

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento de Ciências da Saúde

**Novos Métodos Cromatográficos
para Análise e Separação de Novos
Produtos Naturais Antimicrobianos**

**Mónica José Ciríaco Pinheiro Pombinho de
Matos, nº 21005336**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Tese Orientada pela Professora Doutora Marisa Nicolai

LISBOA - 2015



Novos Métodos Cromatográficos para Análise e Separação de Novos Produtos Naturais Antimicrobianos

Mónica José Ciríaco Pinheiro Pombinho de
Matos, nº 21005336

Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada na Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias / Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Tese Orientada pela Professora Doutora Marisa Nicolai

LISBOA - 2015

Escrito segundo as regras do acordo ortográfico de 1945, ao abrigo da Resolução da Assembleia da República n.º 35/2008, *Diário da República*, 1.ª série — Nº 145 de 29 de Julho de 2008.",

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas. (Carl Sagan)

*Para a Pati e para a Carol,
por quem vale a pena fazer todos os sacrifícios*

Agradecimentos

À Professora Doutora Marisa Nicolai pela orientação e ajuda na elaboração desta tese.

Ao Paulo, o meu informático pessoal, que não desesperou com a falta dos meus “conhecimentos” informáticos.

Ao Helder, que fez muitas vezes de pai e mãe para eu conseguir levar este projecto até ao fim.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes e por poder contar sempre com eles.

À Liliana, Ricardo, Francisco e Vanessa, que quando mais precisei estiveram ao meu lado e não me deixaram ir abaixo.

E por fim às minhas princesas, pelos sorrisos e mimos com que me brindam todos os dias.

Resumo

Cerca de metade dos fármacos usados actualmente na clínica quotidiana derivam de um produto natural.

Os produtos naturais estão a ganhar uma maior importância na investigação de novos fármacos antimicrobianos devido ao aumento das resistências a este tipo de fármacos, derivado ao mau uso, tanto no humano como no veterinário.

De modo a combater este problema de saúde pública mundial, a pesquisa de novas moléculas com actividade antimicrobiana é actualmente um tópico de pesquisa muito relevante.

Por forma a diminuir o tempo e dinheiro gasto na pesquisa destas moléculas recorre-se cada vez mais a técnicas cromatográficas hifenizadas, como é exemplo a cromatografia líquida-espectrometria de massa.

Estas técnicas associam uma ou mais técnicas de separação analíticas, como a cromatografia gasosa, com um ou mais detectores dos compostos a analisar (analitos) separados, como por exemplo o espectrómetro de massa.

No presente trabalho apresentam-se algumas das técnicas cromatográficas mais recentes utilizadas na pesquisa de novas moléculas com actividade farmacológica antimicrobiana.

Palavras Chave:

Cromatografia, Antimicrobianos, Técnicas Hifenizadas, Produtos Naturais

Abstract

Currently, about half the pharmaceuticals used in everyday clinics derive from a natural product.

Natural products are gaining relevance in the research of novel antimicrobial drugs due to the increase in the microbial resistance to these type of drugs, especially as a consequence of their incorrect use, human and animal.

To overcome this world public health problem, research on new antimicrobial molecules is currently a very relevant research topic.

As a way to reduce the amount of time and money spent in the research of these molecules, the use of hyphenated chromatographic techniques, such as liquid chromatography-mass spectrometry, is increasing.

These techniques combine one or more analytical separation techniques, such as gas chromatography, with one or more compound detectors, such as the mass spectrometer.

In this work we present some of the new chromatographic techniques used in the research of new molecules with antimicrobial pharmacological activity.

Keywords:

Chromatography, Antimicrobial, Hyphenated Techniques, Natural Products

Abreviaturas

AC - Configuração absoluta (do inglês *Absolut Configuration*).

APCI - Ionização química a pressão atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

CE - Electroforese capilar (do inglês *Capilar Electrophoresis*).

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*).

ECD - Dicroísmo circular eletrônico (do inglês *Electronic Circular Dicroism*).

ESI - Ionização por electrospray (do inglês *Electrospray Ionization*).

FAB - Bombardeamento atômico rápido (do inglês *Fast Atomic Bombardment*).

GC - Cromatografia gasosa (do inglês *Gas-Chromatography*).

HIV - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*).

HPLC - Cromatografia Líquida de alta pressão (do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*).

IV - Via endovenosa (do inglês *Intra Venous*).

LC - Cromatografia líquida (do inglês *Liquid-Chromatography*).

MS - Espectrometria de massa (do inglês *Mass Spectrometry*).

NCEs - Novas entidades químicas (do inglês *New Chemistry Entities*).

NMR - Ressonância magnética nuclear (do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*).

OR - Rotação óptica (do inglês *Optical rotation*).

RAM - Resistência antimicrobiana.

RPC - Cromatografia de fase reversa (do inglês *Reverse Phase Chromatography*).

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de alta pressão de fase reversa (do inglês *Reverse Phase –High Pressure Liquid Chromatography*).

SFC - Cromatografia supercrítica (do inglês *Supercritical Fluid Chromatography*).

TLC - Cromatografia de camada fina (do inglês *Thin Layer Chromatography*).

T_r - Tempo de retenção.

UPLC - Cromatografia líquida de ultra performance (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*).

UV - Ultra Violeta.

Índice

Introdução	12
Cromatografia	14
Classificação dos processos cromatográficos.....	14
Modo de separação	15
Natureza da fase móvel	16
Modo de operação	17
Aplicações da cromatografia:.....	17
Análise qualitativa	17
Análise quantitativa	18
Antimicrobianos	19
Antibacterianos.....	20
β -lactâmicos.....	22
Penicilinas	23
Isoxazolilpenicilinas	23
Ureidopenicilinas	23
Cefalosporinas	23
Monobactams	24
Carbapenemes.....	24
Cloranfenicol e Tetraciclins	24
Aminoglicosídeos	24
Macrólidos.....	25
Sulfanolidas	25
Quinolonas.....	25
Outros antibacterianos	25
Antituberculosos	26
Antifúngicos	26
Antivirais	27
Antiparasitários.....	28
Anti-helmínticos.....	28
Anti-maláricos	29
Novos antimicrobianos	29

Novas técnicas cromatográficas na pesquisa de novos antimicrobianos ..	30
Cromatografia líquida-espectrometria de massa.....	31
Espectrometria de massa com ionização por electrospray	31
NMR/LC-MS.....	34
TLC-ESI-MS.....	34
HPLC enantiomérico.....	35
HPLC de fase reversa	37
Proteínas terapêuticas	39
Propriedades moleculares das proteínas	40
Conclusão	42
Bibliografia.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1: Critérios para classificar os diferentes tipos de cromatografias	15
Tabela 2: Estrutura química de cada classe de antibiótico.	21
Tabela 3: Estruturas químicas de antivirais	28
Tabela 4: Métodos cromatográficos para obtenção de propriedades de proteínas	40

Índice de Figuras

Fig. 1 – Estrutura química da Anfotericina B	27
Fig. 2 - Estrutura química do Albendazol.....	29
Fig. 3 – Estrutura química da cloroquina	29
Fig. 4 - <i>Pseudoplexaura porosa</i>	32
Fig. 5 - <i>Pseudomonas fluorescens</i> e fenazinas	34
Fig. 6 – Estrutura química de uma fitoalexina – capsidiol	36
Fig. 7 - <i>Piper gaudichaudianum</i> e ácido gaudichaudianico.....	37
Fig. 8 – <i>Taraxacum mongolicum</i> e <i>Phoma</i> spp.	38
Fig. 9 - Ácido 2-hidroxi-6-metilbenzoico	39

Introdução

A relação entre o ser humano e os produtos naturais, derivados de plantas, animais ou outros organismos vivos, sempre foi fundamental, uma vez que há milhares de anos que os utilizamos como alimento, vestuário, abrigo, combustível e até como protecção para o sobrenatural, assim como cura para os males do corpo e alma. As plantas, fonte de alimento e de oxigénio, foram, durante milénios, a base dos medicamentos usados para o tratamento de praticamente todos os tipos de patologias.

Actualmente, cerca de 85% dos medicamentos administrados em todo o mundo são remédios tradicionais à base de plantas [McIntyre, 2011], sendo por isso, fundamental compreender e investigar os seus constituintes, de modo a perceber a origem da sua eficácia.

A eficiência de diversos produtos naturais já foi avaliada e certificada cientificamente, como é o caso do alho na circulação e do tomilho nas infecções [Samuelsson, 2004]. Aliás, muitas das importantes descobertas da medicina e muitos dos fármacos mais potentes têm origem natural, como é o caso da penicilina (descoberta no bolor do pão), a digoxina (obtida da digitálica) e a aspirina (obtida do ulmeiro) [Samuelsson, 2004].

Como tal, a investigação sobre o valor medicinal dos produtos naturais está a ser aprofundada em todo o mundo, pois os cientistas procuram novos tratamentos para todo o tipo de patologias, desde doenças degenerativas, cardíacas, oncológicas, passando pela procura de novos fármacos antimicrobianos, uma vez que a resistência a este tipo de compostos está a tornar-se um enorme problema de saúde pública, sendo cada vez maior o número de microrganismos resistentes aos actuais fármacos [Goodman, 2010].

Uma vez que os produtos naturais têm matrizes muito complexas, sendo muito ricos em variadíssimos compostos, são, cada vez mais, necessárias novas técnicas para a separação dos diversos constituintes, que muitas vezes se encontram em quantidades vestigiais [Annis, 2007].

A técnica utilizada por excelência, na separação dos constituintes dos produtos naturais, é a cromatografia [Skoog, 1996].

Desta forma, é importante fazer um pequeno e exíguo compêndio sobre esta técnica, para posteriormente descrever sucintamente alguns antimicrobianos e novas técnicas cromatográficas na pesquisa de novos antimicrobianos.

