tem efeito tóxico sobre as células pancreáticas e, em uso contínuo promove hipoglicemia seguida por hiperglicemia, resultantes da interferência sobre a liberação de insulina (ANDEL et al., 2014). Durante o tratamento pode haver dor no local da injeção, náuseas, dor de cabeça e mialgia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). Menos frequentemente, resulta em um sabor metálico, uma sensação de queimadura, dormência e hipotensão, diabetes mellitus irreversível em insulino-dependentes (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006).

3.2.6 Considerações sobre os tratamentos das leishmanioses

Quanto mais rápido for realizado o correto diagnóstico e iniciado o tratamento, maior é a chance de cura e menor o número de casos fatais (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Contudo, um dos principais problemas enfrentados pela grande parcela da população mundial é o baixo investimento *per capita* disponibilizado pelos sistemas de saúde pública (STROMME; BAEROE; NORHEIM, 2014). Segundo Marinho (2015), o escasso desenvolvimento de estratégias de controle de leishmanioses pode refletir o fato de serem doenças relacionadas com a pobreza. O acesso aos serviços de saúde, diagnóstico, internações e acompanhamento médico é limitado (OLLIARO et al., 2013).

A confirmação de diagnóstico é fundamental antes da administração de tratamentos (PETERS; EVANS; LANHAM, 1983), pois dosagem e esquema terapêutico podem sofrer mudanças de acordo com a manifestação clínica diagnosticada (OLLIARO et al., 2013). Os médicos devem estar cientes da grande variedade de apresentações clínicas possíveis, pois as respostas aos tratamentos são diferentes (WHO, 2010). É essencial entender as diferentes linhagens de parasito que estão presentes nas áreas endêmicas. Uma prescrição equivocada pode induzir efeitos tóxicos aos pacientes (AMATO et al., 2009). Ainda, se houver infecção secundária por bactérias, deve-se incluir também uso de antibióticos (ZANGGER et al., 2013). A terapia é ainda mais complicada pelo grande número de crianças e idosos infectados (PALUMBO, 2008).

Portanto, considerando o tratamento de leishmanioses, os custos são impactados por toda linha de assistência prestada ao paciente (FAULDE et al., 2009). Mesmo assim, algumas estimativas internacionais são feitas apenas em relação ao custo *per capita* do fármaco durante o tratamento. A TABELA 2 resume algumas estimativas compiladas pela OMS em relação aos gastos *per capita* por tratamento (WHO, 2010). Leva-se em consideração o número de doses necessárias, porém desconsidera-se custos de internação, acompanhamento ou transporte até o local de tratamento. Pacientes em áreas desfavorecidas, às vezes, não tem acesso a estes recursos (LEZAUN; MONTGOMERY, 2014).

TABELA 2 – CUSTO ESTIMADO PER CAPTA DE FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE LV E LC (JANEIRO, 2010)

Composto Nome comercial e base de cálculo	Esquema terapêutico recomendado	Custo per capita
Antimoniato de Meglumina Glucantime, Aventis Vial de 5-mL com 81 mg/mL US\$ 1,2	LV: 20 mg/kg/dia; 30 dias LC: Sistêmico; 20 mg/kg/d; 20 dias LC: Intralesional	US\$ 59 US\$ 39 US\$ 13
Estibogluconato de sódio Pentostam, GlaxoSmithKline vial de 100mL, 100mg/mL 66,4 GBP SSG, Albert David, Índia vial de 30-mL of 100 mg/mL € 5,65	LV: 20 mg/kg/dia; 30 dias LC: Sistêmico: 20 mg/kg/d; 20 dias LC Intralesional	US\$ 56 US\$ 37 US\$ 12
Anfotericina B Desoxicolato Diversas marcas Vial de 50-mg US\$ 7,5 (média)	LV: 1 mg/kg; 30 dias alternados	US\$ 20
Anfotericina B Formulação lipossomal AmBisome (L-Amb), Gilead, EUA (exclusivo) Vial 50-mg US\$ 18 *Negociado pela OMS	LV: 10 mg/kg; 1 dia LV: 20 mg/kg 2 a 4 dias	US\$ 126 US\$ 252
Miltefosina Impavido, Paladin, Canada (exclusivo) Adultos US\$ 45,28-54,92 *Negociado pela OMS Crianças US\$ 34,36-39,30 *Negociado pela OMS	LV: 100 mg/dia; 28 dias	US\$ 65 a US\$ 150
Paromomicina Paromomycin, Gland Pharma, Índia (exclus.) Adultos US\$ 15	LV: 15 mg/kg/dia; 21 dias	US\$ 15
Pentamidina Isetionato Lomidina (via programa de doação)	LV: combinado a L-Amb 5 mg/kg e paromomicina 15 mg/kg/d; 11 dias LC: até 4 meses	US\$ 79 US\$ 0

FONTE: ADAPTADO DE WHO (2010)

Os tratamentos com antimoniais, mesmo possuindo o custo estimado maior que paromomicina e anfotericina B desoxicolato, ainda apresentam o melhor custo benefício devido à sua eficácia no tratamento a longo prazo. A injeção intralesional, apesar de mais barata, serve apenas para algumas espécies que não causam recidivas. Ainda representam um custo elevado em relação ao montante que é investido para populações afetadas por doenças negligenciadas. No Brasil e em alguns países, sua administração é restrita à liberação pelos órgãos públicos, burocratizando o acesso, mas estimulando a notificação de casos (VEEKEN; PECOUL, 2000). Formulações coloidais e lipossomais de Anfotericina são economicamente inviáveis para a população que geralmente é afetada (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006). O custo de formulações de anfotericina lipossomal ainda é proibitivo (CHAVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

Mundialmente há o investimento em pesquisa para doenças negligenciadas, pela *roadmap* da OMS, que prevê tratar todos os casos de leishmaniose visceral até

2020 (WHO, 2012). Organizações como Institute of One World Health (IOWH), Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi) e Bill and Melinda Gates Foundation patrocinam o desenvolvimento de medicamentos para leishmanioses (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). Em alguns casos, pesquisas são financiadas para fins militares, pois regiões estratégicas são endêmicas de leishmanioses (WILLARD et al., 2005). No Brasil, o aporte financeiro do Ministério da Saúde para o financiamento de pesquisas na área de doenças negligenciadas foi de R\$ 17 milhões em 2006 e R\$ 22 milhões em 2008 (DECIT, 2010).

As drogas atualmente em uso demonstram alta toxicidade para fígado, rim ou coração, desenvolvem resistência facilmente e podem estar contribuindo para o aumento da incidência de casos de co-infecções leishmaniose-AIDS (SVS / MS, 2004). Além disso, em Bihar, na Índia, onde ocorrem muitos casos de LV, a regimes inadequados de tratamento permitiram a seleção de parasitos com resistência generalizada a estes agentes (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Dada a variedade de diferenças bioquímicas e moleculares entre espécies de *Leishmania*, a variação intrínseca de sensibilidade em relação a vários fármacos é evidente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Segundo Jha (2006), para se solucionar o problema de falhas de tratamento e para reduzir a duração da terapia, a combinação de pelo menos dois agentes leishmanicidas eficazes é uma opção desejável.

O Ministério da Saúde orienta sacrificar os cães infectados, pois continuam comportando-se como reservatórios mesmo após o tratamento. Usar as mesmas drogas no tratamento de infecção canina e humana poderia favorecer a seleção de cepas resistentes do parasito (LIMA et al., 2007). Além disto, os resultados de testes usados como critério para o abate de cães soro-reativos em programas de vigilância são controversos (SILVA, D. A. DA et al., 2013). Segundo Baneth et al. (2008), uma terapia exclusiva para leishmaniose canina é urgentemente necessária.

3.3 PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

3.3.1 Pesquisas relativas ao tratamento de leishmanioses

Várias frentes de pesquisa sobre controle de leishmanioses estão em desenvolvimento pela comunidade científica internacional. Algumas das principais áreas estão descritas na FIGURA 14. Atualmente, as áreas se sobrepõem e se interseccionam para a descoberta e desenvolvimento de novas tecnologias.

As áreas de Farmácia, Bioquímica, Química e Biotecnologia se destacam na produção e caracterização química de fármacos com atividade leishmanicida (RENSLO; MCKERROW, 2006).

Dentre os 1556 novos medicamentos aprovados entre 1975 e 2004, somente 21 medicamentos foram especificamente desenvolvidos e aprovados para doenças tropicais (1,15%) e tuberculose (0,19%), embora juntas representem 11,4% das doenças globais (DNDI, 2007). Corroborando, Newman e Cragg (2007) apontam que entre 1981 e 2006, de um total de 1010 novas entidades químicas e indicações médicas aprovadas, apenas 14 são fármacos antiparasitários. Treze são moléculas pequenas, das quais quatro são sintéticas e sete derivados de produto natural.

Neste contexto, a pesquisa nacional de novos fármacos ganha significado perante a situação de difícil controle (TEMPONE et al., 2008). Atualmente as parcerias público-privadas são o caminho indicado no desenvolvimento de novos fármacos (NWAKA; HUDSON, 2006) (LEZAUN; MONTGOMERY, 2014).

Pesquisas em Farmacognosia, que trabalham com produtos naturais seguem o esquema de *screening* bioguiado. A obtenção de produtos normalmente segue algumas etapas em comum (WENIGER et al., 2001). Extratos que apresentem atividade são selecionados para isolamento e análises de identificação estrutural (GACHET et al., 2010). Algumas frentes de pesquisam usam a estratégia de projetos em rede e uso de bibliotecas de compostos químicos (NWAKA; HUDSON, 2006).



FIGURA 14 – ALGUMAS FRENTES DE ATUAÇÃO NA ÁREA DE PESQUISA E CONTROLE DE LEISHMANIOSES
 FONTE: O AUTOR (INFOGRAFIA); FIGURAS: GOOGLE IMAGES

A área de Bioquímica tem grande participação na pesquisa de alvos moleculares. A química trabalha na identificação estrutural dos compostos, enquanto a biotecnologia trabalha com a viabilização e estruturação de recursos biológicos na fabricação de moléculas (RICHARD; WERBOVETZ, 2010). A Bioquímica básica, por exemplo, aponta que uma serina protease secretada por *L. donovani* suprime a resposta inflamatória via ativação de macrófagos (DAS; DE; CHAKRABORTI, 2014). Um dos principais registros de modulação de macrófagos induzida pela infecção é a inibição de proteína kinase C (VIVARINI et al., 2011). Segundo Naula (2005), estas observações servem para o desenvolvimento racional de fármacos.

A Informática também tem papel fundamental na busca de *pockets* e *screening* computacional de moléculas catalogadas em relação a algum alvo, seguindo algoritmos matemáticos (JENWITHEESUK et al., 2008). Também trabalha na criação de moléculas novas dependendo da convergência de parâmetros que apontem atividade (AZEVEDO JUNIOR; SOARES, 2009).

Outras áreas que se destacam na pesquisa são as áreas Médica e a Medicina Veterinária, quando fazem a avaliação da resposta clínica aos tratamentos aplicados (MINODIER; PAROLA, 2007), sejam eles práticos (GHAFFARPASAND; SERAJ; HEIRAN, 2009) ou experimentais (CUNHA et al., 2012). O respaldo científico destas áreas representa um grande apoio às frentes de pesquisa.

Pesquisas em Imunologia e Bioquímica apontam os desdobramentos criados pela resposta imune aos pacientes, servindo para o entendimento e compreensão de mecanismos imunitários que levam à desregulação e à patogênese. Atualmente, novas hipóteses são propostas para explicar a forma de regulação e evasão de sistema imune pelo parasito (NARAYAN et al., 2009; SHAPIRA; ZINOVIEV, 2011; DAS et al., 2014; KIMA, 2014; KEVRIC et al., 2015). Uma boa revisão sobre como essas informações serão úteis para aplicação e desenvolvimento de novos medicamentos foi feita por Ashok e Acha-Orbea (2014).

Apesar do atual sucesso alcançado no controle de algumas doenças transmissíveis, algumas apresentam quadro de persistência (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014). Nesse grupo, estão as leishmanioses (visceral e tegumentar), para as quais, além da manutenção de elevadas prevalências, constata-se expansão de áreas de ocorrência desde três décadas atrás, em geral associada às modificações ambientais provocadas pelo homem (LAINSON; SHAW, 1987).

Contudo, ainda há um repositório inesgotável de soluções para os problemas que a sociedade enfrenta (GRAY; IGOLI; EDRADA-EBEL, 2012). Diversas são as fontes de obtenção de produtos orgânicos: plantas, fungos, bactérias, líquens, insetos, animais (TEMPONE et al., 2008). O metabolismo desses organismos normalmente é direcionado à proteção contra agentes exógenos em inter-relações ambientais, tais como terpenos, hormônios, antibióticos, micotoxinas, etc. (SHWAB; KELLER, 2008).

A associação entre conhecimento popular de plantas com potencial

farmacológico e prospecção fitoquímica visando isolar as moléculas bioativas importantes na produção de novos fitoterápicos tem grande importância na busca por medicamentos que atuem no tratamento da leishmaniose (LIMA et al., 2015). Plantas da Amazônia são fonte de recursos naturais para desenvolvimento de fármacos (POHLIT et al., 2013).

A Engenharia e a Biotecnologia, sobretudo, são ferramentas imprescindíveis na obtenção de novos produtos de interesse industrial, atuam para que tecnologias possam ser traduzidas em avanços práticos, em métodos aplicáveis e acessíveis de diagnóstico, tratamento e produção de fármacos oriundos de microrganismos. Segundo Rajasekaran e Chen (2015), as ferramentas de pesquisa atualmente utilizadas são genômica funcional, genômica comparativa, técnicas de *gene knockout*, *reverse docking* e *high throughput screening*.

O genoma de algumas espécies dos agentes patogênicos foram sequenciados como os de *L. major* (IVENS et al., 2005), *L. braziliensis* e *L. infantum* (PEACOCK et al., 2007). Possivelmente, esta cooperação entre Biologia e Biotecnologia permitirá a identificação de proteínas que são usadas pelo parasito, mas não por seres humanos (DUJARDIN, 2009). Estas proteínas, identificadas por análises genômicas, proteômicas e metabolômicas, poderiam servir de alvos potenciais para tratamento (LEIFSO et al., 2007).

Muitos fármacos apresentam atividade *in vitro*, porém a biodisponibilidade não oferece muitos atrativos para o seu uso como medicamento, portanto alguns estudos em Química e Bioquímica focam em métodos de englobamento de moléculas por lipossomas para entrega de medicamentos em tecidos adequados (PATO et al., 2001; BASU, 2005).

Alguns estudos utilizam a estratégia de rejuvenescimento de medicamentos já caracterizados do ponto de vista farmacológico, a qual consiste no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas. Torna-se vantajoso porque dispensa muitas vezes a realização de ensaios pré-clínicos e a primeira fase dos ensaios clínicos (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005). Há a busca do uso de medicamentos anticancer para aplicação como antiparasitários (KLINKERT; HEUSSLER, 2006).

As meta-análises também são úteis à pesquisa de medicamentos para tratamento de LC (TUON et al., 2008). Alguns abordam o estudo por *High-*

throughput screening Genomics (DAVIS; MURRAY; HANDMAN, 2004). Lakshmi et al. (2014), combinaram estudos de Biologia de *Leishmania*, Genômica e Imunologia com objetivo de identificar novos antígenos que poderiam ser candidatos a vacinas. Ao fim, identificaram tuzin, uma rara e conservada proteína transmembrana, como provável candidato. Em revisão, Menezes et al. (2015) abordam sobre a técnica de *High-Throughput Screening* para avaliação de novos fármacos.

Modelos de cultivo de células de insetos em monocamadas confluentes foram criados com a finalidade de observar a interação entre *Leishmania* e o vetor (CÔRTEZ et al., 2011). Isto poderia evidenciar formas de controle biológico.

A recorrência da doença após cura-clínica é um evento particularmente de longo prazo que permanece difícil de prever. Portanto, alguns estudos são feitos para avaliar biomarcadores de cura de leishmaniose (KIP, ANKE E. et al., 2015).

Segundo Chakravarty e Sundar (2010), o monitoramento da resistência dos parasitos poderia permitir desenvolvimento racional de fármacos. A identificação de mecanismos de resistência e alvos-chave intracelulares dariam fundamentos a tal exploração, como realizada na análise comparativa de Kaur e Rajput (2014).

3.3.2 Produtos naturais

Os mais diversos extratos naturais são obtidos desde a antiguidade e utilizados para inúmeras funções e aplicações: chás, aditivos alimentares, matérias-primas, corantes, medicamentos e outros (HANSON, 2003). Isto é possível pois células de organismos produzem uma enorme variedade de compostos químicos orgânicos (SENN, 2006).

Mesmo que o extrato seja complexo e apresente várias substâncias em sua composição, que exerçam efeitos sinérgicos, antagônicos ou paralelos (WAGNER; BLADT, 2001), as Farmacopéias Mundiais consideram válida a identificação de um princípio ativo (BRASIL, 2010). Na maioria das vezes, um único composto é responsável pela maior parte da atividade biológica do extrato. A Farmacognosia é a ciência que se ocupa com a identificação dos princípios ativos e também da titulação e normalização dos produtos acabados (CAPASSO, 2011). É um parâmetro fundamental para avaliação de efeito dose-resposta. Além disto, funciona também

como marcador de qualidade, mesmo quando não se tem conhecimento dos mecanismos de ação de um extrato em sua totalidade (GUTZEIT, 2014).

Um produto natural é um composto químico ou substância produzida por um ser vivo encontrado na natureza (STICHER, 2008). Considera-se que produtos naturais ainda mantém uma função vital em Programas Modernos de Descoberta de Novos Fármacos, pois uma enorme variedade de vias biosintéticas estão disponíveis para prospecção (GRAY; IGOLI; EDRADA-EBEL, 2012). Geralmente estes compostos apresentam atividade biológica ou farmacológica. A suspeita e confirmação de atividade de uma nova estrutura serve como a referência básica e como molde iniciador em muitas estratégias utilizadas em Programas de Descoberta de Novos Fármacos ou concepção de produtos (GRAY; IGOLI; EDRADA-EBEL, 2012).

O estudo de produtos naturais como fonte de novos medicamentos foi quase abandonado há alguns anos, devido a grande atividade restrita das moléculas relacionadas. Entretanto, desde que foram introduzidas novas moléculas no mercado de fármacos (por exemplo, os macrolídeos), renovou-se a esperança das fontes naturais inexploradas constituírem uma fonte inesgotável de substâncias bioativas com propriedades interessantes, como é revisado por Paterson e Anderson (2005).

O Brasil possui enorme biodiversidade inexplorada em que podem ser encontradas espécies de microrganismos e plantas que contêm princípios ativos. Grande quantidade de produtos com potencial atividade leishmanicida provém de produtos naturais. A literatura faz referência especial aos metabólitos secundários, sobretudo aos quais são usualmente extraídos de plantas.

Metabólitos secundários são compostos sintetizados por um organismo em seu metabolismo, mas que não são imprescindíveis em seus processos metabólicos primários. São frequentemente bioativos, de peso molecular até 1500 u.m.a. e sua produção está geralmente correlacionada com um estágio específico de diferenciação morfológica (STICHER, 2008).

Plantas são de particular interesse, pois possuem um grande espectro de biossíntese conhecido, produzindo uma vasta variedade de compostos a partir de materiais simples para conversão: água, dióxido de carbono, nitrogênio (sais elementares), compostos de fósforo e sais. Muitas de suas vias biosintéticas são conhecidas (GRAY; IGOLI; EDRADA-EBEL, 2012). Uma das descobertas mais

antigas de produtos naturais são morfina (analgésico narcótico) em 1817; estricnina (veneno) em 1818; cocaína (estimulante narcótico) em 1859; nicotina (tóxico) em 1828. Quinina e Digitalis são exemplos corriqueiros de metabólitos secundários sintetizados por plantas (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

O Reino Fungi também produz um enorme espectro de metabólitos secundários, com a finalidade de permitir a adaptação dos fungos a diversos substratos (HOFFMEISTER; KELLER, 2007). Estes metabólitos auxiliam os fungos a ocupar seu nicho por mecanismos de competição, antagonismo e autodefesa, facilitando o acesso aos nutrientes ali presentes (HANSON, 2003). Os “blocos de construção” são mais complexos e diversos que as plantas, pois os incluem metabólitos sintetizados por elas (HANSON, 2008).

Especialmente pelo destaque que têm na aplicação medicinal e farmacêutica, alguns metabólitos secundários de fungos são muito conhecidos e têm importância industrial (HALPERN; MILLER, 2002). A penicilina, produzida pelo gênero *Penicillium*, foi descoberta em 1928. Uma série de outras moléculas também são isoladas de fungos, como por exemplo os antibióticos cefalosporina, ácido fusídico e griseofulvina (LIANG; FANG, 2006). A mevinolina possui efeito hipocolesterolêmico, entretanto os seus derivados pravastatina, lovastatina e sinvastatina são substâncias ativas contidas nos principais medicamentos de doenças cardíacas, os quais renderam bilhões de dólares nos anos 90 (WASSER; RESHETNIKOV, 2002; LIANG; FANG, 2006).

Alguns fungos sintetizam moléculas moduladoras sobre atividade imune, como os polissacarídeos (WASSER, 2003). Entretanto, alguns metabólitos secundários também realizam esta função, como por exemplo a ciclosporina e a gliotoxina. São úteis contra a rejeição de órgãos transplantados e no pós-operatório. Agem como imunossupressor e imunomodulador, respectivamente.

Uma recente pesquisa sobre metabólitos produzidos por fungos, que examinou 1500 componentes isolados e caracterizados entre 1993 e 2001, mostrou que mais da metade dessas moléculas possuíam atividade antibacteriana ou antifúngica (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Por este evidente potencial, produtos naturais de fungos também são explorados pelos seus efeitos anti-tumoral (WASSER, 2003) e anti-parasitário (VITOLA, 2008; FENDRICH, 2010; VALADARES et al., 2012).

3.3.3 Produtos naturais com atividade leishmanicida

Sangshetti et al. (2015), revisaram enorme quantidade de compostos com atividade leishmanicida que foram descritos mundialmente a partir das mais variadas fontes. Produtos naturais são uma fonte promissora de novos fármacos contra as doenças negligenciadas (GIL et al., 2008; NDJONKA et al., 2013).

Há muitos extratos com atividade leishmanicida que são procedentes da bioprospecção investigativa da biodiversidade local (TIUMAN et al., 2011); tais como plantas da Colômbia (WENIGER et al., 2001); extratos da flora brasileira (TEMPONE et al., 2008); fungos da floresta Atlântica (ROSA et al., 2009); plantas do Equador (GACHET et al., 2010); organismos marinhos (PANDA et al., 2010) e plantas do Cerrado (LIMA et al., 2015). Além disso, algumas pesquisas seguem indícios do conhecimento popular e investigam quais são os princípios ativos presentes em extratos comumente utilizados por povos do Brasil (FRANCA; LAGO; MARSDEN, 1996), Peru (KVIST et al., 2006), Equador (GACHET et al., 2010) e Mali (AHUA et al., 2007).

Relatos de atividade são publicados com diversos graus de purificação dos extratos e por diversas metodologias de avaliação de atividade (ROCHA et al., 2005). Entretanto, somente moléculas identificadas podem seguir para fases de ensaio clínico (CAVALLI et al., 2010). Em revisão sobre produtos naturais, (ROCHA et al., 2005; SINGH et al., 2014) citam estudos que obtiveram atividade leishmanicida com diversos tipos de extratos orgânicos de plantas; e também catalogam as principais classes de compostos identificados: alcalóides, sesquiterpenos, quinóides, iridóides, fenólicos, flavonóides, coumarinas, auronas, chalconas, taninos, lignanas, lactonas, monoterpênicos, diterpenos, triterpenos, heterociclos com oxigênio, benzenóides, lipídeos, glucanas, esteróides e saponinas.

Em revisão específica para alcalóides, (MISHRA et al., 2009) cita atividade de alcalóides das seguintes classes: alcalóides quinolina, indol, isoquinolina, esteroidais, diterpenos, acridona, benzoquinolizidina e pirrolidinium. Singh et al. (2014), citam também as classes *pyrimidine-b-carboline*, *benzo-c-phenanthridine* e alcalóides de fontes marinhas.

Alguns produtos naturais com atividade leishmanicida são citados na TABELA 3, considerando a fonte de origem e classe de molécula ativa presente.

TABELA 3 - PRODUTOS NATURAIS COM RELATO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Origem	Classes de composto	Referências
Plantas		
<i>Copaifera paupera</i> (Herzog)	Sesquiterpenos	(TINCUSI et al., 2002)
Dwyer (Leguminosae)	Diterpenos	
<i>Maesa balansae</i>	Saponinas	(MAES et al., 2004)
<i>Lophanthera lactescens</i>	Terpenóides (nor-triterpenos e triterpenóides)	(TORRES-SANTOS et al., 2004; DANELLI et al., 2009)
<i>Pourouma guianensis</i>		
<i>Ferula szowitsiana</i>	Sesquiterpeno coumarinas - <i>Umbelliprenine</i> e aurapteno	(IRANSHAHI et al., 2007)
<i>Ambrosia tenuifolia</i>		
<i>Eupatorium buniifolium</i>	Flavonóides	(SÜLSEN et al., 2007)
<i>Ocimum basilicum</i>	Sesquiterpeno δ -cadinene	(ZHELJAZKOV et al., 2008)
<i>Scrophularia cryptophila</i>	ácidos <i>cryptophilic</i>	(TASDEMIR et al., 2008)
<i>Tephrosia pumila</i> (Fabaceae)	Isoflavonóide (isoflavan-4-ol (pumilanol))	(GANAPATY et al., 2008)
<i>Peganum harmala</i>	Peganine hydrochloride	(KHALIQ et al., 2009)
<i>Vitis</i> sp.	Resverastrol (polifenol)	(FERREIRA et al., 2014)
<i>Musa paradisiaca</i> (bananeira)	Triterpenos tipo cycloartane Esteróis	(SILVA et al., 2014)
<i>Lafoensia pacari</i> St. Hil. (Lythraceae)		
<i>Galactia glauscecens</i> Kunth. (Leguminosae)	Flavonóides, Triterpenóides, Esteróides e Taninos	(LIMA et al., 2015)
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth. (Mimosaceae)		
<i>Physalis angulata</i>	Fisalinas	(SILVA et al., 2015)
Fungos		
<i>Fusarium oxysporum</i> sobre <i>Musa acuminata</i> (bananeira)	Fenil-fenalenones Fitoalexinas	(LUQUE-ORTEGA et al., 2004)
Macromicetos	Extrato aquoso	(VITOLA, 2008)
<i>Agaricus blazei</i> Murill	Extrato aquoso	(VALADARES et al., 2011) (VALADARES et al., 2012)
Algas		
<i>Euplotes crassus</i> (ciliado)	Sesquiterpeno euplotin C	(SAVOIA et al., 2004)
<i>Bostrychia tenella</i> J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales)	Metabólitos voláteis	(FELÍCIO et al., 2010)
<i>Gymnogongrus griffithsiae</i>		
<i>Gayralia oxysperma</i>	Ácido-heteropolissacarídeos	(KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2015)
Animais		
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (molusco)	Defensina (fragmentos de peptídeos)	(ROCH; BESCHIN; BERNARD, 2004)
Esponja marinha	Renieramycin A	(NAKAO et al., 2004)
Esponja marinha	Alcalóides	(MISHRA et al., 2009)
<i>Bothrops marajoensis</i>	Fosfolipase A2	(CISCOTTO et al., 2009)
<i>Bothrops jararaca</i> (cobras)	Oxidases de L-amino ácidos	(COSTA TORRES et al., 2010)

3.3.4 Derivados químicos com atividade leishmanicida

Outro enfoque dado à pesquisa de novos fármacos contra as leishmanioses são os estudos e testes de compostos químicos sintéticos, tanto orgânicos quanto inorgânicos (RICHARD; WERBOVETZ, 2010). Através de reações químicas e bioquímicas conhecidas, uma infinidade de moléculas orgânicas podem ser completamente sintetizadas. Em alguns casos é impossível realizar a síntese total, fazendo-se necessária a semi-síntese a partir de um composto intermediário ou uso de vias biológicas de biotransformação. Conforme complexidade de realização, uma das estratégias se mostrará economicamente mais atrativa.

Alguns trabalhos iniciam com obtenção e teste de derivados de moléculas reconhecidamente ativas para outras funções (BHARGAVA; SINGH, 2012). O propósito é testar se algum derivado é mais ativo que a estrutura original (BOLLINI et al., 2009). A vantagem deste caminho é aproveitar o conhecimento técnico-científico já adquirido pela molécula molde; porquanto facilita à determinação de estrutura por métodos analíticos já padronizados e à comparação de parâmetros farmacocinéticos de biodisponibilidade e toxicológicos. Alguns exemplos de moléculas com espectro de atividade diverso são descritas na TABELA 4.

Visto que antimoniais são o tratamento de primeira escolha, a síntese de complexos metálicos é uma proposta testada por muitos grupos de pesquisa (TABELA 4). Derivados químicos similares aos quimioterápicos de segunda escolha também são sintetizados. Calogeropoulou et al. (2008) sintetizaram alguns derivados de alquilfosfocolinas similares a Miltefosina. Shalev et al. (2015) sintetizaram aminoglicosídeos análogos a Paromomicina. Outros testaram diamidinas relacionadas à Pentamidina, como aril-imidamidas (WANG et al., 2010); dialquil-fosforil hidrazonas (MATTA et al., 2015); alquil-triazoles e alquil-fosfocolinas (GONTIJO et al., 2015).

Segundo Barbosa et al. (2011), o trabalho com certas classes de compostos é favorecido quando já existem alguns estudos básicos que definiram os prováveis mecanismos de ação; pois poderiam ter também a finalidade de utilização contra leishmanioses.

A mimetização de esqueletos químicos de produtos naturais via síntese química é muito comum. São sintetizadas chalconas, como licochalcona A (CHEN et al., 1994); derivados dihydro-alfa-ionone (SURYAWANSHI et al., 2008); derivados tangeretin-chalconas (QUINTIN et al., 2009); e chalconóides cloro-cromeno-propenones (NAZARIAN et al., 2010). Além disso, peptídeos sintéticos também tem atividade relatada, como o Killer decapeptide KP (SAVOIA et al., 2006) e cópias de peptideos antimicrobianos de plantas (BERROCAL-LOBO et al., 2009). Outras classes sintetizadas e testadas são os derivados de Perspicamide A (PANDEY et al., 2013) e de galactofuranosídeos (SULEMAN et al., 2014).

Muitos produtos químicos com ação leishmanicida são resultantes de química combinatória, tal como derivados de compostos hidroxibenzil (ROLDOS et al., 2008); pirimidinas e triazinas (SUNDURU et al., 2009); 4-arilcoumarinas (PIERSON et al., 2010); corantes tipo-*rhodacyanine* (YANG et al., 2010); derivados de 2-aril-benzimidazol (KEURULAINEN et al., 2015) e; 8-nitroquinolin-2(1H)-ona (KIEFFER et al., 2015).

A revisão de Sangshetti et al. (2015), conclui que as principais classes de derivados químicos sintéticos com atividade leishmanicida são acridinas, bonzodiazepinas, cromenos, coumarinas, quinolinas, quinazolinas, quinonas, purinas, pirimidinas, bases de Schiff, hidrazonas, chalconas, indoles, furanos, piridinas, tienopiridinas, tiofenos, triazinas, esteróides e azoles.

TABELA 4 - DERIVADOS QUÍMICOS COM RELATO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Grupo	Classe de composto	Referências
Derivados de fármacos com outras atividades		
Inibidores de microtubulo	Compostos nitroaromáticos	(ARMSON et al., 1999)
Drogas anti-neoplásicas	Cisplatin	(TAVARES et al., 2007)
Fármacos anticancer	Hydroxyurea	(MARTINEZ-ROJANO et al., 2008)
Anti-hipertensivos	Dihydropyridine	(PALIT; ALI, 2008a)
Inibidores de Dihidrofolato redutase	Quinazolines (dihydro and tetrahydroquinazolines)	(AGARWAL et al., 2009)
Compostos Nitroaromáticos (<i>QSAR pharmacophore development and virtual screening</i>)	Dinitrodiphenylthioethers	(DELFIN et al., 2009)
Drogas anti-tuberculose	Pyrazinamide	(MENDEZ et al., 2009)
Análogos semi-sintéticos de ivermectina	Derivados de Ivermectina	(SANTOS et al., 2009)
Fármacos anti-arritmia	Amiodarone	(SERRANO-MARTIN et al., 2009)
Inibidores do metabolismo de esteróis	Aryloxy cyclohexyl imidazoles	(SRINIVAS et al., 2009)
Herbicidas anti-tubulina	Compostos nitroaromáticos dinitroaniline trifluralin	(ESTEVES et al., 2010)
Drogas anti-neoplásicas	Cisplatin	(KAUR et al., 2010)
Drogas anti- <i>Trypanosoma</i>	Nitroimidazole substituídos	(WYLLIE et al., 2012)
Complexos metálicos		
Antimoniais modificados	Sb	(ROBERTS et al., 1995; CARRIÓ et al., 2001; HALDAR et al., 2009)
Metais de coordenação	V, Ru	(NOLETO et al., 2002; MELO PEREIRA et al., 2010; MACHADO et al., 2015)
Complexos metálicos Nanoparticulados	Au	(NAVARRO, 2009)
	Ag, Au, TiO ₂ , Zn, MgO Mn ²⁺ e Zn ²⁺	(JEBALI; KAZEMI, 2013)
<i>Metal Dithiocarbamates</i>	(maneb, zineb, and propineb)	(PAL; MONDAL; DATTA, 2015)

3.4 BIOPROCESSOS

Bioprocessos compreendem um conjunto de operações que incluem a aplicação de princípios físicos, químicos e biológicos, utilizando-se de células vivas, ou seus componentes, para obtenção de produtos desejados (alimentícios, químicos ou biológicos). Bioprocessos tem grande flexibilidade de operação para produção de produtos naturais a partir de microrganismos de interesse. A principal vantagem é a possibilidade de controle das condições de cultivo, principalmente quando se utilizam biorreatores. Temperatura, agitação, pH e concentração de oxigênio são parâmetros importantíssimos, que de acordo com o sistema, normalmente tem fácil controle. Além disto, com monitoramento microbiológico de inóculo, menores são os riscos de contaminação. Isto permite, inclusive, o estudo da estabilidade genética do microrganismo em uso. O cultivo apresenta, portanto, poucos fatores que interferem no processo, tornando-o reprodutível. Ainda, se desejável, é possível otimizar condições para obtenção de melhor rendimento (DORAN, 1995).

Um fator de considerável impacto sobre rendimento em biomassa e formação de produto são as fontes nutritivas (ARANTES; MILAGRES, 2006). Fontes de carbono e nitrogênio executam funções fisiológicas estruturais e funcionais em células fúngicas. Em combinação com outras vias biossintéticas, a fonte de carbono normalmente é direcionada para síntese de polissacarídeos e como fonte energética, enquanto a fonte de nitrogênio, para síntese de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (KAVANAGH, 2011).

Oxigênio, um substrato utilizado na respiração, também é fundamental em funções mistas de enzimas oxidativas. É essencial para síntese de ergosterol e ácidos graxos insaturados (KAVANAGH, 2011). Fungos são aeróbios e utilizam a via cadeia respiratória com uso de oxidase alternativa para redução do oxigênio, (MOORE; SIEDOW, 1991). Em alguns momentos, fungos assumem a via fermentativa com redução de moléculas orgânicas.

O hidrogênio é um elemento primordial para regulação da acidez, vital para nutrição de fungos. Fisiologicamente, participa no potencial de membrana. A condição intracelular de pH 5-6 é fundamental para o metabolismo (KAVANAGH, 2011). Em conjunto, deve ser considerada a presença de micronutrientes, pois participam sobre o balanço iônico, na atividade de enzimas, na transdução de sinais

e também no metabolismo de vitaminas. Os principais são potássio, magnésio, sulfatos, cálcio e manganês. Fontes de fósforo participam na transdução de energia, na síntese de ácidos nucléicos e na estrutura de membrana (KAVANAGH, 2011).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

A identificação de um microrganismo produtor de um produto natural auxilia na etapa de identificação do composto, pois há a possibilidade de consulta à literatura. Normalmente a amplificação da região ITS é utilizada na identificação de gênero e espécie, pois é uma região conservada e faz parte de todos os eucariotos (BELLEMAIN et al., 2010). Este gene codifica a região ribossômica do RNA (GHERBAWY; VOIGT, 2010). Portanto, é uma região conservada e mudanças na sequência são teoricamente variantes entre diferentes espécies. Além disto, possui múltiplas cópias dentro do mesmo gene (MORRIS et al., 2011).

As etapas que compõem a identificação de um fungo através de Biologia Molecular são: extração e purificação de DNA; amplificação por PCR de fragmentos de DNA com iniciadores específicos para classificação; purificação do material amplificado; sequenciamento do fragmento; e análise dos resultados (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.6 EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

O primeiro passo na análise e o isolamento de produtos naturais é de extração para separar os compostos da matriz celular. Tomando como base um material de ocorrência natural, algumas técnicas clássicas estão estabelecidas para obtenção de material contendo biomoléculas (BART; PILZ, 2011). Contudo, nenhuma sequência toma-se como um protocolo rígido. O isolamento depende das propriedades do analito em questão, demorando às vezes a determinação do melhor método de purificação. Muitos métodos já foram desenvolvidos para obtenção de um

extrato químico de um produto natural e são revisados por (STICHER, 2008).

O procedimento mais simples e comum de extração é a **extração líquido-sólido**, que normalmente ocorre a temperatura ambiente. O solvente orgânico carrega consigo um conjunto de moléculas orgânicas que possuam certo grau solubilidade.

Extração Líquido-líquido se refere à transferência de massa de analitos entre dois solventes, resultando em uma fase enriquecida. Preferencialmente outros compostos não são transferidos junto com o analito de interesse.

A **extração ácido-base** é uma extração líquido-líquido em que uma das fases é aquosa. Utiliza-se também um ácido ou uma base forte para favorecer a mudança de fase e do coeficiente de partição, favorecendo a permanência do composto em uma das fases (GRAY; IGOLI; EDRADA-EBEL, 2012). Dependendo da acidificação, a mudança de fase tipicamente envolve diferentes graus de solubilidade em água e num solvente orgânico. O solvente orgânico deve ser pouco solúvel em água, como éter, acetato de etila, clorofórmio e diclorometano. Extração ácido-base é tipicamente utilizada se um dos compostos orgânicos é ionizável ou possui diferente propriedade de ionização em relação aos outros compostos.

Além dessas técnicas de extração, várias outras podem ser utilizadas para a separação e extração de um composto. Cada uma apresenta vantagens e desvantagens, principalmente em relação a eficiência e tempo de extração. As mais comuns são: Extração com fluido supercrítico (SFE); Extração líquida pressurizada (PLE); Extração assistida por microondas (MAE); Extração Soxhlet (STICHER, 2008).

Um **sistema de solventes** é caracterizado por uma mistura de solventes orgânicos que solubilizem a maior quantidade de compostos presentes em um extrato (IKAN, 2008). Esta mistura é definida porque o solvente em que foi extraído o composto normalmente não é a melhor escolha para aplicação do material em uma coluna de cromatografia. É possível que o solvente de extração tenha apenas carregado a amostra. Outra possibilidade é que os outros analitos tenham favorecido a extração conjunta. Um sistema de solventes, portanto, é constituído de um solvente orgânico principal, constituindo misturas binárias ou ternárias.

3.7 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO

A **partição seletiva** é um método prático para ser utilizado em um extrato desconhecido (CANNELL, 1998). Por esta técnica, faz-se a subdivisão do extrato em frações, utilizando-se de uma grande gama de polaridades de solventes orgânicos. A finalidade é carrear grupos de substâncias orgânicas com propriedades químicas similares. Em si, o princípio é o mesmo que o da cromatografia de partição, entretanto a passagem pela fase estacionária, não proporciona boa resolução. Serve apenas como método preparativo para métodos cromatográficos subsequentes ou outros métodos de purificação.

A partição seletiva mais comum separa compostos em fase Hexânica, Acetato de Etila, diclorometano ou clorofórmio e Hidroalcoólica. Muitos trabalhos aplicaram esta série para obtenção de extratos contra *Leishmania*. Torres-Santos et al. (2004), particionaram em seguida a fração metanólica de *Pourouma guianensis*. Izumi et al. (2008) fizeram o mesmo para o extrato de *Tanacetum parthenium*; Vendrametto et al. (2010), particionaram a fração acetato de etila oriunda da extração etanol:água (9:1) de *Piper regnellii* var. *pallescens*. Em um isolamento guiado por bioensaios, por exemplo, este tipo de fracionamento resultou na caracterização de um triterpeno biologicamente ativo (MAREGESI et al., 2010). Estes estudos utilizam Sílica Gel 60 como fase estacionária, entretanto outros, como Tincusi et al. (2002) consideram vantagens de usar a resina LH-20 (GE).

A **cromatografia em coluna (CC)** é a técnica mais poderosa e amplamente utilizada para a separação de dois ou mais componentes presentes numa mistura. É explorada e utilizada em pesquisa básica, indústria e ciências médicas com grande sucesso (TALAPATRA; TALAPATRA, 2015).

O princípio da técnica cromatográfica leva em consideração o fenômeno de adsorção e desorção dos compostos de uma mistura em uma fase estacionária, a qual é percolada por uma fase móvel. As taxas de adsorção de cada analito são dependentes da afinidade do analito pela fase estacionária na condição imposta pela fase móvel (BHAT; NAGASAMPAGI; SIVAKUMAR, 2005). A resolução de separação é influenciada principalmente pela composição da fase móvel e da fase estacionária, quantidade de amostra aplicada, diâmetro da coluna e fluxo (CANNELL, 1998).

3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia Cromatografia em Camada Delgada (**CCD**), ou *Thin Layer Chromatography (TLC)*, normalmente é utilizada em escala analítica para determinar o número de componentes de uma amostra; para monitorar se os produtos de uma reação estão sendo produzidos com êxito durante uma reação de síntese; para qualificar comparativamente uma amostra; ou para monitorar se um analito está sendo corretamente separado do restante da mistura durante uma cromatografia em coluna. Analiticamente, utiliza-se apenas microgramas de material (STAHL, 1969; SHERMA, 1996; SPANGENBERG et al., 2011).

É difícil que grandes quantidades sejam separadas utilizando **CCD analítica**. Para a separação de quantidades na ordem de miligramas, devem ser utilizadas placas de **CCD preparativas**, revestidas com camadas espessas (1-3 mm) de fase estacionária. Uma vez que a corrida da placa é realizada, os pontos ou linhas com analitos são raspados juntamente com o adsorvente (STAHL, 1969). Com o uso de um solvente polar ou vários volumes da fase móvel, cada componente separado é eluído a partir da fase estacionária. Para alguns trabalhos científicos, quantidades obtidas por esta técnica são suficientes para elucidação estrutural, tal como em Jermain e Evans (2009). As atuais técnicas analíticas possuem grande sensibilidade e há inclusive análises de espectrometria de massas diretamente sobre o material separado por placas analíticas (SPANGENBERG; POOLE; WEINS, 2011).

O princípio de cromatografia em camada delgada muitas vezes é explicado como similar ao processo de cromatografia em coluna (STAHL, 1969). Contudo, considerando a CCD em fase normal, utilizando solventes orgânicos, pelo sistema ser aberto à evaporação do solvente (mesmo em câmara fechada), as concentrações de cada solvente variam ao longo do frente de migração (SHERMA; FRIED, 1991). Algumas explicações sugerem que cada constituinte da fase móvel migra até certo frente (FIGURA 15). Neste caso, a interação entre analito e fase estacionária é influenciada de modo diferente ao longo da migração. As isotermas de adsorção do analito são função das propriedades da fase móvel, que varia em função da fração molar de cada constituinte (RICE, 1980).

Portanto, pequenas mudanças de fase móvel resultam em grandes mudanças na resolução e no perfil de eluição de uma cromatografia em camada delgada (SPANGENBERG; POOLE; WEINS, 2011).

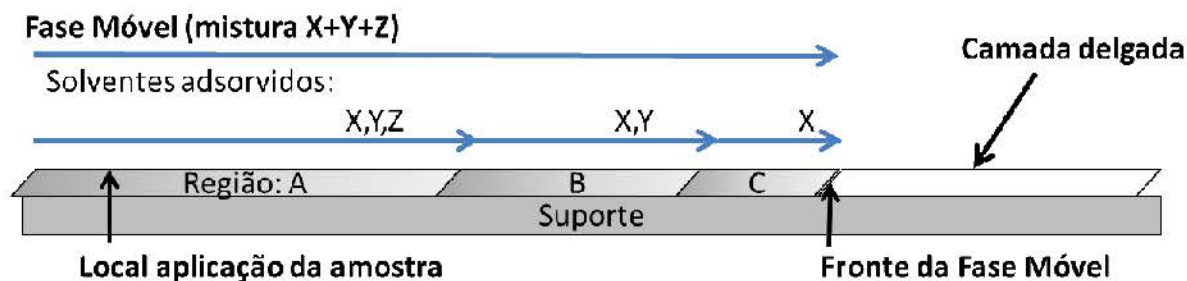


FIGURA 15 – ESQUEMA DE MIGRAÇÃO DE FASE MÓVEL EM CCD
 FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2015)

Os sistemas de solvente que normalmente são utilizados para fase estacionária sílica gel 60 para separação de produtos naturais são do tipo apolar, constituídos majoritariamente por hexano e éter de petróleo; do tipo médio, constituídos por clorofórmio e acetato de etila; e do tipo polar, constituídos por sistemas aquosos ácidos ou básicos (SHERMA; FRIED, 1991). Entretanto, dificilmente existe uma fase genérica ou universal. Muitas vezes é necessário adaptar a formulação, mesmo para compostos similares. Às vezes, uma substituição de radical é suficiente para mudança de comportamento de eluição (SPANGENBERG; POOLE; WEINS, 2011).

3.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**CLAE**), ou **HPLC** (*High performance liquid chromatography*) é a técnica analítica que sustenta a produção e controle de qualidade de processos bioanalíticos nas indústrias e laboratórios de Química, Bioquímica, Farmácia e Bioprocessos. As principais aplicações são para determinação de pureza de um composto; detecção de um analito ou determinação

de perfil de analitos em matriz complexa; e quantificação de rendimentos de processos. É especialmente útil para amostras difíceis de serem determinadas por outras técnicas.

A vantagem sobre a cromatografia convencional é a reprodutibilidade, pois há controle exato sobre o fluxo e constituição da fase móvel e sobre o tempo de retenção do analito. Em vez de o solvente percorrer a fase estacionária pela gravidade, ele é aplicado sob altas pressões em equipamento apropriado. Desta forma, é possível o uso de fase estacionária com porosidade elevada, o que melhora a resolução de análise pelo aumento de pratos teóricos de separação.

A CLAE se desenvolveu enormemente com o desenvolvimento das fases estacionárias quimicamente ligadas, como C-8 e C-18. Este tipo de fase estacionária possui grande estabilidade química e permitiu o desenvolvimento de grande número de métodos em fase reversa para muitas classes de compostos distintas. A técnica também pode ser aplicada de modo preparativo, contudo são necessários equipamentos apropriados que suportem grandes pressurizações. Colunas CLAE analíticas possuem diâmetro interno de cerca de 0,45 cm e colunas preparativas cerca de 2 cm.

A eficiência da separação é determinada por muitos fatores, mas de acordo com o método escolhido, o processo de separação é rápido e tem ótima resolução. Contudo, a identificação de um composto por HPLC normalmente só é possível através da comparação com um padrão. Não é possível obter informações diretas relativas à estrutura de uma molécula, especialmente quando se trata de um composto desconhecido.

A quantidade de informações estruturais é dependente (e limitada) pelo tipo de detector ou análise utilizada após a separação. Cada técnica possui sua função e variam em sensibilidade, resolução, exatidão e reprodutibilidade. Normalmente são utilizados detectores por ultravioleta, fluorescência, índice de refração, eletroquímicos, etc. Contudo, para análises estruturais, muitas vezes é necessário aliar a separação da CLAE a uma técnica analítica mais consistente, como a espectrometria de massas.

3.7.3 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (**SPE**) é um procedimento técnico criado para facilitar a concentração de analitos de interesse, e permitir a remoção de moléculas indesejadas (WATERS TECHNOLOGIES CORP et al., 1980). O uso corriqueiro é na preparação de amostras para técnica de CLAE, levando em consideração a mesma fase estacionária e polaridade do método.

A SPE também é aplicada para concentração do analito de interesse em quantidades maiores que a escala analítica. O princípio da técnica é similar a adsorção em carvão ativo, porém considera-se que o empacotamento com fase estacionária definida permitirá adsorção seletiva do soluto de interesse. Além disto, este poderá ser recuperado posteriormente por eluição. O uso de SPE em fase reversa é vantajoso para concentração de produtos naturais, pois estes normalmente possuem característica apolar.

3.7.4 Cristalização da molécula

A maioria das técnicas preparativas resulta em compostos isolados, porém não purificados. O processo de precipitação é rápido, mas não serve para purificar amostras, pois não é seletivo. Se o produto for sólido, a cristalização é o método de purificação mais adequado (SLAYDEN, 1999). O princípio da técnica se utiliza de diferenças de solubilidade de compostos em diferentes solventes e em diferentes condições. As etapas básicas de purificação de um composto orgânico envolvem dissolução do analito num solvente quente (ou mistura de solventes) e recristalizando o composto de modo lento. Pode ocorrer por diminuição de temperatura gradual ou evaporação lenta de solvente. O objetivo final é a união de moléculas iguais em cristais, os quais podem ser coletados por filtração. O processo geralmente é repetido em várias vezes, pois o rendimento final é a soma dos rendimentos do analito desejado na fração cristalizada em relação a quantidade de impurezas (PAVIA et al., 2009).

3.8 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Atualmente existem diversas técnicas de avaliação de atividade citotóxica contra células de *Leishmania*, que levam em consideração a forma promastigota e a forma amastigota. O método tradicional de avaliação é a contagem direta. Entretanto, existem muitas técnicas de avaliação de atividade anti-*Leishmania* que fazem a quantificação de alguma atividade metabólica, tal como a análise de pelo corante alamar blue (MIKUS; STEVERDING, 2000) e pelo reagente de MTT (DUTTA et al., 2005). Estes testes utilizam formas promastigotas no final da fase de crescimento logarítmico, pois possibilita a padronização dos experimentos. Pode-se realizar, inclusive, experimentos em microplaca (BRINGMANN et al., 2013).

O modelo axenico foi muito utilizado (amastigotas extracelulares diferenciados *in vitro* por mudanças de pH e temperatura) (HODGKINSON et al., 1996). Contudo, foi substituído por outros modelos *in vitro* que mimetizam melhor a realidade, principalmente com amastigotas diferenciados em cultivos celulares. Ensaio com a linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1) são bastante utilizados, pois esta linhagem é capaz de permanecer viva sem multiplicar-se, mesmo infectada pelas formas amastigotas (GEBRE-HIWOT et al., 1992). Outros estudos dão preferência ao uso de macrófagos peritoneais de camundongo; macrófagos humanos derivados de monócitos do sangue periférico (SEIFERT; ESCOBAR; CROFT, 2010); explantes de linfonodo de hamster *ex vivo* (PENICHE et al., 2014); ou células murinas J774 (KIEFFER et al., 2015).

Outros tipos de testes fazem a avaliação indireta de atividade através da avaliação de óxido nítrico (TORRES-SANTOS et al., 2004); microscopia confocal (RASMUSSEN; DESCOTEAUX, 2004); análise proteômica (CUERVO et al., 2007); observações por microscopia eletrônica de transmissão (HU et al., 2008); expressão de proteínas (MADEIRA DA SILVA et al., 2009) e da avaliação de nanopartículas peguadas (COSTA LIMA et al., 2012).

Modelos experimentais *in vivo* são essenciais para desenvolvimento de um fármaco, mas são principalmente utilizados quando há potencial farmacológico quantificado e identificado estruturalmente (GAMBOA et al., 2008; AUXILIADORA DEA-AYUELA et al., 2009; BOIANI et al., 2009; SRINIVAS et al., 2009; FORTIN et al., 2014; ROBLEDO et al., 2015; SIFONTES-RODRIGUEZ et al., 2015).

3.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As técnicas clássicas de elucidação estrutural foram gradualmente substituídas por técnicas espectroscópicas de análise (IR, UV-vis, RMN, etc.); e pelas análises espectrométricas de massas (TALAPATRA; TALAPATRA, 2015). Métodos clássicos, contudo, fundamentam muitos conceitos e podem auxiliar a identificação de um composto desconhecido com sucesso (SIMÕES et al., 2002). Entretanto, muitas vezes os métodos são degradativos e caracterizados por análises tediosas, demoradas ou inespecíficas. Várias reações químicas e métodos foram desenvolvidos, compilados e selecionados entre os séculos XIX e XX. Um dos primeiros e bem sucedidos programas de análise qualitativa orgânica foi apresentado por Kamm (1932).

As análises espectroscópicas e espectrométricas modernas tem muitas vantagens sobre as técnicas antigas, pois requerem pequena quantidade de amostra e menor tempo de análise (SILVERSTEIN et al., 2007). Além disso, não são destrutivas e os analitos podem ser recuperados e reutilizados, como para um bioensaio (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010). A espectrometria de massas é uma exceção, mas em contrapartida necessita menos que uma miligrama para análise e fornece dados valiosos como fórmula molecular e perfil estrutural da molécula a partir da interpretação de seus fragmentos comuns (GROSS, 2004).

A principal diferença entre os vários tipos de radiação eletromagnética utilizada em análises espectrais é a quantidade de energia encontrada em seus fótons (SILVERSTEIN et al., 2007). A energia de vibrações espectroscópicas é quantizada e varia em função do comprimento de onda, conforme o espectro eletromagnético (FIGURA 16).

De acordo com o fenômeno que desencadeiam, alguns dados espectrais podem ser comparados diretamente com a literatura (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009). A presença de alguns cromóforos e alguns grupos funcionais podem ser detectados imediatamente a partir do UV e espectros de IR do composto em questão (TALAPATRA; TALAPATRA, 2015).

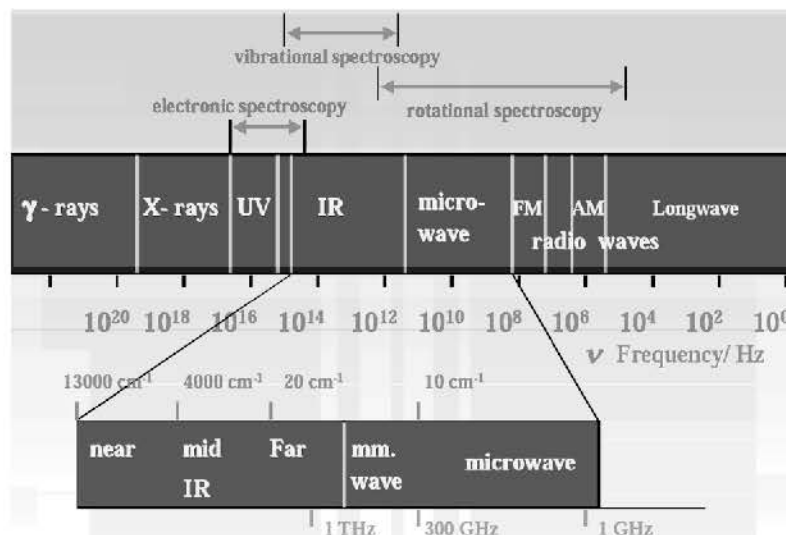


FIGURA 16 – ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO SEPARADO EM REGIÕES
 FONTE: (ELOWITZ, 2013)

É possível elencar a RMN como a principal técnica analítica de elucidação estrutural de compostos orgânicos. As informações de diversos tipos de espectros são comumente usadas até a elucidação estrutural completa de uma molécula. Em alguns casos é possível concluir a elucidação estrutural somente utilizando esta técnica. Às vezes, há êxito mesmo para compostos complexos (MAHROUS; FARAG, 2015). Perante o grande número de experimentos registrados para RMN, alguns são fundamentais na elucidação estrutural. Quando coordenados de modo estratégico, reduz enormemente o tempo de uso do equipamento. Estratégias de elucidação estrutural, considerando os tempos e tipos de análise para proposição de fragmentos, são descritas por (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010).

Apenas a técnica de raios-X fornece mais informações estruturais que RMN, contudo são obrigatórios alguns pré-requisitos, como alto grau de pureza para análise (MAHROUS; FARAG, 2015). Análises cristalográficas de raio-X revelam estrutura, estereoquímica e conformação de moléculas quirais. A técnica dá auxílio às interpretações de RMN de moléculas orgânicas complexas, complementando-se uma a outra.

Estereoquímica e informações conformacionais também podem ser obtidas por meio de análise detalhadas dos dados espectrais ou por análises ORD (Optical rotatory dispersion) e CD (dicroísmo circular). Estas são capazes de fornecer informação a respeito da estereoquímica absoluta de moléculas quirais (DJERASSI, 1960; CHARNEY, 1979).

Entretanto, quando a complexidade é grande, ou quando não há registros na literatura sobre o composto em questão, é imprescindível fazer a complementação entre todas as técnicas analíticas disponíveis, sejam elas espectroscópicas, espectrométricas ou por caracterização química (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010).

3.10 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

3.10.1 Exames preliminares

Informações sobre a aparência, odor, sabor e cor da amostra são muito informativas. Alguns compostos terpenóides, por exemplo, possuem odor pungente. Alcalóides normalmente resultam em sabor amargo. Substâncias orgânicas com grupos funcionais conjugados, por exemplo, são coloridas, com intensidade proporcional ao número de ligações duplas conjugadas (VOGEL; FURNISS, 1989). Por exemplo, nitro- e nitroso-compostos aromáticos e α -dicetonas são amarelos, quinonas e azo-compostos são de cor amarela, laranja ou vermelha. Moléculas extensamente conjugadas possuem cores do amarelo ao púrpura. Substâncias saturadas ou com baixo grau de insaturação são brancas ou pouco coloridas (WAGNER; BLADT, 2001). A cor marrom é geralmente causada por impurezas ou pela formação de produtos de oxidação (STAHL, 1969).

3.10.2 Ponto de fusão

O ponto de fusão designa a temperatura a qual uma substância passa do estado sólido ao estado líquido (VOGEL et al., 1999). Para uma substância pura, os processos de fusão ou de solidificação ocorrem sempre a uma mesma temperatura, uma informação estrutural que serve para comparação (PAVIA et al., 2009).

3.10.3 Perfil de solubilidade

A solubilidade é um dos temas mais relevantes da área da química, tanto pela sua importância intrínseca quanto pela variedade de fenômenos e propriedades químicas envolvidas no seu entendimento (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013).

Quando um sólido se dissolve em um líquido, o sólido parece desaparecer. Simples testes visuais contribuem para obtenção de muitas informações sobre a natureza da amostra. A razão do comportamento de solubilidade envolve a natureza das forças intermoleculares de atração entre o composto e o solvente. A solubilidade dos compostos orgânicos pode ser decorrente de simples miscibilidade ou resultante de uma reação química. Indiretamente a solubilidade de uma molécula é estimada pela constante dielétrica do solvente em que está solubilizado (PAVIA et al., 2009).

3.10.4 Testes químicos

Algumas reações químicas são específicas e algumas vezes exclusivas de algum grupo de produto natural. Quando não se dispõe de estudos químicos, como no caso de uma espécie química desconhecida, é possível que a identificação de grupos relevantes de metabólitos secundários na análise fotoquímica seja útil (SIMÕES et al., 2002). Apesar disto, reações químicas são um método analítico destrutivo e várias vezes inespecífico. Os princípios de fitoquímica descrevem as técnicas de caracterização e isolamento de moléculas provenientes do reino vegetal. O uso sistemático de técnicas estabelecidas é útil na determinação de qual família química e classe de produto natural o composto pertence (STAHL, 1969; MERCK, 1980; WAGNER; BLADT, 2001; SIMÕES et al., 2002).

3.11 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Todas as estruturas químicas possuem massa, que pode ser comparada em relação à unidade de massa atômica (u.m.a); definida como a fração 1/12 da massa do isótopo mais abundante de carbono (^{12}C). No SI, 1 u.m.a. é equivalente a $1,66053892173 \times 10^{-27}$ kg. Um composto químico possui distintas combinações de massas, pois cada elemento químico que o constitui faz contribuições diferentes com cada um de seus isótopos (WATSON; SPARKMAN, 2007). Muitos isótopos são de ocorrência natural, mas com abundâncias distintas. Normalmente uma combinação de massas é preponderante, porém quando participam muitos átomos, o resultado é um somatório das frequências de populações (GROSS, 2004). Alguns analisadores de massa, possuindo alta resolução, são capazes de detectar diferenças, incluindo os picos isotópicos, que aparecem adjacentes a todos os picos de íons formados com os isótopos de maior abundância (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007).

A técnica de **espectrometria de massas (EM) (Mass Spectrometry, MS)** faz a medição da massa de compostos químicos por meio da formação e detecção de íons com carga elétrica (HIRAOKA, 2013). A molécula não absorve qualquer parte de frequências de radiação do espectro electromagnético. Campos elétricos e magnéticos servem para favorecer a formação de íons e direcioná-los ao detector. O espectro de massas é registrado em função da abundância relativa de cada íon (em relação **m/z** – massa / carga) em relação ao número de detecções do pico com maior intensidade, denominado pico base (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010).

Em algumas circunstâncias, o pico base corresponde ao analito íntegro ionizado denominando-se pico do íon molecular (HERBERT; JOHNSTONE, 2003). Normalmente ocorre a perda ou ganho de um hidrogênio. Contudo, na técnica MS é comum a fragmentação de íons para enriquecer o número de informações estruturais. A fragmentação ocorre tanto pelo processo natural de ionização como por condições induzidas de voltagem ou barreiras químicas (DOWNARD, 2004).

Em produtos naturais com muitos heteroátomos, a previsibilidade de um padrão de fragmentação é baixa. No entanto, certos padrões de fragmentação são

racionalizados para as principais classes de produtos naturais e podem vantajosamente ser utilizados na elucidação de compostos novos (TALAPATRA; TALAPATRA, 2015).

O espectrômetro de massas tem pelo menos cinco componentes: injeção da amostra, fonte de ionização (ionizador), analisador de massas, detector e sistema de dados (software e computador) (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007).

Durante a injeção é necessário que o fluxo de moléculas seja introduzido na fonte de ionização de forma apropriada, em fluxo e quantidade ideal. Analitos podem ser ionizados a partir de amostras diretamente injetadas no ionizador, mas também podem ser provenientes de uma análise hifenada (também conhecidas como tandem) (EKMAN et al., 2013). Por exemplo, a amostra pode ser proveniente da fase líquida da separação por HPLC, denominando-se LC-MS.

Existem três métodos principais de ionização à pressão atmosférica: Electrospray (ESI), Ionização Química (APCI) e Fotoionização (APPI) (AGILENT TECHNOLOGIES INC, 2010). Dos três métodos, ESI é o método mais comum, pois é compatível com uma ampla gama de compostos, tem sensibilidade entre femtogramas a picogramas, e proporciona tanto informações qualitativas como quantitativas. A implementação do método depende em grande parte da polaridade dos analitos, porém é possível fazer adaptações (GROSS, 2004). Ionização por ESI ocorre como resultado da transmissão de um grande potencial eléctrico ao eluente à medida que o aerossol de gotículas emerge a partir do nebulizador. A formação de íons é induzida através da aplicação de um grande potencial entre a agulha de entrada de metal e o primeiro skimmer, após a fonte em pressão atmosférica (METZGER et al., 2007).

O mecanismo de ionização não é bem compreendido e há várias teorias que tentam explicar o processo. Uma teoria sugere que as gotículas sofrem uma redução de tamanho por evaporação do solvente até atingir uma densidade de carga suficiente grande para permitir que os íons da amostra sejam ejetados a partir da superfície da gotícula por um processo denominado repulsão de Coulomb. A gotícula atinge um ponto em que a carga eléctrica é maior do que a tensão superficial que as prendem em conjunto. O campo eléctrico induz a formação de carga eléctrica resultante sobre o analito. Um espectro típico ESI mostra uma distribuição de íons da molécula com diferentes números de carga (WATSON;

SPARKMAN, 2007).

Três tipos de analisadores de massa são normalmente utilizados, com diferentes princípios teóricos e fatores de resolução. **Single-Quadrupolo (Q)** é um analisador de baixa resolução, mas torna-se poderosa análise qualitativa e quantitativa quando são estabelecidas condições de ionização e o equipamento é acoplado à injeção por Cromatografia Líquida HPLC (AGILENT TECHNOLOGIES INC, 2010). O termo **iontrap** foi cunhado para definir o analisador de massas em que os íons combinam rotação em torno de um sistema de electrodos com oscilações harmônicas ao longo do eixo de rotação em frequência característica de acordo com seu valor m/z (MAKAROV, 2000). **TOF** (Time of Flight) é um analisador de alta resolução que tem como princípio o tempo preciso de vôo dos íons em um espaço determinado, após serem acelerados por um campo elétrico (CAMPANA, 1987).

Em posse de dados com boa resolução, é possível utilizá-los para observar a proporção isotópica e assim estimar a composição elementar de um analito. Este dado substitui a análise elementar para determinação CHNSO por combustão, com maior precisão e sensibilidade (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007).

3.12 RMN - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica não destrutiva que se fundamenta em propriedades magnéticas de núcleos atômicos (CLARIDGE, 1999). Consolidada há pelo menos três décadas, a RMN é onipresente nas ciências com uma infinidade de aplicações (ERNST, 1992). É utilizada rotineiramente na análise de amostras químicas e biológicas, sobretudo em elucidação estrutural (JACOBSEN, 2007). A versatilidade de programações e ajustes torna esta tecnologia imprescindível no desenvolvimento de inovações e ciência aplicada. Há aplicações em controle de qualidade, química orgânica e inorgânica, indústrias, ciências de materiais, medicina, etc (MAHROUS; FARAG, 2015).

Atualmente são empregados equipamentos de RMN com Transformada de Fourier, que facilitam aquisição e processamento de dados (CONTRERAS, 2013). O primeiro espectrometro comercial com esta tecnologia tornou-se disponível no final da década de 1960, operando a 90 MHz para o núcleo de Hidrogênio (^1H) (CLARIDGE, 2009). Desde então, muitos experimentos vem sido criados e desenvolvidos (ERNST, 1992). De grande importância, as técnicas bidimensionais ganharam visibilidade a partir da metade da década de 70, quando a estabilidade de análise foi garantida pela instrumentação e a realização de cálculos complexos foi viabilizada por computador (CLARIDGE, 2009).

Alguns conceitos explorados na prática revolucionaram os métodos de elucidação estrutural, tais como os avanços obtidos com aplicação de campo pulsado, transferência de polarização, uso do fenômeno de coerência e aplicação de gradiente de campo (GÜNTHER, 1995) (MAHROUS; FARAG, 2015).

3.12.1 Instrumentação de Ressonância Magnética Nuclear

O espectrômetro de RMN é constituído por três componentes principais, como demonstrado na FIGURA 17. Há o magneto supercondutor com acomodação para uma sonda, a qual contém em si espaço para amostra a ser analisada (HORNAK, 2010). O segundo componente é o console, que contém placas eletrônicas utilizadas na transmissão e amplificação de sinais de comunicação de rádio frequência (RF) e controladores programados de diversas funções de estabilidade de análise. O terceiro componente é o computador, que comunica-se com a sonda via software e console. Pelo software, o operador executa os experimentos e processa os dados de RMN adquiridos (BUTLER, 2002). Os pulsos de RF passam do pré-amplificador até a sonda, para que esta induza o fenômeno de RMN na amostra.

Para análise estrutural, o campo magnético deve ser intenso e uniforme, e frequências e faixas das fontes de radiofrequência (radiação eletromagnética) calibradas. Durante a obtenção de dados, deve-se ajustar um campo magnético homogêneo nas dimensões tempo e espaço. Na dimensão tempo, o campo

magnético da região a ser analisada normalmente é mantido constante (*lock*) de acordo com o sinal recebido na frequência do nuclídeo de Deutério. Na dimensão espacial, o campo magnético é homogeneizado por solenóides que criam pequenos campos magnético de ajuste em várias direções espaciais (JACOBSEN, 2007).



FIGURA 17 – INSTRUMENTAÇÃO DO LABORATÓRIO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
FONTE: DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR

Nos instrumentos simples, o campo magnético é obtido por um ímã permanente. Na instrumentação analítica moderna, o magneto é fabricado em material supercondutor, os quais podem criar campos magnéticos entre 4,7 e 23,5 Tesla (ROONEY et al., 2007). Considerando o núcleo de Hidrogênio ^1H , são equivalentes às frequências de ressonância entre 200 MHz e 1 GHz. O preço da instrumentação cresce exponencialmente de acordo com o campo magnético desejado, mas que é recompensado por intensificação do sinal, maior resolução dos espectros e menor tempo de aquisição dos experimentos (JACOBSEN, 2007). O sinal é intensificado porque a frequência angular de precessão do núcleo é diretamente proporcional ao campo magnético aplicado (CLARIDGE, 2009).

O esquema de montagem ainda inclui os sistemas de ajuste de sonda, compostos por gerador e detector de RF, módulo de controle do pré-amplificador, detector de quadratura, filtro digital, gradiente, sistema anti-vibração, travamento de campo (*lock*) e *shimming* (HORNAK, 2010). O magneto supercondutor fica submerso em hélio líquido (4 Kelvin) para possibilitar a propriedade supercondutora (IWASA, 2002). A proteção térmica é realizada com o auxílio de um

compartimento “Dewar” com nitrogênio líquido, camadas de folhas isolantes (*Mylar*) e câmaras sob vácuo.

3.12.2 Aquisição e processamento de dados

As formas mais comuns de **preparo de amostras** em RMN são para ressonância magnética de líquidos, HR-MAS; RMN de sólidos; acompanhamento de cinética, etc. Para em cada contexto e utilidade, sonda, rotor e tubo são adaptados. Em todos os casos, quando se deseja a observação (ou utilização indireta) de núcleos de hidrogênio ^1H , é necessário o uso de solventes que não contenham este isótopo. Portanto, os solventes utilizados para solubilização das amostras tem os isótopos de hidrogênio substituídos pelo nuclídeo do Deutério ^2H (solventes deuterados).

Os equipamentos modernos de RMN possuem vários canais de comunicação com amostra e fazem a aquisição dos dados ao longo do tempo. Registram fase e intensidade dos sinais adquiridos, que são um sinal eletromagnético oscilante que diminui sua intensidade ao longo do tempo, denominado **decaimento livre de indução (FID)** (FIGURA 18). O sinal, oriundo da amostra em fenômeno de RMN, é detectado pela sonda, que o transfere ao console. Este multiplica e digitaliza o sinal para o computador. Vários transientes (*scans*) são capturados para uma única amostra até obtenção de um espectro somado. Esses equipamentos utilizam pulsos para excitação dos núcleos caracterizados por descarga de energia de alta potência, de curta duração. Os pulsos contém uma faixa de frequências centradas na frequência fundamental do isótopo que é observado. Desta forma, todos os núcleos são induzidos a passar por ressonância ao mesmo tempo (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007).

A **transformada de Fourier (FT)** é uma técnica matemática que permite a análise de dados complexos gravados simultaneamente, o que diminui o tempo de aquisição dos experimentos. A **FT** faz a conversão de uma função no domínio do tempo para o domínio da frequência, e vice-versa, mesmo que haja sobreposição de decaimentos livre de indução. O sinal ao longo do tempo é composto de várias

frequências e velocidades de decaimento, referentes a distintos núcleos. Este método matemático depende de processamento computacional, todavia é extremamente válida para moléculas complexas. Os sinais ao longo do tempo são resolvidos em frequências individuais, de acordo com as propriedades de cada núcleo observado.

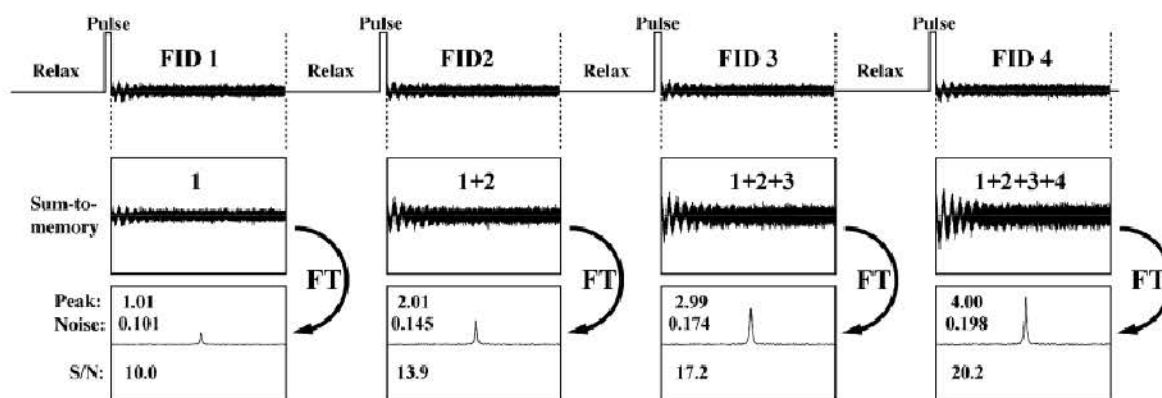


FIGURA 18 – FID E APLICAÇÃO DA TRANSFORMADA DE FOURIER
 FONTE: JACOBSEN (2007)

Os dados podem ser ajustados antes da FT, através da alteração de alguns parâmetros de processamento. Isto favorece os cálculos para melhor resolução ou, alternativamente, melhor fator sinal / ruído (BUTLER, 2002).

3.12.3 Princípio da técnica

A ocorrência do fenômeno de ressonância magnética em condições controladas é quesito fundamental para que a interpretação dos sinais detectados seja possível (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007). A teoria do fenômeno, se considerada, é importantíssima para se extrair informações desejadas a partir experimentos apropriados de técnicas selecionadas (CLARIDGE, 2009). Quando analisando os resultados de RMN em solução, as três principais informações sobre o comportamento químico utilizadas na elucidação estrutural de compostos orgânicos são:

- Deslocamento químico (Subitem 3.12.4)
- Multiplicidade e Acoplamento (Subitem 3.12.5)
- Intensidade relativa (Subitem 3.12.6)

Deslocamento químico, multiplicidade e intensidade são variáveis intrinsecamente dependentes do **ambiente químico** em que o nuclídeo se encontra (JACOBSEN, 2007). Portanto, são as principais informações consideradas na interpretação das análises de RMN para elucidação estrutural de um composto desconhecido. Cada nuclídeo possui um sinal característico, que os diferencia dos demais (caso não equivalentes), mesmo que dois nuclídeos pertençam ao mesmo tipo de grupo funcional (SILVERSTEIN et al., 2007). Grupos vizinhos interagem entre si, interferindo sobre o sinal uns dos outros. Cada grupo tem uma vizinhança química, que possibilita identificar o posicionamento relativo de cada grupo químico na estrutura. As posições de duas metilas, por exemplo, podem ser diferenciadas (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007).

Um requisito para ocorrência do fenômeno de RMN é a inserção de nuclídeos com *spin* não nulo em um campo magnético (B_0). Spin é uma propriedade fundamental da natureza, que prótons, elétrons e nêutrons possuem, tal como massa ou carga elétrica. Spin é uma propriedade quântica intrínseca de cada isótopo. As primeiras considerações sobre as complexidades quânticas definidas sob a propriedade *spin* ocorreram pelo histórico descobrimento do efeito Zeeman (CLERK; CLERK, 2008). Segundo este efeito, ao se inserir um átomo em um campo magnético, suas linhas espectrais se dividem em certas condições (WEISS, 2001).

Quando os núcleos não se encontram sob a influência de nenhum campo magnético exterior, os spins apresentam direções aleatórias (FIGURA 19–A), de maneira que a soma vetorial de todos eles é igual a zero (OTADUY; LEITE, 2007). A diferença de energia é nula (FIGURA 19–A).

Em campos magnéticos homogêneos, como os utilizados para análise estrutural de compostos orgânicos, cada nuclídeo assume um **estado quântico de energia** de acordo com seu *spin* (FIGURA 20). Considerando um nuclídeo com $spin\ \frac{1}{2}$, por exemplo, este pode assumir estado a favor (paralelo) ou contra (anti-paralelo) o campo magnético (FIGURA 19 – B e C).

O fenômeno de RMN ocorre quando o *spin* nuclear de um nuclídeo magneticamente ativo entra em ressonância, absorvendo e emitindo radiação eletromagnética enquanto transita entre os possíveis estados quânticos energéticos (FIGURA 19, FIGURA 20). Neste caso, a diferença de energia entre estes estados energéticos é regida pela equação da FIGURA 19-B. As possibilidades de estados quânticos de energia são definidas pelo valor de *spin* nuclear (GÜNTHER, 1995) e são esquematizadas na FIGURA 20.

Quase todos os elementos na tabela periódica tem um isótopo com um spin nuclear não nulo. O spin é resultado da contribuição geral entre prótons e nêutrons desemparelhados. Alguns elementos são apresentados na TABELA 5, junto com abundância isotópica natural, a constante giromagnética e a frequência de precessão no campo magnético de 9,4 Tesla.

TABELA 5 – ALGUNS NUCLÍDEOS MAGNETICAMENTE ATIVOS E SUAS PROPRIEDADES CORRESPONDENTES

Núcleo	Protons não pareados	Neutrons não pareados	Spin nuclear	$\gamma \times 10^7$ (rad s ⁻¹ T ⁻¹)	Abundância isotópica natural	Frequência RMN em 9,3979 Tesla
¹ H	1	0	1/2	42,58	99,98%	400,130 MHz
² H	1	1	1	6,54	0,015%	61,42 MHz
¹³ C	0	1	1/2	10,71	1,1%	100,6 MHz
¹⁴ N	1	1	1	1,93	99,63%	28,91 MHz
¹⁵ N	0	1	1/2	2,71	0,37%	40,5 MHz
¹⁹ F	1	0	1/2	40,08	100%	376,3 MHz
²³ Na	1	2	3/2	11,27	100%	105,84 MHz
³¹ P	1	0	1/2	17,25	100%	161,9 MHz

FONTE: ADAPTADO DE (BRUKER, 2012)

NOTA: CONSTANTE GIROMAGNÉTICA (MHz/T) $\times 10^7$ (rad s⁻¹ T⁻¹)

Considerando núcleos de spin $\frac{1}{2}$, eles irão se alinhar contra ou a favor do campo. A diferença entre a população destas duas orientações (conhecida como a **distribuição de Boltzman**) é dependente da intensidade do campo. De acordo com a intensidade do campo magnético, maior a diferença de populações entre os estados quânticos de energia e maior a sensibilidade da técnica devido a maior diferença de energia entre os estados de alinhamento de spin.