Cromatografia

A palavra cromatografia surge do grego, significando cor (*chroma*) e escrever (*grafia*), e tornou-se um método importante de separação a partir de 1903, quando foi desenvolvida pelo botânico Mikhail Semenovich Tswett. É um processo de separação de amostras complexas, entre uma fase móvel – eluente – e uma fase estacionária – adsorvente. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido depositado num sólido inerte, empacotada numa coluna ou espalhada numa superfície, formando uma fina camada. A fase móvel é a que se desloca por dentro ou por cima da fase estacionária, transportando com ela o analito [Skoog, 1996].

A cromatografia pode ser definida como uma técnica em que os compostos de uma mistura são separados dependendo da velocidade com que são transportados através de uma fase estacionária, por um líquido ou gás da fase móvel [Krull, 2012].

Esta técnica tem inúmeras aplicações, desde a separação de componentes relativamente voláteis, como purificações de produtos farmacêuticos, proteínas, esteróides, entre outras [Krull, 2012].

Classificação dos processos cromatográficos

Visto que todos os processos cromatográficos se baseiam no facto de uma mistura de componentes a separar se repartir em maior ou menor proporção entre uma fase estacionária (fixa) e uma fase móvel, existem vários princípios para se classificar o tipo de cromatografia. Na Tabela 1 apresentam-se os diversos critérios para a sua classificação, que incluem o tipo de suporte, o modo de separação, a natureza da fase móvel, o objectivo da separação, a composição da fase móvel e o modo de preparação [Labvirtual, 2014].

Tabela 1: Critérios para classificar os diferentes tipos de cromatografias [Labvirtual, 2014]

Tipo de suporte	Coluna
	Planar (papel, placa)
Modo de separação	Adsorção
	Partição
	Permuta iónica
	Exclusão de tamanhos
	Afinidade
Natureza da fase móvel	Cromatografia gasosa (GC)
	Cromatografia líquida (LC)
	Cromatografia supercrítica (SFC)
Objectivo da separação	Análítica
	Preparativa
Composição da fase móvel	Isocrática
	Gradiente
Modo de operação	Análise frontal
	Análise por deslocamento
	Eluição

Modo de separação

De acordo com a classificação através do modo de separação, tem-se em conta os processos físicos e químicos entre os componentes da mistura e as duas fases. Como tal, dentro desta categoria estão:

Cromatografia de adsorção: baseia-se na separação entre os vários constituintes da mistura e ocorre devido às diferentes interações intermoleculares, tais como as forças de *Van der Waals* e as pontes de hidrogénio, entre a fase estacionária e a fase móvel (líquida ou gás). A fase estacionária, por sua vez, pode ser sílica gel, alumina ou celulose [Skoog, 1996].

Cromatografia de partição: a separação dá-se devido às diferenças de solubilidades entre a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (líquida). A fase estacionária é constituída por uma substância inerte, insolúvel e hidratada, através da

qual flui a fase móvel. Esta fase consiste num solvente não miscível com o líquido da fase estacionária, que contém a mistura a separar.

Cromatografia de permuta iónica: neste tipo de cromatografia iões da fase estacionária são trocados com iões da fase móvel, ocorrendo a separação dos diversos constituintes da amostra. A afinidade entre os iões da fase móvel e o suporte é controlada através do pH ou pela força iónica do eluente.

Cromatografia de exclusão molecular: como o próprio nome indica, os compostos são separados devido ao seu tamanho molecular. Sendo assim, moléculas grandes não penetram no interior do suporte – fase estacionária – e movem-se mais rapidamente pela coluna, tendo um tempo de retenção menor (t_r – tempo que um composto demora até sair da coluna), ao contrário das moléculas mais pequenas, que ao fazerem um percurso maior apresentam um tempo de retenção maior.

Cromatografia de afinidade: ocorre uma ligação específica e reversível entre o soluto e um ligando que está imobilizado na fase estacionária. O ligando utilizado é uma pequena biomolécula específica para o tipo de composto que se pretende isolar. Uma vez que esta técnica se baseia em ligações específicas é utilizada preferencialmente para separar produtos biológicos, como enzimas, anticorpos e receptores hormonais, quando misturados em matrizes complexas de produtos semelhantes, mas que estabelecem ligações químicas específicas com determinados receptores.

Natureza da fase móvel

Quando se pretende separar substâncias voláteis recorre-se, normalmente, a GC, em que os compostos são arrastados por um gás inerte (hidrogénio, hélio, azoto ou argón), através de uma fase estacionária. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido, onde ocorre a separação pelos métodos previamente mencionados. O cromatógrafo, instrumento analítico que permite analisar diversos compostos numa amostra, tem acoplado um detector, originando um registo dos tempos de eluição dos diversos componentes da amostra e respectivas áreas dos picos – cromatograma.

Se o analito se encontra na forma líquida, a técnica mais utilizada será a LC, que é utilizada tanto para fins analíticos, como para fins comerciais [Skoog, 1996]. Neste caso, a fase móvel é obrigada a percorrer a coluna devido a uma acção externa, que pode ser a gravidade – cromatografia de baixa pressão – ou uma força mais

intensa, gerada por uma bomba – cromatografia de alta pressão (HPLC). Tal como no caso do GC, no final da cromatografia também se obtém um cromatograma.

A polaridade da fase estacionária, na LC, também vai originar uma nova classificação, isto é: sempre que a fase estacionária é mais polar que a fase móvel a cromatografia líquida é denominada de cromatografia em fase normal, caso contrário denomina-se de cromatografia de fase reversa [Skoog, 1996]

Modo de operação

A técnica mais usual é a cromatografia de eluição. Neste caso o eluente flui continuamente através da coluna, e à entrada da coluna, rapidamente, é injectada uma mistura. Devido às diferentes propriedades físicas e químicas, os compostos presentes na mistura saem a diferentes tempos da coluna – t_r , originando o cromatograma.

Na cromatografia por deslocamento, a amostra é introduzida, tal como na de eluição, rapidamente no topo da coluna, mas neste caso a fase móvel terá que ter um composto com grande afinidade para a fase estacionária, que será mais fortemente adsorvido que qualquer um dos compostos da mistura. Os compostos da amostra vão sendo sucessivamente arrastados através da coluna, formando zonas de concentração constantes. Neste caso o cromatograma originado terá o aspecto de degraus [Skoog, 1996].

Se a amostra for introduzida continuamente no eluente, a cromatografia será designada por frontal. Neste caso, à medida que a fase móvel percorre a coluna, os constituintes da mistura vão-se distribuindo pelas duas fases, e emergem da coluna a tempos diferentes, quando o adsorvente fica saturado.

Aplicações da cromatografia:

Análise qualitativa

Esta técnica é essencialmente utilizada para detectar a presença ou ausência de determinados componentes numa mistura, desde que as amostras não sejam muito complexas e os compostos a detectar sejam conhecidos. Para determinar a composição de misturas complexas recorre-se, normalmente, às técnicas hifenizadas, em que um espectrómetro de massa (MS) ou um detector de ultravioleta (UV) é acoplado ao cromatógrafo, de modo a conseguir identificar as várias espécies presentes [Skoog, 1996]

Análise quantitativa

Comparando a área do pico de um padrão, num cromatograma, com a área do pico originado por um composto é possível determinar a quantidade presente nessa amostra [Skoog, 1996].

Com o desenvolvimento informático e tecnológico tornou-se possível a evolução de técnicas hifenizadas, em que diversos tipos de detectores são acoplados a um cromatógrafo, como um detector de ultravioleta ou um espectrometro de massa. Também foi possível o desenvolvimento de colunas cromatográficas mais sensíveis e específicas para diferentes classes de compostos [Krull, 2012].

Analisando os diversos tipos de cromatografia é, portanto, fácil perceber a importância desta técnica na análise e separação de diversos produtos naturais, entre os quais os que apresentam actividade antimicrobiana.

Antimicrobianos

As infecções humanas são causadas por diversos tipos de microrganismos – parasitas, vírus, bactérias e fungos. Podem provocar o aparecimento de doença, ou ter uma manifestação subclínica, que dependerá da interação agente-hospedeiro, podendo, em alguns casos, a cura ocorrer espontaneamente, isto é, quando o organismo hospedeiro encontra meios de erradicar a bactéria, ou provocar vários graus de morbidade (insuficiências respiratórias em pneumonias) e mortalidade [Oswald, 2004].

Se a doença infecciosa se manifestar na sua forma mais grave, será necessário recorrer à hospitalização, para monitorização e/ou administração parentérica da medicação.

Com a descoberta dos primeiros antibióticos, considerada, na época, a última grande descoberta a nível farmacêutico, foi possível tratar muitas das doenças bacterianas, o que permitiu uma enorme melhoria na saúde pública, assim como o aumento da esperança média de vida e a qualidade de vida, pois as morbididades associadas às doenças bacterianas diminuíram [Abramowicz, 2014; Cunha, 2012].

Antibiótico é uma substância que interage com organismos uni ou pluricelulares (bactérias), que causam infecções num organismo. Podem causar a morte ou inibir o metabolismo celular das bactérias, assim como impedir a sua reprodução, permitindo que o sistema imunológico do organismo hospedeiro possa combater com mais eficácia a infecção bacteriana [Brody, 1994].

Alexander Fleming, em 1928, descobriu acidentalmente um antibiótico natural, produzido por um fungo (o bolor do pão) que inibiu o crescimento de uma cultura de *Staphylococcus*. Como o fungo que produziu a nova substância se designava *Penicillium chrysogenum*, Fleming denominou-o de penicilina. Em 1941, após comprovada a sua eficácia na terapêutica humana e a sua baixa toxicidade, foi o primeiro antibiótico a ser comercializado [Brody, 1994].

Embora exista uma enorme variedade de antimicrobianos disponíveis, a erradicação total das doenças infecciosas não é total, nem é previsível que o seja, uma vez que os microrganismos têm a capacidade de se adaptarem a meios adversos e criarem resistências aos agentes antimicrobianos que os “combatem” [Abramowicz, 2004].

Para que uma molécula tenha eficácia antimicrobiana é necessário que na célula alvo existam receptores para que a molécula de fármaco se possa ligar, de modo a impedir, por exemplo, a sua replicação e, desta forma, não seja possível a entrada do antimicrobiano na célula alvo, uma vez que a maior parte das ligações entre o fármaco e o seu receptor se dá em locais no interior da célula; onde ocorrem ligações bioquímicas entre o fármaco e um ou mais compostos celulares imprescindíveis à vida da célula microbiana [Brody, 1994].