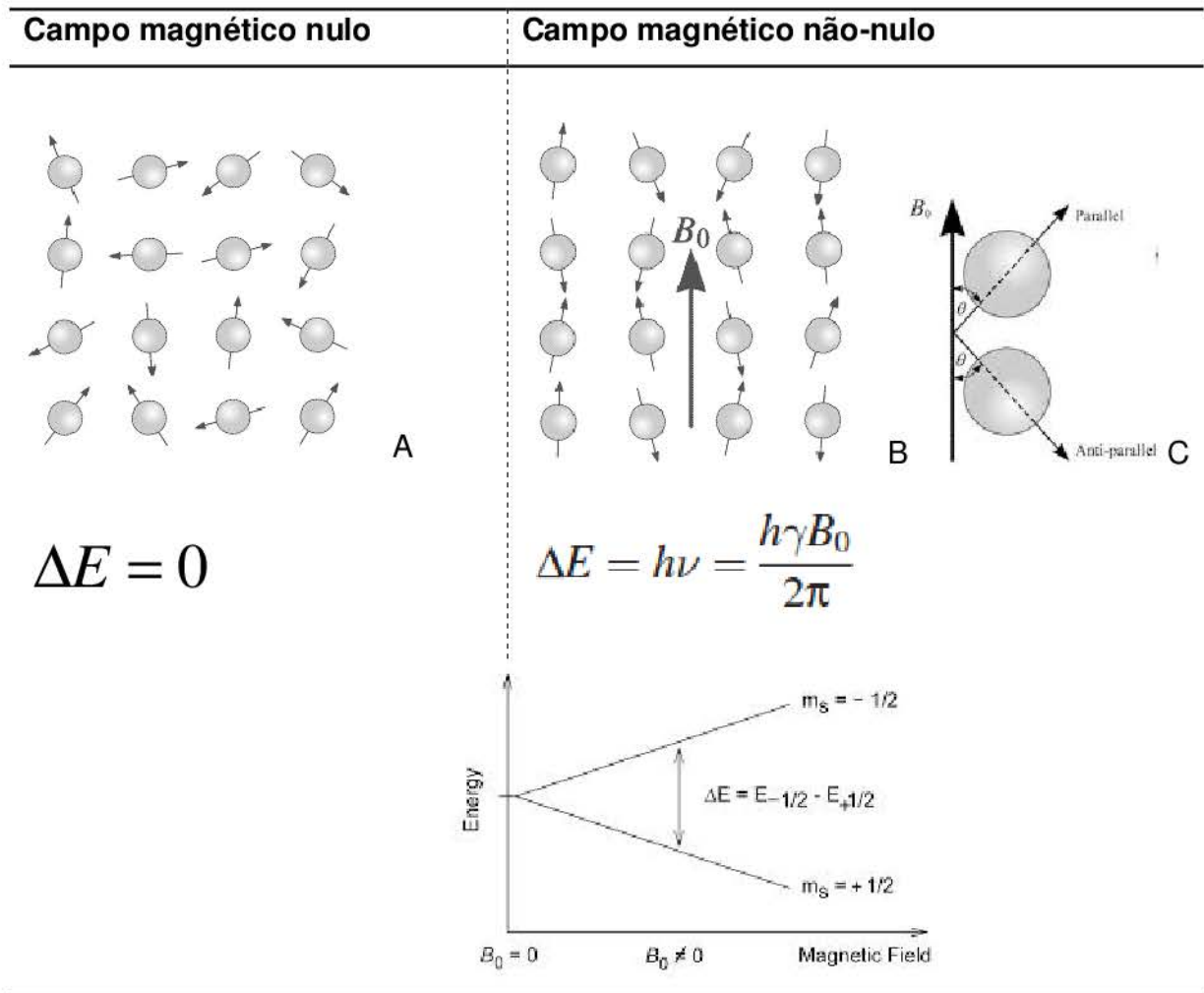


FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO DE ESTADOS QUÂNTICOS DE ENERGIA PARA NUCLÍDEOS COM SPIN 1/2
 FONTE: PUDDEPHAT (2015), GOOGLE IMAGES

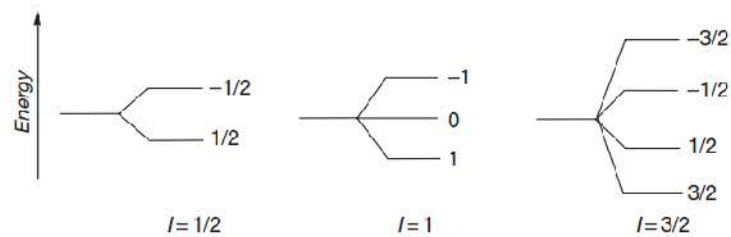


FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO DE ESTADOS QUÂNTICOS DE ENERGIA DE ACORDO COM O SPIN NUCLEAR
 FONTE: PUDDEPHAT (2015)

Quando ocorre o alinhamento e a ordenação de spins, gera-se uma magnetização total que torna possível observar o fenômeno de RMN através do detector (FIGURA 21). Nestas circunstâncias, a energia aplicada ao sistema por meio de ondas de rádio frequência gera um segundo **campo magnético oscilante** (denominado B_1) que direciona a magnetização ao eixo de detecção. Somente os núclídeos com spin que sofrerem ressonância (ou que se correlacionam com núcleos em ressonância) é que se alinharão e terão influência sobre o sinal do detector (GÜNTHER, 1995).

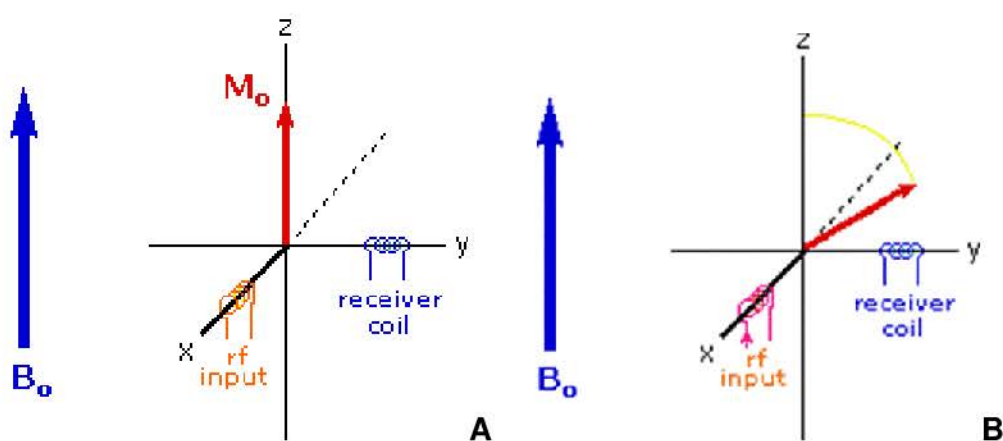


FIGURA 21 – VETOR MAGNETIZAÇÃO M_0 EM PRESENÇA DE (A) CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO E (B) CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO B_0 E CAMPO MAGNÉTICO OSCILANTE B_1
 FONTE: PUDDEPHAT (2015)

Quando se considera a dinâmica atômica, percebe-se os núcleos tomam um movimento de precessão ao redor do eixo do campo magnético.

3.12.4 Deslocamento químico

O efeito de precessão (FIGURA 22) pode ser confrontado com o modelo de movimento de precessão de um pião girante inserido no campo gravitacional da Terra. De acordo com as leis da física clássica, quando um corpo possui tanto um momento e um momento angular, devido à sua rotação, o pião girante permanece girando em torno de um eixo central de rotação e não cede prontamente à força da

gravidade (CLERK; CLERK, 2008). Entretanto, para um núcleo, deve-se considerar os efeitos de Mecânica Quântica do spin nuclear sobre o momento de dipolo magnético característico de quando está inserido em um campo magnético.

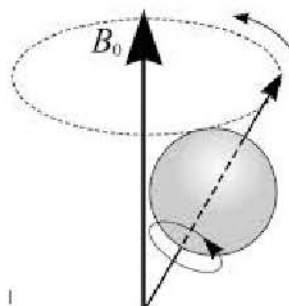


FIGURA 22 – PRECESSÃO DE UM NUCLÍDEO
FONTE: PUDDEPHAT (2015)

Cada núcleo assume uma frequência de precessão, que é equivalente à frequência do fóton que provocaria transições entre os níveis de energia do spin. Esta frequência é chamada de frequência de Larmor e é definida por:

$$\nu_0 = (\gamma B_0) / 2\pi \quad (1)$$

Onde ν_0 é a frequência de precessão (Hertz), γ é a constante giromagnética ($\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$) e B_0 é a intensidade do campo magnético (T).

Por convenção e conveniência, a frequência de precessão é convertida em deslocamento químico, comparada em relação a uma referência. O deslocamento químico exibe diversos tipos de perfil, que variam de acordo com a intensidade relativa e acoplamentos com outros núclídeos constantes de acoplamento (multiplicidade). É conveniente medir as frequências de ressonância relativas dos núcleos com relação a um parâmetro definido, pois é muito difícil medir a frequência de ressonância absoluta de um determinado núcleo.

O deslocamento químico é a relação entre a frequência ressonante relativa a referência. É um exame muito sensível do ambiente químico dos núcleos em ressonância. Ao assumir uma frequência de precessão, pode-se utilizar esta informação para análise estrutural, fazendo-se a comparação com um composto referência. Assim, o deslocamento químico é definido por:

$$\delta = \frac{\nu \text{ amostra} - \nu \text{ referência}}{\nu \text{ referência}} \quad (2)$$

A **referência química** é um composto químico de estrutura química conhecida e que possua o nuclídeo de interesse da análise em sua composição. Deve possuir um deslocamento químico característico, de preferência fora da região de interesse para análise. Na maioria das vezes é inerte, o que possibilita a introdução conjunta ao analito de forma homogênea distribuída, denominada referência interna. Em alguns casos é necessário separar a referência da amostra por um capilar, sendo denominada referência externa. Nos experimentos de Hidrogênio, Carbono e Silício, a referência mais comumente utilizada é o Tetrametilsilano (TMS) para solventes orgânicos. Em solventes aquosos utiliza-se regularmente TMSP-d4 (3-trimetilsililpropanoato sódico tetradeuterado) ou DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico).

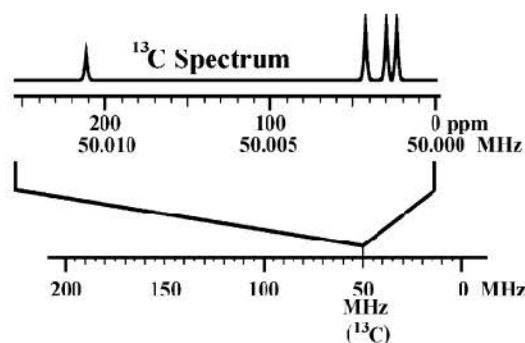


Figure 1.3

FIGURA 23 - FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA DO NÚCLEO CARBONO ¹³C (4,7 T)
 FONTE: JACOBSEN (2007)

As frequências básicas de ressonância são resultados de efeitos sobrepostos devido ao ambiente químico local em que o isótopo está localizado. O valor exato da frequência de ressonância de um núcleo de ¹H num composto qualquer, depende dos átomos aos quais está ligado e aqueles ao seu redor (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009).

As diferenças de deslocamento químico são uma função do ambiente químico em que cada nuclídeo se encontra. O movimento constante dos elétrons nos orbitais moleculares das ligações químicas gera pequenas contribuições sobre o

campo magnético de cada núcleo. Elas aumentam ou diminuem o campo magnético resultante. Os momentos magnéticos nucleares interagem com o **campo magnético local**. Este campo pode ser diferente do campo aplicado, pois o campo externo induz momentos angulares orbitais dos elétrons (isto é, induz a circulação de correntes de elétrons) que propiciam pequena contribuição de campo magnético local ($B_{\text{local}} = (1 - \sigma) B_0$) no núcleo. Núcleos que estejam em grupos químicos diferentes têm constantes de blindagem σ diferentes.

Em moléculas reais, os prótons são circundados por orbitais moleculares devido a ligações químicas e átomos adjacentes, os quais produzem um campo magnético induzido, o qual se opõe ou favorece o campo magnético aplicado (FIGURA 24). O campo magnético resultante e efetivo sobre o núcleo será ($B = B_0 - B_i$), que é a soma do campo magnético aplicado (B_0) com o campo resultante da circulação dos elétrons. Diz-se que o núcleo experimenta blindagem ou desblindagem diamagnética (*diamagnetic shielding*).

Núcleos diferentes não equivalentes quase sempre assumem frequência de precessão distinta, gerando picos distintos, tornando-se uma informação valiosa na análise de estruturas orgânicas. Não é idêntica para todos os núcleos de uma molécula.

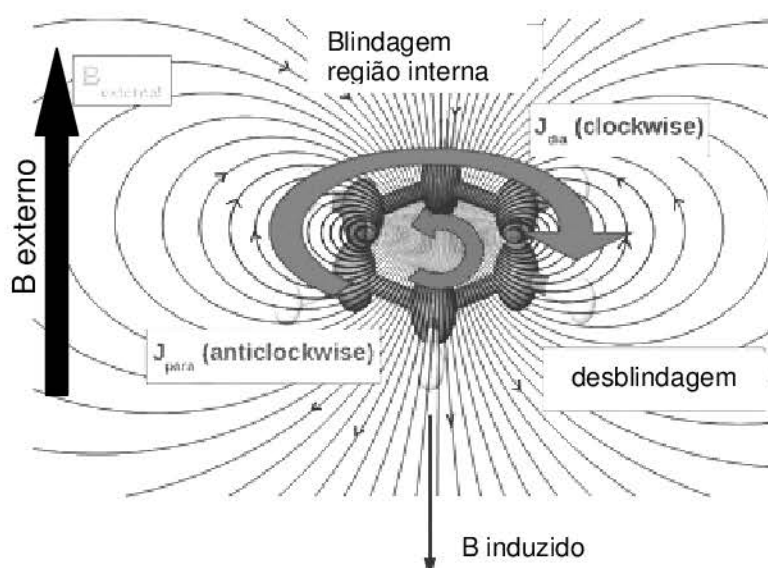


FIGURA 24 – INFLUÊNCIA DO MOVIMENTO ELETRÔNICO NOS ORBITAIS MOLECULARES SOBRE O CAMPO MAGNÉTICO EFETIVO EM UM ANEL AROMÁTICO
 FONTE: ADAPTADO DE (FLIEGL ET AL., 2011)

A frequência de precessão depende de inúmeros fatores, que promovem os deslocamentos químicos, tais como:

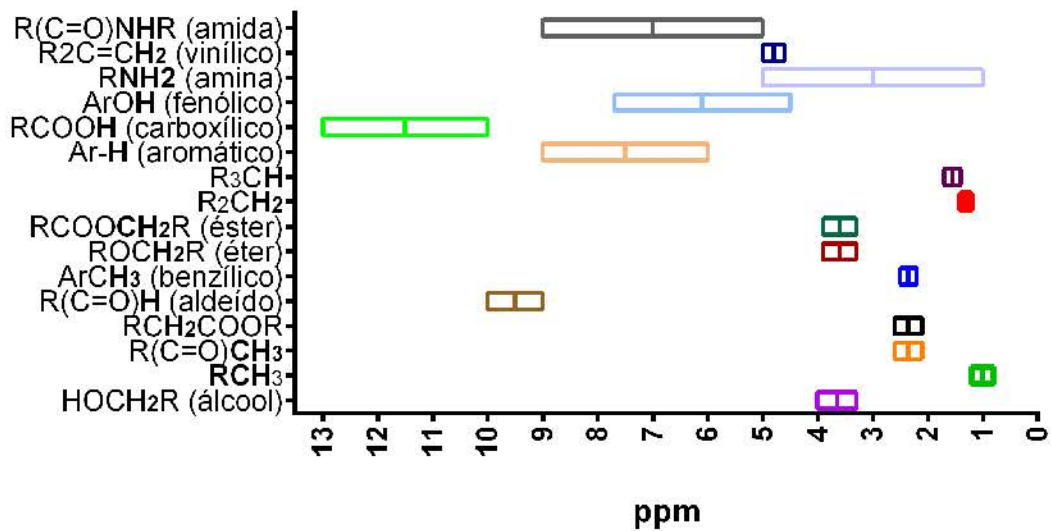
- Blindagem e desblindagem por densidade de elétrons
- Blindagem diamagnética local
- Efeitos de eletronegatividade
- Efeitos de hibridização
- Hidrogênios ácidos e intercambiáveis
- Ligações de hidrogênio
- Anisotropia magnética (interferência por campos magnéticos induzidos por geometria espacial); de especial interesse a anisotropia magnética no benzeno; de dupla ligação e do acetileno

Grupos funcionais distintos tem comportamentos químicos distintos e, portanto, valores de deslocamento químico característicos, que variam de acordo com várias contribuições. Faixas de deslocamentos químicos dos átomos de ^1H e ^{13}C estão esquematizados na FIGURA 25.

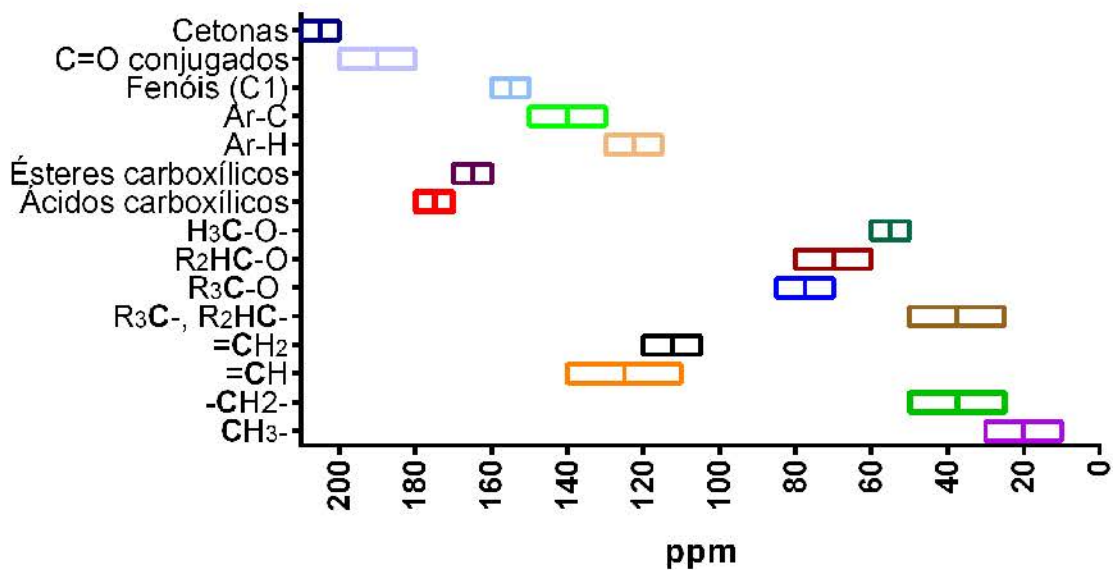
Em anéis benzeno, por exemplo, os hidrogênios do anel sofrem a experiência de desblindagem magnética porque o campo magnético induzido tem o mesmo sentido que o campo externo.

Átomos de hidrogênio ligados ao mesmo carbono são considerados **equivalentes** caso não tenham acoplamento magnético e causem desdobramento de sinal um do outro. Desta forma, um grupo CH_2 com hidrogênios equivalentes, teriam um deslocamento químico único e, ao acoplar com outro núcleo, causariam a este sinal dois desdobramentos de mesma magnitude.

Entretanto, caso não sejam equivalentes, cada hidrogênio presente no CH_2 se comporta de forma independente, com deslocamentos químicos diferentes. Inclusive haverá interações ^2J e desdobramentos de sinal entre si através de sua ligação geminal (FIGURA 26).



A



B

FIGURA 25 - FAIXAS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE (A) HIDROGÊNIO, ^1H E (B) CARBONO (^{13}C), DE ACORDO COM O AMBIENTE QUÍMICO DE ALGUNS GRUPOS FUNCIONAIS

FONTE: ADAPTADO PELO AUTOR (2015)

3.12.5 Correlação, Acoplamentos e Multiplicidade

Em um espectro de alta resolução, pode-se perceber que muitos sinais, percebidos como únicos em um espectro de baixa resolução, são na verdade *clusters* de picos que se desdobram devido à interações entre núcleos. Apesar de aumentar a complexidade dos dados, a sua interpretação proporciona um método

poderoso de análise de funcionalidade, conectividade exata, simetria, estereoquímica, e outros parâmetros de estrutura molecular (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010).

Em uma molécula, dois núcleos magneticamente ativos, não equivalentes, que estejam em certa proximidade, interagem entre si de acordo com o *spin* de cada núcleo por meio de ligações químicas (CLARIDGE, 2009). Esta interação, portanto, é uma constante que não varia de acordo com o campo magnético em que está imerso (CLARIDGE, 2009).

Existem alguns padrões de desdobramento que são característicos (TABELA 6), referentes a núcleos com spin 1/2, como os considerados para acoplamentos comuns de um núcleo de hidrogênio (FIGURA 26). Quando há proximidade a um grupo CH, CH₂ ou CH₃ (com nuclídeos equivalentes), os padrões característicos são duplete, tripleto e quarteto, respectivamente. Isto ocorre pois cada um dos átomos vizinhos promove o desdobramento do sinal em questão, pois cada núcleo possui as diferentes probabilidades de níveis energéticos para um nuclídeo com spin 1/2.

TABELA 6 - PADRÕES DE DESDOBRAMENTO COMUNS, ABREVIÇÃO E ASPECTO

Número de hidrogênios vizinhos (equivalentes)	Número de picos (n+1)	Denominação do perfil (abreviação)	Intensidade relativa
0	1	Singleto (s)	1
1	2	Dubleto (d)	1:1
2	3	Tripleto (t)	1:2:1
3	4	Quarteto (q)	1:3:3:1
4	5	Quinteto (quin)	1:4:6:4:1
5	6	Sexteto (sex)	1:5:10:10:5:1
6	7	Septeto (sep)	1:6:15:20:15:6:1

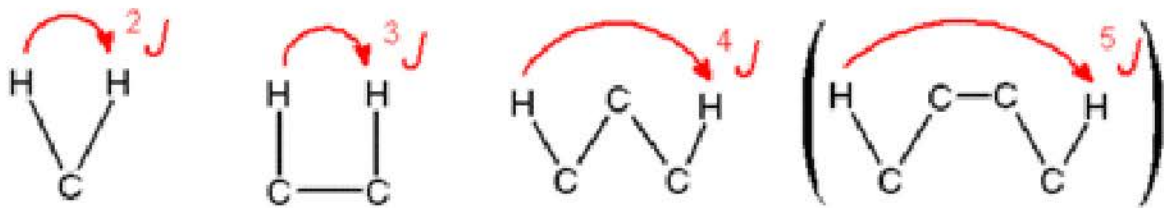


FIGURA 26 - ACOPLAMENTOS COMUNS
 FONTE: (CRASTO, 2014)

Cada interação é mensurável e caracterizada pelo valor J (constante de acoplamento), medido em Hertz. A interação de um spin nuclear sobre outro é, relacionada com a forma e quantidade de elétrons compartilhados através de uma ligação química. Um acoplamento entre dois tipos diferentes de núcleos é chamado de acoplamento heteronuclear (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007).

A principal característica dos acoplamentos são que os desdobramentos são iguais para os dois núclídeos que se acoplam. Entretanto cada núclídeo pode acoplar com múltiplos núclídeos a sua volta, e portanto, cada núcleo pode ter várias interações, causando padrões de desdobramentos distintos. O número de desdobramentos é denominado multiplicidade. De certa forma este efeito é mais visível quando há proximidade de núcleos, porém pode existir ao longo de várias ligações químicas.

Martin Karplus foi o primeiro pesquisador que descobriu que a constante de acoplamento (J) entre os hidrogênios ligados a átomos de carbono vicinais também depende do ângulo diedro entre os núclídeos, e desenvolveu uma expressão conhecida como a equação de Karplus. O ângulo diedro é considerado em relação ao primeiro e quarto átomos ligados, quando quatro átomos estão ligados entre si.

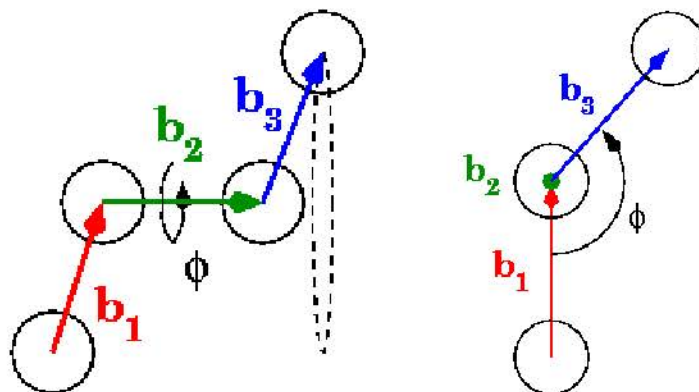


FIGURA 27 - DEFINIÇÃO DE ÂNGULO DIEDRO
 FONTE: WIKIPEDIA, CREATIVE COMMONS

A princípio, constantes de acoplamento podem ser medidas entre quaisquer núcleos magneticamente ativos, desde que possuam conexão através de ligações químicas. Pares de hidrogênios quimicamente equivalentes acoplam, mas o acoplamento não é observável, sendo que a explicação completa deste fenômeno envolve longas descrições de mecânica quântica de RMN (MARRS, 2013).

Quando não são equivalentes ($H_a \neq H_b$), como caracteristicamente ocorre com grupos CH_2 próximos a centros anoméricos; ou sem livre rotação (CH_2 travados em ciclos), os núcleos acoplam entre si e comportam-se independentemente (FIGURA 26). O acoplamento ocorre pela ligação geminal 2J e também independentemente pelas ligações vicinais e a longa distância.

3.12.6 Intensidade relativa

A área dos sinais em RMN é proporcional ao número de núcleos que contribuem para o sinal e a concentração da amostra. A intensidade relativa dos sinais depende do vetor magnetização resultante no eixo do detector. Esta intensidade é função diretamente proporcional à intensidade do campo magnético e a homogeneidade de campo magnético; e inversamente proporcional ao tempo de relaxação. Também depende do fator resultante de todos os pulsos aplicados sobre a amostra e de transições entre estados de energia que ocorram. Portanto, intensidade é dependente do ambiente químico em que o núcleo está inserido.

É possível fazer a comparação de intensidade relativa por integração, mas esta não pode ser considerada quando alguns fenômenos interferem sobre o processo de aquisição. No experimento de ^{13}C , por exemplo, em que ocorra o desacoplamento do núcleo de hidrogênio, a integração não apresenta valores relativos de integração satisfatórios para análise.

3.12.7 Sequências de pulsos

A programação apropriada do equipamento para obtenção de dados específicos se realiza pelas sequências de pulsos, as quais se dividem entre experimentos unidimensionais e experimentos multidimensionais. As sequências de pulsos são programadas via software. Uma enorme quantidade de tipos de experimento existe para observação de infinitos comportamentos químicos de núcleos magneticamente ativos em fenômeno de RMN (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010). Certas sequências de pulso mostram-se capazes de obter muitas informações estruturais, através de múltiplos tipos de transferências de sinal entre núcleos que se correlacionam (*“spin gymnastics”*) (GÜNTHER, 1995).

Em um **experimento unidimensional**, o sinal é apresentado como uma função de um único parâmetro, em geral o deslocamento químico. Em um **experimento bidimensional**, há dois eixos coordenados, que em geral, também representam faixas de deslocamento químico. O sinal é apresentado como uma função de cada uma dessas faixas de deslocamento químico (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007). O resultado de correlações é avaliado de forma prática por contornos tipo “curvas de nível”, em que as linhas de contorno correspondem à intensidade do sinal (JACOBSEN, 2007).

RMN de ^1H hidrogênio é a análise mais comum, que necessita de menores quantidades de amostra e tem tempo de análise mais curto. É uma ferramenta de rotina para elucidação de estruturas em química orgânica e organometálica. Também é amplamente aplicada em polímeros e biomoléculas (polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, etc). A região típica de deslocamentos químicos de ^1H é na faixa entre 0 e 10 ppm, embora núcleos de hidrogênio envolvidos em ligação de

hidrogênio podem aparecer em entre 10 e 20 ppm.

Para carbono, a RMN de ^{13}C é realizada, mesmo possuindo abundância isotópica 1,1%, visto que o isótopo mais abundante ^{12}C não é detectável por RMN por possuir spin zero. Às vezes é feita marcação isotópica com ^{13}C , mas na maioria das vezes opta-se por acúmulo de vários transientes ou técnicas de detecção indireta. Vários dados podem ser extraídos a partir de espectros de RMN de ^{13}C . A maioria dos espectros de RMN de ^{13}C é obtida como espectros desacoplados ao hidrogênio, ou seja, não se observa as interações entre núcleos de carbono e hidrogênio. Portanto, apenas picos nas formas de singletos são observados em um espectro de carbono desacoplado (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007). A janela espectral de deslocamentos químicos de carbono (na faixa entre 0 e 220 ppm) é muito maior que do hidrogênio, tendo poucas sobreposições. Algumas sequências de ressonância de ^{13}C utilizam transferência de polarização, utilizando-se dos núcleos de hidrogênio para aumentar a sensibilidade do sinal e/ou obter as características de multiplicidade por experiências do tipo DEPT (Distortionless enhancement by polarization transfer).

Espectroscopia de RMN de Oxigênio ^{17}O é amplamente utilizada para compostos inorgânicos e orgânicos. No entanto, devido à extrema baixa sensibilidade (100 mil vezes menor que o ^1H), só é recomendada em casos imprescindíveis. Mesmo assim, marcação isotópica pode ser requisitada. Além disto, algumas sequências de pulso específicas e processamentos refinados devem ser utilizados para evitar distorções de linha de base e outros efeitos problemáticos de espectros obtidos a baixas frequências de ressonância (GRANT; HARRIS, 1996).

Átomos como Nitrogênio e Enxofre, apesar de serem relativamente comuns em moléculas orgânicas, geram espectros de baixa intensidade. Além da baixa abundância isotópica de núclídeos magneticamente ativos, esses elementos também apresentam isótopos com intenso momento quadrupolar. A relaxação dos spins é acelerada, resultando em sinais alargados e com muitas sobreposições. Mesmo assim, RMN de ^{15}N é aplicada para algumas moléculas orgânicas, preferencialmente para compostos organometálicos, heterociclos e biomoléculas como peptídeos e proteínas. Compostos marcados são amplamente utilizados para contornar o problema de baixa sensibilidade (enriquecidos com o isótopo ^{15}N). Melhor sensibilidade é alcançada pelo uso de RMN de ^{14}N , entretanto os sinais são

muito alargados. Algumas técnicas bidimensionais, principalmente utilizadas para proteínas, fazem detecção a partir dos núcleos de hidrogênio (GRANT; HARRIS, 1996).

A baixa sensibilidade e os espectros com sinais muito largos (usualmente mais de um 1KHz) devido ao efeito do momento quadrupolar são as duas principais razões para o uso limitado de RMN de ^{33}S NMR (GRANT; HARRIS, 1996). Mesmo assim, é possível detectar o efeito do enxofre indiretamente por espectrometria de massas ou através de núcleos de enxofre diretamente ligados a carbono ^{13}C , tais como tióis, dissulfetos, sulfóxidos, sulfonas, etc.

As **técnicas bidimensionais** tiveram início na década de 60 (CLARIDGE, 1999). Estes experimentos sofreram uma melhora de resolução com a introdução da aplicação do conceito gradiente de campo. Experimentos bidimensionais são as principais técnicas analíticas aplicadas na elucidação estrutural de compostos orgânicos (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010).

Deve-se ressaltar que a obtenção da segunda dimensão não é resultante do cruzamento de dados entre experimentos unidimensionais (GÜNTHER, 1995). A segunda dimensão é gerada pela variação de intensidade ou de fase do sinal em função da variação de algum dos parâmetros programados em uma das dimensões, após o acúmulo de vários transientes consecutivos (CLARIDGE, 2009). Os sinais dos mapas de correlação resultam da ocorrência ou não de interação entre os núcleos observados conforme cada tipo experimento (JACOBSEN, 2007).

Os experimentos bidimensionais são caracterizados por quatro etapas fundamentais: Preparação ; Evolução; Mistura (Coerência) e; Aquisição (GÜNTHER, 1995; CLARIDGE, 2009; CREWS et al., 2010).

Entre experimentos bidimensionais, pode-se diferenciá-los entre experimentos de correlação homonuclear e experimentos de correlação heteronuclear (CONTRERAS, 2013). Respectivamente, fazem a observação entre núclídeos magneticamente ativos de um único elemento químico ou entre elementos químicos distintos.

3.12.8 Simulação de RMN

Conhecimentos sobre os comportamentos de ressonância dos núcleos de ^1H e ^{13}C estão atualmente bem estabelecidos. Desta forma, algumas previsões podem ser feitas a partir de estruturas e fragmentos propostos a fim de ser feita a comparação com os dados experimentais (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010).

Alguns algoritmos permitem a comparação entre dados experimentais e dados calculados. Apesar de ser um fenômeno complexo, os valores são estimados com base em banco de dados de contribuições de vizinhança química ou modelos químicos avançados.

Programas computacionais como ACD ChemsSketch (www.acdlabs.com), ChemDraw (www.cambridgesoft.com) e Spectool (www.upstream.ch) usam dados experimentais de mais de 200.000 compostos para calcular os deslocamentos químicos usando códigos de algoritmo HOSE (hierarchically ordered spherical description of environment), introduzidos paralelamente a algoritmos de redes neurais no final da década de 70 (BREMSE, 1978).

Em alguns casos, também é possível obter mais detalhes sobre correlações espectro-estrutura, incluindo constantes de acoplamento e resolução de espectro, através da customização e ajuste das configurações de simulação.

A compreensão de alguns valores de deslocamentos químicos, observados em experimentos anteriores, frequentemente facilitam a avaliação computacional de estruturas químicas desconhecidas e inferência de novas propostas estruturais em conjunto com resultados de outras técnicas analíticas.

3.13 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

A obtenção de espectro de ultravioleta é útil quando há insaturação em uma molécula ou quando há presença de ligações que permitem transições eletrônicas entre orbitais (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007). A maioria das moléculas orgânicas, entretanto, não absorve na região de UV-vis. Além disto, quando compostos químicos absorvem UV, esta normalmente ocorre em uma ampla faixa de comprimentos de onda, pois há muitos modos excitados de vibração e rotação (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010). A absorção de certo comprimento de onda é proporcional ao número de moléculas amostradas e quanto maior for a eficiência de absorção (SILVERSTEIN et al., 2007). O diagrama de absorção de UV está representado na FIGURA 28, que pode ser matematicamente expresso pela lei de Lambert Beer Eq.(3).

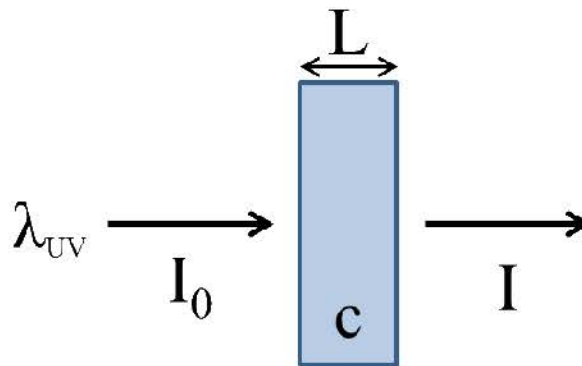


FIGURA 28 - CAMINHO ÓTICO PERCORRIDO PELO FEIXE UV
 FONTE: O AUTOR (2015)

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = L\epsilon c \quad (3)$$

Onde,

A = Absorbância para um certo comprimento de onda UV (λ_{UV});

I_0 = Intensidade UV incidente na cela de amostra;

I = Intensidade UV que sai da cela de amostra;

L = Caminho ótico (cm);

ϵ = Coeficiente de extinção molar ($M^{-1} L^{-1} cm^{-1}$);

c = Concentração molar do soluto (M).

3.14 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Espectros de **infravermelho (IR)** podem ser utilizados para identificar grupos funcionais particulares num composto orgânico, ou mesmo para identificar, por comparação, todo um composto (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010).

O espectro de infravermelho surge como uma consequência de vibrações das ligações químicas intramoleculares. A absorção de radiações electromagnéticas na frequência do infravermelho é relacionada à vibrações específicas de alguns tipos de ligações químicas (STUART, 2004). Somente as vibrações que provocam a alteração no momento de dipolo ou deslocamento de carga em função do tempo podem ser detectadas. Não há excitação de elétrons. As transições vibracionais e rotacionais ocorrem entre os átomos de uma molécula devido a uma distribuição de carga assimétrica (WITHROW, 2012). Por isto, nem toda molécula absorve na região do infravermelho (SILVERSTEIN et al., 2007).

As vibrações que caracteristicamente absorvem infravermelho estão ilustradas na FIGURA 29. Absorções podem ser muito próximas umas das outras e haver sobreposição. Além disso, há o efeito de vibrações harmônicas que acrescenta bandas adicionais fracas às vibrações observadas (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007).

Symmetrical		IR inactive Raman active
Anti symmetrical		IR active Raman inactive
Scissoring		IR inactive Raman active
Rocking		IR active Raman inactive
Wagging		IR active Raman inactive
Twisting		IR inactive Raman active

FIGURA 29 – COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE VIBRAÇÃO DETECTADAS POR INFRAVERMELHO (IR) E ESPECTROSCOPIA RAMAN
FONTE: (SHRESTHA, 2014)

A metodologia avançada que aplica transformada de Fourier é denominada FT-IR. Seu uso virou corriqueiro devido a facilidade de uso e aplicação em todo tipo de amostra química (FERRARO; BASILE, 1978). As análises são muito confiáveis e

reprodutíveis em relação à frequência de absorção dos grupos funcionais, com regiões características para grupos funcionais (FIGURA 30). Contudo, devido a mudanças no comprimento da trajetória e alterações de concentração, é muito difícil reproduzir os resultados exatos. Por isso, são normalmente expressos em relação à transmitância e de acordo com as unidades de frequência, ou seja, o inverso do comprimento de onda. Demanda pouco espaço e não gera resíduos ou gasto de consumíveis. Possui custo acessível, é seguro e não tóxico (REES, 2010).

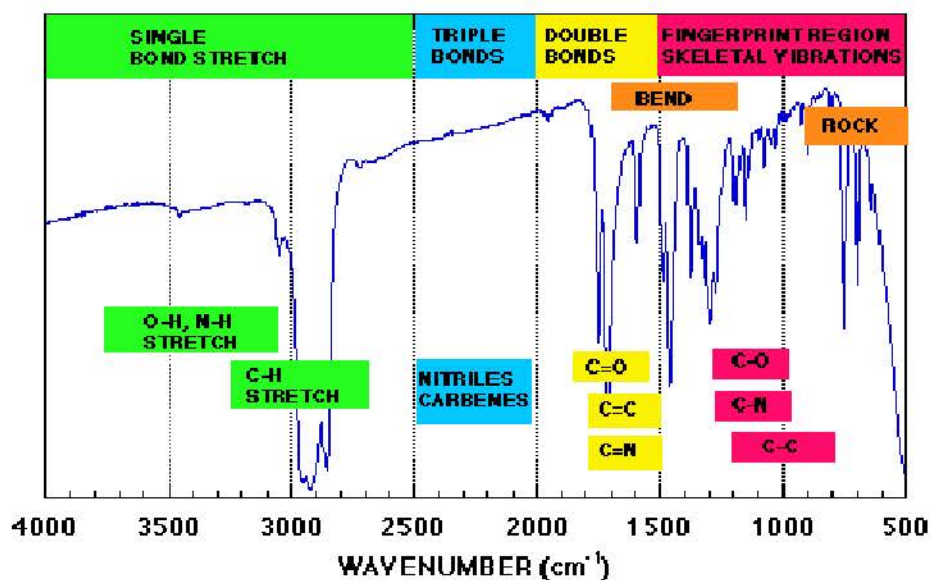


FIGURA 30 - FREQUÊNCIAS DE INFRAVERMELHO CARACTERÍSTICAS PARA CERTOS GRUPOS FUNCIONAIS

FONTE: DIANLIWENMI.COM/POSTIMG_629946_15.HTML

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



FIGURA 31 - FLUXOGRAMA DE ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL, A COMEÇAR DA IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO ATÉ ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO ATIVO
 FONTE: ADAPTADO DE PINO et al. (2013)

4.2 CULTIVO DO MICRORGANISMO

O fungo utilizado, previamente desconhecido, foi obtido do banco de cepas isoladas do Laboratório Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná. A cepa foi cultivada em placa contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) a 28°C por quinze dias.

Além disto foram testados diversos substratos de cultivo em placa e/ou meio sólido, com objetivo de testar se ocorria esporulação do fungo. Os meios testados foram: trigo com sulfato de cálcio 1%; trigo com carbonato de cálcio 10%; milho; meio PDA; meio PDA com explante de gramínea; meio PDA acidificado com ácido tartárico; Agar Sabouraud; Agar V8; Agar Nutriente; Meio Mínimo; Tryptic Soy Agar (TSA); Agar infuso cérebro coração (CCS); meio FAN Agar; meio FAN suplementado com CoSO_4 0,05 g/L; Agar YMEA.

O cultivo em frascos do tipo Erlenmeyer foi realizado em volumes de 100, 250, 500 e 1000 mL. Foram testadas condições temperatura de cultivo e também algumas modificações do meio FAN (LEIFA, 2003), como concentração de açúcar, concentração de cloreto de cálcio; e concentrações de fosfato de potássio monobásico e dibásico.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

4.3.1 Extração do DNA

Após o crescimento celular do fungo, 100 mg do micélio foi transferido assepticamente com auxílio de uma alça de platina para microtubos de polipropileno de 2mL. Cada microtubo continha 1800 μL água destilada autoclavada aquecida a 60°C. Foram realizados três ciclos de lavagem do micélio sob agitação em vórtex por dois minutos. No término de cada lavagem o material era centrifugado a 4000 $\times g$ – por 1 minuto a temperatura ambiente. A água de lavagem era descartada e o micélio lavado era transferido para outro microtubo. Cada microtubo continha 1,5 g de *beads* de quartzo e 600 μL de tampão para extração de DNA (CTAB 2%) brometo de cetil-trimetil-amônio modificado TABELA 7 (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ; GAYTÁN-OYARZÚN, 2006). O rompimento da parede celular do micélio foi realizado por método físico, com cisalhamento causado pelos *beads* de quartzo em agitação contínua de 3 minutos em *Vortex* na potência máxima. Os *beads* de quartzo foram previamente esterilizados overnight em mufla a 540°C para incineração do material orgânico.

TABELA 7 – REAGENTES PARA O PREPARO DO TAMPÃO CTAB DE EXTRAÇÃO DO DNA DO FUNGO DE ACORDO COM SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ E GAYTÁN-OYARZÚN (2006)

Reagentes	Concentração
Brometo de cetil-trimetil-amônio	2%
Tris-HCl pH 8,0	100mM
Cloreto de sódio	1,4M
PEG 8000	1%
EDTA pH 9,5	20mM
Beta-mercaptoetanol	0,3%

O pulverizado solubilizado em 350 μ L de tampão CTAB foi submetido a dois ciclos de congelamento e descongelamento (ultrafreezer a -80°C por 2 minutos e a banho Maria 75°C por 2 minutos). Para a purificação do DNA, segundo Sambrook et al. (1989), foi adicionado uma solução de fenol/clorofórmio/isoamílico (25:24:1) para remoção de proteínas. O isolamento de DNA foi realizado a partir da fase aquosa após centrifugação a $13200\times g$ por 10 minutos e repetido até que a fase aquosa ficasse límpida.

A precipitação do DNA, a partir do sobrenadante, foi realizada com 2,5 volumes de etanol absoluto grau P.A., seguida de centrifugação a $12.000\times g$ a 4°C . O DNA precipitado foi então lavado com 300 μ L de etanol 70% grau P.A e novamente submetido à centrifugação. Após, o etanol foi evaporado em estufa a 37°C overnight. O DNA foi ressuspedido com água ultrapura e realizado uma corrida eletroforética em gel de agarose para analisar o aparecimento de bandas de DNA. Após esse procedimento, o DNA extraído foi armazenado a -20°C .

4.3.2 Reação de PCR

Um par de oligonucleotídeos iniciadores ITS4 e ITS5 (*primers*) foram adquiridos da Invitrogen, especificamente utilizados para eucariotos, corroborando com as condições de ITS descritas para *Phytophthora* spp. por Cooke et al. (2000).

A região *internal transcribed spacer* (ITS) amplificada pelo par de *primers* ITS5 *forward* e ITS4 *reverse*, incluem as regiões ITS1 e ITS2, separadas pelo gene ribossomal 5.8S, e está situado no DNA nuclear (nrDNA) de várias cópias, entre os genes codificadores das subunidades 18S (SSU) e 28S (LSU) (BELLEMAIN et al., 2010).

A concentração de DNA isolado foi determinada para o cálculo da diluição necessária que impedisse a inibição de reação por excesso de substrato. O material foi quantificado a partir de alíquotas num equipamento NanoVue Plus (GE). O DNA molde foi geralmente diluído nas proporções de 1:5; 1:10 e 1:20 em água ultra pura.

A reação de polimerase em cadeia (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) foi realizada em tubos de parede fina com a utilização de 2 µL de DNA molde em solução reagente (*mix*), descrita na TABELA 8. Todas as reações foram realizadas em termociclador Veriti (AppliedBiosystems) com desnaturação inicial a 95° C por 10 min. Em seguida a reação da polimerase em cadeia realizou-se com 30 ciclos de desnaturação (95° C por 30 segundos), anelamento (46° C por 2 minutos) e extensão (72° C por 2 minutos), seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 minutos (WHITE et al., 1990).

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO REAGENTE PARA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Reagentes, concentração	Quantidade
Tampão Tris-HCl pH8 10X	2,2 µL
dNTPs, 10 mM	0,4 µL
MgCl ₂ 50 mM	0,6 µL
<i>Taq</i> Polymerase, 5 U/µL	0,25 µL
ITS 4 <i>reverse</i> , 10 pmol/µL (5'→3' TCCTCCGCTTATTGATATGC)	0,65 µL
ITS 5 <i>forward</i> , 10 pmol/µL (5'→3' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)	0,65 µL
Água ultra pura	15,25 µL

Os produtos de PCR foram visualizados em um gel de agarose 1,2% com o marcador de massa molecular 1kB (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UV (Loccus Biotecnologia). O tamanho do fragmento de DNA amplificado era entre 600 e 900 pares de base (bp).

4.3.3 Purificação de DNA para reação de sequenciamento

Os produtos de amplificação foram purificados com o protocolo de precipitação por acetato de amônio e armazenados a -20° C em tubo de 500 µL, no qual foram adicionados 45 µL do produto de PCR, 30 µL de acetato de amônio 7,5 M

(esterilizado por filtração 0,22 μ m) e 90 μ L de etanol absoluto. O material foi homogeneizado em vortex e centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado para obtenção do *pellet*. Em seguida foram adicionados lentamente 200 μ L de etanol 70%, seguido de uma centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, o qual foi descartado após este procedimento. O material amplificado foi seco em estufa à vácuo a 45°C (10-15 minutos) e então dissolvido em 20 μ L de água ultrapura. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% com 3 μ L do DNA purificado para avaliação da eficiência do procedimento de purificação e subsequente envio para reação de sequenciamento.

4.3.4 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento das amostras de DNA foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS). Foi utilizado o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 GeneticAnalyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (AppliedBiosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 4,5 pmol do *primer* ITS4 ou do *primer* ITS5 e 3 μ L do reagente *BigDyeTerminator v3.1 CycleSequencing RR-100* (AppliedBiosystems) em um volume final de 10 μ L. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (AppliedBiosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 μ L de formamida Hi-Fi (AppliedBiosystems), desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletro-injetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (AppliedBiosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz"*.

4.4 CULTIVO EM BIORREATOR

Para cultivo de fungo em Biorreator, o crescimento foi realizado em meio FAN (LEIFA, 2003). O material foi utilizado para preparação do extrato fúngico. O fungo foi cultivado em Biorreatores modelo New Brunswick BIOFLO100, sob agitação de 150 rpm, pH inicial de 6,1. A taxa de inóculo foi de 5%, considerando um pré-inóculo de 5 a 7 dias de crescimento em 2 Erlenmeyers de 500 mL, mantidos em rotação a 100 rpm a 25°C. O volume de meio de cultura era de 10 L. A massa inicial do inóculo era em média 6 g.seco/L, ou seja, no inóculo inicial havia 3 g.seco de micélio / batelada de fermentação.

4.5 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO

Técnicas preparativas para obtenção do extrato e purificação do composto só foram realizadas após secagem do material obtido por bioprocessamento fúngico (biomassa e caldo de fermentação), tal como descrito em seguida.

4.5.1 Secagem por Liofilização

O extrato derivado do caldo de fermentação foi concentrado por liofilização. Cerca de 30 L foram evaporados em evaporador rotativo para 12 L de meio concentrado. Este total foi congelado em freezer -80°C em bandejas de 30 cm de diâmetro, em camadas de 1 cm de líquido, para garantir a eficiência de transferência de massa no processo de liofilização. O processo de liofilização não é destrutivo, porém devido ao grande gasto energético não é a alternativa de primeira escolha. O objetivo de sua utilização na etapa de pesquisa foi manter a integridade da amostra, com a finalidade de obtenção de material seco para possibilitar extração com solvente orgânico sem interferência de água. Ao final do processo evaporativo, que demorava cerca de 144 h, o material seco no fundo da bandeja era raspado e/ou

extraído diretamente com diclorometano (LIMA, 2009).

A biomassa, de modo semelhante, foi congelada e liofilizada após ter sido separada do meio de cultivo, logo após o término do bioprocesso, rendendo cerca de 80 g por batelada de 10L.

4.5.2 Secagem por Spray dryer

O meio líquido que havia sido congelado continha em baixa concentração a molécula com atividade leishmanicida. A evaporação do meio foi realizada em um equipamento Labplant spray dryer SD-05. A temperatura de evaporação do jato de ar foi de 120°C, com pressão de injeção de 3 bar e fluxo de entrada de 10 mL/min. O diâmetro do bico de injeção foi de 0,5mm. A secagem foi realizada para favorecer a adsorção do material em sílica comercial tipo TIXOSIL 38AB (material inerte, atóxico), considerando massa total de sólidos adicionados de 40%. As condições foram compressor 350 graus, *de blocker* 60 graus, com 24 a 26 injeções / minuto. O ciclone foi ajustado para otimizar a formação de massa seca, porém empiricamente. O objetivo principal foi testar um método rápido de concentração de extrato a partir do meio de cultura líquido.

4.5.3 Obtenção do extrato

Os extratos brutos foram obtidos principalmente a partir de biomassa e do caldo de fermentação, totalmente secos. Após processo de secagem, os materiais foram mantidos em dessecador, pois a umidade interferiria no coeficiente de partição de constituintes do material seco para o solvente orgânico, o qual foi utilizado para extração do material overnight, a temperatura ambiente, sob agitação rotatória. Previamente, o material foi triturado com aparato de aço inox.

A sequência de fracionamentos e união de extratos foi realizada por experimentação e erro, até que se considerasse qual era a fração que continha o princípio ativo em maior quantidade. Na FIGURA 42, item 5.5, são ilustradas as

etapas desde o preparo de extrato até o teste de atividade biológica. A extração foi realizada com solvente orgânico diclorometano a temperatura ambiente. A extração foi feita a partir de 80 gramas de biomassa liofilizada e triturada, oriunda do Biorreator 01. A proporção solvente massa de amostra foi de 5x, resultando em 400 mL de solvente por extração. O processo foi repetido até a 4ª extração (LIMA, 2009).

A **extração líquido-líquido** foi realizada a partir dos extratos denominados Sdcm, Xdcm e B02SsDCM. Também foi realizada a extração líquido-líquido após a concentração de frações para cromatografia e continuação para o processo de cristalização.

A **extração ácido-base** foi realizada com objetivo de precipitar o composto de interesse a partir da fase aquosa e facilitar sua transferência para fase orgânica. O material obtido por esta técnica não foi utilizado para elucidação estrutural, visto que alguns grupos funcionais poderiam sofrer modificações estruturais com mudanças de pH. Entretanto o esqueleto carbônico principal dificilmente se modifica.

Foram testados 7 tipos de sistemas de solvente a fim de favorecer a solubilidade da maioria dos compostos, deixando de incluir o menor número de compostos possível (TABELA 9).

TABELA 9 – SISTEMAS DE SOLVENTE TESTADOS

Sistema	Composição
0	Éter etílico: n-hexano: Acetona: Acetato de etila (1:1:1:1)
1	n-hexano: Acetona (1:1)
2	Éter etílico: n-hexano: Diclorometano: Metanol (1:1:0,5:0,5)
3	Éter etílico: n-hexano: Acetato de etila: Metanol (1:1:1:0,5)
4	n-hexano: Acetato de etila: Metanol (2:1:0,5)
5	Éter petróleo: n-hexano: Acetona: Diclorometano: Metanol (0,6:1,5:1:1:1)
6	Éter petróleo: Acetato de etila: Metanol (2:2:1)
7	Éter petróleo: n-hexano: Acetona: Diclorometano: Acetato de etila: Metanol (3: 1,5: 1: 1: 2: 2)

4.6 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO

A **partição seletiva** foi aplicada para possibilitar o fracionamento de constituintes com propriedades semelhantes, que não teria resolução suficiente para separação por cromatografia preparativa convencional de fase normal. Desta forma, extratos unidos serviram como base para procedimentos cromatográficos mais refinados para grupos de moléculas. Como fase móvel, foram utilizados os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, isoladamente ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

Para **cromatografia de adsorção em coluna (CC)** foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 (70- 230 mesh, ASTM) de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm (Vetec). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de sílica a serem utilizadas. A cromatografia em coluna foi realizada em três tamanhos de coluna:

- Diâmetro 10mm x 7 cm altura
- Diâmetro 30mm x 20 cm altura
- Diâmetro 50mm x 40 cm altura
- Coluna com pressurização média e fase estacionária flash

O acompanhamento do processo de separação foi determinando pela observação dos compostos por CCD analítica. A fase móvel não utilizou concentrações superiores a 5% de metanol, pois causa arraste da sílica.

4.6.1 CCD analítica e CCD preparativa

A cromatografia em camada delgada foi realizada no modo ascendente. A CCD analítica foi realizada em placas de Sílica Gel 60 F254 aluminum sheets (Machenery-Nagel) cortadas em 120 x 80 mm. A CCD preparativa foi realizada em placas de vidro de 150 x 150 mm com 3 mm de espessura preparadas artesanalmente com sílica gel 60 F254 apropriada para placas (Vetec) junto com sulfato de cálcio semi-anidro (*Plaster of Paris*) (STAHL, 1969). A cuba utilizada era de vidro. A espessura considerada de 3 mm foi indicada pois outras espessuras comprometem a velocidade de entrada de fase móvel na placa (STAHL, 1969).

CCD analítica foi utilizada para determinar a abrangência de frações a serem unificadas e verificar que tipos de separação eram eficientes. Além disto, serviu para detectar comparativamente a presença da molécula ativa em alguns extratos não testados biologicamente (CANNELL, 1998).

A CCD preparativa foi utilizada para separar e purificar alguns compostos a partir de extratos. Também serviu para facilitar análises consecutivas através da purificação de moléculas do extrato que serviram como padrões internos para análises posteriores.

A revelação das placas foi feita por observação em câmara de irradiação ultravioleta (UV 254 e UV 365 nm), observação visível e revelação com reagentes gerais ou específicos, de acordo com metodologias propostas por (MERCK, 1980; JORK, 1990; WAGNER; BLADT, 2001; SIMÕES et al., 2002). Para certeza de purificação, o composto bruto foi eluídos com pelo menos três sistemas de solventes distintos, verificando-se banda única (STAHL, 1969).

4.6.2 HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A HPLC analítica foi conduzida em um equipamento HPLC Varian Prostar 800 module, column valve module model 500 / serial no: 00254; PDA detector model 330 / serial no: 00870; Solvent delivery module model 240 / serial no: 00652. O software utilizado foi o Star Aurora.

A coluna utilizada foi uma coluna Zorbax XDB C18 (250 x 4.6 ID mm; 5 µm; 100 Å). A fase móvel utilizada foi composta por TFA 0,01% em água (solvente A) e TFA 0,01% em acetonitrila (solvente B), começando com 45% durante 5 min e então um gradiente linear desde 45% até 90% em 40 min de solvente B (FIGURA 32 – A). O fluxo foi de 1 mL/min; e a detecção PDA foi entre 200–400 nm. Este método foi adaptado a partir do método de Oughlissi-Dehak et al. (2008), que é utilizado para separação de sesquiterpenos. O método justifica-se porque o ciclo central do composto ativo continha um anel tipo-humuleno pertencente ao grupo dos sesquiterpenos.

Utilizou-se também um método isocrático constituído por metanol e acetonitrila (70:30) com fluxo 0,8 mL/min. Este método foi utilizado pois pretendia-se

a determinação de um método simples e quantitativo, tal como descrito no trabalho de Jadhav et al. (2012).

Outros métodos isocráticos testados, com maior ou menor eficácia de separação, foram: (10) [70% MeOH; 30% HOAc (0,3%)]; (11) 30% MeOH; 70% HOAc (0,3%); (21) [30:70 MetOH:ACN] 0,8 mL/min; (21b) 30:70 MetOH:ACN; (22) 40:60 MetOH:ACN 0,8 mL/min; (23) 20:80 MetOH:ACN 0,8 mL/min.

Um pico bem determinado foi obtido pelo método otimizado para fenólicos (WEN et al., 2005) (FIGURA 32 – B). Para análises LC-MS também foi utilizado o método proposto por (YANG et al., 2007) (FIGURA 32 – C). O software de análise utilizado foi o Agilent Chemstation.

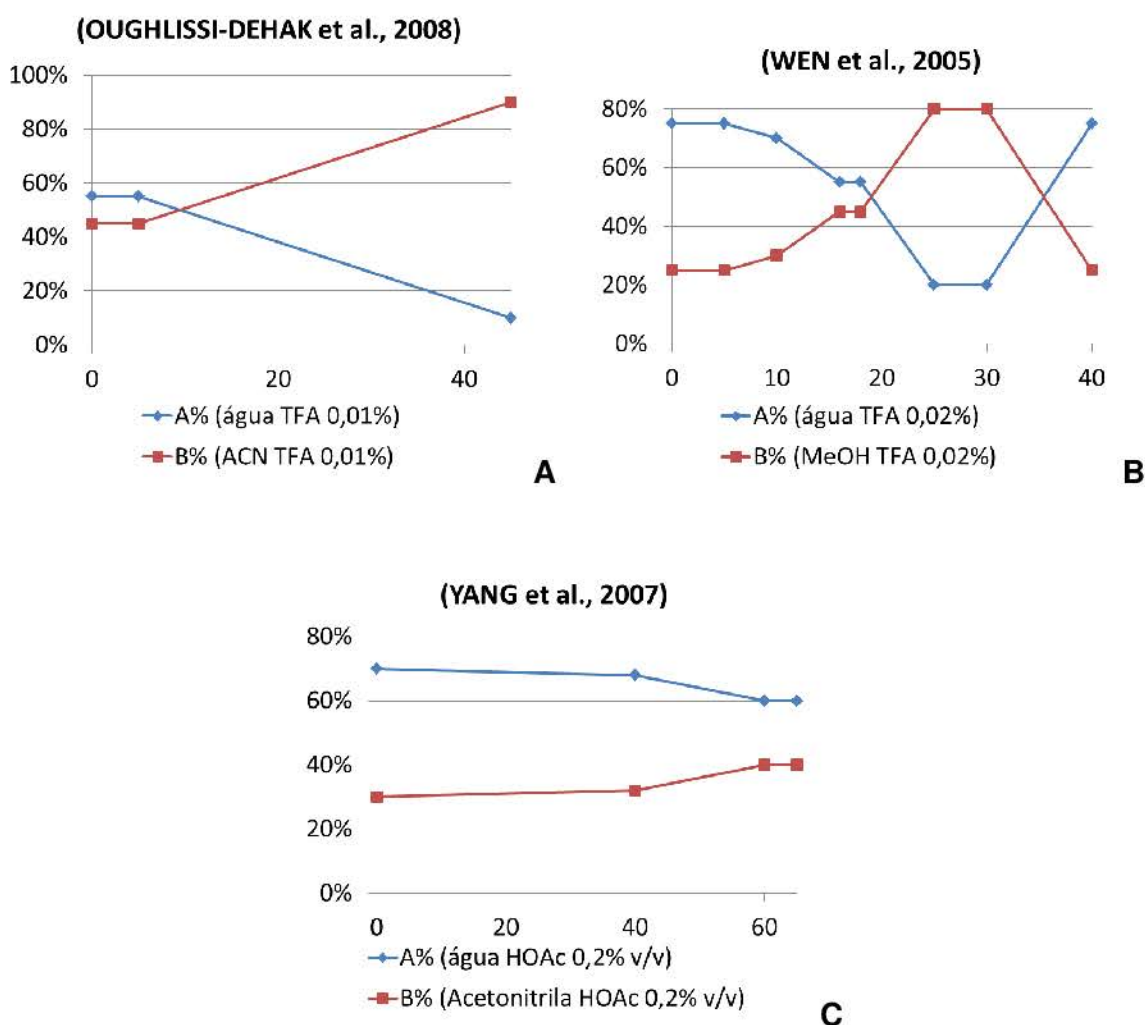


FIGURA 32 - MÉTODOS GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA CROMATOGRAFIA (HPLC) UTILIZANDO COLUNA DE FASE REVERSA (A) OUGHLISSI-DEHAK et al. ; (2008) ; (B) WEN et al. (2005) E (C) YANG et al. (2007)

4.6.3 Extração em fase sólida

A extração SPE foi realizada com fase estacionária C-18 pré-equilibrada, com área de adsorção equivalente a 10 g de fase estacionária Waters Sep-Pak. O procedimento foi realizado de acordo com o manual do fabricante (WATERS TECHNOLOGIES CORP et al., 1980), iniciando-se pela inserção da amostra na coluna pré-equilibrada. A amostra foi solubilizada em uma pequena quantidade de metanol (menos polar em relação ao solvente de limpeza). Foram testados extratos diclorometano a partir de sobrenadante de fermentação e de biomassa. Os analitos de interesse ficaram adsorvidos e com isso, passou-se um solvente mais polar (água destilada) que promoveu a eluição das moléculas polares, sais e outros contaminantes. Em seguida, voltou-se a utilizar o metanol, em um volume maior, para facilitar a desorção dos analitos da fase estacionária pela diminuição de polaridade. Por fim, fez-se a regeneração da coluna para reutilização da mesma e evaporou-se o solvente contendo os analitos de interesse.

4.6.4 Cristalização da molécula

Os procedimentos da cristalização foram realizados de acordo com Pavia et al. (2009), destacando-se:

(I) Os sólidos do extrato foram solubilizados em uma quantidade mínima de solvente (aquecido à temperatura de ebulição). A pesquisa de solventes foi realizada por tentativa e erro, usando pequenas quantidades de material, conforme está especificado no Anexo 01 (Perfil de solubilidade). Aproximadamente 50 g de extrato foram dissolvidos em diclorometano (1 L) e o volume foi reduzido até 200 mL, por evaporação lenta, à temperatura ambiente;

(II) Foi realizada a remoção de impurezas insolúveis através de filtração (em algodão) do material solubilizado no solvente orgânico, à 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 mL de metanol;

(III) A solução foi deixada em repouso para resfriamento lento em um frasco Erlenmeyer de boca estreita. O frasco foi coberto por um béquer invertido e deixado

para evaporação gradual em temperatura ambiente;

(IV) Foram observados cristais, em forma de pontos após 10 dias de formação e, em forma de palha após 14 dias de formação. Os cristais resultantes foram coletados por filtração rápida em seringas de vidro e lavados com cerca de 100 mL de diclorometano a -20°C . A secagem dos cristais ocorreu em estufa a vácuo, por 8h a pressão de 0,3 atm.

Outro procedimento foi realizado com acetato de etila e éter de petróleo (2:1). O material foi aquecido abaixo da temperatura de ebulição e o material foi solubilizado aos poucos. A amostra filtrada e deixada em repouso, entre 24 e 48 horas, em local protegido e com isolamento térmico. O material formou cristais pequenos. Para manutenção dos cristais a alíquota foi para congelador e filtrado.

No processo de cristalização também foi aplicada extração líquido-líquido para favorecer a cristalização a partir do meio aquoso, aproveitando a extração acetato de etila, a partir da água que foi alcalinizada e depois neutralizada com bicarbonato de sódio. Também foram testadas condições com acetonitrila e hexano.

A recristalização para remoção de impurezas foi realizada pela solubilização do material em 20 mL de solução aquosa com pH ajustado para aproximadamente 12 com solução de hidróxido de sódio (5M). O material foi extraído para fase orgânica de acetato de etila, pelo ajuste gradual até o pH 8 com ácido clorídrico. A solução de acetato de etila foi aquecida e filtrada. O material foi cristalizado com diminuição de temperatura.

4.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.7.1 Viabilidade celular de *Leishmania*

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73M2269) *L. (L.) infantum* (MHOM/FR/71/LRM75) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300) foram mantidas em meio bifásico Tobie-Evans (EVANS et al., 1984) a 24°C . Os parasitos foram cultivados por 5-7 dias e promastigotas em final de fase log foram subcultivadas em 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

O ensaio do MTT é fundamentado em clivagem do sal Tetrazolium MTT (amarelo) [(3-4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina] em um produto colorido Formazan (roxo) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Dado que esta conversão só pode ser realizada por células viáveis, a quantidade de Formazan produzido é uma medida direta de células viáveis e verificação de atividade leishmanicida. Quanto mais clivagem ocorrer, maior a absorbância em espectrofotômetro a 595nm e menor é a atividade de um fármaco. O protocolo original deste ensaio semi-automático foi descrito por (MOSMANN, 1983) e adaptado por (PALIT; ALI, 2008b).

A metodologia do MTT utilizou 2×10^6 *Leishmania* / mL, após contagem. Após um período de 72h de incubação a 24°C, os ensaios contendo *Leishmania* foram centrifugadas a 4000g, a 4°C durante 10 minutos. O meio foi retirado com auxílio de micropipetador com ponteiros estéreis. O pellet foi então ressuspensado em solução de MTT. Para completa ressuspensão e padronização entre os ensaios utilizou-se agitador do tipo Vortex (10 segundos, agitação máxima). Os ensaios foram mantidos por um período de 4 horas a 24°C. Os cristais formados a partir do metabolismo dos parasitos ativos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) após centrifugação e retirada do sobrenadante não metabolizado. O conteúdo de 100 µL de cada ensaio foi distribuído em poços de microplacas e lidos em leitor de absorbância para multipoços na frequência de 595nm.

4.7.2 Identificação das cepas referência de *Leishmania*

Para confirmação da identificação de cepas referência de *Leishmania* foram utilizados os seguintes pares de iniciadores para análise de espécie por técnica de amplificação de DNA de cinetoplasto por PCR: a1/a2 para *L. (L.) amazonensis*; b1/b2 e B1/B2 para *L. (V.) braziliensis* e RV1/RV2 para *L. (L.) infantum*. As condições de amplificação são descritas por (MIMORI et al., 1998; PAIVA et al., 2004; PEREIRA et al., 2008).

4.7.3 SDS-PAGE

A técnica de análise de proteínas por gel de poliacrilamida com desnaturação em SDS foi realizada com objetivo de verificar possíveis diferenças de expressão de proteínas constitutivas em uma amostra tratada com o composto isolado. O cultivo tratado recebeu dose sub-letal IC₁₀, pois o objetivo era obter biomassa viável sob influência do composto. A comparação dos perfis de bandas foi feita em relação ao controle sem tratamento, por observação visual de presença ou ausência, após corar o gel com Comassie Blue.

Aproximadamente 10 mL de cultura de *Leishmania* foram obtidos na fase tardia da fase log ($\sim 1 \times 10^7$ células / mL). O pellet foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 $\times g$. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de PBS. Novamente foi centrifugado a 1.000 $\times g$ e o sobrenadante descartado. As células foram lisadas em solução de 1x SDS-PAGE *loading buffer* e fervidas por 5 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

A extração de proteínas do sobrenadante foi realizada pelo método do ácido tricloroacético. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro 0,22 μm para remover restos celulares. A cada mL de sobrenadante filtrado foram adicionados 250 μL de uma solução de ácido tricloroacético (0,5 mg/mL) a 4°C. A amostra foi incubada em gelo por 10 minutos. Logo após foi centrifugada a máxima velocidade (5000 rpm). O precipitado foi lavado duas vezes com acetona mantida em gelo. O pellet foi ressuspensado em 1x SDS-PAGE *loading buffer* (1/10 do volume original).

A aplicação de proteína em gel foi normalizada para 30 μg por poço.

4.7.4 Teste de hemólise

O teste de hemólise foi realizado em hemácias de sangue de coelho. O sangue foi coletado em citrato de sódio e diluído 1/50 em solução salina. A amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos em agitação orbital, na presença de várias concentrações de amostra. Ao final do teste, o material foi centrifugado 1500 rpm

por 1 minuto (evitando-se hemólise por centrifugação). A atividade hemolítica foi determinada pela presença de sobrenadante avermelhado, indicativo de liberação de hemoglobina.

4.7.5 Citotoxicidade contra células Vero

Para o teste de citotoxicidade sobre células Vero, foram sedimentadas 10^5 células por poço em placas de 24 poços. Após 24 h de aderência, as células foram submetidas ao tratamento com a molécula ativa em diversas concentrações. As amostras foram solubilizadas em 0,1% DMSO. O resultado foi comparado com controle não tratado que também continha a mesma proporção de DMSO.

4.8 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DE ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A estratégia de elucidação estrutural aplicada neste trabalho foi principalmente com dados de RMN em conjunto com dados de caracterização química, espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho, ponto de fusão e absorvância UV-vis.

A elucidação estrutural do composto foi realizada em etapas, agregando-se informações de diversos tipos de análise, como é ilustrado na FIGURA 33.

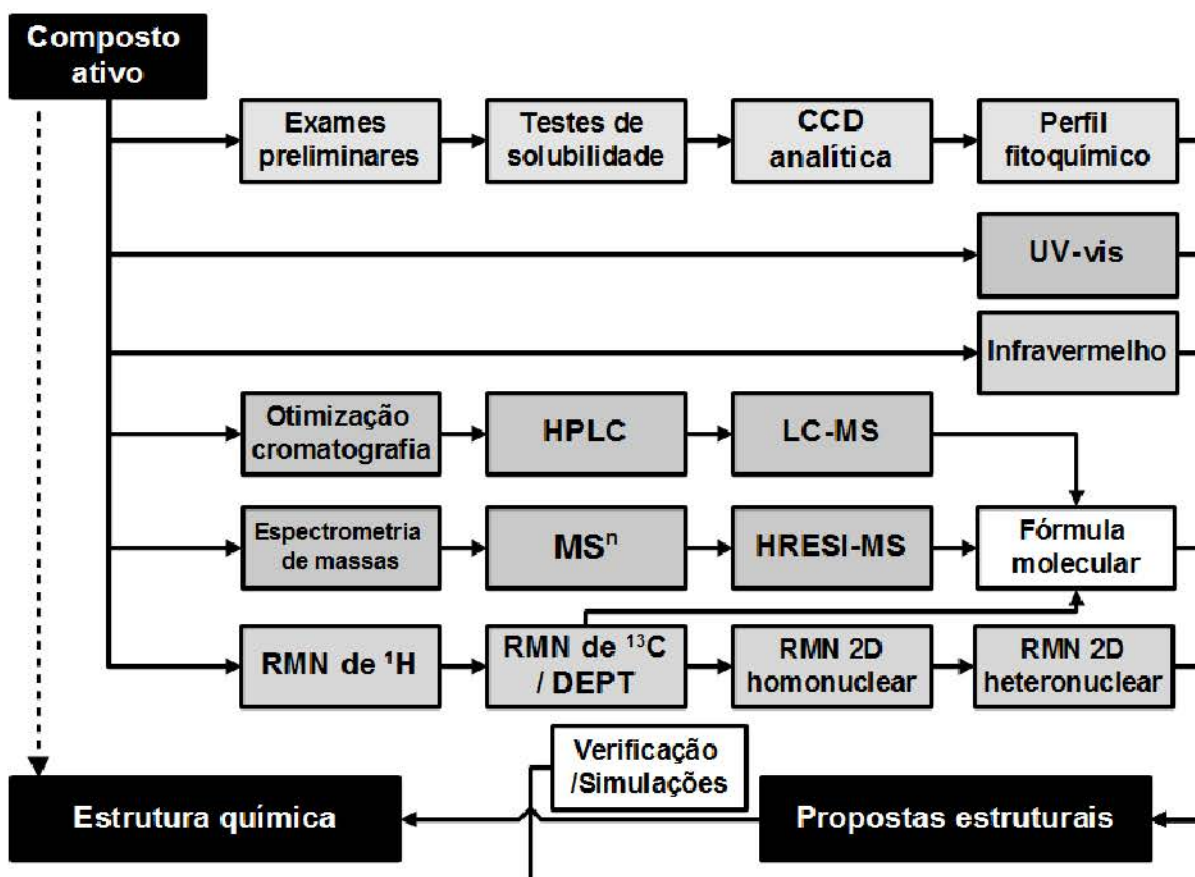


FIGURA 33 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DE ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.9 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

4.9.1 Exames preliminares

As análises preliminares de aparência, odor e sabor foram realizadas por via subjetiva, com auxílio de três observadores independentes. O teste de chama foi realizado com a chama produzida pela inserção do material direto no fogo. Também foi testado aquecimento indireto pelas paredes do tubo de ensaio.

4.9.2 Ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado em capilar tubo aberto por um equipamento automático assistido por microcâmera, de modelo MP90 Melting Point System (Mettler Toledo). A método aplicado foi Termodinâmico, com rampa de aquecimento entre 200 a 380°C, variando na taxa de 3°C/minuto.

4.9.3 Perfil de solubilidade

O perfil de solubilidade foi testado de acordo com Pavia et al. (2009) para sistemas orgânicos e sistemas aquosos (listados no ANEXO 1). Foram testados solventes não-próticos, incluindo solventes não-polares (hidrocarbonetos em geral, CHCl_3 , etc.) e solventes polares não-ionizantes (Acetonitrila, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etc). O uso de solventes não-polares se torna útil quando tem-se a necessidade de que o solvente não interaja de maneira forte com o soluto em questão, pois não solvatam íons. Solventes polares não-ionizantes raramente ficam ionizados e normalmente atuam como boas bases de Lewis.

A metodologia de testes de solubilidade em sistemas aquosos seguiu os passos descritos na FIGURA 34. Solventes polares ionizantes não foram testados, a não ser soluções aquosas. Foram testadas soluções aquosas de NaOH 5%, NaHCO_3 5%, HCl 5%, Ácido Sulfúrico 98% (concentrado) e ácido fosfórico 85%. Para cada novo processo de solubilização foi utilizado tubo de ensaio limpo e seco, e uma amostra nova para cada solvente.

Considerou-se positivo quando havia dissolução dos cristais ou quando havia a indicação de dissolução pela mudança de cor em volta do cristal, característica da dissolução.

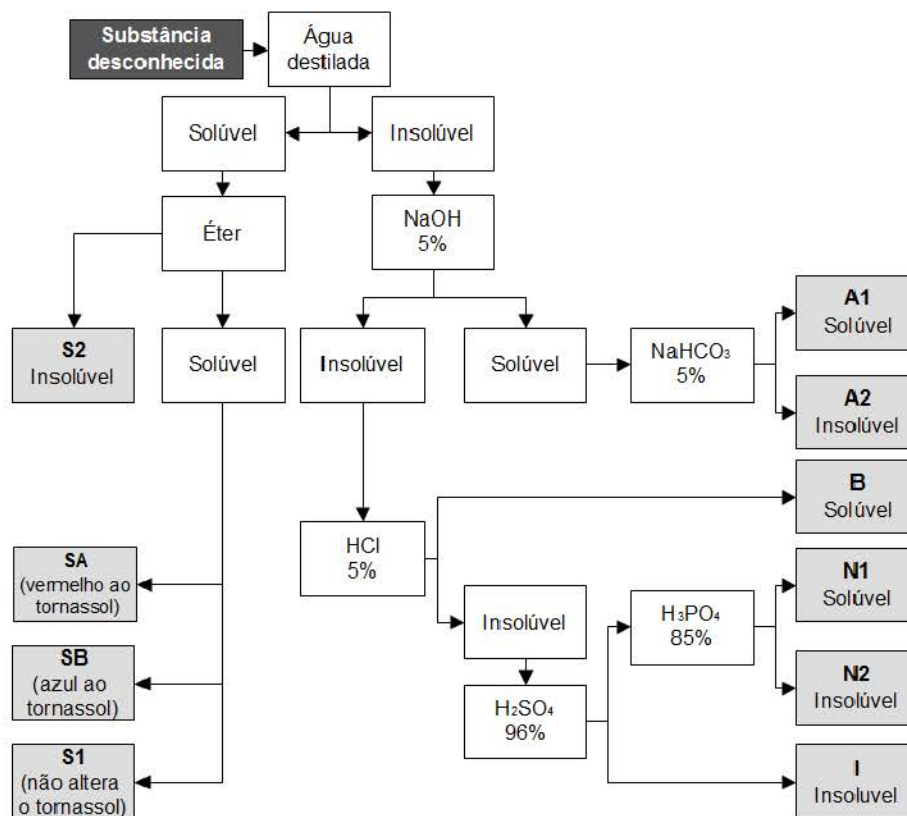


FIGURA 34 – FLUXOGRAMA DO TESTE DE SOLUBILIDADE
(CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS IDENTIFICADOS POR LETRAS)
FONTE: ADAPTADO DE Pavia et al. (2009)

4.9.4 Aplicação de Marcha Fitoquímica

Foi aplicada a Marcha Fitoquímica, considerando reações bem estabelecidas para análises fitoquímicas (WAGNER; BLADT, 2001). O objetivo foi pesquisar a maior quantidade de grupos de moléculas orgânicas comumente encontradas em produtos naturais; revelando ou não presença de determinada classe de metabólitos secundários.

Os testes foram realizados com alguns extratos e frações, mas os resultados foram especialmente avaliados em relação à molécula ativa após purificação. A análise do perfil de reatividade química do composto foi realizada através de reações colorimétricas ou de precipitação. A caracterização fitoquímica avaliou a pesquisa de alcalóides, antocianidinas, antraquinonas, heterosídeos antraquiônicos, chalconas, compostos fenólicos e aromáticos, cumarinas, moléculas insaturadas,

esteróides, flavonóides, glicosídeos, carboidratos, leucoantocianidinas, saponinas, taninos e triterpenoides.

Alguns testes foram realizados em tubos de ensaio ou em placa de toque de porcelana. Outros testes foram realizados após eluição das amostras em placas de CCD com sistemas de solventes específicos. O ANEXO 2 lista as classes de constituintes químicos que foram investigados, bem como os resultados e sistemas de reagentes e reveladores utilizados, conforme Merck (MERCK, 1980) e Wagner e Bladt (2001). A triagem foi sistematizada para rastrear quais são os principais grupos químicos por um exame superficial, mas rápido e muito informativo (WAGNER; BLADT, 2001).

No cultivo do fungo, alguns compostos poderiam ser oriundos de biotransformação do extrato de malte, um substrato de origem vegetal presente no meio de cultura.

4.10 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.10.1 HPLC-MS

Foi utilizado um sistema Agilent 1100 Series LCMSD, que é um espectrometro de massas projetado para oferecer desempenho para ionização a pressão atmosférica em aplicações hífenadas HPLC-MS. O sistema de injeção utilizado foi um HPLC Agilent série 1200, que contava com um desgaseificador a vácuo, uma bomba quaternária, uma placa com auto-amostrador e detector de comprimento de onda único (LWD). Em geral, a concentração total de amostra injetada no sistema foi na ordem de pmol / μL , com uma taxa de fluxo de até 1 mL por minuto. A fonte de ionização utilizada foi ESI (pressão, fluxo e voltagens dependentes de cada experimento). A ionização foi realizada em modo positivo e modo negativo. O analisador funcionou para promover a detecção seletiva de massas através de um quadrupolo simples, de baixa resolução, com um alcance máximo de massa até 1.500 u.m.a., mas a maioria das análises foi setada para uma faixa entre 100 e 500 u.m.a. Para promover a ionização foram testados potenciais de

3000V, 3500V e 4000V. Para fragmentação foram testadas voltagens de 60V, 70V e 100V. O software utilizado na comunicação com equipamento e para análise dos resultados foi o Agilent ChemStation.

4.10.2 IONTRAP

Foi utilizado o sistema Thermo LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer, que entrega rapidamente dados confiáveis de análise espectral. A informação desejada sobre o analito foi fornecida por esta técnica quando analisados a detecção em tandem (MS^n). Esta técnica é muito útil para elucidação estrutural, pois os íons podem ser fragmentados consecutivamente em n número de reações (GLISH, 1994).

Este sistema ofereceu excelente sensibilidade para análise *full-scan* e operação robusta. Segundo o fabricante, o equipamento gera informações desde amostras complexas em aplicações de alto rendimento, como produtos naturais, análise de impurezas e química analítica em geral.

Foram pesados 2 mg de composto purificado. A amostra foi seca em estufa a vácuo VacuCell MMM (Medcenter einrichtungen GmbH MMM-Group) a 60°C por 2 horas. Foi então solubilizada em 1 mL de Diclorometano grau HPLC e seguiu para diluição em Metanol grau HPLC até 1:1000. Apesar de amostra não ser solúvel em metanol visualmente, quantidades mínimas são solúveis e foram suficientes para análise de massas neste equipamento. Os espectros foram adquiridos tanto em modo de ionização positivo como modo negativo, sendo obtidos e processados com auxílio do software Thermo Xcalibur e do software livre MZmine-2.16.

As condições de ionização foram: modo positivo e modo negativo. As voltagens foram otimizadas pelo próprio equipamento via algoritmo próprio de maximização de formação de íons. A energia de colisão foi ajustada conforme o íon selecionado. Os artefatos são 522 e 550 m/z (resíduo do metanol).

4.10.3 qTOF

A molécula de interesse purificada foi avaliada por meio de espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESIMS). O objetivo foi determinar a relação massa/carga considerando a diferenciação entre as contribuições isotópicas e também para fragmentação consecutiva de íons selecionados (multiple-stage mass spectrometry).

O equipamento utilizado para a obtenção do perfil de massas foi um Bruker microQTOF, que estava acoplado a um ionizador ESI alimentado por uma bomba seringa (Hamilton) e a um analisador de massas do tipo tempo de voo (TOF). Os espectros foram obtidos com auxílio do software Compass Bruker Daltonics e processados com o software livre mMass (STROHALM et al., 2008) (STROHALM et al., 2010).

4.11 RMN - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

4.11.1 Aquisição e processamento de dados

Para elucidação estrutural do composto orgânico desconhecido, foram utilizadas 12 tipos de sequências de pulso de Ressonância Magnética Nuclear. Sobretudo, foram realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais com obtenção de dados sobre os núclídeos de ^1H , ^{13}C e suas correlações químicas. Os principais experimentos foram realizados pelo menos três vezes, objetivando a coleta de novos dados, e reconfirmação de outros, para consolidar o conjunto de informações estruturais.