Devido à utilização inadequada e desnecessária dos antimicrobianos verificou-se um aumento das resistências a estes fármacos, uma vez que as células destes microrganismos criaram mecanismos de defesa, como por exemplo as bombas de efluxo, que diminuem o tempo de permanência do medicamento dentro da célula alvo, diminuindo a sua eficácia. No entanto e de modo geral, cada tipo de microrganismo tem o seu antimicrobiano específico [Abramowicz, 2014].

Antibacterianos

Os antibióticos são a classe de antimicrobianos mais utilizada mundialmente. De elevada importância, tanto para a saúde pública, como economicamente, dividem-se em variadas classes, consoante a estrutura química associada [Cunha, 2012]

Se o composto celular que fica “bloqueado” pelo antibiótico impede apenas a sua divisão, a bactéria não morre, apenas não se divide. Neste caso o antibiótico diz-se bacteriostático [Goodman, 2010].

Se o composto celular inibido pelo antibiótico provoca a morte da bactéria (por lise ou outro mecanismo), o fármaco diz-se bactericida [Goodman, 2010].

Apresenta-se, de seguida, a tabela 2 com as várias classes de antibióticos e exemplos com as respectivas estruturas químicas, segundo Abramowicz, (2014).

Tabela 2: Estrutura química de cada classe de antibiótico [Abramowicz, 2014].

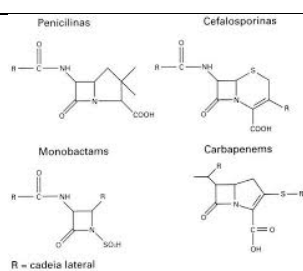
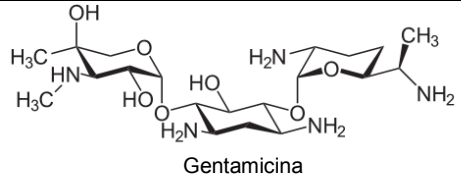
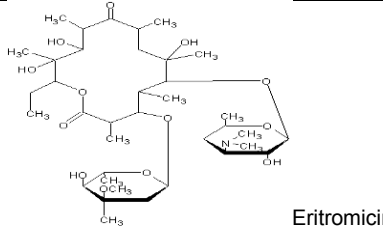
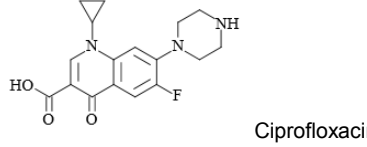
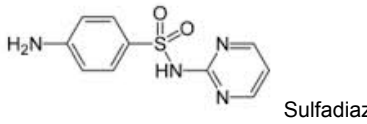
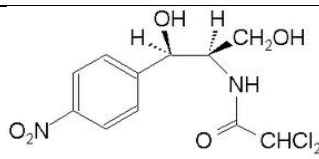
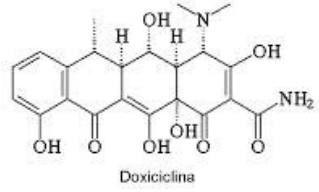
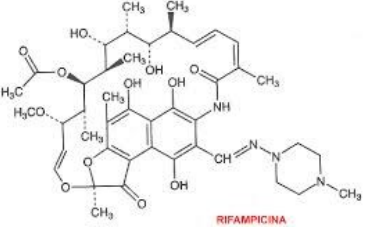
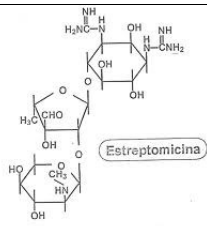
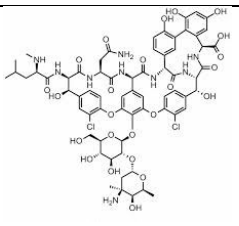
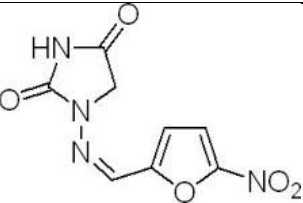
Classe de antibiótico	Estrutura química	Data de isolamento/síntese
B - lactâmicos	 Penicilinas Cefalosporinas Monobactams Carbapenems R = cadeia lateral	Penicilina – isolada do bolor do pão em 1928
Aminoglicosídeos	 Gentamicina	Purificado da <i>Micromonospora purpurea</i> em 1964
Macrólidos	 Eritromicina	Isolado da <i>Streptomyces erythreus</i> em 1952
Quinolonas	 Ciprofloxacina	Sintetizado em 1983 a partir da norfloxacina
Sulfanolidas	 Sulfadiazina	Sintetizado em 1941 a partir da sulfonamida
Clorofenicol		Isolado em 1947 de <i>Streptomyces venezuelae</i>
Tetraciclina	 Doxiciclina	Sintetizada em 1962 a partir da clortetraciclina
Isoniazida	 ISONIAZIDA	Sintetizada em 1912 a partir do ácido isonicotínico

Tabela 2: Estrutura química de cada classe de antibiótico [Abramowicz, 2014] (cont.).

Classe de antibiótico	Estrutura química	Data de isolamento/síntese
Rifampicina		Isolada em 1963 a partir de <i>Streptomyces mediterranei</i>
Estreptomicina		Isolada em 1943 a partir de <i>Streptomyces griseus</i>
Vancomicina		Isolada na década de 50 a partir de <i>Amycolaptosis orientalis</i>
Nitrofurantuína		Sintetizada em 1938 a partir do nitrofurfural substituído.

β-Lactâmicos

Os antibióticos da classe dos β-lactâmicos possuem um mecanismo de acção e efeitos adversos semelhantes entre si, diferindo nas propriedades farmacocinéticas e no espectro de acção. Todos os fármacos deste grupo inibem a formação da parede celular da bactéria, sendo por isso bactericidas [Goodman, 2010]

Têm em comum um anel beta lactâmico e são agrupados em quatro subclasses diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems [Cunha, 2012].

Penicilinas

A penicilina G é extremamente rápida e eficaz, e é o menos tóxico dos antibióticos. Continua a ser a primeira escolha na maioria das infecções provocadas por espiroquetas e cocos. Deve ser reservada para as espécies que lhe são sensíveis e em regimes profiláticos [Cunha, 2012].

As aminopenicilinas são resistentes ao ácido gástrico e com um espectro de acção semelhante ao da penicilina G. Nesta subclasse, a mais utilizada oralmente é a amoxicilina. Como esta subclasse é sensível às lactamases, que destroem o anel beta lactâmico, inactivando o antibiótico é comum a associação de um inibidor das β -lactamases, como o ácido clavulâmico. No entanto, esta associação amoxicilina-ácido clavulâmico tem bastantes efeitos a nível gastrointestinal, impedindo o aumento de dose nas infecções pneumocócicas, como seria ideal [Cunha, 2012].

Isoxazolilpenicilinas

A subclasse das isoxazolilpenicilinas é resistente às penicilinases (bactérias que desactivam as penicilinas), sendo por isso preconizado o seu uso exclusivamente no tratamento de infecções causadas por estafilococos produtores de penicilinases. Um exemplo desta subclasse é a flucloxacilina [Goodman, 2010].

Ureidopenicilinas

As mais conhecidas das ureidopenicilinas são a azlocilina, a mezlocilina e a piperacilina. Têm um bom espectro de acção em relação às bactérias gram-negativo, e são utilizadas normalmente em associação com antibióticos de outras classes terapêuticas [Infarmed, 2014].

Cefalosporinas

Todas as cefalosporinas são activas contra a maioria dos cocos gram-positivos e muitos dos bacilos gram-negativos e são muitas vezes prescritos a doentes alérgicos a penicilinas [Cunha, 2012].

Nesta subclasse os fármacos são classificados por gerações (1ª a 4ª), consoante o seu espectro de acção e actividade contra as bactérias. As cefalosporinas de primeira geração são mais resistentes às beta-lactamases e podem ser administradas oralmente, como a cefradina, ou então por via endovenosa (IV), como a cefazolina [Goodman, 2010].

As cefalosporinas de segunda geração perdem actividade em relação às bactérias gram-positivo, mas ganham em relação às bactérias gram-negativo, como é o caso da cefoxitina. As cefalosporinas de terceira geração, além de terem um espectro de acção alargado para bactérias gram-negativas, são também resistentes às beta-lactamases. São reservadas normalmente para uso hospitalar [Cunha, 2012].

Monobactamos

Esta subclasse, monobactamos, tem apenas um antibiótico para uso terapêutico, que é o aztreonam, sendo o único beta-lactâmico exclusivo para bactérias gram-negativas aeróbias. Não tem no entanto vantagens em relação a outros antibióticos com o mesmo espectro de acção [Goodman, 2010].

Carbapenemes

Esta subclasse tem um espectro de acção muito alargado, tanto para bactérias gram-positivas como gram-negativas. O primeiro carbapeneme disponível para uso foi o imipenem, que desempenha um papel chave no tratamento de infecções não tratadas prontamente com outros antibióticos [Goodman, 2010].

Cloranfenicol e Tetraciclina

O cloranfenicol, embora tenha toxicidade hematológica, é a primeira escolha em caso de abscessos cerebrais por bactérias anaeróbias, para a febre tifóide ou sempre que uma febre escaro-nodular necessite de tratamento IV [Infarmed, 2014].

Entre as tetraciclina, a mais utilizada é a doxiciclina. Esta classe de antibióticos é a primeira escolha em caso de cólera, peste, brucelose, riquetsioses, infecções por *Chlamydia* e por *Mycoplasma* [Infarmed, 2014].

Esta classe de fármacos inibe a subunidade 30S ribossomal, impedindo a síntese proteica e consequentemente parando a replicação celular [Goodman, 2010].

Aminoglicosídeos

Esta classe de antibióticos tem um largo espectro contra as bactérias gram-negativas aeróbias e também contra o *Staphylococcus aureus*. Não são absorvidos por via oral e têm também o inconveniente de serem nefro e ototóxicos. São utilizados em associação com os beta-lactâmicos. O mais utilizado é a gentamicina, usado no tratamento inicial de quadros sépticos graves [Goodman, 2010].

Tal como as tetraciclina, esta classe liga-se à subunidade 30S ribossomal, impedindo a síntese proteica [Goodman, 2010].

Macrólidos

O primeiro antibiótico desta classe a ser introduzido no mercado foi a eritromicina, que continua a ser o macrólido de referência. É utilizado principalmente em infecções causados por estreptococos e difteria. As *guidelines* indicam macrólidos para o tratamento da doença do Legionário. Tem havido um acréscimo nas resistências a esta classe de antibioterapia, nomeadamente no tratamento de pneumonias primárias [Cunha, 2012].

A eritromicina liga-se à subunidade 50S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas, que dependendo da concentração de fármaco e da estirpe bacteriana, pode levar ao impedimento da replicação celular ou mesmo à morte da bactéria [Goodman, 2010].

Sulfanolidas

A sulfadiazina é uma sulfamida utilizada no tratamento de meningite meningocócica e o trimetropin é utilizado no tratamento de infecções urinárias recorrentes, principalmente em pediatria [Goodman, 2010].

Estes antibióticos são bacteriostáticos, uma vez que impedem o metabolismo do ácido fólico [Goodman, 2010].

Quinolonas

O exemplo típico desta classe é a ácido nalidíxico, no entanto pouco utilizado hoje em dia. As quinolonas são utilizadas principalmente em bactérias gram-negativas. A ciprofloxacina é considerada a que tem uma maior actividade antimicrobiana intrínseca [Infarmed, 2014]. Têm a grande adversidade de os organismos ganharem facilmente resistência a este grupo.

Esta classe inibe a actividade da enzima topoisomerase II, essencial à sobrevivência da célula [Goodman, 2012].

Outros antibacterianos

Existem alguns antibióticos que não se conseguem classificar em nenhuma das classes anteriores e que são únicos nas suas características, e por isso juntaram-se todos num só grupo.

Como exemplo a nitrofurantoína, com grande relevância no tratamento de infecções urinárias, sem afectar a flora bacteriana endógena [Goodman, 2010]. Esta molécula inibe a acetil co-enzima A, impedindo o normal funcionamento do RNA bacteriano, conduzindo à morte da célula. Em altas concentrações também actua a nível do DNA bacteriano, impedindo a replicação celular [Goodman, 2010].

Outro exemplo bastante utilizado a nível hospitalar é a vancomicina, usada no tratamento de infecções graves em doentes com hipersensibilidade à classe mais utilizada, que são os beta-lactâmicos, e também para casos em que existem resistências às outras opções terapêuticas [Cunha, 2012]. Este fármaco impede a síntese da parede celular, provocando a morte celular [Goodman, 2010].

Antituberculosos

Ao contrário das outras infecções bacterianas, a tuberculose tem uma evolução que decorre ao longo de mais tempo, e como tal o tratamento nunca deve ser inferior a 6 meses, e nunca é feito apenas com um antibiótico, mas com três classes diferentes de antibióticos. Neste caso os antibióticos de primeira linha são a estreptomicina (aminoglicosídeo), o etambutol (bacteriostático, de mecanismo não totalmente descoberto), a isoniazida (inibição da síntese do RNA bacteriano), a pirazinamida (inibição da síntese do RNA bacteriano) e a rifampicina (inibição da RNA polimerase) [Goodman, 2012]. No entanto já existem estirpes resistentes a esta antibioterapia, sendo necessário recorrer a outros fármacos de segunda linha, criando a necessidade da procura de novos fármacos [Abramowicz, 2012].

Antifúngicos

Este tipo de fármacos, ao contrário dos antibióticos, são pouco selectivos, uma vez que as células humanas e fúngicas são bastante parecidas [Abramowicz, 2012]. Como tal, é necessário que o fármaco seja o mais específico possível da célula fúngica senão ao eliminar o fungo / inibir a replicação da célula fúngica, também irá fazer o mesmo às células humanas [Goodman, 2010].

Nas infecções fúngicas sistémicas o fármaco de eleição é a Anfotericina B (Fig. 1), pois revela um espectro de acção alargada e uma eficácia elevada. É normalmente utilizada em infecções causadas por candidas, *cryptococcus* e *aspergillus*. Foi isolada em 1955, a partir de *Streptomyces nodosus*. Fixa-se à membrana celular fúngica, permitindo a saída de iões sódio, potássio e hidrogénio, o que provoca a morte celular [Cunha, 2012]. Tem, no entanto, como já foi referido, uma

elevada toxicidade, sendo por isso importante a pesquisa de novos antifúngicos, menos agressivos para o ser humano [Infarmed, 2014].

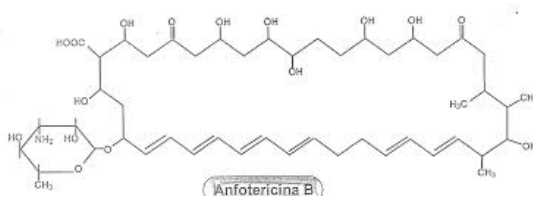


Fig. 1 – Estrutura química da Anfotericina B

Antivirais

No caso das infecções por vírus, de um modo geral, se o indivíduo não possuir o sistema imunitário comprometido, este acabará por autolimitar a infecção, sem necessidade adicional de fármacos, uma vez que a imunidade inata do ser humano é capaz de eliminar os vírus. Existem, no entanto, exceções, como no caso de um indivíduo ser imunodeprimido ou em casos de vírus que apresentam uma elevada mortalidade ou graves implicações a nível da morbilidade [Oswald, 2004].

Na tabela 3 apresentam-se as estruturas químicas dos antivirais mais comuns para cada tipo de patologia viral [Abramowicz, 2014].

Esta classe de antimicrobianos tem uma disponibilidade muito reduzida, e o exemplo mais eficaz é o aciclovir, utilizado no tratamento de infecções herpéticas, permitindo diminuir a incidência da encefalite herética [Infarmed, 2014]. Este antivírico é apenas eficaz em relação a este vírus específico.

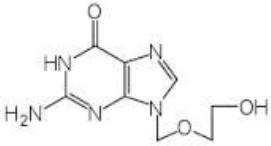
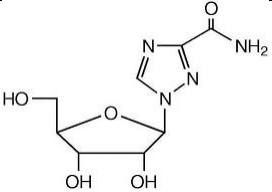
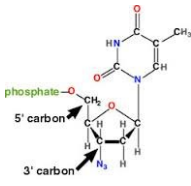
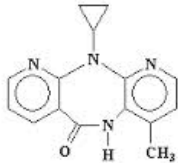
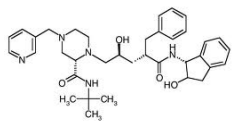
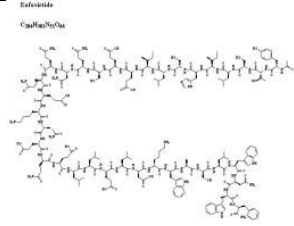
No caso das infecções virais crónicas, como a hepatite B e C utiliza-se o interferão alfa associado a outros antivirais [Abramowicz, 2012].

No caso da infecção causada pelo HIV existe um maior número de retrovirais, classificados de acordo com o seu mecanismo de acção, podendo ser [Oswald, 2004]:

- Inibidores nucleósidos da transcriptase reversa – ex. AZT
- Inibidores não nucleósidos da transcriptase reversa – ex. nevirapina
- Inibidores da protease – ex. indinavir
- Inibidores da fusão – ex. enfuvirtida.

Este tipo de terapia é sempre de associação, para evitar resistências, assim como mecanismos de toxicidade.

Tabela 3: Estruturas químicas de antivirais [Abramowicz, 2014].

Patologia	Antiviral
Herpes	 Aciclovir
Hepatite B e C	 Interferão α
HIV	 Zidovudine (AZT)
	Nevirapine $C_{18}H_{14}N_4O$ 
	 Indinavir
	 Raltegravir

Antiparasitários

Anti-helmínticos

A infecção por parasitas helmínticos, tênias e lombrigas são os mais comuns, muito usual em países subdesenvolvidos, têm origem em condições higiénicas mais precárias. É comum a exposição e posterior infecção por mais que um agente [Abramowicz, 2012].

Como exemplos de fármacos anti-helmínticos temos o albendazol (Figura 2) e o mebendazol [Goodman, 2010]. Pertencendo à classe do benzimidazóis, impedem o normal funcionamento dos microtúbulos das células dos parasitas, provocando a sua morte e posterior digestão e excreção [Goodman, 2012].

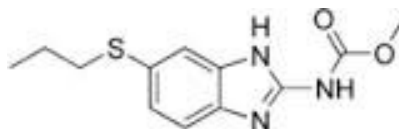


Fig. 2 - Estrutura química do Albendazol [RxList, 2014].

Anti-maláricos

O *Plasmodium falciparum* é o parasita responsável pelo paludismo, a doença infecciosa com maior número de mortes [Infarmed, 2014]. O fármaco de eleição é a cloroquina (Figura 3), que pode ser utilizado em associação com doxiciclina.



Fig. 3 – Estrutura química da cloroquina [RxList, 2014].

Novos antimicrobianos

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema de saúde pública, cada vez mais importante, uma vez que numa era pós descoberta dos antibióticos é possível perecer-se de uma simples infecção. [WHO, 2014].

A consequência de infecções resultantes das resistências aos antimicrobianos são internamentos mais longos, aumentos dos custos de saúde e opções de tratamento secundárias ou terciárias, que podem ser menos eficazes e mais tóxicas. [Payne, 2007].

É então importante a descoberta de novos fármacos, para conseguir promover uma melhor saúde pública.

Novas técnicas cromatográficas na pesquisa de novos antimicrobianos

Os antimicrobianos sintéticos podem apresentar vários efeitos indesejados, podendo por em causa a continuação da terapêutica, como é o caso dos distúrbios gástricos no caso dos β -lactâmicos, ou a nefrotoxicidade da vancomicina [Strobel, 2003]. É então essencial a descoberta de novos agentes antimicrobianos mais seguros, mais ecológicos e mais facilmente obtidos [Liu et al., 2001], designados por novas entidades químicas [NCEs].