Os experimentos de RMN foram realizados em equipamentos com campos magnéticos referentes à frequência de precessão do Hidrogênio ^1H de 200 MHz (Equipamento Bruker DPX200), 400 MHz (Equipamento Bruker Avance 400) e 600 MHz (Equipamento Bruker AVANCE III-600 NMR spectrometer). Foram preparadas

amostras para RMN de líquidos, em tubos de 5 mm de diâmetro. Os tubos foram lavados previamente com detergente neutro, enxaguados entre seis a oito vezes com água normal, cinco vezes com água destilada e três vezes com acetona. Os tubos foram secos em estufa a vácuo na posição vertical em vácuo (pressão absoluta de 0,1 atm) por duas horas a 37°C, para eliminar resíduos de vapor de acetona e água.

O **preparo de amostra** consistiu em solubilizar a amostra em clorofórmio deuterado (CDCl_3) (CIL Biolabs) com TMS (0,05% ou 1%), volume total entre 400 a 600 μL . Quando necessária, foi realizada sonicação em potência máxima por dez minutos. Considerando a possibilidade de fenômeno de saturação de detector, a quantidade de amostra foi de 9,3 mg e de 17 mg; para alguns experimento de RMN de ^1H e experimentos bidimensionais. Para maioria dos experimentos que não apresentassem essa limitação, a quantidade de 25 mg foi utilizada, pois acima desta concentração havia cristalização da molécula e ocorrência de fenômenos de anisotropia.

Mesmo que a aquisição funcionasse no modo automático, houve a necessidade de que os parâmetros de cada aquisição fossem setados apropriadamente de acordo com cada tipo de experimento, de acordo com Butler (2002). Além disto, para análise dos dados, foi necessário aplicar processamento sobre os dados adquiridos. As etapas entre início da aquisição e análise dos dados está ilustrada na FIGURA 35.

A **aquisição** consistiu na criação de um novo experimento, considerando as frequências ajustadas para cada núcleo em observação. Na sequência foi aplicado ajuste de *lock* do campo magnético, de acordo com a frequência de precessão do nuclídeo de deutério presente no solvente selecionado. Os ajustes de *lock* controlaram parâmetros que estabilizam a homogeneidade do campo magnético ao longo do tempo.

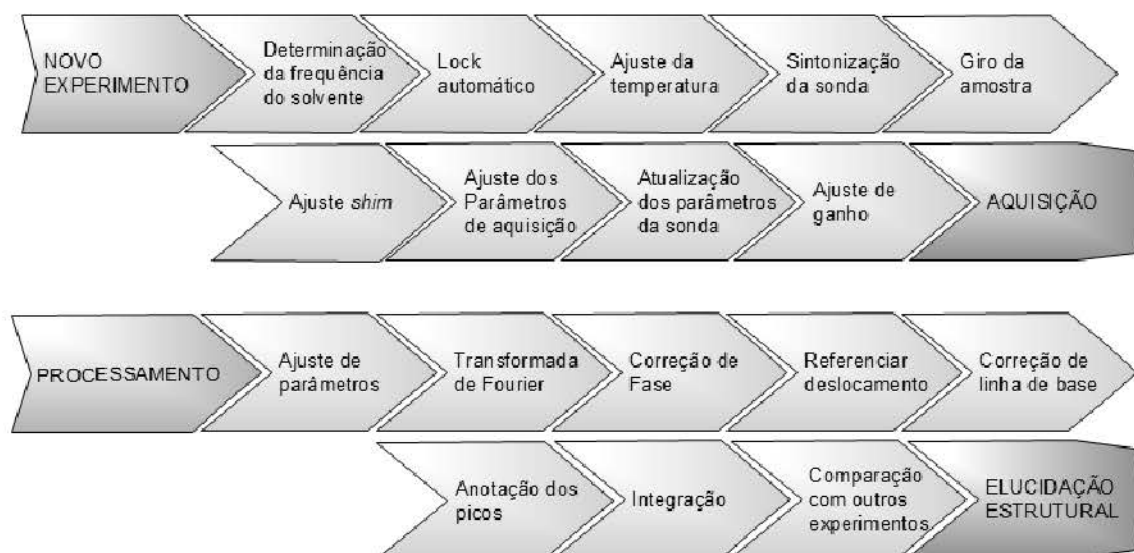


FIGURA 35 - FLUXOGRAMA DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO

Os tubos de amostra foram colocados em rotação de 20 giros por segundo nos equipamentos de 200 MHz e 400 MHz e sem giro em algumas análises bidimensionais e no equipamento de 600 MHz. A temperatura em que a análise foi realizada foi ajustada via software para 300 Kelvin, somente para alguns tipos de sonda capazes de realizar tal função. Quando cabível, foram consideradas calibrações de frequências dos canais de radiofrequência, principalmente em experimentos bidimensionais.

Na sequência, foram aplicados ajustes de *shim* para controlar a homogeneidade do campo em relação à posição espacial do tubo. O *shim* foi realizado nos eixos Z, Z2, Z3, Z4 e combinações e, algumas vezes, também para combinações de eixos X e Y, sugerido por Jacobsen, p.82 (2007). Cada experimento teve um grupo de valores setados, mas com objetivo primordial era que houvesse a menor dispersão de probabilidades em relação ao deslocamento químico de cada sinal. Quanto mais homogêneo fosse o campo, maior era o tempo de relaxação do decaimento livre de indução e menor o alargamento, ou seja, maior a resolução. O perfil do sinal do TMS foi utilizado como parâmetro de qualidade em todo início de análise. Somente análises que possuíssem a largura do sinal à meia altura menor que 1Hz eram considerados bons, e quando menor igual que 0,6 Hz muito bons. Além disto, foi considerada a presença dos sinais satélite, de correlação interna do TMS de $J=6,66$ Hz, pois evidenciavam o bom ajuste de campo em relação a Z2 (JACOBSEN, 2007).

Antes do início de cada aquisição foram ajustados os parâmetros de sonda em relação aos valores calibrados para cada sequência de pulso utilizada. O ganho do detector foi ajustado de acordo com a concentração da amostra. Experimentos que exigiam comparação precisa de dados entre si foram realizados no mesmo dia, pois os valores de ajustes ficavam próximos. Após o estabelecimento de valores de frequências de núcleos, *lock power*, *lock gain* e *shim*, os demais ajustes se fizeram automáticos pelo equipamento ao longo da análise, inclusive para manutenção de homogeneidade.

Ao ser feito o **processamento**, foram realizadas modificações sobre os parâmetros do decaimento livre de indução (FID). Isto influenciou largura e a forma de linha após a realização da transformada de Fourier em experimentos unidimensionais e após duas transformadas de Fourier independentes em experimentos bidimensionais. Em ambos casos, foram modificados os parâmetros ***lb***, ***gb*** e ***sinm***. O conceito aplicado para experimentos bidimensionais variava em função do número de pontos obtidos em cada dimensão. Algumas vezes o tipo de processamento era incompatível com o tipo de experimento.

A modificação mais comum realizada sobre o FID foi a redução de ruído através da multiplicação exponencial. Como resultado, a aplicação da função exponencial sobre a janela espectral, algumas linhas foram alargadas, mantendo-se a forma de linha dos sinais como uma distribuição de Lorentz. Assim, pelo fator de multiplicação exponencial, fez-se a escolha entre melhor resolução ou melhor relação sinal-ruído (S/N). Quando aplicada, a multiplicação com função gaussiana alterou a forma das linhas de modo que tornou-se uma mistura das distribuições de Lorentz e de Gauss. A forma de linha gaussiana é mais estreita do que a de Lorentz, especialmente perto da linha de base. Como resultado da multiplicação gaussiana, a resolução do espectro foi melhorada, diminuindo a relação S/N (TIAINEN, 2013).

Após a transformada de Fourier, todos os experimentos foram **referenciados** em zero em relação ao sinal do TMS. Quando necessário, como por exemplo alguns experimentos DEPT e experimentos com sinal do TMS fora da janela espectral, os experimentos foram referenciados empregando algum sinal apropriado: da amostra ou do solvente.

Em casos necessários e compatíveis ao experimento, foram aplicadas correções de linha de base, correção de fase de primeira, correção de fase de

segunda ordem, correção de fase por linhas e colunas, tilt (J-resolved), simetrização simples e simetrização fase sensível. Os processos de aquisição, processamento, observação, anotação e análise dos sinais foi feita através do aplicativo do equipamento (Bruker TopSpin 3.1). Os sinais foram observados um a um através de expansões, um a um, e / ou com alinhamentos a um sinal correlato para comparação.

4.11.2 RMN - Métodos unidimensionais

A. RMN de ^1H Hidrogênio

O experimento de RMN de ^1H foi utilizado pois é uma técnica que tem grande sensibilidade para o nuclídeo e fornece a maior parte dos dados para elucidação estrutural de um produto natural. O isótopo ^1H possui spin $\frac{1}{2}$ com abundância de 99,9999% e constante giromagnética γ $2,67513 \times 10^8 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$.

B. RMN de ^{13}C Carbono

O experimento de RMN de ^{13}C foi utilizado porque a informação estrutural por ele fornecida foi muito relevante e não foi possível obtenção clara e completa de dados a partir de experimentos bidimensionais. O isótopo ^{13}C possui abundância de 1,11%, spin $\frac{1}{2}$ com e constante giromagnética γ $6,7262 \times 10^7 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$. Devido à menor abundância do carbono magneticamente ativo, fenômenos de Efeito Nuclear Overhauser (NOE) e transferência de polarização são aproveitados para aumentar a intensidade de sinal ^{13}C .

Para facilitar a interpretação, a aquisição do espectro foi realizada com desacoplamento de nuclídeos de Hidrogênio. Caso contrário, hidrogênios ligados a carbono desdobrariam o sinal deste.

C. DEPT

As variações dos experimentos DEPT (Distortionless enhancement by polarization transfer) são derivadas do modelo INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer). Experimentos DEPT significam intensificação sem distorção por transferência de polarização. Foram aplicados como RMN de ^{13}C utilizando transferência de polarização para aumentar a intensidade de sinal.

O objetivo da utilização destes experimentos foi a observação dos núclídeos de carbono ^{13}C com aumento de sensibilidade, pois nestes experimentos há a detecção das informações sobre o carbono através da transferência de polarização e detecção a partir dos núclídeos de hidrogênio a que estão acoplados através do *spin*. Além disto, as sequências DEPT conseguem multiplicar a sensibilidade através do efeitos NOE.

Como resultado foram obtidos espectros do núclídeo ^{13}C acoplados ao hidrogênio, no qual foi possível observar com maior intensidade o sinal de carbonos ligados a hidrogênio. Além disto, foram realizadas variações de sequência de pulso do tipo DEPT, pois cada experimento possui um perfil de sinais e intensidades que serve para determinar a multiplicidade dos carbonos entre CH , CH_2 ou CH_3 . Carbonos não ligados a hidrogênio não são detectados pelas sequências DEPT. Foram utilizadas as variações de experimento DEPT constantes na TABELA 10, que também informa qual foi o sentido convencionado dos sinais para cada multiplicidade, de acordo com cada sequência de pulso.

TABELA 10 – EXPERIMENTOS RMN DE ^{13}C UTILIZANDO TRANSFERÊNCIA DE POLARIZAÇÃO E SENTIDO CONVENCIONADO DOS SINAIS

Sequência de pulso	CH_3	CH_2	CH	Cq
^{13}C DEPT 135	Positivo	Negativo	Positivo	Nulo
^{13}C DEPT 45	Positivo	Positivo	Positivo	Nulo
^{13}C DEPT 90	Nulo	Nulo	Positivo	Nulo

4.11.3 Experimentos de RMN 2D - Métodos Homonucleares

A. COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)

COSY (Correlation SpectroscopY) é um experimento bidimensional de RMN que considera correlação homonuclear através das ligações químicas. Picos de correlação aparecem se a intensidade de acoplamento entre spins é perceptível. Uma das frequências de sinal do mapa de correlação bidimensional é obtida normalmente por RMN de ^1H , enquanto a outra é gerada pela segunda dimensão, que considera a variação de intensidades de sinais da primeira.

A sequência utilizada foi COSY90. Este experimento foi utilizado com objetivo de identificar no espectro quais eram os sinais de ^1H associados entre si através de acoplamento de spins. Mostrou-se necessário, pois não foi possível deduzir os parceiros de acoplamento a partir da medição das constantes de acoplamento no experimento RMN de ^1H . Além disto, foi muito mais vantajoso que a técnica unidimensional de desacoplamento seletivo homonuclear, visto que havia sinais sobrepostos que seriam irradiados com efeito deletério sobre suas análises.

Os dados no domínio do tempo foram normalmente processados com uma função de ponderação tipo sine (ou similar) para aumentar a resolução perdida pela torção de fase e para dar respostas positivas e intensas, tanto na diagonal como nas correlações existentes fora da diagonal. Comumente executa-se este tipo experimento no modo padrão.

B. COSY-DQF sensível à fase ($^1\text{H} - ^1\text{H}$)

Existem várias versões do experimento COSY, como a versão sensível à fase. A sequência utilizada foi COSY Phase-Sensitive, referente ao experimento 10.5 do manual do equipamento. A diferença em relação ao modo padrão está ilustrada na FIGURA 36. Pela escolha deste experimento, foi possível observar o

acoplamento de spins e medir constantes de acoplamento, considerando a padronagem característica dos sinais.

Os padrões surgiram apenas após processamento e ajuste de fase corretos. A correção de fase foi realizada levando em consideração primeira e segunda ordem de correção em pelo menos 4 pontos distintos de ajuste, com correção feita por linhas e colunas. A simetrização foi feita por meio do comando `syma`, no qual foi selecionado o algoritmo apropriado para comparação de valores sensíveis à fase.

A interpretação da padronagem de picos positivos e negativos, levou em conta como se distribuem para favorecer a interpretação dos acoplamentos. Esta versão oferece pico de correlação fora da diagonal que podem ter a fase ajustada, de um modo transversal em fase ou antifase.

A desvantagem deste método é que as respostas são diagonais de 90 graus fora de fase e podem obscurecer respostas fora da diagonal, mas próximas a ela (FACEY, 2008).

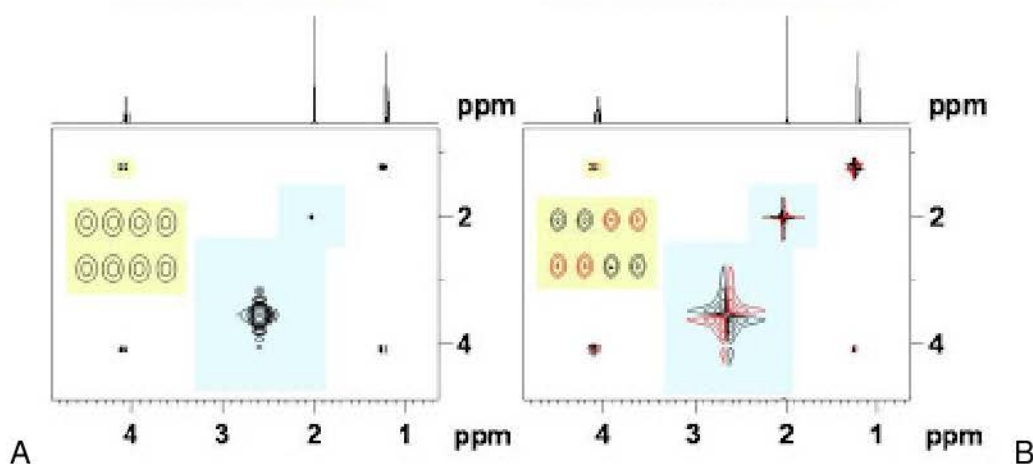


FIGURA 36 – PADRÃO DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR SENSÍVEL A FASE: COMPARAÇÃO ENTRE COSY E COSY FASE SENSITIVO DE ACETATO DE ETILA
 FONTE: (FACEY, 2008)

C. TOCSY

O experimento de correlação homonuclear total TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) é um método que pode proporcionar dados de correlação entre todos os hidrogênios de uma cadeia química entre si, dependendo da interação entre os

orbitais moleculares. Esta variante é sensível à fase.

Foram avaliados diferentes tempos de mistura com objetivo de diferenciar os grupos de spin de acordo com o grau de transferência de magnetização ocorrida durante o fenômeno. Para tanto, os valores de aquisição e processamento foram igualmente aplicados nos diferentes experimentos. Correção de fase também tomou como referencial picos idênticos de correlação química, fora da diagonal, que estivessem claramente distantes de sobreposições ou artefatos de aquisição.

O tempo de mistura caracteriza o tempo em que há a transferência de magnetização entre núclídeos e, portanto, quanto menor a distância entre núcleos ou maior a força de interação entre eles, mais facilmente observada e intensa é a correlação bidimensional. Este tempo é logicamente programável no equipamento e encontra-se na faixa de milissegundos.

Os tempos testados foram: 32 ms, 48 ms, 60 ms, 100 ms e 120 ms.

Centros com carbonos quaternários ou contendo heteroátomos inibem a transferência de magnetização durante o tempo de mistura e por este motivo bloqueiam o aparecimento de correlação.

O nome atribuído aos núclídeos que interagem entre si recebem a denominação de grupos de spins.

D. NOESY (Correlação através do espaço)

O experimento 2D NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) é um método bidimensional que explora o fenômeno NOE (Nuclear Overhauser enhancement). Ele foi utilizado para determinar a estereoquímica relativa da molécula através de interações ao longo do espaço.

Este experimento foi obtido em modo 2D de absorção. Foi útil para identificação de *spins* que sofrem relaxação cruzada (*cross-relaxation*). Ocasionalmente, artefatos do tipo COSY apareceram no espectro. Entretanto, eles foram facilmente identificados pela estrutura do multipletto anti-fase.

4.11.4 Experimentos de RMN 2D - Métodos Heteronucleares

A. HMQC

Ressonância correlação heteronuclear carbono hidrogênio a uma ligação. A base do método HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) é a forma mais simples de correlação por uma técnica inversa H,X. A supressão dos sinais indesejados é realizada apenas pelo ciclagem de fase. Este experimento não aplicou desacoplamento.

B. HSQC

O experimento HSQC ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy) foi realizado para obtenção da correlação química entre C e H através da evolução do deslocamento químico de ^{13}C via coerência quântica única. Foram observadas correlações que indicassem ligação direta entre núcleos de ^{13}C e ^1H . Este experimento não tem desacoplamento e os sinais não são alargados por acoplamentos entre hidrogênios.

C. HETCOR

O experimento HETCOR (C,H Correlation by Polarization Transfer) é um experimento de ressonância de correlação heteronuclear que pode ser programado para observação de núcleos a uma ou mais ligações de distância. Os dados deste método bidimensional resultam da correlação C,H por transferência de polarização.

No experimento de **correlação direta** heteronuclear, os sinais de correlação são obtidos para todos os núcleos de hidrogênio que estejam conectados a uma ligação ($^1J_{\text{C,H}}$) a um carbono isótopo ^{13}C . Como a obtenção do sinal eletromagnético nesta sequência de pulso é realizada pelo canal do carbono, foi utilizada uma sonda

qnp de detecção direta (não-broadband). A sequência utilizada foi *hxco* (Experimento 10.10).

No experimento de **correlação a longa distância** heteronuclear, foi possível observar sinais de correlação entre C,H conectados por acoplamentos de duas $^2J_{(C,H)}$ ou três $^3J_{(C,H)}$ ligações. Isto foi logrado pela mesma sequência de pulso usado no experimento de correlação direta, porém, foram ajustados tempos de atraso apropriados para estas conectividades. A sequência utilizada foi *hxco* (Experimento 10.11, derivado do experimento 10.8) referente ao experimento *HETCOR Long-Range - C,H Correlation by Polarization Transfer*.

D. HMBC

A principal vantagem da utilização do experimento de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) foi observar a conectividade (1H - ^{13}C) através da cadeia de carbonos com e sem hidrogênios ligados. Além disto é uma técnica de detecção pelo núcleo de hidrogênio.

E. COLOC

O experimento de correlação C,H via acoplamentos a longa distância (COLOC - Correlation spectroscopy via Long range Couplings) é um método bidimensional que detecta picos de correlação entre núcleos de hidrogênio 1H e ^{13}C , que sejam conectados por duas ou três ligações. Esta sequência de pulso é uma variante do experimento XHCORR (espectroscopia de correlação X, H), que detecta apenas hidrogênios diretamente ligados ao carbono ^{13}C . A diferença entre os dois experimentos está no uso dos acoplamentos heteronucleares para a transferência de polarização. Enquanto XHCORR faz uso de ligações com constantes de acoplamento $J_{(CH)}$ grandes, COLOC se utiliza de constantes de acoplamento

heteronucleares $J_{(CH)}$ pequenas, a longa distância (${}^nJ_{CH}$, $n > 1$).

Desta forma, o uso deste experimento permitiu detectar quais eram as correlações ${}^2J_{(CH)}$ para definir a vizinhança próxima no esqueleto carbônico. Este experimento foi utilizado pois havia a hipótese da presença de muitos carbonos quaternários longe de hidrogênios, que apesar de presentes no experimento HMBC, não apresentavam variação de intensidade ou havia sobreposição de sinais.

Logo, a exclusão de valores ${}^2J_{(CH)}$ da lista de correlações HMBC permitiu definir com mais certeza quais seriam as correlações ${}^3J_{(CH)}$ e ${}^4J_{(CH)}$ por comparação, inclusive por informações do próprio experimento.

Através do ajuste do parâmetro CNST2, foram testadas as constantes de acoplamento a longa distância de 10Hz, 15Hz e 33Hz e, para comparação, a constante de 145 Hz. Constantes de acoplamento a longa distância J_{CH} normalmente são pequenas (entre 5 a 20 Hz). Foram analisados 25 mg de amostra para evitar a perda de sensibilidade devido à relaxação transversal inerente do tempo de análise.

4.11.5 Simulação de RMN

Vários softwares foram utilizados para simulação e predição de valores de deslocamento químico de RMN para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos pelos experimentos unidimensionais e bidimensionais. Várias propostas estruturais foram esquematizadas pelo usuário no ambiente do software, complementando o processo de interpretação dos espectros e geração de estruturas. Para isto, foram utilizadas versões DEMO dos softwares ACD ChemsSketch (www.acdlabs.com), ChemDraw (www.cambridgesoft.com), Mnova (mestrelab.com), Mestrelab (www.mestrec.com) e ChemDoodle (www.chemdoodle.com), NMRshiftDB (STEINBECK; KUHN, 2004) e NMRdb (AIRES-DE-SOUSA; HEMMER; GASTEIGER, 2002). Alguns softwares, citados na Revisão de Literatura, conseguiram inclusive estimar os valores de constante de acoplamento.

Para sistemas simples, os cálculos para a estimativa de deslocamentos químicos, de diversos fragmentos parcialmente elucidados, foram utilizados

utilizando-se dados compilados em (BREITMAIER et al., 1987; CREWS et al., 2010), que levam em consideração contribuições parciais de cada um dos substituintes.

Para busca de banco de dados foram utilizadas as versões gratuitas de Internet online (NMRdb) (BANFI; PATINY, 2008) e Internet online (COSY simulation) (CASTILLO; PATINY; WIST, 2011) e versão acadêmica de Marvin sketch (CHEMAXON, 2015).

Também foram utilizados softwares para geração e simulação de multipletos com objetivo de comparação com o espectro real unidimensional. Para este intuito, foram utilizados valores de constante de acoplamento reais, medidos, como parâmetro de entrada. Foram utilizados aplicativos para visualizar os efeitos de acoplamento de primeira ordem (FOMSC3) (CONSTANTINO, 2004) e segunda ordem (software WinDNMR) (REICH, 1995).

4.12 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

A obtenção dos espectros de varredura das amostras foram realizadas em cubeta de quartzo de 1mL em metanol grau HPLC, em duas diluições num equipamento Shimadzu 2401PC Spectrophotometer. Também foram analisadas duas diluições em DMSO grau analítico : água destilada (90:10) num equipamento NanoVue Plus GE 7000 series com aplicação de 2 μ L, considerando presença e ausência de 0,05% hidróxido de sódio na fase aquosa. As medidas espectroscópicas foram realizadas à temperatura ambiente, considerando faixa de leitura de absorvância com intervalos de 2 nm operando entre 200-400 nm. Algumas análises foram também realizadas na faixa do visível entre 400-800 nm.

4.13 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

O espectro foi obtido com a amostra na forma sólida, utilizando brometo de potássio (KBr), grau IR, como carreador da amostra. O KBr foi inicialmente seco em

estufa a 105°C por 24 horas. Algumas placas de sal são altamente solúveis em água, de modo que os reagentes e as amostras aplicadas foram deixados anidros. A amostra foi preparada considerando 12 mg de cristal. Em estufa a vácuo (0,1 atm), o material cristalizado foi seco durante 12 horas, na temperatura de 60°C. Aproximadamente 3 mg de amostra foram macerados juntos ao KBr, com graal e pistilo especiais, isentos de qualquer resíduo químico.

O espectro de infravermelho foi registrado em equipamento BIORAD Excalibur series FTS 3500 GX. A atmosfera ambiente estava a 20°C com umidade relativa entre 30 e 35%. Foram adquiridos 32 scans, na faixa entre 4000-400 cm^{-1} , sendo a resolução programada de 4 cm^{-1} . Foi subtraído um branco, referente a pastilha de KBr e do ar atmosférico, considerando o gás carbônico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

O melhor resultado da extração de DNA do fungo foi obtido a partir do micélio recém cultivado. O melhor tempo de extração com os *beads* foi de 1 min de agitação em vortex. A melhor diluição para amplificação foi de 1:20 quando a massa úmida para extração era aproximadamente 100 mg de micélio. As bandas foram amplificadas com especificidade em relação à temperatura de anelamento, entre 46°C e 48°C. Os fragmentos amplificados encontravam-se entre 640 – 660 pares de base.

As seqüências obtidas com a análise da região ITS foram editadas e alinhadas com CAP Contig Assembly Program (HUANG, 1992), acessado a partir do software Bioedit, versão 7.1.11.

De acordo com a comparação obtida pela análise online no banco de dados do NCBI por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), o alinhamento buscou seqüências depositadas, entre as quais fungos do gênero *Phaeosphaeria*, resultaram em 99% de similaridade com o sequenciamento da região ITS do fungo desconhecido. Para ilustrar as relações filogenéticas, um dendrograma (FIGURA 37) foi criado com o algoritmo *neighbor joining*, por meio do programa NCBI BLAST pairwise alignments / BLAST Tree View, utilizando-se algumas das sequencias já depositadas no servidor (BLAST, 2015). Fungos não cultiváveis (gb|GU078632.1) e fungos de coleção (APA2013) também obtiveram grande similaridade (98-99%). Como outgroup, foi selecionada uma sequencia ITS proveniente de *Septoriella phragmitis*, que apresentou 92% de similaridade com a sequencia testada.

Oportunamente, a seqüência *contig* (detalhada no Anexo 8) será depositada no Genbank para obtenção do voucher da seqüência. Será referente ao fungo desconhecido (Unkown lcl|query_226269), destacado em amarelo no dendrograma, o qual neste momento foi identificado como *Phaeosphaeria sp.*

Este gênero pertence aos Pleosporales, maior ordem de fungos Dothideomycetes, que é a maior e mais diversa classe de ascomicetos. Esta classe compreende 11 ordens, 90 famílias, 1.300 gêneros e mais de 19.000 espécies conhecidas (SCHOCH et al., 2009).

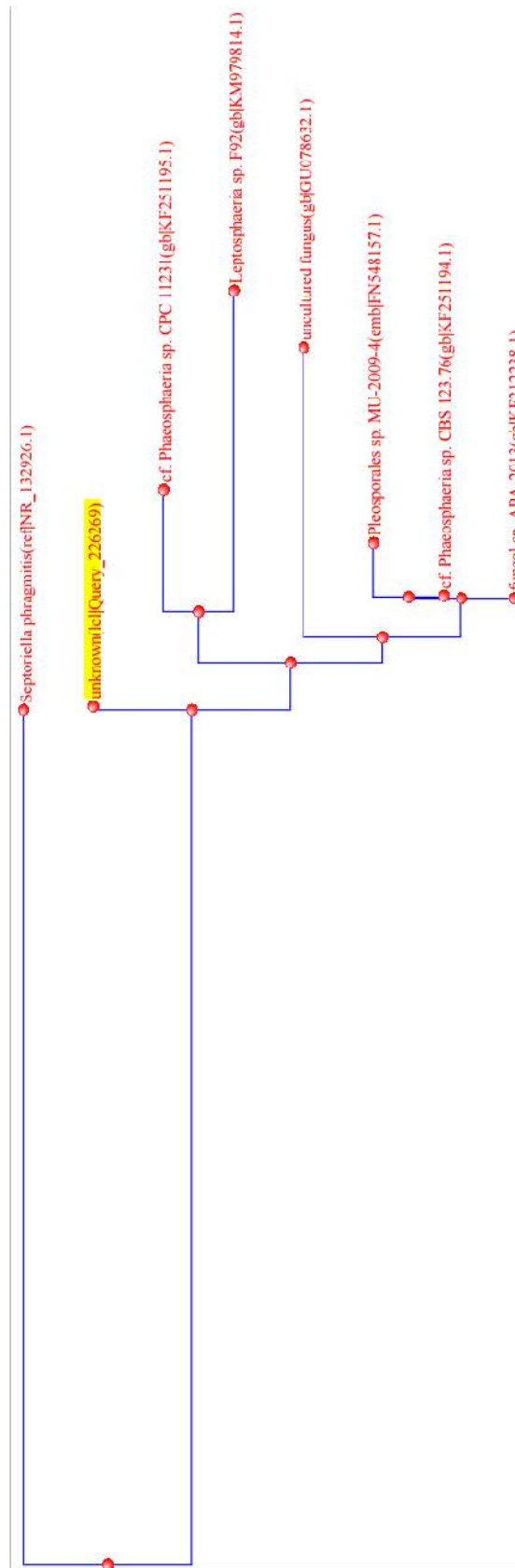


FIGURA 37 - DENDROGRAMA GERADO COM O ALGORITMO NEIGHBOR JOINING COM BASE NAS SEQUENCIAS ITS DE ISOLADOS DO GÊNERO *Phaeosphaeria*, POR MEIO DO PROGRAMA NCBI BLAST TREE VIEW.
 NOTA: *Septoriella phragmitis* FOI UTILIZADO COMO OUTGROUP

5.2 CULTIVO DO MICRORGANISMO

Os resultados de crescimento do microrganismo em diversos meios está descrito na TABELA 11, relacionando diversas condições de nutrição. A condição que possibilitou a formação de esporos está ilustrada na FIGURA 38 e a formação de pycnidia na FIGURA 39.

TABELA 11 - OBSERVAÇÕES DE CRESCIMENTO DO FUNGO

Condição	Resultado
Meio PDA (Potato Dextrose Agar) T _{amb}	Crescimento lento, mas com viabilidade maior que um mês (sem perda de umidade)
Meio PDA guardado em geladeira	Micélio, após crescimento em estufa, perde a oxigenação e viabilidade na geladeira
Meio PDA (Potato Dextrose Agar) a 28°C (fotoperíodo)	Crescimento exponencial até o 9º dia, mudança de cor somente no 5º dia
Meio PDA (Potato Dextrose Agar) a 28°C (sem luz)	Crescimento exponencial até o 9º dia, mas não há mudança de cor (preferência branco)
Meio PDA (Potato Dextrose Agar) a 37°C	Incapaz de crescer nesta temperatura, mas mantém-se vivo
Meio PDA acidificado com ácido tartárico	Crescimento
Meio PDA com explante de gramínea	Único meio que foi possível observar formação de pycnidia para formação de esporos
Milho	Bom meio para crescimento e estoque, mas apresenta grandes chances de contaminação
Agar Sabouraud	Crescimento diferente do micélio, mais centrado em um ponto e com formação de exsudado
Tryptic Soy Agar (TSA)	Crescimento de micélio branco com aspecto brilhante
Agar V8	Cresce com micélio espaçado e pobre
Agar Nutriente	Cresce com micélio espaçado e pobre
Meio Mínimo	Cresce com micélio espaçado e pobre
Agar infuso cérebro coração	Consegue adaptação e sobrevive, mas não cresce
Trigo com sulfato de cálcio 1% ou carbonato de cálcio 10%	Crescimento rápido, mas necessita controle constante de umidade, impossível separar biomassa. Formação de produto (rendimento menor)
SSF	
Meio FAN em shaker	Perfil de produtos extraídos idêntico ao biorreator, exceto por 3 componentes. Rendimento menor.
Meio FAN em cultivo estático	Não há produção de molécula ativa, apesar de a formação de biomassa ser ótima
Meio FAN em cultivo estático (sob luz do Sol)	Há produção de molécula ativa, mas em conjunto com muitos outros metabólitos após período de pelo menos 45 dias
Meio FAN com complexo de vitamina B	Excelente para reativação de inóculo para o processo líquido em Biorreator
Meio FAN com cobalto (0,01%)	Crescimento é inibido, mas mantém-se vivo por mais de 6 meses
Variação de concentração de glicose	Concentrações maiores que 35 g/L de glicose inibe a velocidade de crescimento. Necessidade de cultivo alimentado. Verifica-se influência sobre a fragmentação do micélio e formação de pellets em cultivo agitado. Concentração ideal promove pellets menores e evita formação de aglomerados. Concentração ideal 0,15 g/L
Variação de concentração de cloreto de cálcio	
Variação de concentrações de fosfato de potássio	Preferência por Fosfato de Potássio Bibásico na concentração de 0,75 g/L (crescimento inferior com sal monobásico)



FIGURA 38 - CULTIVO *IN VITRO* COM EXPLANTE DE GRAMÍNEA DEMONSTRANDO FORMAÇÃO DE PYCNIDIA (ESTRUTURA ESPECIALIZADA)

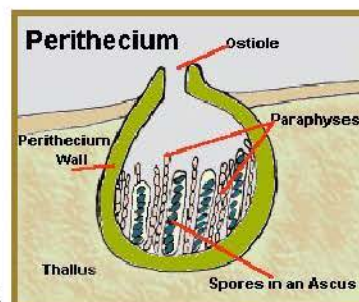
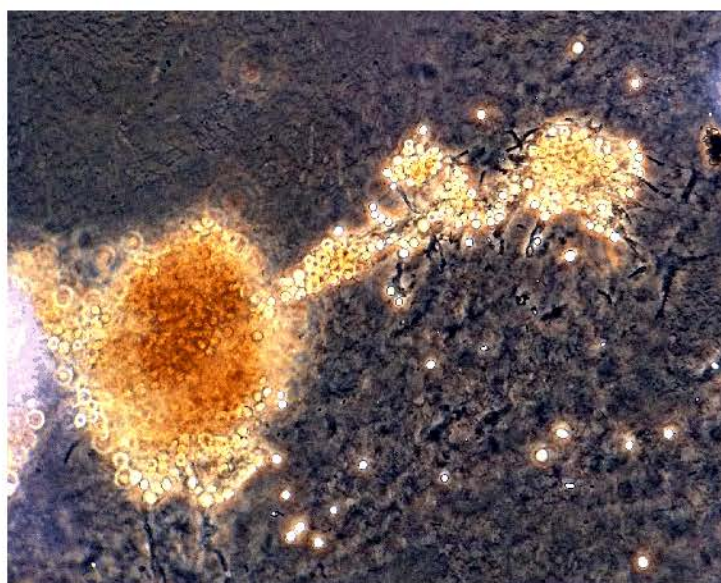


FIGURA 39 – OBSERVAÇÃO DE (A) PYCNIDIUM EM MICROSCÓPIO ÓPTICO 400X EM CONTRASTE DE FASE, DEMONSTRANDO OSTÍOLO E LIBERAÇÃO DE ESPOROS, DE ACORDO COM (B) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA FONTE: (A) O AUTOR (2015) (B) (EARTHLIFE, 2015)

O gênero *Leptosphaeria* é muito próximo filogeneticamente a *Phaeosphaeria* (CAMARA et al., 2002). A classificação antiga de gêneros, tal como *Phoma*, também muito próxima ao gênero *Phaeosphaeria*, está sendo revista (DEGRUYTER et al., 2009). Estudos recentes de revisão consideraram reposicionamentos filogenéticos de várias espécies (ZHANG et al., 2009, 2012).

Fungos do gênero *Phoma* sp. são produtores de estruturas da classe das bistropolonas (HARRIS et al., 1993). Gênero do fungo e classe de composto produzido estão de acordo com o composto ativo (OVERY et al., 2014). O gênero *Phaeosphaeria* sp., portanto, produz compostos da rara classe de composto ativo (bistropolonas policíclicas).

Fungos são microrganismos heterotróficos e na maioria aeróbios obrigatórios. Cerca de dois terços das espécies conhecidas de fungos estabelecem íntimas relações com outros organismos vivos, em relações parasíticas, comensalísticas ou mutualistas, segundo Barbieri e Carvalho (2001). Mesmo que diverso e com inesgotáveis funções, o repertório de metabólitos secundários provenientes de fungos podem ser classificados de acordo com a classe enzimática envolvida em suas biossínteses (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). Segundo Fox e Howlett (2008), as principais classes de metabólitos secundários de fungos incluem policetídeos, peptídeos não ribossomais (por exemplo, sirodesmin, peramine e siderophores como a ferricrocin), terpenos (por exemplo, T-2 toxin, deoxyvalenol), indol terpenos (por exemplo, paxilline e lolitrems).

Policetídeos são a classe mais abundante, a qual inclui desde compostos como lovastatina (comercialmente conhecida), aflatoxina (carcinogênico) e fumonisinas. A natureza modular dos genes de síntese (genes PKS) resulta em imensa diversidade de estruturas químicas de policetídeos (CUMMINGS; BREITLING; TAKANO, 2014). A síntese de novas moléculas é o resultado da pressão evolutiva contínua, facilitada pela organização dos genes (SCHMITT; LUMBSCH, 2009). A diversidade evolutiva é introduzida através de mutações simples e freqüente co-transferência horizontal entre clusters de genes de policetídeos (DONADIO et al., 2005).

A regulação do metabolismo secundário em fungos é complexa e envolve várias proteínas e complexos que respondem a vários estímulos ambientais de cultivo. Além disto, genes para a biosíntese de metabólitos secundários são geralmente agrupados em *cluster* (KELLER; HOHN, 1997) (BROMANN et al., 2012); assim a identificação deles é relativamente simples a partir de sequências de genoma completas. A regulação do metabolismo secundário em fungos está revisado por Yu e Keller (2005), Shwab e Keller (2008) e Fox e Howlett (2008).

A via do chiquimato é encontrada em plantas, bactérias, fungos e parasitos do filo Apicomplexa (que inclui *Leishmania* sp.) (HE, 2015). Esta via é fundamental para a biossíntese de compostos aromáticos carbocíclicos (HAWKINS et al., 1993).

5.3 CULTIVO EM BIORREATOR

O cultivo em biorreator resultou em rendimento máximo de biomassa de 12 g L^{-1} em 120 h de bioprocesso, com esgotamento total da fonte de carbono. A cinética de produção de biomassa e as variações dos parâmetros de fermentação estão ilustradas na FIGURA 40. A manutenção do meio de cultivo pós fermentação, contendo fração ativa foi realizada eficientemente por congelamento ou pela adição de etanol e ácido clorídrico até pH 1.

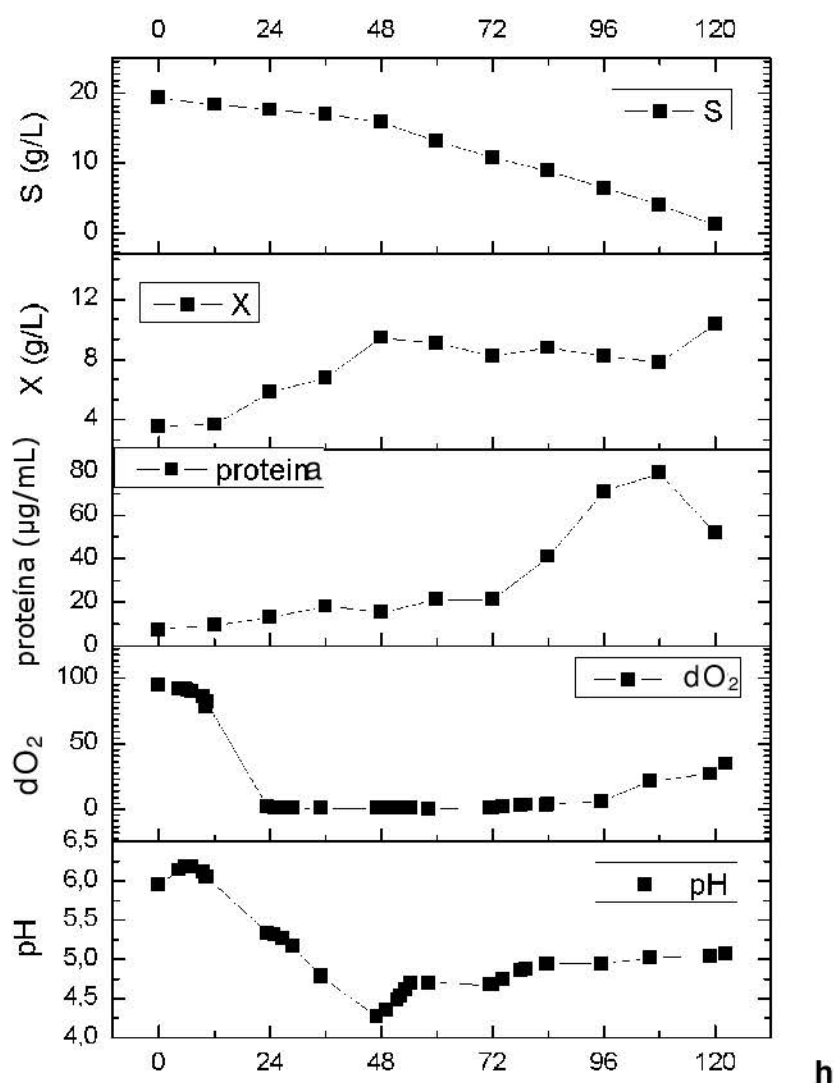


FIGURA 40 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO FÚNGICO EM BIORREATOR

5.4 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO

O melhor resultado de extração e atividade foi com a extração com o solvente diclorometano. Entre as formas de obtenção de um extrato, foi eficiente a extração a temperatura ambiente. Filtração por membranas do tipo tecido se mostraram eficientes para separação de biomassa. A obtenção do composto ativo a partir do caldo de fermentação concentrado por rotaevaporação seguida de liofilização foi factível, mas com rendimento 37% menor que o obtido com a extração a partir da biomassa.

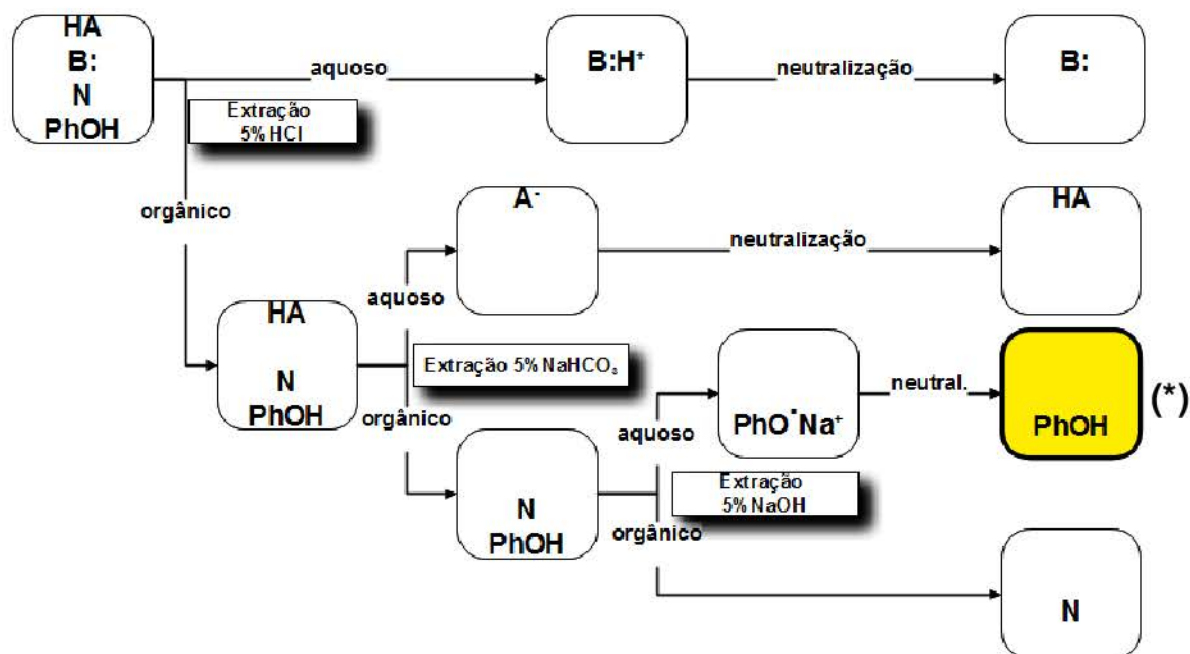
Foi possível extrair a molécula ativa com solventes orgânicos a partir de

material sólido. As duas fontes que resultaram em extração foram a extração a partir de biomassa (XdcM) e a partir de Caldo de fermentação (SdcM). A extração a partir de biomassa teve rendimento de 8,4 g extrato DCM / 100 g biomassa. A extração a partir do caldo de fermentação teve rendimento de 5,3 g extrato DCM / 100 g seco de caldo liofilizado. As tentativas de extração com outros solventes orgânicos a partir do extrato resultaram em extrato acetato de etila, etanólico e aquoso.

Foi necessário produzir grande quantidade de biomassa e caldo de fermentação para que fosse possível obter uma boa quantidade de extrato para as etapas de purificação, pois não se tinha noção inicial da concentração do composto ativo no extrato. Sem conhecimento da espécie do fungo, ou a qual classe estrutural a molécula pertencia, também não se sabia quais eram as condições ideais de purificação e fracionamento. Portanto, foram realizados testes de separação e purificação de acordo com as condições encontradas. A verificação de atividade foi realizada ao longo das etapas de fracionamento e purificação por um screening bioguiado, considerando as cepas referência de *Leishmania* sp. (confirmadas por técnicas de Biologia Molecular) responsáveis pelas principais manifestações clínicas de leishmanioses.

Seguindo a idéia de que o composto pudesse ser particionado por extração líquido-líquido consecutiva, parte do material do caldo foi submetido à extração com adição de ácido e base. Este procedimento foi independente do procedimento que originou a fração caracterizada, pois ainda não havia sido estudadas interferências de degradação sobre a amostra pelas condições ácido e base, que poderiam induzir degradação. Entretanto, por comparação analítica via CCD, foi possível constatar a presença da molécula ativa na fração aquosa da extração com hidróxido de sódio (após recuperação das fases orgânicas das extrações com ácido clorídrico e bicarbonato de sódio). Esta fração é referente a moléculas com propriedades de fenóis (FIGURA 41). O processo foi reprodutível quando testado diretamente com um alíquota do composto puro.

Em bioprocessos é enorme a diversidade de matérias-primas que podem ser aproveitadas, sobretudo quando se trata da nutrição de fungos. Apesar disto, a proposta do atual trabalho foi trabalhar apenas com matérias-primas do meio de composição básico (glucose), para não complicar o isolamento e purificação do composto ativo.



(*) ≡ PRESENÇA ANALÍTICA DO COMPOSTO ATIVO

FIGURA 41 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

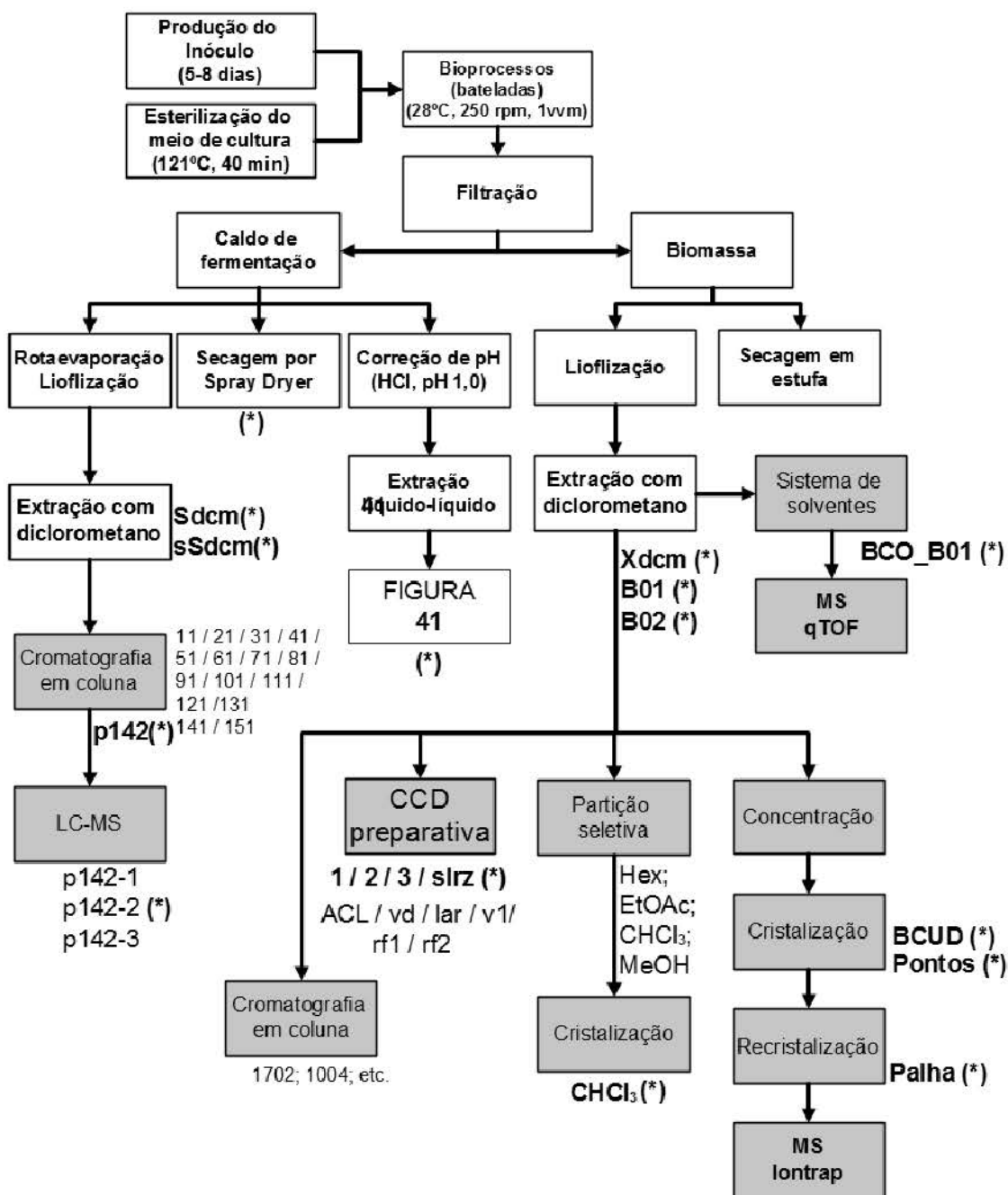
5.4.1 Sistema de solventes

O teste de adição de misturas de solventes em alíquotas do extrato orgânico bruto (seco, após evaporação de solvente e liofilização) demonstrou alguns perfis de solubilidade. Esta etapa foi de fundamental importância para entender os processos de cromatografia e de cristalização. O objetivo foi ressuspender o maior número de compostos possível, mas em alguns casos determinados, a condição de solvente não propiciou a solubilização total do extrato.

O sistema de solvente acetato de etila : éter de petróleo (80:20) demonstrou deixar o extrato bastante solúvel para aplicação de amostra em coluna cromatográfica. O sistema de solventes água : acetona : n-hexano : acetato de etila: éter etílico demonstrou não ter solubilidade total da amostra. O sistema de solvente acetona : n-hexano (1:1) demonstrou deixar parcialmente solúvel e, quando aumentada a proporção de n-hexano, tornou-se mais solúvel. O sistema de solventes No.6 [Éter petróleo: Acetato de etila: Metanol (2:2:1)] foi o melhor, pois solubilizou a parte laranja e deixou um precipitado branco no fundo do frasco, relativo majoritariamente ao composto ativo.

5.5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO

As amostras resultantes das técnicas preparativas que melhor proporcionaram separação são apresentadas na TABELA 12 e foram obtidas conforme FIGURA 42.



(*) ≡ PRESENÇA ANALÍTICA DO COMPOSTO ATIVO

FIGURA 42 – ETAPAS DE OBTENÇÃO DE EXTRATO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRA PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Várias frações foram coletadas a partir de diversas condições de cromatografia em coluna (CC). Alíquotas destas amostras foram testadas individualmente para atividade biológica.

A partição seletiva dos compostos foi realizada pela eluição diferencial nos solventes orgânicos, porém não forneceu nenhum composto puro; apenas extratos simplificados. Estes foram separados em frações quando submetidos a cromatografia em coluna, ou diretamente, para a etapas de cristalização. Em alguns casos, era obtida a concentração majoritária de três compostos em relação aos demais compostos do extrato total. Entretanto, sempre havia presença de outros constituintes em menor proporção, os quais poderiam exercer os efeitos, mesmo em menor concentração.

Uma coluna foi empacotada com hexano, nas dimensões de 50mm x 40 cm altura. Resultou em boa compactação, pois a temperatura de ebulição do hexano era alta em relação ao calor de entalpia dissipado no fenômeno de dissolução da sílica. Entretanto, mesmo proteção de areia sobre a sílica para prevenir canalização, houve a formação de correntes de solvente que propiciaram uma canalização do tipo lateral. Mesmo assim, antes do ocorrido, foi possível coletar grande gama de frações iniciais separadas. O material restante voltou para o extrato total e foi recromatografado.

Embora o resultado tenha sido insatisfatório, foi valioso perceber que devido a um comportamento inesperado, a molécula ativa e outros compostos foram irreversivelmente adsorvidos à sílica. Mesmo com esforço de muitos volumes de fase móvel para limpeza e com o aumento radical da polaridade da fase móvel, não houve deslocamento da amostra remanescente do local de aplicação. Além disto, todas as frações coletadas ao longo desse tempo não apresentaram atividade. Isto levou a desconsiderar como possível molécula ativa, todos os compostos previamente eluídos. Foi útil, pois serviram como padrões comparativos em CCD, em outras técnicas de fracionamento, classificando-os como indesejáveis na fração final. Além disto, foi necessário readequar as condições de fase móvel aplicadas à coluna, promovendo um gradiente de aumento de polaridade mais acelerado.

Foi possível recolher uma fração enriquecida com a molécula ativa quando foi utilizado o seguinte sistema de solvente. Amostra aplicada em diclorometano:acetato de etila em coluna 3x20 cm; com fase móvel composta por

hexano:clorofórmio:metanol nas seguintes proporções e volumes de eluição: 100mL (100:0:0); 100 mL (97:3:0); 100 mL (95:5:0); 150 mL (90:10:0); 150 mL (70:30:0); 200 mL (50:50:0); 200 mL (0:100:0); 200 mL (0:99:1); 200 mL (0:99:2); 200 mL (0:99:3); 200 mL (0:95:5).

A coluna que propiciou separação de maior número de frações, obteve rendimento da fração ativa, denominada pool142 (p142), de 3,2 mg por 1g de amostra aplicada. A fase móvel utilizada era constituída por éter de petróleo : acetato de etila : etanol : água; acrescidos em ordem de polaridade crescente. A resolução de separação da molécula ativa foi influenciada pela proporção de água que era acrescida na fase móvel. A fase estacionária ativada garantiu melhores resultados. O fluxo de solvente de 1mL/ min foi satisfatório. A coluna também possuía dimensões de 50mm x 40 cm altura. Entretanto esta não foi afetada por canalização e houve boa separação da amostra aplicada. A coluna com melhor resolução, entretanto, era a de 3 cm de diâmetro.

As amostras foram submetidas a bioensaio. Apesar de o rendimento da fração ativa ter sido baixo, pois a amostra era proveniente do caldo de fermentação evaporado e extraído, verificou-se que a fração aquosa eluída na lavagem da coluna apresentava características químicas semelhantes à molécula ativa, sobretudo espuma persistente. Apesar de esta amostra ter sido descartada como lavagem de coluna, poderia se tratar de um composto derivado (glicosilação, hidroxilas, etc.) da molécula ativa, que teriam impedido de eluir junto à fração ativa detectada.

Analiticamente, o pool apresentava-se como fração de três constituintes pela detecção por análise em HPLC-MS (FIGURA 96). Portanto, não foi considerado o composto puro. Além disto não se apresentava em quantidade suficiente para fácil elucidação estrutural e por isso optou-se por aumentar o número de bateladas de fermentação submersa em Biorreator.

A obtenção do composto puro foi realizado após partição seletiva em uma coluna preparativa que priorizou apenas a concentração da fração ativa. Em seguida, esta fração foi concentrada e submetida ao processo de cristalização. A amostra que permitiu quantidade suficiente era originária da biomassa seca, com rendimento de 279 mg de composto puro a cada 100 g micélio seco (considerando extrações sucessivas).

Para separação, a CCD analítica foi uma técnica analítica fundamental.

Serviu para determinar a abrangência de frações a serem reunidas e na determinação de qual seria a melhor fase móvel para separação em CC. Serviu também para determinar a complexidade das frações e avaliar se poderiam ser realizadas técnicas analíticas. Algumas separações em CCD serviram para facilitar a revelação química durante a caracterização. Os extratos concentrados foram separados em diversas frações por CCD preparativa. Algumas destas amostras estão nomeadas na TABELA 12.

Todas as amostras foram testadas quanto a sua atividade. Uma das frações (“solarize”) era enriquecida com o composto ativo, conforme análise de RMN e CCD analítica. Mostrou que o processo fermentativo é reproduzível, pois esta fração foi obtida a partir de uma batelada diferente da primeira. Nesta batelada, houve a diferença de síntese de um pigmento verde pelo fungo (característico). Contudo a quantidade aplicada foi muito menor que as técnicas preparativas de CC ou cristalização.

O melhor sistemas de solvente utilizado em CCD foi a fase móvel FM603 e a FM1004, compostas por clorofórmio : metanol : ácido acético e água. Apesar de formar arraste quando a amostra era aplicada concentrada, ela favorecia a focalização do composto ativo (ANEXO 6). Uma segunda dimensão permitiu definir a molécula ativa que foi em seguida purificada.

A adição de hidróxido de amônio às fases móvel mostrou-se apropriada para separação de grande número de componentes, como pode visualizado na CCD dos extratos (ANEXOS 6 e 7). Contudo, a fração ativa permanece próxima ao local de aplicação na placa CCD.

TABELA 12 – DENOMINAÇÃO DE AMOSTRAS E FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO, TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA E CRISTALIZAÇÃO

Amostras	Origem - Código	Técnicas
Extrato Bruto		
S dcm / Sdcm14	Caldo de fermentação Erlen	Extração com Diclorometano
Sdcm	Caldo de fermentação seco	Extração com Diclorometano
XB01	Biomassa fúngica seca	Extração com Diclorometano
B01	Biomassa fúngica seca Biorreator 01	Extração com Diclorometano
B02	Biomassa fúngica seca Biorreator 02	Extração com Diclorometano
Xdcm	Biomassa fúngica seca, cultivo Erlenmeyer	Extração com Diclorometano
Erl13	Biomassa fúngica seca, cultivo Erlenmeyer	Extração com Diclorometano
Extrato Simplificado		
“Solarize” (ativo)	B02 (cód.09072014191143)	CCD preparativa
B02 S sDCM	B02	Partição seletiva
Blue violet Ch.16,58	B02	CCD preparativa
Composto Bruto		
p142 (ativo)	Sdcm	Cromatografia de coluna preparativa (acetato de etila:etanol)
BCO_B01 (ativo)	B01 (cód.09072014190031)	Sistema de solventes (No.06)
Rf1, Rf2 (ativo), Rf3 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 141 (ativo), 151	BCUD	CCD bidimensional
Laranja, Azul Claro acl, Laranja 2, V, lf, lv, a, BColar, rf/0,2, az	Sdcm	Cromatografia de coluna preparativa (acetato de etila:etanol)
	B02 (cód.22092014)	CCD preparativa
Composto Puro (ativo)		
BCUD	B01	Cristalização
PALHA	B01	Recristalização em forma de palha (Diclorometano : metanol)
Pontos	B01	Cristalização em forma de pontos
PLT1	B01	Recristalização (acetato de etila: água)

5.5.1 HPLC - Cromatografia Líquida de Alta eficiência

A fração simplificada **p142** (obtida por cromatografia em coluna) foi analisada por HPLC, resultando em 3 picos principais, os quais foram investigados por espectrometria de massas. Um dos componentes possuía o mesmo tempo de retenção (7,2 min) e padrão de fragmentação de massas que o composto ativo bruto **Rf2** (obtido por CCD preparativa).

O comprimento de onda que melhor detectou os compostos em cromatografia foi de 254 nm. Fases móvel com acetonitrila aquosa não proporcionaram boa eluição da amostra, muitas vezes causando arraste.

Da mesma forma, como realizado no estudo de Oughlissi-Dehak et al. (2008), com estudo de sesquiterpenos obtidos de material vegetal, o uso de fase móvel com ácido trifluoracético mostrou-se vantajoso para resolução de separação. O resultado da fase móvel (WEN et al., 2005) resultou em pico bem definido.

5.5.2 Cristalização da molécula

O cristal denominado **BCO_B01** surgiu como um depósito cor branca a partir do extrato do biorreator B01. Ele foi obtido após sistema de solvente 7 [Éter petróleo: n-hexano: Acetona: Diclorometano: Acetato de etila: Metanol (3: 1,5: 1: 1: 2: 2)], para o qual foi testada sua solubilidade (ANEXO 1). A determinação de solubilidade permitiu desenvolver métodos com maior rendimento de cristalização (105 mg composto / Litro de extrato).

O cristal era um pouco solúvel em éter de petróleo e hexano, levando a formação de um depósito. Com acetato de etila e éter de petróleo o depósito ainda era perceptível. Com adição de diclorometano, ainda sobrava precipitado. Este precipitado era algo solúvel em acetona e pouco solúvel em metanol. Portanto, a segunda técnica de cristalização utilizou mistura diclorometano, metanol e acetona, com evaporação lenta. O material era relativamente solúvel em acetato de etila. Percebendo-se tal solubilidade e considerando precipitação com bicarbonato de

sódio, outro sistema de precipitação foi aquoso / bicarbonato / acetato de etila, como em metodologia aplicada por Rodrigues (2008) para ácido giberélico.

Houve a necessidade de purificação para posterior confirmação de atividade biológica em relação à qual fração possuía atividade. Todos os cristais formados foram qualificados por análise de Ressonância Magnética Nuclear e considerados com componente majoritário idêntico.

Os materiais cristalizados que apresentaram atividade *in vitro*, foram denominados **PALHA**, **BCUD**, **PONTOS** e **PLT** e foi submetido à identificação química e elucidação estrutural por RMN. O cristal PALHA Foi considerado puro pelas análise de CCD. O cristal do composto ativo tinha aspecto de sólido 'amorfo', cristalizado em forma de palha e/ou pontos cor creme. O sabor residual era amargo, característico de compostos fenólicos. A cor apresentava-se laranja em solução de solventes orgânicos e amarelo claro em solução aquosa levemente básica. Tipicamente, uma série de ligações duplas conjugadas absorve fortemente na região do ultravioleta-visível do espectro electromagnético, resultando muitas vezes em uma cor amarelo-alaranjado. Durante o aquecimento não apresentou nenhuma característica de volatilidade e portanto não foi submetida a análises de cromatografia gasosa.

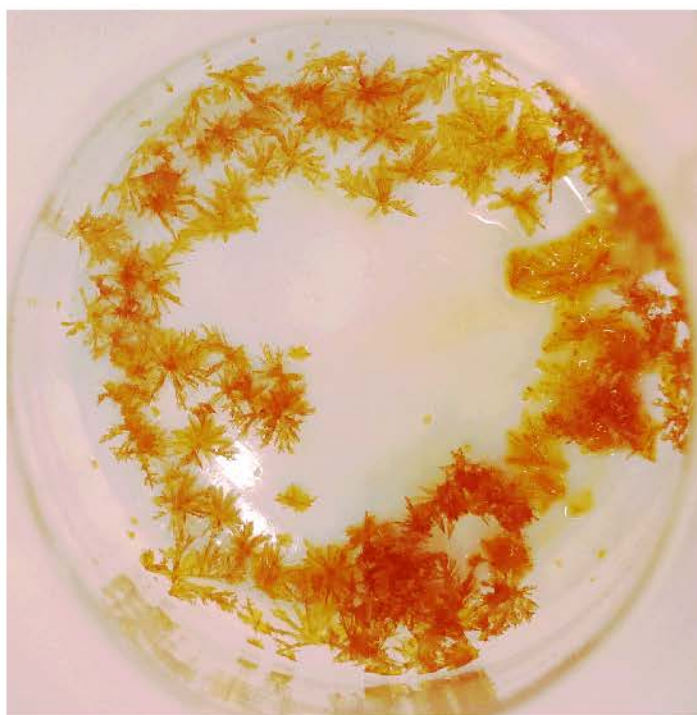


FIGURA 43 - CARACTERÍSTICA DOS CRISTAIS FORMADOS (AMOSTRA PALHA)

5.6 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

5.6.1 Testes contra *Leishmania*

Os resultados de inibição obtidos nos ensaios biológicos estimulam a continuação da pesquisa. A atividade se repete ao longo de diversos experimentos, principalmente contra as cepas referência de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*.

O efeito leishmanicida das amostras foi medido a partir de repetições independentes, aleatorizadas. A comparação foi realizada em relação a um controle não tratado, segundo a equação de inibição:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 * \left(1 - \frac{\text{ensaio}}{\text{controle não tratado}} \right) \quad (4)$$

O controle não tratado recebeu o diluente da amostra em igual concentração, normalmente solução esterilizada de dimetilsulfóxido aquoso (máximo 1%). O registro de atividade foi realizado após 72 horas de ensaio, pois correspondeu ao final da fase logarítmica de crescimento das células. Além disso, este é o tempo de experimento preconizado por (KIDERLEN; KAYE, 1990; DUTTA et al., 2005; PALIT; ALI, 2008b).

O tratamento, contra as formas promastigotas *in vitro*, continha concentrações de amostra que variavam de acordo com a etapa de fracionamento e purificação. De acordo com seu grau de pureza, e entendendo-se sobre o comportamento químico do extrato ou composto, foi possível solubilizar as amostras em concentrações de ensaio cada vez menores, mantendo-se e, inclusive, superando-se em grau de atividade.

Dentre os ensaios realizados no período de 2013 a 2015, o melhor resultado obtido, em termos da eficiência de inibição de crescimento de *Leishmania sp.* está indicado na TABELA 13. Uma seleção prévia foi realizada para discernir quais foram as formas de fracionamento eficientes e com bom rendimento.

Os resultados ilustrados nas FIGURAS 44 a 46 mostram em quais extratos fracionados por cromatografia em coluna estão os compostos que apresentam

valores de inibição de crescimento dos contra *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente. O extrato bruto (100 µg/mL) inibiu 41,6% e 31,1% do crescimento de *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente.

Os valores de absorção pelo ensaio do MTT, e contagem de promastigotas, atenderam aos quesitos de distribuição normal e igual variância. Aplicou-se assim, testes estatísticos paramétricos (ANOVA um fator seguida por teste de comparação múltipla de Dunnett). Os resultados foram expressos como médias ± DP (n = 3, em triplicata). O teste de Dunnett é recomendado para determinar as diferenças entre os tratamentos experimentais e um grupo de controle sem tratamento.

O valor-p para aceitação ou negação de diferenças significativas foi proposto como * P < 0,05 e *** P < 0,001. Se na comparação estatística entre grupos, o valor-p foi menor que 0,05 ou 0,001; a probabilidade de estar incorreto na conclusão que havia uma diferença significativa é menor que 5% ou 1%, respectivamente.

Vale ressaltar que frações purificadas apresentaram resultado superior ao Controle Positivo (C+), em uma dose muito menor. A concentração de antimoniato de meglumina foi estabelecida em 2000 µg/mL e é equivalente a 581 µg/mL de íon Sb(V). Este medicamento de primeira escolha, *in vivo*, possui mecanismo de ação indireto (possíveis rotas de oxidação intracelular) e efeito cumulativo. Mesmo assim, serviu como bom parâmetro de comparação.

A fração 141 (amostragem de p142) demonstrou atividade superior ao Glucantime, inibindo *L. (V.) braziliensis* em 62% e *L. (L.) infantum* em 42%. A amostra “solarize”, obtida por CCD preparativa, também. Entre as três moléculas separadas por CCD preparativa bidimensional (Rf1, Rf2 e Rf3), somente Rf2 foi ativa. Essas amostras, com atividade superior ao antimoniato, apresentaram em CCD analítica *spots* indicativos de similaridade de atividade devido à presença da mesma molécula ativa. Desta forma algumas amostras foram posteriormente selecionadas para purificação do composto ativo e avaliadas nas concentrações 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL, conforme ilustra a FIGURA 46.

Todos os ensaios que apontavam atividade pela reação colorimétrica do MTT, foram confirmados por contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, microscopicamente. Normalmente apresentavam destruição celular ou redução de motilidade dos promastigotas. A observação de atividade foi realizada na faixa de $2 \cdot 10^6$ /mL a $1,25 \cdot 10^7$ /mL, uma ampla faixa para comparação de concentrações.

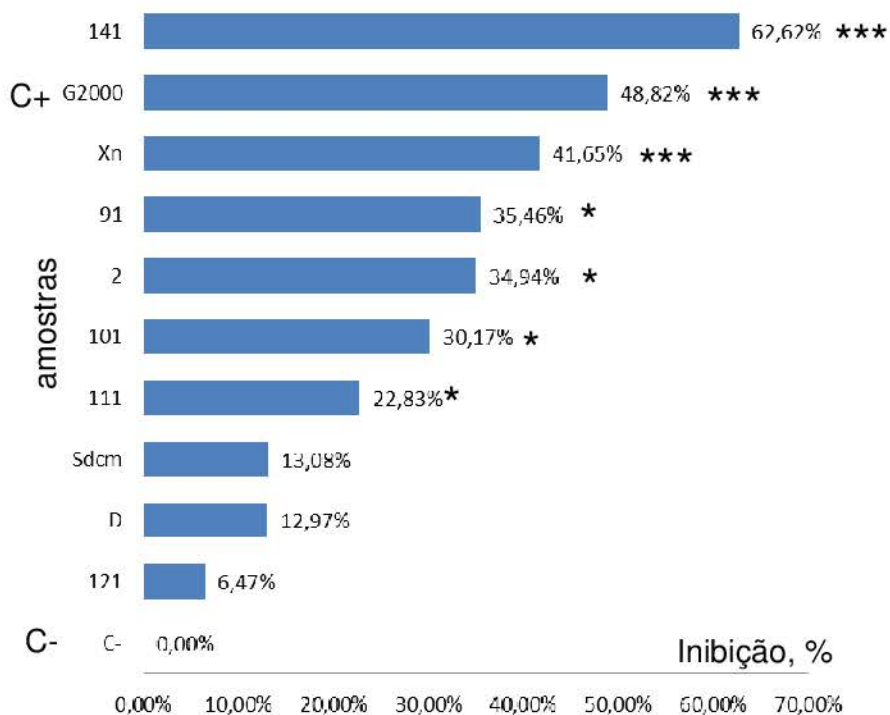


FIGURA 44 - ATIVIDADE (100 µg/mL) DE EXTRATOS FRACIONADOS POR POR COLUNA CROMATOGRÁFICA SOBRE *L. braziliensis*
 CONTROLE ANTIMONIAL: G2000 µg/mL (INIBIÇÃO 48%)
 C- : CONTROLE NEGATIVO (SEM AMOSTRA)

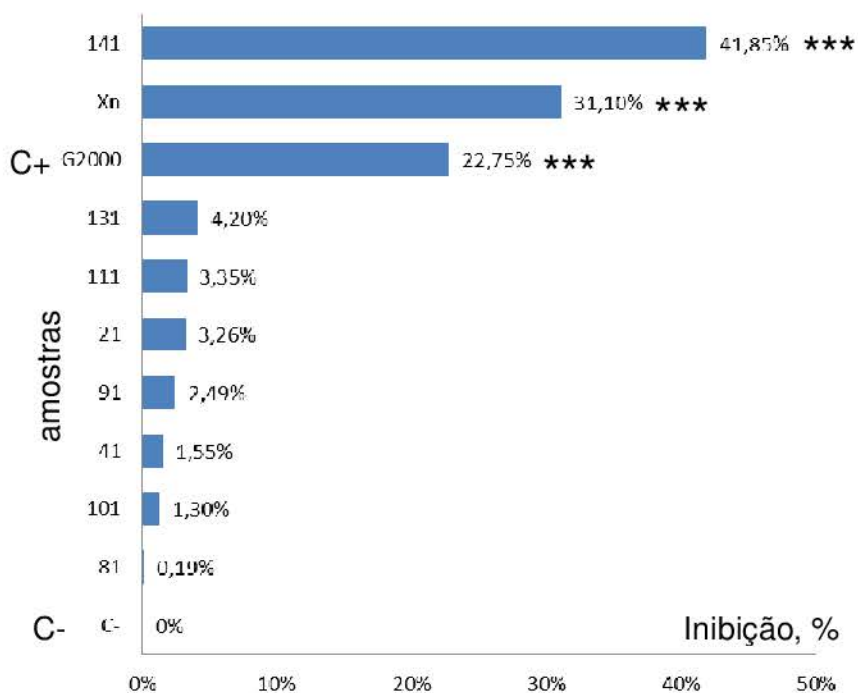


FIGURA 45 - ATIVIDADE (100 µG/ML) DE EXTRATOS FRACIONADOS POR COLUNA CROMATOGRÁFICA SOBRE *L. infantum*
 CONTROLE ANTIMONIAL: G2000 µg/mL (INIBIÇÃO 22,7%)
 C- : CONTROLE NEGATIVO (SEM AMOSTRA)

Após obtenção e identificação do composto ativo e indicação de sua pureza por RMN, foi possível realizar os ensaios dose-resposta. Para isto, o composto ativo foi diluído em 6 concentrações diferentes, as quais situavam-se em torno da concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das formas promastigotas (valor previsto por experimentos anteriores). O valor de IC₅₀ foi determinada de acordo com uma regressão sigmoideal realizada para cálculo Log(Dose) vs. resposta com inclinação variável, utilizando o software GraphPad Prism versão 3.0, GraphPad Software, La Jolla California USA (www.graphpad.com). A função deste procedimento matemático foi ajustar os dados experimentais de acordo com a equação logística de quatro parâmetros (Eq.5) (HILL, 1910) (GADAGKAR; CALL, 2015):

$$Y = a + \frac{b - a}{\left[1 + \left(\frac{IC_{50}}{X} \right)^d \right]} \quad (5)$$

Onde:

Y = Resposta esperada para uma dosagem X (porcentagem de promastigotas vivas);

a = Resposta quando a concentração do composto ativo é zero (assíntota mínimo)

b = Resposta atingida para uma dosagem infinita (assíntota máximo)

IC₅₀ = concentração que inibe 50% do crescimento (=c) (ponto de inflexão);

d = maior inclinação da curva sigmoide (coeficiente angular) (HILL, 1910).

As doses testadas do composto ativo para determinação de IC₅₀ foram igualmente espaçadas na escala logarítmica, correspondendo às concentrações:

0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 50 – 100 µg/mL.

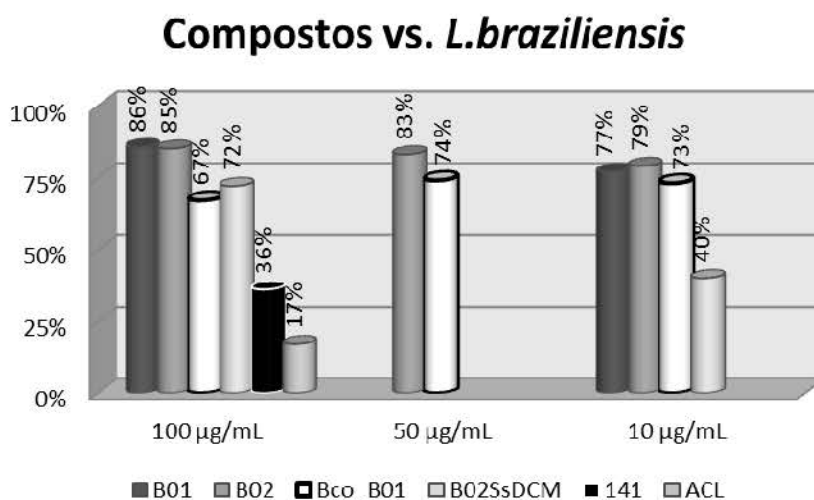


FIGURA 46 – ATIVIDADE DE EXTRATOS BRUTOS E COMPOSTOS BRUTOS CONTRA *L. (V.) braziliensis* ATIVIDADE (100 – 50 – 10 µg/mL) DE EXTRATOS FRACIONADOS POR POR COLUNA CROMATOGRÁFICA CONTROLE ANTIMONIAL: ACL (INIBIÇÃO 17-40%)

Quando bem solubilizado em DMSO, com sonicação, o composto purificado inibiu fortemente o crescimento celular de formas promastigotas de *Leishmania*, conforme resultados de concentração de inibição IC_{50} apresentados na TABELA 13. O composto demonstrou ser tóxico também para cultivo celular de células VERO, com índice de seletividade 13,4 ($IC_{50} \text{ VERO} / IC_{50} \text{ Leishmania}$).

O IC_{50} do composto ativo (válido para as amostras BCUD, PALHA, PONTOS) foram calculados e apresentados na TABELA 13. Por exemplo, IC_{50} 0,32 µg/mL contra *L. (V.) braziliensis* é correspondente à concentração molar de IC_{50} 0,58 µM, considerando a massa molecular do composto de 548 g / mol.

TABELA 13 - VALORES ESTIMADOS DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA IC_{50}

	IC_{50} , µg/mL	IC_{50} , µM
<i>L. (V.) braziliensis</i>	0,32	0,58
<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,40	0,72
<i>L. (L.) infantum</i>	0,36	0,66
Células VERO	4,8	8,75

5.6.2 Identificação de cepas referência de *Leishmania*

As cepas referência de *Leishmania* tiveram suas espécies confirmadas através das técnicas moleculares de rotina utilizadas no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (UFPR). De acordo com a observação de bandas, caracteristicamente amplificadas por *primers* específicos de minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA), concluiu-se que os bioensaios foram realizados com as cepas referência de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*. Para diferenciação dos clones de *Leishmania*, os protocolos de extração e amplificação foram realizados em condições específicas de ciclos de amplificação e temperatura de anelamento do *primer*.

5.6.3 SDS-PAGE

Não foram encontradas diferenças no perfil de proteínas analisando-se pelo perfil de eletroforese 1D. No entanto, é possível que ocorram diferenças no perfil de proteínas expressas em testes mais sensíveis. Entretanto, não se mostrou justificável proceder no presente momento, pois tanto as proteínas de biomassa de *Leishmania* como as proteínas solúveis não diferiram visualmente do controle. O crescimento do tratamento foi realizado com dose inibidora IC₉₀, mas que permitiu multiplicação de biomassa em quantidade de proteína aplicada no gel foi equivalente ao controle, considerando o método de Bradford.

Alguns estudos argumentam que mesmo a mudança de meio de cultura interfere com metabolismo de expressão de proteínas de promastigotas de *Leishmania*.

5.6.4 Teste de hemólise

O material com hemólise menos intensa foi observado no microscópio óptico em phase 2 (400x) e percebe-se que havia presença de formas anormais de hemácias normais e ocorrência de lise (TABELA 14).

TABELA 14 - TESTE DE HEMÓLISE DE HEMÁCIAS DE COELHO

Concentração (composto ativo)	Resultado de hemólise
25 mg/mL	+++++
12,5 mg/mL	+++++
6,25 mg/mL	+++++
3,13 mg/mL	+++++
1,5 mg/mL	++++
0,75 mg/mL	++++
0,38 mg/mL	++ fraco

5.7 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

O composto com atividade leishmanicida foi caracterizado e teve a estrutura química determinada, como ilustrado na FIGURA 47, a qual é mais detalhadamente exemplificada na FIGURA 73. A estrutura molecular foi definida de acordo com os resultados de análise do composto purificado neste trabalho, isolado a partir de um extrato de classe química totalmente desconhecida. A caracterização estrutural ocorreu em paralelo à identificação do microorganismo produtor.

A conclusão foi que a estrutura é equivalente a estrutura definida como Pycnidiona (HARRIS et al., 1993) ou Eupenifeldin (MAYERL et al., 1993), dois estereoisômeros com nomes distintos.

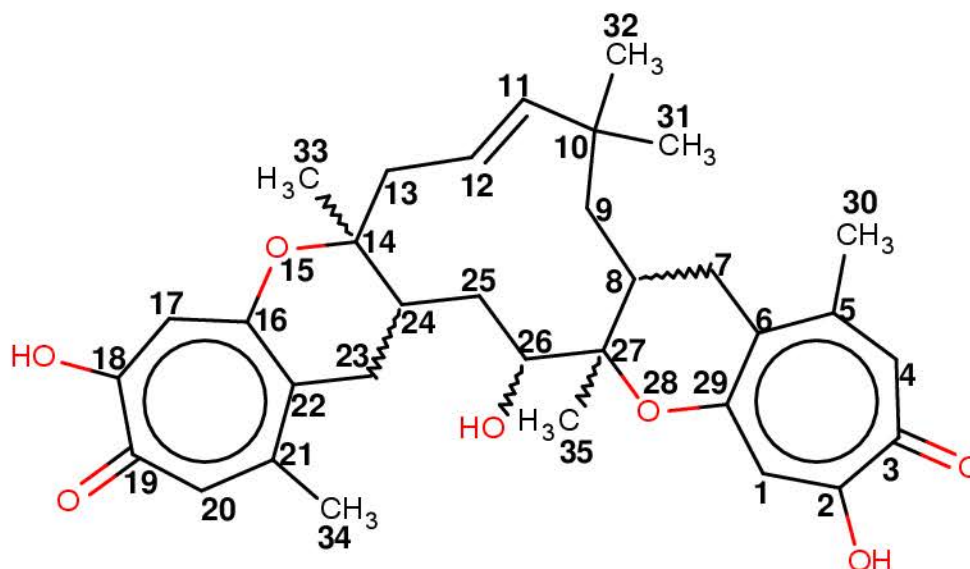


FIGURA 47 – PROPOSTA ESTRUTURAL DE COMPOSTO ATIVO LEISHMANICIDA
 FONTE: O AUTOR (2015)

NOTA: NUMERAÇÃO DE ACORDO COM HARRIS et al. (1993)

Este resultado foi obtido após exaustivas análises que consideraram informações estruturais da molécula. As análises que suportam a hipótese desta estrutura estão apresentadas de forma lógica e se referem a caracterização química, espectrométrica (ESI-MS), espectroscopia de RMN 1D, RMN 2D, UV-vis e Infravermelho. As explicações da sequência lógica de elucidação estrutural que confirmam esta hipótese serão descritas a seguir. Alguns testes foram realizados ao longo da evolução de purificação da molécula e portanto, em algumas análises será indicado se foi utilizado o composto bruto concentrado ou o composto bruto.

Por vários motivos, é de interesse da ciência fazer a elucidação estrutural de uma molécula purificada que possua atividade biológica. Após elucidação, é possível fazer a quantificação molar exata para fins de ensaio. Além disto, torna possível utilizá-la em fases clínicas como princípio ativo. É nitidamente mais fácil fazer o registro deste produto em agências regulatórias e em documentos de patente.

Uma outra grande vantagem de elucidação estrutural é a comparação com a literatura. Torna-se possível fazer a bioprospecção, em banco de dados, de outros organismos produtores ou de outras atividades biológicas, registradas para compostos similares à molécula identificada. Pode-se, então, sugerir novas aplicações biológicas, de acordo com as necessidades descritas pela literatura.

Além disto, é possível prever as reações e modificações químicas prováveis, fundamentado-se pelos parâmetros estruturais, grupos funcionais, estabilidade e comportamento químico da molécula. Além disto, serve para idealizar vias de síntese química, localizar sítios de atuação ou desvendar o comportamento das vias biossintéticas. Portanto, a posse de dados estruturais é de extrema utilidade para maximização de rendimentos e na determinação dos métodos mais apropriados de extração, concentração e purificação.

Em objetivo último, a caracterização estrutural serve para quantificação da molécula em processos produtivos, em vistas de reprodutibilidade e controle de qualidade do processo. Determinando-se um método padrão analítico de detecção, é possível rastrear a molécula em amostras complexas e multicomponente, viabilizando sua comercialização.

5.7.1 Exames preliminares

Durante a caracterização química, o teste de chama resultou em uma chama amarela fuliginosa, que indica alta insaturação ou elevado número de carbonos na molécula. As análises de RMN indicaram, a princípio, apenas uma dupla ligação na molécula. Desta forma, haveria outras ligações dupla sem que houvessem hidrogênios ligados, como duplas em carbonos quaternários, ligações C=O ou carbonos aromáticos substituídos. Portanto, o composto possuía elevado número de carbonos. O odor, no teste de chama, não foi característico da presença de enxofre. Apesar de o cheiro de queimado não ter sido agradável, não lembrou compostos similares ao H₂S. Segundo indicação de análises de EDS e RMN, não havia indicação para presença de átomos de enxofre ou nitrogênio na amostra.

A preferência de degradação, por chama indireta, é característica de moléculas orgânicas com composição CHO. Foi o que ocorreu durante a amostra ter sido submetida à chama direta em um tubo de ensaio. Não houve combustão completa quando em exaustão de oxigênio; seria indicativo de consumo de átomos de oxigênio intramoleculares.

O composto ativo isolado demonstrou odor pungente após sua degradação em condições induzidas e lembrou odor de arnica (*Arnica montana*, Asteraceae) e

de um medicamento anti-tussígeno (Vick Vapourub®). Ambos possuem em sua composição muitos sesquiterpenos. Alguns sesquiterpenos estão presentes em diversos óleos essenciais, como o α -humuleno, β -cariofileno, β -farneseno e α -bisabolol. O arbusto *Cordia verbenacea*, Borraginaceae (conhecida como erva baleeira ou maria-milagrosa) é uma planta nativa da Mata Atlântica brasileira que produz grande quantidade de sesquiterpenos (FERNANDES et al., 2007). O seu óleo essencial é matéria-prima para o anti-inflamatório fitoterápico Acheflan® (Aché), constituído principalmente por α -humuleno (RODRIGUES et al., 2012).

5.7.2 Ponto de fusão

O ponto de fusão determinado automaticamente pelo equipamento foi de 284,8°C. Segundo observações visuais, entretanto, a amostra começou a degradar dentro do capilar a partir de 246°C. Apresentou odor de queimado e aspecto visual de carvão em 278°C.

Apesar disto, há a possibilidade de ser aceito o valor 284,8°C (resultado do equipamento) como ponto de fusão, pois o equipamento determina o ponto de fusão da amostra com base em um vídeo capturado com ampliação óptica e efetua correções programadas automáticas.

Há a possibilidade de ser realizada análise de ponto de fusão com capilar selado a vácuo, para que se evite a oxidação do composto pela presença de oxigênio. Entretanto a presença de 7 átomos de oxigênio na molécula não impediria completamente o processo de degradação.

5.7.3 Solubilidade

Pode-se inferir que o composto faz parte do grupo de solubilidade A2 (PAVIA et al., 2009) sendo insolúvel em água; solúvel em NaOH 5% e NaOH 0,5%. Precipita em cor branco-bege quando adicionado 5% de bicarbonato de sódio. A classificação dos possíveis e excludentes compostos é relacionado na TABELA 15. Os resultados de solubilidade da molécula ativa em sistemas de solventes orgânicos e aquosos é dada no ANEXO 1.

TABELA 15 - COMPOSTOS ORGÂNICOS RELACIONADOS ÀS CLASSES DE SOLUBILIDADE

Grupo	Possíveis compostos
S2	Sais de ácidos orgânicos, hidrocloreto de amina, aminoácidos, compostos polifuncionais (carboidratos, poliálcoois, ácidos, etc.).
SA	Ácidos monocarboxílicos, com cinco átomos de Carbono ou menos, ácidos arenossulfônicos.
SB	Aminas monofuncionais com seis átomos de carbono ou menos.
S1	Álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, nitrilas e amidas monofuncionais com cinco átomos de carbono ou menos.
A1	Ácidos orgânicos fortes: ácidos carboxílicos, fenóis com grupos eletrofílicos em posições orto e para, β -dicetonas.
A2	Ácidos orgânicos fracos: fenóis , enóis , oximas, imidas, sulfonamidas, tiofenóis com mais de cinco átomos de carbono, β -dicetonas, compostos nitro com hidrogênio em α , sulfonamidas.
B	Aminas aromáticas com oito ou mais carbonos, anilinas e alguns oxitéres.
N1	Álcoois, aldeídos, metil cetonas, cetonas cíclicas e ésteres contendo somente um grupo funcional; éteres com menos de oito átomos de carbono; epóxidos.
N2	Alcenos, alcinos, éteres, alguns compostos aromáticos (com grupos ativantes) e cetonas (além das citadas em N1).
I	Hidrocarbonetos saturados, alcanos halogenados, haletos de arila, éteres diarílicos, compostos aromáticos desativados.

O perfil de solubilidade, em comparação com os outros dados analíticos, indicam a presença de função enol (FIGURA 48) ou fenol. Esta função orgânica é caracterizada por uma hidroxila ligada a um carbono primário com hibridação sp^2 , o qual se converte entre função alceno com grupo hidroxila ou função carbonila de cadeia alifática (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2014).



FIGURA 48 - TAUTOMERIA CETOENÓLICA

5.7.4 Testes químicos

Quando o composto ativo estava isolado bruto, ainda que com alguns interferentes, foram iniciadas as primeiras análises, como os testes químicos. Ao longo dos experimentos, o material foi purificado a um grau maior de pureza e então analisado com maior detalhamento por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

De acordo com os resultados da marcha fitoquímica, a molécula ativa se comportava como uma saponina triterpênica. No entanto, não pertencia a esta classe. Tratava-se de uma molécula incomum com comportamento químico similar; hipótese que só foi confirmada após conclusão de toda estratégia de elucidação estrutural. O ANEXO 2 mostra a reatividade e as observações dos ensaios realizados para o composto de interesse. Além disso, o resultado positivo antioxidante DPPH sugeriu presença de função cetona.

Saponinas, do grego *sapon*, são caracterizadas por possuir a propriedade emulsificante. O teste de espuma consistiu em agitar a amostra solubilizada em meio aquoso e verificou formação de espuma com durabilidade ao longo do tempo, permanecendo estável por pelo menos 15 minutos. Para confirmação diferencial, fez-se adição de ácido orgânico à espuma, que continuou estável por mais 15 minutos, indicando não se tratar de detergentes.

5.8 RMN

A análise do perfil do extrato bruto da biomassa (extração diclorometano) através do experimento de RMN de ^1H (FIGURA 49-A) demonstra que os constituintes possuíam cadeias alifática saturadas, especialmente com muitos grupos metila (aprox. 0,8 a 1,5 ppm) e metileno (aprox. 1,5 a 2,9 ppm). Também havia presença de muitos hidrogênios ligados a carbonos contendo oxigênio (aprox. 3,0 a 4,5 ppm) e presença de insaturações (aprox. 5,0 a 6,0 ppm). Provavelmente o extrato era composto por esteróides e terpenóides, em conformidade com as análises químicas realizadas com esta amostra.

Dentre todos os constituintes, apenas a molécula ativa possuía sinais na região de aromáticos. O composto ativo correspondia a aproximadamente a 15% do extrato bruto. Comparações podem ser realizadas entre composto ativo bruto (FIGURA 49-B); ou composto ativo puro (FIGURA 49-C); e o extrato bruto.

De fato, foram as comparações entre os experimentos de RMN que permitiram concluir que o componente majoritário era idêntico nas frações ativas isoladas. O composto ativo era o mesmo em diferentes estágios de purificação e avaliação biológico, amostras bco_b01, bcud, pontos e palha. Portanto, análises com composto bruto e composto puro, obtidos por diferentes métodos de concentração e cristalização, puderam ser consideradas em combinação para elucidação estrutural do composto ativo. Para tanto, foram desconsideradas impurezas em pequena quantidade.

A primeira análise espectroscópica utilizada na elucidação estrutural foi o experimento de **RMN de ^1H** na frequência de 600MHz (FIGURA 50), que fornece muitas informações em relação a estrutura molecular. Alguns sinais ficaram sobrepostos e por isso foi necessária complementação de dados estruturais com análise de experimentos do composto puro (em grande resolução) e uso de técnicas bidimensionais. O composto ativo demonstrou sinais nas regiões de aromático, dupla ligação, álcool e alifático.

Verifica-se no espectro de RMN de ^1H , a presença de dez sinais tipo singleto, dos quais seis eram mais intensos (expansões FIGURA 50). Caracteristicamente, grupos metila proporcionam singletos intensos no espectro. Procurando por grupos distintivos, são claros quatro singletos que tem integração próxima a 3H, entre eles δ_{H} 1,08; δ_{H} 1,11; δ_{H} 1,15 e δ_{H} 1,41 ppm. Essa informação reforça a possibilidade de o composto ativo pertencer às classes de saponinas, triterpenos ou esteróides; conforme havia sido sugerido pelos testes químicos, pois normalmente esses grupos possuem quatro metilas. Valores de grupos metila destes compostos estão entre δ_{H} 0,7-1,30 e revelam a posição detalhada de cada grupo e de suas interações (HANSON, 2003).

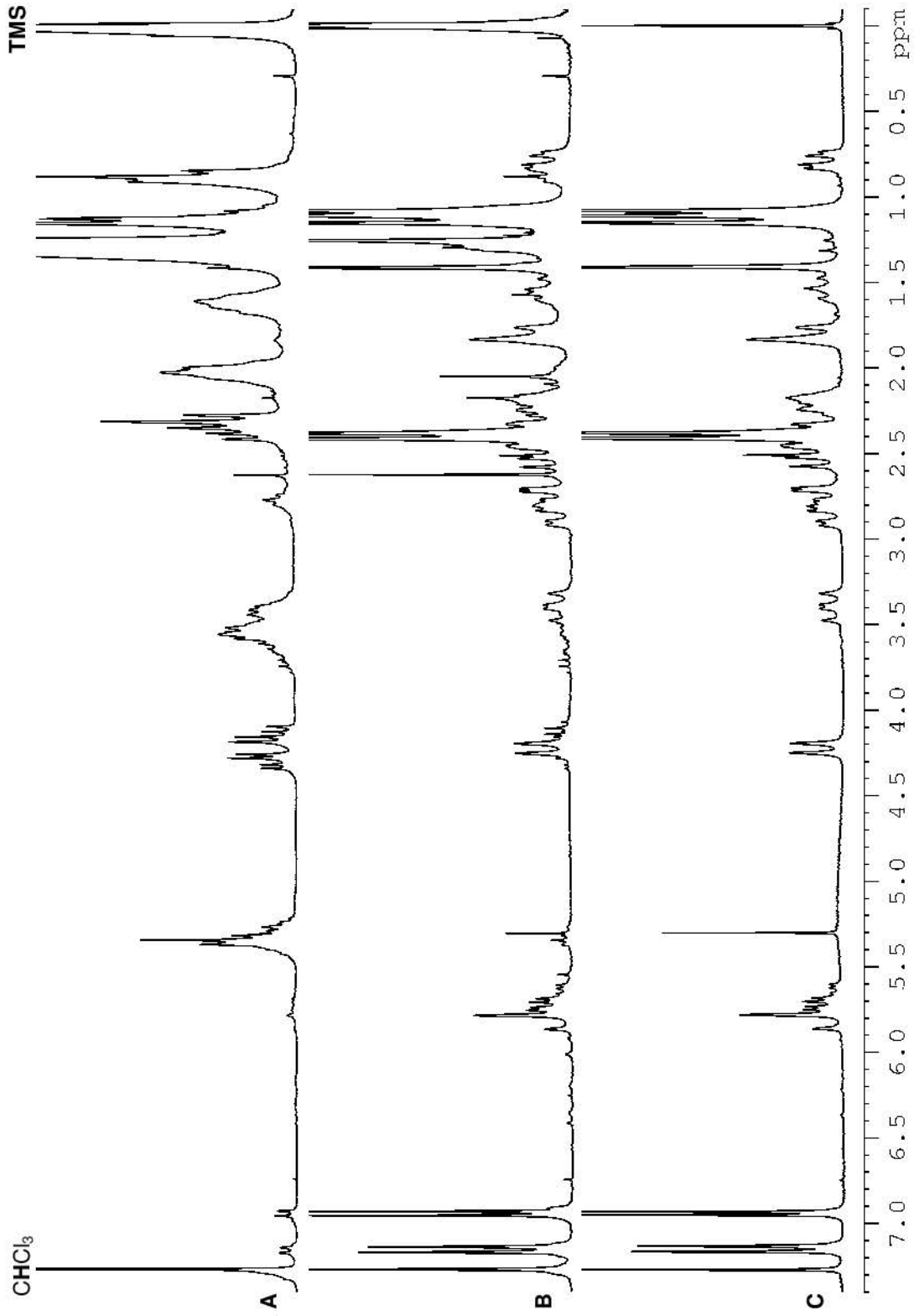


FIGURA 49 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO (A) EXTRATO BRUTO; (B) COMPOSTO BRUTO; (C) COMPOSTO PURO; (200,13 MHz) (REFERENCIADO PELO TMS)

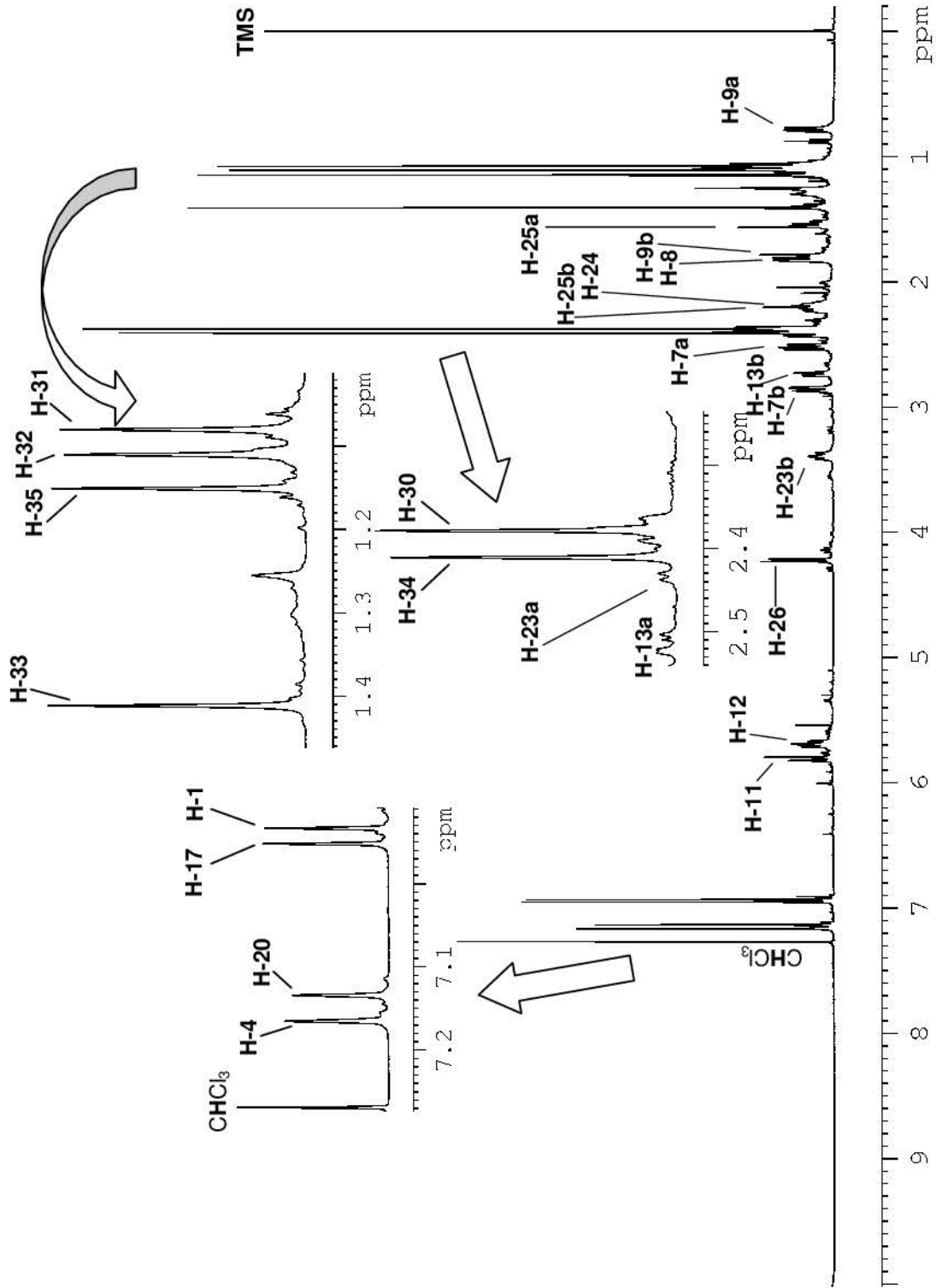


FIGURA 50 - ESPECTRO DE RMN DE ¹H DO COMPOSTO PURO CONCENTRADO E EXPANSÕES DE SINAIS SINGLETOS EM ESCALA (600,13 MHz) REFERENCIADO PELO TMS. ASSINALAMENTO DOS SINAIS DE ACORDO COM CRITÉRIO DE NUMERAÇÃO DE HARRIS et al. (1993)

Apesar do acesso a muitas informações espectrais, não foi possível identificar o composto por comparação de valores aos banco de dados ou à literatura. Desta forma, foi necessário realizar a estratégia de elucidação estrutural por completo, a partir da proposta de vários fragmentos químicos conforme anotação de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento. A união de fragmentos foi realizada conforme suas correlações químicas. A elucidação estrutural foi concluída após verificação de dados e complementação com outros métodos analíticos, como espectrometria de massas e espectroscopia de infravermelho.

As ligações entre átomos foi determinada por diferentes experimentos. Embora a faixa de deslocamento químico de carbono (0-220 ppm) seja muito maior que a de hidrogênio (aprox. 0-13 ppm), houve uma relação proporcional para átomos com mesmo ambiente químico, de acordo com Macomber (1991).

Os deslocamentos químicos característicos de δ_H 5,81 e δ_H 5,69 apontou que o composto possuía dois hidrogênios em dupla ligação em configuração trans, pois a constante de acoplamento entre estes sinais era $J = 16$ Hz. Assim, foi confirmada a insaturação do composto e proposto o primeiro fragmento químico para elucidação. Após acesso ao experimento com maior resolução, na frequência de 600 MHz, foi possível eliminar a sobreposição destes sinais e melhor definir as constantes de acoplamento. As expansões dos sinais de RMN de 1H deste experimento estão ilustradas, em mesma escala, na FIGURA 51.

A multiplicidade dos hidrogênios de dupla, apesar de inicialmente serem considerados como um dubleto e um multipeto; eram na verdade δ_H 5,81 (dd, 1H, $J= 16,0 : 1,6$ Hz) e δ_H 5,69 (ddd, 1H, $J= 16,0 : 10,8 : 4,3$ Hz).

As informações, desconectadas dos valores de carbono aos quais os hidrogênios das metilas e dupla ligação estavam ligados, era insatisfatória para união destes e de outros fragmentos propostos. Valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento fornecidas pelos experimentos de RMN de 1H eram insuficientes para elucidação do composto desconhecido.

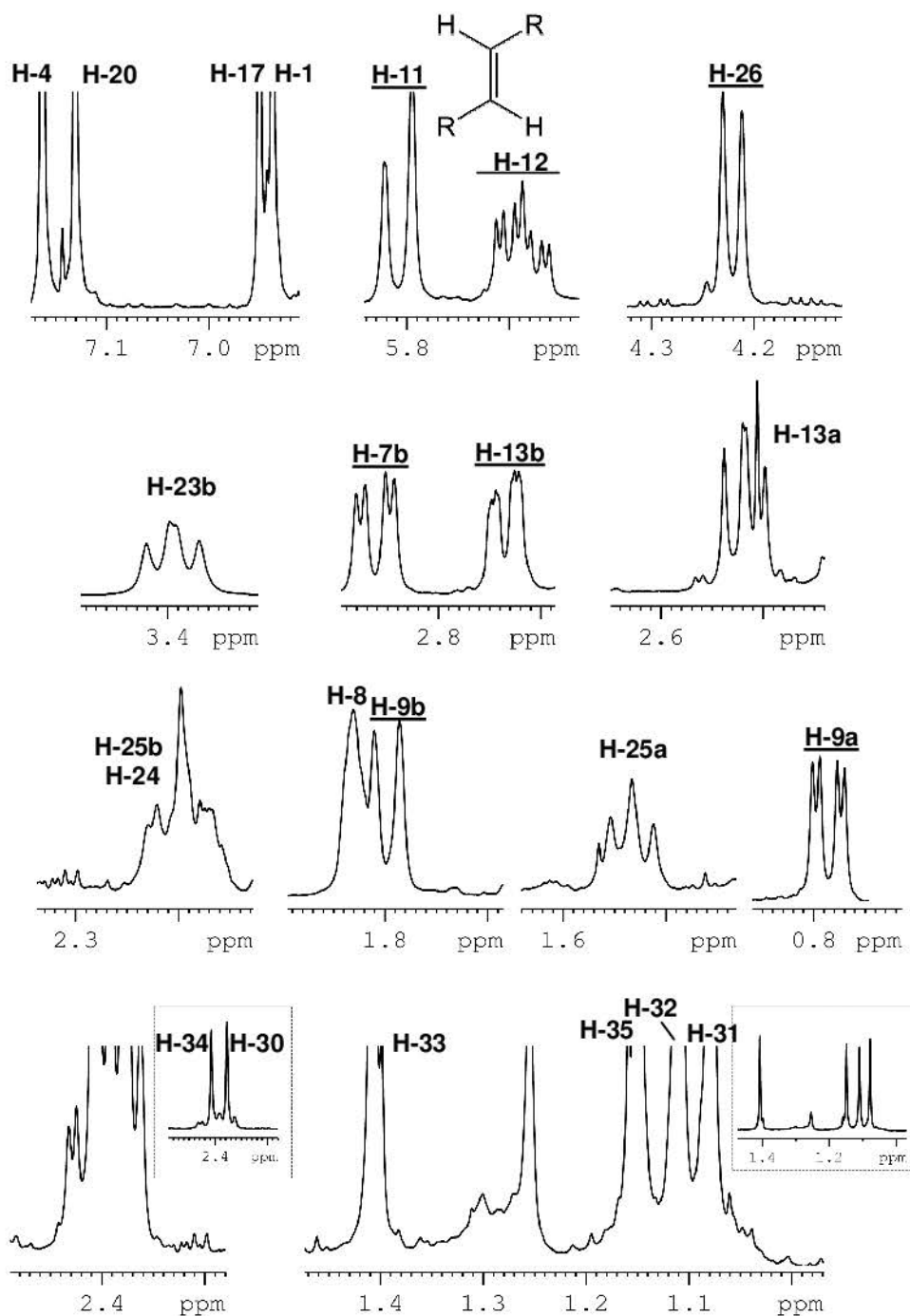


FIGURA 51 - EXPANSÕES DO ESPECTRO RMN DE ^1H DO COMPOSTO PURO CONCENTRADO (CONSIDERANDO MESMA INTENSIDADE), COM INDICAÇÃO DO PRIMEIRO FRAGMENTO PROPOSTO (DUPLA TRANS) (600,13 MHz) REFERENCIADO PELO TMS. ASSINALAMENTO DOS SINAIS DE ACORDO COM CRITÉRIO DE NUMERAÇÃO DE HARRIS et al. (1993)

Então, foram consideradas as análises bidimensionais de correlação direta HSQC, HMQC e HETCOR. Entretanto, havia muitas sobreposições (tanto em F1 como em F2) que não permitiam determinar exatamente qual era correlação hidrogênio - carbono. Além disto, era desconhecido se todos os sinais de carbono eram artefatos de processamento ou realmente existiam. Portanto, também foram realizados experimentos de RMN de ^{13}C e DEPT (FIGURA 52).

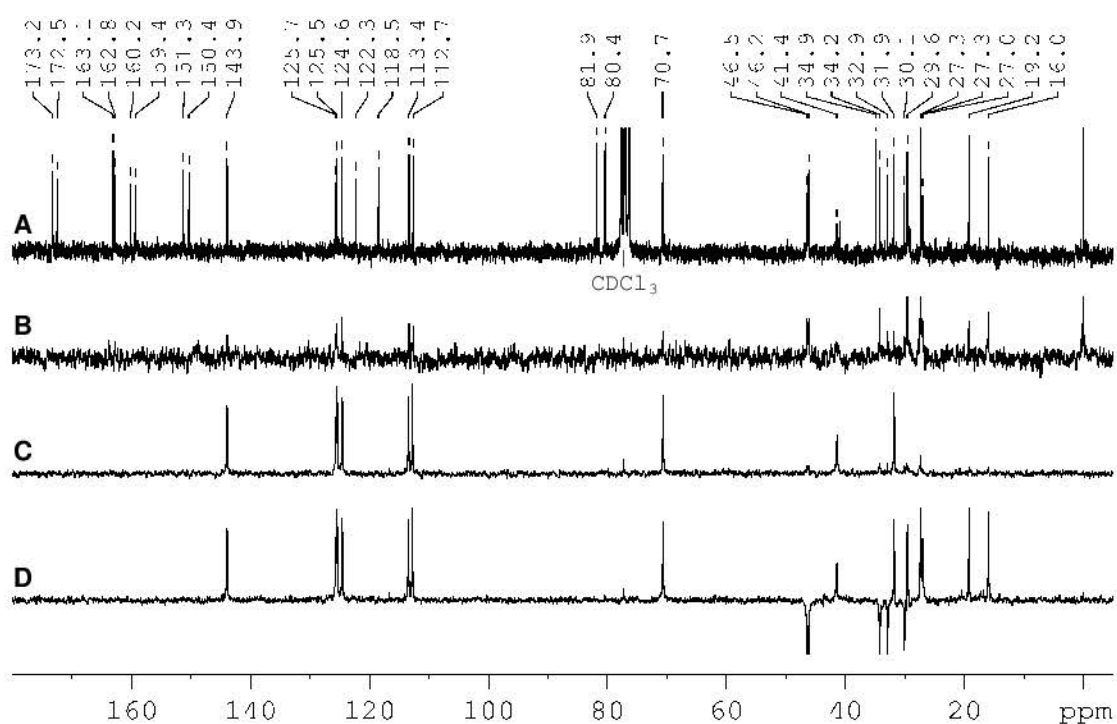


FIGURA 52 – ESPECTROS DE CARBONO (50,32 MHz)
 (A) RMN DE ^{13}C ; (B) DEPT 45; (C) DEPT 90; (D) DEPT 135
 NOTA: AMOSTRA BCO_B01

Os valores do experimento RMN de ^{13}C e sentidos dos sinais de experimentos DEPT 45, DEPT 90 e DEPT 135 foram tabelados com a finalidade de determinar a multiplicidade de cada carbono (TABELA 16). Isto é, foram determinados quantos hidrogênios estavam ligados a cada nuclídeo de carbono, na forma CH , CH_2 , CH_3 , ou se os carbonos eram quaternários, de acordo com os sentidos de sinal DEPT convencionados na TABELA 10 (Material e Métodos).

Esta apreciação serviu para calcular a primeira estimativa de massa molecular do composto. Para isto, foi considerado que em espectros de ^{13}C , picos acima de 160 ppm normalmente indicam função carbonila ($\text{C} = \text{O}$) e picos entre 60-80 ppm indicam carbonos ligados a oxigênio ($\text{C}-\text{O}$). Picos acima de 100 ppm são de carbonos sp^2 . Desta forma, a primeira estimativa foi de massa 419 u.m.a, considerando o esqueleto carbônico com hidrogênios, e de 515 u.m.a. incluindo os átomos de oxigênio.

O espectro de RMN de ^{13}C demonstrou que há trinta e três frequências de ressonância de carbono pela análise do composto puro. Da mesma forma que os valores de hidrogênio, os dados de deslocamento químico de carbono foram comparados com a literatura (BREITMAIER; VOELTER; BREITMAIER, 1987), (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010) e bancos de dados na internet, mas não sugeriam nenhuma informação trivial que identificasse um esqueleto de produto natural conhecido. Devido à sensibilidade relativa do carbono ser menor que a do hidrogênio, foi utilizado experimento com desacoplamento de núclídeos de hidrogênio, necessitando acúmulo de 20K transientes para análise diluída e de 8K transientes para amostra concentrada.

A medida que eram considerados os fragmentos possíveis, foi necessário correlacionar os valores de ligação direta, que como mencionado, foram obtidos a partir de experimentos HSQC, HMQC e HETCOR, determinando quais carbonos estavam ligados a quais hidrogênios. Os valores de deslocamento químico de hidrogênios acoplados a uma ligação ($^1J_{\text{C,H}}$) também estão apresentados na TABELA 16. Os carbonos da ligação dupla trans, por exemplo, ressonavam em δ_{C} 144,0 e δ_{C} 125,7 ppm.

Foram identificados seis carbonos metilas, cinco carbonos metilênicos, nove carbonos metínicos e treze carbonos quaternários. Dentre os carbonos quaternários, oito possuíam deslocamento químico acima de 150 ppm; dois na faixa convencional de deslocamento químico de aromáticos (sem substituição); dois entre 70 e 85 ppm; e apenas um na região de alifáticos. Totalizando foram 18 sinais com deslocamento maior (*downfield*) e 15 com deslocamento químico menor (*upfield*) que o sinal do clorofórmio deuterado (77 ppm, tripleto).

TABELA 16 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^{13}C , SENTIDOS DE SINAL EXPERIMENTOS DEPT E DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ^1H CORRELACIONADOS A CARBONO ($^1\text{J}_{\text{C,H}}$) DETERMINADOS POR EXPERIMENTOS HSQC, HETCOR E HMQC

δ_{C}	DEPT			m	δ_{H} [HSQC, HETCOR, HMQC ($^1\text{J}_{\text{C,H}}$)]
	45	90	135		
173,2	0	0	0	Cq	---
172,5	0	0	0	Cq	---
163,1	0	0	0	Cq	---
162,8	0	0	0	Cq	---
160,2	0	0	0	Cq	---
159,4	0	0	0	Cq	---
151,3	0	0	0	Cq	---
150,4	0	0	0	Cq	---
144,0	+	+	+	CH	5,81
125,7	+	0	+	CH	5,69
125,5	+	+	+	CH	7,15
124,6	+	+	+	CH	7,12
122,3	0	0	0	Cq	---
118,5	0	0	0	Cq	---
113,4	+	+	+	CH	6,95
112,7	+	+	+	CH	6,91
81,9	0	0	0	Cq	---
80,4	0	0	0	Cq	---
70,7	+	+	+	CH	4,22
46,5	+	0	-	CH ₂	0,80 / 1,80
46,2	+	0	-	CH ₂	2,52 / 2,74
41,5	+	+	+	CH	2,20
34,9	0	0	0	Cq	---
34,2	+	0	-	CH ₂	2,35 / 2,86
32,9	+	0	-	CH ₂	2,44 / 3,39
31,9	+	+	+	CH	1,83
30,1	+	0	-	CH ₂	1,54 / 2,23
29,6	+	0	+	CH ₃	1,08
27,40*	+	0	+	CH ₃	2,38
27,31*	+	0	+	CH ₃	2,41
26,9	+	0	+	CH ₃	1,11
19,2	+	0	+	CH ₃	1,41
16,0	+	0	+	CH ₃	1,15

*definido por experimentos bidimensionais

Os experimentos de HSQC, HMQC e HETCOR confirmaram que 20 dos 33 carbonos eram ligados a átomos de hidrogênio. O uso de experimentos HMQC obtiveram boa definição para assinalar os hidrogênios ligados a carbono, contudo resultou em saturação de hidrogênio no detector devido ao ajuste de ganho e ausência de gradiente de campo. Portanto, também foi realizado o experimento HETCOR (composto puro) para complementação dos dados que permaneceram ambíguos ou indefinidos após o experimento de HSQC (composto bruto) (ANEXO 4).

Quatro das seis metilas já haviam sido identificadas pelo experimento RMN de ^1H e foram confirmadas pelos demais experimentos. Porém, permanecia a dúvida se os sinais $\delta_{\text{H}} 2,38$ e $\delta_{\text{H}} 2,41$ eram referentes a seis hidrogênios de duas metilas desdobradas num grupo isopropil (6H); ou de duas metilas independentes. Quando em experimentos bidimensionais comuns, os sinais $\delta_{\text{H}} 2,38$ e $\delta_{\text{H}} 2,41$ não tinham resolução suficiente e, por isso, foram setados experimentos detalhados com muitos acúmulos, transientes e pontos digitalizados.

Sinais com deslocamento químico próximo de 2 ppm são provavelmente metilas (CH_3) próximas a $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$ ou anéis aromáticos. A confirmação que $\delta_{\text{H}} 2,38$ e $\delta_{\text{H}} 2,41$ ppm eram pertencentes a metilas ligadas a anel aromático só foi possível com a análise conjunta dos experimentos e confirmação de deslocamento químico de dois carbonos (um para cada 3H). Esses dois sinais resultavam em integração equivalente 6H a 8H ($\int_{\text{grupo}} = 6$ a 8), pois ficavam sobrepostos aos sinais dos hidrogênios $\delta_{\text{H}} 2,35$ e $\delta_{\text{H}} 2,44$ (FIGURA 53). Foi identificado que cada um destes sinais pertence a um grupo metileno distinto com hidrogênios diastereotópicos. Através de experimentos bidimensionais, com grande resolução na frequência do carbono, foi possível diferenciar os deslocamentos químicos de dois carbonos $\delta_{\text{C}} 27,31$ e $\delta_{\text{C}} 27,40$ (valor mediano). Estes carbonos, algumas vezes foram definidos como $\delta_{\text{C}} 27,38$ e $\delta_{\text{C}} 27,41$, respectivamente, pois apresentavam pequena variação de deslocamento químico entre experimentos, como pode ser visualizado nas expansões de experimentos bidimensionais (FIGURA 53). Além disto, ficavam próximos ao carbono $\delta_{\text{C}} 26,9$ pertencente à metila $\delta_{\text{H}} 1,11$.

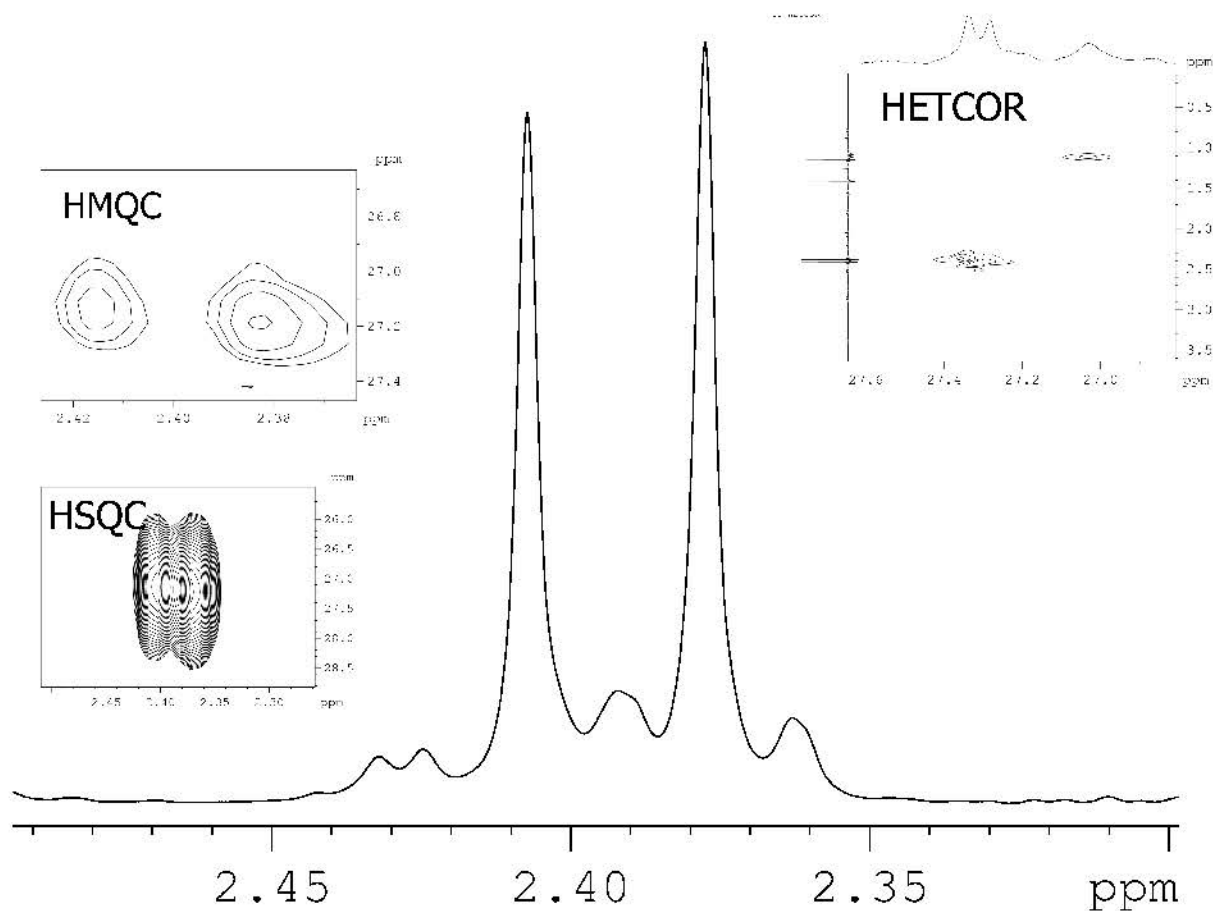


FIGURA 53 – EXPANSÃO DO ESPECTRO RMN DE ^1H (COMPOSTO PURO, 600 MHz); DOIS SINGLETOS δ_{H} 2,38 ($J=3$, CH_3); δ_{H} 2,41 ($J=3$, CH_3) SOBREPSTOS AOS SINAIS δ_{H} 2,35 (H_A DE CH_2 , δ_{C} 34,2) E δ_{H} 2,44 (H_A DE CH_2 , δ_{C} 32,9) EXPANSÕES BIDIMENSIONAIS DE EXPERIMENTOS HMQC; HSQC; HETCOR DE CORRELAÇÃO DIRETA ($^1J_{\text{C,H}}$)

Um deslocamento químico entre 2,0 e 3,0 ppm poderia indicar também a presença de ligação a um nitrogênio. Contudo esta hipótese não foi constatada pela marcha fitoquímica ou pela espectrometria de massas. Um grupo de experimentos testou para alcalóides e outro grupo testou para aminas e compostos nitrogenados, mas todos testes obtiveram resultado negativo.

Sinais com deslocamento químico ao redor de δ_{H} 3,5 a 4,0 ppm são geralmente adjacentes ao oxigênio, em função álcool, éter ou outra configuração química. Maregesi e colaboradores (2010) encontraram um tripleto δ_{H} 3,45 ppm, que é típico para H-3 de triterpenos com um substituição hidróxi. No composto ativo, o sinal identificado em δ_{H} 3,39 ppm lembra um tripleto, porém não se referia a configuração de um triterpeno. Este sinal, ao contrário, era referente a um hidrogênio de grupo metileno diastereotópico com multiplicidade de um duplo dubleto.

Apenas um hidrogênio adjacente a hidroxila, com deslocamento químico δ_H 4,22 ppm foi evidenciado na estrutura do composto. Carbonos correspondentes a ligação com oxigênio foram identificados pela análise do espectro de HSQC como dois carbonos quaternários e um grupo oxi-metino. Este possuía deslocamento δ_C 70,7 ppm, que é referente ao átomo de carbono ligado ao hidrogênio relatado.

É provável que os dois oxigênios presentes nos carbonos quaternários com deslocamentos δ_C 80,4 ppm e δ_C 82,0 ppm estejam completando, cada um, uma ligação éter ao invés de função hidroxila livre. Valores na faixa de δ_C 76 a 88 ppm são caracteristicamente de oxigênios com função éter em estrutura aberta ou presentes em ciclos com heteroátomos (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010). Os valores ainda podem ser deduzidos por valores de seus deslocamento referência, somado às contribuições de desblindagem proporcionados aos anéis pela função éter em anel, conforme se observa em uma sequência de compostos da NMRShiftDB.

Todos os grupos metilenos identificados tiveram deslocamento químico heterotrópico, ou seja, cada hidrogênio de cada metileno (CH_2) apresentava um deslocamento químico ($H_a \neq H_b$) diastereotópico. Além disto, por não serem magneticamente equivalentes, apresentavam acoplamento geminal, como caracterizado pelos valores $J_{a,b}$; descritos ao longo dos resultados.

Formalmente, se não houver um plano espelhado no plano X-C-Y ou um eixo C2 bissetriz do ângulo H-C-H, os dois hidrogênios de um grupo metileno são não equivalentes (JACOBSEN, 2007, p. 56). A presença ou ausência de simetria em uma estrutura molecular determina o número de deslocamentos químicos distintos que se observa em um espectro de RMN (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010). Compostos contendo elementos de simetria ou quiralidade representam um tipo de desafio (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010, p. 71).

Foram identificados cinco grupos metileno, conforme TABELA 16, entretanto alguns hidrogênios que apresentavam muitos desdobramentos só foram identificados após experimento HETCOR (CNST 145Hz, $^1J_{CH}$) (FIGURA 54). A mesma informação é confirmada pelo experimento HSQC (FIGURA 55), mas necessitava ser reconfirmado, pois os sinais δ_H 1,54, δ_H 2,20 e δ_H 2,23 eram incompreensíveis. A complementação destes sinais com os valores de acoplamento só foi possível por meio de experimentos bidimensionais de correlação homonuclear

do estilo COSY-DQF sensível a fase.

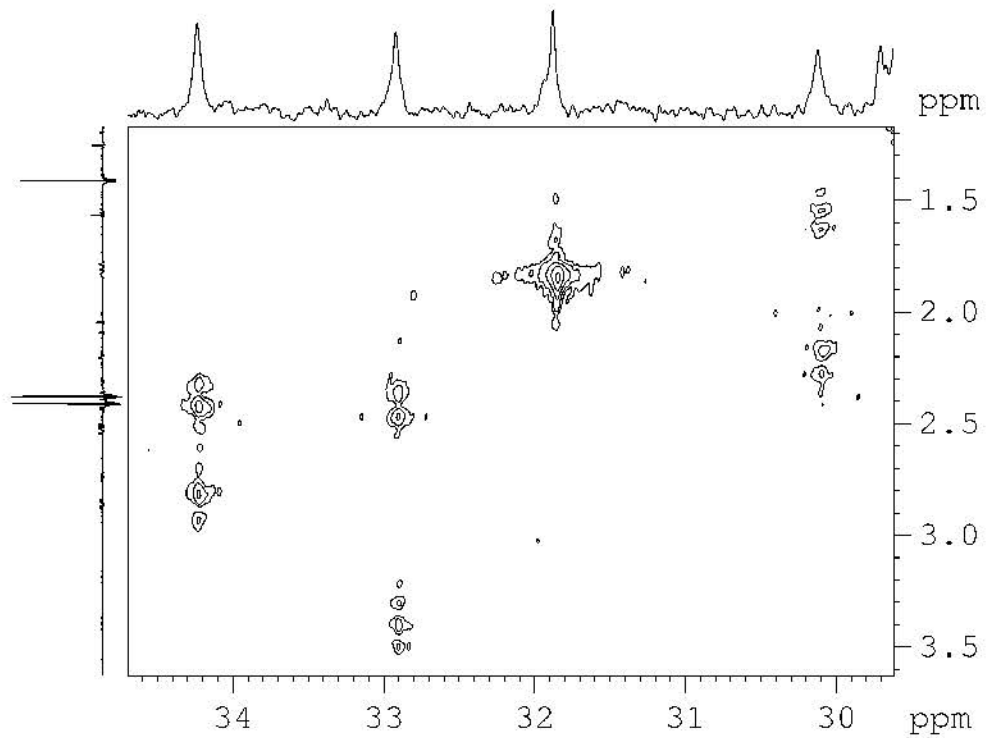


FIGURA 54 - HETCOR $^1J_{CH}$ - DEMONSTRANDO VALORES DE CARBONOS CH₂ (34,2; 32,9 E 30,1 PPM) E SUAS CORRELAÇÕES DIRETAS. RESPECTIVAMENTE HIDROGÊNIOS (2,35 E 2,86); (3,39 E 2,44) E (2,23 E 1,54). TAMBÉM APRESENTA A CORRELAÇÃO DA METINA CH 1,83 COM 31,9

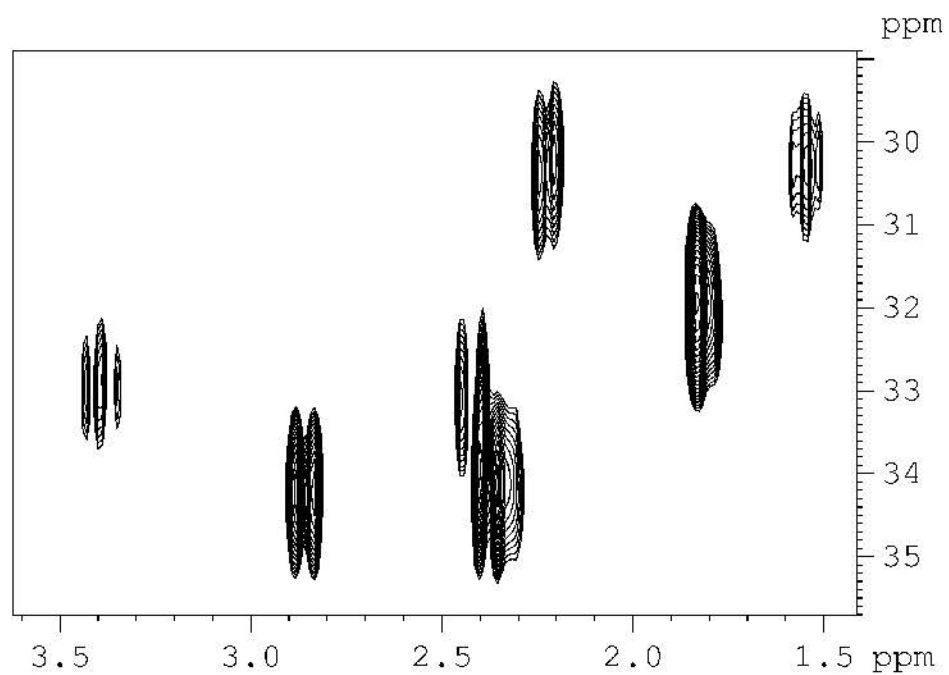


FIGURA 55 - EXPANSÃO DA REGIÃO HSQC DE 3 METILENOS (2,35 E 2,86); (3,39 E 2,44) E (2,23 E 1,54) E 1 METINA (1,83)

Após identificação dos principais grupos, era necessário conectá-los em fragmentos prováveis. Para isto, foram utilizados experimentos de correlação a longa distância HMBC, HETCOR long range e COLOC. Reconhecer grupos alquila de até quatro carbonos, é particularmente um início simples, como por exemplo grupos etila caracterizados por um tripleto para o CH₃ e um quarteto para um CH₂. Entretanto, apenas grupos metilas foram identificados. Nem ao menos um grupo metoxila (CH₃—O—) foi detectado na estrutura do composto ativo.

A anotação de dados de correlação a longa distância (TABELA 17) forneceram dados para proposta dos primeiros fragmentos. No entanto, para confirmação de muitos sinais, foram necessários experimentos adicionais de HMBC com resolução muito alta, tanto em F1, como em F2. Portanto, foram realizados experimentos com redução de janela espectral em F1 (frequência do carbono) como o experimento selective HMBC (sHMBC, 600 MHz) e com mais pontos digitalizados em F2 (frequência do hidrogênio). Além disto, experimentos HETCOR *long range* e COLOC completaram a informação dos dados através da variação de parâmetros CNST, pois alterou a sensibilidade e intensidade de certas correlações heteronucleares (ⁿJ_{C,H}), onde n variou de 1 a 4 ligações de distância.

As correlações de HMBC a partir dos deslocamentos químicos δ_H 1,11 com δ_C 29,6 e δ_H 1,08 com δ_C 26,9; revelaram correlação entre duas metilas em posição geminal. Além disto, os demais valores de correlação para δ_H 1,11 e δ_H 1,08; presente para ambos, confirmou que o carbono quaternário ao qual os dois grupos metila estão ligados em posição geminal tem deslocamento químico δ_C 34,8. Também foram reveladas as duas conexões restantes do carbono δ_C 34,8: uma ao carbono olefínico δ_C 144,0 e outra ao carbono metilênico δ_C 46,4. Com menor intensidade, foi perceptível a correlação a longa distância ⁴J com o carbono olefínico δ_C 125,7 e com o carbono metínico δ_C 31,9.

Assim, a partir da definição das correlações químicas dos hidrogênios das metilas geminais e da dupla trans, foi possível realizar a primeira união de fragmentos propostos. A dupla trans foi situada em posição alfa ao carbono quaternário ligado às duas metilas geminais.

TABELA 17 - DESLOCAMENTO QUÍMICO, MULTIPLICIDADE E ACOPLAMENTOS E VALORES DE CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DETERMINADOS POR HMBC, HETCOR LONG RANGE E COLOC

Deslocamento químico, multiplicidade e constantes de acoplamento	Correlações HMBC, sHMBC, HETCOR long range e COLOC ($^nJ_{C,H}$)
CH₃	
1,08 s	26,9 ³ J / 31,9f ⁴ J / 34,8F ² J / 46,4 ³ J / --- / 144,0 ³ J
1,11 s	29,6f ³ J / 31,9 ⁴ J / 34,8 ² J / 46,4F ³ J / 82,0f ⁵ J / 144,0 ³ J
1,15 s	31,9 ³ J / 34,2 ⁴ J / 70,7 ³ J / 82,0 ² J
1,41 s	41,4 ³ J / 46,2 ³ J / 80,4 ² J
2,38s (A)	34,2 ⁴ J / 118,5 ³ J / 125,4 ³ J / 151,3F ² J / 159,4f ⁴ J
2,41s (B)	122,3 ³ J / 124,6 ³ J / 150,4F ² J / 160,2f ⁴ J
CH₂	
0,80 dd (J = 14,9 : 4,3 Hz)	29,6f ³ J / 34,2F ³ J / 34,8 ² J / 31,9 ² J / --- / ---
1,80 dd (J = 14,9 : 1,9 Hz)	26,9 ³ J / 34,2F ³ J / 34,8 ² J / 31,9 ² J / 29,6f ³ J / 82,0 ³ J
1,54 ddd (J = 17,5 : 11,2 : 8,4 Hz)	19,2 ⁴ J / 70,7 ² J
2,23 ddd (J = 17,5 : 5,7 : 1,8 Hz)	32,9 ³ J / 34,2 ⁵ J / 41,5 ² J
1,83 dddd (J = 5,4 : 4,3 : 2,5 : 1,9 Hz)	34,8 ³ J / 46,4f ² J / 82,0 ² J
2,20 dddd (J = 13 : 8,4 : 5,7 : 4,2 Hz)	19,2 dist. ³ J / 32,9 ² J
2,52 dd (J = 13,4 : 10,8 Hz)	19,2 ³ J / 41,5 ³ J / 80,4F dist ² J / 125,7 ² J / 144,0 ³ J
2,74 ddd (J = 13,4 : 4,3 : 1,6 Hz)	19,2 ³ J / 41,5f ³ J / 80,4F ² J / 125,7 ² J / 144,0 ³ J
2,35 dd (J = 17,4 : 2,5 Hz)	31,9f ² J / 46,4f ³ J / 82,0 ³ J / 118,5 ² J / 125,4f ⁴ J / 151,4f ³ J / 159,4 ³ J
2,86 dd (J = 17,4 : 5,4 Hz)	31,9F ² J / 46,4F ³ J / 118,5 ² J / 159,4 ³ J
2,44 dd (J = 17,9 : 4,2 Hz)	41,5f ² J / 80,4f ³ J / 122,5f ² J / 124,6f ⁴ J
3,39 ddt (J = 17,9 : 13 : 1,8 Hz)	41,4 ² J / 122,3 ² J / 160,2F ³ J
Oxi-metino	
4,22 d (J = 11,2 Hz)	16,0 ³ J / 30,1f ² J / 31,9f ³ J / 41,4 ³ J / 82,0 ² J
Dupla	
5,69 ddd (J= 16,0 : 10,8 : 4,3 Hz)	34,8F ³ J / 46,2 ² J / 80,4f ³ J / 144,0 ² J
5,81 dd (J= 16,0 : 1,6 Hz)	26,9 ³ J / 29,6 ³ J / 34,8 ² J / 46,2 ³ J / 46,4 ³ J / 125,7 ² J
Aromáticos (não benzenóide)	
6,91 s (A)	34,2f ⁴ J / 118,5 ³ J / 159,4 ² J / 162,8 ² J / 173,2 ³ J
7,15 s (A)	27,4 ³ J / 118,5 ³ J / 151,3 ² J / 159,4f ⁴ J / 162,8 ³ J / 173,2 ⁴ J
6,95 s (B)	32,9 ⁴ J / 122,3 ³ J / 160,2 ² J / 163,1 ² J / 172,6 ³ J
7,12 s (B)	27,31 ³ J / 122,3 ³ J / 163,1 ³ J / 172,6 ⁴ J

NOTA: F – Forte; f – fraco; dist – distorcido

Da mesma forma, foi possível evidenciar que havia outras duas metilas δ_H 1,15 e δ_H 1,41 que possuíam correlação a longa distância a carbonos com ligação típica a oxigênio. Inclusive, o hidrogênio δ_H 4,22 possuía correlação com carbono δ_C 82,0 ; o mesmo que correlacionava com os hidrogênios de metila δ_H 1,15. Desse modo, foi considerado que os carbonos δ_C 82,0 e δ_C 70,7 estavam ligados entre si; e cada um estava ligado a um oxigênio. Considerando as correlações, era possível que houvesse um carbono metínico entre estes núcleos, visto que a característica do sinal δ_H 4,22 era um dubleto. Entretanto, a opção de ligação direta prevaleceu após verificação de experimentos do tipo COSY e TOCSY, demonstrando que o desdobramento era influenciado por um hidrogênio vicinal, contudo pertencente a um grupo metileno diasterotópico (CH_2). Apenas um hidrogênio δ_H 1,54 do grupo CH_2 apresentava constante de acoplamento perceptível com o hidrogênio δ_H 4,22.

O carbono δ_C 80,4 não estava próximo a estes carbonos oxigenados. Apenas os hidrogênios δ_H 1,41 e δ_H 2,74 apresentavam correlação facilmente identificável com esse núcleo através de experimentos HMBC. O hidrogênio δ_H 2,52 apresentava correlação distorcida; e o hidrogênio δ_H 2,44 apresentava correlação perceptível apenas após reprocessamento bidimensional dos dados. Essas correlações, entretanto, foram claramente evidenciadas pelo experimento HETCOR long range (otimizado para 15Hz) (FIGURA 56), que também revelou correlação com o hidrogênio δ_H 1,54.

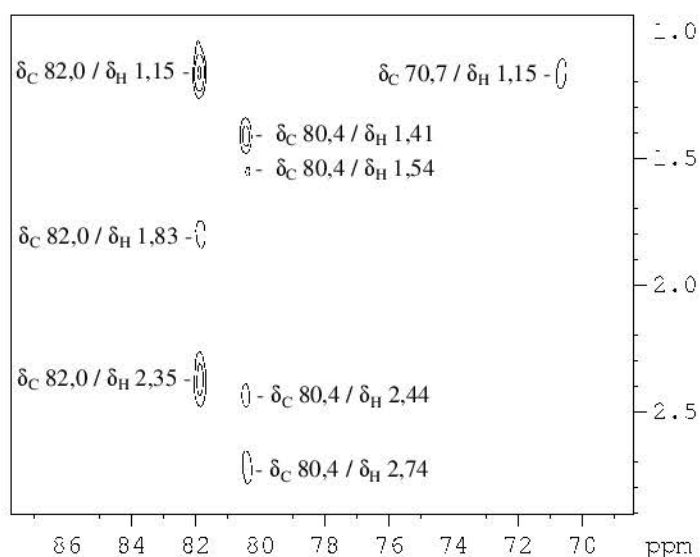


FIGURA 56 - MAPA DE CORRELAÇÃO DO EXPERIMENTO HETCOR LONG RANGE (OTIMIZADO 15 Hz) PARA CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA (200,13 MHz), COMPOSTO PURO

No mesmo experimento HETCOR, em complementação aos dados HMBC, o carbono δ_C 82,0 apresentava correlações com os sinais de hidrogênio δ_H 1,15; δ_H 1,80; δ_H 1,83 e δ_H 2,35. Respectivamente, estas correlações eram referentes aos hidrogênios da metila substituinte em δ_C 82,0; a um hidrogênio ligado ao carbono δ_C 46,4; ao hidrogênio de grupo metino (CH) em posição alfa; e a um hidrogênio ligado ao carbono δ_C 34,2.

Logo, fragmentos foram propostos (FIGURA 57), e os que correlacionavam foram ligados respeitando as corretas distâncias de ligação, permitindo identificar parcialmente o esqueleto central da molécula. Apesar da dificuldade de assinalamento, foi possível indicar um anel com muitos átomos, ao invés de um composto alifático. Apenas um entre dois hidrogênios de grupos CH_2 diastereotópicos, apresentavam correlação forte ao carbono δ_C 82,0, como nos dois casos δ_H 1,80 e δ_H 2,35. A provável hipótese de fechamento de um grande ciclo foi reforçada por diferenças de intensidade de correlação a longa distância em experimentos HMBC, mesmo para grupos idênticos. Eram evidentes diferenças de interação espacial através das ligações químicas dependentes de posicionamento espacial "rígido", como no caso das metilas geminais.

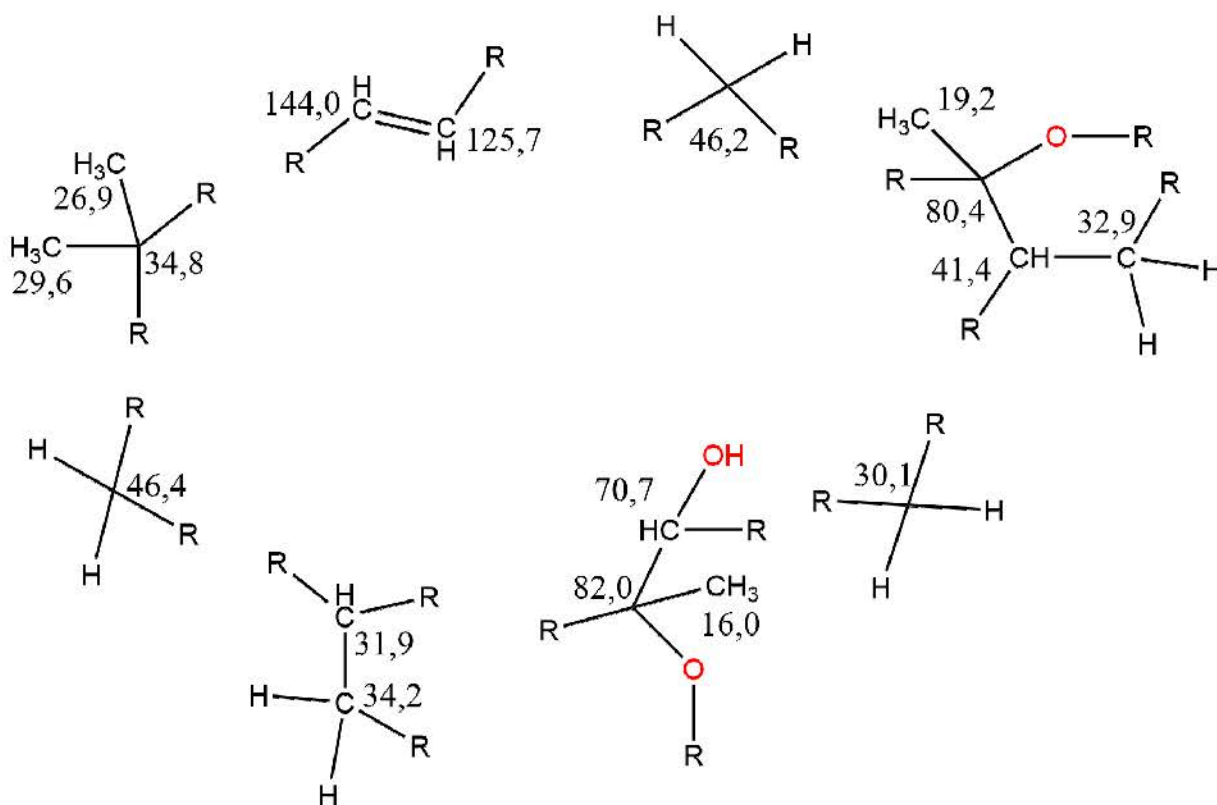


FIGURA 57 - PRIMEIROS FRAGMENTOS PROPOSTOS (COM INDICAÇÃO DE DESLOCAMENTO QUÍMICO DE ^{13}C , ppm)

A união de fragmentos foi realizada pela ligação da dupla trans ao carbono δ_C 34,8; ligados às metilas geminais. Os hidrogênios destas metilas correlacionavam ao grupo metileno δ_C 46,4 e de modo menos intenso com o carbono metínico δ_C 31,9. De acordo com as correlações dos hidrogênios destes grupos ao carbono oxigenado δ_C 82,0, como discutido anteriormente, foi possível propor um fragmento com cadeia carbônica contínua desde o carbono de dupla trans δ_C 125,7 até o carbono oxigenado δ_C 70,7.

Além disto, como verificado, o carbono δ_C 70,7 possuía carbono metilênico vizinho (δ_C 30,1). Do mesmo modo, a dupla trans também possuía um carbono metilênico vizinho (δ_C 46,2). As correlações HMBC dos hidrogênios δ_H 2,52 e δ_H 2,74 possuíam mesma intensidade aos dois carbonos de dupla. Logo, a posição dos hidrogênios da dupla trans necessitou ser determinada por soma de contribuições, conforme Crews (2010). As metilas vicinais ligadas ao carbono quaternário em posição alfa contribuía para a desblindagem do carbono δ_C 144,0; enquanto o grupo metilênico δ_C 46,2 é vizinho ao carbono δ_C 125,7.

Todavia, hidrogênios de ambos grupos metilenos (δ_C 30,1 e δ_C 46,2), que se posicionavam nos extremos da parte elucidada da molécula, correlacionavam com o mesmo carbono metínico δ_C 41,5. Assim, a conexão entre fragmentos resultou em um ciclo de onze carbonos, com quatro metilas substituintes, que pode ser comparado ao esqueleto alfa-humuleno (FIGURA 58). Os valores de correlação para a elucidação dos núcleos neste esqueleto tipo-humuleno e posição de substituintes foi alcançado através da complementação dos diversos experimentos de HMBC, HETCOR Long-Range e COLOC, conforme já mencionado na TABELA 17.

Alfa-humuleno é um sesquiterpeno cíclico (de fórmula $C_{15}H_{24}$) com três ligações duplas e seis posições alílicas, todas elas, teoricamente capazes de serem oxidadas (ZIGON et al., 2015). Uma das duas ligações duplas C=C tri-substituídas (com grupo metila) é significativamente mais reativa (NEUENSCHWANDER; CZARNIECKI; HERMANS, 2012). Grupos químicos com essa característica são considerados sesquiterpenos originários da via dos terpenóides (ou isoprenóides) com três unidades de isopreno, totalizando quinze carbonos na estrutura. Existem duas vias metabólicas que criam terpenóides: via do ácido mevalônico (MVA) e a via MEP/DOXP. Um segmento da via MVA, com ação das enzimas (2E,6E)-farnesil-difosfato-liase e alfa-humuleno sintase, é ilustrada na FIGURA 59, pois é a via de

terpenóides presente em fungos.

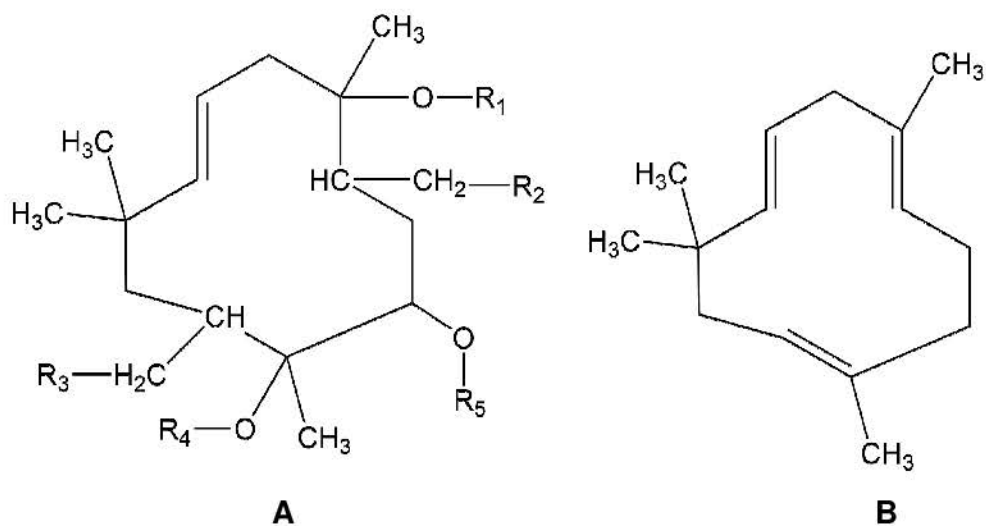


FIGURA 58 – COMPARAÇÃO ENTRE (A) FRAGMENTO ELUCIDADO DO COMPOSTO ATIVO E (B) ALFA-HUMULENO

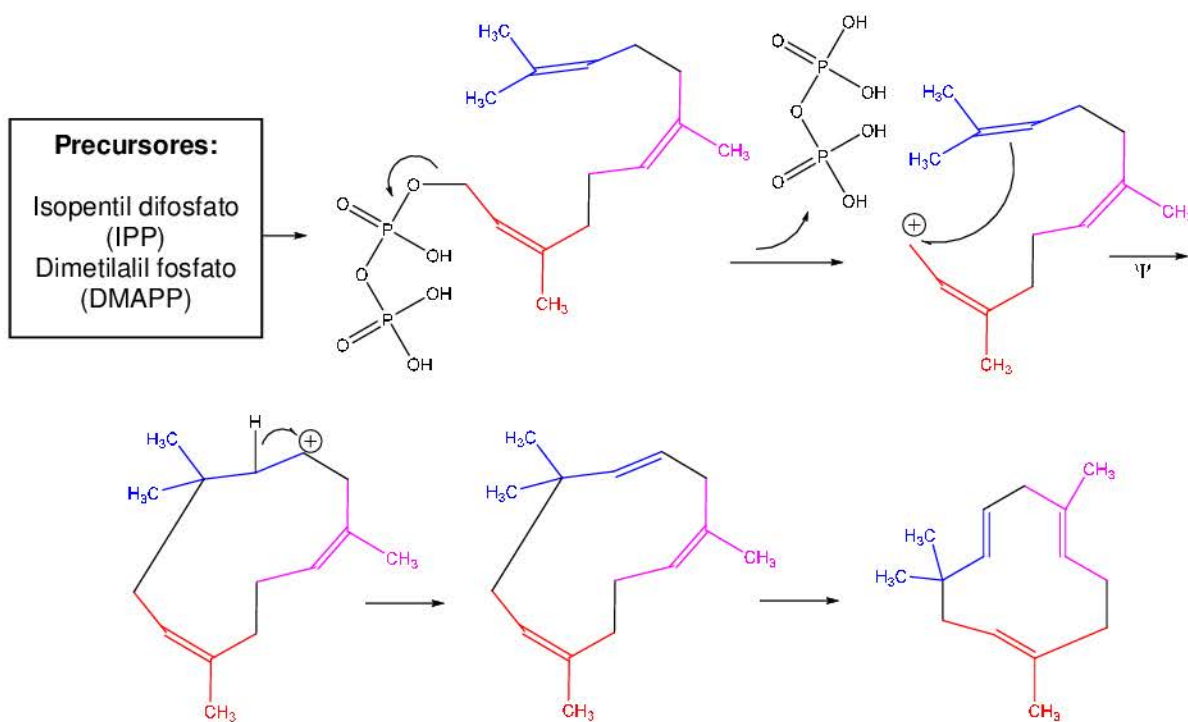


FIGURA 59 - BIOSSÍNTESE DO ALFA-HUMULENO VIA AÇÃO DA ENZIMA (2E,6E)-FARNESIL-DIFOSFATO-LIASE E ALFA-HUMULENO SINTASE
 FONTE: ADAPTADO DE TALPATRA E TALPATRA (2015, P.467) E (KEGG, 2015)

O primeiro composto estilo sesquiterpeno isolado a partir do corpo de frutificação de um fungo foi isolado de *Lactarius hirtipes* por Lin e Ji-kai (2002). A molécula, representada na FIGURA 60, é muito similar ao núcleo central do composto ativo. Os dados foram comparados, através do conjunto de informações espectrais e espectrométricas obtidas, evidenciando muitas similaridades.

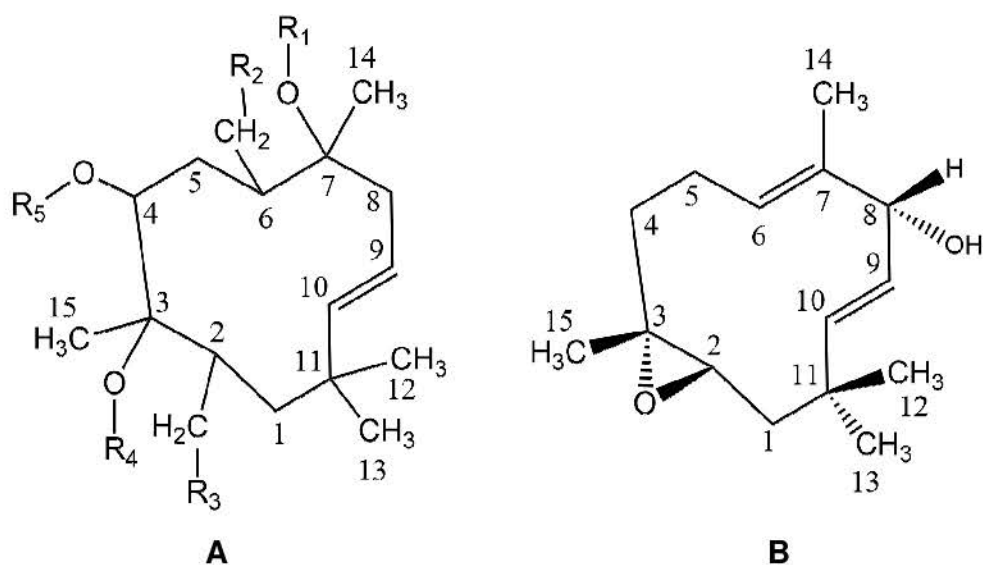


FIGURA 60 - COMPARAÇÃO ENTRE (A) FRAGMENTO ELUCIDADO DO COMPOSTO ATIVO; (B) ESQUELETO TIPO-HUMULENO ISOLADO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *Lactarius Hirtipes*;
 FONTE: (A) O AUTOR (2015) E (B) (LIN; JI-KAI, 2002)
 NOTA: NUMERAÇÃO ESPECÍFICA DE LIN; JI-KAI (2002)

Percebe-se que o esqueleto tipo-humuleno do trabalho de Lin e Ji-kai (2002) possui substituições do tipo hidróxi e do tipo epóxido. A presença desses grupos funcionais poderia ser explicada pela ação de enzimas. Uma possibilidade é a participação da enzima alfa-humuleno 10-oxidoreductase (E.C. 1.14.13.150), com participação de NADPH (FIGURA 61). Também poderiam haver outros pontos de substituição, considerando que existem outras enzimas com esta função (ex. 8-hydroxylase-alfa-humuleno) e também diferentes padrões de numeração do alfa-humuleno.

Posto que a produção do composto ativo está relacionada com a agitação do cultivo, é muito provável a participação da via respiratória (com emprego de oxigênio) sobre a via biossintética de formação do produto. Além disto, para síntese de um anel tipo-humuleno, ocorreria a reposição de NADP, com sequestro de H+

(ácido) do meio de cultivo e formação de água. Indiretamente, o aumento do valor de pH durante a síntese do composto ativo em biorreator poderia explicar este fenômeno. Possivelmente haveria participação de enzimas para a oxidação do metabólito secundário (desidrogenação), favorecendo a continuidade do metabolismo catabólico pela reposição de NADP^+ (forma oxidada) (DAVID L. NELSON, 2008).

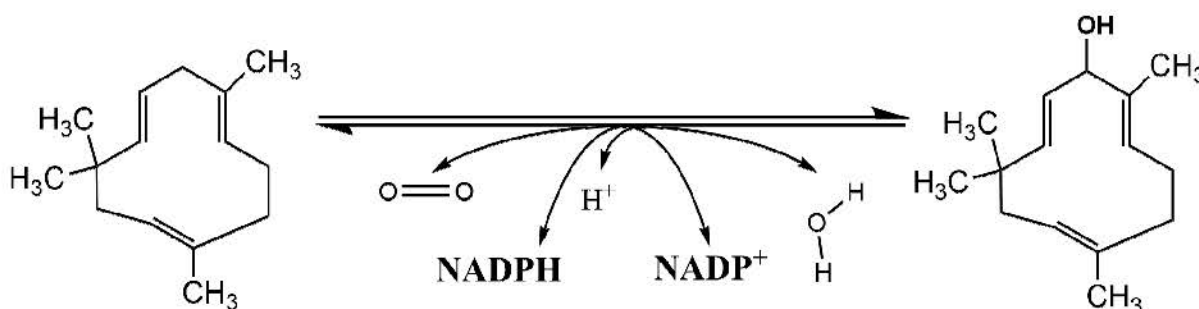


FIGURA 61 – AÇÃO DA ENZIMA
ALFA-HUMULENO,NADPH:OXIGÊNIO 10-OXIDOREDUTASE
FONTE: ADAPTADO DE (KEGG, 2015)

A função epóxido é altamente reativa e comporta-se enantioselectivamente para abertura da função epóxido em álcool ou éter (JANSSEN et al., 2006). Logo, se houvesse a presença do grupo funcional epóxido no anel tipo-humuleno, como ocorre no trabalho de Lin e Ji-kai (2002), muito provavelmente ocorreria reação. Apesar da proximidade dos radicais $\text{R}_1\text{-R}_2$ e $\text{R}_3\text{-R}_4$, não foi possível evidenciar através dos testes químicos nenhum anel tipo beta- ou gama-lactona, comuns em produtos naturais (RAUTER et al., 2001).

Entretanto, substituições em $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ e R_4 era incontestável. Considerando uma possível rota biossintética para metabólitos Xenovulene A®, Raggatt et al. (1997); Bailey et al. (2007); Geris e Simpson (2009) mostraram um caso específico em que os átomos de oxigênio ligados a um ciclo sesquiterpênico são originários de um composto sintetizado por outra via metabólica. Assim, foi favorecida a hipótese que havia a reação de sesquiterpenos e outra classe de compostos, sobretudo com os policetídeos.

Segundo a proposta inicial de Raggatt e colaboradores (1997), o anel humuleno teria a incorporação de uma porção ciclopentenona através de contrações sucessivas e participação intermediária de um precursor fenólico através de uma via

biossintética única.

De acordo com a proposta estrutural do composto ativo, havia dois grupos metileno com radical de substituição desconhecido. Posicionavam-se a seis ligações de distância, o que poderia indicar um composto com anéis em ponte (R_2 -substituinte- R_3). Contudo, a formação de anéis heterociclos com oxigênio pericondensados ao esqueleto tipo-humuleno era muito provável. Os carbonos que possuem deslocamentos químicos de δ_C 80,4 e δ_C 82,0 sugerem fortemente que os oxigênios ligados a estes átomos estão substituídos por outros grupos.

Portanto, os resultados de experimentos de correlação HMBC foram utilizados para validar tal hipótese. Havia, entretanto, a dificuldade de análise dos espectros de correlação a longa distância para anotação de valores das correlações de hidrogênios dos grupos CH_2 diastereotópicos (não equivalentes). Além disso, os sinais δ_H 2,35; δ_H 2,38; δ_H 2,41 e δ_H 2,44 resultavam em sobreposição nos experimentos bidimensionais.

Em alguns experimentos, o composto analisado encontrava-se puro na forma bruta, sem recristalização. Alguns artefatos, portanto, interferiram na análise, que foi replicada em condições similares com a amostra pura recristalizada em janela espectral distinta. Também foram realizados experimentos, na frequência de 400 MHz, variando o parâmetro CNST 8Hz e CNST 12Hz, com objetivo de favorecer diferentes intensidades de correlação.

Para apoiar as análises de correlação muito difíceis, foi fundamental o experimento de alta resolução *selective* HMBC (sHMBC), realizado na frequência de 600 MHz (ANEXO 5). O experimento foi setado com aumento de resolução na primeira dimensão (F1) para o incremento de número de pontos digitalizados, resultando em janela espectral com frequência de carbono entre δ_C 0 e 60 ppm. Outros experimentos, mas realizados na frequência de 400 MHz, possuíam frequência de carbono entre δ_C 0 e 120 ppm. Estes experimentos possibilitaram a análise das correlações dos hidrogênios diastereotópicos δ_H 2,44 e δ_H 3,39; δ_H 2,86 e δ_H 2,35; assim como as sobreposições δ_H 2,20 e δ_H 2,23; δ_H 1,80 e δ_H 1,83.

Como todos os grupos CH_2 possuíam hidrogênios diastereotópicos, era evidente que a falta de planos de simetria do composto fosse referente a formação de uma estrutura policíclica. Entretanto poderia ser um problema de interpretação dos mapas de correlação de HMBC. Achar um valor de correlação que

demonstrasse a ligação entre o fragmento elucidado e um possível anel aromático tornou-se difícil pelo fato de que uma das ligações que ocorreria entre os ciclos, se dá por um oxigênio heteroátomo. Além disso, os átomos de oxigênio ligavam-se a carbonos sem hidrogênios que indicassem correlação. Portanto, não são observáveis correlações $^3J_{CH}$ para hidrogênios com carbonos de anel aromático que completariam a estrutura policíclica.