No entanto, a partir dos anos 90, poucas novas moléculas foram aprovadas para a terapia de infecções bacterianas, o número foi bem inferior quando comparado com os números da década de 80 [Spellberg, 2004].

De todas as novas moléculas aprovadas como fármacos antimicrobianos humanos, cerca de 66 %, são produtos naturais ou derivadas de produtos naturais [Brown, 2013].

Contudo a investigação em fármacos tendo por base produtos naturais tem vindo a diminuir desde o início do século. [Brown, 2013]. Um dos argumentos mais utilizados para a diminuição da investigação em produtos naturais é que os recursos monetários para a identificação e posterior isolamento dos compostos antimicrobianos são muito elevados [Brown, 2013].

Apesar da pressão para reduzir os custos na investigação de novos fármacos de origem natural, a separação e a purificação de produtos naturais são consideradas a base do processo de desenvolvimento dos biofármacos. A cromatografia líquida é o passo fundamental na maior parte dos processos de purificação de amostras naturais [Hanke, 2014], e a cromatografia em coluna continua a ser a técnica dominante na purificação deste tipo de amostras [Przybycien, 2004; Gottschalk, 2012]. Esta predominância é devida, principalmente, ao facto de ser possível uma alta eficiência na separação de componentes similares numa mistura complexa. Avanços químicos no material de empacotamento contribuíram para diminuir as preocupações a nível da eficiência e resolução [Cramer, 2011]. É necessário, no entanto, quando se tem uma mistura complexa, descobrir quais as melhores condições/parâmetros para isolar o(s) composto(s) desejados, assim como qual a melhor técnica associada ao método cromatográfico, para melhor determinar as propriedades do composto isolado.

Apresentam-se de seguida, alguns exemplos de como a cromatografia líquida pode ser fundamental na investigação de novos fármacos antimicrobianos de origem natural.

Cromatografia líquida-espectrometria de massa

Os métodos de cromatografia líquida incluem a cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa (RP-HPLC), combinada com detectores de absorvância no UV [Page-Sharp, 2003], fluorescência [Paulke, 2006] e detectores electroquímicos [Kotani, 2006].

Desde a introdução das técnicas de ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química, a pressão atmosférica (APCI), a junção da cromatografia líquida com a espectrometria de massa (LC-MS) foi utilizada para a análise de produtos naturais, devido à elevada especificidade, velocidade e sensibilidade [Maurer, 2005; Qian, 2005; Ilett, 2002].

As diferentes interfaces LC-MS para analisar produtos naturais, mencionadas anteriormente, têm em comum uma característica, todos pretendem originar uma ionização ligeira, com poucos iões formados [Xing, 2006]. Mostram uma ionização mais estável e sensibilidade mais elevada [Pico, 2004].

Um outro modo de ionização suave é o bombardeamento rápido de átomos (FAB). Esta técnica, no entanto, origina picos resultantes da matriz, que podem dificultar a análise dos espectros [Ma, 2000].

Espectrometria de massa com ionização por *electrospray*

A ionização por *electrospray* é um processo que executa uma ionização suave (poucos iões formados) em MS. É muito utilizada para a identificação de um grande número de pequenas e de macromolécula, em vários sistemas de identificação molecular [Schug, 2007].

A capacidade para a identificação e análise quantitativa de misturas complexas é aumentada se ao sistema ESI-MS se acoplar um aparelho de HPLC [Schug, 2010].

O uso da técnica ESI-MS como meio versátil de detecção, quer directa, quer indirectamente, deu origem ao termo selecção por afinidade-espectrometria de massa (AS-MS) [Annis, 2007].

O método AS-MS directo refere-se à técnica, na qual uma mistura iónica, não covalente, é transferida intacta para o espectrómetro de massa, para análise e manipulação directa. Exemplo desta técnica é GC-MS [Schug, 2007].

No método indirecto, inicialmente, através de extracções selectivas, separa-se a molécula de interesse, que é depois analisada por espectrometria de massa. Um exemplo é a técnica hifenizada HPLC-MS [Hofstadler, 2006].

Enquanto os métodos indirectos são melhores para análises posteriores em linhas de células, os métodos directos são mais específicos nas interacções observadas e permitem outras análises por métodos separativos e de espectrometria de massa. Com as suas vantagens, ambos os métodos são muito importantes na descoberta de novos fármacos, quer na indústria, quer a nível académico [Hofstadler, 2006].

Apresentam-se de seguida alguns exemplos desta técnica na pesquisa de novos antimicrobianos.

Antibióticos

Um dos campos em que as técnicas HPLC-MS mais foram utilizadas foi na descoberta de NCEs, principalmente nas bactérias gram-positivas resistentes à vancomicina, como o *Enterococci*, e resistentes à meticilina, como o *Staphylococcus aureus* [Schug, 2012].

Através de métodos directos, foi possível analisar o extracto bruto de um coral das caraíbas, *Pseudoplexaura porosa* (Figura 4), para pesquisa de compostos antibacterianos para agentes patogénicos marinhos e humanos [Schug, 2012]. Os resultados mostraram a presença de vários compostos desconhecidos que inibiam o crescimento de várias estirpes de bactérias, incluindo algumas resistentes a fármacos [Schug, 2012].



Fig. 4 - *Pseudoplexaura porosa* [Coralpedia, 2014]

Os compostos foram isolados recorrendo à separação por HPLC. De seguida, recorrendo a ESI-MS foram identificados algumas moléculas novas. No entanto, devido às quantidades muito pequenas de amostra não foi possível a elucidação da estrutura química desses compostos. Ficou no entanto demonstrado que esta técnica (HPLC-ESI-MS) é importante na investigação de novos fármacos antimicrobianos, uma vez que permite ultrapassar técnicas mais demoradas de isolamento, que além de consumirem muito tempo também são dispendiosas, tornando a investigação mais onerosa. [Schug, 2012].

Antifúngicos

Nas últimas três décadas os fungos resistentes a fármacos, principalmente estirpes de *Candida*, causaram graves problemas de saúde pública, nomeadamente a mulheres, em todo o mundo [Ouédraogo, 2012].

Azois e anfotericina B são os antifúngicos mais utilizados, há muito tempo. No entanto, a resistência a estes fármacos é um problema de saúde a nível global, o que levou a um acréscimo na investigação de novos fármacos nestes campos [Gorantia, 2014].

As pseudomonas fluorescentes são consideradas um dos grupos mais promissores no controle do crescimento florestal, uma vez que promovem o desenvolvimento das rizobactérias, envolvidas no biocontrolo das doenças florestais [Gardner, 1984].

Dentro desta classe as *Pseudomonas fluorescens* (Figura 5), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas pyrocinia* já demonstraram actividade antifúngica com diferentes graus de antagonismo [Weger, 1986]. Mais recentemente, estas plantas receberam maior atenção, uma vez que se começaram a produzir antifúngicos [Minaxi, 2010] e antibióticos [Huang, 2009] a partir de metabolitos produzidos por estas plantas.

Um dos tipos de metabolitos produzidos por este tipo de plantas são as fenazinas. São moléculas tricíclicas, coloridas, com átomos de azoto. Possuem propriedades antitumorais, antibióticas e antiparasitárias [Laursen, 2004].

Foram isoladas utilizando cromatografia líquida, a diferentes gradientes de eluentes, e identificadas recorrendo a espectrometria de massa [Gorantia, 2014].

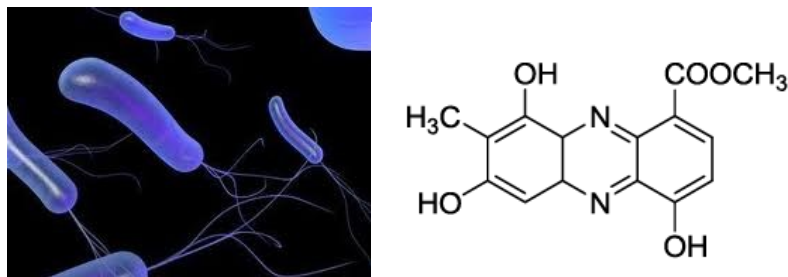


Fig. 5 - *Pseudomonas fluorescens* e fenazinas [Ferreira, 2010]

Demonstraram actividade antifúngica contra a espécie *T. rubrum*, contra a qual existem poucos fármacos que consigam combater a patologia em humanos. Os fármacos que existem e que são activos contra este fungo têm elevados custos económicos e graves efeitos secundários para os pacientes. Este metabolito, fenazina, identificado por LC-MS poderá ser uma importante alternativa no tratamento deste tipo de infecções [Gorantia, 2014].

NMR/LC-MS

Como já foi referido anteriormente, a necessidade de analisar compostos individuais de uma amostra complexa levou ao surgimento de várias técnicas hifenizadas, entre as quais a cromatografia líquida-espectrometria de massa acoplada a ressonância magnética nuclear (NMR), LC-MS-NRM [Ouattara, 2004]. Esta técnica facilita a identificação de compostos novos em amostras brutas. De entre as várias técnicas hifenizadas esta última é uma das mais importantes, uma vez que fornece dados de MS e de NMR em tempo real [Dai, 2008]. Recentemente vários melhoramentos têm sido feitos a esta técnica, através de alterações no campo magnético e introdução de sondas de NMR criogenadas, e no campo de LC tem-se melhorado a extracção em fase sólida [Lambert, 2007]. A combinação de LC capilar juntamente com a utilização de ressonância magnética nuclear recorrendo a microbobinas, às quais corresponde um aumento de sensibilidade, permitiu a análise de quantidades muito pequenas de amostras [Jaroszewski, 2005; Hopson, 2008].

No entanto, esta técnica necessita sempre de uma separação inicial dos componentes da amostra a analisar.

TLC-ESI-MS

As secreções defensivas de anfíbios exóticos contêm diversos compostos activos biologicamente, incluindo aminas biogénicas, péptidos, proteínas, entre outros [Daly, 1997].

Xenopus laevis é um sapo que contém péptidos antimicrobianos que inibem o crescimento microbiano na pele deste anfíbio, assim como tem características anti-inflamatórias [Smyth, 2006].

Após a estimulação das secreções na pele do animal, segue-se a recolha e análise, recorrendo a uma associação de cromatografia em camada fina (TLC) com técnicas hifenizadas, TLC-ESI-MS [Chen, 2002].

Foi também possível determinar a presença de novos péptidos, que se encontravam em quantidades vestigial, com actividade antimicrobiana comprovada em animais [Chen, 2002].

HPLC enantiomérico

A caracterização estereoquímica de compostos quirais é muito importante na definição da bioactividade de fármacos e produtos naturais, uma vez que diferentes acções podem ser exercidas pelos diferentes estereoisómeros de substâncias quirais presentes numa amostra [Ariëns, 1983; Crossley, 1995; Mori, 2011].

É, portanto, natural que as técnicas analíticas que permitem a caracterização completa da estereoquímica de uma amostra tenham recebido uma atenção especial, uma vez que as agências de controlo de qualidade dos fármacos exigem um conhecimento total da quiralidade de um composto, visto que esta característica vai afectar tanto a eficácia como a segurança de um fármaco [Hutt, 1991; Shindo, 1995]. Além de que o conhecimento da quiralidade de uma molécula permite perceber o modo de ligação ao receptor, e portanto permite o desenvolvimento de novos fármacos mais potentes e a optimização do perfil farmacocinético [Hutt, 2007; Brooks, 2011].

Muitas técnicas permitem a caracterização enantiomérica de compostos quirais, entre as quais se destacam GC, LC e electroforese capilar (CE), com selectores quirais adicionados à fase estacionária ou dissolvidos na fase móvel [Wainer, 1993].

O HPLC enantioselectivo provocou um grande impacto a nível da investigação, devido à elevada quantidade de fases estacionárias quirais disponíveis no mercado, que provaram a sua mais-valia na determinação da composição enantiomérica de um elevado número de amostras [Bertucci, 2012].

Houve um avanço significativo quando se acoplou ao HPLC sistemas de detecção baseados em propriedades óptico-quirais, nomeadamente rotação óptica (OR) e dicroísmo circular electrónico (ECD), espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário, rotineiramente utilizado no estudo da estrutura secundária de proteínas. [Bringmann, 2008; Bringmann, 2012].

A vantagem mais importante ao usar um detector óptico-quiral baseia-se no facto de a configuração absoluta (AC) de uma amostra desconhecida poder ser determinada a partir do valor e sinal de uma propriedade quiral de interesse, num único comprimento de onda, desde que anteriormente já se tenha estabelecido uma relação entre essa propriedade quiral e a estrutura química da molécula. [Salvadori, 1994]. É fácil de verificar, portanto, que assim que as misturas enantioméricas sejam separadas por uma coluna de HPLC enantiomeraselectiva, o detector ECD permite determinar CA isolada. [Bertucci, 2012].

Um factor importante a ter em conta neste tipo de análise é o valor do comprimento de onda escolhido, uma vez que a relação entre a AC e o sinal do ECD vai depender do tipo de transição electrónica monitorizada [Bertucci, 2012].

Entre os sistemas de detecção óptico-quiral, o ECD permite uma maior selectividade, uma vez que apenas detecta transições no comprimento de onda escolhido, ao contrário de outros sistemas, que detectam transições em todo o espectro. Esta característica permite a escolha de um comprimento de onda em que outras moléculas sejam “transparentes” [Salvadori, 1994].

Um exemplo da aplicação desta técnica foi o isolamento de fitoalexinas (Figura 6), isoladas do rabanete japonês *Raphanus sativus* [Monde, 2000; Suchý, 2001]. Estas moléculas são muito importantes uma vez que têm um papel relevante no mecanismo de defesa natural do ser humano contra microrganismos. Embora estudos iniciais indicassem apenas a presença de um enantiómero após a separação do extracto inicial por HPLC com uma coluna enantiomérica e detecção com ECD revelou-se a existência de dois enantiómeros. [Kosugi, 1997]

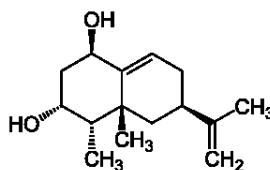


Fig. 6 – Estrutura química de uma fitoalexina – capsidiol [PubChem, 2014]

Outro exemplo interessante da importância do HPLC-ECD foi a análise estereoquímica do dioncofelino E, um alcalóide naftilisoquinolínico, isolado da liana *Dioncophyllum thollonnii*, originária da África Ocidental, que possui actividade antimalárica [Bringmann, 2002]. Este composto surge como uma mistura de dois estereoisómeros, cuja CA foi determinada por esta técnica.

Um estudo recente demonstra claramente a relação entre a estereoquímica e a actividade biológica. O ácido gaudichaudianico (Figura 7), um potente anti *Trypanosoma cruzi*, isolado da espécie *Piper gaudichaudianum*, surge como uma mistura racémica. As fracções enantioméricas foram isoladas e purificadas recorrendo a HPLC-ECD, tendo-se determinado a AC. O enantiómero (S) demonstrou uma eficiência muito superior ao (R). A mistura racémica dos dois enantiómeros, em diferentes proporções, demonstrou um efeito sinérgico, superior aos compostos isolados [Batista, 2011].

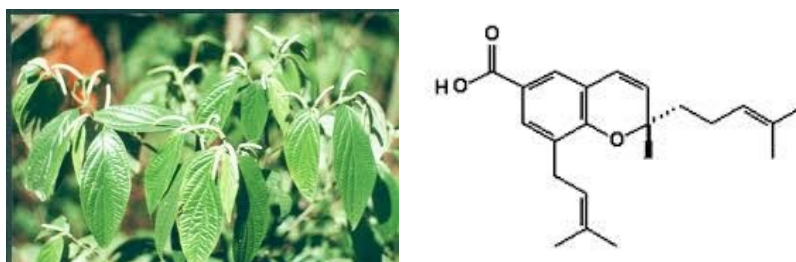


Fig. 7 - *Piper gaudichaudianum* e ácido gaudichaudianico [PubChem, 2014]

Como se pode verificar, esta técnica é bastante promissora no campo do isolamento de antimicrobianos de origem natural.

HPLC de fase reversa

Cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) é geralmente utilizada para a separação de compostos, devido à sua facilidade de separação. Embora a especificidade do espectrómetro de massa torne a separação por HPLC desnecessária, se o analito for eluído muito rapidamente, pode ocorrer co-eluição ou haver interferência de picos da matriz. Havendo uma separação prévia adiciona-se mais um elemento que irá aumentar a selectividade do método de ionização [Grace, 2003].

Na técnica RHPLC, a maioria das fases estacionárias são de sílica, quimicamente modificada com octadecil ou octil. Usando uma coluna de HPLC mais pequena é possível diminuir o tempo de retenção da técnica [Apollonio, 2006].

A selecção da fase móvel é um factor crítico para uma boa separação e uma boa ionização [Nirogi, 2006]. Tensão superficial baixa e uma constante dieléctrica também baixa do solvente promovem a evaporação do ião, favorecendo o processo de ionização. Usando uma concentração baixa de ácido fórmico ou acetato de amónia, a fase móvel é mantida com um pH baixo, diminuindo o aparecimento de picos com arraste [Chen, 2002; Xing, 2007].

Os endófitos, fungos e bactérias que protegem as plantas, são uma importante fonte de metabolitos com actividades anticancerígenas, antidiabéticas, antivirais e antimicrobianas [Stierle, 1993]. Os compostos antimicrobianos produzidos pelos endófitos poderão vir a ser utilizados na protecção contra agentes patogénicos [Yang, 1997]. Os metabolitos produzidos por esta espécie têm também o benefício de ser pouco tóxicos para organismos superiores, uma vez que a própria planta faz uma selecção dos metabolitos menos tóxicos, deixando desenvolverem-se apenas os endófitos que produzem metabolitos pouco tóxicos para si [Strobel, 2003]. Existem cerca de 300.000 espécies de plantas na Terra, e cada espécie tem um ou dois tipos de endófitos característicos [Aly, 2011]. Existe, portanto, um enorme potencial, para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos, mais activos e menos tóxicos, provenientes dos endófitos.

A espécie *Taraxacum mongolicum* está descrita na Farmacopeia Chinesa para o tratamento de processos inflamatórios e infecções virais [Zhang, 2012]. Como tal, foi escolhida para o estudo dos endófitos bioactivos que a caracterizam, isolando-se *Phoma* sp. (Figura 8), que possui actividade antibiótica muito promissora. [Zhang, 2012]. De modo a conseguir isolar e caracterizar devidamente o(s) metabolito(s) activo(s), o extracto obtido do endófito foi purificado recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando clorofórmio:metanol como eluente, variando-se o gradiente de concentração, originaram 53 fracções que foram posteriormente analisadas [Zhang, 2012].



Fig. 8 – *Taraxacum mongolicum* e *Phoma* spp [DrFungus, 2014].

As amostras obtidas foram analisadas recorrendo-se a RHPLC, à temperatura ambiente, utilizando-se como fase móvel uma mistura metanol:água. O detector de UV foi colocado para os 280 nm [Zhang, 2012]. As fracções que demonstraram actividade antimicrobiana foram repurificadas recorrendo-se ao mesmo sistema mencionado anteriormente, RHPLC, nas mesmas condições. Durante a repurificação, foi detectado um pico, 5,01 min, que foi posteriormente analisado por GC-MS, levando depois ao isolamento e identificação do composto ácido 2-hidroxi-6-metilbenzoico (Figura 9) [Zhang, 2012].