A espectrometria de massas permitiu determinar a massa que seria do íon molecular e a partir daí, juntar os dados de RMN para determinação de fórmula molecular do composto ativo, que foi determinada por massa exata a partir do experimento de espectrometria de massas de alta resolução. A massa do composto foi definida em **548,2774**. Entre as possibilidades de fórmula molecular, a mais consoante com a deconvolução e com os experimentos de RMN foi **C₃₃H₄₀O₇**.

Segundo esse resultado, a fórmula molecular tinha um número de **insaturação 14**. Isto é, equivale ao número somado de duplas ligações, ciclos, grupos carbonila, etc. Considerando o fragmento elucidado (FIGURA 58-A), faltava incluir C₁₆H₁₂O₄ (268,07356 u.m.a.) à massa da estrutura, além de 12 unidades equivalentes de insaturação, visto que o fragmento elucidado possuía apenas 2 unidades de insaturação (um anel e uma dupla ligação).

Uma possibilidade poderia ser um derivado antraceno (FIGURA 62), que possui essa massa. A interpretação conjunta de dados de infravermelho permitiu gerar algumas novas idéias quanto à estrutura da molécula. Foi idealizado que haveria um grupo antraquinona ou um grupo similar a benzofenona ou antraquinona, conforme as frequências de absorção similares a benzofenona cm⁻¹ (transmit.): 1598, 1318 (0,27), 1176 (0,50), 1150 (0,60), 1083 (característico), 920 (0,43), 639 (0,35); e a antraquinona aloína (cm⁻¹): 2926, 2878, 1636, 1490, 1459, 1231, 1186, 1084, 1049, 912, 742, 629, 594. Essas absorções são muito similares ao composto ativo.

Grupos antraquinona são característicos da via biossintética dos policetídeos de fungos. Além disso, em uma confusão de análise de RMN (pelo HMBC) foi sugerida que havia correlação de hidrogênios aromáticos presentes em anéis diferentes correlacionando com uma única carbonila (δ_C 163,1), a qual estaria no anel central de um anel antraquinônico. Mesmo que esta hipótese **não** seja válida, outros dados também indicavam esta possibilidade, como alguns testes

químicos, perfil de absorção UV e alguns fragmentos de massa (como o íon 255 m/z). O derivado antraquinona possui 11 unidades de insaturação; caso completasse ligação em ponte (R_2 -substituente- R_3) ou (R_1 -substituente- R_4) com o anel tipo-humuleno, estaria em concordância. Contudo algumas características não faziam sentido, como hidrogênios em meta sem acoplamento e ligação em simetria.

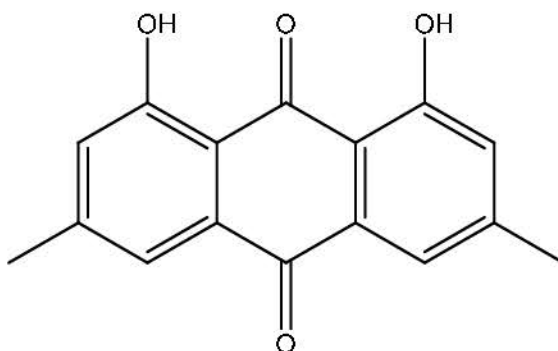


FIGURA 62 - DERIVADO ANTRAQUINONA DA VIA DOS POLICETÍDEOS

Contudo, havia a hipótese de haver dois fragmentos independentes ao invés de um único substituinte em ponte. Pela análise de dois experimentos RMN de ^{13}C independentes (dados não mostrados) foi perceptível que alguns sinais do composto ativo puro tiveram variação de deslocamento químico. Apesar de numericamente insignificante, foi possível verificar que cada um dos grupos com deslocamento químico $\delta_{\text{C}} 173,2$ e $\delta_{\text{C}} 172,5$ influenciavam sobre os sinais de carbonos acima de 80 ppm aos pares, exceto os pertencentes à dupla trans. Assim, concluiu-se que os spins de grupos de núcleos (exceto a dupla trans) estavam conectados em certa proximidade através de ligações químicas, evidenciando dois anéis diferentes, cada um influenciado por uma função carbonila.

Isto está em conformidade com a proposta e com a teoria de RMN. Se um conjunto de núcleos é vizinho de um elemento altamente eletronegativo ou um grupo de remoção de elétrons, tal como um grupo carbonila, a densidade de elétrons em torno dos núcleos é diminuída e o pico tem maior frequência de ressonância, pois o campo magnético efetivo é maior (JACOBSEN, 2007; CLARIDGE, 2009).

Além disso, pela análise de massas, descobriu-se que diferenças de massas de perda neutra correspondiam aos fragmentos da molécula que faltava elucidar. Isto foi evidente tanto no modo de ionização positiva como no modo negativo.

A diferença entre o íon 571 (modo positivo) e o íon 547 (modo negativo) e seus correspondentes fragmentos obtidos por reação MS^2 (fragmentação de íons selecionados), possuíam perda neutra **164 u.m.a.** A massa faltante de 328,09469 é equivalente a $C_{18}H_{16}O_6$.

Perdas neutras de massa, resultantes dos experimentos MS^2 :

$$ESI(+): \quad 571 - 407 = 164$$

$$ESI(-): \quad 547 - 383 = 164$$

Logo, a substituição de R_1, R_2, R_3 e R_4 (FIGURA 58-A) por dois fragmentos equivalentes (independentes) foi respaldada por estes experimentos. Havia presença de dois fragmentos de massa 164,04734, equivalente a $C_9H_8O_3$.

Os quatro sinais singletos menos intensos são referentes aos deslocamentos químicos δ_H 6,91; δ_H 6,95; δ_H 7,12 e δ_H 7,16; que são correspondentes a hidrogênios em região de aromático.

Se for observado um par de dupletos entre 7 e 8, é provável que seja um anel aromático para-substituído, pois este padrão é característico da dissubstituição. A princípio, os sinais tinham aspecto de dois dubletos em região de aromático, visto que a separação (0,04 ppm) sugestionava acoplamento. Entretanto, pelas análises bidimensionais, foi possível constatar presença de diferentes carbonos para cada átomo de hidrogênio. Além disto, os sinais variavam $\pm 0,02$ ppm; e a constante de acoplamento não se mantinha em campos magnéticos distintos. Também não era perceptivo efeito proveniente de acoplamento de segunda ordem entre os sinais (“efeito telhado”).

O singlete isolado δ_H 6,95 foi considerado como unidade relativa para a integração. Esta proposta só foi confirmada ao longo da elucidação estrutural. Antes, a ocorrência de sinais equivalentes “aos pares” (inclusive em RMN de ^{13}C) sugeria molécula simétrica (integração poderia ser dois), ou presença de isômeros em proporções idênticas (integração deveria ser independente). Estas duas hipóteses foram contrariadas a medida que informações eram coletadas de experimentos

adicionais. Além disso, todos os sinais de carbono acima de 80 ppm (exceto da de carbonos da dupla trans) aparentemente estavam aos pares, ou seja, para cada deslocamento havia um outro equivalente com deslocamento químico próximo. Desta forma, foi reforçada a hipótese de dois fragmentos similares.

O grupo dos sinais δ_H 7,12 e δ_H 7,16 apresentam tendência a desdobramento, por parecerem menos intensos, entretanto com transformadas e processamentos, transformavam-se em singletos alargados. Este resultado indica acoplamento a longa distância e confirmou proximidade 4J às metilas com δ_H 2,38 e δ_H 2,41. Os hidrogênios de um grupo ligado a um anel aromático raramente possuem acoplamentos significativos aos hidrogênios aromáticos aromáticos, pois estão a pelo menos 4J .

De fato, havia correlação a longa distância pelo experimento HMBC (FIGURA 63) dos sinais δ_H 7,12 e δ_H 7,16 com os carbonos de metila δ_C 27,31 e δ_C 27,4 respectivamente, mesmo que difícil resolução.

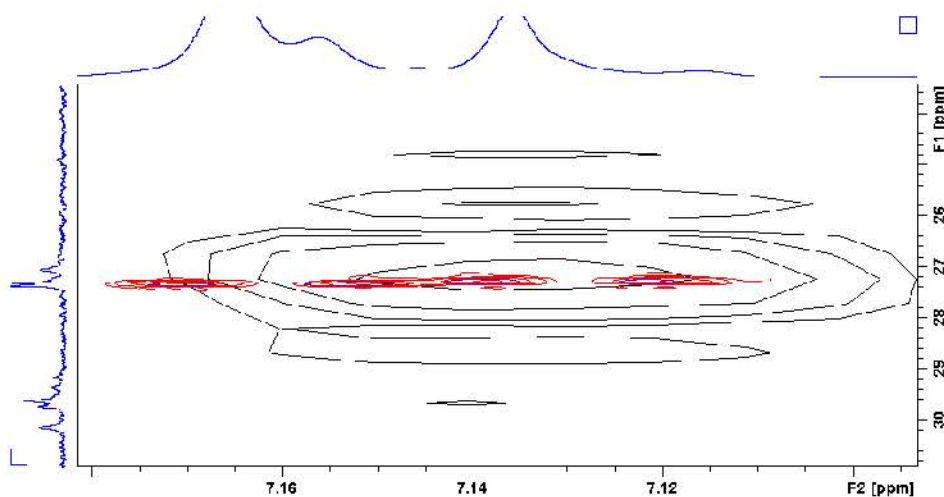


FIGURA 63 – CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DOS HIDROGÊNIOS δ_H 7,15 E δ_H 7,12 AOS CARBONOS DAS METILAS δ_C 27,4 E δ_C 27,31, RESPECTIVAMENTE, POR DOIS EXPERIMENTOS HMBC

Sinais acima de 7 ppm são, provavelmente aromáticos, mas podem eventualmente ser vinílicos se grupos carbonila (C=O) (ou similares) que estejam nas proximidades. Outras configurações de dupla ligação também podem resultar em tal deslocamento químico.

No experimento HETCOR long range (FIGURA 64), setado o valor CNST2 para o valor 15Hz, através da mudança dos valores D3 (de 0,00230000 para 0,050)

e D2 (de 0,00345000 para 0,050), pode-se observar para o composto ativo, acoplamento $^2J_{(C,H)}$ entre os núcleos de Hidrogênio δ_H 7,15 (correlação muito forte) e δ_H 6,91 (correlação fraca) com o carbono δ_C 122,3. Enquanto, para núclídeos com deslocamento de δ_H 7,12 (correlação muito forte) e δ_H 6,95 (correlação forte) apresentou correlação com o carbono δ_C 118,5. Esta observação levou à conclusão que estes hidrogênios estariam posicionados equidistantes de carbonos quaternários em função dupla ou anel aromático substituído. Além disto, possivelmente:

- δ_H 7,15 está para δ_H 7,12, assim como δ_H 6,95 está para δ_H 6,91;
- δ_H 7,15 e δ_H 6,95 estão próximos;
- δ_H 7,12 e δ_H 6,91 estão próximos

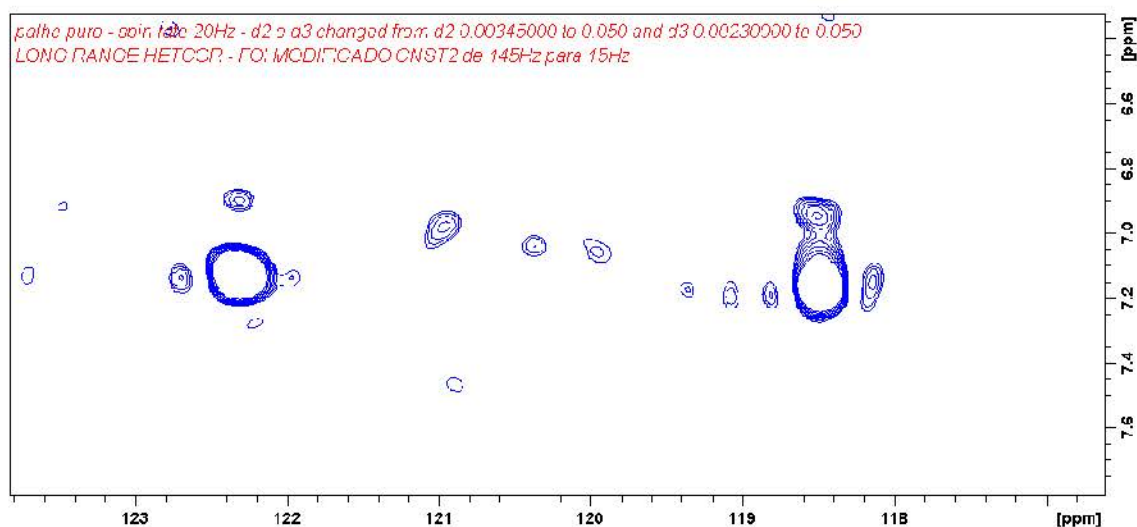


FIGURA 64 – HETCOR LONG RANGE (PARÂMETRO CNST2 15HZ)

Foi perceptível que um hidrogênio não tinha correlação com o carbono um do outro. Logo, os hidrogênios estariam em posição para. Além disto, o espectro de infravermelho (FIGURA 65) apresentava bandas típicas de dois anéis aromáticos 1,2,4,5-tetrasubstituídos, ou seja, também indicava os hidrogênios em **posição para** (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2007). Por isso, a primeira consideração foi de um anel de seis carbonos do tipo benzenóide, como as propostas indicadas na FIGURA 66, que foram discutidas até se chegar ao anel tropolone indicado na FIGURA 70.



FIGURA 65 – EXPANSÃO DE FREQUÊNCIAS HARMÔNICAS INDICANDO DOIS ANÉIS BENZÊNICOS 1,2,4,5-TETRA-SUBSTITUÍDOS POR VIBRAÇÕES C-H FORA DO PLANO

Para cada um dos dois fragmentos faltantes, considerados equivalentes, foram incluídas nas propostas grupos funcionais de acordo com os valores de deslocamento químico que sobraram. As metilas já identificadas (δ_H 2,38 e δ_H 2,41), que permitiram propor os carbonos ligado e dois vizinhos, também foram incluídas.

As propostas também foram complementadas por resultados de análises químicas, que indicavam grupos aromáticos e fenólicos. Os ensaios de cloreto férrico e benzidina, dentre outras análises, apresentaram resultado claramente positivo, demonstrando grupo fenólico na molécula.

Os deslocamentos químicos δ_C 173,2 e δ_C 172,6 são característicos de função éster ou de ácido livre, mas não de carbonila em anel. Entre as propostas válidas para os deslocamentos químicos próximo de δ_C 170-175 ppm estão grupos carbonila em forma ácido, em forma ácido com dupla em posição alfa, amidas, grupos éster e alguns encaixes específicos (CREWS et al., 2010).

Para oxigênios substituintes em dupla, evidenciados por deslocamentos químicos entre δ_C 150 a δ_C 165 ppm, foi considerado tanto um grupo fenólico como um grupo em ligação éter. De qualquer forma, poderia haver um ácido livre, que foi racionalmente proposto de acordo com dois resultados positivos indicativos para ácidos orgânicos. Contudo, a molécula não solubilizava em bicarbonato de sódio e

foram consideradas outras opções para as duas substituições (R_1 —substituinte 1— R_2) e (R_3 —substituinte 2— R_4).

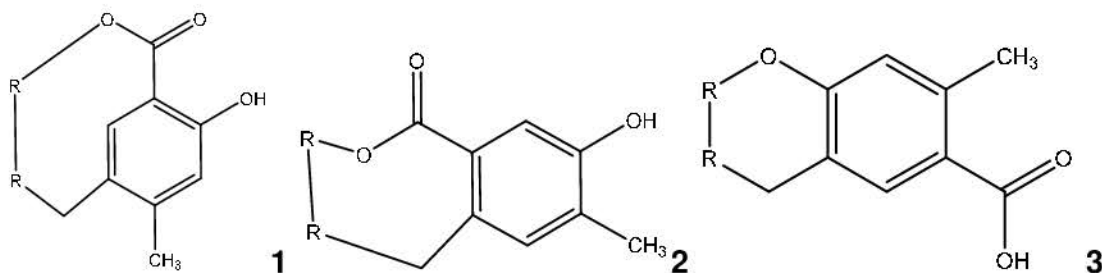


FIGURA 66 - PROPOSTAS (1) LIGAÇÃO META ÉSTER (2) LIGAÇÃO ORTO ÉSTER E (3) LIGAÇÃO ORTO ÉTER

A **proposta 1** havia sido aceita, pois segundo ela, reações de epóxido (tipo humuleno de fungo), com ácido benzílico (formando um intermediário perácido) são comuns e viáveis (reação de Prilezhaev) (KHAVRUTSKII; MUSAEV; MOROKUMA, 2004). Entretanto haveria tensão resultante na estrutura. Isto explicaria a fácil quebra nesta posição, conforme perda neutra de massa (MS). O anel benzenóide tem estabilidade planar e decorreria em impossibilidades estruturais. Contudo, análises tridimensionais demonstravam haver espaço atômico suficiente para o hidrogênio, pois o ciclo de 11 átomos do anel humuleno fazia estabilização por distribuição de tensões e espaçamento entre os núcleos. Contudo esta hipótese foi desconsiderada, pois havia dois valores inconsistentes de ressonância. Os carbonos das metilas ressonavam em $\delta_C \sim 27$ ppm, enquanto o valor característico de anel benzenóide é $\delta_C 18$ ppm. Isto demonstrava efeitos dissimilares de contribuições paramagnéticas. Um anel benzenóide não costuma contribuir com efeito tão forte de anisotropia magnética local para átomos de carbono. Efeitos paramagnéticos em carbono são maiores que os efeitos diamagnéticos (CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 2010, p. 88). Haveria, portanto uma interferência de posição espacial.

A **proposta 2** seria compatível com vários resultados, inclusive com o resultado positivo para anel fenólico, dados de IR tetrasubstituídos e RMN. Entretanto, quando se observou as intensidades e ordens de aparecimento das correlações a longa distância nos experimentos de RMN, estes não permitiam considerar o padrão proposto de substituição. Para esta dedução foi necessário analisar os experimentos COLOC e HMBC com CNST de 12 Hz.

A **proposta 3**, com função ácido livre, foi a primeira proposta válida a ser considerada para formação da estrutura pentacíclica. Estava em concordância com o número de insaturação calculado pelos dados de espectrometria de massas. A função ácido carboxílico livre estava de acordo com os valores de deslocamento químico. Além disto, havia o respaldo dos experimentos químicos para ácidos orgânicos e para ácidos carboxílicos pelos testes químicos. O metileno substituído estava em posição orto à substituição éter, com hidrogênios em posição *para*, com frequências de absorção IR indicativas de anéis benzênicos 1-2-4-5-tetra-substituídos. Inclusive, os valores de correlação a longa distância de RMN pareciam razoáveis. Entretanto, esta proposta foi incompatível por três motivos. O valor do carbono de anel que está substituído pela função ácido apresentou deslocamento químico de δ_C 162,8 (considerando posição relativa de correlações). Normalmente este valor é estimado entre 110 a 130 ppm. Além disto o valor da metila CH_3 está estimado em $\delta_C \sim 18$ ppm, mas experimentalmente era próximo a $\delta_C \sim 27$ ppm, como na proposta 1. Outro valor inaceitável seria δ_C 159,4 ou δ_C 162,8: um deles sobraria sem explicação, pois aparentemente havia apenas o oxigênio em função éter. Deveriam haver hidroxilas substituintes em função fenólica, mas sem espaço nesta proposta.

Propostas de substituição apenas em dois radicais R_1, R_2, R_3 ou R_4 não haviam sido levantadas. Somente no caso de substituintes bicíclicos havia a possibilidade de fechar a soma do número de insaturação, como alguns derivados policetídeos com massa próxima a 164 (FIGURA 67). Na proposta hipotética 74-C, a correlação $^3J_{CH}$ de mesma intensidade para δ_H 7,15 e δ_H 6,91 (e para δ_H 7,12 e δ_H 6,95) estaria de acordo. Contudo, nenhuma proposta está de acordo com as informações coletadas. Para serem aceitas, deveria haver alguma condição de simetria que levasse a sobreposições de sinais de intensidades enganosas.

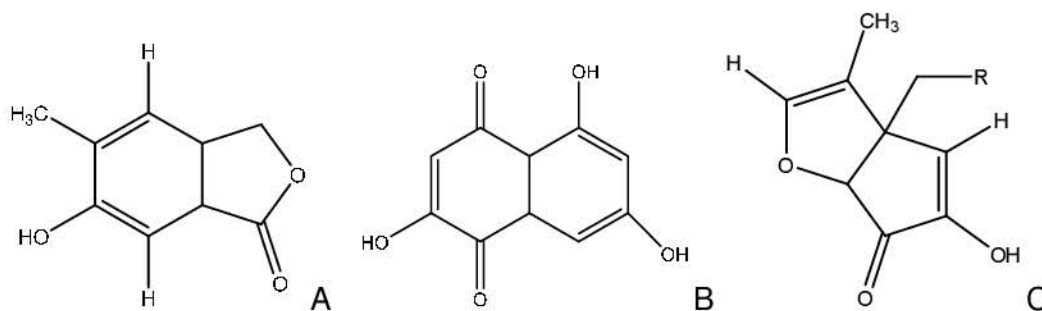


FIGURA 67 - DERIVADOS DE POLICETÍDEOS

FONTE: (A) (ABE ET AL., 2015) ; (B) FLAVIOLIN; (C) HIPOTÉTICO

Contudo, se a presença de oxigênio na posição de ligação ao anel-tipo-humuleno estivesse na forma hidróxi, favoreceria a formação de um éter, considerando a via biossintética provável. Muitos policetídeos simples são similares ao ácido salicílico (ácido benzílico em posição orto a hidroxila fenólica). Eles poderiam formar ligação e gerar efeitos de ligação de hidrogênio intramolecular e acomodação de cristais intermolecular. Isto explicaria o desaparecimento de valores de vibrações de estiramento C=O no espectro de infravermelho, que seriam deslocadas pelo efeito da ligação de hidrogênio.

Teoricamente, de acordo com a ordem de aparecimento dos sinais na estrutura, os fragmentos propostos na FIGURA 66 são do tipo ácido 4-metil-salicílico (4-MSA). Contudo, a via mais comum de síntese de derivados policetídeos é para formação de ácido orselínico ou ácido 6-metil-salicílico (6-MSA), conforme Schmitt e Lumbsch (2009), que identificaram a arquitetura genética dos genes policetídeo sintases desses compostos.

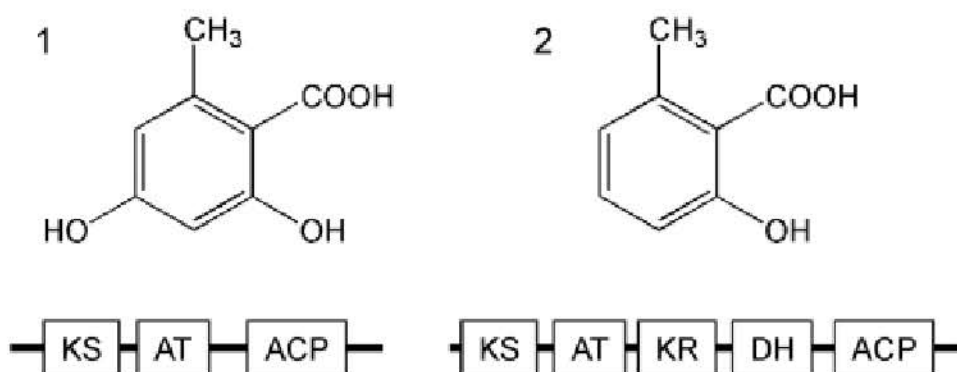


FIGURA 68 - DERIVADOS POLICETÍDEOS COMUNS (1) ÁCIDO ORSELÍNICO (2) ÁCIDO 6-METIL-SALICÍLICO; E ARQUITETURA DOS GENES POLICETÍDEO SINTASES NECESSÁRIOS PARA SUA PRODUÇÃO
 FONTE: (SCHMITT; LUMBSCH, 2009)

Entretanto a ligação de um desses fragmentos ao anel tipo-humuleno com hidroxila em função éter e ácido em função éster, posicionados 1,2 ou 1,3 era uma possibilidade pouco provável. Considerou-se metila não reativa. Assim, a ligação na forma éter via hidroxila ou éster via função “ácido benzílico”, permaneceu em aberto até fossem realizadas outras deduções. Teoricamente, um grupo funcional carboxílico tem maior reatividade que um grupo éter. Quimicamente, dependendo

das condições, é comum a reação de epóxidos com ácido benzóico e formação de derivados de anel aberto (KHALAFI-NEZHAD; SOLTANI RAD; KHOSHNOOD, 2003).

A proposta de presença da função fenol e ausência de função ácido livre era mais aceitável de acordo com os cálculos simulados de distribuição de espécies ionizadas e grupos funcionais livres, utilizando a licença acadêmica do software MarvinSketch. Segundo a simulação, somente a partir do pH 7,8 haveria 5% população ionizada (e portanto solúvel em meio aquoso), e no pH 11; 100% das moléculas estariam ionizadas (FIGURA 69).

Assim a proposta válida foi a hipótese de fenol. Contudo, existindo fenol, deveria haver outro ponto de substituição com oxigênio. Contudo a proposta éster da função ácido não dava suporte aos valores de deslocamento químico, além de necessitar de difícil posicionamento estrutural em orto ou meta. A presença de ambos grupos (ácido livre e grupo fenólico) violariam a condição de número equivalentes de insaturações calculado pela fórmula molecular.

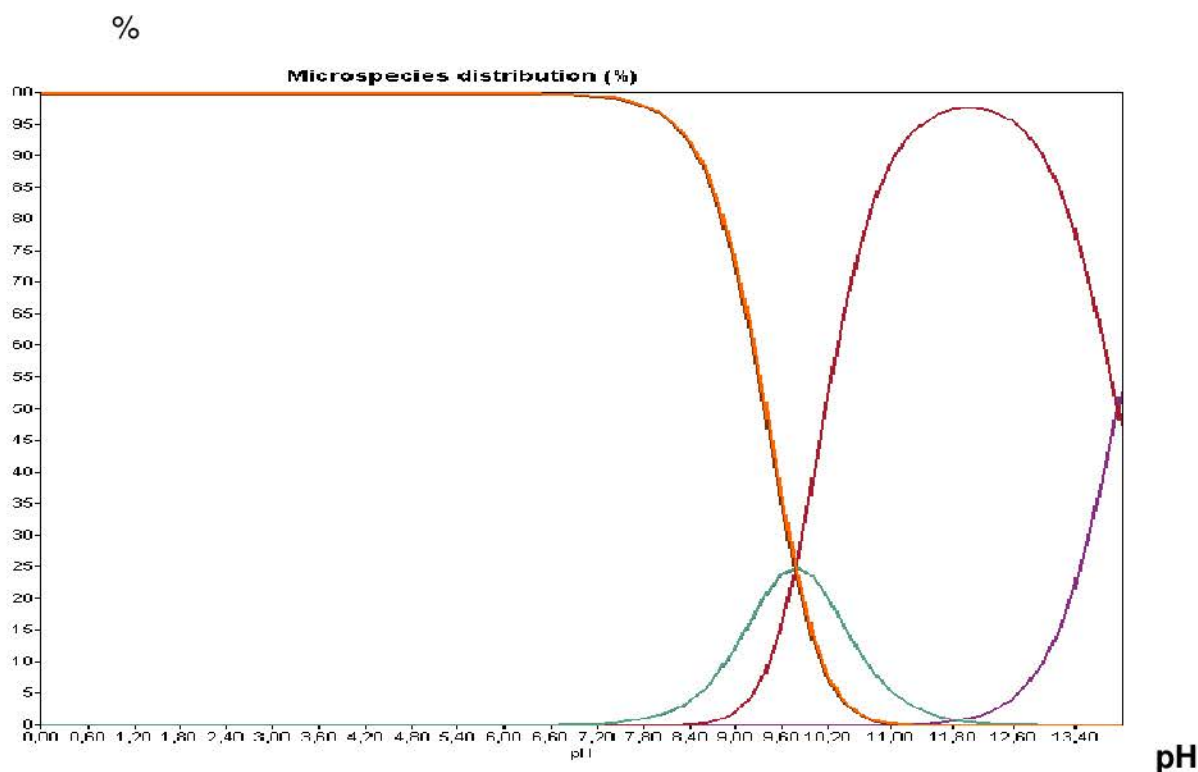


FIGURA 69 - ESTIMATIVA DAS FORMAS IONIZADAS DA MOLÉCULA

Após exaustivas análises, surgiu a possibilidade de que a proposta não estivesse com a função ácido livre, mas sim com a carbonila incorporada a um anel com 7 unidades.

Esta proposta eliminaria as impossibilidades constantes nas propostas da FIGURA 66 e de outras discussões. Para isto, haveria um anel aromático não-convencional com uma carbonila, uma hidroxila, um oxigênio substituído, dois hidrogênios a 5 ligações de distância e uma metila.

Tratava-se, portanto, de um anel do tipo Tropolone (FIGURA 70).

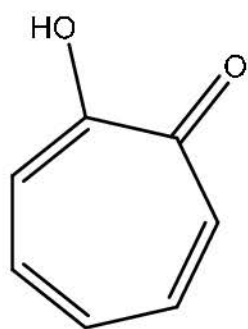


FIGURA 70 – ANEL TROPOLONE

Pelos dados experimentais comprova-se a presença de duas unidades de anél do tipo tropolona, substituídos como na FIGURA 71. Eles possuem característica aromática com conformação planar; entretanto não são benzenóides.

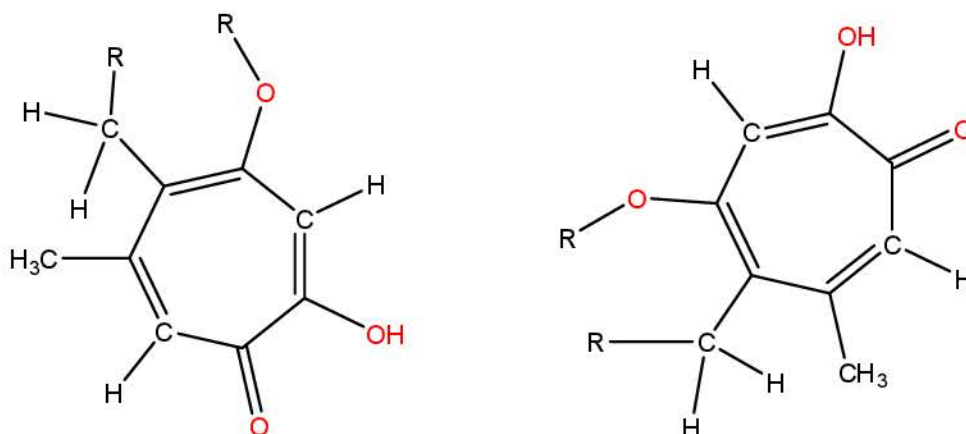


FIGURA 71 - ANÉIS TROPOLONE E POSIÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO

A ordem de aparecimento dos sinais foi importante para observar que não se tratava de um anel de seis átomos, mas um anel tropolona. Foram determinados, a partir dos hidrogênios aromáticos, quais eram os núcleos vizinhos, diferindo entre átomos a duas ou ligações $^2J_{CH}$ ou $^3J_{CH}$, através dos ajustes de parâmetros CNST de HMBC (principalmente o ajustado para 12 Hz) e experimentos COLOC e HETCOR long range. A conclusão do anel tropolona permitiu confirmar e vislumbrar os acoplamentos nos experimentos especificamente realizados para este objetivo.

A insaturação de cada um destes sistemas é 5 (três ligações dupla, um anel aromático, uma carbonila). Dois anéis tropolone, totalizam 10 insaturações. Considerando que ocorre ligação ao anel tipo-humuleno por fechamento de ciclo com heteroátomo (oxigênio), totalizam-se 6 insaturações equivalentes a cada sistema tropolone. Somando-se às duas insaturações do esqueleto tipo-humuleno, chega-se a 14 insaturações de um composto pentacíclico do tipo bistropolone; de acordo com o número de insaturação calculado para fórmula molecular.

Os valores δ_C 173,2 e δ_C 172,6 eram, portanto, referentes a carbonilas em um anel cicloheptanona. Pela literatura, o deslocamento químico de uma carbonila em um ciclo com sete carbonos encontra-se próximo de δ_C 212 ppm (CREWS, 2010, p100). Inclusive, o deslocamento químico da carbonila aumenta de acordo com número maior de carbonos no ciclo. Esse valor parece absurdo para a proposta, mas é reforçado por (JACOBSEN, 2007), como demonstra a (FIGURA 72).

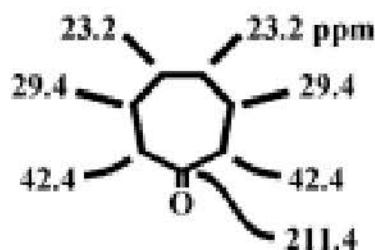


FIGURA 72 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS TÍPICOS DE CARBONO EM UMA CICLOHEPTANONA, INCLUINDO CARBONILA
FONTE: JACOBSEN (2007)

Contudo, observou-se que são possíveis tais deslocamentos químicos (δ_C 173,2 e δ_C 172,6), desde que estivessem presentes as ligações duplas conjugadas.

Além disso, as seguintes substituições foram promotoras de tal valor, conforme verificado pelas correlações HMBC, COLOC e HETCOR:

- Hidroxila “fenólica” em posição orto à carbonila;
- Metila em posição meta à carbonila;
- Dois hidrogênios aromáticos a cinco ligações de distância;
- Oxigênio éter ligado ao anel tipo-humuleno;
- Grupo metileno ligado ao anel tipo-humuleno.

O grupo “fenólico” tropolone é mais ácido que um fenólico benzenóide, pois para ocorrência de aromaticidade no anel é necessário que ocorra o tautomerismo da ligação entre a carbonila e a hidroxila vizinha (“fenólica”).

Além da positividade para os testes de ácidos orgânicos, isto também explicaria a forte atividade antioxidante observada em ensaios de DPPH e outros ensaios que testam esta reatividade.

O deslocamento da banda de absorção no infravermelho também poderia ser explicada por esta função tautomérica, que diminuiria o comprimento da ligação C=O, aumentando a frequência vibracional.

A estrutura do composto ativo identificada através do conjunto de informações espectrométricas e espectroscópicas está ilustrada na FIGURA 73. São apresentados valores dos experimentos de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e correlações a longa distância (HMBC, HETCOR long range e COLOC) de acordo com o correto assinalamento estrutural.

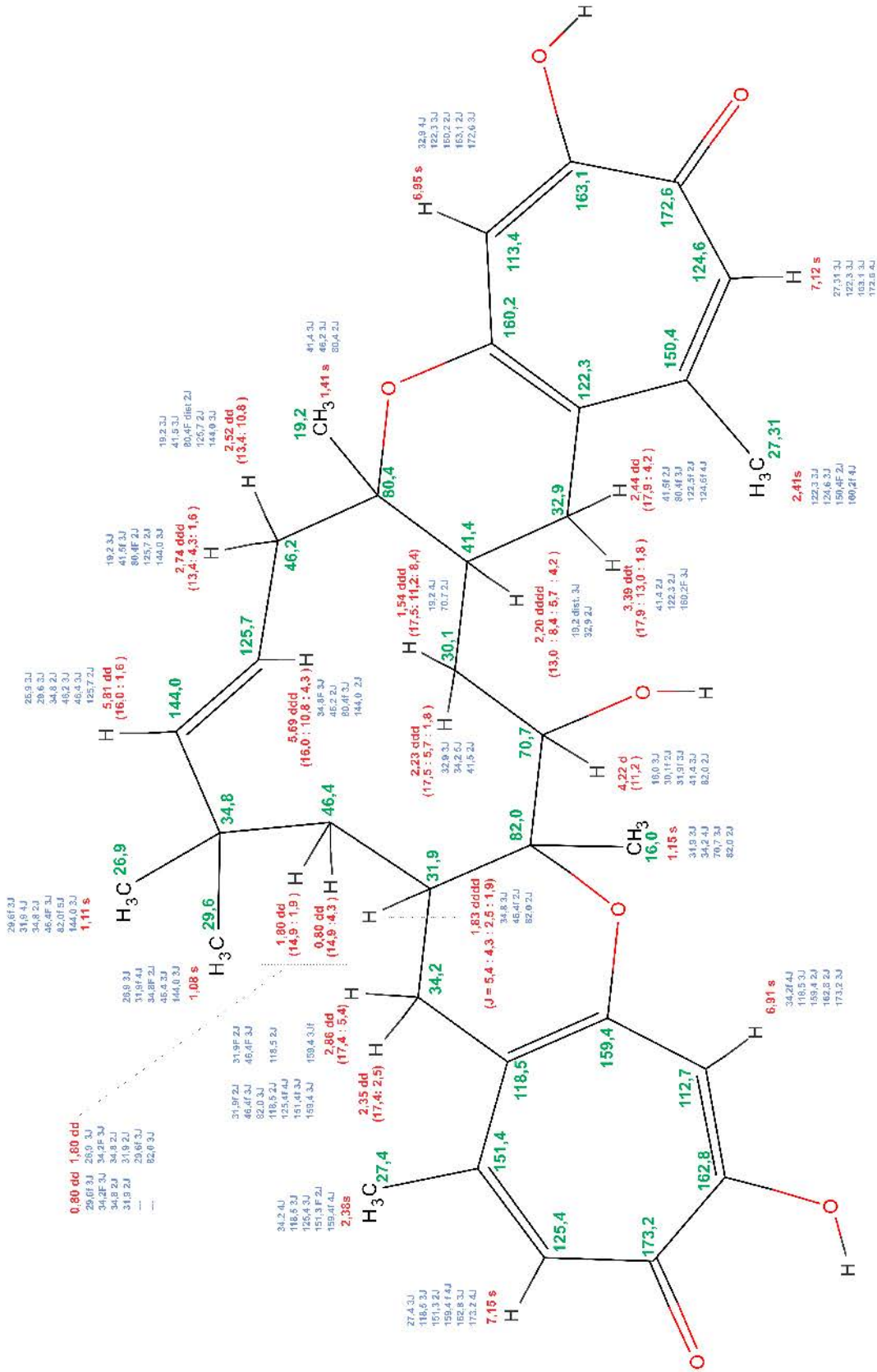


FIGURA 73 – ESTRUTURA DO COMPOSTO ATIVO IDENTIFICADA ATRAVÉS DO CONJUNTO DE INFORMAÇÕES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS (INFORMAÇÕES REFERENTES A EXPERIMENTOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR)

A descoberta de anéis tipo tropolona foi realizada por Dewar (1945), que propôs uma estrutura em anel com sete membros para o ácido estipitático, baseado no grupo 2-hidroxi-2,4,6-ciclo-1-ona. Em adição, a atribuição de dados estruturais para o composto hinoquitiol foi importante para demonstrar o comportamento do anel com sete membros do tipo alfa-dicetona em função enol tautomérica (NOZOE, 1991).

O núcleo tropolona é comum em grande número de compostos, incluindo os xenovulenos (antidepressivos) e o ácido puberúlico (composto anti-malárico). Existem aproximadamente 200 moléculas desta classe que ocorrem naturalmente, segundo Bentley (2008), que cita 154 referências que abrangem relatos entre 1945 e 2007. Segundo a revisão, muitos destes compostos possuem atividade biológica e são encontrados em diversas fontes naturais.

A via biossintética de como os fungos são capazes de sintetizar tropolonas em condições biológicas permaneceu um mistério por mais de 70 anos (CAI et al., 2012). Usando uma combinação de métodos genéticos e químicos, Davison et al. (2012) conseguiram identificar os genes responsáveis por este processo. De acordo com a metodologia, há o bloqueio da via de síntese em diferentes passos, demonstrando passo-a-passo como a estrutura tropolona é produzida. Ao que tudo indica, o atual precursor para as tropolonas e xenovulenos é o composto 3-metil-orcinaldeído.

Moléculas com a característica principal de fusão de unidade tropolona, adjacente a um anel tipo-humuleno, são reportadas pela literatura em outras estruturas (RAGGATT et al., 1997; BAILEY et al., 2007). Estruturas tropolonas (não nomeadas, FIGURA 74-A) foram isoladas a partir de cultivo do fungo fitopatógeno *Acremonium strictum*, como co-metabólitos da síntese de xenovuleno A (RAGGATT et al., 1997). Já a estrutura tricíclica epolone B (FIGURA 74-B), foi isolada a partir da cultura do fungo OS-F 69284 (ATCC 74390) por Cai et al. (1998).

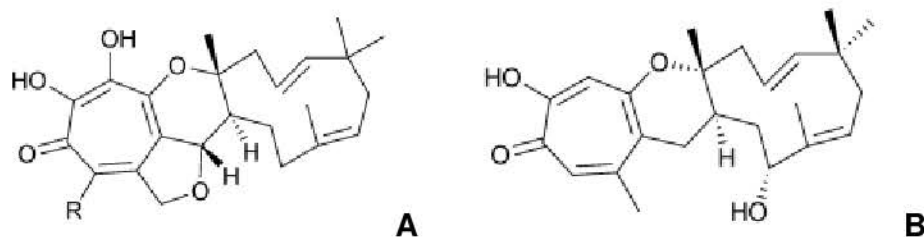


FIGURA 74 - MOLÉCULAS SIMILARES REPORTADAS NA LITERATURA (A) NÃO NOMEADAS; (B) EPOLONE B
 FONTE: (A) Raggatt et al. (1997) (R = H e R = OH); (B) Bailey et al. (2007)

Também são descritas estruturas pentacíclicas de derivados tropolones, tal como a estrutura do composto ativo elucidado neste trabalho. A proposta é muito similar ao composto **pycnidiona**, que foi isolado e identificado pela primeira vez por Harris et al. (1993). Outro grupo, no mesmo ano, isolou um estereoisômero do composto, denominando-o **eupenifeldin** (MAYERL et al., 1993). A partir de então, estas moléculas foram relatadas em isolamento a partir do caldo de fermentado do fungo *Gloeotinia* sp. FKI-3416 (KANEKO et al., 2012) e do fungo *Theissenia rogersii* (92031201) (HSIAO et al., 2012). As estruturas estão representadas na TABELA 18 e os valores experimentais RMN na TABELA 19, considerando numeração específica.

TABELA 18 – COMPARATIVO ENTRE PROPOSTA E MOLÉCULAS DA LITERATURA

Proposta	(HARRIS et al., 1993)	(MAYERL et al., 1993)
	Pycnidiona	Eupenifeldin

TABELA 19 – COMPARAÇÃO DE DESLOCAMENTO QUÍMICO COM LITERATURA

m	Composto ativo		Harris (1993)			Mayerl (1993)		
	δ_C	δ_H	No.	δ_C	δ_H	No.	δ_C	δ_H
Cq	173,2	---	3	172,27	---	1'	172,3	---
Cq	172,5	---	19	171,47	---	1	170,5	---
Cq	163,1	---	18	165,09	---	2	162,6	---
Cq	162,8	---	2	164,44	---	2'	162,2	---
Cq	160,2	---	16	161,85	---	4	160,7	---
Cq	159,4	---	29	161,68	---	4'	159,7	---
Cq	151,3	---	5	151,18	---	6'	151,2	---
Cq	150,4	---	21	150,87	---	6	150,7	---
CH	144,0	5,81	11	144,29	5,40 m	11''	143,7	5,64
CH	125,7	5,69	12	122,27	5,40 m	12''	125,0	5,48
CH	125,5	7,15	4	124,20	7,06 s	7'	124,9	6,97
CH	124,6	7,12	20	124,57	7,08 s	7	124,3	7,02
Cq	122,3	---	22	124,31	---	5	123,8	---
Cq	118,5	---	6	122,39	---	5'	118,7	---
CH	113,4	6,95	17	114,87	6,96 s	3	114,1	6,84
CH	112,7	6,91	1	114,26	7,03 s	3'	112,9	6,87
Cq	81,9	---	27	84,4	---	5''	81,5	---
Cq	80,4	---	14	82,84	---	14''	80,6	---
CH	70,7	4,22	26	76,22	3,58 d (10,0)	4''	69,9	4,00
CH ₂	46,5	0,80 / 1,80	9	46,24	1,62 d (14,5) 1,12 dd (14,5: 4,0)	9''	45,9	1,61 0,56
CH ₂	46,2	2,52 / 2,74	13	49,26	2,70 m 2,33 m	13''	45,6	2,53 2,33
CH	41,5	2,20	24	39,99	1,85 m	2''	40,9	2,00
Cq	34,9	---	10	37,10	---	10''	34,4	---
CH ₂	34,2	2,35 / 2,86	7	34,52	2,67 m 2,40 m	7''	33,8	2,67 2,16
CH ₂	32,9	2,44 / 3,39	23	34,23	3,06 dd (17:5) 2,33 m	1''	32,5	3,27 2,26
CH	31,9	1,83	8	31,79	1,66 m	8''	31,3	1,62
CH ₂	30,1	1,54 / 2,23	25	33,30	2,13 d (15) 1,22 m	3''	29,6	2,03 1,33
CH ₃	29,6	1,08	31	31,32	1,01 s	17''	26,6	0,91
CH ₃	27,41*	2,38	30	27,20	2,38 s	8'	26,9	2,18
CH ₃	27,38*	2,41	34	27,20	2,42 s	8	26,9	2,23
CH ₃	26,9	1,11	32	21,86	1,06 s	18''	29,1	0,87
CH ₃	19,2	1,41	33	18,70	1,21 s	19''	18,8	1,22
CH ₃	16,0	1,15	35	15,76	1,19 s	16''	15,5	0,94

As correlações entre os hidrogênios diastereotópicos e suas correlações homonucleares foram verificadas através de experimentos de correlação COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$). Da mesma forma, a análise dos resultados de experimentos TOCSY permitiu constatar a correlação total de três principais sistemas de spin que estão presentes na parte do composto que foi elucidada (FIGURA 75).

Especialmente através de experimentos de correlação homonuclear sensível a fase COSY-DQF (phase sensitive) ($^1\text{H} - ^1\text{H}$), as constantes de acoplamento que não podiam ser medidas em experimentos unidimensionais puderam ser medidas, inclusive para sinais que apresentavam sobreposição. As constantes estavam em concordância com experimentos J-resolved, mas tiveram resolução muito maior na medição.

Alguns sinais complexos necessitaram ser confirmados por simulação de acoplamentos, principalmente os deslocamentos químicos de hidrogênios metínicos em δ_{H} 1,83 (FIGURA 76) e δ_{H} 2,20 ppm (FIGURA 78), pois estes sinais possuíam sobreposição.

Após aumento de resolução e alteração de parâmetros de processamento desses sinais, o desdobramento foi revelado. Entretanto, o padrão característico de duplo duplo duplo dubleto (dddd) só foi confirmado através simulação de multipletos considerando o sistema completo de spins. Para tanto, variou-se alguns parâmetros como resolução a meia altura (w_a), frequência de janela e pontos digitalizados através do software Win dNMR.

A simulação foi importante, pois dependendo das condições de análise, a resolução do experimento pode diferir e gerar sinais que apresentem perfil diferente do obtido neste trabalho, mesmo que sejam resultantes da mesma molécula (mesmo ambiente químico). Logo, o perfil teórico do sinal foi considerado com o parâmetro $w_a=0,1$ Hz. É o sinal que seria obtido em experimentos refinados. Da mesma forma, aumentando w_a , foram obtidos os perfis em condições de baixa resolução. Esta situação é comumente encontrada em análises robustas e em equipamentos mais baratos utilizados em controle de qualidade.

As multiplicidades corretas dos sinais que inicialmente eram considerados multipletos, foi confirmada pela simulação do sistema de **cinco spins** do sinal δ_{H} 1,83 (FIGURA 77) e do sistema de **seis spins** do sinal δ_{H} 2,20 ppm (FIGURA 79).

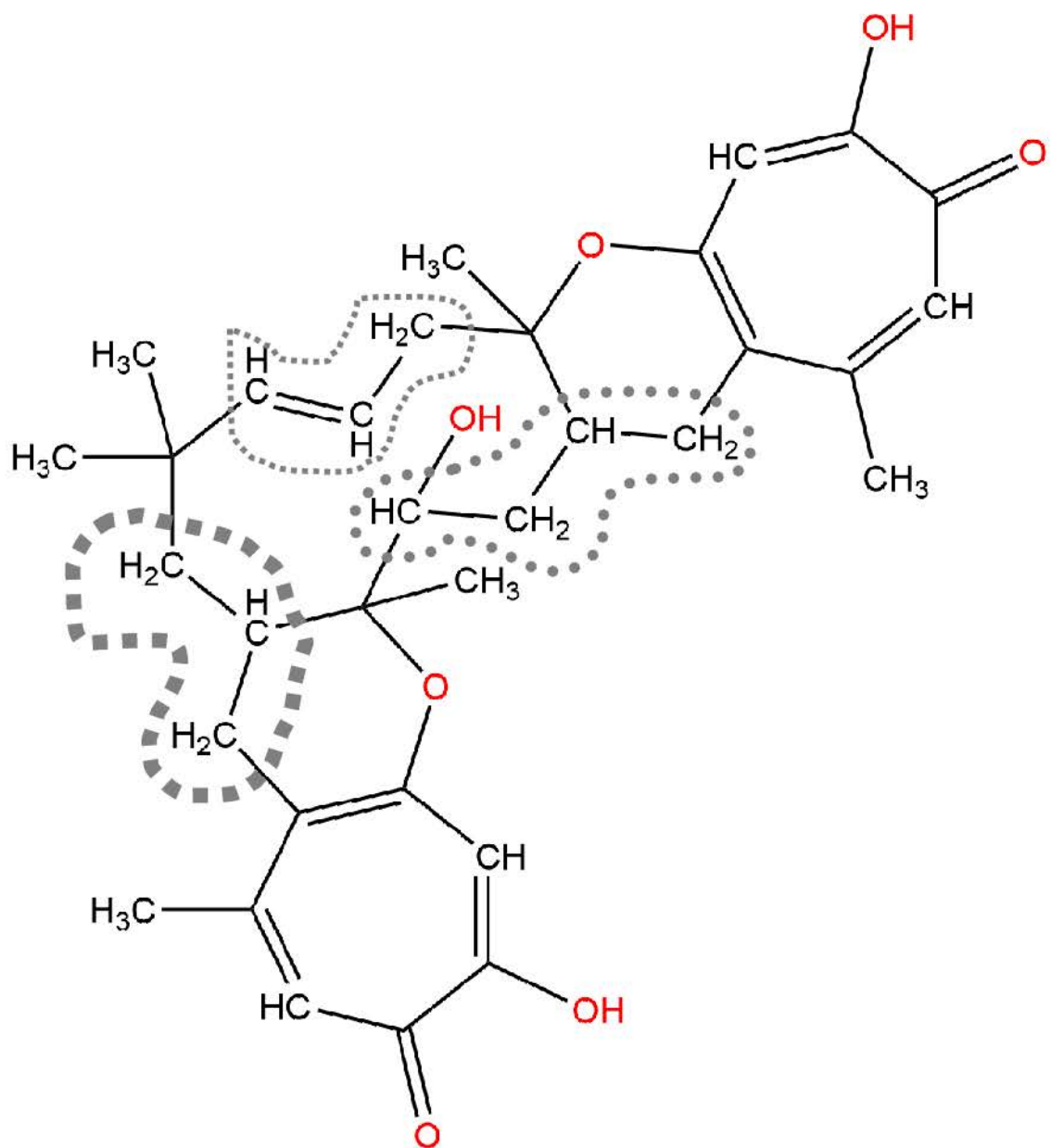


FIGURA 75 – PRINCIPAIS SISTEMAS DE SPIN

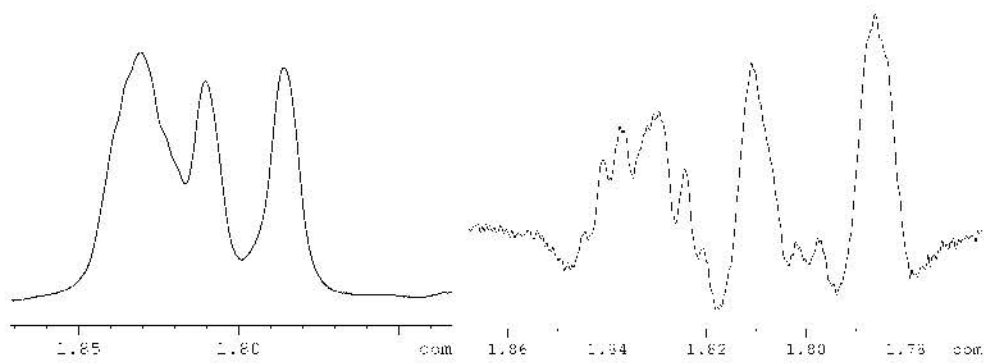


FIGURA 76 - ESPECTRO REAL: EXPANSÃO DOS SINAIS δ_H 1,80 dd E δ_H 1,83 dddd EM DUAS RESOLUÇÕES DIFERENTES DE PROCESSAMENTO (A) (600MHZ, LB 0,3); (B) (600MHZ, LB -0,3, GB 0,5)

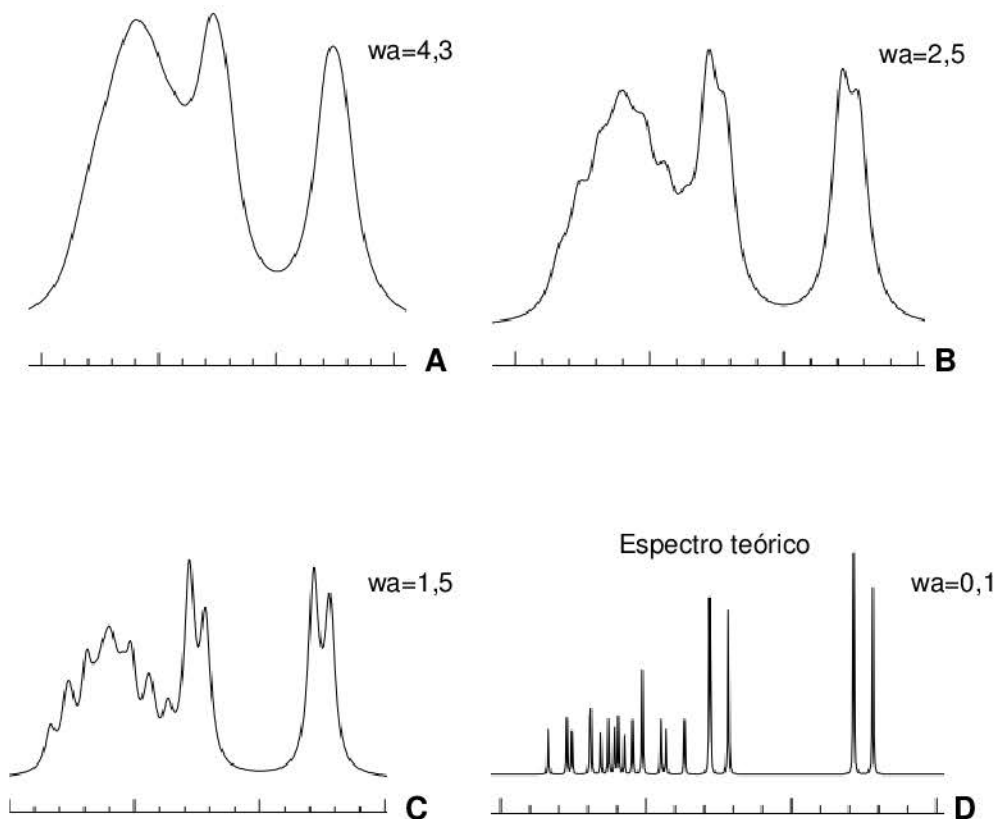


FIGURA 77 - ESPECTRO SIMULADO: REGIÃO DE SOBREPÓSÇÃO δ_H 1,83 dddd E δ_H 1,80 dd COM VARIÇÃO DO PARÂMETRO w_a (LARGURA A MEIA ALTURA) (A) $w_a = 4,3$ (B) $w_a = 2,5$ (C) $w_a = 1,5$ (D) $w_a = 0,1$ EQUIVALENTE AO ESPECTRO TEÓRICO

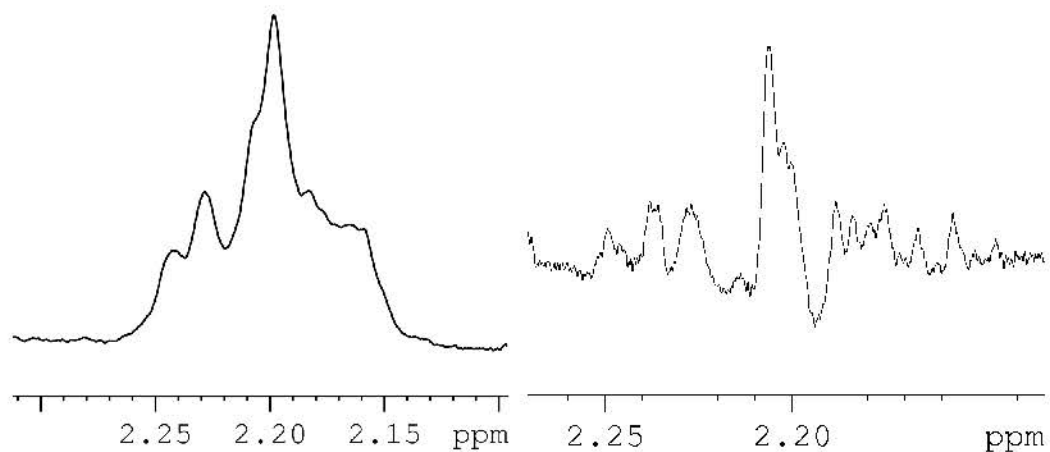


FIGURA 78 – ESPECTRO REAL: EXPANSÃO DOS SINAIS δ_H 2,20 dddd E δ_H 2,23 ddd EM DUAS RESOLUÇÕES DIFERENTES DE PROCESSAMENTO (A) (600MHZ, LB 0,3); (B) (600MHZ, LB -0,3, GB 0,5)

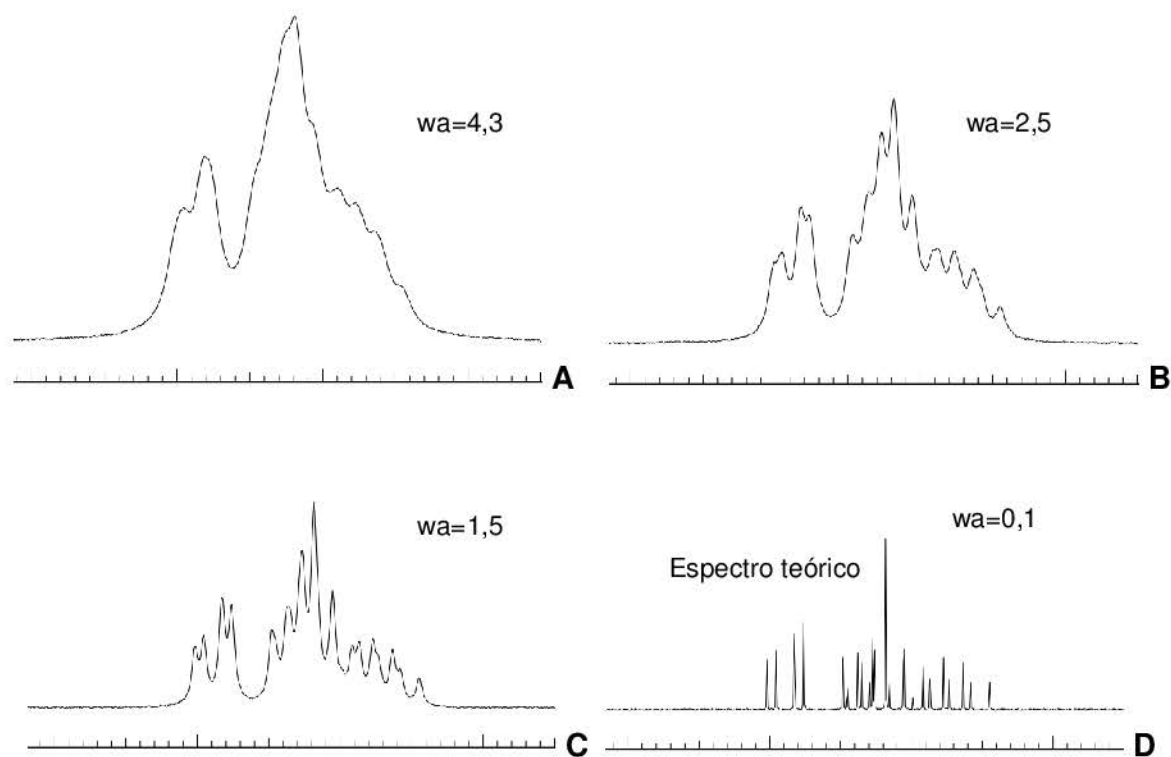


FIGURA 79 - ESPECTRO SIMULADO: REGIÃO DE SOBREPOSIÇÃO δ_H 2,20 dddd E δ_H 2,23 ddd COM VARIAÇÃO DO PARÂMETRO w_a (LARGURA A MEIA ALTURA) (A) $w_a = 4,3$ (B) $w_a = 2,5$ (C) $w_a = 1,5$ (D) $w_a = 0,1$ EQUIVALENTE AO ESPECTRO TEÓRICO

A observação detalhada destes sinais de experimentos COSY sensíveis a fase permitiu a observação detalhada de constantes de acoplamento, pois picos de correlação exibem padrão anti-fase (de absorção pura) no que diz respeito ao acoplamento J-ativos, e em fase com todos os acoplamentos J-passivos. Desta forma, estes picos serviram para revelar a conectividade do acoplamento.

Como mencionado, a correlação homonuclear total (TOCSY) confirmou que havia três sistemas de spin principal na molécula. Com aumento do tempo de mistura observou-se aumento da intensidade de alguns sinais, como era esperado pelo aumento da transferência de polarização através das ligações, até núcleos mais distantes (maior número de ligações). Carbonos quaternários e heteroátomos impediram a mistura de spins. Foi importante verificar a correlação dos sinais do anel tropolone δ_H 6,91 e δ_H 7,15 com δ_H 2,86 e dos sinais δ_H 6,95 e δ_H 7,12 com δ_H 3,39 (FIGURA 80). Isto indicou realmente a conectividade entre os anéis tropolone e o anel tipo humuleno em duas posições distintas, conforme proposta estrutural. Grande número de correlações pode ser verificado na expansão do mapa de TOCSY ilustrado na FIGURA 81, mas a expansão da FIGURA 82 em particular demonstra conectividade entre δ_H 3,39 com δ_H 4,22; dois hidrogênios distantes.

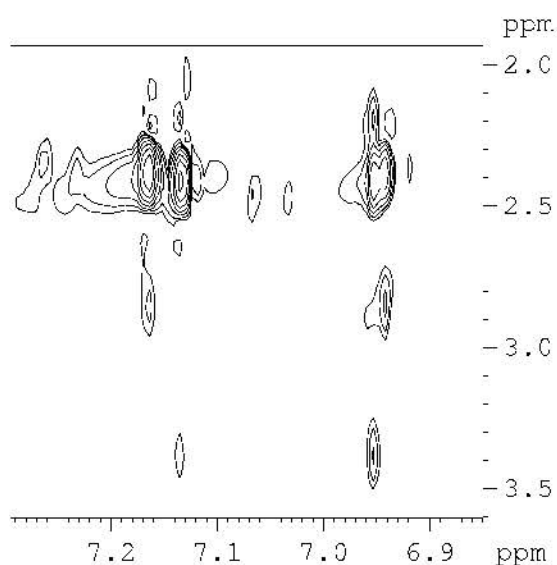


FIGURA 80 - EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR TOCSY (MIXING TIME 120 ms) DEMONSTRANDO CORRELAÇÃO 3,39 COM 6,95 E 7,12; TAMBÉM 2,86 COM 6,91 E 7,15. TAMBÉM POSSÍVEL PERCEBER CORRELAÇÃO 2,38 COM 7,15 E DO 2,41 COM 7,12. ALÉM DISSO, TALVEZ SEJAM IMPERCEPTÍVEIS E SOBREPOSTAS AS CORRELAÇÕES DO 2,44 (GEMINAL AO 3,39) E DO 2,35 (GEMINAL AO 2,86)

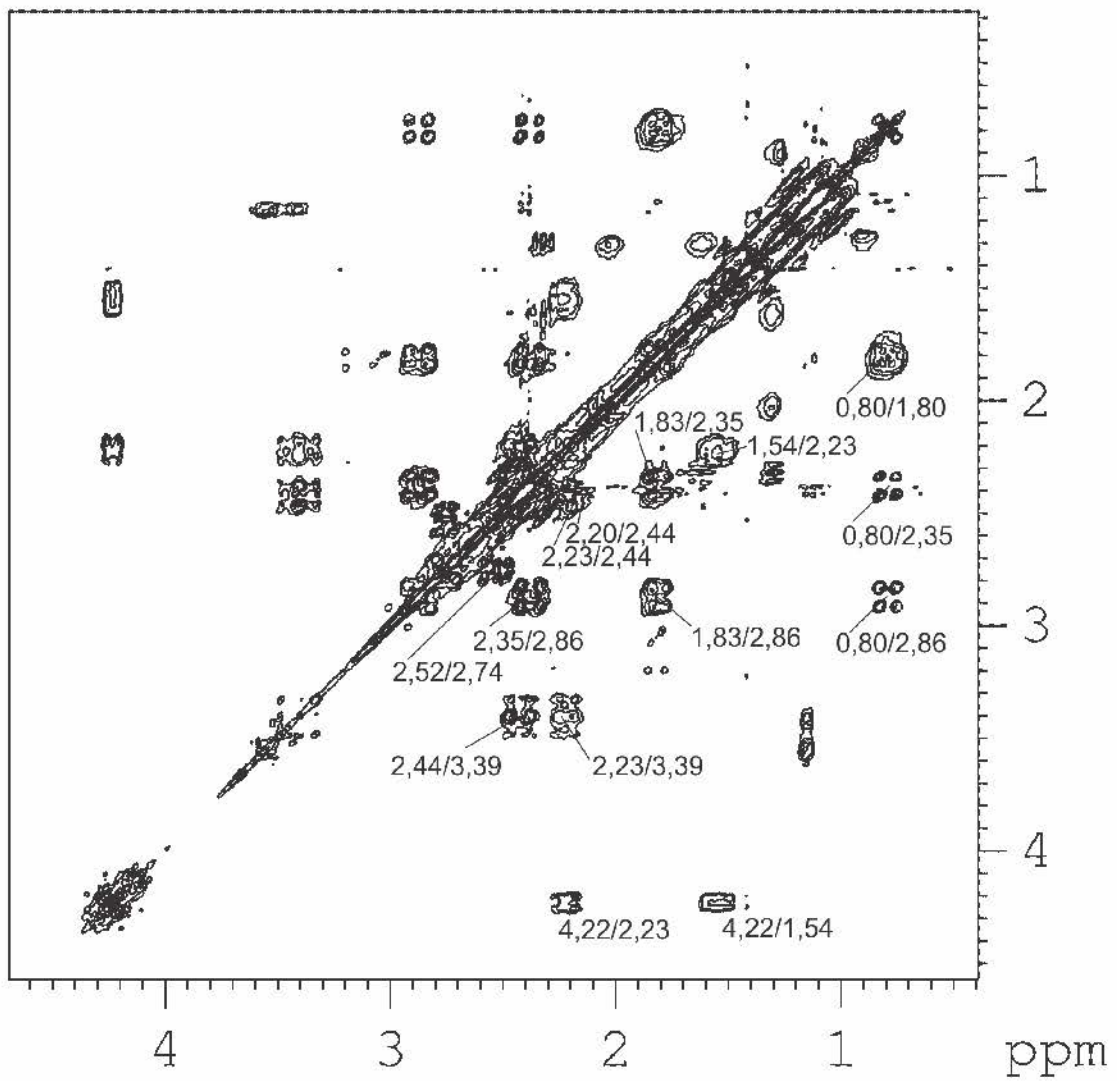


FIGURA 81 - EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR TOCSY (MIXING TIME 100 ms)

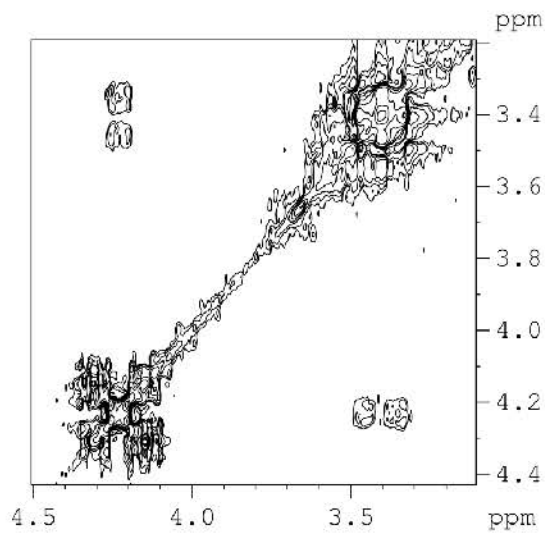


FIGURA 82 - CORRELAÇÃO δ_H 3,39 COM δ_H 4,22 (EXPERIMENTO TOCSY MIXING TIME 48 ms)

Foi possível verificar correlação através do espaço entre os hidrogênios δ_H 4,22 e δ_H 1,80. Conforme determinado por experimentos COSY e TOCSY esses hidrogênios são separados a 5 ligações de distância e não possuem acoplamento através de ligações (como ocorria entre δ_H 4,22 e δ_H 3,39). Há entre eles um carbono quaternário, o qual dificultaria a transferência de polarização. Portanto, a correlação observada em experimento NOESY (FIGURA 83) é indicativo de correlação através do espaço. A intensidade dessa ligação é proporcional a $\frac{1}{d^6}$, onde d é a distância entre dois núcleos que se correlacionem. Se a distância for grande, a interação não é perceptível. Logo, δ_H 4,22 e δ_H 1,80 estariam próximos espacialmente.

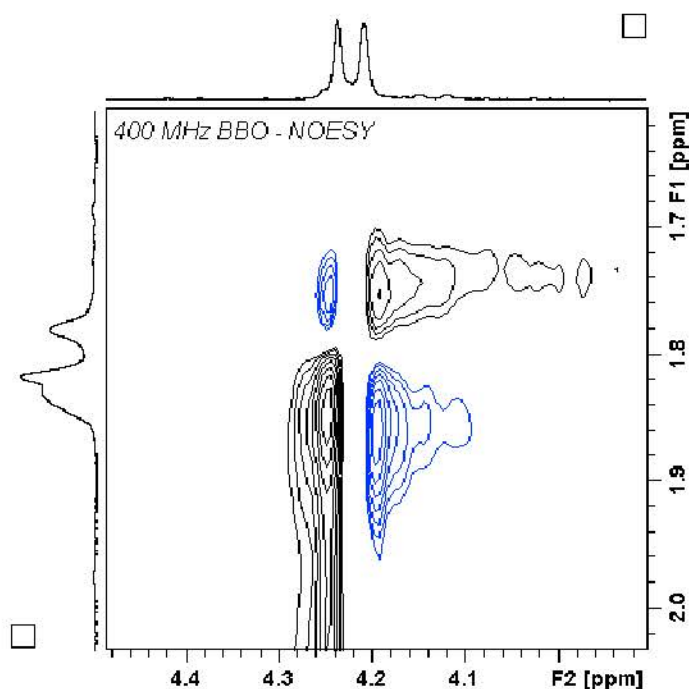


FIGURA 83 – EXPANSÃO NOESY DO MAPA DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAL ATRAVÉS DO ESPAÇO

O composto ativo possui cinco centros enantioméricos possíveis, conforme pode ser verificado em sua estrutura. Apenas 8 (TABELA 20) entre 32 possibilidades (ANEXO 3) são prováveis, por estarem em conformidade com uma distância espacial razoável entre $\delta_H 4,22$ e $\delta_H 1,80$ para acoplamento.

TABELA 20 - DISTÂNCIA ESPACIAL TEÓRICA ENTRE $\delta_H 4,22$ E $\delta_H 1,80$ PARA OS POSSÍVEIS ISÔMEROS SIMULADOS EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL APÓS OTIMIZAÇÃO POR ALGORITMO B3LYP E LAN2DZ

Número da proposta	Enantiômero (ver Anexo)	Distância espacial entre $\delta_H 4,22$ - $\delta_H 1,80$ (Å)	Provável	Configuração carbono $\delta_C 70,7$ ($\delta_H 4,22$)
1	SRRRS	3,96		
2	SSRRS	4,04		
3	SRSRS	2,81	+	S
4	SSSRS	3,47		
5	SRRSS	4,04		
6	SSRSS	4,20		
7	SRSSS	4,49		
8	SSSSS	4,30		
9	SRRRR	3,72		
10	SSRRR	3,51		
11	SRSRR	2,02	+	S
12	SSSRR	2,07	+	S
13	SRRSR	3,25		
14	SSRSR	2,26	+	R
15	SRSSR	3,82		
16	SSSSR	4,14		
17	RRRRS	3,94		
18	RSRRS	3,98		
19	RRSRS	3,10		
20	RSSRS	3,64		
21	RRRSS	4,25		
22	RSRSS	4,19		
23	RRSSS	3,84		
24	RSSSS	4,36		
25	RRRRR	3,80		
26	RSRRR	3,68		
27	RRSRR	2,11	+	S
28	RSSRR	1,95	+	S
29	RRRSR	2,02	+	R
30	RSRSR	2,57	+	R
31	RRSSR	3,75		
32	RSSSR	3,87		

A ligação entre o esqueleto tipo-humuleno e os grupos aromáticos foi logrado através da análise do experimento HMBC, por meio dos sinais de cada um dos dois grupos metileno ($-\text{CH}_2-$), com hidrogênios não-equivalentes. Estes hidrogênios apresentavam correlações tanto para carbonos aromáticos como para hidrogênios alifáticos saturados pertencentes ao esqueleto tipo-humuleno.

A confirmação extra não foi possível através de correlações através do espaço por um experimento NOESY, que não apresentou interações entre hidrogênios aromáticos com os hidrogênios do esqueleto tipo-humuleno. Contudo, verifica-se por simulação tridimensional, pelo software MarvinSpace (versão teste) que realmente não há possibilidades de correlação espacial de acordo com o posicionamento das ligações e característica planar do anel aromático.

A simulação serviu também para dar uma possível explicação ao valor δ_{H} 3,39, muito deslocado para um hidrogênio metilênico. Provavelmente efeitos magnéticos de anisotropia da dupla ligação interferem sobre o seu deslocamento químico devido a proximidade estrutural. Apesar de distantes em número de ligações, estariam próximos espacialmente.

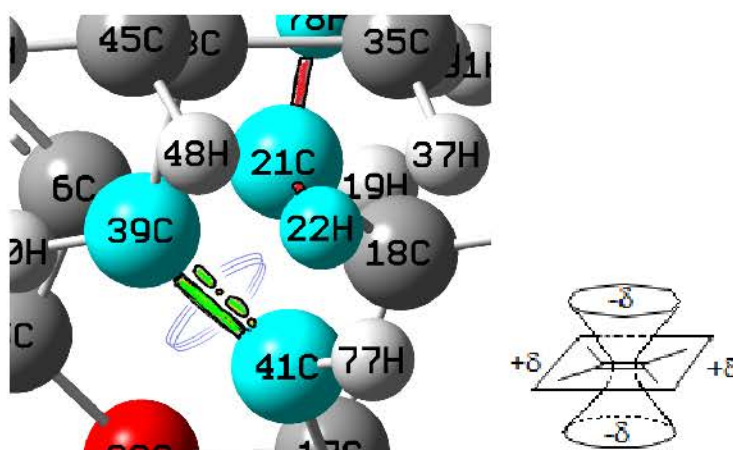


FIGURA 84 – EFEITO ANISOTRÓPICO DE DUPLA LIGAÇÃO SOBRE UM DOS HIDROGÊNIOS DE DIASTEROTÓPICOS 3,39

Apesar dos policetídeos serem diversos em estrutura, a classe é definida por uma origem biossintética comum dos átomos de carbono. Tais átomos são derivados de tiol-ésteres-CoA de pequenos ácidos carboxílicos, tais como acetato e malonato (CIVJAN, 2012).

O composto pycnidiona possui várias atividades relatadas pela literatura, tal como o aumento de indução da síntese de eritropoietina por células humanas (CAI et al., 1998). Teoricamente poderia ser útil no controle da anemia, num possível medicamento leishmanicida, pois a eritropoietina é um hormônio secretado pelo rim que estimula a medula óssea a elevar a produção de células vermelhas do sangue.

O composto mostrou boa atividade contra três linhagens de *Plasmodium falciparum*, com concentrações de inibição IC_{50} entre 0,28 e 0,75 μ M (WRIGHT; LANG-UNNASCH, 2005). Neste estudo o composto foi derivado do mesmo fungo utilizado por (HARRIS et al., 1993).

Segundo Kaneko et al. (2012) exposições a pycnidiona funcionou como composto antitumoral através de um mecanismo atividade indefinido. A disfunção da fase celular G2 induzida por bleomicina em células Jurkat foi anulada pelo composto. A reparação de DNA ocorre apenas nesta fase (evitada por células tumorais) e assim o composto tem potencial para desenvolvimento de uma nova terapia.

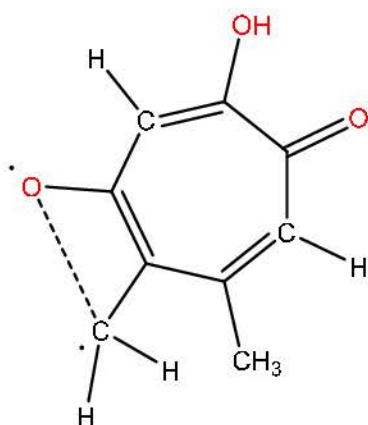
O bloqueio do ciclo celular de células cancerígenas e a indução de apoptose também foi relatada para o composto utilizando o modelo de células A549 de câncer de pulmão humano (HSIAO et al., 2012). A indução de apoptose é importantíssima para o combate do sistema de evasão imune de *Leishmania* sp.

5.9 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

5.9.1 qTOF

A análise dos resultados qTOF permitiu a deconvolução de massas para ser descoberta a fórmula molecular. A fórmula molecular do composto isolado foi elucidada pelos dados das proporções isotópicas obtidas pelos dados dos espectros total no modo de ionização positivo (FIGURA 86) e no modo negativo (FIGURA 87). A fórmula molecular do composto ativo, conforme descrito, foi determinada como **C₃₃H₄₀O₇**, com o pico íon molecular de **548.2774 m/z**, obtido pela análise de HR-ESIMS (High Resolution-Electrospray Mass Spectrometry). O número de insaturações calculado é **14**, considerando C₃₃H₄₀O₇.

Foi possível evidenciar através perda neutra comum em reações de íons selecionado, perda de massa de 164 u.m.a., que conforme discussão prévia, é referente um fragmento tropolone fragmentado que leva consigo oxigênio e grupo metile, que possivelmente sofre um rearranjo. Esta perda foi evidente tanto em experimeno no modo de ionização positivo (FIGURA 90), quanto no modo negativo (FIGURA 91).



C₉H₈O₃^{2•}
 Exact Mass: 164,04734
 Molecular Weight: 164,16000
 m/z: 164.04734 (100.0%), 165.05070 (9.7%)
 Elemental Analysis: C, 65.85; H, 4.91; O, 29.24

FIGURA 85 – PERDA NEUTRA 164

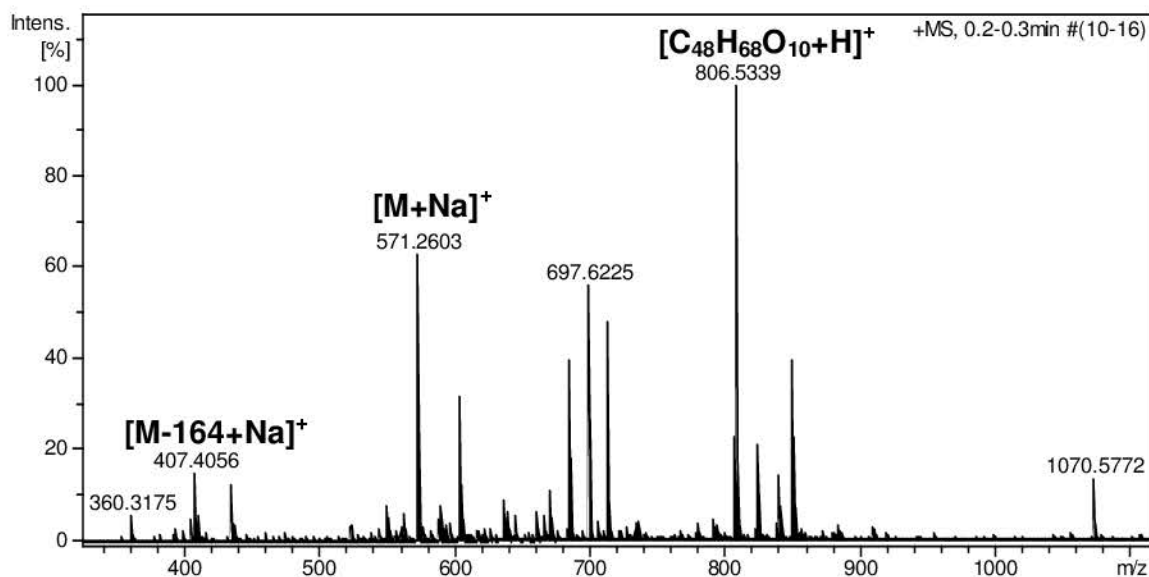


FIGURA 86 - ESPECTRO TOTAL QTOF (HR-MS)
IONIZAÇÃO MODO POSITIVO
AMOSTRA: BCO_B01 (METANOL) 50 µg/mL

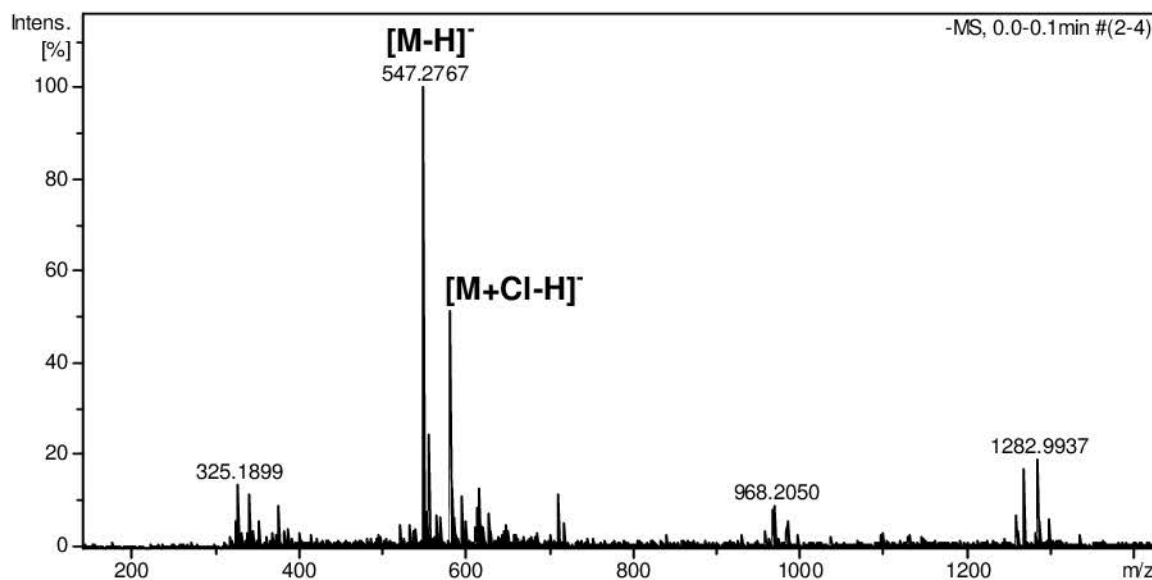


FIGURA 87 – ESPECTRO TOTAL QTOF (HR-MS)
IONIZAÇÃO MODO NEGATIVO
AMOSTRA: BCO_B01 (METANOL) 50 µg/mL

A média de massa do principal íon foi calculada como 571,2591 (dados: 571,2605 ; 571,2567; 571,2603), referente ao aduto de sódio (FIGURA 88). O íon 806 foi considerado como interferente, ou dímero do íon 407, ou como rearranjo entre composto inteiro e fragmento provável (FIGURA 89).

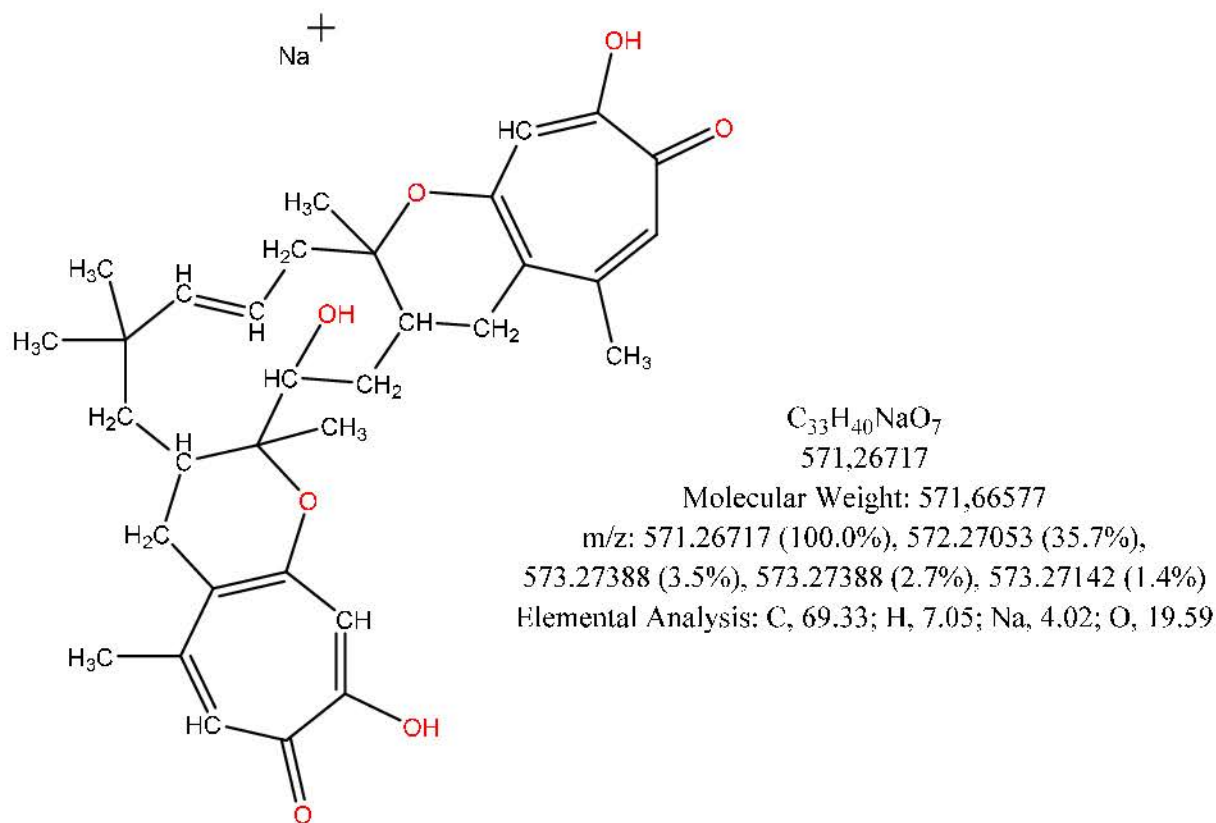
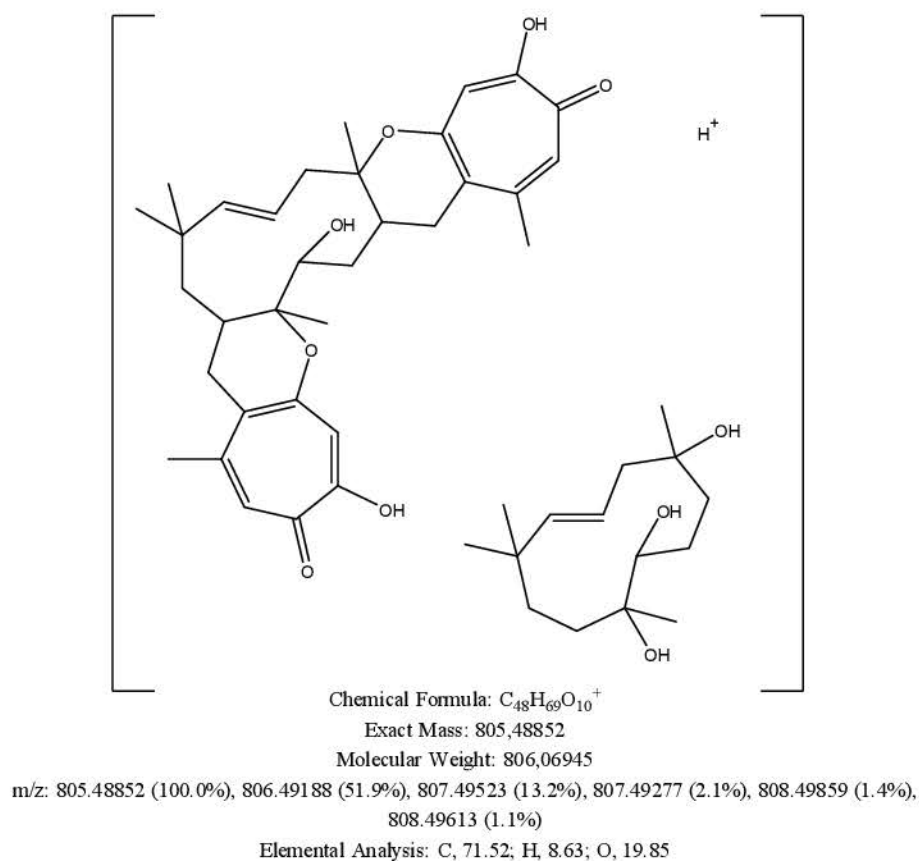
FIGURA 88 - ADUTO $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 

FIGURA 89 – POSSÍVEL ÍON 806 m/z QTOF (IONIZAÇÃO POSITIVA)

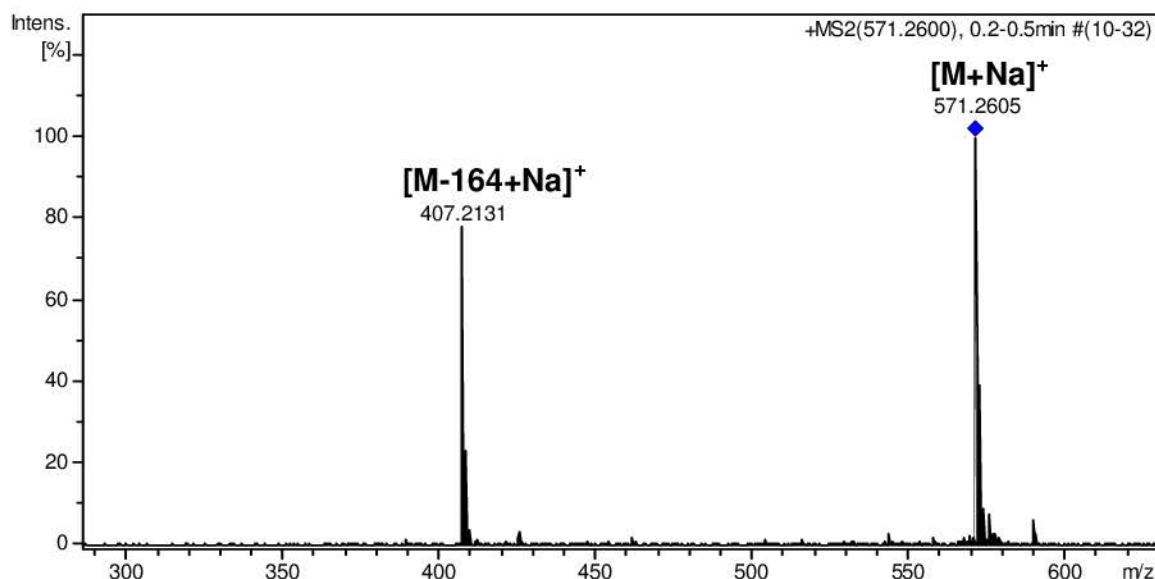


FIGURA 90 - REAÇÃO DE ÍON SELECIONADO (571,2600)
MODO IONIZAÇÃO POSITIVA
571,2605 → 407,2131 (MS²)

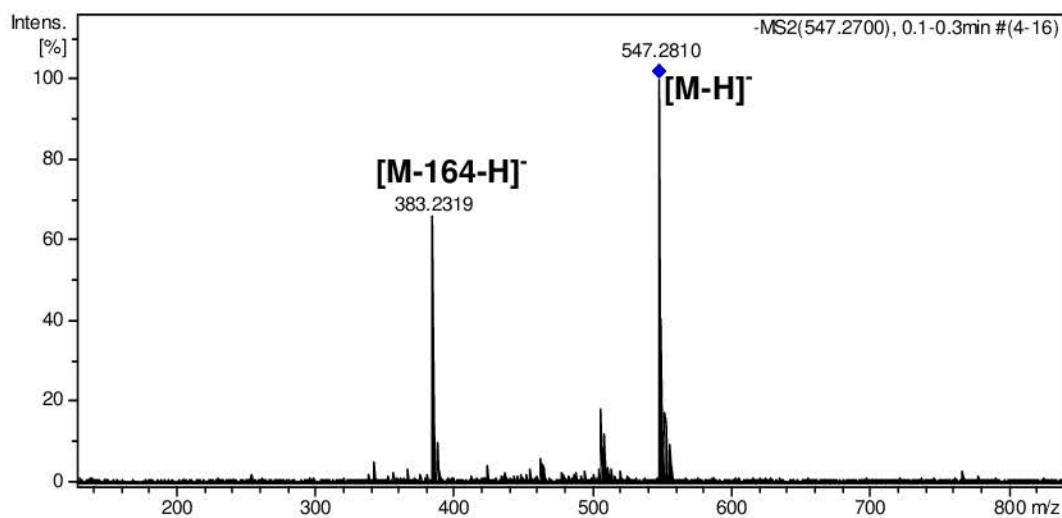


FIGURA 91 – REAÇÃO DE ÍON SELECIONADO (547,2700)
MODO IONIZAÇÃO POSITIVA - MS²
547,2810 → 383,2319 (MS²)

O íon 547,2767 (ionização negativa) pôde ser comparado e tem relação com o íon 571,2605 (ionização positiva). Basta considerar a diferença entre sódio e presença ausência de hidrogênio em cada modo de ionização. O hidrogênio normalmente é perdido no modo negativo. Somando 22,9898 (sódio) +1,0079 (hidrogênio) +1,0079 (próton de ionização) é igual a 571,2744, equivalente a massa

dada na ionização modo positivo. O delta calculado entre média de valores de íons observados e a fórmula monoisotópica ionizada de $C_{33}H_{40}O_7$ é 0.00965 (547,27915 - 547,2695) e o erro fica em 17,63 ppm.

Buscas de possíveis fórmulas moleculares (MF) foram realizadas a partir da massa monoisotópica no site ChemCalc (2015).

5.9.2 IONTRAP

Os principais resultados obtidos a partir do analisador iontrap são as reações sequencias de íons selecionados por Monitoramento de Reação Seleccionada [*selected reaction monitoring* (SRM)]. A seguir, são relatados os principais íons e fragmentos observados, que foram analisados pelo software mzmine com importação de dados brutos a partir do arquivo original do equipamento; modos positivo (FIGURA 93) e negativo (FIGURA 94).

A sintonia de parâmetros eletromagnéticos de ionização foram realizados automaticamente pelo equipamento. Foram otimizados para o principal íon do composto ativo, de modo equivalente para tune:

ESI POSITIVO 549,2 \leftrightarrow ESI NEGATIVO 547,3

Perdas consecutivas de CO (M-28) e (M-28-28) são comuns em compostos fenólicos, mesmo que não benzenóides, como pode ser verificado na FIGURA 92. Os íons observados em modo positivo foram:

[M+Na](+)	571,3 antes do TUNE 100% ~1E5
[M + H] (+)	549,2 depois TUNE 100% ÍON MOLECULAR
[M-164-28-28+Na](+)	353,3 (perda neutra de um anel tropolone e 2x CO)
[M-164-28+Na](+)	381,3 (perda neutra de um anel tropolone e CO)
[M-164-28+Na](+)	409,2 (quebra de um anel tropolone mais sódio)
Não identificado	494,7
possível dímero	621

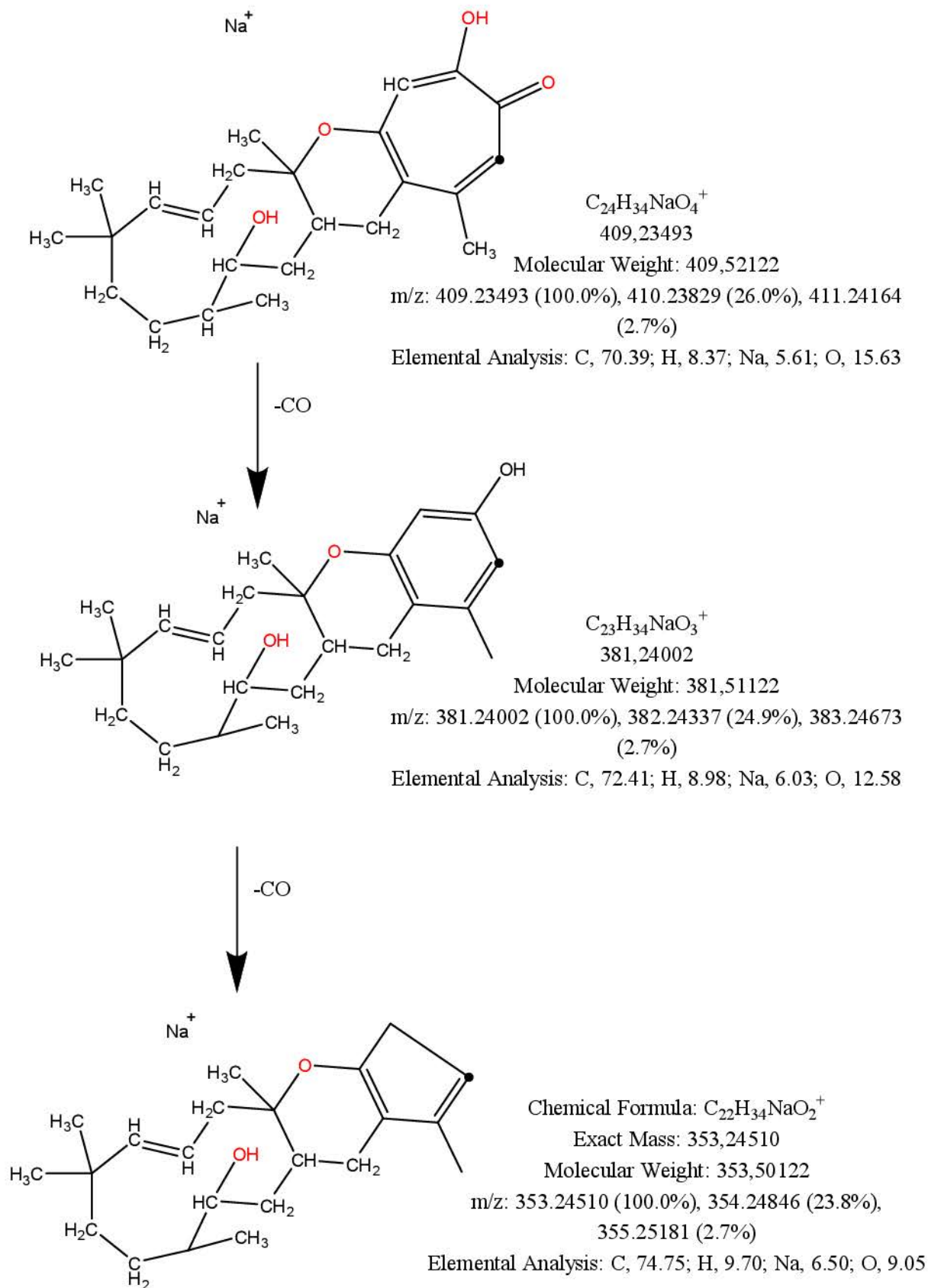


FIGURA 92 - PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DE PERDA M-164-28 E M-164-28-28 (COM FORMAÇÃO DE ADUTO SÓDIO)

A proporção isotópica do íon 549 não pôde ser considerada, pois a impureza intrínseca do solvente de injeção (metanol) possui como interferentes os íons 550 e 522 no modo positivo. Esta impureza possuía diferença de 1 u.ma. do íon 549 m/z referente ao composto ativo, contudo não apresentou mesmo padrão de fragmentação. Para eximir dúvidas quanto aos outros fragmentos foi realizada o monitoramento de reação selecionada, observando-se:

ESI (+) (m/z): $MS^1 \rightarrow 550,6 \rightarrow MS^2 \rightarrow 532,3 / 514,3 / 486,2$

Artefato: íon 1119,0

O monitoramento de reação selecionada permitiu detectar os seguintes íons, adutos e fragmentos:

571,3 $\rightarrow MS^2 \rightarrow 407,2 \rightarrow MS^3 \rightarrow$ perde sinal e ionização

$[M+Na](+)$ $\rightarrow MS^2 \rightarrow [M-164+Na](+)$ $\rightarrow MS^3 \rightarrow$ perde sinal

Colision energy c=21

549,2 $\rightarrow MS^2 \rightarrow 531,0 \rightarrow MS^3 \rightarrow 513,3 / 485,3$ (100%)

$[M+H](+)$ $\rightarrow MS^2 \rightarrow [M-H_2O+H](+)$ $\rightarrow MS^3 \rightarrow 513,3 / 485,3$ (100%)

$[M-2H_2O+H](+)$ 513,3

$[M-H_2O-CO+H](+)$ 485,3 (ou CH_2O_2 ? ou C_2H_6O ?)

Colision energy c=20, 27, 35

523,6 $\rightarrow MS^2 \rightarrow \{299,3 / 298\} \{270,2/271,3\}$

Colision energy ce=20, 33

POSITIVO $MS^1 \rightarrow 494,6 \rightarrow MS^2 \rightarrow 270,3$ (100%)/298,3/242,3

Nos experimentos em modo negativo, é possível verificar o íon 255, que poderia ser explicado, como também às vezes observado no modo positivo em menor intensidade, como ilustrado na FIGURA 95.

ESI NEGATIVO

[M+Cl](-) 583,1 (100%)

[M-H] (-) 547,3

(2M-H)(-) 1095,1

Pós-TUNE para 549,2 m/z

Íons: 255,2; 283,4; 365,2; 383,2; 547,3 100%; 548,3 +- 30%

Observação: 583,1; 584,1 (30%); 585,1 (30%) – aduto de cloro

As reações SRM no modo negativo não foram eficientes para fragmentação, considerando valores de energia de colisão $ce=25$ / $MS^3 ce=20$. Alguns fragmentos puderam ser observados:

583,1 (100%) $\rightarrow MS^2 ce=20 \rightarrow 547,2 \rightarrow MS^3 \rightarrow 505,2 / 383,2 / 163$ (85%)

547,3 $\rightarrow MS^2 \rightarrow 505,2 / 383,2$ (1E4) / 163

493,4 $\rightarrow MS^2 \rightarrow 383,2$ (100%) (1E2)

425,4 $\rightarrow MS^2 \rightarrow$ sem fragmentos

409,2 $\rightarrow MS^2 \rightarrow 289,2 \rightarrow MS^3 \rightarrow$ sem fragmentos

381,3 $\rightarrow MS^2 \rightarrow$ sem fragmentos

353,3 $\rightarrow MS^2 \rightarrow$ sem fragmentos

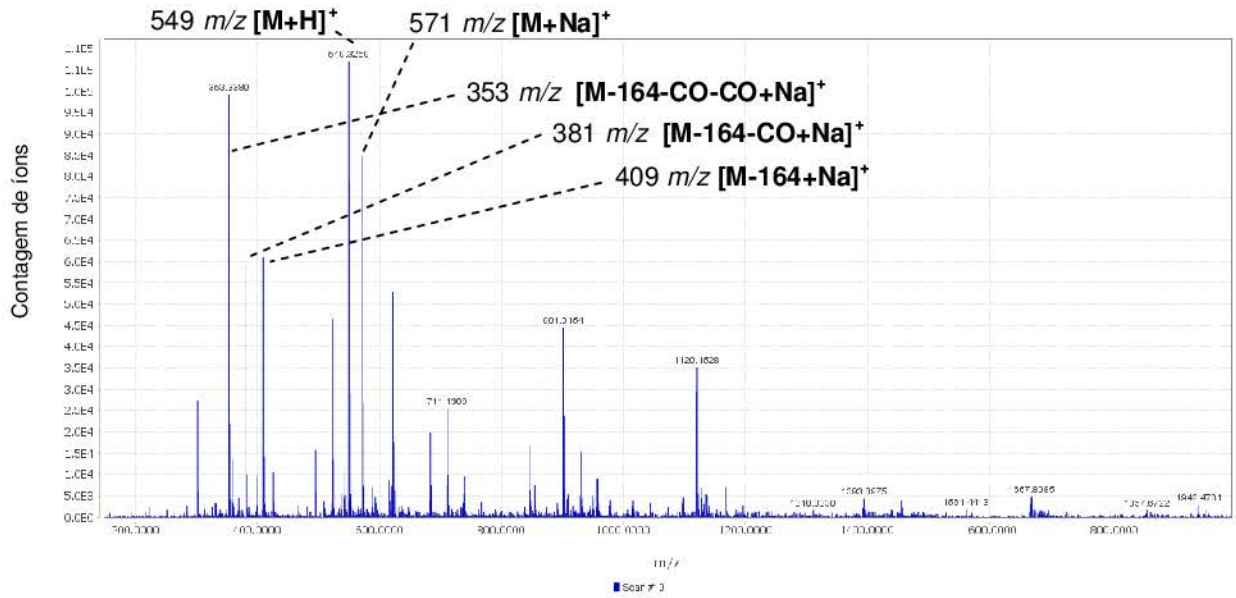


FIGURA 93 – IONTRAP ESPECTRO TOTAL ESI MODO POSITIVO

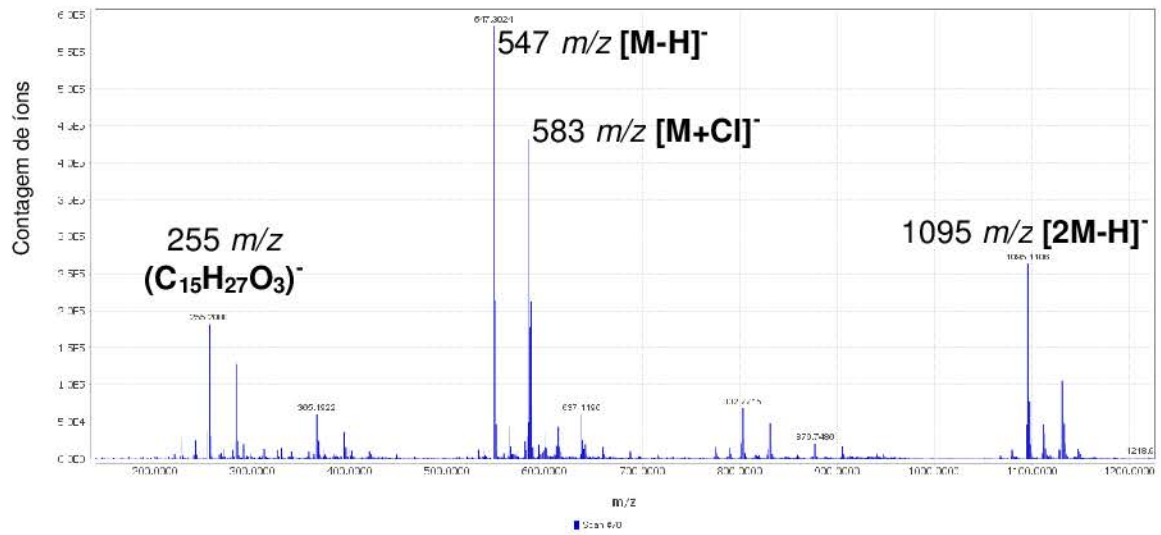
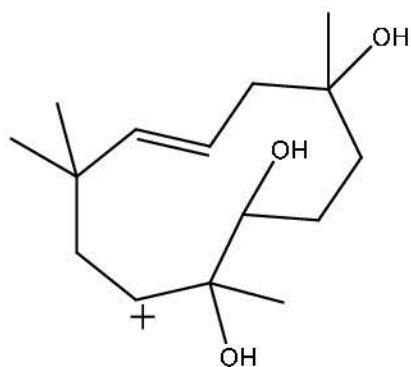
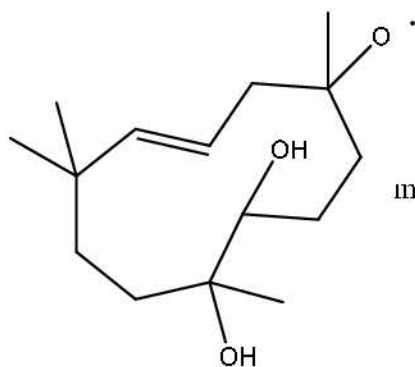


FIGURA 94 - IONTRAP ESPECTRO TOTAL ESI MODO NEGATIVO



$C_{15}H_{27}O_3^-$
 Exact Mass: 255,19547
 Molecular Weight: 255,37745
 m/z: 255.19547 (100.0%), 256.19883 (16.2%), 257.20218 (1.2%)
 Elemental Analysis: C, 70.55; H, 10.66; O, 18.79



$C_{15}H_{27}O_3^{\cdot}$
 255,19602
 Molecular Weight: 255,37800
 m/z: 255.19602 (100.0%), 256.19937 (16.2%), 257.20273 (1.2%)
 Elemental Analysis: C, 70.55; H, 10.66; O, 18.79

FIGURA 95 - POSSÍVEIS ÍONS 255 EM IONIZAÇÃO MODO POSITIVO E NEGATIVO

5.9.3 Espectro de baixa resolução LC-MS (single quadrupolo)

A cromatografia em coluna foi utilizada no procedimento de entrada do espectrometro de massas (FIGURA 96). O composto 1 foi isolado a partir do extrato diclorometano do fungo PN como agulhas amareladas. Quando em spot na placa CCD tinha três formas de ser observado: como Laranja UVP, como azul UVP, como Laranja-Marrom vis ou como spot cor branca, ou como *quenching* (absorção) em 254nm.

Foram observados três compostos com tempos de retenção distintos, os quais são apresentados na FIGURA 97, no modo de ionização positiva. Foi observado um padrão característico de fragmentação para todos os constituintes do composto bruto, conforme referência de fragmentação de sesquiterpenos (SONG et al., 2012). Isto reforça a evidencia de que o núcleo era do tipo sesquiterpeno.

O tempo de retenção do composto elucidado foi de 7,2 minutos, sendo detectado pelo íon 385 m/z, equivalente a perda tropolone e ionização com um próton $[M-164+H]^+$. Além disso é possível detectar o íon da estrutura do humuleno

Além disto foi possível verificar o íon epolone, proveniente da fragmentação do esqueleto pycnidiona ou epenifeldin, com perda de anel tropolone, característico do composto.

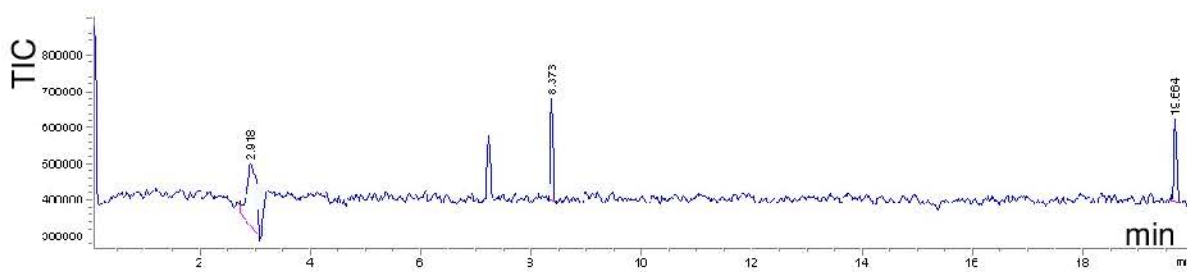
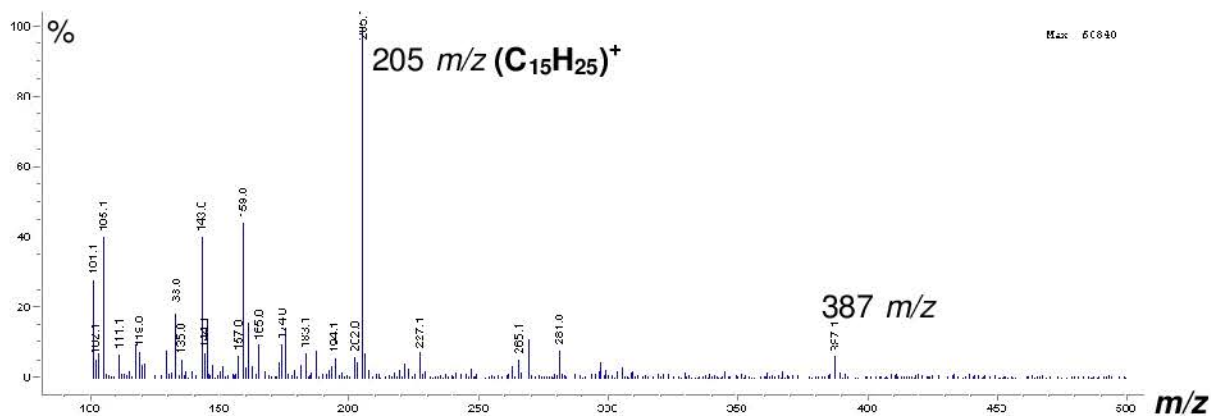
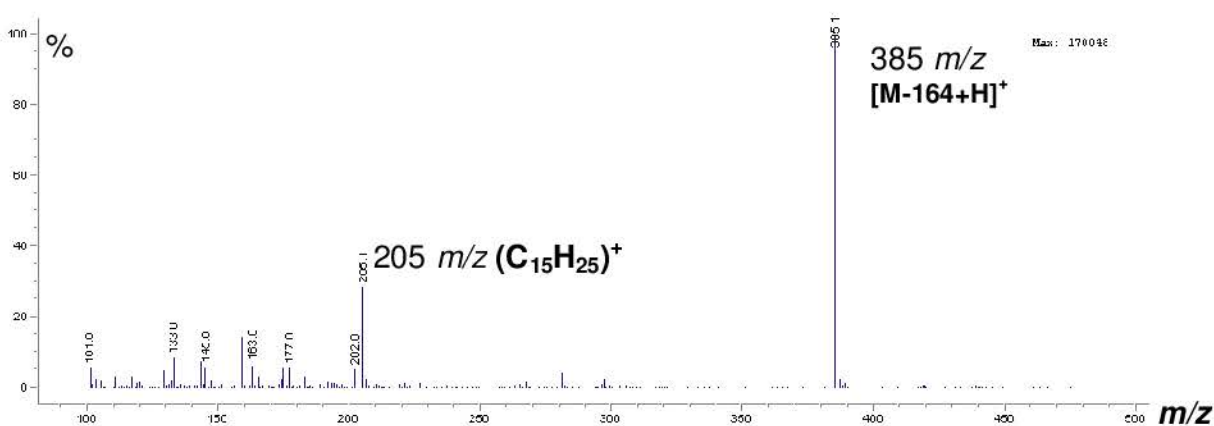


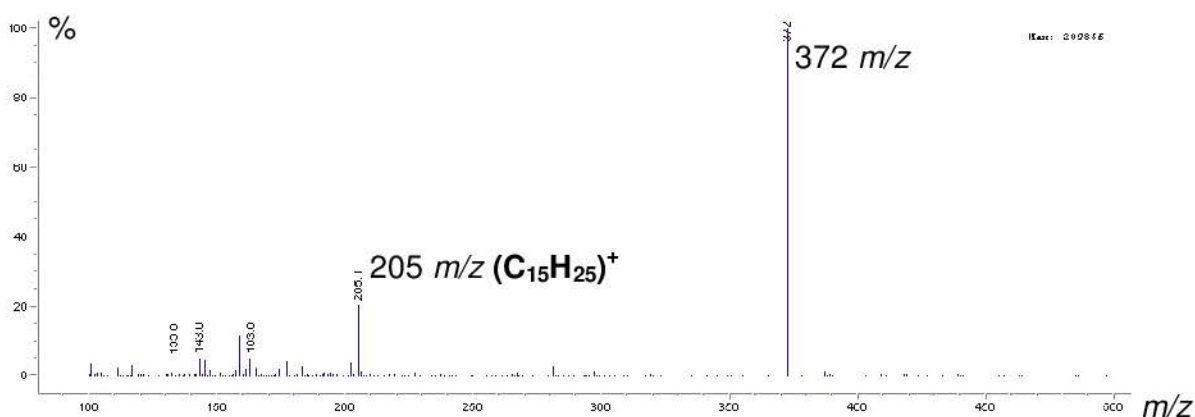
FIGURA 96 – CROMATOGRAMA DE CONTAGEM TOTAL DE ÍONS (TIC, SCAN POSITIVO)
SCAN M/Z: 100 A 500 U.M.A.; FRAGMENTAÇÃO: 100V; TEMPERATURA COLUNA: 40°C; INJEÇÃO: 1 µL; TEMPERATURA GÁS: 300°C; FASE MÓVEL ISOCRÁTICA 0,4ML/MIN; - AQUOSA ÁC.ACETICO : METANOL ACIDIFICADO 0,3% AC.ACETICO (82 :18)



A – íons: 101, 105, 111, 119, 133, 143, 159, 165, 174, 183, 205 (100%), 227, 387



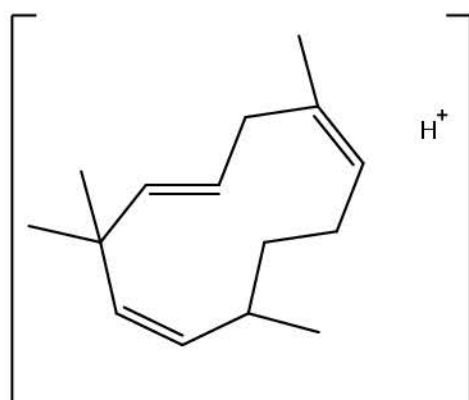
B – íons: 101, 133, 145, 163, 177, 202, 205, 385 (100%) [M-164+H]+



C – íons: 133, 143, 163, 205, 372 (100%)

FIGURA 97 – COMPOSTO BRUTO ATIVO COM FRAGMENTOS TÍPICOS DE SESQUITERPENOS NAS TRÊS FRAÇÕES DE ACORDO COM (SONG et al., 2012) IONIZAÇÃO ESI POSITIVO - SCAN: 100 A 500 m/z; FRAGMENTAÇÃO: 100V; TEMPERATURA COLUNA: 40°C; INJEÇÃO: 1 µL; TEMPERATURA GÁS: 300°C; FASE MÓVEL ISOCRÁTICA AQUOSA 0,3% AC.ACETICO : METANOL 0,3% AC.ACETICO (82 :18), 0,4 mL/min; TEMPO DE RETENÇÃO:
 (A) 2,917 MINUTOS
 (B) 7,226 MINUTOS (COMPOSTO PURO) [M-164+H]⁺
 (C) 8,373 MINUTOS

O íon 205 pode ser explicado como



$C_{15}H_{25}^+$
 Exact Mass: 205,19508
 Molecular Weight: 205,36445
 m/z: 205.19508 (100.0%), 206.19843 (16.2%), 207.20179
 (1.2%)
 Elemental Analysis: C, 87.73; H, 12.27

Em alguns casos de outras fases móvel e condições de ionização não houve percepção de íons. Entre as hipóteses da não-ionização ou ausência de percepção de íons de interesse:

- O processo não favoreceu ionização (mesmo com aditivos);
- Não houve ionização na fonte utilizada, voltagens insuficientes;
- A concentração da amostra foi abaixo limite de detecção do equipamento;
- A concentração da amostra era muito concentrada (supressão de íons), mesmo que o limite de injeção fosse 10 µg/mL (HPLC);
- Os tempos programados dwell do detector não foram otimizados;
- Janela de observação incorreta e, sendo o composto alvo um desconhecido, não foi localizado.

Entre as hipóteses para falta de observação do íon molecular ou de valores inconsistentes com o esperado:

- Ocorreu degradação na fonte;
- Houve formação de íons com cargas múltiplas;
- Houve formação de dímero ($2M+H^+$) ou adutos (possível interpretação);
- Voltagens ajustadas automaticamente selecionaram íons diferentes do objetivo;
- Mesmo com os devidos cuidados (uso de material novo, enxaguado com solvente orgânico) a amostra pode ter sido contaminada com: silano (quando filtrou em fibra de vidro); contaminantes de solvente ou íons fantasma oriundos do analisador de massas.

5.10 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

A absorção máxima de ultravioleta do composto ativo foi de 256 nm e de 364 nm. Para análise estrutural, esta informação é irrelevante. Contudo estes dados foram mantidos para que trabalhos futuros tentem desvendar uma técnica colorimétrica analítica para detecção do composto.

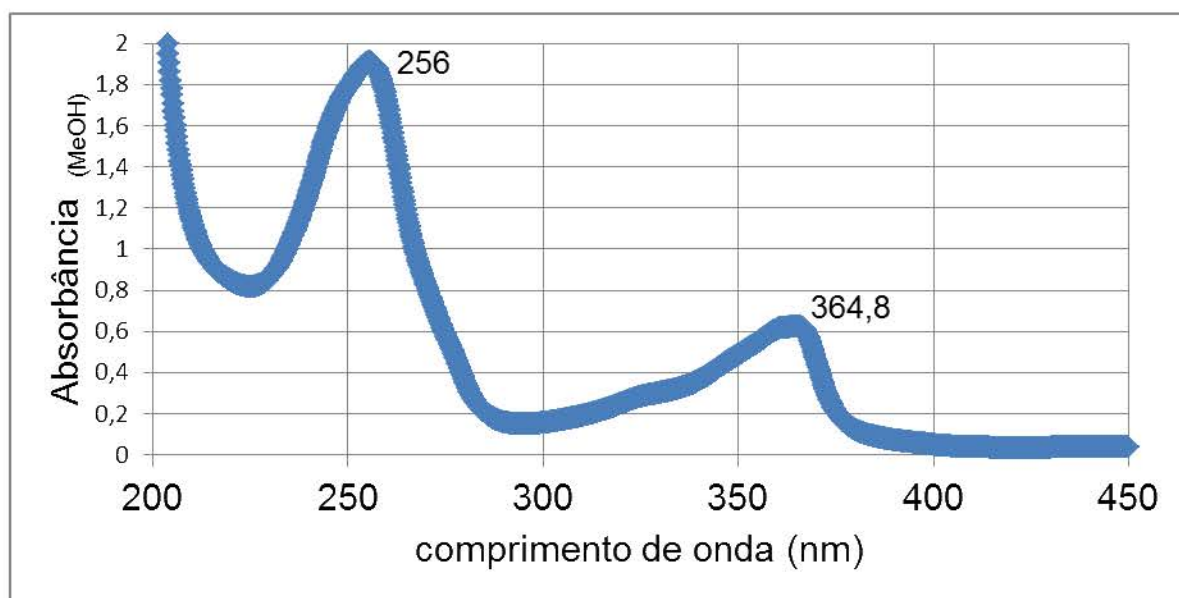


FIGURA 98 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DE ULTRAVIOLETA DA AMOSTRA BCO_B01 (200 – 450NM)

Uma dupla ligação C=C atua como cromóforo. Uma das suas transições importantes é $\pi \leftarrow \pi^*$, na qual há a transição de um elétron de um orbital π para o orbital antiligante correspondente. A energia é cerca de 7 eV para uma dupla ligação não conjugada, o que corresponde à absorção de 180 nm (no ultravioleta). Quando a dupla ligação é parte de uma cadeia conjugada, as energias dos orbitais moleculares aproximam-se mutuamente, e a transição π para π^* estrela desloca-se para os comprimentos de onda grandes. Pode estar na região do visível se o sistema conjugado for suficientemente comprido (ATKINS).

A transição responsável pela absorção dos compostos com carbonila pode ser atribuída aos pares isolados de elétrons do átomo de oxigênio. O conceito de Lewis de “par isolado” de elétrons corresponde, na teoria dos orbitais moleculares, a um par de elétrons em um orbital confinado em grande parte em um só átomo e que

não está apreciavelmente envolvido na formação de ligação. É este par que proporciona a transição $\pi^* \leftarrow n$ (n para π estrela). As energias típicas da absorção são da ordem de 4 eV (290 nm). Como as transições $\pi^* \leftarrow n$ são proibidas nas carbonilas, pela simetria, as absorções são fracas.

5.11 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Espectro de infravermelho do composto ativo (cristal bruto) é apresentado inteiro na FIGURA 99 e expandido na região de fingerprint na FIGURA 100.

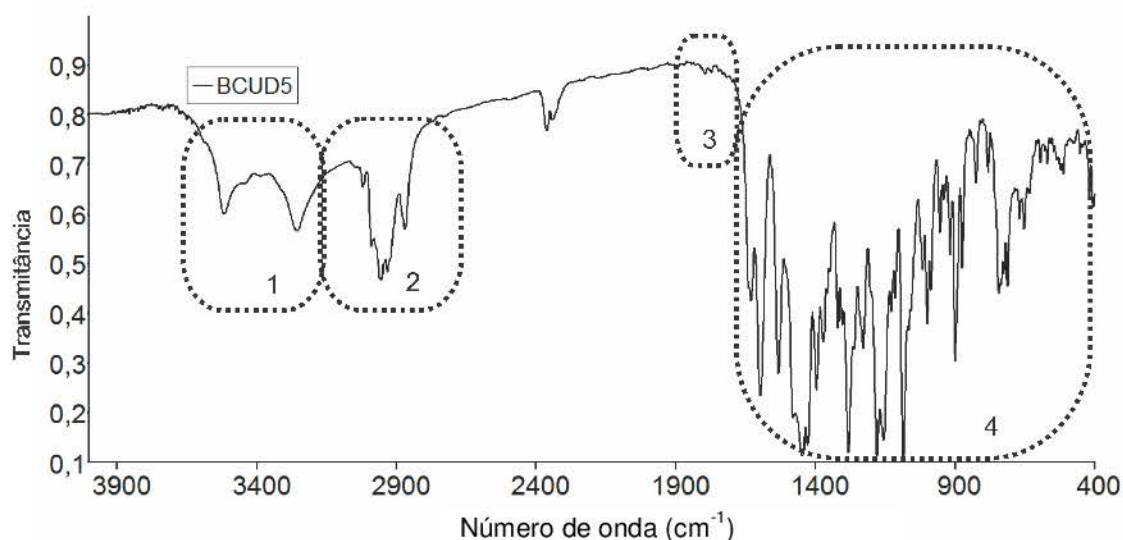


FIGURA 99 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (4000-400 cm^{-1}), COM (1) REGIÃO HIDROXILAS, AMINAS, etc.; (2) ANÉIS AROMÁTICOS OU LIGAÇÕES sp^2 ; (3) REGIÃO DE HARMÔNICOS CARACTERÍSTICOS; (4) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (1800-400 cm^{-1}), COM REGIÃO FINGERPRINT (1450-500 cm^{-1})

Frequências de absorção do espectro infravermelho e comparadas com a literatura, são similares a **3260, 2950, 2870, 1630, 1595, 1530, 1445, 1425, 1395, 1280, 1178, 1150, 1082, 889** (MAYERL et al., 1993). Também apresentaram bandas equivalentes a **2934, 1631, 1594, 1445, 1280, 1180, 1152** (HARRIS et al., 1993). Não foram observadas frequências de vibração para grupos éster [COOR], para o qual as frequências de vibração tipo estiramento seriam observadas entre 1746- 1735 cm^{-1} e entre 1250-1240 cm^{-1} .

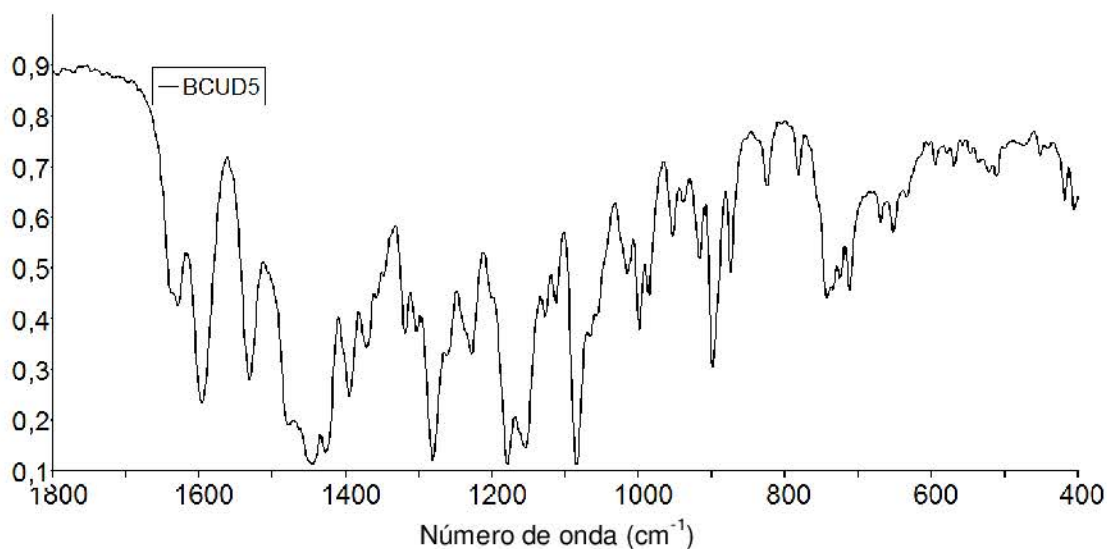


FIGURA 100 – EXPANSÃO DO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (1800-400 cm^{-1}), COM REGIÃO FINGERPRINT (1450-500 cm^{-1})

A banda de absorção de 1597 cm^{-1} aponta um grupo carbonil altamente conjugado ou ligado a hidrogênio. A posição deste sinal é muito próxima de 1590 cm^{-1} , valor registrado para o anel 3,7-dihidroxi-tropolona (SUGAWARA et al., 1988). Além disso, a banda 985 cm^{-1} poderia estar relacionada com a banda 972 cm^{-1} , a qual faz evidência característica a um sesquiterpeno tipo humuleno (LIN; JI-KAI, 2002).

A complexidade dos espectros de infravermelho na região entre $1450 - 500 \text{ cm}^{-1}$ torna difícil atribuir todas as bandas de absorção. Por causa dos padrões únicos ali encontrados, esta região é muitas vezes chamada a região de impressão digital (fingerprint), pois serve como comparativo único para análise futuras.

Segundo a ausência de absorções em infravermelho maiores que 1700 cm^{-1} , algumas hipóteses de fragmentos foram rejeitadas pois não havia evidências indicativas para os seguintes grupos funcionais: anidridos, cloretos de ácido, perácidos, grupo ($-\text{CO}-\text{O}-\text{C}=\text{C}$), lactonas tetra- ou pentacíclicas (alfa-beta-insaturadas ou beta-gama-insaturada); lactamas; imidas; uretanos; anéis cetona tetra- ou pentacíclicos; cetonas saturadas; ésteres (saturados),(aril-),(alfa- beta-insaturados) ou (alfa-halogênio); alfa-halogênio e alfa-alfa'-di-halogênio-cetonas; alfa-cetoésteres ou 1,2-dicetonas; e ácidos carboxílicos (saturados ou alfa-halogênio).

Além disto, na faixa entre 1700 a 1650 cm^{-1} , também foram rejeitados os seguintes grupos funcionais: aril- e ácidos carboxílicos alfa- e beta- insaturados, cetonas alfa- beta- alfa'- beta'- insaturadas, quinonas, cetonas aril-, alfa- ou beta- insaturadas, aldeídos aril- ou insaturados, aminas primárias em solução, grupos (R—CO—S—R), grupos (C=C=C—N—) ou grupos (C=C=C—O—).

5.12 CONSIDERAÇÕES

O composto ativo, mesmo que seja do tipo tropolona, comporta-se quimicamente e biologicamente como os polifenóis. Segundo Vergara-Salinas et al. (2015), polifenóis podem ser definidos como metabólitos secundários de peso molecular relativamente elevado e complexidade estrutural diversa que são sintetizados por microrganismos em resposta a diferentes tipos de *stress* (hídrico ou salino) ou contra fatores agressivos (bactérias, fungos, radiação ultravioleta, etc). A atividade leishmanicida de polifenóis já foi relatada, por exemplo o resveratrol (FERREIRA et al., 2014). Além disto, polifenóis possuem outras ações biológicas, tais como atividades anti-inflamatória, anti-cancer, antioxidante, anti agregação plaquetária, antifúngica, antiviral e antibiótica.

O composto ativo possui certo grau de simetria. Compostos com simetria tem efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial, tais como a pentamidina (MUKHERJEE et al., 2006) ou uma série de análogos simétricos de colina (IBRAHIM et al., 2011). Ambos tipos de composto tem atividade leishmanicida relatada. Desta forma, a atividade do composto ativo poderia estar relacionada ao seu grau de simetria dos anéis tropolona, no qual anéis simétricos com função aromática tem variação de densidade eletrônica. Tal comportamento poderia ser análogo aos casos descritos para pentamidina e compostos simétricos de colina, influenciando a atividade.

Para um fármaco ter potencial anti-*Leishmania* ele deve bater o critério de ser ativo $\text{IC}_{50} < 0,5 \mu\text{g/mL}$, com índice de seletividade $\text{SI} > 20$ (FREARSON et al., 2007). Segundo (NWAKA; HUDSON, 2006), outro critério pertinente a ser considerado é se uma formulação em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) apresenta atividade *in vivo* menor ou igual a 100 mg / kg (camundongos). Para isto deve haver

redução de parasitemia maior que 90% e/ou aumento de expectativa de vida, considerando entre uma a cinco doses administradas diariamente por via intraperitoneal, subcutânea ou oral.

Dutra e colaboradores (2009) estudaram as atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel, que também contém, segundo a literatura, quantidades de humuleno. Esta atividade pode ser decorrente da presença dos constituintes trans-cariofileno e α -humuleno, uma vez que já foi relatada tal atividade para estes constituintes (HERNANDEZ et al., 2005) (SONBOLI; BABAKHANI; MEHRABIAN, 2006).

Veiga e colaboradores (2007) citaram efeitos anti-inflamatórios de *Copaifera reticulata*, que contém sesquiterpenos incluindo o α -humuleno. Este gênero de planta havia sido avaliado com atividade leishmanicida por Santos e colaboradores (2008) e por Tincusi e colaboradores (2002).

Alfa-humuleno e (-)-trans cariofileno exibem acentuado efeito inibidor em diferentes modelos inflamatórios experimentais em camundongos e ratos. São poderosos compostos para o tratamento de doenças inflamatórias (FERNANDES et al., 2007). Entretanto, os mecanismos moleculares através do qual esses compostos exercem a sua atividade anti-inflamatória ainda permanecem uma incógnita (MEDEIROS et al., 2007). Os efeitos de alfa-humuleno e do trans-cariofileno foram avaliados sobre as respostas inflamatórias agudas induzidas por LPS, demonstrando a capacidade do alfa-humuleno inibir a ativação de NF-kappaB e a migração de neutrófilos induzida por LPS, prevenindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-1) no modelo *in vivo* (MEDEIROS et al., 2007).

Sesquiterpenos complexos e funcionalizados são componentes ativos de algumas plantas medicinais, como as lactonas sesquiterpênicas. A artemisinina é um importante antimalárico encontrado em *Artemisia annua* (Asteraceae) (KOOY; SULLIVAN, 2013).

Os sesquiterpenos α -humuleno e trans-cariofileno também foram os dois principais compostos encontrados nas sub-frações do óleo essencial de *Salvia officinalis* (HADRI et al., 2010). Testes com estes extratos tiveram a habilidade de inibir o crescimento de células de câncer. Extratos que continham alfa-humuleno apresentaram a atividade mais acentuada frente às linhas celulares RAW264.7 e HCT-116, com valores de IC₅₀ de 41,9 e de 77,3 μ g/mL, respectivamente (HADRI et

al., 2010).

Medeiros e colaboradores (2011) testaram a atividade *in vitro* anti-*Leishmania* e citotóxica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. O óleo essencial e timol mostraram atividade significativa contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, com IC₅₀/48h de 44,4 e 19,5 µg/mL, respectivamente. No entanto, nenhum efeito citotóxico foi observado em macrófagos tratados com o óleo essencial bruto. A análise química realizada por cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massas (MS) indicaram que 0,32% do óleo essencial de *Li. sidoides* é constituído por alfa-humuleno dentre outros constituintes sesquiterpenos. O timol correspondia a 78,37%, mas era citotóxico.

O metabolismo energético de tripanosomatídeos depende principalmente das fontes de carbono disponíveis no hospedeiro (COSTA et al., 2011). Segundo a revisão de Chawla e Madhubala (2010), os potenciais alvos para fármacos contra *Leishmania* são a via biossintética de esteróis; a via glicolítica; a via purine salvage; transportadores de nucleosídeos; a via biossintética de GPI; proteínas quinases; MAP quinases; proteinases; via biossintética de folato; sistema de glioxalase; via de tripanotiona; topoisomerasas e via de hypusine.

Sete enzimas da via glicolítica são compartimentalizadas em organelas do similares a peroxisomos, nos glicosomos, que são uma característica única de tripanosomatídeos. Na via biossintética de esteróis, uma das enzimas que está sendo estudada minuciosamente é a esqualeno sintase (SQS). Um outro alvo importante na via de biossíntese de ergosterol é a enzima $\Delta^{24,25}$ -sterol methyltransferase (SMT) (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

O modelo molecular do composto ativo pode ser simulado computacionalmente a partir das informações estruturais elucidadas. Estes dados poderiam ser utilizados para avaliar o possível mecanismo de ação do composto ativo. Chauhan et al. (2015), por exemplo, identificaram por “*molecular docking*” e avaliação biológica, novos híbridos de β -carboline–quinazolinona que inibiam a síntese da enzima tripanotione redutase de *Leishmania donovani*.

Com a disponibilidade de acesso à seqüências do genoma, o método convencional de identificação de alvo de drogas, que era feito com base nas diferenças bioquímicas e fisiológicas entre patógeno e hospedeiro, está num processo de atualização. Análise de micro-arrays e do proteoma, que fazem uso de

seqüências do genoma, permitem localizar alguns genes exclusivos ou espécie-específicos do parasito (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). Estas informações ajudam a compreender melhor a biologia do parasito. Várias frentes de pesquisa em bioinformática têm sido propostas, as quais irão propiciar o desenvolvimento de novas drogas (MYLER, 2008), principalmente se consideradas moléculas identificadas a partir da biodiversidade.

Na revisão de Azevedo-Junior e Soares (2009), comenta-se sobre três alvos proteicos identificados nos genomas de parasitos através de análises de bioinformática. Eles discutem sobre as principais características que possam servir para desenvolvimento de fármacos por *screening virtual* com base no conhecimento químico adquirido. Silva-López (2010) revisaram proteases como novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos anti-*Leishmania*. A inibição de uma serina protease por aprotinina ou por anticorpo anti-protease diminuiu significativamente o índice de infecção de macrófagos por *L. donovani*, sugerindo um alvo em potencial (DAS; DE; CHAKRABORTI, 2014). Smirlis e Soares (2014) descrevem mais proteínas como possíveis alvos.

A determinação de configuração enantiomérica do composto é muito importante. A primeira síntese enantio-específica de um composto anti-*Leishmania* (12-deoxyroyleanone), foi executada por semi-síntese a partir do ácido abiético em 11 etapas, com rendimento geral de 25 % (ROLDÁN et al., 2004).

Neste trabalho, a principal dificuldade foi a purificação de um composto desconhecido a partir de um extrato de um microrganismo também desconhecido. Antes que fosse possível submeter as amostras às técnicas analíticas, foi necessária a indicação de pureza. Além disto, a comparação com a literatura só foi possível após completa elucidação estrutural. Buscas a partir de fragmentos parciais não retornaram bons resultados nem no banco de dados SciFinder®, nem no ChemSpider®, tampouco na biblioteca NMRShiftDB (STEINBECK; KUHN, 2004). Mais de 400 respostas de busca não traziam informações compatíveis com os dados registrados, mesmo que a entrada de dados fosse com o fragmento já elucidado (anel tipo-humuleno com posições de substituição).

A maioria das hipóteses de fragmentos foram analisados e testados quanto a sua compatibilidade em relação aos dados, mas foi preciso analisar todos os experimentos em conjunto para concluir o objetivo. A cada etapa de elucidação

surgiam propostas mais consistentes e também mais dúvidas, que precisavam ser respondidas por novos tipos de experimento. A ordem de aparecimento dos sinais, por exemplo, serviu para fechamento estrutural dos anéis tropolona.

Resultados equivalentes de purificação poderiam ser conseguidos por cromatografia HPLC preparativa, mas ao mesmo tempo que não se tinha conhecimento de qual era o composto, ficavam incertezas quanto à forma mais adequada de separação. Sem estes conhecimentos ficaria perigoso fundamentar-se apenas nos dados de cromatografia analítica. Apesar de estar acoplado a um analisador de massas, esse era baixa resolução e não permitia análises MRM. Ou seja, as informações estruturais poderiam estar mascaradas, pois haveria a possibilidade de retenção na coluna ou eluição prévia da amostra alvo, de acordo com o protocolo de preparação e equilíbrio inicial da fase estacionária.

A análise de massas de baixa resolução da fração ativa demonstrou três picos em que o padrão de íons se mantinham constantes e portanto foram consideradas impurezas. Contudo, após análise estrutural, foi possível considerá-los como padrão característico de fragmentação de sesquiterpenos. Logo, concluiu-se que todas as moléculas que foram co-fracionadas por técnicas preparativas junto a molécula ativa, continham um núcleo sesquiterpênico.

A **caracterização química** forneceu muitas das possibilidades de classes de moléculas prováveis candidatas, incluindo a família dos terpenos e triterpenos. Seguindo a marcha fitoquímica, a molécula apresentava muitas propriedades consistentes com saponinas, que poderiam ser do tipo saponinas triterpênicas. Saponinas são compostos que possuem a característica anfótera, que tem a propriedade de diminuir a tensão superficial de líquidos.

Os experimentos de RMN não permitiram apontar estruturas conhecidas referentes aos compostos listados pela caracterização química. Os sinais de carbono δ_C 70,7; δ_C 80,4 e δ_C 82,0; em conjunto com a coloração roxa obtida pelo teste químico com vanilina-sulfúrica, corroboravam pela hipótese de um esteróide ou de um triterpeno.

A RMN, a princípio, serviu apenas para elucidar alguns fragmentos da molécula, sendo necessário recorrer à estratégia de elucidação estrutural como um todo. A estratégia iniciou em atribuir os valores de deslocamento aos átomos e considerar suas ligações. Para isto, analisou-se os valores de deslocamento químico

em associação às constantes de acoplamento à uma ligação e à acoplamentos de longa distância através de técnicas bidimensionais de RMN. No entanto, houve várias partes da molécula que tinham sobreposição de valores, sendo requisitados experimentos extras com maior resolução e detalhamento. Novos experimentos foram conduzidos para que fosse observada uma nova informação que complementasse os dados obtidos anteriormente.

O fato de apenas a molécula ativa possuir sinal na região de aromáticos (considerando o extrato bruto diclorometano nas condições de cultivo propostas) possibilitará a determinação de métodos de RMN quantitativos.

A localização da molécula para determinação de R_f era fundamental ao longo das etapas de purificação, mas às vezes confusa. A espectroscopia de UV-vis permitiu determinar que havia dois tipos de sistemas conjugados, fazendo entender e ter concordância com os fenômenos que aconteciam durante observação da amostra em placas de CCD, quando expostas à fluorescência de 365 nm. A amostra aparecia em diferentes aspectos, como fluorescência azul forte, fluorescência laranja-pink, fluorescência azul claro, mancha escura (quenching) ou reflexo branco. Também, em 254 nm em placas com indicador de fluorescência, aparecia como mancha escura ou com fluorescência azul forte. Sob a luz do dia, a amostra apresentava coloração marrom ou laranja forte de acordo com o solvente que estava solubilizado.

A interpretação de cor não é um parâmetro confiável caso não se tenha um padrão para comparação, pois vários fatores, tais como estado de ionização e influência da matriz e solvente, interferem sobre o resultado. No entanto, a observação de cor indicou a possível presença de grupos de duplas conjugadas. Enquanto as análises de RMN inferiam apenas uma dupla ligação trans presente, racionalizou-se que todas as outras duplas estariam conjugadas em anel aromático.

Algumas absorções davam idéia de valores de presença de nitrogênio, pois os valores de absorção na região de oxigênio não se apresentava característica de grupos funcionais conhecidos. Ao final foi possível perceber que a explicação se devia ao efeito de tautomeria da função enol no grupo fenol estaria influenciando a característica vibracional.

No transformação entre um anel humuleno e um anel tipo-humuleno, com remoção de duplas ligação poderia estar relacionada a ação reversa de uma liase.

Esta enzima catalisa quebra de ligações químicas por uma reação de eliminação, gerando uma dupla ligação. A reação é diferente de hidrólise ou oxidação. O produto final normalmente possui uma nova dupla ligação ou uma estrutura ciclizada. A reação reversa também é possível e é denominada adição de Michael (Lyase, WIKIPEDIA) (BRENDA).

Testes químicos, assim como uma reação de íon selecionado no experimento de massas (qTOF ESI modo positivo) (FIGURA 101) e alguns sinais no experimento HSQC apontaram uma possível glicosilação do composto ativo. Entretanto a amostra encontrava-se em uma fase de purificação inicial (amostra BCO_B01) e quando obtido o composto em maior quantidade por outras técnicas de purificação, não foi possível reproduzir tais observações.

Em proteínas, a glicosilação tem efeito sobre secreção, estrutura, estabilidade, propriedades, processamento intracelular e atividade (ARORA, 2004). De forma análoga, a glicosilação de produtos naturais lhes conferem as mesmas funções. A síntese e degradação de glicosídeos envolve três passos principais: ativação de açúcares por fosforilação; transferência de resíduos glicosil para aceptores; e hidrólise de glicosídeos por glicosidases (LUCKNER, 1984 , p. 112).

A via metabólica dos terpenóides e policetídeos já estão bem estabelecidas. A via dos anéis tropolones, entretanto, só foi recentemente identificada (CAI et al., 2012). A via dos meroterpenóides, que incluem etapas de ambas vias metabólicas para síntese de compostos como a pycnidiona, ainda não foram estabelecidas. A indicação de uma possível glicosilação do composto ativo poderá ser um indício inovador que explique algumas etapas de via biossintética desses compostos de via metabólica mista.

O teste de fenol sulfúrico mudou a intensidade da coloração alaranjada, mas somente quando testados 2 mg de amostra. O teste químico de Keller Kelliani também resultou positivo. Apesar de primordialmente usado para saponinas, o teste também identifica glicosídeos. O método do DNS não indicou açúcar redutor, assim como o teste de Molisch não identificou resíduos de açúcares (apesar de criar efeito turvo).

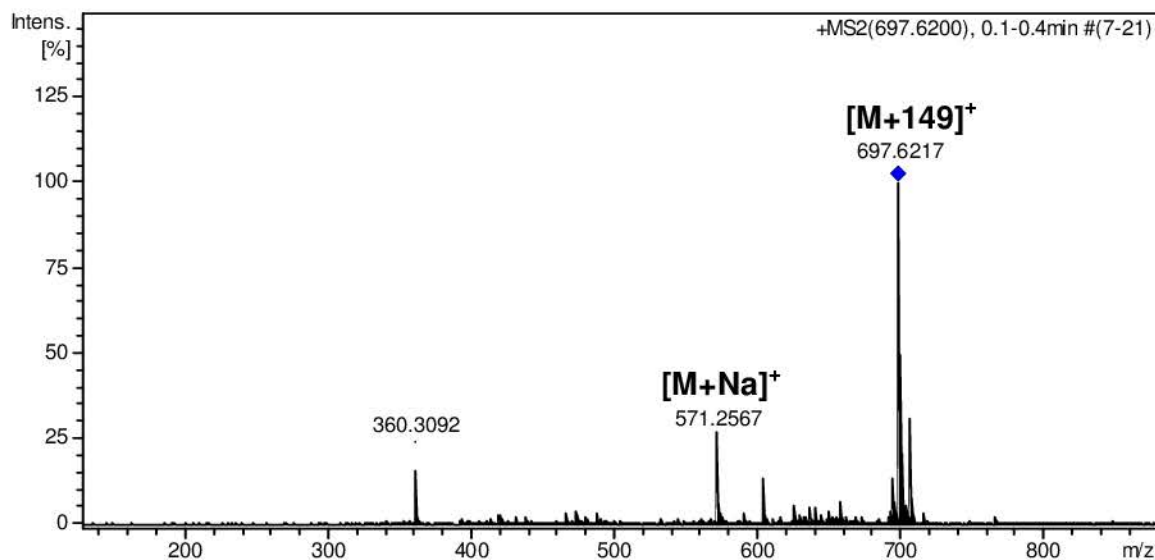


FIGURA 101 - REAÇÃO DE ÍON SELECIONADO (697,62)
IONIZAÇÃO MODO POSITIVO - MS²

A elucidação estrutural de uma molécula, a partir de uma fonte anteriormente desconhecida, agregará valor ao bioprocesso, pois este será direcionado ao desenvolvimento de um futuro medicamento com ação leishmanicida.

A estimulação química e a fotoregulação são fatores que podem influenciar a fisiologia e as rotas biossintéticas de fungos (ARORA, 2004 , p. 371). Com a definição de método analítico, o composto ativo pode ser prospectado em meios de cultura com diversas fontes de carbono e nitrogênio. Considerando menores custos, o crescimento do fungo poderia ser otimizado para produção do composto de interesse. Entre os fatores que influenciam seu crescimento, pode-se elencar os seguintes:

1. Quantidade e qualidade da matéria prima do meio de cultura;
2. Uso de água deionizada (micronutrientes);
3. Temperatura de fermentação (variações são toleradas), a 37°C o crescimento é mínimo, mas o microrganismo sobrevive;
4. pH inicial;
5. Constituição do meio de fermentação;
6. Idade do inóculo;
7. Fragmentação do inóculo;
8. Método de agitação;
9. Oxigenação do meio;
10. Luminosidade (radiação ultravioleta).

A viabilidade econômica de um medicamento depende em grande parte da facilidade de obtenção dos componentes a partir da matéria-prima utilizada. Há relatos que demonstram a existência de maior ou menor concentração de classes de metabolitos secundários em diferentes partes de planta (LIMA et al., 2015). Este problema é menor em Bioprocessos industriais, pois é possível obter condições controladas e reprodutíveis (DORAN, 2013).

Métodos de síntese ou semi-síntese por vias químicas ou bioquímicas costumam ser economicamente atrativas, entretanto desde que seja possível viabilidade técnica na produção de moléculas complexas, sobretudo se houver necessidade de resolução de enantiômeros (ROLDÁN et al., 2004).

6 CONCLUSÕES

O bioprocesso por fermentação líquida em biorreator, utilizando um fungo, teve produtividade aproximada de 300 mg de um composto ativo com atividade leishmanicida por batelada de 10 litros, em 7 dias de cultivo em meio de cultura definido (glicose).

O composto foi isolado tanto de biomassa como de caldo de fermentação; mais facilmente da biomassa.

O isolamento e purificação do composto ativo apresentou certa dificuldade, devido a complexidade do extrato diclorometano, sendo necessário 4 bateladas de cultivo em biorreator para isolamento do composto através do processo de cristalização.

A melhor condição de cristalização foi o processo com extrato de biomassa (5 L extrato concentrado) e solubilizado em mistura diclorometano metanol com precipitação lenta a temperatura ambiente (aproxim. 7 dias).

A melhor condição de recristalização foi com acetato de etila e solução aquosa de bicarbonato de sódio.

O composto ativo foi identificado como Pycnidiona (HARRIS et al., 1993) ou Eupenifeldin (MAYERL et al., 1993), dois estereoisômeros de denominação distinta. A elucidação estrutural foi concluída a partir do conjunto de informações de caracterização química, técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

O fungo produtor do composto ativo foi identificado por técnicas de Biologia Molecular e observação de formação de esporos, sendo classificado como gênero *Phaeosphaeria* sp., ordem Pleosporales.

Fungos da ordem Pleosporales, especialmente do gênero *Phaeosphaeria* sp. e *Phoma* sp. (gênero reclassificado), possuem relatos na literatura para produção de compostos pycnidiona (HARRIS et al., 1993).

O composto ativo teve ação leishmanicida maior que o fármaco antimoniato de meglumina (Glucantime) em concentração de inibição calculada em IC₅₀ 0,72 µM contra *L. (L.) amazonensis*, 0,66 µM contra *L.(L.) infantum* e 0,58 µM contra *L.(V.) braziliensis*. O relato desta atividade é inédito.

7 RECOMENDAÇÕES

A identificação estrutural de um composto bioativo abre muitas perspectivas para trabalhos futuros.

Na área de Bioprocessos, deve-se verificar o efeito de oxigenação sobre a produtividade do biocomposto, pois alguns indícios apontam dependência direta entre oxigenação e produto. Será necessário testar se as fases anteriores à fase estacionária tem produtividade do composto, mesmo se for acelerada a velocidade de crescimento. Sugere-se que sejam testados outros meios de cultivo complexos, levando em consideração uma metodologia precisa de quantificação do produto. Também serão necessários testes de estabilidade para complementar informações relevantes à formulação de um possível fármaco.

Nas áreas de Química e Bioquímica será necessário verificar se o composto produzido é o único isômero isolado. Portanto, deve-se determinar a estereoquímica absoluta da molécula por técnicas de difratometria de raio X e técnicas ópticas. Caso exista mais de um isômero, deve-se verificar se todos possuem atividade. Além disso, deve-se verificar se a molécula é realmente glicosilada, de acordo com fortes indícios deste trabalho.

Em trabalhos futuros, em que seja necessário o uso quantitativo da técnica, sugere-se estudos de padronização, verificação e validação para utilização de HPLC e HPLC-MS. Caso seja possível, deve-se aproveitar a técnica de RMN quantitativa, pois os sinais da região de aromáticos podem servir para estabelecer um sinal referência, livre de sobreposições.

Na área de Parasitologia, será necessário testar o composto ativo em modelos *in vivo*. Com a determinação de pureza e a informação precisa da estrutura molecular, pode-se correlacionar melhor os resultados entre dose e atividade. Evita-se, portanto, o gasto excessivo de animais. Uma outra frente que se abre são testes contra outras espécies de parasitos.

8 REFERÊNCIAS

ABE, H. et al. Total synthesis of the proposed structure of a polyketide from *Phialomyces macrosporus*. **Chemical Communications**, United Kingdom, v. 51, n. 17, p. 3586–3589, 2015.

ABREU, C. R. DE et al. Description of six autochthonous cases of canine visceral leishmaniasis diagnosed in Pedregulho (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Brasil, v. 24, n. 2, p. 216–219, 2015.

AGARWAL, K. C. et al. Design and synthesis of novel substituted quinazoline derivatives as antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, England, v. 19, n. 18, p. 5474–5477, 2009.

AGILENT TECHNOLOGIES INC. Concepts Guide. **Agilent 6100 Series Quadrupole LC / MS Systems**, v. 1960, n. 90072, p. 1–130, 2010.

AGUIAR, M. G. et al. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical Paromomycin and oral Miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 54, n. 11, p. 4699–4704, 2010.

AHUA, K. M. et al. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 110, n. 1, p. 99–104, 2007.

AIRES-DE-SOUSA, J.; HEMMER, M. C.; GASTEIGER, J. Prediction of ¹H NMR Chemical Shifts Using Neural Networks. **Analytical Chemistry**, United States of America: American Chemical Society, v. 74, n. 1, p. 80–90, 2002.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, United States of America: Elsevier, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, United States of America, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2008.

AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Netherlands, v. 23, n. 9, p. 1026–1034, 2009.

ANDEL, M. et al. [Factors causing damage and destruction of beta-cells of the islets of Langerhans in the pancreas]. **Vnitřní Lekarství**, Czech Republic, v. 60,

n. 9, p. 684–690, 2014.

ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Netherlands: Elsevier Ltd. on behalf of Australian Society for Parasitology Inc., v. 4, n. 2, p. 95–111, 2014.

ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, United Kingdom, v. 8, n. 3, p. 191–199, 2008.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, Germany, v. 31, n. 2, p. 109–118, 2012.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by *Wolfiporia cocos* and *Perenniporia medulla-panis*. **Process Biochemistry**, Netherlands, v. 41, n. 4, p. 887–891, 2006.

ARAUJO, V. E. M. de; et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America, v. 7, n. 11, p. e2540, 2013.

ARMSON, A. et al. A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 73, n. 3, p. 303–311, 1999.

ARORA, D. K. **Handbook of fungal biotechnology, Volume 20**. 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 2004.

ARRAES, S. M. A. A. et al. Investigação sorológica de casos subclínicos de leishmaniose tegumentar após um surto em uma localidade endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba-MG, Brasil, 2008.

ASEVEDO, D. Leishmaniose tem cura e eutanásia não é tratamento. Disponível em: <http://www.brasiliaempauta.com.br/artigo/ver/categoria/saude/id/400/nome/Leishmaniose_tem_cura_e_eutanasia_ao_e_tratamento>. Acesso em: 15/8/2015.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 30, n. 12-13, p. 1269–1281, 2000.

ASHOK, D.; ACHA-ORBEA, H. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine *Leishmania infection*. **Trends in Parasitology**, United Kingdom: Elsevier Ltd, v. 30, n. 10, p. 499–507, 2014.

AUXILIADORA DEA-AYUELA, M. et al. *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-N-pyrimidinand N-pyrazin-2-yl-benzenesulfonamides, and N2-(4-nitrophenyl)-N1-propylglycinamide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, United Kingdom, Elsevier, v. 17, n. 21, p. 7449-7456, 2009.

AZEVEDO JUNIOR, W. DE; SOARES, M. P. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. **Current Drug Targets**, Netherlands, Springer, v. 10, n. 3, p. 193–201, 2009.

AZZOUZ, S. et al. Leishmanicidal activity of edelfosine, Miltefosine and

ilmofosine. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Denmark, v. 96, n. 1, p. 60–65, 2005.

BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, United States of America, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, 1986.

BAILEY, A. M. et al. Characterisation of 3-methylorcinolaldehyde synthase (MOS) in *Acremonium strictum*: first observation of a reductive release mechanism during polyketide biosynthesis. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, England, n. 39, p. 4053–4055, 2007.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, United Kingdom, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

BANFI, D.; PATINY, L. www.nmrdb.org: Resurrecting and Processing NMR Spectra On-line. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, Switzerland: Swiss Chemical Society, v. 62, n. 4, p. 280–281, 2008.

BARBIERI, R.; CARVALHO, F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas-RS, Brasil v. 7, n. 2, p. 79–83, 2001.

BARBOSA, T. P. et al. Design, synthesis and antileishmanial *in vitro* activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, United Kingdom, v. 19, n. 14, p. 4250–4256, 2011.

BARRAL, A. et al. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **International Journal of Dermatology**, United States of America, v. 34, n. 7, p. 474–479, 1995.

BARRATT, G.; LEGRAND, P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of Amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, United States of America, v. 18, n. 6, p. 527–530, 2005.

BARRATT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Cellular transport and lipid interactions of Miltefosine. **Current Drug Metabolism**, Netherlands, v. 10, n. 3, p. 247–255, 2009.

BARRATT, J. L. N. et al. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v. 23, n. 4, p. 795–836, 2010.

BART, H. J.; PILZ, S. **Extraction of Natural Products from Plants—An Introduction**. Online doi:10.1002/9783527635122: Edited by Hans-Jörg Bart and Stephan Pilz, 2011.

BASU, M. K. Liposomal delivery of antileishmanial Agents. **The Journal of Applied Research**, United States of America, v. 5, n. 1, p. 221–236, 2005.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom: Australian Society for Parasitology Inc., v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, United Kingdom, v. 11, n. 4, p. 340–344, 2008.

BELLEMAIN, E. et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiology**, United Kingdom: BioMed Central Ltd, v. 10, n. 1, p. 189, 2010.

BENTLEY, R. A fresh look at natural tropolonoids. **Natural Product Reports**, United Kingdom, v. 25, n. 1, p. 118–138, 2008.

BERN, C. et al. Liposomal Amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, United States of America, v. 43, n. 7, p. 917–924, 2006.

BERROCAL-LOBO, M. et al. *Leishmania donovani*: Thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **Experimental Parasitology**, United States of America, v. 122, n. 3, p. 247–249, 2009.

BHARGAVA, P.; SINGH, R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Egypt, v. 2012, p. 1–13, 2012.

BHAT, S. V; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. **Chemistry of natural products**. New Delhi: Springer & Narosa, 2005.

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch>. Acesso em: 30/10/2015.

BLITTERSWIJK, W. J. van; VERHEIJ, M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. **Current Pharmaceutical Design**, Netherlands, v. 14, n. 21, p. 2061–2074, 2008.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 28, n. 1, p. 121–134, 1998.

BOIANI, L. et al. *In vitro* and *in vivo* antitrypanosomatid activity of 5-nitroindazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Italy, v. 44, n. 3, p. 1034–1040, 2009.

BOLLINI, M. et al. New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, United Kingdom, v. 17, n. 4, p. 1437–1444, 2009.

BOLOGNIA, J.; JORIZZO, J. L.; SCHAFFER, J. V. **Dermatology**. Philadelphia; London: Elsevier Saunders, 2013.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira Vol.1**. 5ªed. Brasília-DF, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W.; BREITMAIER, E. **Carbon-13 NMR spectroscopy : high-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**. New York: VCH Publishers, 1987.

BREMSE, W. Hose — a novel substructure code. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 103, n. 4, p. 355–365, 1978.

BRINGMANN, G. et al. A novel *Leishmania major* amastigote assay in 96-Well format for rapid drug screening and its use for discovery and evaluation of a new class of leishmanicidal Quinolinium salts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 57, n. 7, p. 3003–3011, 2013.