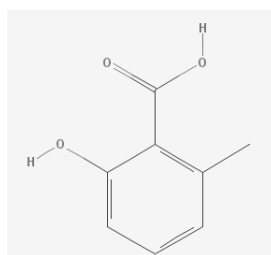


Fig. 9 - Ácido 2-hidroxi-6-metilbenzoico [PubChem, 2014]

Este ácido tinha sido isolado anteriormente de outros fungos de origem chinesa e provou-se que tinha uma forte actividade antibacteriana [Shao, 2007; Yang, 1994]. Neste estudo provou-se que recorrendo à técnica cromatográfica aplicada, foi possível isolar o composto mencionado anteriormente, que possui actividade contra *E. coli*, *S. aureus*, *A. hydrophila*, *E. tarda* e *P. multocida*. Também foram realizados testes de toxicidade, que não revelaram indícios de toxicidade aguda.[Zhang, 2012].

Como tal, os resultados acima descritos indiciam que a espécie *Phoma sp* poderá vir a ser utilizada na obtenção de novos fármacos antibacterianos.

Existem, também, exemplos em que várias técnicas cromatográficas são muito úteis no isolamento e identificação de compostos antimicrobianos importantes, como é o caso de proteínas terapêuticas descrito a seguir.

Proteínas terapêuticas

De entre as classes de biofármacos, as proteínas terapêuticas, que incluem os anticorpos monoclonais, são das mais importantes [Osborne, 2013]. Como tal, é natural que tenham surgido avanços nas técnicas cromatográficas, nomeadamente no que respeita à fase estacionária, para determinar as suas propriedades.

Propriedades moleculares das proteínas

A forma e a heterogeneidade das características superficiais de uma proteína podem levar a uma distribuição não aleatória na ligação à fase estacionária, durante o processo de adsorção, numa cromatografia [Dismer, 2007], originando problemas no seu isolamento. No entanto, foi demonstrado anteriormente que simples propriedades moleculares macroscópicas podem ser suficientes para prever a eficiência do processo de separação numa amostra complexa, contendo proteínas [Asenjo, 2009]. As propriedades a ter em conta irão depender do princípio de separação que se vai aplicar.

Qualquer tipo de cromatografia, seja de permuta iónica, partição, ou outra classificação, tem por base, para uma simplificação dos parâmetros a adoptar, um critério de uniformidade e homogeneidade. No entanto as proteínas, principalmente à medida que o tamanho molecular aumenta, tendem a desviar-se dessa uniformidade [Asenjo, 2004]. É necessário, portanto ter em contas as já referidas propriedades macroscópicas, que podem ser obtidas recorrendo a novas técnicas cromatográficas, como é o caso da LC-MS-2D, em que numa primeira dimensão se utiliza a cromatografia de troca catiónica e de fase reversa, numa segunda dimensão. Neste caso, não é necessário conhecer previamente a estrutura ou sequência das referidas proteínas [Ahamed, 2006].

Na tabela seguinte (Tabela 4) apresentam-se algumas propriedades macroscópicas, essenciais para o desenvolvimento de um bom método de separação, assim como a técnica cromatográfica aplicada para a determinação destas propriedades.

Tabela 4: Métodos cromatográficos utilizados com base nas propriedades de proteínas [Hanke, 2014]

Propriedade	Método para determinação
Volume específico parcial	Cromatografia de exclusão de tamanho
Hidrofobicidade	Cromatografia de fase reversa
Segundo coeficiente virial	Cromatografia de interacção própria em coluna Cromatografia de interacção própria em microcanaís

Após o conhecimento das características macroscópicas das proteínas, utilizando os anteriormente referidos métodos cromatográficos, é então possível

começar a estabelecer os parâmetros ideais para o seu isolamento recorrendo novamente a técnicas cromatográficas.

Como se evidenciou ao longo deste capítulo são muitas as técnicas cromatográficas desenvolvidas, ao longo dos últimos anos, que permitiram o isolamento e identificação de novas moléculas com actividade antimicrobiana.

De seguida irão ser apresentadas as conclusões relativas à importância do desenvolvimento e aperfeiçoamento destas técnicas.

Conclusão

A resistência aos fármacos antimicrobianos é um problema de saúde pública a nível mundial, que terá que ser combatido através de uma melhor prescrição a nível clínico, mas também através da utilização correcta de novos fármacos.

Embora a utilização de amostras de origem natural seja algo comum a nível de investigação, o facto de as matrizes serem muito complexas torna o processo de isolamento e de identificação dos compostos farmacologicamente activos algo demorado e oneroso. Como tal as companhias farmacêuticas têm sido um pouco reticentes numa utilização mais concreta neste tipo de matéria prima.

Para tentar minorar o tempo e recursos, energéticos e financeiros, utilizados neste tipo de pesquisa, surgiram e aperfeiçoaram-se novas técnicas de cromatografia, a técnica por excelência utilizada no isolamento e identificação de compostos em misturas complexas.

O uso de técnicas de cromatografia simples consome muito tempo e pode não ser sensível ou específica. Para contornar este facto surgiram novas técnicas, hifenizadas, em que se juntam técnicas espectrométricas, espectroscópicas, que permitem a identificação mais rápida das moléculas farmacologicamente activas.

A nível da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, possíveis novos desenvolvimentos, através da utilização da micro/nano LC acoplados a instrumentos de MS, poderão facilitar a identificação de amostras mais reduzidas.

Também a utilização da cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) poderá ser ligada a espectrómetros de massa, tornando-se uma alternativa à técnica HPLC-MS. Esta nova técnica permitirá um melhoramento a nível da sensibilidade e resolução.

O futuro da análise cromatográfica de amostras biológicas são as técnicas hifenizadas, podendo tornar possível a análise de vários analitos em simultâneo, o que irá diminuir os custos, tanto a nível de tempo como custos financeiros, tornado mais viável o aparecimento de novos fármacos.

Bibliografia

Abramowicz, M.; *The Medical Letter – Handbook of antimicrobial Therapy* – 16th Ed., 2004.

Ahamed, T.; Ottens, M.; Nfor, B.; Dedem, G.; Wielen, L.; *A generalized approach to the thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design*, Fl. Pha. Equilib., 241, 268-282, 2006.

Aly, A.H.; Debbab, A.; Proksch, P.; *Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises*, Appl. Micro. Biotech., 90:1829-45, 2011.

Annis, D. A.; Nickbarg, E.; Yang, X.; Ziebell, M.; Whitehurst, C.; *Affinity selection-mass spectrometry screening techniques for small molecule drug discovery*, Curr. Opin. Chem. Biol., 11, 518-526, 2007.

Apollonio, L. G.; Pianca, D.; Whittball, I.; Maher, A.; Kyd, J.; *A demonstration of the use of ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry [UPLC/MS] in the determination of amphetamine-type substances and ketamine for forensic and toxicological analysis*, J. Chromatogr. B, 836, 111-115, 2006.

Ariëns, E; *Stereochemistry and biological activity of drugs*, Blackwell, London, 1983.

Asenjo, J.; Andrews, B.; *Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics*, J. Mol. Recognit., 17, 236-247, 2004.

Asenjo, J.; Andrews, B.; *Protein purification using chromatography: selection of type, modeling and optimization of operating conditions*, J. Mol. Recognit., 22, 65-76, 2009.

Batista, J. M.; Batista, A.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Ambrósio, D.; Cicarelli, R.; Bolzani, V.; Kato, M.; Nafie, L.; Lopez, S.; Furlan, M.; *Absolute Configuration and Selective Trypanocidal Activity of Gaudichaudianic Acid Enantiomers*, J. Nat Prod., 74, 1154-1160, 2011.

Bertucci, C.; Tedesco, D.; *Advantages of electronic dichroism detection for the stereochemical analysis and characterization of drugs and natural products by liquid chromatography*, J. Chromat. A, 1269, 69-81, 2012.

Bringmann, G.; Messer, K.; Wolf, K.; Mühlbacher, J.; Grüne, M.; Brun, R.; Louis, M.; *Dioncophylline E from Dioncophyllum thollonii, the first 7,3'-coupled dioncophyllaceous naphthylisoquinoline alkaloid*; Phytoch., 60, 389-397, 2002.

Bringmann, G.; Gulder, A.; Reichert, M.; Gulder, T.; *The online assignment of the absolute configuration of natural products: HPLC-CD in combination with quantum chemical CD calculations*, Chir., 20, 628-642, 2008.

Bringmann, G.; in: Comprehensive chiroptical spectroscopy, vol. 2, Wiley & Sons, Hoboken, p. 335, 2012.

Brody, *Human Pharmacology: Molecular to clinical*; Mosby Ed, 1994.

Brooks, W. H.; Guida, W. C.; Daniel, K. G.; *The significance of chirality in drug design and development*, Curr. Top. Med. Chem, 11, 760-770, 2011.

Brown, D. G.; Lister, T.; May-Dracka, L.; *New natural products as new leads for antibacterial drug discovery*, Bio. & Med. Chem. Lett., 24, 413-418, 2014.

Chen, T.; Orr, F.; Bjourson, J.; McClean, S.; O'Rourke, M.; Hirst, G., Rao, P.; Shaw, C.; *Bradykinins and their precursor cDNAs from the skin of the fire-bellied toad (Bombina orientalis)*. Pepti., 23, 1547-1555, 2002.

Coralpedia (2014), Disponível em http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/en/octocorals/pseudoplexaura_porosa

Cramer, S.; Holstein, M.; *Downstream bioprocessing: recent advances and future promise*, Curr. Opin. Chem. Eng., 1, 27-37, 2011.

Crossley, R.; *Chirality and the Biological Activity of Drugs*, CRC Press, Boca Raton, 1995.

Cunha, B. A.; *Antibiotic Essentials* – written by Leading World Experts – 11^a Ed.; Jones and Bartlett Learning; 2012.

Dai, D.; He, J.; Sun, R.; Zhang, R.; Aisa, A.; Abliz, Z.; *Nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry combined with an incompleted separation strategy for identifying the natural products in crude extract*, Ana. Chimi. Acta, 632, 221-228, 2009.

Daly, J. W.; Garraffo, H. M.; Myers, C. W.; *The Origin of Frog Skin Alkaloids: An Enigma?*, Pharma. News, 4(4): 9-14, 1997.

Dismer, F.; Hubbuch, J.; *A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins*, J. Chromatogr. A, 1149, 312-320, 2007.