BROMANN, K. et al. Identification and characterization of a novel diterpene gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **PLoS ONE**, United States of America, v. 7, n. 4, p. e35450, 2012.

BROWN, M. et al. Successful liposomal Amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. **The British Journal of Dermatology**, England, v. 153, n. 1, p. 203–205, 2005.

BRUKER. **NMR Tables**. Disponível em: <http://kodu.ut.ee/~laurit/AK2/NMR_tables_Bruker2012.pdf>. Acesso em: 12/9/2015.

BURCHMORE, R. J.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 31, n. 12, p. 1311–1320, 2001.

BUTLER, E. **AVANCE - SGU Based Frequency Generation - Beginners Guide**. Version 01. Rheinstetten, Germany: Bruker Biospin GmbH, 2002.

CAI, M. et al. **How tropolones synthesized in fungi : 70-year-old chemical mystery solved**. PhysOrg, online: University of Bristol, ScienceDaily. Disponível em: <www.sciencedaily.com/releases/2012/04/120416154414.htm> Acesso em: 12/04/2015.

CAI, P. et al. Epolones: novel sesquiterpene-tropolones from fungus OS-F69284 that induce erythropoietin in human cells. **Journal of Natural Products**, United States of America, v. 61, n. 6, p. 791–795, 1998.

CALOGEROPOULOU, T. et al. Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, United States of America, v. 51, n. 4, p. 897–908, 2008.

CAMARA, M. P. S. et al. Molecular phylogeny of *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria*. **Mycologia**, United States of America, v. 94, n. 4, p. 630–640, 2002.

CAMPANA, J. E. **Time-of-flight mass spectrometry: a historical overview**. United Kingdom: Taylor & Francis, 1987.

CAMPINO, L. et al. Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. **Acta Médica Portuguesa**, Portugal, v. 18, n. 6, p. 475–478, 2005.

CANNELL, R. J. P. **Natural products isolation**. Totowa, New Jersey, United States of America: Humana Press, 1998.

CARREGARO, V. et al. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC Microbiology**, England, v. 13, p. 102, 2013.

CARRIÓ, J. et al. *In vitro* activity of pentavalent antimony derivatives on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* strains from humans and dogs in Spain. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 79, n. 2, p. 179–183, 2001.

CARSON, C. et al. A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. **Vaccine**, Netherlands, v. 27, n. 7, p. 1080–1086, 2009.

CASTILLO, A. M.; PATINY, L.; WIST, J. Fast and accurate algorithm for the simulation of NMR spectra of large spin systems. **Journal of Magnetic Resonance**, United States of America, v. 209, n. 2, p. 123–130, 2011.

CASTRO, E. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Parana. **Experimental Parasitology**, United States of America, v. 117, n.1, p. 13–21, 2007.

CAVALLI, A. et al. Complementary medicinal chemistry-driven strategies toward new antitrypanosomal and antileishmanial lead drug candidates. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**: John Wiley & Sons, Inc. & Federation of European Microbiological Societies, United Kingdom, v. 58, n. 1, p. 51–60, 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention - Leishmaniasis - Prevention & Control. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/prevent.html>>. Acesso em: 14/5/2015.

CFSPH. **Leishmaniasis (cutaneous and visceral)**. Iowa, United States of America: The Center for Food Security and Public Health. College of Veterinary Medicine. Iowa State University. Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 2009.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, India, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010.

CHANG, K. P. et al. *Leishmania* model for microbial virulence: The relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 85, n. 3, p. 375–390, 2003.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, United Kingdom, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHARNEY, E. **The molecular basis of optical activity : optical rotatory dispersion and circular dichroism**. New York, United States of America: Wiley, 1979.

CHAUHAN, S. S. et al. Novel β -carboline–quinazolinone hybrid as an inhibitor of *Leishmania donovani* trypanothione reductase: Synthesis, molecular

docking and bioevaluation. **Medicinal Chemistry Communications**, [United Kingdom], Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 2, p. 351–356, 2015.

CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. New delivery systems for Amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, India, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2010.

CHEMAXON. Marvin Sketch. Disponível em: <<https://www.chemaxon.com/free-software/>>. Acesso em: 10/7/2015.

CHEMCALC. ChemCalc M F Finder. Disponível em: <http://www.chemcalc.org/mf_finder/mfFinder_em_new>. Acesso em: 23/10/2015.

CHEN, M. et al. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 38, n. 6, p. 1339–1344, 1994.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, United Kingdom, v. 53, n. 3, p. 330–341, 2009.

CIVJAN, N. **Natural Products in Chemical Biology**. Hoboken, New Jersey, United States of America: John Wiley & Sons Inc. 2012.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. London, England: Pergamon, 1999.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. London, England: Elsevier, 2009.

CLERK, J.; CLERK, J. Physics is set spinning. **Nature Physics**, United Kingdom, v. 595, n. 3, p. 591–595, 2008.

COHEN, J. M. et al. Pink plaque on the arm of a man after a trip to Mexico: cutaneous leishmaniasis. **Dermatology Online Journal**, United States of America, v. 21, n. 6, 2015.

COHNSTAEDT, L. W. et al. The population structure of *Lutzomyia verrucarum* (Diptera: Psychodidae), a *Bartonella bacilliformis* and *Leishmania peruviana* vector in Peru. **Journal of Medical Entomology**, United States of America, v. 49, n. 1, p. 77–84, 2012.

COLLAZOS, J. Comment on: Efficacy of liposomal Amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v. 61, n. 2, p. 466–467, 2008.

CONSTANTINO, M. G. **Softwares FOMSC3**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil, 2004.

CONTRERAS, R. H. **High resolution NMR spectroscopy**. 1ªed. San Diego, United States: Elsevier Science, 2013.

COOKE, D. E. L. et al. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related

oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, United States of America: Elsevier, v. 30, n. 1, p. 17–32, 2000.

CÔRTEZ, L. M. et al. Lulo cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): a novel model to assay *Leishmania* spp. and vector interaction. **Parasites & Vectors**, United Kingdom: BioMed Central Ltd, v. 4, n. 1, p. 216, 2011.

COSTA LIMA, S. et al. *In vitro* evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against *Leishmania infantum* protozoa. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 39, n. 5, p. 424–430, 2012.

COSTA, T. L. et al. Energetic metabolism of axenic promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, United Kingdom, v. 128, n. 4, p. 438–443, 2011.

COSTA TORRES, A. F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A 2 and l-amino acid oxidase. **Toxicon**, United Kingdom, v. 55, n. 4, p. 795–804, 2010.

COUTO, D. V. et al. American tegumentary leishmaniasis - a case of therapeutic challenge. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasil: Sociedade Brasileira de Dermatologia, v. 89, n. 6, p. 974–976, 2014.

CRASTO, A. M. 1H-1H COSY (Correlation Spectroscopy). Disponível em: <<http://orgspectroscopyint.blogspot.com.br/2014/11/1h-1h-cosy-correlation-spectroscopy.html>>. Acesso em: 27/6/2015.

CRAUWELS, P. et al. Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination. **Autophagy**, United Kingdom, v. 11, n. 2, p. 285–297, 2015.

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARS, M. **Organic Structure Analysis**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2010.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CRUZ, A. et al. Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Journal of Infectious Diseases**, United Kingdom, v. 195, n. 4, p. 602–608, 2007.

CUERVO, P. et al. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 154, n. 1, p. 6–21, 2007.

CUMMINGS, M.; BREITLING, R.; TAKANO, E. Steps towards the synthetic biology of polyketide biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, United Kingdom, v. 351, n. 2, p. 116–125, 2014.

CUNHA, R. C. et al. Laboratory diagnosis and clinical signs of canine visceral leishmaniasis in dogs examined at the center for zoonosis control in Campo Grande-MS, Brazil. **Archives of Veterinary Science**, Brazil, v. 17, n. 4, p. 17–26, 2012.

CUNHA, R. C. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia*

longipalpis captured in Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Brasil, v. 23, n. 2, p. 269–273, 2014.

DANELLI, M. G. M. et al. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 70, n. 5, p. 608–614, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasil, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DAS, P.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. *Leishmania donovani* secretory serine protease alters macrophage inflammatory response via COX-2 mediated PGE-2 production. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, India, v. 51, n. 6, p. 542–551, 2014.

DAVID L. NELSON, M. M. C. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5ª ed. New York, NY, United States of America: Worth Publishers, 2008.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Netherlands, v. 103, n. 7, p. 653–660, 2009.

DAVIS, A. J.; MURRAY, H. W.; HANDMAN, E. Drugs against leishmaniasis: A synergy of technology and partnerships. **Trends in Parasitology**, United Kingdom, v. 20, n. 2, p. 73–76, 2004.

DAVISON, J. et al. Genetic, molecular, and biochemical basis of fungal tropolone biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States of America: National Acad Sciences, v. 109, n. 20, p. 7642–7647, 2012.

DECIT. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde - informe técnico institucional do Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, Brasil, v. 44, n. 1, p. 200–202, 2010.

DEGRUYTER, J. et al. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. **Mycological Research**, England: British Mycological Society, v. 113, n. 4, p. 508–519, 2009.

DELFIN, D. A. et al. Redox-active dinitrodiphenylthioethers against *Leishmania*: synthesis, structure-activity relationships and mechanism of action studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, England, v. 17, n. 2, p. 820–829, 2009.

DEMICHELI, C. P.; FRÉZARD, F. Medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo – SP, Brasil: Instituto de Química, USP, n. 6, p. 24–30, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, United States of America, v. 14, n. 5, p. 417–423, 1996.

DEWAR, M. J. S. Structure of stipitatic acid. **Nature**, United Kingdom, v. 155, p. 50–51, 1945.

DIAS, R. C. F. et al. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, State of Paraná, Brazil. **WORLDLEISH 5th - World Congress on Leishmaniasis. Abstract Book**, [940] P826, 2013.

DJERASSI, C. **Optical Rotatory Dispersion; Applications to Organic Chemistry**. New York, NY, United States of America: McGraw-Hill, 1960.

DNDI. NGP (Next Generation Pharmaceutical). Disponível em: <DNDI.org/index.php/ngpharma.eu.com>. Acesso em: 11/7/2010.

DONADIO, S. et al. Comparative analysis and insights into the evolution of gene clusters for glycopeptide antibiotic biosynthesis. **Molecular Genetics and Genomics**, Germany, v. 274, n. 1, p. 40–50, 2005.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Waltham-MA, United States of America: Academic Press, 1995.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. London, England: Elsevier/Academic Press, 2013.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, England, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, United Kingdom, v. 5, p. 276, 2012.

DOWNARD, K. **Mass spectrometry a foundation course**. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2004.

DRUGBANK. DrugBank Open data drug & Drug Target Database Version 4.3. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 20/4/2015.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [São Paulo-SP], Brasil, v. 53, n. 1, p. 3–11, 2011.

DUJARDIN, J. Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome:

Resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? **Infection, Genetics and Evolution**, Netherlands, v. 9, p. 290–297, 2009.

DUMONTEIL, E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, Ohio United States of America: Hindawi Publishers, v. 2007, p. 1–11, 2007.

DUNNING, N. *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. **Bioscience Horizons**, United Kingdom, v. 2, n. 1, p. 73–82, 2009.

DUTRA, R. C. et al. Antimicrobial and leishmanicidal activities of seeds of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 2A, p. 429–435, 2009.

DUTTA, A. et al. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, Ireland, v. 54, n. 2, p. 119–122, 2005.

EARTHLIFE. Reproduction of lichens. Disponível em: <[HTTP://www.earthlife.net/lichens/reproduction.html](http://www.earthlife.net/lichens/reproduction.html)>. Acesso em: 14/8/2015.

EKMAN, R. et al. **Mass Spectrometry for Drug Discovery and Drug Development**. Hoboken, New Jersey, United States of America: John Wiley & Sons Inc., 2013.

ELMAHALLAWY, E. K.; AGIL, A. Treatment of leishmaniasis: A review and assessment of recent research. **Current Pharmaceutical Design**, Seattle, WA, United States of America, v. 21, n. 17, p. 2259–2275, 2015.

ELOWITZ, M. What is Imaging Spectroscopy (Hyperspectral Imaging)? Disponível em: <<http://www.markelowitz.com/hyperspectral.html>>. Acesso em: 18/6/2015.

ENDRIS, M. et al. Bacterial sepsis in patients with visceral leishmaniasis in Northwest Ethiopia. **BioMed Research International**, United States of America, v. 2014, p. 361058, 2014.

ERNST, R. R. Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform spectroscopy. **Bioscience Reports**, United Kingdom, v. 12, n. 3, p. 143–187, 1992.

EROGLU, F. et al. Clinical manifestations and genetic variation of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in Southern Turkey. **Experimental Parasitology**, United States of America, v. 154, p. 67–74, 2015.

ESTEVEZ, M. A. A. et al. Synthesis and biological evaluation of trifluralin analogues as antileishmanial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, United Kingdom, v. 18, n. 1, p. 274–281, 2010.

EVANS, D. A. et al. The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, England: Oxford University Press, v. 78, n. 1, p. 35–42, 1984.

FACEY, G. Magnitude COSY-90 vs. Phase Sensitive COSY-90. Disponível em: <<http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com.br/2008/07/magnitude-cosy-90-vs-phase-sensitive.html>>. Acesso em: 21/9/2015.

FAIMAN, R. et al. Studies on the flight patterns of foraging sand flies. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 120, n. 1-2, p. 110–114, 2011.

FAULDE, M. et al. High efficacy of integrated preventive measures against zoonotic cutaneous leishmaniasis in northern Afghanistan, as revealed by Quantified Infection Rates. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 110, n. 1, p. 28–34, 2009.

FELÍCIO, R. de et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Netherlands, v. 52, n. 5, p. 763–769, 2010.

FENDRICH, R. C. **Production and testing of antileishmanial compounds obtained by submerged fermentation of *Perenniporia martiussii***. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Paraná - UFPR. Master BIODEV IRD. Université de Provence et de la Méditerranée. Curitiba – PR, Brasil, 2010.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Netherlands, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.

FERRARO, J. R.; BASILE, L. J. **Fourier transform infrared spectroscopy**. 1^o ed. New York, NY, United States of America: Academic Press, 1978.

FERREIRA, C. et al. Resveratrol Is Active against *Leishmania amazonensis*: *in vitro* effect of its association with Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 58, n. 10, p. 6197–6208, 2014.

FIGUEIRO-FILHO, E. A. et al. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, United States of America, v. 12, n. 1, p. 31–40, 2004.

FISHER, M. L. et al. Deposition from ultra-low volume application of public health insecticides in a hot desert environment. **Journal of the American Mosquito Control Association**, United States of America, v. 31, n. 2, p. 155–163, 2015.

FLIEGL, H. et al. The gauge including magnetically induced current method. **Physical Chemistry Chemical Physics**, United Kingdom, v. 13, n. 46, p. 20500, 2011.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose v.4**. São Paulo – SP, Brasil: Editora Edgar Blucher Ltda./ EDUSP, 1973.

FORTIN, A. et al. Direct comparison of the efficacy and safety of oral treatments with oleylphosphocholine (OIPC) and Miltefosine in a mouse model of *L. major* cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America, v. 8, n. 9, p. e3144, 2014.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, United Kingdom, v. 11, n. 6, p. 481–487, 2008.

FRANCA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, Brasil: Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, v. 29, n. 3, p. 229–232, 1996.

FREARSON, J. A. et al. Target assessment for antiparasitic drug discovery. **Trends in Parasitology**, United Kingdom, v. 23, n. 12, p. 589–595, 2007.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Netherlands, v. 2, p. 11–19, 2012.

GACHET, M. S. et al. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 128, n. 1, p. 184–197, 2010.

GADAGKAR, S. R.; CALL, G. B. Computational tools for fitting the Hill equation to dose–response curves. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, United States of America: Elsevier B.V., v. 71, p. 68–76, 2015.

GAMBOA, D. et al. Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. **Parasitology**, United Kingdom, v. 135, n. 3, p. 319–326, 2008.

GANAPATY, S. et al. Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. **Phytochemistry Letters**, Netherlands, v. 1, n. 4, p. 175–178, 2008.

GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, España, v. 96, n. 1, p. 1–24, 2005.

GEBRE-HIWOT, A. et al. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 51, n. 3-4, p. 237–245, 1992.

GEMAQUE, K. et al. Prevalence of oral lesions in hospitalized patients with infectious diseases in northern Brazil. **The Scientific World Journal**, United States of America, v. 2014, p. 586075, 2014.

GERIS, R.; SIMPSON, T. J. Meroterpenoids produced by fungi. **Natural Product Reports**, United Kingdom, v. 26, n. 8, p. 1063–1094, 2009.

GHAFFARPASAND, F.; SERAJ, S. R.; HEIRAN, H. R. Intralesional artemisinin for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Medical Hypotheses**, Iran, v. 72, n. 2, p. 233–234, 2009.

GHERBAWY, Y.; VOIGT, K. **Molecular identification of fungi**. Berlin, Germany: Springer, 2010.

GIAROLLA, J.; FERREIRA, E. I. Drug design for neglected disease in Brazil. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 15, n. 3, p. 220–242, 2015.

GIL, E. S. et al. Natural products with leishmanicide potential. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, Brasil: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista v. 29, n. 3, p. 223–230, 2008.

GILEAD SCIENCES. Visceral leishmaniasis in the developing world - May 2013. Disponível em: <www.gilead.com/community>. Acesso em: 27/06/2014.

GLISH, G. L. Multiple stage mass spectrometry: the next generation tandem mass spectrometry experiment. **Analyst**, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, v. 119, n. 4, p. 533–537, 1994.

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 13, n. 4, p. 473–479, 2010.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 101, p. 24–33, 2015.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, United Kingdom, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 35, n. 11-12, p. 1169–1180, 2005.

GRANT, D. M.; HARRIS, R. K. **Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance**. Chichester, England: John Wiley, 1996.

GRAY, A.; IGOLI, J.; EDRADA-EBEL, R. Natural Products isolation in modern drug discovery programs. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (ORGS.); **Natural Products Isolation - SE 20**, Methods in Molecular Biology, Totowa, New Jersey, United States of America: Humana Press. 2nd ed, v. 864, 2012. p.515–534.

GRECH, V. et al. Visceral leishmaniasis in Malta--an 18 year paediatric, population based study. **Archives of disease in childhood**, v. 82, n. 5, p. 381–385, 2000.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, United Kingdom, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry : a textbook**. Berlin, Germany: Springer, 2004.

GÜNTHER, H. **NMR spectroscopy : basic principles, concepts, and**

applications in chemistry. New York, NY, United States of America: Wiley, 1995.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, England, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 2015.

GUTZEIT, H. O. **Plant natural products : synthesis, biological functions and practical applications.** ePub Online: Wiley, 2014. Disponível em: <<http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1680610>>. Acesso em: 19/08/2015.

HABIF, T. P. **Clinical Dermatology: A Color Guide to Diagnosis and Therapy.** United States of America: Mosby, 2012.

HADRI, A. EL. et al. Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, España, v. 76, n. 3, p. 343–356, 2010.

HALDAR, A. K. et al. Sub-optimal dose of Sodium Antimony Gluconate (SAG)-diperoxovanadate combination clears organ parasites from BALB/c mice infected with antimony resistant *Leishmania donovani* by expanding antileishmanial T-cell repertoire and increasing IFN- γ to IL-10 ratio. **Experimental Parasitology**, United States of America, v. 122, n. 2, p. 145–154, 2009.

HALPERN, G.; MILLER, A. **Medicinal Mushrooms: Ancient Remedies for Modern Ailments.** New York: M. Evans and Co, 2002.

HANN, I. M.; PRENTICE, H. G. Lipid-based Amphotericin B: a review of the last 10 years of use. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 17, n. 3, p. 161–169, 2001.

HANSON, J. R. **Natural Products: The Secondary Metabolites.** Tutorial C, Online, United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2003. Disponível em: <[doi:10.1039/9781847551535](https://doi.org/10.1039/9781847551535)>. Acesso em: 26/01/2014.

HANSON, J. R. **The chemistry of fungi.** Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2008.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, England, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.

HARRIS, G. H. et al. Isolation and structure determination of pycnidione, a novel bistropolone stromelysin inhibitor from a *Phoma* sp. **Tetrahedron**, United Kingdom, v. 49, n. 11, p. 2139–2144, 1993.

HARTLEY, M. A. et al. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, United Kingdom: Elsevier Ltd, v. 30, n. 8, p. 412–422, 2014.

HAWKINS, A. R. et al. The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects. **Journal of General Microbiology**, England, v. 139, n. 12, p. 2891–2899, 1993.

HE, Z. Chorismate Metabolism. Disponível em: <<http://chemgroups.ucdavis.edu/~toney/Chorismate.html>>. Acesso em: 19/8/2015.

HENDRICKX, S. et al. Experimental induction of Paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: Outcome dependent on *in vitro* selection protocol. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America: Public Library of Science, v. 6, n. 5, p. e1664, 2012.

HENDRICKX, S. et al. *In vivo* selection of Paromomycin and Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* and *L. infantum* in a Syrian Hamster model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 59, n. 8, p. 4714–4718, 2015.

HERBERT, C. G.; JOHNSTONE, R. A. W. **Mass spectrometry basics**. Boca Raton, FL, United States of America: CRC Press, 2003.

HERNANDEZ, T. et al. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 96, n. 3, p. 551–554, 2005.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, England, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HILL, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **Journal of Physiology**, London, England, v. 40, p. 4–7, 1910.

HIRAOKA, K. **Fundamentals of Mass Spectrometry**. New York, NY, United States of America: Springer, 2013.

HODGKINSON, V. H. et al. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. **Experimental parasitology**, United States of America, v. 83, n. 1, p. 94–105, 1996.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports**, England, v. 24, n. 2, p. 393–416, 2007.

HORNAK, J. P. The basics of NMR - Chapter-7 - NMR hardware. Disponível em: <<https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/chap-7/chap-7.htm>>. Acesso em: 14/8/2015.

HOTEZ, P. J. et al. The global burden of disease study 2010: Interpretation and implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America, v. 8, n. 7, 2014.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; STRYCH, U. New vaccines for the World's poorest people. **Annual Review of Medicine**, Review in Advance Online, United States of America, 2015. Disponível em: <[doi:10.1146/annurev-med-051214-024241](https://doi.org/10.1146/annurev-med-051214-024241)>. Acesso em: 30/09/2015.

HSIAO, C.J. et al. Pycnidione, a fungus-derived agent, induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, Ireland: Elsevier Ireland Ltd, v. 197, n. 1, p. 23–30, 2012.

HU, L. et al. Azaterphenyl diamidines as antileishmanial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, United Kingdom, v. 18, n. 1, p. 247–251, 2008.

HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**, United States of America: Elsevier, v. 14, n. 1, p. 18–25, 1992.

IBRAHIM, H. M. S. et al. Symmetrical choline-derived dications display strong anti-kinetoplastid activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v. 66, n. 1, p. 111–125, 2011.

IKAN, R. **Selected topics in the chemistry of natural products**. Singapore: World Scientific, 2008.

IRANSHAHI, M. et al. Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and *in vitro* antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 68, n. 4, p. 554–561, 2007.

ISHIKAWA, E. A. Y. et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Netherlands, v. 96, n. Supplement 1, p. S111–S121, 2002.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, United States of America: American Association for the Advancement of Science, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

IWASA, Y. **Case studies in superconducting magnets design and operational issues**, New York, NY, United States of America: Kluwer Academic, 2002.

IZUMI, E. et al. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**, United States of America, v. 118, n. 3, p. 324–330, 2008.

JACOBSEN, N. E. **NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology**. Hoboken, New Jersey, United States: Wiley-Interscience, 2007.

JADHAV, K. G.; GOWEKAR, N. M.; GOWEKAR, S. N. A Validated RP-HPLC method for the determination of celecoxib in bulk and pharmaceutical dosage form. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, [India], v. 3, n. 3, p. 1312–1316, 2012.

JANSSEN, D. B. et al. Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases. **Biochemical Society Transactions**, England, v. 34, n. Pt 2, p. 291–295, 2006.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA**, England, v. 27, n. 6, p. 1896–1904, 2013.

JENWITHEESUK, E. et al. Novel paradigms for drug discovery: computational multitarget screening. **Trends in Pharmacological Sciences**, United Kingdom, v. 29, n. 2, p. 62–71, 2008.

JERMAIN, J. D.; EVANS, H. K. Analyzing *Salvia divinorum* and its active ingredient Salvinorin a utilizing thin layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, United Kingdom, v. 54, n. 3, p. 612–616, 2009.

JHA, T. K. Drug unresponsiveness & combination therapy for Kala-Azar. **Indian Journal of Medical Research**, [India], v. 123, n. 3, p. 389–398, 2006.

JHINGRAN, A. et al. Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 164, n. 2, p. 111–117, 2009.

JIMENEZ-LOPEZ, J. M. et al. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. **Lipids in Health and Disease**, England, v. 9, p. 33, 2010.

JORK, H. **Thin-layer chromatography : reagents and detection methods**. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH, 1990.

KALANTARI, H. et al. Effect of topical nanoliposomes of Paromomycin on rats liver and kidney. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, Iran, v. 9, n. 4, p. e17565, 2014.

KAMM, O. **Qualitative organic analysis**. United States: J. Wiley & Sons Inc., 1932.

KANEKO, M. et al. Potentiation of Bleomycin in Jurkat Cells by fungal Pycnidione. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japan, v. 35, n. 1, p. 18–28, 2012.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M. et al. Acid heteropolysaccharides with potent antileishmanial effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, Netherlands: Elsevier B.V., v. 81, p. 165–170, 2015.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine resistance in *Leishmania*. **Journal of Parasitology Research**, United States of America, v. 2014, p. 726328, 2014.

KAUR, S. et al. Antileishmanial effect of cisplatin against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, Ireland, v. 59, n. 1, p. 62–69, 2010.

KAVANAGH, K. **Fungi Biology and Applications**. 2^a ed. New Delhi, India: Wiley-Blackwell, 2011.

KEGG. REACTION: R09934 alpha-humulene, NADPH:oxygen 10-oxidoreductase. Disponível em: <http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?reaction+R09934>. Acesso em: 21/8/2015.

KELLER, N. P.; HOHN, T. M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, United States of America, v. 21, n. 1, p. 17–29, 1997.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, United Kingdom, v. 3, n. 12, p. 937–947, 2005.

KELLINA, O. I. [A study of experimental cutaneous leishmaniasis in white mice]. **Meditsinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni**, Russia (Federation): Moskva, v. 30, p. 684–691, 1961.

KEURULAINEN, L. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis and biological evaluation of 2-arylbenzimidazoles targeting *Leishmania donovani*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, United Kingdom: Elsevier Ltd, v. 25, n. 9, p. 1933–1937, 2015.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* infections. **Dermatologic Clinics**, United Kingdom, Elsevier Inc, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KHALAFI-NEZHAD, A.; SOLTANI RAD, M. N.; KHOSHNOOD, A. An efficient method for the chemoselective preparation of benzoylated 1, 2-diols from epoxides. **Synthesis**, Germany: Thieme, n. 16, p. 2552–2558, 2003.

KHALIQ, T. et al. Peganine hydrochloride dihydrate an orally active antileishmanial agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, England, v. 19, n. 9, p. 2585–2586, 2009.

KHAN, N.; RAWLINGS, B.; CAFFREY, P. A labile point in mutant Amphotericin polyketide synthases. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 33, n. 6, p. 1121–1126, 2011.

KHAVRUTSKII, I. V.; MUSAEV, D. G.; MOROKUMA, K. Epoxidation of unfunctionalized olefins by Mn (salen) catalyst using organic peracids as oxygen source: A theoretical study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [United States of America]: National Acad Sciences, v. 101, n. 16, p. 5743–5748, 2004.

KIDERLEN, A. F.; KAYE, P. M. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 127, n. 1, p. 11–18, 1990.

KIEFFER, C. et al. Antileishmanial pharmacomodulation in 8-nitroquinolin-2(1H)-one series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, England, v. 23, n. 10, p. 2377–2386, 2015.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, France: Masson, v. 65 Suppl 1, p. 37–42, 1990.

KIMA, P. Update on *Leishmania* mediators that promote immune evasion. In: SATOSKAR, A.; DURVASULA, R. (ORGS.); **Pathogenesis of Leishmaniasis SE - 2**, New York, NY, United States of America: Springer, 2014. p.15–24.

KIP, A. E. et al. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 59, n. 1, p. 1–14, 2015.

KIP, A. E. et al. Quantification of Miltefosine in peripheral blood mononuclear cells by High-Performance Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Netherlands, v. 998-999, p. 57–62, 2015.

KLINKERT, M.-Q.; HEUSSLER, V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 6, n. 2, p. 131–143, 2006.

KOCYIGIT, A. et al. Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, United States of America, v. 70, n. 12, p. 6589–6591, 2002.

KOLODZIEJ, H.; RADTKE, O. A.; KIDERLEN, A. F. Stimulus (polyphenol, IFN- γ , LPS)-dependent nitric oxide production and antileishmanial effects in RAW 264.7 macrophages. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 69, n. 18, p. 3103–3110, 2008.

KOOY, F. VAN DER; SULLIVAN, S. E. The complexity of medicinal plants: the traditional *Artemisia annua* formulation, current status and future perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 150, n. 1, p. 1–13, 2013.

KUMAR, A. **Leishmania and Leishmaniasis**. 2013.

KUMAR, V. et al. *Leishmania donovani*: Dynamics of *L. donovani* evasion of innate immune cell attack due to malnutrition in visceral leishmaniasis. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, [United States of America]: Elsevier Inc., v. 30, n. 4, p. 449–458, 2014.

KVIST, L. P. et al. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 106, n. 3, p. 390–402, 2006.

LAI A FAT, E. J. S. K. et al. Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Surinam. **International Journal of Dermatology**, United States of America, v. 41, n. 11, p. 796–800, 2002.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua-PA, Brasil, jun. 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (ORGS.); **The Leishmaniases in Biology and Medicine v.1**, London, England: Academic Press, 1987. p.1–120.

LAKSHMI, B. S.; WANG, R.; MADHUBALA, R. *Leishmania* genome analysis and High-Throughput immunological screening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, Netherlands: Elsevier Ltd, v. 32, n. 30, p. 3816–3822, 2014.

LANGEN, P. et al. Cytostatic effects of various alkyl phospholipid analogues on different cells *in vitro*. **Anticancer Research**, Greece, v. 12, n. 6B, p. 2109–2112, 1992.

LEIFA, F. **Production of extra-cellular polyssaccharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state culture and its antitumor effect**. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba – PR, Brasil, 2003.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively

expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 152, n. 1, p. 35–46, 2007.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Germany, v. 68, n. 2, p. 151–162, 2005.

LEWIS, D. J.; WARD, R. D. Transmission and vectors. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (ORGS.); **The Leishmaniases in Biology and Medicine v.2**, London, England: Academic Press, 1987. p.235–262.

LEZAUN, J.; MONTGOMERY, C. M. The pharmaceutical commons: sharing and exclusion in global health drug development. **Science, Technology & Human Values**, Online, v. 40, n. 1, p. 3–29, 2014. Disponível em: <<http://intl-sth.sagepub.com>>. Acesso em: 14/07/2015.

LI, A. Y. et al. Baseline Susceptibility to Pyrethroid and organophosphate insecticides in two old world sand fly species (Diptera: Psychodidae). **U.S. Army Medical Department Journal**, United States of America, p. 3–9, 2015.

LIANG, X.; FANG, W.-S. **Medicinal chemistry of bioactive natural products**. Hoboken, New Jersey, United States of America: Wiley-Interscience/John Wiley, 2006.

LIMA, E. B. de; et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro – RJ, Brasil: Sociedade Brasileira de Dermatologia, v. 82, n. 2, p. 111–124, 2007.

LIMA, M. A. de.; **Potencial biotecnológico de basiodimicetos isolados no estado do Paraná**. Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba – PR, Brasil, 2009.

LIMA, P. C. et al. Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do cerrado. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia – GO, Brasil: Universidade Federal de Goiás Instituto de Patologia Tropical v. 44, n. 1, p. 45–55, 2015.

LIN, H.; JI-KAI, L. The first humulene type sesquiterpene from *Lactarius hirtipes*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, Germany, v. 57, n. 7-8, p. 571–574, 2002.

LINKE, H. A.; MECHLINSKI, W.; SCHAFFNER, C. P. Production of Amphotericin B-14C by *Streptomyces nodosus* fermentation, and preparation of the Amphotericin B-14C-methyl-ester. **The Journal of Antibiotics**, Japan, v. 27, n. 3, p. 155–160, 1974.

LIU, Y. T. Biosynthetic studies of Amphotericins, Candicidin and Nystatin by means of mutation. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences**, Taiwan, v. 8, n. 2, p. 182–186, 1984.

LUCKNER, M. **Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals**. Berlin; Heidelberg: Springer, 1984.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,

United States of America, v. 48, n. 5, p. 1534–40, 2004.

MAAROUF, M. et al. *In vivo* interference of Paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. **Experimental Cell Research**, United States of America, v. 232, n. 2, p. 339–348, 1997.

MACHADO, P. de A. et al. High selective antileishmanial activity of vanadium complex with stilbene derivative. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 148, p. 120–7, 2015.

MACHADO-SILVA, A. et al. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, England, v. 25, n. 3, p. 247–260, 2015.

MACOMBER, R. S. Proton-carbon chemical shift correlations. **Journal of Chemical Education**, Easton, PA, United States of America: Division of Chemical Education, American Chemical Society v. 68, n. 4, p. 284, 1991.

MADEIRA DA SILVA, L. et al. Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [United States of America], v. 106, n. 18, p. 7583–7588, 2009.

MAES, L. et al. *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 48, n. 1, p. 130–136, 2004.

MAHROUS, E. A.; FARAG, M. A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. **Journal of Advanced Research**, Cairo, Egypt: Cairo University Press, v. 6, n. 1, p. 3–15, 2015.

MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. **Analytical Chemistry**, United States of America: American Chemical Society, v. 72, n. 6, p. 1156–1162, 2000.

MALLA, N. Control of leishmaniasis - Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, [India], v. 136, n. 3, p. 504–506, 2012.

MANZANO, J. I. et al. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 55, n. 3, p. 1045–1052, 2011.

MAREGESI, S. M. et al. Phytochemical and biological investigations of *Elaeodendron schlechteranum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 129, n. 3, p. 319–326, 2010.

MARINHO, D. S. et al. Health economic evaluations of visceral leishmaniasis treatments: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America, v. 10, n. 2, p. e0003527, 2015.

MARRS, P. Stereochemistry and NMR - University of Victoria Chemistry © 363 Nmr Notes, September. Disponível em: <http://web.uvic.ca/~pmarrs/chem363/nmr_files/363_nmr_stereochemistry.pdf>.

MARTINEZ-ROJANO, H. et al. Activity of hydroxyurea against *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v.

52, n. 10, p. 3642–3647, 2008.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, São Paulo-SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Química, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013.

MASMOUDI, A. et al. Glucantime® par voie parentérale: bénéfique versus toxicité. **Médecine et Maladies Infectieuses**, France: Elsevier B.V., v. 35, n. 1, p. 42–45, 2005.

MASMOUDI, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: Diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, Online: v. 7, n. 2, p. 31–41, 2013. Disponível em: <<http://www.jdcr.eu/index.php?journal=jdcr&page=index>>. Acesso em: 18/10/2015.

MATTA, C. B. B. da; et al. Novel dialkylphosphorylhydrazones: synthesis, leishmanicidal evaluation and theoretical investigation of the proposed mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 101, p. 1–12, 2015.

MAURER-CECCHINI, A. et al. Immunological determinants of clinical outcome in peruvian patients with tegumentary leishmaniasis treated with Pentavalent Antimonials. **Infection and Immunity**, United States of America, v.77, n. 5, p. 2022–2029, 2009.

MAYERL, F. et al. Eupenifeldin, a novel cytotoxic bistropolone from *Eupenicillium brefeldianum*. **The Journal of Antibiotics**, Japan, v. 46, n. 7, p. 1082–1088, 1993.

MAZIERO, N. et al. Rural-urban focus of canine visceral leishmaniosis in the far western region of Santa Catarina State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 205, n. 1-2, p. 92–95, 2014.

MECHLENSKI, W. et al. Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic Amphotericin B. **Tetrahedron Letters**, United Kingdom: Pergamon, v. 11, n. 46, p. 3962, 1970.

MECHLINSKI, W.; SCHAFFNER, C. P. Separation of polyene antifungal antibiotics by high-speed liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Netherlands, v. 99, p. 619–633, 1974.

MEDEIROS, M. DAS G. F. DE et al. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, Ireland, v. 60, n. 3, p. 237–241, 2011.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, England, v. 151, n. 5, p. 618–627, 2007.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: Complex II inhibition results in increased Pentamidine cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, United States of America, v. 279, n. 12, p. 11798–11813, 2004.

MELO PEREIRA, J. C. et al. Antileishmanial activity of ruthenium (II) tetraammine nitrosyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Italy,

v. 45, n. 9, p. 4180–4187, 2010.

MENDEZ, S. et al. The antituberculosis drug pyrazinamide affects the course of cutaneous leishmaniasis *in vivo* and increases activation of macrophages and dendritic cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 53, n. 12, p. 5114–5121, 2009.

MENEZES, J. A. et al. An integrated approach using spatial analysis to study the risk factors for leishmaniasis in area of recent transmission. **BioMed Research International**, United States of America, v. 2015, p. 621854, 2015.

MENEZES, J. P. B. de; et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, United States of America, v. 2015, p. 815023, 2015.

MERCK. **Handbook - Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography**. 1ª ed. Darmstadt, Germany: E. Merck, 1980.

METZGER, J. W. et al. Electrospray Mass Spectrometry. In: KELLNER, R.; LOTSPEICH, F.; MEYER, H. E. (ORGS.); **Microcharacterization of Proteins**, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. 2ª ed, 2007. p.213–234.

MIKUS, J.; STEVERDING, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®. **Parasitology International**, Ireland, v. 48, n. 3, p. 265–269, 2000.

MIMORI, T. et al. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. **Gene**, Netherlands, v. 210, n. 2, p. 179–186, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS**. Brasília, DF, Brasil: Editora do Ministério da Saúde, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília, DF, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Editora do Ministério da Saúde, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnósticos Clínico e Diferencial - Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, DF, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª ed. Brasília, DF, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora do Ministério da Saúde, 2006b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria interministerial**. Brasília-DF, Brasil, Nº 1.426, de 11 de Julho de 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª ed. Brasília-DF, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde. Editora do Ministério da Saúde, 2010a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de**

bolso, 8^a Ed. Brasília-DF, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde SUS - Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>>. Acesso em: 21/8/2015.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, Amsterdam : Elsevier Science, v. 5, n. 3, p. 150–158, 2007.

MISHRA, B. B. et al. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, Netherlands, v. 80, n. 2, p. 81–90, 2009.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 14, n. 10, p. 1153–1169, 2007.

MOLINA, I. et al. Efficacy of liposomal Amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v. 60, n. 4, p. 837–842, 2007.

MOORE, A. L.; SIEDOW, J. N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v. 1059, n. 2, p. 121–140, 1991.

MORAIS-TEIXEIRA, E. DE et al. Combined suboptimal schedules of topical Paromomycin, Meglumine Antimoniate and Miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v.70, n.12, p.3283-3290, 2015.

MORRIS, P. J. et al. Fungal nomenclature 4. Letter of concern regarding Props.(117–119) to amend the ICBN to require pre-publication deposit of nomenclatural information. **Mycotaxon**, United States of America, v. 116, n. 1, p. 513–517, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MUKHERJEE, A. et al. Roles for mitochondria in Pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 145, n. 1, p. 1–10, 2006.

MURRAY, C. J. L. et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, United Kingdom: Elsevier, v. 380, n. 9859, p. 2197–2223, 2012.

MYLER, P. J. Searching the Tritryp genomes for drug targets. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, United States of America, v. 625, p. 133–140, 2008.

NAKAO, Y. et al. Identification of Renieramycin A as an antileishmanial substance in a marine sponge *Neopetrosia sp.* **Marine Drugs**, Switzerland, v. 2, n. 2,

p. 55–62, 2004.

NARAYAN, S. et al. *Leishmania donovani* vs immunity: T-cells sensitized from *Leishmania* of one donor may modulate their cytokines pattern on re-stimulation with *Leishmania* from different donor in visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology CN - 019**, United States of America, v. 121, n. 1, p. 69–75, 2009.

NASCIMENTO, B. W. L. et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in the central-western state of Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 125, n. 3, p. 262–268, 2013.

NATARAJAN, G. et al. Mechanisms of Immunopathology of Leishmaniasis. In: SATOSKAR, A.; DURVASULA, R. (ORGS.); **Pathogenesis of Leishmaniasis SE - 1**, New York, NY, United States of America: Springer, p.1–13, 2014.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, Netherlands, v. 1754, n. 1-2, p. 151–159, 2005.

NAVARRO, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, Netherlands, v. 253, n. 11-12, p. 1619–1626, 2009.

NAZARIAN, Z. et al. Novel antileishmanial chalconoids: synthesis and biological activity of 1- or 3-(6-chloro-2H-chromen-3-yl)propen-1-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Italy: Elsevier Masson SAS, v. 45, n. 4, p. 1424–1429, 2010.

NDJONKA, D. et al. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 14, n. 2, p. 3395–3439, 2013.

NEJAD-MOGHADDAM, A.; ABOLHASSANI, M. Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing a common 57-kDa antigen of *Leishmania* species. **Iranian Biomedical Journal**, Iran, v. 13, n. 4, p. 245–251, 2009.

NEUENSCHWANDER, U.; CZARNIECKI, B.; HERMANS, I. Origin of regioselectivity in alpha-humulene functionalization. **The Journal of Organic Chemistry**, United States of America, v. 77, n. 6, p. 2865–2869, 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo – SP, Brasil: Editora Atheneu, 1991.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 Years. **Journal of Natural Products**, United States of America, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NOLETO, G. R. et al. Effects of a lichen galactomannan and its Vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Netherlands, v. 233, n. 1-2, p. 73–83, 2002.

NOZOE, T. **Seventy Years in Organic Chemistry**. Washington, DC, United States of America: American Chemical Society, 1991.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, United Kingdom, v. 5, n. 11, p. 941–

955, 2006.

OLIVEIRA GUERRA, J. A. de; et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America, v. 5, n. 3, p. 1–5, 2011.

OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, United Kingdom: Elsevier Masson SAS, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.

OLLIARO, P. et al. Methodology of clinical trials aimed at assessing interventions for cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America, v. 7, n. 3, p. e2130, 2013.

OPAS. Tratamiento de las enfermedades parasitarias. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (ORG.); **Guía para el Tratamiento de las enfermedades infecciosas**, Washington, DC, United States of America: OPAS, 2013. p.212–213.

OTADUY, M. G.; LEITE, C. DA C. **Princípios físicos da Ressonância Magnética (RM)**. São Paulo – SP, Brasil: Instituto do Coração - HCFMUSP, 2007.

OUGHLISSI-DEHAK, K. et al. Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensis*. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 69, n. 9, p. 1933–1938, 2008.

OVERY, D. P. et al. Sea foam as a source of fungal inoculum for the isolation of biologically active natural products. **Mycology**, United Kingdom: Taylor & Francis, v. 5, n. 3, p. 130–144, 2014.

PAIVA, B. R. et al. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [São Paulo - SP, Brasil], v. 46, n. 6, p. 335–338, 2004.

PAL, D. S.; MONDAL, D. K.; DATTA, R. Identification of metal dithiocarbamates as a novel class of antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 59, n. 4, p. 2144–2152, 2015.

PALACIOS, R. et al. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States of America, v. 64, n. 3-4, p. 187–193, 2001.

PALADIN THERAPEUTICS Inc. **Product Information. Impavido (Miltefosine)**. Wilmington, DE, United States of America, 2015.

PALIT, P.; ALI, N. Oral therapy with Amlodipine and Lacidipine, 1,4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 52, n. 1, p. 374–377, 2008a.

PALIT, P.; ALI, N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v. 61, n. 5, p. 1120–1124, 2008b.

PALUMBO, E. Oral Miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases : an Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, Salvador, Bahia, Brazil: Contexto, v. 12, n. 1, p. 2–4, 2008.

PANDA, P. et al. Review on Marine organisms with antileishmanial activity. **Journal of Pharmacy Research**, India, v. 3, n. 4, 2010.

PANDEY, A. K. et al. Synthesis of Perspicamide A and related diverse analogues: Their bioevaluation as potent antileishmanial Agents. **Journal of Organic Chemistry**, United States of America, v. 78, n. 4, p. 1534–1546, 2013.

PANDEY, K.; PANDEY, B.; PUN, S. Relapse of Kala-Azar after use of multiple drugs: A case report and brief review of literature. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [India], v. 30, n. 2, p. 227, 2012.

PARANAÍBA, L. et al. *Leishmania enriettii*: biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. **Parasites & Vectors**, United Kingdom, v. 8, n. 1, p. 31, 2015.

PASSOS-SILVA, D. G. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**, England, v. 2010, p. 840768, 2010.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. Chemistry. The renaissance of Natural Products as drug candidates. **Science (New York, N.Y.)**, United States of America, v. 310, n. 5747, p. 451–453, 2005.

PATO, C. et al. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. **Biochemical Pharmacology**, United States of America, v. 62, n. 5, p. 555–560, 2001.

PATZ, J. A. et al. Effects of environmental change on emerging parasitic

diseases. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 30, n. 12, p. 1395–1405, 2000.

PAVIA, D. L. . et al. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de Escala Pequena**. 2ª ed. Rio de Janeiro – RJ, Brasil: LTC, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy: a Guide for Students of Organic Chemistry**. Fort Worth, Texas, United States: Harcourt Brace, 2007.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, United Kingdom: Nature Publishing Group, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PENICHE, A. G. et al. Development of an *ex vivo* lymph node explant model for identification of novel molecules active against *Leishmania major*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 58, n. 1, p. 78–87, 2014.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 208, n. 1-2, p. 35–47, 2015.

PEREIRA, E. de F. A. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Parana state of southern Brazil. **Experimental Dermatology**, Denmark, v. 17, n. 12, p. 1024–1030, 2008.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro – RJ, Brasil: Editora Guanabara, 1988.

PETERS, W.; EVANS, D. A.; LANHAM, S. M. Importance of parasite identification in cases of leishmaniasis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, England, jul. 1983.

PIERSON, J.T. et al. Synthesis and antiprotozoal activity of 4-arylcoumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 45, n. 3, p. 864–869, 2010.

PINHEIRO, R. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismo imunológico, tratamento e profilaxia. **Pharmacia Brasileira**, Brasília, DF : Conselho Federal de Farmácia, v. 16 . n. 7, 77- 80, 2004.

PINK, R. et al. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, United Kingdom, v. 4, n. 9, p. 727–740, 2005.

PINO, O.; SÁNCHEZ, Y.; ROJAS, M. M. Plant secondary metabolites as an alternative in pest management. I : Background , research approaches and trends. **Revista de Protección Vegetal**, Cuba, v. 28, n. 2, p. 81–94, 2013.

POHLIT, A. M. et al. Amazonian plant natural products: Perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, United States of America, v. 18, n. 8, p. 9219–9240, 2013.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure determination of organic compounds tables of spectral data**. Heidelberg, Germany: Springer, 2009.

PUDDEPHAT, M. The principles of Magnetic Resonance Imaging. Disponível em: <<http://www.voxelcube.com/articles/1/the-principles-of-magnetic-resonance-imaging>>. Acesso em: 11/09/2015.

QUINTIN, J. et al. Synthesis and biological evaluation of a series of tangeretin-derived chalcones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, United Kingdom: Elsevier Ltd, v. 19, n. 1, p. 167–169, 2009.

RAGGATT, M. E. et al. Biosynthesis of Xenovulene A @: formation of a cyclopentenone via a unique ring expansion-ring contraction mechanism. **Chemical Communications**, United Kingdom, The Royal Society of Chemistry, n. 22, p. 2245–2247, 1997.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y.-P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, United Kingdom: Elsevier Ltd, v. 20, n. 8, p. 958–968, 2015.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 51, n. 4, p. 1425–1430, 2007.

RASMUSSEN, B.; DESCOTEAUX, A. Contribution of electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania*–Macrophage interactions. **Microscopy and Microanalysis**, United Kingdom, v. 10, n. 05, p. 656–661, 2004.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova**, São Paulo – SP, Brasil, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

RAUTER, A. P. et al. Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 56, n. 2, p. 167–171, 2001.

REES, O. J. **Fourier Transform infrared spectroscopy developments, techniques, and applications**. e-book ed. New York, NY, United States of America: Nova Science Publishers, 2010.

REICH, H. J. WinDNMR: Dynamic NMR Spectra for Windows. **Journal of Chemical Education**, United States of America: ACS Publications, v. 72, n. 12, p. 1086, 1995.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, United Kingdom, v.7, sept. 2007.

RENSLO, A. R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology**, United States of America, v. 2, n. 12, p. 701–710, 2006.

REZENDE, J.; Gaspar Vianna, mártir da ciência e benfeitor da humanidade. **À sombra do plátano: crônicas de história da medicina [online]**, São Paulo – SP, Brasil: Editora Unifesp, 2009. p.359–362. Disponível em: <books.scielo.org/id/8kf92/43>. Acesso em: 18/09/2013.

REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum : an International Quarterly Journal**, Urmia, Iran: Urmia University Press, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2015.

RICE, C. B. F. Thin-Layer Chromatography techniques of chemistry — Volume XIV. **Chromatographia**, Germany: Springer, v. 13, n. 1, p. 43, 1980.

RICHARD, J. V; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, United Kingdom, v. 14, n.

4, p. 447–455, 2010.

RIDLEY, D. S. Pathology. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (ORGS.); **The Leishmaniasis in Biology and Medicine v.2**, London, England: Academic Press, 1987. p.665–701.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 39, n. 6, p. 1234–1239, 1995.

ROBINSON, J. A. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, England, v. 332, n. 1263, p. 107–114, 1991.

ROBLEDO, S. M. et al. Antileishmanial Effect of 5,3'-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone of *Picramnia gracilis* Tul. (Picramniaceae) Fruit: *in vitro* and *in vivo* studies. **Advances in Pharmacological Sciences**, Online, United States of America: Hindawi Publishing Corporation, 8p., id978379, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/978379>>. Acesso em: 30/11/2014.

ROCH, P.; BESCHIN, A.; BERNARD, E. Antiprotozoan and antiviral activities of non-cytotoxic truncated and variant analogues of mussel defensin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine :eCAM**, United States of America, v. 1, n. 2, p. 167–174, 2004.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Stuttgart, Germany; New York : G. Fischer, v. 12, n. 6-7, p. 514–535, 2005.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, India, v. 4, n. 3, p. 161–165, 2012.

ROHOUSOVA, I. et al. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites & Vectors**, England, v. 8, n. 1, p. 360, 2015.

ROLDÁN, E. J. A. M. et al. First enantiospecific synthesis of antileishmanial 12-deoxyroyleanone from abietic acid. **Synlett**, Stuttgart, Germany : New York : Thieme Medical Publishers, Inc., Georg Thieme Verlag, v. 36, n. 15, p. 2701–2704, 2004.

ROLDOS, V. et al. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: *in silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 43, n. 9, p. 1797–1807, 2008.

ROONEY, W. D. et al. Magnetic field and tissue dependencies of human brain longitudinal $^1\text{H}_2\text{O}$ relaxation *in vivo*. **Magnetic Resonance in Medicine**, United States of America: Wiley Online Library, v. 57, n. 2, p. 308–318, 2007.

ROSA, L. H. et al. Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic rainforest in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 95, n. 3, p. 227–237, 2009.

ROSAL, T. del; et al. Successful treatment of childhood cutaneous leishmaniasis with liposomal Amphotericin B: Report of two cases. **Journal of Tropical Pediatrics**, United Kingdom, v. 56, n. 2, p. 122–124, 2010.

ROSS, R. Further Notes on Leishman's Bodies. **British Medical Journal**, [United Kingdom], v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

RUBIANO, L. C. et al. Noninferiority of Miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. **Journal of Infectious Diseases**, United Kingdom, v. 205, n. 4, p. 684–692, 2012.

SALAH, A. BEN; et al. Topical Paromomycin with or without Gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, United States of America, v. 368, n. 6, p. 524–532, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2^a ed. New York, NY, United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMPAIO, R. N. R. et al. Tratamento com Pentamidina de seis casos da forma mucosa de leishmaniose tegumentar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro – RJ, Brasil: Sociedade Brasileira de Dermatologia, v. 63, n. 6, p. 439–442, 1988.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C.; GAYTÁN-OYARZÚN, J. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 5, n. 20, p. 1864–1867, 2006.

SANGSHETTI, J. N. et al. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **RSC Advances**, United Kingdom, The Royal Society of Chemistry, v. 5, n. 41, p. 32376–32415, 2015.

SANTIAGO, M. E. B. et al. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 150, n. 4, p. 283–290, 2007.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008.

SANTOS, A. R. dos; et al. Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, England, v. 17, n. 2, p. 496–502, 2009.

SAVOIA, D. et al. Antimicrobial activity of Euplotin C, the sesquiterpene taxonomic marker from the marine ciliate *Euplotes crassus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 48, n. 10, p. 3828–3833, 2004.

SAVOIA, D. et al. Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. **Experimental Parasitology**, United States of America, v. 113, n. 3, p. 186–192, 2006.

SCHAFFNER, C. P.; KIENTZLER, D. J. **Process for the production of Amphotericin-B inhibiting production of Amphotericin-A** United States Patent US6132993 A, Oct, 17th, 2000.

SCHLECHT, H. P.; BRUNO, C. Aminoglycosides, The Merck Manual. Disponível em: <[http://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/aminoglycosides?qt=&sc=&alt=>](http://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/aminoglycosides?qt=&sc=&alt=). Acesso em: 22/2/2014.

SCHMITT, I.; LUMBSCH, H. T. Ancient horizontal gene transfer from bacteria enhances biosynthetic capabilities of fungi. **PLoS ONE**, United States of America, v. 4, n. February, p. 1–8, 2009.

SCHOCH, C. L. et al. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 64, p. 1–15, 2009.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **Open Medicinal Chemistry Journal**, Netherlands, v. 5, p. 31–39, 2011.

SEIFERT, K.; ESCOBAR, P.; CROFT, S. L. *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v. 65, n. 3, p. 508–511, 2010.

SENN, M. W. **Structures and evaluation of biologically active constituents of *Cussonia zimmermannii* harms**. Doktors der Philosophie, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, Switzerland, 2006.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 74, n. 1, p. 25–31, 2000.

SERRANO-MARTIN, X. et al. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 53, n. 4, p. 1403–1410, 2009.

SHALEV, M. et al. Structural basis for selective targeting of leishmanial ribosomes: aminoglycoside derivatives as promising therapeutics. **Nucleic Acids Research**, United Kingdom, v. 43, n. 17, p. 8601–8613, 2015.

SHAPIRA, M.; ZINOVIEV, A. *Leishmania* parasites act as a Trojan horse that paralyzes the translation system of host macrophages. **Cell Host and Microbe**, United States of America: Elsevier Inc., v. 9, n. 4, p. 257–259, 2011.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, United States of America, v. 49, p. 117–143, 1995.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, India, v. 45, n. 4, p. 255–272, 2008.

SHAW, J. J. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: FARRELL, J. P. (ORG.); **World Class Parasites vol. 4, Leishmania**, Boston, Dordrech, London: Kluwer Academic Publishers, 2002. p.193.

SHERMA, J.; FRIED, B. (ORGS.). **Handbook of Thin-Layer Chromatography**. 1ª ed. New York, NY, United States of America: Marcel Dekker, 1991.

SHRESTHA, T. Infrared Spectroscopy. Disponível em: <<http://upendrats.blogspot.com.br/2014/04/spectroscopy.html>>. Acesso em: 30/8/2015.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research**, Cambridge, England: Cambridge University Press for the British Mycological Society, v. 112, n. 2, p. 225–230, 2008.

SIFONTES-RODRIGUEZ, S. et al. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania in vitro* and *in vivo*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, v. 110, n. 2, p. 166–173, 2015.

SILVA, A. A S. et al. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum chagasi*. **Phytomedicine**, Germany: Elsevier GmbH., v. 21, n. 11, p. 1419–1423, 2014.

SILVA, D. Leishmaniose tegumentaria queloidiana com lesões ósseas. **Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia**, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, v. 33, p.3, 1958.

SILVA, D. A. da; et al. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Journal (London, England : 1997)**, London : Ballière Tindall, v. 195, n. 2, p. 252–253, 2013.

SILVA, M. S. da; et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. **PloS One**, United States of America, v. 8, n. 11, p. e81397, 2013.

SILVA, R. R. P. da; et al. *In vitro* biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, England, v. 15, n. 1, p. 249, 2015.

SILVA-LÓPEZ, R. E. da. Proteases de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, São Paulo – SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Química, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SILVEIRA, F. T. Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the Amazon region, Brazil: clinical and epidemiological aspects. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador – BA, Brasil: Bahia [Typographia de Tourinho, 1866-1976], v. 79, n. Supl.3, p. 25–29, 2009.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro – RJ, Brasil: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS; Editora da UFSC, 2002.

SIMPSON, L. Structure and function of kinetoplast DNA. **The Journal of Protozoology**, New York, NY, United States of America: Society of Protozoologists / Blackwell Publishing Ltd, v. 20, n. 1, p. 2–8, 1973.

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. **International Review of Cytology**, New York, NY, United States of America: Academic Press, v. 99, p. 119–179, 1986.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, United Kingdom, Elsevier Ltd, v. 22, n. 1, p. 18–45, 2014.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**, Japan, v. 10, n. 6, p. 307–315, 2004.

SLAYDEN, S. W. **General chemistry laboratory experiments**. Dubuque, IA, United States of America: Kendall Hunt Publishers, 1999.

SMIRLIS, D.; SOARES, M. P. B. Selection of Molecular Targets for Drug Development Against Trypanosomatids. In: SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; D'AVILA-LEVY, C. M.; KNEIPP, L. F.; SODRÉ, C. L. (ORGS.); **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma**, Dordrecht, Netherland: Springer, 2014. p.43–76.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, United Kingdom: BioMed Central Ltd, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Organic chemistry**. Singapore: Wiley, 2014.

SONBOLI, A.; BABAKHANI, B.; MEHRABIAN, A. R. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, Germany, v. 61, n. 3-4, p. 160–164, 2006.

SONG, A. A. L. et al. Functional expression of an orchid fragrance gene in *Lactococcus lactis*. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 13, n. 2, p. 1582–1597, 2012.

SOTO, J. et al. Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States of America, v. 71, n. 5, p. 577–581, 2004.

SOTO, J.; SOTO, P. Oral Miltefosine to treat leishmaniasis. **Biomedica : Revista del Instituto Nacional de Salud**, Colombia, v. 26, Suppl. 1, p. 207–217, 2006.

SOUZA, T. D. et al. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 200, n. 3-4, p. 233–241, 2014.

SOUZA-LEMONS, C. et al. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. **Journal of Pathology**, United Kingdom: Wiley Online Library, v. 216, n. 3, p. 375–386, 2008.

SPANGENBERG, B.; POOLE, C. F.; WEINS, C. **Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey**. 1^a ed. Dordrecht, London, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

SRINIVAS, N. et al. Aryloxy cyclohexyl imidazoles: A novel class of antileishmanial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, United Kingdom, v. 19, n. 2, p. 324–327, 2009.

STAHL, E. **Thin-layer chromatography A laboratory handbook**. Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1969.

STEINBECK, C.; KUHN, S. NMRShiftDB -- Compound identification and structure elucidation support through a free community-built web database. **Phytochemistry**, United States of America, v. 65, n. 19, p. 2711–2717, 2004.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, United Kingdom, v. 25, n. 3, p. 517–554, 2008.

STILLER, E. T.; VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J. L. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. **Antibiotics Annual**, United States of America, v. 3, p. 587, 1955.

STROHALM, M. et al. mMass data miner: An open source alternative for mass spectrometric data analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., v. 22, n. 6, p. 905–908, 2008.

STROHALM, M. et al. mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. **Analytical Chemistry**, United States of America: American Chemical Society, v. 82, n. 11, p. 4648–4651, 2010.

STROMME, E. M.; BAEROE, K.; NORHEIM, O. F. Disease control priorities for neglected tropical diseases: lessons from priority ranking based on the quality of evidence, cost effectiveness, severity of disease, catastrophic health expenditures, and loss of productivity. **Developing World Bioethics**, England, v. 14, n. 3, p. 132–141, 2014.

STUART, B. **Infrared spectroscopy fundamentals and applications**. 1^a ed. Chichester, England; Hoboken, New Jersey: J. Wiley, 2004.

SUGAWARA, K. et al. BMY-28438 (3,7-dihydroxytropolone), a new antitumor antibiotic active against B16 melanoma. I. Production, isolation, structure and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, Japan, v. 41, n. 7, p. 862–868, 1988.

SULEMAN, M. et al. Alkyl galactofuranosides strongly interact with *Leishmania donovani* membrane and provide antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 58, n. 4, p. 2156–2166, 2014.

SÜLSEN, V. P. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, United States of America, v. 77, n. 4, p. 654–659, 2007.

SUNDAR, S. et al. Injectable Paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, United States of America, v. 356, n. 25, p. 2571–2581, 2007.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy Informa UK Ltd.**, London, United Kingdom, v. 14, n. 1, p. 53–63, 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p. 43–59, 2015.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **The Indian Journal of Medical Research**, India, v. 123, n. 3, p. 345–352, 2006.

SUNDURU, N. et al. Synthesis and antileishmanial activity of novel 2,4,6-trisubstituted pyrimidines and 1,3,5-triazines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Italy, v. 44, n. 6, p. 2473–2481, 2009.

SURYAWANSHI, S. N. et al. Chemotherapy of leishmaniasis part-VIII: synthesis and bioevaluation of novel chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 43, n. 11, p. 2473–2478, 2008.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: the complete drug reference**. Chicago, United States of America: Pharmaceutical Press, v.2, 2009.

TALAPATRA, S. K.; TALAPATRA, B. **Chemistry of Plant Natural Products: stereochemistry, conformation, synthesis, biology, and medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015.

TASDEMIR, D. et al. Evaluation of antiprotozoal and antimycobacterial activities of the resin glycosides and the other metabolites of *Scrophularia cryptophila*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, New York United States of America: G. Fischerv. 15, n. 3, p. 209–215, 2008.

TAVARES, J. et al. Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 103, n. 2, p. 133–141, 2007.

TEMPONE, A. G. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, v. 103, n. 5, p. 443–449, 2008.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Enzymatic polymorphism and phylogenetic relationships in *Leishmania* Ross, 1903 (Sarcocystidophora: Kinetoplastida): a case study in Colombia. **Systematic Parasitology**, Netherlands, v. 46, n. 1, p. 59–68, 2000.

TIAINEN, M. **Quantitative Quantum Mechanical Analysis of ¹H NMR Spectra**. Kuopio, Finland: Publications of the University of Eastern Finland. Dissertations in Health Sciences, 2013.

TINCUSI, B. M. et al. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, Germany, v. 68, n. 9, p. 808–812, 2002.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, Netherlands, v. 15, n. 8, 2011.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, New York, United States of America: G. Fischer v. 11, n. 2-3, p. 114–120, 2004.

TRINCONI, C. T. et al. Combination therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 58, n. 5, p. 2608–2613, 2014.

TUON, F. F. et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**, United States of America, v. 47, n. 2, p. 109–124, 2008.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, United States of America, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

ULIANA, S. R. B. *Leishmania* e Leishmanioses. In: FERREIRA, M. U. (ORG.); **Parasitologia contemporânea**, Rio de Janeiro – RJ, Brasil: Grupo Gen - Guanabara Koogan. 1ªed, 2012. p.47–56.

VAKIL, N. H.; FUJINAMI, N.; SHAH, P. J. Pharmacotherapy for leishmaniasis in the United States: focus on Miltefosine. **Pharmacotherapy**, United States of America, v. 35, n. 5, p. 536–545, 2015.

VALADARES, D. G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, Ireland, v. 60, n. 4, p. 357–363, 2011.

VALADARES, D. G. et al. Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei* Murill is effective in treatment of murine visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, United States of America, v. 132, n. 2, p. 228–236, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: Invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, Netherlands: Bentham Science Publishers, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.

VÁSQUEZ, L. et al. Pharmacokinetics of experimental Pentavalent Antimony after intramuscular administration in adult volunteers. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, United States of America, v. 67, n. 3, p. 193–203, 2006.

VEEKEN, H.; PECOUL, B. [Drugs for “neglected diseases”: a bitter pill]. **Nederlands tijdschrift voor geneeskunde**, Netherlands, v. 144, n. 26, p. 1253–1256, 2000.

VEIGA, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 112, n. 2, p. 248–254, 2007.

VENDRAMETTO, M. C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of Eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitology International**, Ireland, v. 59, n. 2, p. 154–158, 2010.

VERGARA-SALINAS, J. R.; CUEVAS-VALENZUELA, J.; PÉREZ-CORREA, J. R. Pressurized hot water extraction of polyphenols from plant material. In: GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. (ORGS.); **Biotechnology of Bioactive Compounds**, Chichester, England; Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p.63–101.

VITOLA, F. M. D. **Antileishmanial biocompounds screening on submerged mycelial culture broths of twelve macromycete species** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Paraná - UFPR. Master BIODEV IRD. Université de Provence et de la Méditerranée. Curitiba – PR, Brasil, 2008.

VIVARINI, A. DE C. et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States of America, v. 25, n. 12, p. 4162–4173, 2011.

VOGEL, A. I. et al. **Vogel’s textbook of practical organic chemistry**. New York, United States of America: Longman, 1999.

VOGEL, A. I.; FURNISS, B. S. **Vogel’s textbook of practical organic chemistry**. New York, United States of America: Longman Scientific and Technical, 1989.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis : a Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin: Springer, 2001.

WANG, M. Z. et al. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States of America, v. 54, n. 6, p. 2507–2516, 2010.

WASAN, K. M. et al. Highly effective oral Amphotericin B formulation against murine visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, United States of America, v. 200, n. 3, p. 357–360, 2009.

WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Germany, v. 60, n. 3, p. 258–274, 2003.

WASSER, S. P.; RESHETNIKOV, S. V. **Process for producing, methods and compositions of cholesterol lowering agents from higher basidiomycetes mushrooms**: U.S. Patent 6,372,462, 2002.

WATERS TECHNOLOGIES CORP et al. **Triaxially compressed packed beds**: U.S. Patent 4,211,658A, July,8, 1980.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry**. 4^a ed. New York, United States of America: John Wiley, 2007.

WEISS, M. The Zeeman Effect - Spin Quantum Mechanism. Disponível em: <<http://math.ucr.edu/home/baez/spin/node8.html>>. Acesso em: 13/8/2013.

WEN, D. et al. A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States of America, v. 53, n. 17, p. 6624–6629, 2005.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 78, n. 2, p. 193–200, 2001.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**, San Diego, United States of America: Academic Press, v. 18, p. 315–322, 1990.

WHO. **Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneve, Switzerland: World Health Organization, Technical Report Series 949, 2010.

WHO. Accelerating work to overcome the global impact of Neglected Tropical Diseases: A roadmap for implementation. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf>. Acesso em: 12/7/2015.

WHO. Leishmaniasis Fact Sheet N°375 - World Health Organization, Updated: February, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 12/7/2015.

WILLARD, R. J. et al. Cutaneous leishmaniasis in soldiers from Fort Campbell, Kentucky returning from Operation Iraqi Freedom highlights diagnostic and therapeutic options. **Journal of the American Academy of Dermatology**, United States of America, v. 52, n. 6, p. 977–987, 2005.

WITHROW, J. **Infrared spectroscopy**. 1^aed. Delhi, India: Research World, 2012.

WRIGHT, A. D.; LANG-UNNASCH, N. Potential antimalarial lead structures from fungi of marine origin. **Planta Medica**, Germany, v. 71, n. 10, p. 964–966, 2005.

WRIGHT, M. M.; HOWE, A. G.; ZAREMBERG, V. Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. **Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire**, Canada, v. 82, n. 1, p. 18–26, 2004.

WYLLIE, S. et al. The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral Leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, United States of America, v. 4, n. 119, p. 119, 2012.

YANG, M. et al. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, United States of America, v. 18, n. 5, p. 927–939, 2007.

YANG, M. et al. Fluorinated rhodacyanine (SJL-01) possessing high efficacy for visceral leishmaniasis (VL). **Journal of Medicinal Chemistry**, United States of America, v. 53, n. 1, p. 368–373, 2010.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville, Florida, United States of America: Associated Publishers American Entomological Institute, 1994.

YU, J.H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, United States of America, v. 43, p. 437–458, 2005.

ZANDBERGEN, G. van; et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States of America, v. 103, n. 37, p. 13837–13842, 2006.

ZANGGER, H. et al. Detection of *Leishmania* RNA Virus in *Leishmania* Parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, United States of America, v. 7, n. 1, 2013.

ZHANG, Y. et al. Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 64, p. 85–102S5, 2009.

ZHANG, Y. et al. Pleosporales. **Fungal Diversity**, Netherlands: Springer Netherlands, v. 53, n. 1, p. 1–221, 2012.

ZHELJAZKOV, V. et al. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. **Planta Medica**, Germany: ACS Publications, v. 74, n. 03, p. 380–385, 2008.

ZIGON, N. et al. Where is the Oxygen? Structural analysis of α -humulene oxidation products by the crystalline sponge method. **Angewandte Chemie International Edition**, Germany: WILEY-VCH Verlag, v. 54, n. 31, p. 9033–9037, 2015.

ZSILA, F. Glycosaminoglycans are potential pharmacological targets for classic DNA minor groove binder drugs Berenil and Pentamidine. **Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP**, Cambridge [England]: Royal Society of Chemistry, v. 17, n. 38, p. 24560–24565, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1 – Perfil de solubilidade

RESULTADOS DO PERFIL DE SOLUBILIDADE

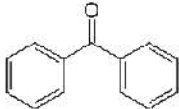
Solvente	Resultado
Diclorometano	Solúvel, mas diminui a solubilidade a frio ou para cristais já formados. Ótimo solvente para cristalização
Clorofórmio	Solúvel
Acetona	Solúvel quando junto ao extrato bruto
Acetato de Etila	Solúvel, exceto à baixa temperatura
Éter etílico	Insolúveis cristais, mas quando evapora tudo há o aparecimento de uma fração “cor branca” pelas paredes do tubo. (Possivelmente algum fragmento da molécula havia sido solubilizado)
Éter de Petróleo	Baixa solubilidade, melhorada em muito quando adicionado pouco de acetato de etila
Hexano	Muito baixa solubilidade
Ciclohexano	Muito baixa solubilidade
Acetonitrila (ACN)	Solúvel, mas demora (baixa solubilidade), somente overnight
Acetonitrila aquosa	Baixíssima solubilidade
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Solúvel, média solubilidade. Boa solubilidade quando sonicado
Dimetilformamida (DMF)	Solúvel
Terc-butil-metil-éter	Solúvel
Metanol	Baixa solubilidade. Boa se estiver previamente solubilizado em DCM
Etanol	Baixa solubilidade, mas ótima solubilidade em conjunto com acetato de etila
Benzeno	Média solubilidade
Tolueno	Solúvel
Água (pH neutro)	Insolúvel
NaOH (5%)	Solúvel
NaOH (0,5%)	Solúvel
NaHCO ₃ (5%)	Insolúvel
NaOH (5%) neutralizado por NaHCO ₃ (5%)	Insolúvel (Precipita)
HCl (5%)	Insolúvel
H ₂ SO ₄ (96%)	Solúvel
H ₃ PO ₄ (85%)	Solúvel, mas logo precipitou.

ANEXO 2 – Marcha Fitoquímica

REAÇÕES PARA PESQUISA DE GRUPOS QUÍMICOS E RESULTADOS

Pesquisa de... / teste indicativo de...	Reagente de detecção Referências)	Resultados
Compostos orgânicos	p-anisaldeído	Positivo inespecífico (cor cinza em fundo vermelho em UV365)
Compostos orgânicos	Ácido sulfúrico etanólico	Mancha escura visível após aquecimento (se diluído, laranja em UV365)
Grupos hidrofóbicos	Água	Positivo. Spot branco em sílica
Duplas ligações	Iodo e reflectância por UV 365 nm	Positivo. Spot laranja e, se amostra concentrada, marrom
Função álcool ou aldeído	Dicromato de potássio	Positivo – Spot verde (vis)
Aldeídos, Aldeídos aromáticos, insaturação alfa beta, grupos carbonil	Ácido tiobarbitúrico, HCl	Positivo. Spot cinza esverdeado.
Fenóis	Folin Ciocalteau	Positivo. Spot cinza azulado.
Aminas primárias, secundárias e terciárias	Cobalto : tiocianato	Negativo
Fenóis	FeCl ₃ , conforme apostila de farmacognosia	Positivo em clorofórmio para fenóis
Fenóis	Benzidina diazotizada	Positivo. Cor instantânea.
Terpene-aldeídos, flavonoides, carboidratos	Benzidina	Indefinido
Coumarinas	KOH, 5%	Positivo inespecífico. Apenas fluorescência azul em UV 365 nm
Flavonóides	<i>Ethanolamine diphenylborate</i> (reagente flavone acordo com NEU)	Negativo
Flavonóides	Cloreto de alumínio	Negativo
Coumarinas	UV 365 nm	Positivo (não específico). Spot azul em UV365
Alguns flavonoides	Ammonium iron(III) sulfato	Negativo
Esteróides	TFA 0,1% em clorofórmio	Positivo (não específico). Spot azul em UV365
Açúcares	Teste de Molisch	Negativo, mas com mudança de cor
Açúcares	DNS	Negativo
Açúcares	Fenol sulfúrico	Positivo inespecífico, impossível diferenciação por espectrofotômetro.
Açúcares	1-naphtol-ácido sulfúrico	Positivo inespecífico
Compostos insaturados e álcoois	Permanganato (KmnO ₄)	Positivo (manchas amarelas instantâneas)
Compostos redutores e ácidos aromáticos policarboxílicos.	Permanganato de potássio alcalino (com carbonato de cálcio) (no.249)	Positivo (manchas amarelas e laranjas, fundo rosa)
Ácidos carboxílicos	verde de bromocresol F. Bryant, B.T. Overell, Biochim. Et biophys. Acta 10, 471 (1953).	Positivo (spot amarelo em fundo azul claro)
Ácidos orgânicos	Verde de Bromocresol – azul de bromophenol – permanganato de potássio (no.43) J. Pásková, V.J. Munk, J. Chromatog. 4, 241 (1960)	Positivo. Spot azul em fundo azul claro.

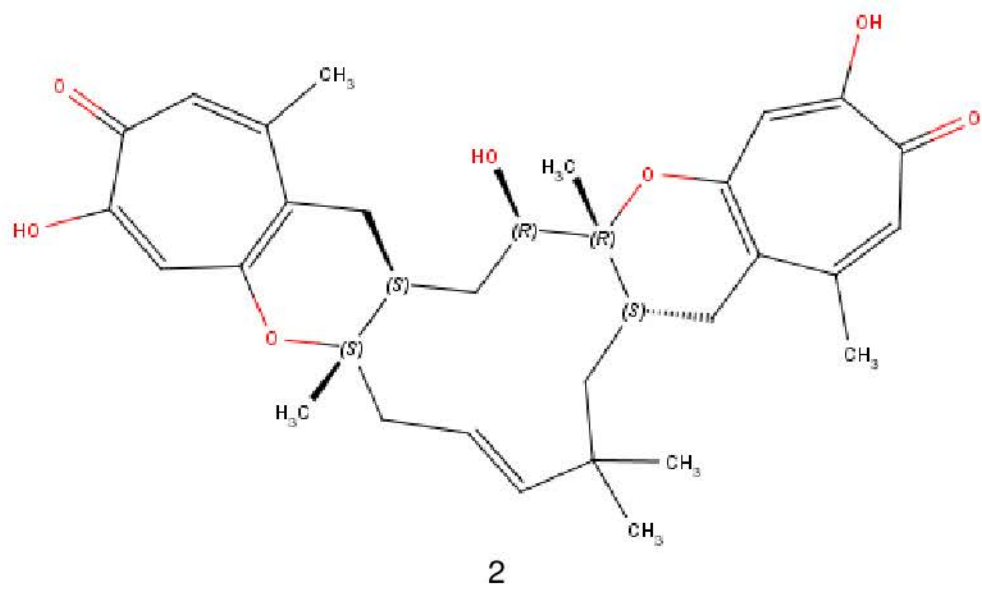
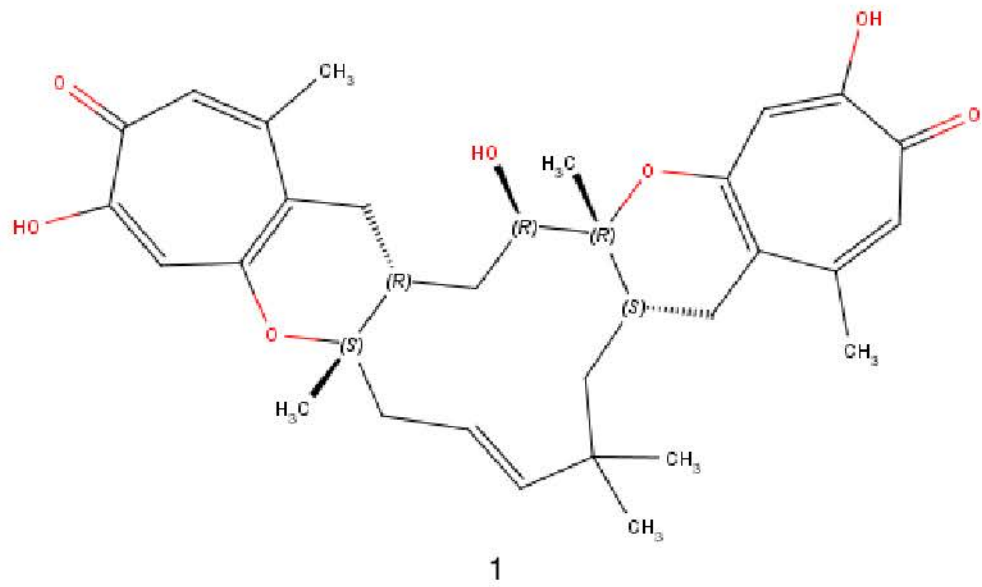
CONTINUAÇÃO

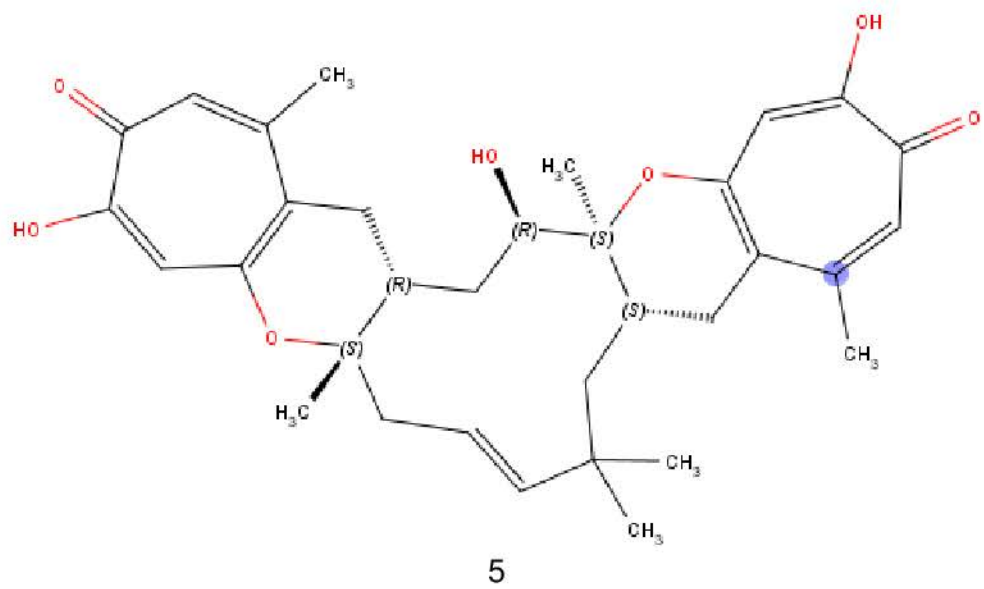
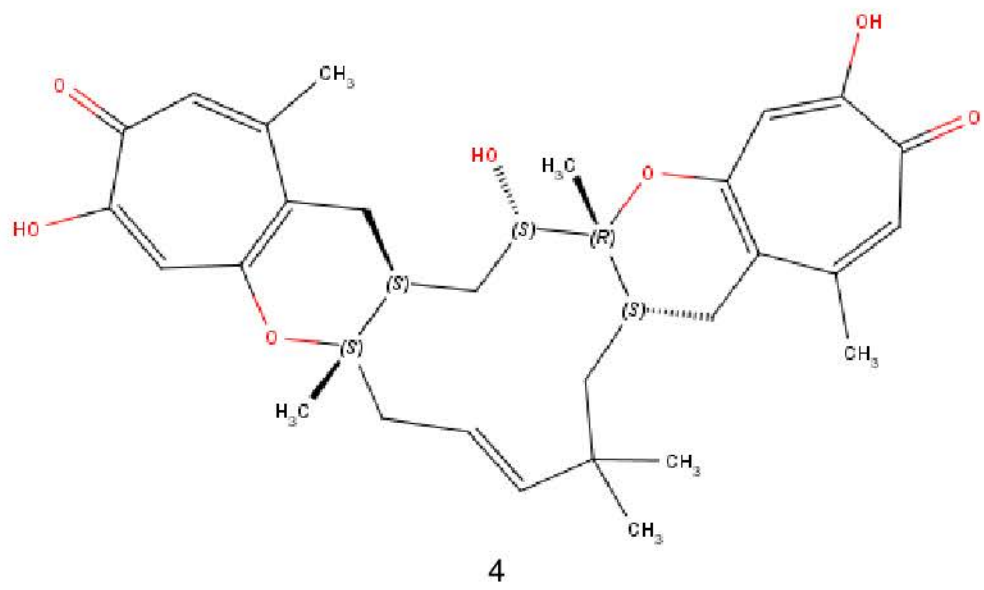
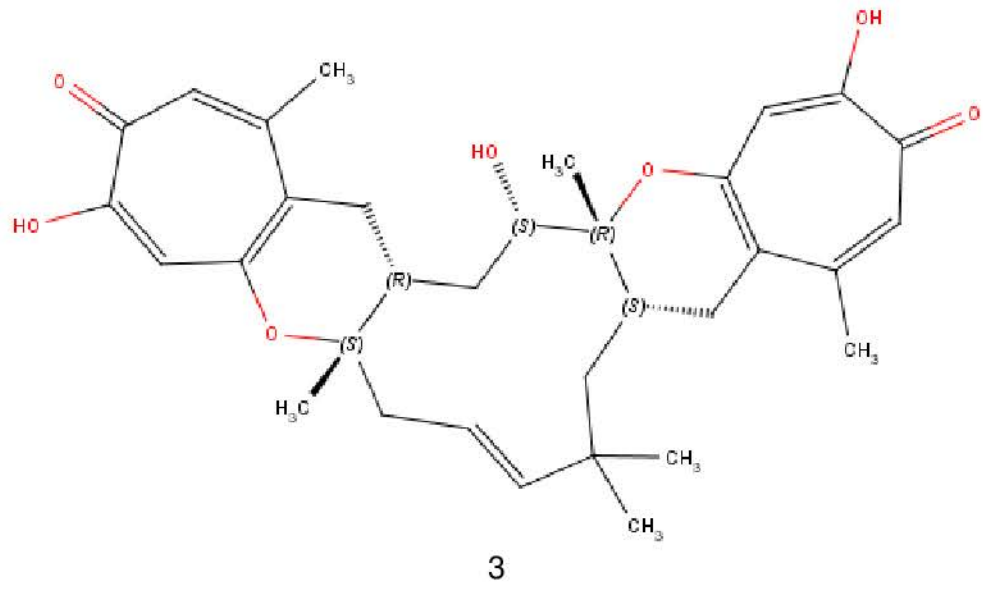
Pesquisa de... / teste indicativo de...	Reagente de detecção (Referências)	Resultados
Grupos antraquinonas ou benzofenonas 	Fluorescência em UV 254 nm http://www.reachdevices.com/TLC_stains.html	Foi possível perceber, além do efeito <i>quenching</i> , efeito fluorescente após excitação com UV 254 nm (característicos destas classes)
Heterosídeo Antraquiônico	Reação de Borntraeger (solução de NH ₄ OH)	Positivo inespecífico. Não foi realizada extração seletiva para heterosídeos antraquiônicos. Houve desenvolvimento de coloração vermelha na solução alcalina devido à ionização de hidroxilas fenólicas (tropolônicas).
Antraquinonas, Fenonas Taninos	Dietilamina FeCl ₃ etanólico	Negativo em placas CCD Negativo para taninos
Taninos	Precipitação de proteínas (gelatina)	Em placa CCD observou-se um tom mais escuro para coloração preto indicando a presença de polifenóis no extrato bruto Negativo
Alcalóides	Reativo de Mayer Reativo de Dragendorff Reativo de Hager Reativo de Ehrlich	Negativo Negativo Negativo Negativo
Alcalóides	Dragendorff (variante) Adicionou-se 2 gotas de HCl 3N. Após, adicionou-se de 1-2 gotas de reagente de Dragendorff	Não foi observada mudança de coloração, que a princípio era transparente, após acrescentar o reagente de Dragendorff. Portanto não indica a presença de alcalóides por este teste.
Aminoácidos, aminas e amino-sacarídeos	Ninhidrina	Negativo
Lactonas sesquiterpênicas (indicativo de geninas com anel lactônico pentagonal insaturado)	Reação de Baljet (ácido pícrico)	Negativo em tubo de ensaio.
Monoterpenos, Sesquiterpenos e Diterpenos	Vanilina Sulfúrica	Positivo. Cor roxa característica após aquecimento.
Alcools, fenóis, esteroides e óleos essenciais	Vanilina Sulfúrica	Positivo. Cor roxa característica após aquecimento.
Esteróides	Vanilina Fosfórica	Positivo inespecífico
Iridóides	Fluoroglucinol	Positivo
Cardenólicos (indicativo de anel pentagonal lactônico insaturado)	Reação de Kedde (ácido dinitrobenzóico)	Negativo em tubo de ensaio
Esteróides e/ou Terpenos	Cloreto de zinco	Positivo inespecífico.
Esteróides e/ou Triterpenos	Lieberman Liebermann-Burchard	Negativo em tubo de ensaio e em placa CCD.

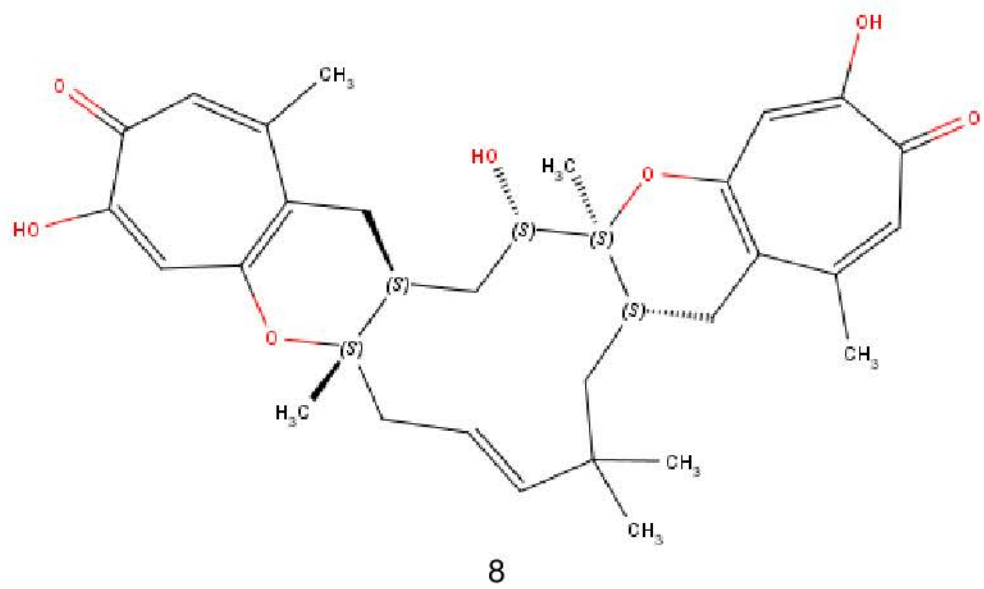
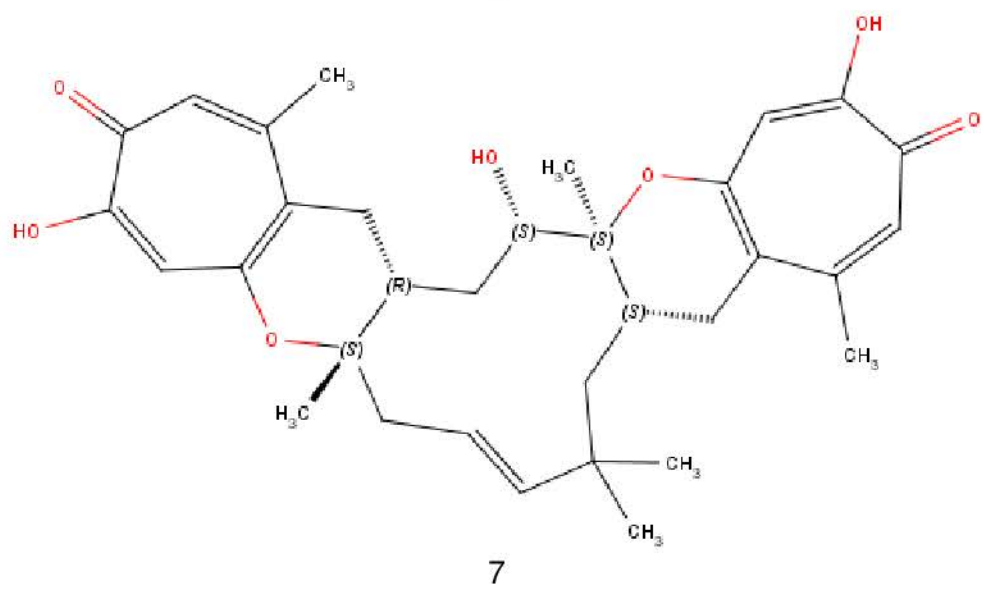
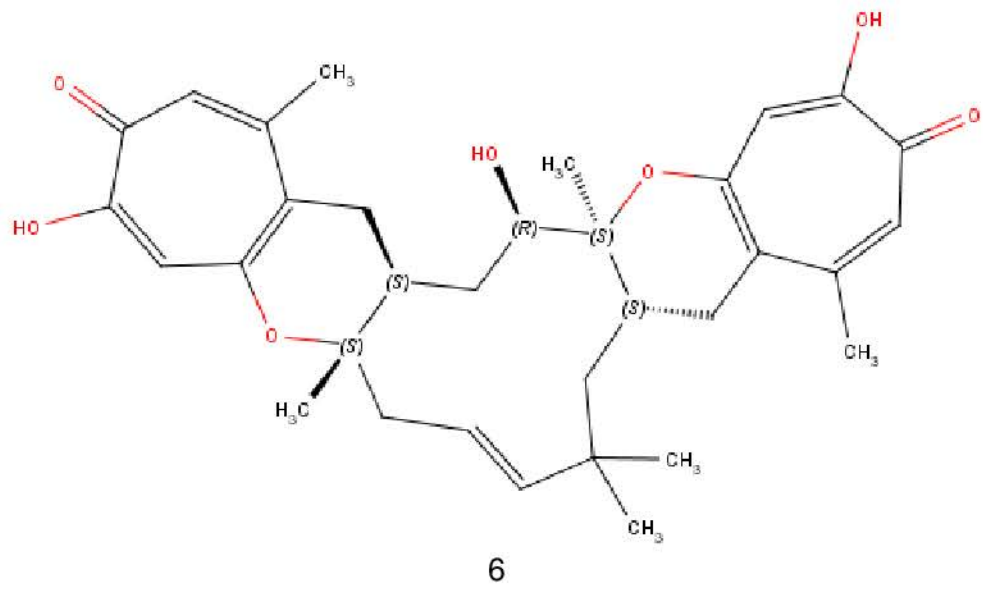
CONTINUAÇÃO

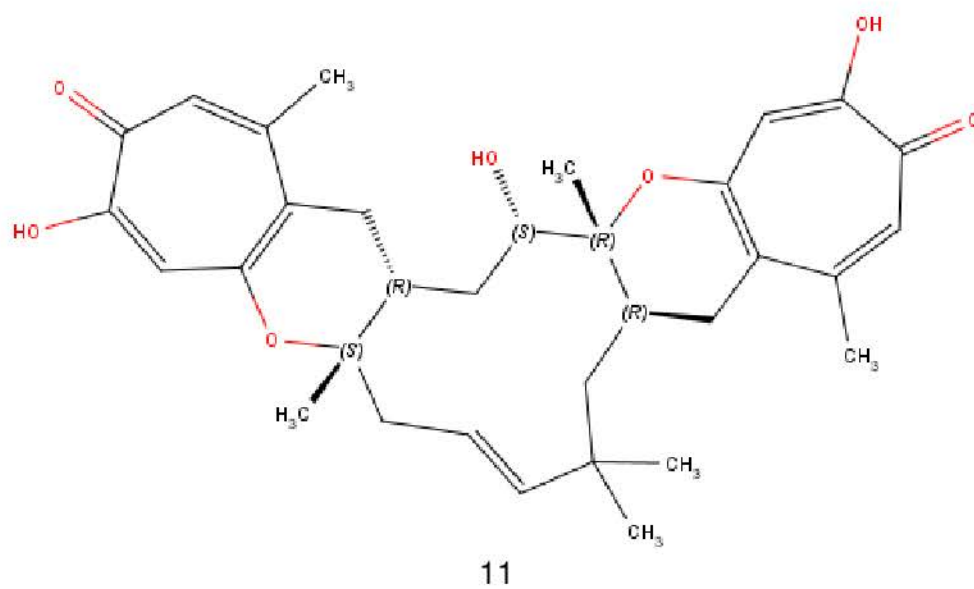
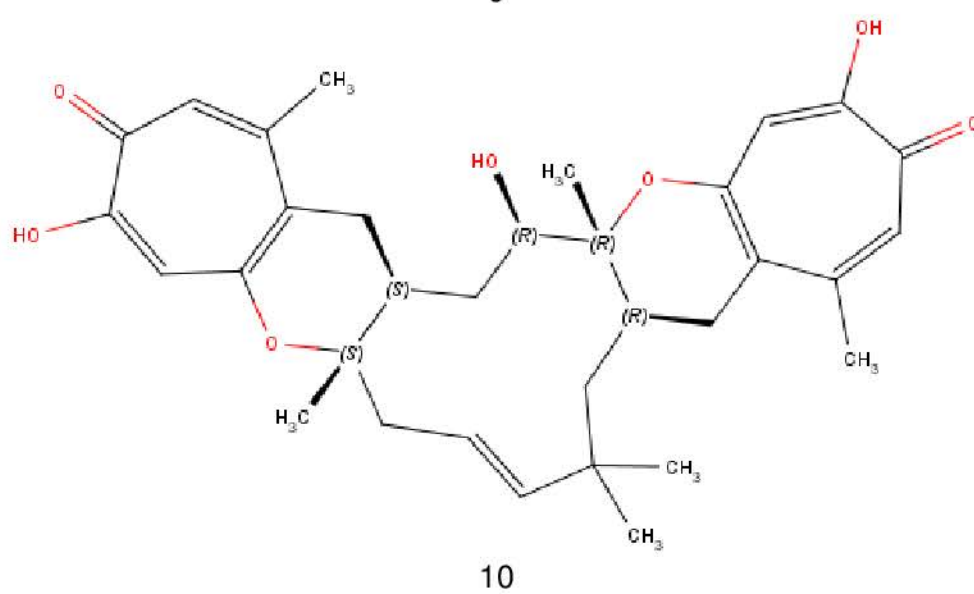
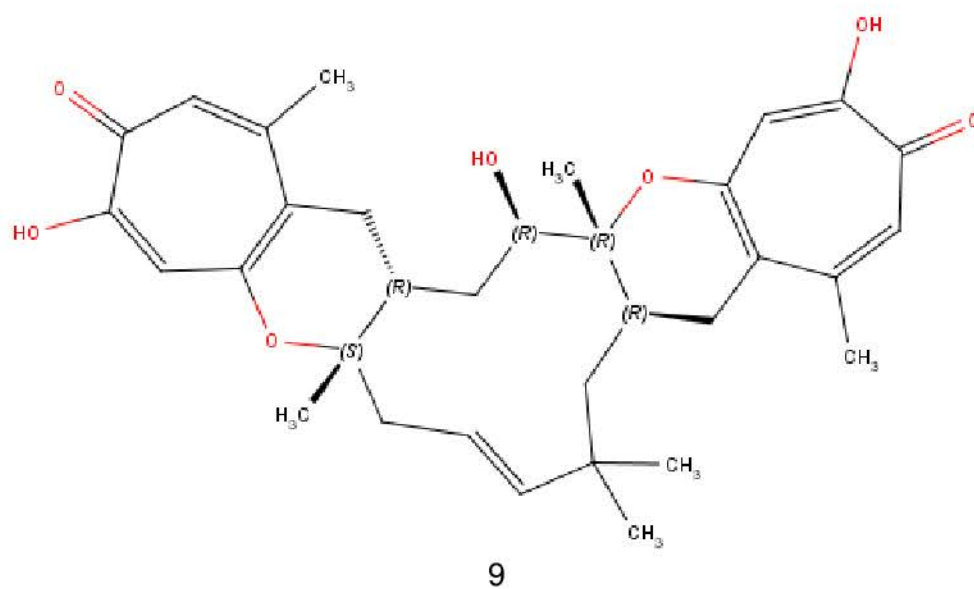
Pesquisa de... / teste indicativo de...	Reagente de detecção (Referências)	Resultados
Esteróides e/ou Triterpenos	Reação de Keller Kelliani	Positivo em tubo de ensaio. Desenvolvimento de cor verde e anel cor marrom nas paredes. Demora em solubilizar em ácido acético.
Esteróides e/ou Triterpenos	Reação de Tollens Reação de Xantidrol Reação de Raymond ou de Marthoud Reação de Legal Teste de espuma	Indefinido
Saponinas (esteroidais ou triterpenóides)	(Reação de Fontan-Kendell) (meio alcalino e meio ácido)	Positivo em tubo de ensaio: espuma estável em meio alcalino e meio ácido (mais de 30 minutos) A maior parte da espuma permaneceu na amostra após repouso <i>overnight</i> .
Saponinas (esteroidais)	Reagente de Sanje's (1% vanilina ácido sulfúrico)	Indicativo de saponinas triterpenóides
Saponinas	Reagente de Lafon's (ferric sulfate amonium, ácido sulfúrico e metanol)	Negativo em tubo de ensaio sem aquecimento.
Saponinas	Acetato de chumbo [+] 1% (ref PC)	Positivo em tubo de ensaio. Desenvolvimento de coloração verde forte. O esperado era verde-azulado.
Ergosterol	Salkowski (CHCl ₃ + H ₂ SO ₄)	Positivo. Precipitação gerou precipitado branco turvo em amostra 0,1% em meio aquoso em tubo de ensaio.
Aldeídos e cetonas	2,2'-Diphenylpicrylhydrazyl (15mg 2,2'-DPPH em 25 mL clorofórmio)	Positivo para extrato bruto
Compostos com grupo SH- (cisteína) ou grupo dissulfeto -S-S-	Nitroprussiato	Positivo. Não foi necessário aquecimento. Spots amarelos em um fundo púrpura.
Corticosterides e compostos redutores.	Azul de tetrazolium	Negativo
Ácidos sulfônicos	Formação de sais com hipoclorito de sódio	Positivo inespecífico
Enxofre em sulfetos Inespecífico (efeito quelante)	Cloreto de bário em H ₃ PO ₄ FeSO ₄ NH ₄	Inespecífico. A reação com hipoclorito de sódio liberou um odor doce incomum. Houve formação de cristais em solução aquosa, mas o teste é inespecífico.
		Negativo. Não deixou precipitado. Quando misturado com FeSO ₄ NH ₄ (sulfato de ferro amoniacal) houve precipitado vermelho

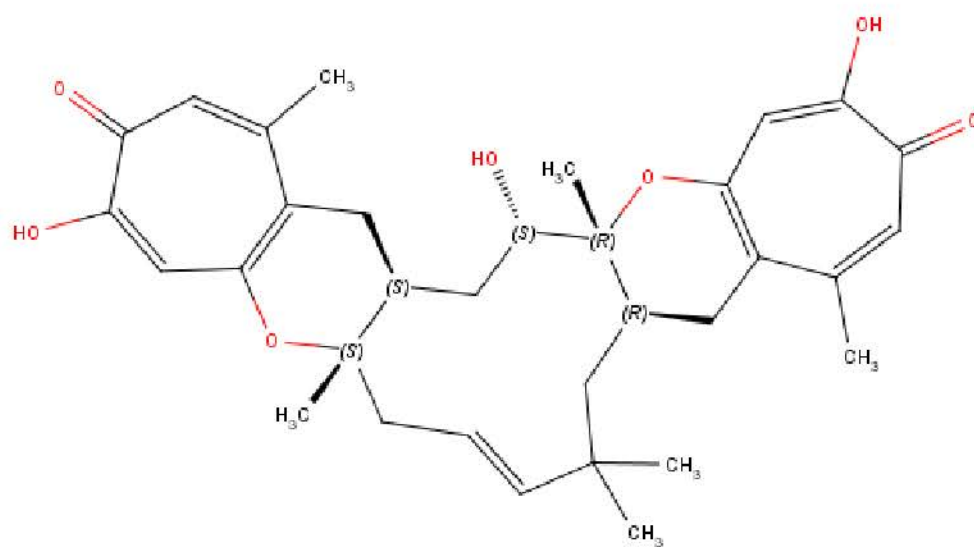
ANEXO 3 - Estereoisômeros



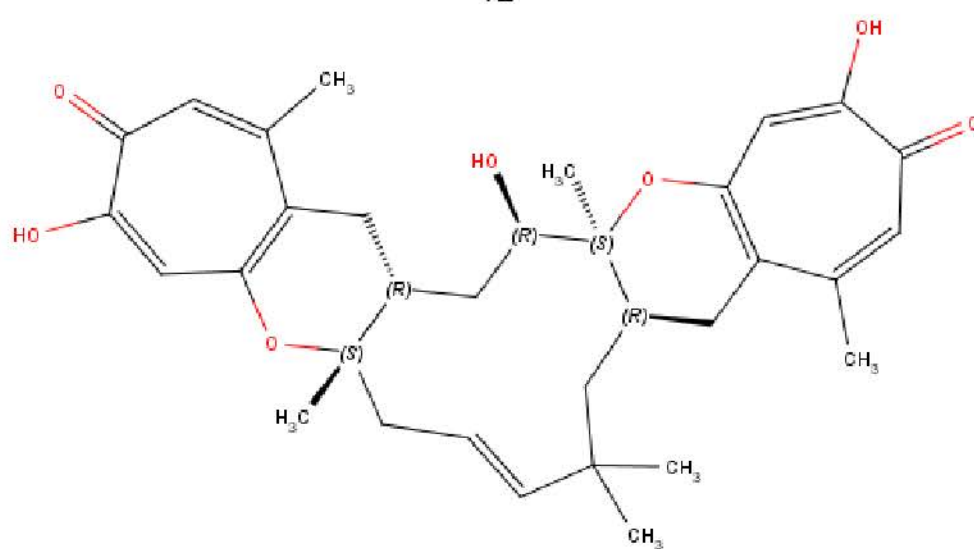




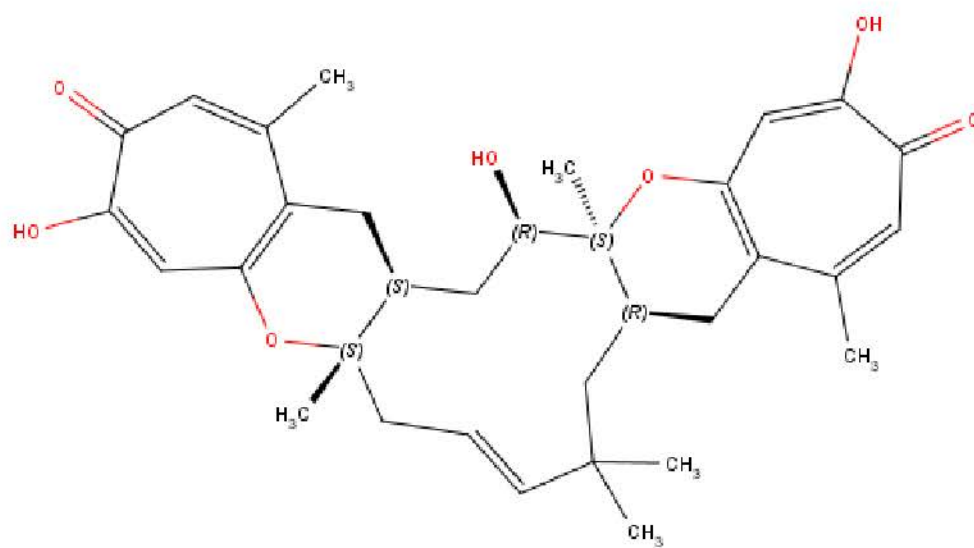




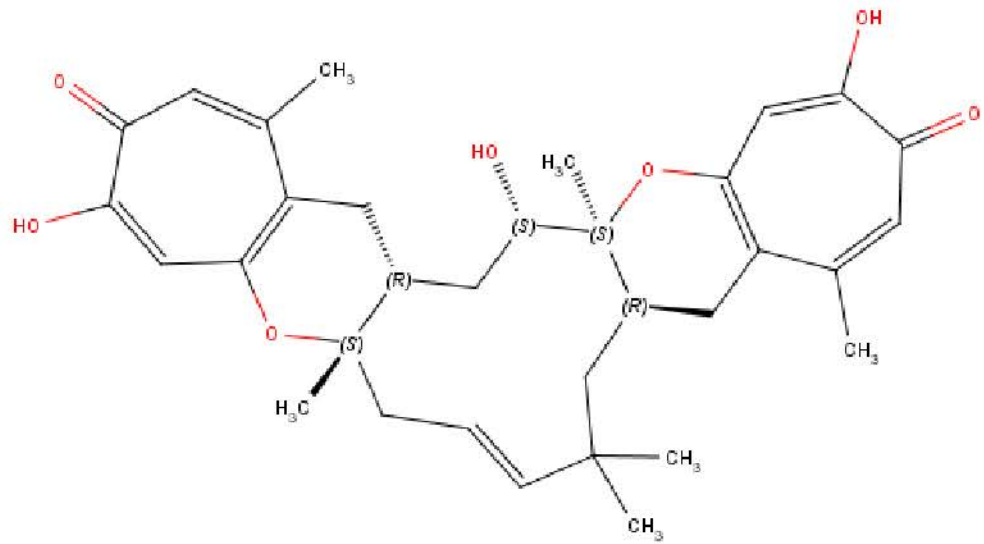
12



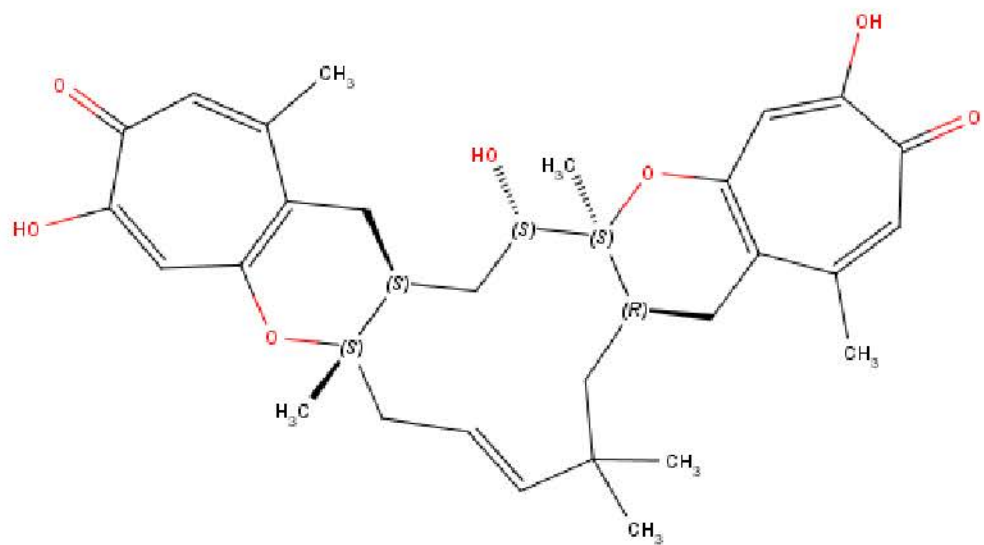
13



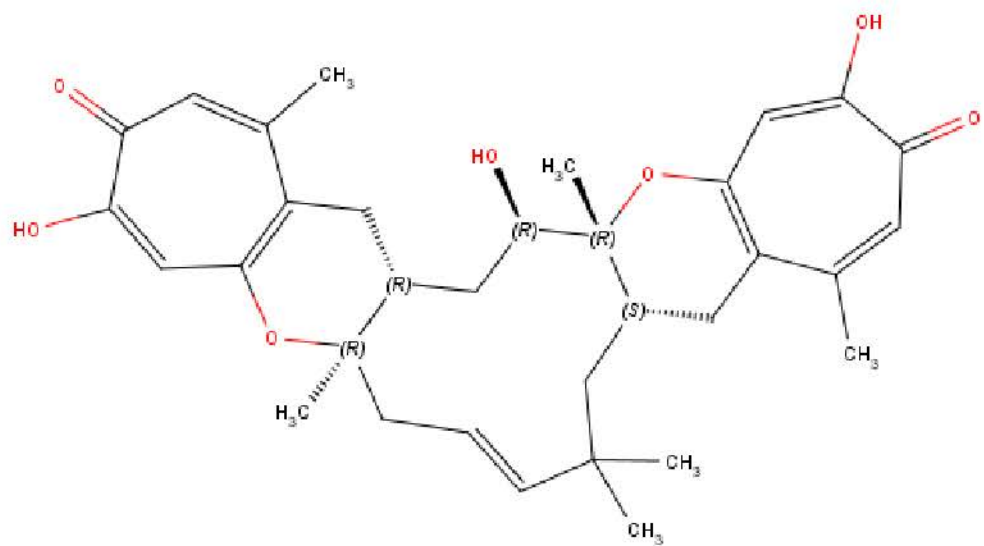
14



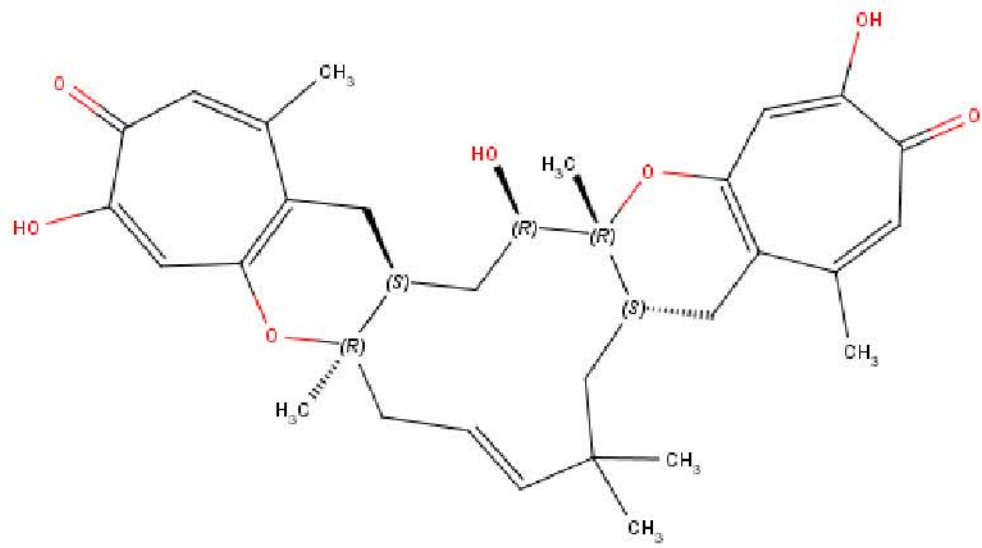
15



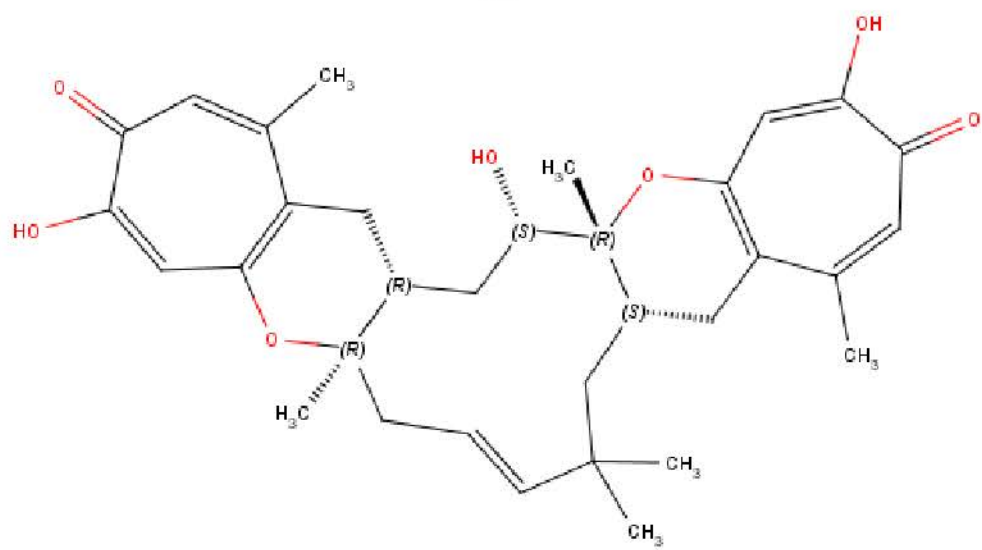
16



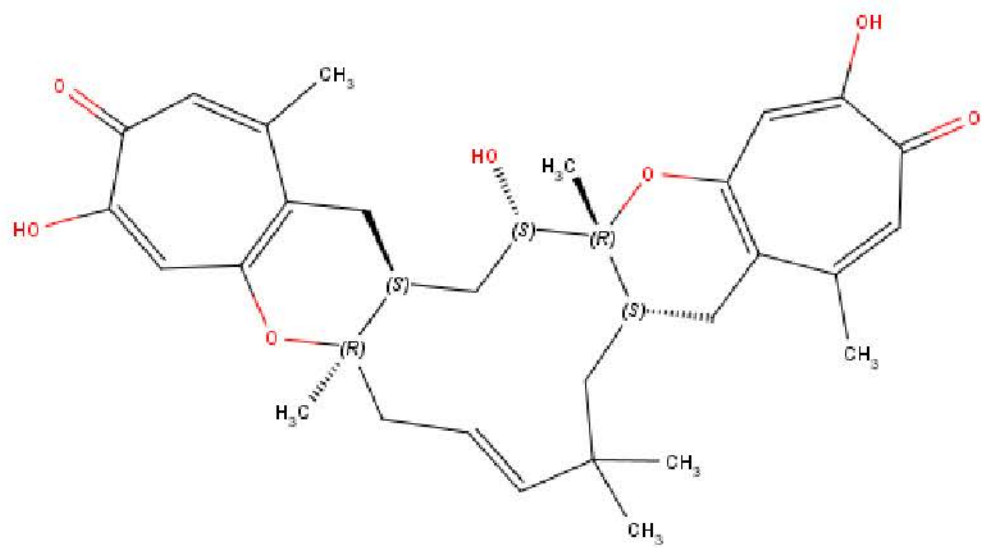
17



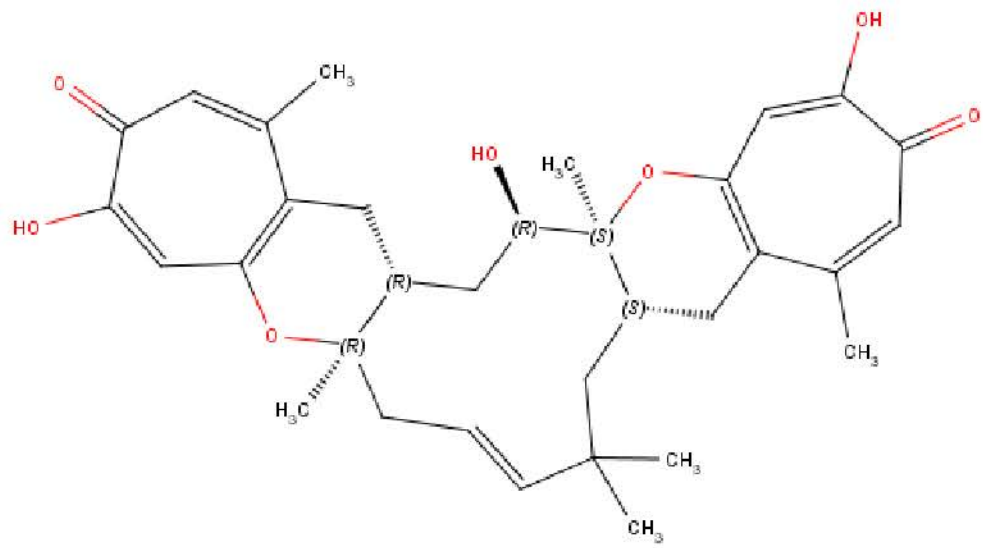
18



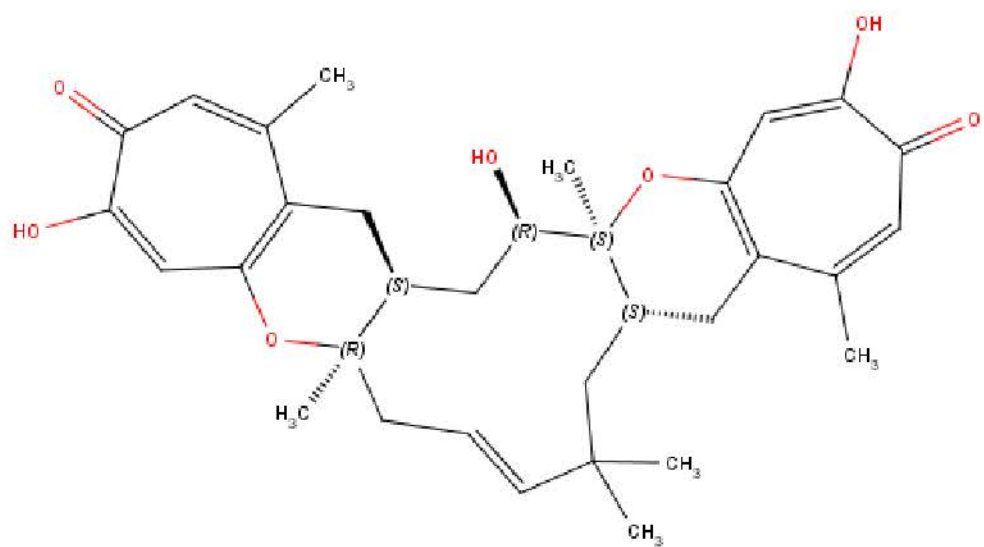
19



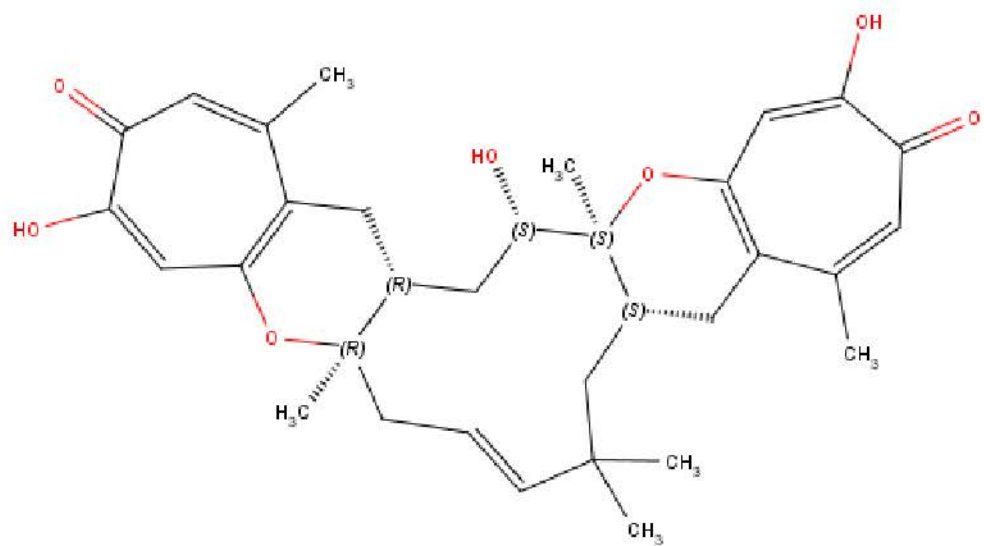
20



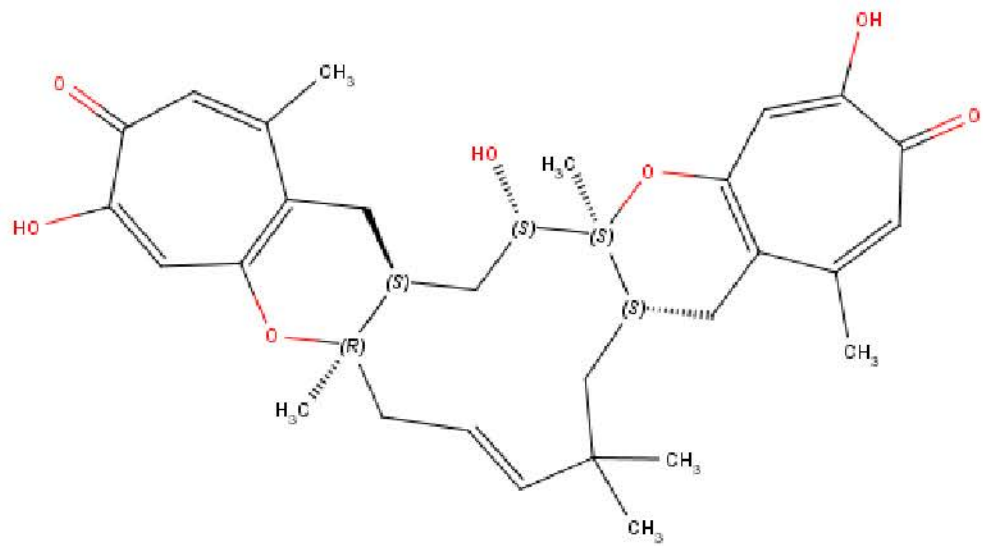
21



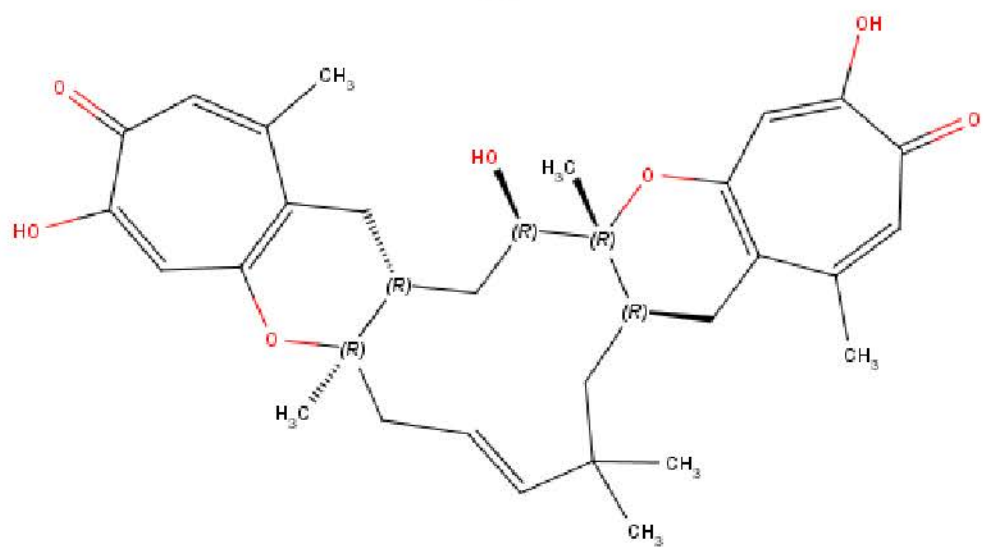
22



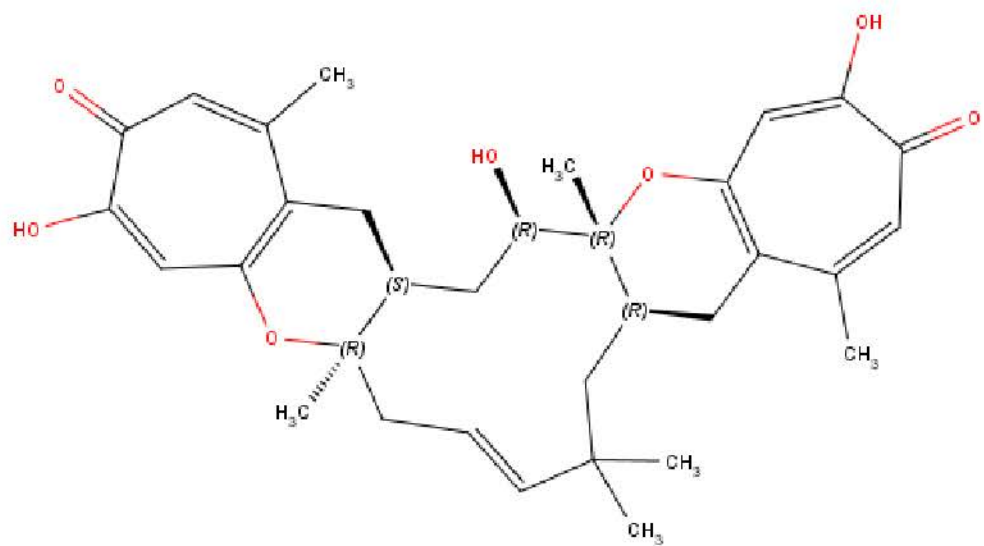
23



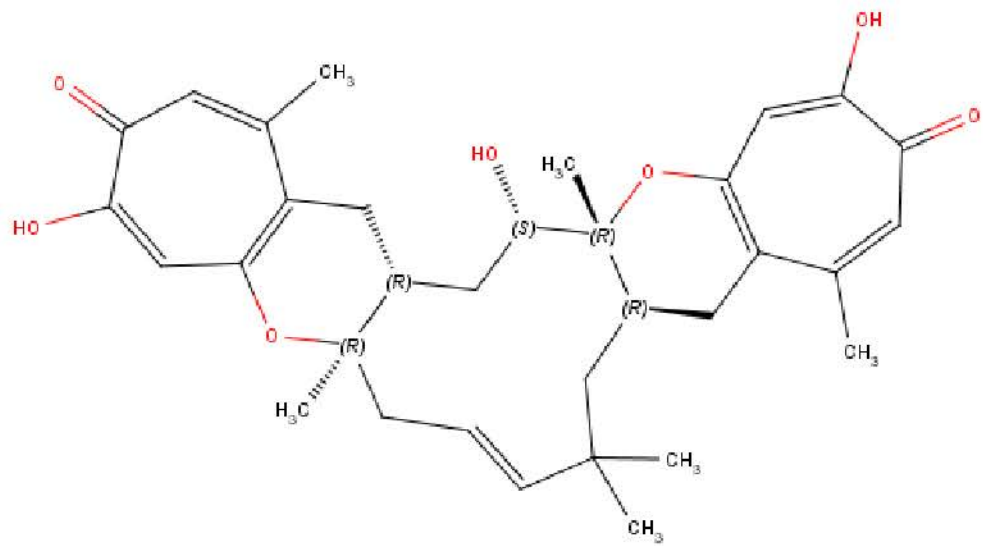
24



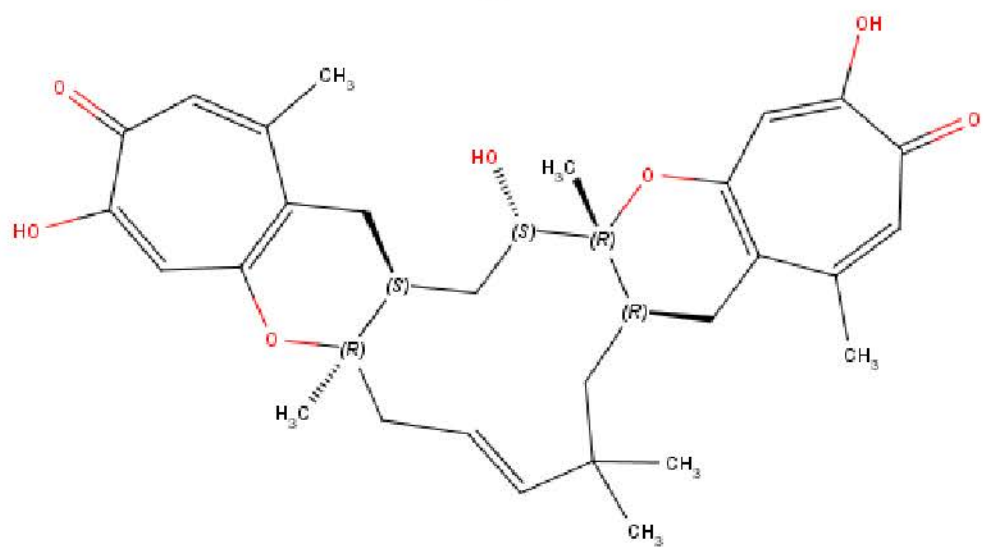
25



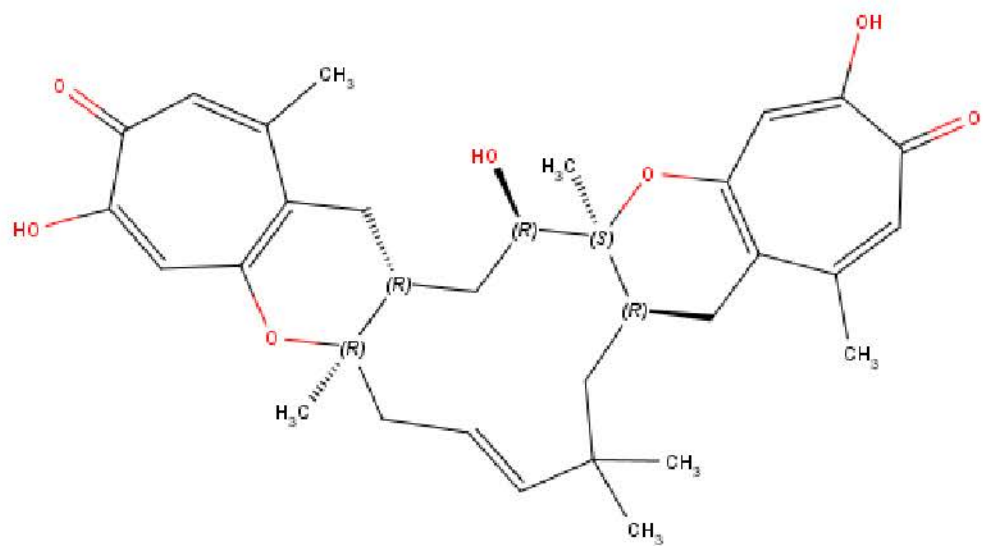
26



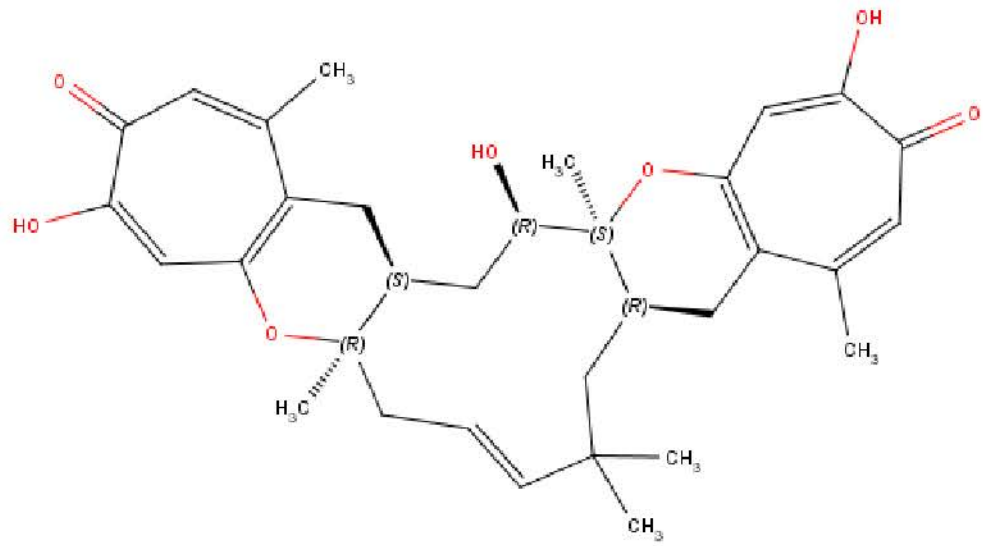
27



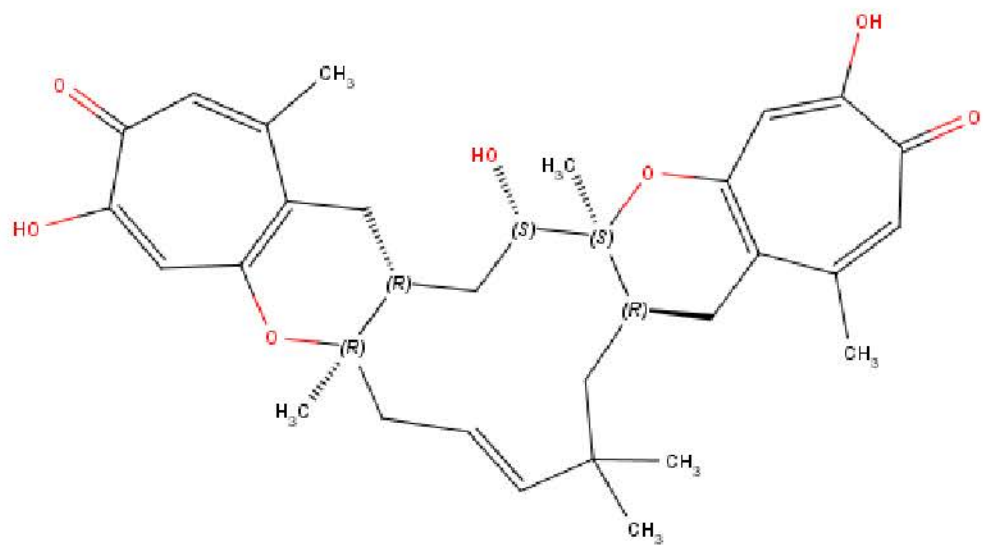
28



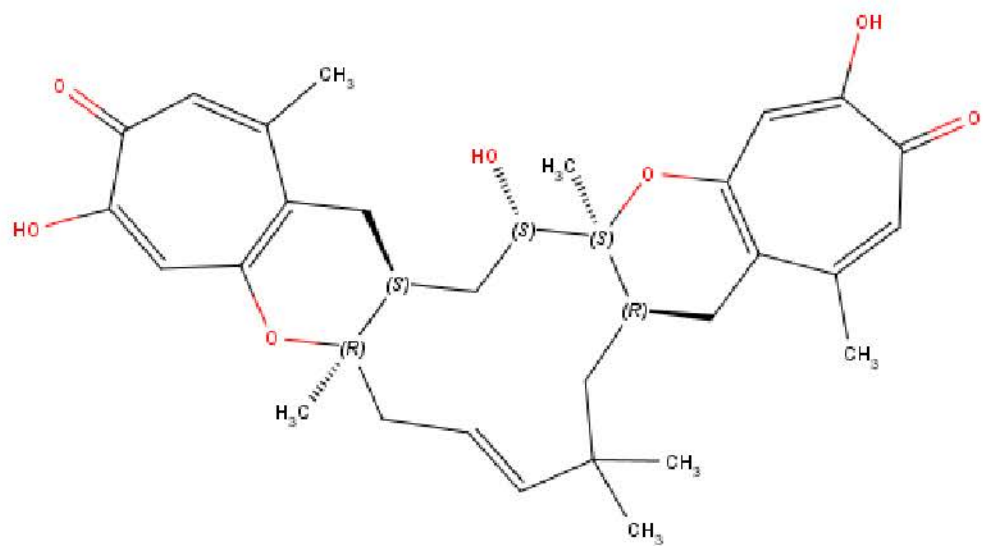
29



30

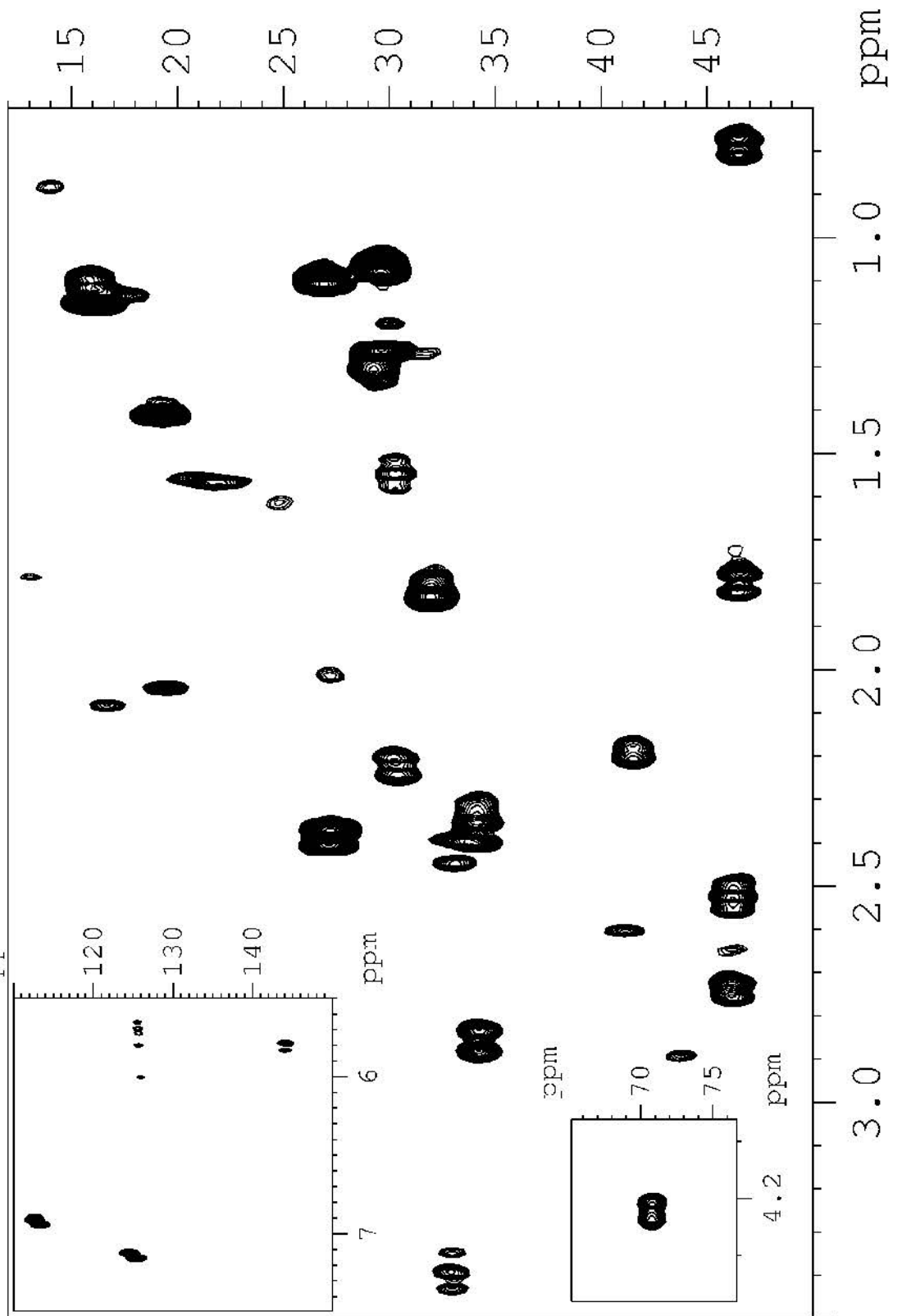


31

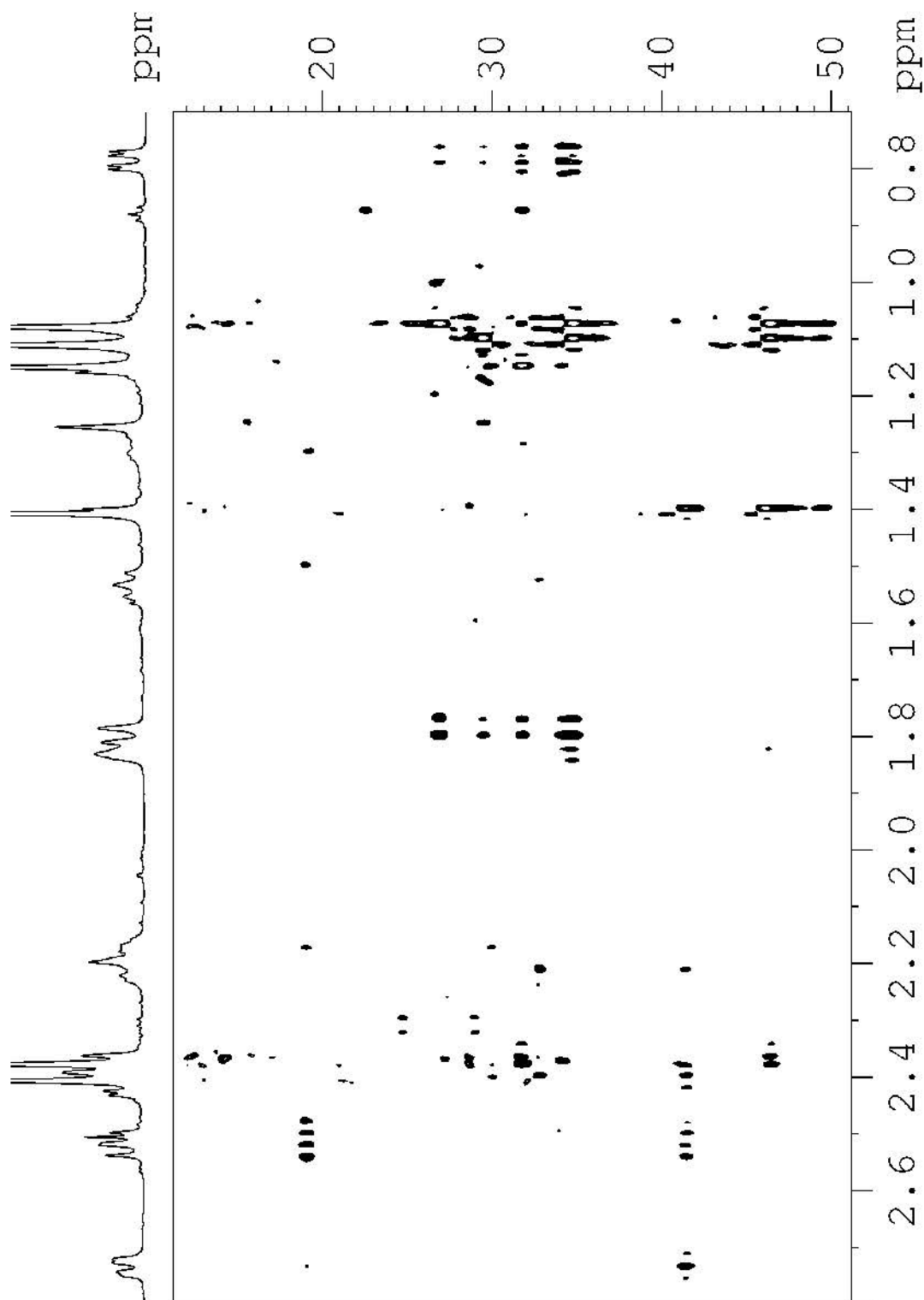


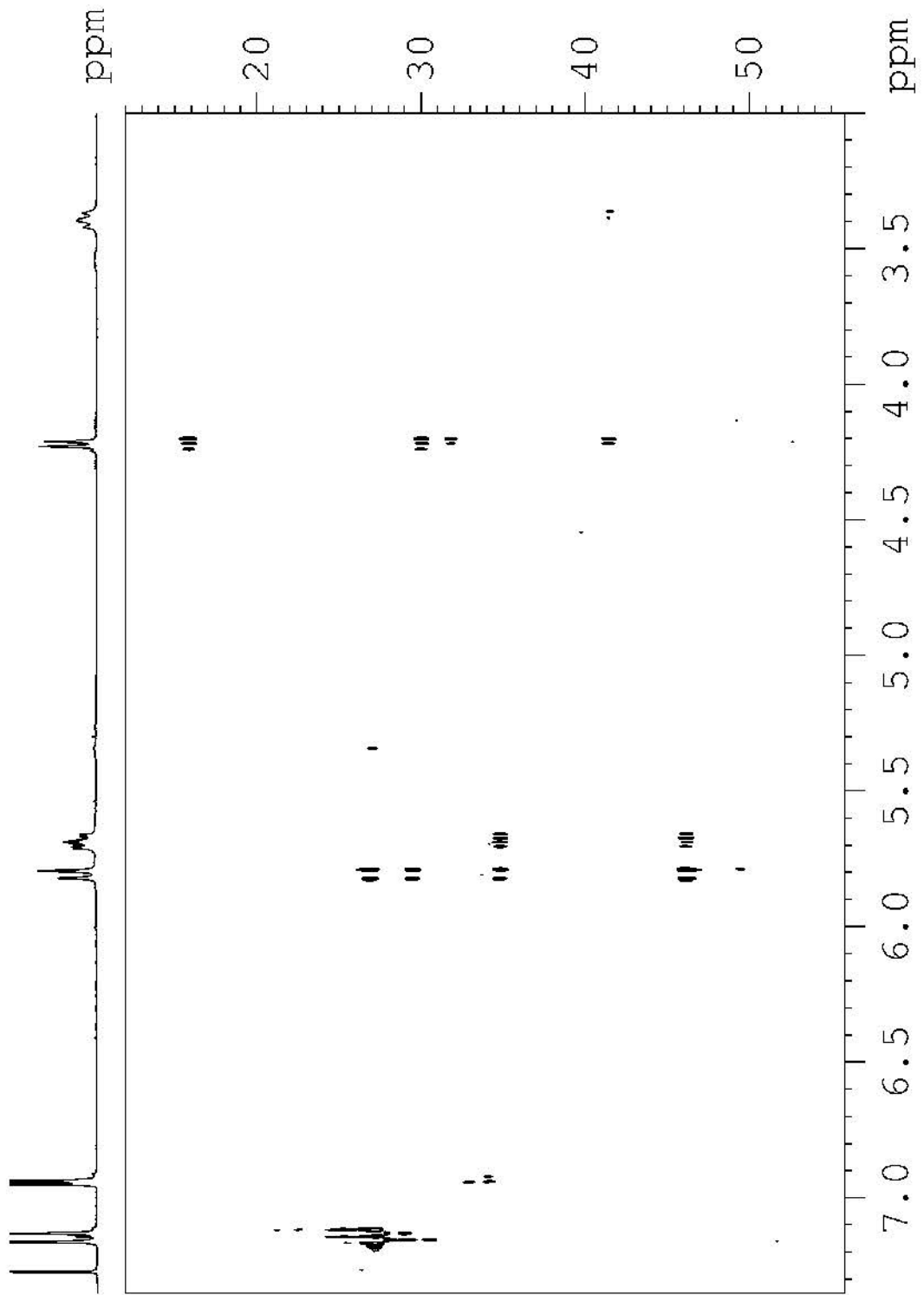
32

ANEXO 4 – HSQC 400 MHZ


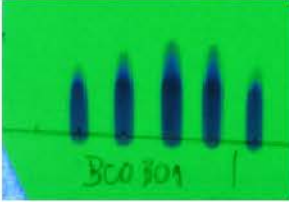


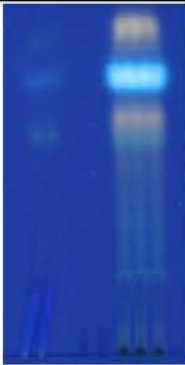
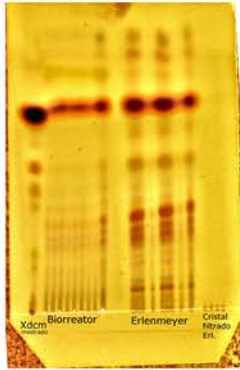

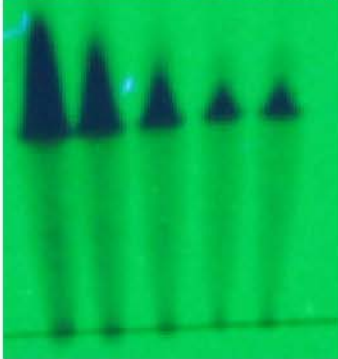
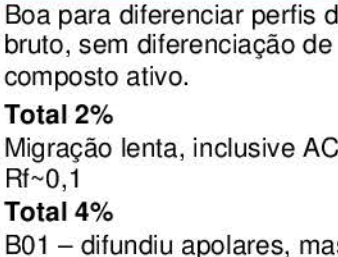
ANEXO 5 – HMBC (SHMBC)





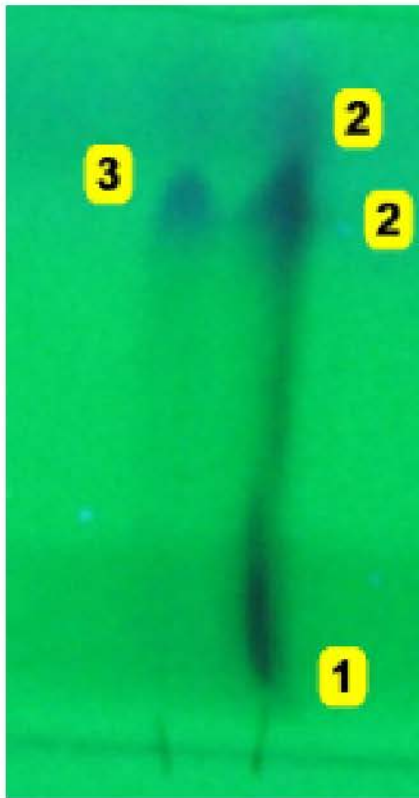
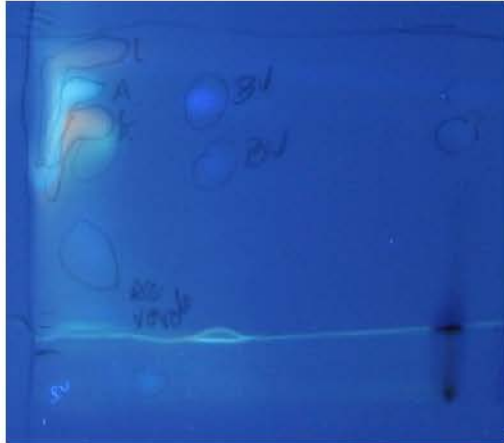
ANEXO 6 – fases móvel de ccd e resultados

Denominação Fase móvel	Constituição	Resultado
180712	CHCl ₃ :EtOAc:ACN 15:15:3	Boa separação, só estava muito concentrado. Sílica ativada. Parece que isômeros de pool142 deram bandas contíguas.
FM1	CHCl ₃ :EtOAc:ACN 50:50:2	Otimizado para apolares. Funcionou para separar amostras azul claro de azul forte.
FM2	EtOAc:MeOH:H ₂ O 100:13:10	Extrato do B02 resultou em composto ativo com Rf 0 a Rf0,111 e visualizado em UV 254nm como spot em forma de arraste com <i>quenching</i> Amostra Xdcm apresentou bandas contíguas bem definidas no UV254 (isomeria?). Na época acreditava que BV era fração ativa
FM2	EtOAc:MeOH:H ₂ O 100:13,5:10	Ótima para separação do extrato de trigo em fase aberta, sem tampa e sem saturação de câmara.
FM2	EtOAc:MeOH:H ₂ O 100:13,5:10	Ótima separação, mas composto ativo ficou em Rf 0-0,111, perceptível em UV254 como azul forte, spot tipo chama.
FM3	Hex:EtOAc 30:40	
FM3	C:\Users\Ricardo\Desktop\fotos - tlc\002 - TLC\FM3 - Hex-EtOAc (3p4)\20062013121916.jpg	
FM3	C:\Users\Ricardo\Desktop\fotos - tlc\B01ppto bco pos sist solv. - FM3	

FM3 antiga	Hex:EtOAc 30:40 pós evaporação longa		ótima separação apolares, alvo com fluorescência azul
FM382	CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH		Boa resolução, exceto para composto ativo
FM1702	CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH 20:0,56:0,04 CHCl ₃ :MeOH:(MeOH 10% NH ₄ OH) 20:0,2:0,4		BCUD3 – várias concentrações
FM0603 Extra	FM603 20mL extra 3mL MeOH 20% HOAc extra 1mL H ₂ O		
FM1004	Clorofórmio: Metanol : ácido acético : água		
FM	DCM : EtOAc : ACN (câmara aberta, pós mais volátil semi- evaporar, então Chamber sat.)		Boa para diferenciar perfis de extrato bruto, sem diferenciação de composto ativo.
FM1402 extra	FM382 Com 2% total MeOH-NH ₄ OH(10%) Com 4% total MeOH-NH ₄ OH(10%)		Total 2% Migração lenta, inclusive ACL com Rf~0,1 Total 4% B01 – difundiu apolares, mas alvo

		fluorescência azul forte em forma de chama desde Rf 0. Pool 142 – bem separado B02 – bem separado, mas Rf 0 a 0,11 (arraste) XdcM: Rf~0.6 +arraste (spot forma de coração) SdcM: Rf~0,9 3de3.5 +arraste e Rf~0,2
FM	DCM : EtOAc : ACN 50:50:2	
FM (benzeno)	Benzeno:Etanol (90:10) (95:5)	Boa para separação geral
FM0603	CHCl ₃ : MeOH : HOAc	Separação lenta, bem definida, ótima para análise, mas imprópria para amostras concentradas
Fm1004	Clorofórmio: Metanol : ácido acético : água c/ mais CHCl ₃	Ótima, desde que se evite sistemas bifásicos
FM2505	CHCl ₃ : EtOH:DCM 20:12:18	Boa para separação geral, especialmente no bidimensional
FM2006	EtOAc : EtOH abs : NH ₄ OH 42:38:3	Fluorescência provavelmente depende da presença do NH ₄ OH, pois composto na FM2006 apresentava fluorescência bastante intensa
FM2006	FM2006 COM 10% H ₂ O	30062014204429.jpg; 30062014204221.jpg; BCO_B01 está em arraste, desde Rf0 a Rf 0,113 (conferido), tanto na amostra B02 como no BCO_B01
25052014172420	Hex:EtOAc:HOAc (65:35:2)	Carreou somente apolares, apesar do ácido acético
FM0108	Tolueno : EtOAc (9:1)	Boa separação para apolares (não fração ativa)
FM 4	hexano:diclorometano:acetona 2:1,5:1	Insatisfatória
FM 5	Hexano:DCM:Acetona:MeOH 2:1,5:1:0,5	Insatisfatória
FM 6	CHCl ₃ :EtOAc:H ₂ O:MeOH [8mL FM2 + 0,5mL MeOH]	Insatisfatória
FM	PetrolEther : MeOH 9:1	Insatisfatória (exceto para apolares)
FM	Acetona:H ₂ O 49:1	Insatisfatória
FM	ButOH : HOAc : H ₂ O 20:5,5:25	Insatisfatória
FM	EtOAc : EtOH : NH ₄ OH 42:38:3	Insatisfatória
FM	MeOH:H ₂ O 10:40	Insatisfatória
FM 2605	Benzeno (só benzeno ou com EtOAc)	Insatisfatória
BAW; EBAW	butanol – ác. acetico -água (12:3:5).	Insatisfatória
IPA	2-propanol	Insatisfatória
FM (acetona)	Acetona	Insatisfatória
FM (metanol)	MeOH:H ₂ O (4:1) – internet e Stahl	Insatisfatória

ANEXO 7 Fases móvel bidimensionais

Focalização bidimensional / Constituição 1D e 2D	Observação / código	Resultado (2D ascendente)
Focalização pela primeira dimensão FM2006 – 1D, 1 ^a FM1004 – 1D, 2 ^a FM2006 – 2D, 1 ^a	20062014171635.jpg	
Preparativo para bioensaio 1D FM1004 c/20% (50:6:0,8) (considerando solução estoque)	11062014182046 - Cópia.jpg Amostra BCO_B01 NMR em MeOH solubilizado para análise LCMS (composto bruto) No.3 pode ser o único interferente do composto bruto (BCO_B01) 1 e 2 podem ser a mesma molécula, só que a quantidade de NH4OH não foi suficiente para neutralizar todo ácido e portanto alguma fração ficou ionizada (1), adsorvendo fortemente à sílica e não eluindo com a fase móvel para o bioensaio	←1D
2D 8 EtOH absoluto 8 EtOAc 8 gotas NH ₄ OH	20062014160242.jpg	
Focalização pela segunda dimensão FM2006 – 1D FM1004 – 2D	Focalizou na segunda dimensão, percebendo-se que com FM2006 manteve no local fixo, enquanto FM1004 focalizou composto único no spot tipo spot	←1D

Dispersão de bandas
com posicionamento
central

FM1106 – 1D
(benzeno:EtOAc)

FM1004 – 2D
CHCl₃ :
MeOH/ac.acético :
água
(50: 6 (20%weight) :
0,8)

11062014184219.jpg

A primeira dimensão
distribuiu
relativamente bem,
mas a molécula alvo
ficou no meio. A
segunda dimensão
ficou com muito
metanol e ácido
acético. Seria melhor
se adiciona-se mais
clorofórmio.

02062014155957.jpg



Ampla separação de
apolares

FM1004 – 1D
FM2+MeOH+NH₄OH
– 2D

Apresentou dispersão
resoluta boa, com
spots bidimensionais
pequenos, mas
também perceber que
a placa foi aprox.
15cm x 12 cm.
Perceber que o 2D
serviu apenas para
dispersar o que não
era alvo, que
teoricamente ficou no
Rf-0 quando na
segunda dimensão.



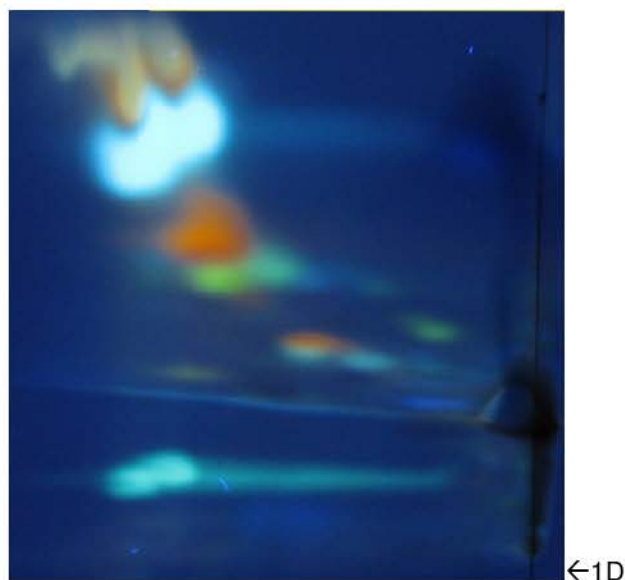
Dispersão ampla
favorecendo excitação
UV 365 nm

FM3 gotas NH₄OH –
1D

FM1004
(CHCl₃:MeOH_{20%}:H₂O)
(101:10:0.8 mL
apenas)
– 2D

02062014112559.jpg

A concentração mais
baixa permitiu a
separação
bidimensional mais
distribuída. Quando
na presença de
NH₄OH, a amostra
ficou no frente, mas
com FM1004 foi
carreada. Perceber a
área preta.



25052014165217.jpg

Unidimensional com
duas corridas
consecutivas
(1ª e 2ª)

A –

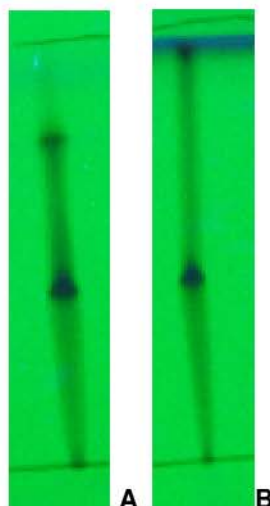
Pós outras 3 fases
CHCl₃:EtOH96:DCM
(12:8:10)

esbranquiçado

B –

CHCl₃:EtOH96:DCM
(12:12:8) 2ª – a parte
carreada ficou junto
ao fronte

Apenas parte da
amostra percorreu
junto com a 2ª fase
móvel. Percebe-se
que o spot alvo
(formato chama)
resultado do FM1004,
permaneceu no lugar,
mesmo após a
mudança de fase
móvel com etanol
hidratado e
diclorometano.
É possível que a falta
de ácido fixou parte
da amostra ionizada
na sílica. Isto pode
ser observado pois há
um arraste contínuo.



A

B

ANEXO 8 – CONTIG DA REGIÃO amplificada ITS fúngico

Fungo desconhecido (Unkown lcl|query_226269, destacado em amarelo)

Identificado como *Phaeosphaeria* sp.

```
AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATTCAGTAGCTTGCTACTGTTAG
GGGGGTCTATTAGTCTGTATAGTATCACTACTGATGAGCAGCACGACCCTCTGTCTATA
CCCTTGCTTTTTCGCACTCATGTTTCCTCGGCGGCTTGATACCCGCCGGCTGGATCAAT
CTATAACCTTTTTAATTTTCAATCAGCGTCTGAAAAACCTAATAATTACAACCTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAT
GGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTG
TCCACCATCGTGGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCAGTGTTTTGGTATTGAAGCGCA
GCACATTTTGCGCCTCTAGCCTAGAACACTAGCGTCCAGTAAGCCTTTTTCCACTTTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT
```