DrFungus, 2014. Doctor Fungus, <http://www.doctorfungus.org/index.php>, Acedido a 30 de Outubro de 2014.

Gorantia, J.N.; Kumar, N.; Nisha, V.; Sumandu, S.; Dileep, C.; Sudaresan, A.; Kumar, M.; Lankalapalli, S.; Kumar, S.; *Purification and characterization of antifungal phenazines from a fluorescent Pseudomonas strain FPO4 against medically important fungi*, J. Myco. Medic., 465-472, 2014.

Hanke, A.; Ottens, M.; *Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development*, Trends in Biotechnol., 32, 210-220, 2014.

Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A.; *Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes*, Nat. Rev., 5, 585-595, 2006.

Labvirtual (2014), Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos, disponível em: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=451&id=103&option=com_content&task=view, Acedido a 26 de Fevereiro de 2014.

Ferreira, S.; Gonzaga, D.; Santos, W.; Araújo, K.; Ferreira, V.; *β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais*; Rev. Virtual Quim., 2 (2), 140-160, 2010.

Infarmed (2014), disponível em: <http://www.infarmed.pt/formulario/navegacao.php?paiid=1>, acedido a 19 de Março de 2014.

Gardner, J.M.; Chandler, L.; Feldman, A.W.; *Growth promotion and inhibition by antibiotics producing fluorescent Pseudomonas on citrus root*, Plant. Soli., 77, 103-113, 1984.

Goodman e Gilman; *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, 2010.

Gottschalk, U.; Brorson, K.; Shukla, A.; *The need for innovation in biomanufacturing*, Nat. Biotechnol, 30, 489-492, 2012.

Grace, P. B.; Taylor, I.; Botting, P.; Fryatt, T.; Oldfield, F.; Al-Maharik, N.; Bingham, A.; *Quantification of isoflavones and lignans in serum using isotope dilution*

liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Rap. Commun. Mass Spectrom. 17, 1350-1357, 2003.

Hopson, RE.; Peti, W.; *Microcoil NMR spectroscopy: a novel tool for biological high throughput NMR spectroscopy*, Methods Mol Biol; 426:447 – 58, 2008.

Huang, J.; Xu, Y.; Zhang, H., Li Y.; Huang, X.; Ren, B.; Zhang, X.; *Temperature-dependent expression of phzM and its regulatory genes lasI and otsP in rhizosphere isolate Pseudomonas sp. Strain M185*, Appl. Environ Microbiol., 75, 6568-80, 2009.

Hutt, A. J.; *Drug chirality: impact on pharmaceutical regulation*, Chirality, 3, 161-164, 1991.

Hutt, A. J.; *Chirality and pharmacokinetics: an area of neglected dimensionality?*, Drug Metab. Drug Interact., 22, 79-112, 2007.

Ilett, K. F.; Ethell, T.; Maggs, L.; Davis, M.; Batty, T.; Burchell, B.; Binh, Q.; Thu, A.; Hung, C.; Pirmohamed, M.; Park, K.; Edwards, G.; *Glucuronidation of dihydroartemisinin in vivo and by human liver microsomes and expressed UDP-glucuronosyltransferases*. Drug metab. Dispos., 30, 1005-1012, 2002.

Jaroszewski, J.W.; *Hyphenated NMR methods in natural products research, Part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation*, Planta Med., 71,795-802, 2005.

Kotani, A.; Kojima, S.; Hakamata, H.; Kusu, F.; *HPLC with Electrochemical Detection to Examine the Pharmacokinetics of Baicalin and Baicalein in Rats after Oral Administration of a Kampo Medicine*, Anal. Biochem., 350, 99-104, 2006.

Krull, I.; *Analytical chemistry*, Ed. Intech, 2012.

Kosugi, H.; Kato, M.; *A study of asymmetric protonation with chiral B-Hidroxy sulfoxides. Asymmetric synthesis of (-) – Epibatidine*; Chem Commun. (Cambridge), 1857-1858, 1997.

Lambert, M.; Wolfender, L.; Staerk, D.; Christensen, B.; Hostettmann, K.; Jaroszewski, J.W.; *Identification of natural products using HPLC-SPE combined with CapNMR*, Anal. Chem., 79, 727-735, 2007.

Laursen, J.B.; Nielsen, J.; *Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity*. Chem. Rev., 104, 1663-1685, 2004.

- Liu, H.; Zou, X.; Lu, H.; Tan, X.; *Antifungal activity of Artemisia annua endophyte cultures against phytopathogenic fungi*; J. Biotech., 88:277-82, 2001.
- Ma, Y. L.; Vedernikova, I.; Van den Heuvel, H.; Claeys, M.; *Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation*, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 11, 136-144, 2000.
- Maurer, H. H.; *Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid*, Anal. Bioanal. Chem., 381, 110-118, 2005.
- McIntyre, A.; *Cultive as suas plantas medicinais*; 1ª edição, Circulo de Leitores, 2012.
- Minaxi, S.; *Characterization of Pseudomonas aeruginosa RM-3 as a potential biocontrol agent*. Mycophatol., 170, 181-193, 2010.
- Monde, K.; Harada, N.; Takasugi, M.; Kutschy, P.; Suchy, M.; Dzurilla, M.; *Enantiomeric excess of a cruciferous phytoalexin, spiobrassinin, and its enantiomeric enrichment in an achiral HPLC system*, J. Nat. Prod., 63, 1312-1314, 2000.
- Mori, K.; *Bioactive natural products and chirality*, Chirality, 23, 449-462, 2011.
- Nirogi, R. V. S.; Kandikere, N.; Shukla, M.; Mudigond, K.; Maurya, S.; Komarneni, P.; *Simultaneous quantification of fexofenadine and pseudoephedrine in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray ionization: method development, validation and application to a clinical study*, Rapid Commun. Mass Spectrom, 20, 3030-3038, 2006.
- Osborne, R.; *Fresh from the biotech pipeline* – Nat. Biotechnol., 31, 100-103, 2013.
- Oswald, Garret e Guimarães, *Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas*, Porto Ed.; 2004.
- Ouédraogo, M.; Konaté, K.; Lepengué, N.; Souza, A.; M'Batchi, B.; Sawadogo L.; *Free radical scavenging capacity, anticandidial effect of bioactive compounds from Sida Cordifolia L., in combination with nystatin and clotrimazole and their effect on specific immune response in rats*, Ann Clin. Microbiol. Antimicrob., 11, 1-10, 2012.
- Ouattara, B.; Angenot, L.; Guissou, P.; Fondu, P.; Dubois, J.; Frederich, M.; Jansen, O.; Van Heugen, C.; Wauters, N.; Tits, M.; *LC/MS/NMR analysis of isomeric*

divanilloylquinic acids from the root bark of Fagara zanthoxylöides Lam, Phyto., 65, 1145-1151, 2004.

Page-Sharp, M.; Hale, W.; Hackett, P.; Kristensen, H.; Ilett, F.; *Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection*, J. Chromat. B, 796, 173-180, 2003.

Paulke, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; *Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection*, J. Chromat. B, 832, 109-113, 2006.

Payne, D. J.; Gwynn, N.; Holmes, J.; Pompliano, L.; *Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery*, Nat. Rev. Drug Discov., 6, 29-40, 2007.

Pico, Y.; Blasco, C.; Font, G.; *Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview*, Mass Spectrom. Rev, 23, 45-85, 2004.

Przybycien, T.; Pujar, S.; Steele, M.; *Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography*, Curr. Opin. Biotechnol., 15, 469-478, 2004.

PubChem (2014), Open Chemistry Database, disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, Acedido a 30 de Outubro de 2014

Qian, T. ; Cai, Z.; Wong, N.; Mak, K.; Jiang, H.; *In vivo rat metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg3*, J. Chromatogr. B, 816, 223-232, 2005.

RxList (2014), The Internet Drug Index, disponível em: <http://www.rxlist.com>, Acedido a 30 de Outubro de 2014.

Salvadori, P.; Rosini, C.; Bertucci, C. in: *Circular Dichroism: Principles and Applications*; 1st ed., VCH Pub, New York, p. 541, 1994.

Samuelsson, G.; *Drugs of natural origin, a text book of pharmacognosy*; 5th Ed; Swedish Pharmaceutical Press, 2004.

Schug, K. A.; *Solution phase enantioselective recognition and discrimination by electrospray ionization--mass spectrometry: state-of-the-art, methods, and an eye towards increased throughput measurements*, Comb. Chem. High Throug. Screen, 10, 301-316, 2007.

Schug, K. A.; Serrano, C. A.; Frycak, P.; *Controlled band dispersion for quantitative binding determination and analysis with electrospray ionization-mass spectrometry*, Mass Spectrom. Rev., 29, 806-829, 2010.

Schug, K.A.; Wang, E.; Shen, S.; Rao, S.; Smith, M.; Hunt, L.; Mydlarz, D.; *Direct affinity screening chromatography-mass spectrometry assay for identification of antibacterial agents from natural product sources*, Analyt. Chimi. Acta, 713, 103-110, 2012.

Shao, C.; Zhiyong, G.; Hong, P.; Guangtian, P.; Zhongjing, H.; Zhigang, S.; Yongcheng, L.; Shining, Z.; *A new isoprenyl phenyl ether compound from mangrove fungus*; Chem. Nat. Comp.; 43:377-80, 2007.

Shindo, H.; Caldwell, J.; *Development of chiral drugs in Japan: An update on regulatory and industrial opinion*; Chir., 7, 349-352, 1995.

Skoog, A.; West, D.; Holler, F.; *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7^{ed}; Saunders College Publishing 1996.

Smyth, W. F.; McClean, S.; Hack, C.; Ramachandran, V.; Doherty, B.; Joyce, C.; O'Donnell, F.; Smyth, T.; O'Kane, E.; *The characterization of synthetic and natural-product pharmaceuticals by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) and liquid chromatography (LC)-ESI-MS*, Trend. In Ana. Chem., 25 (6), 572-582, 2006.

Stierle, A.; Strobel, G. A.; *Taxol and taxane production by taromyces andreanae, an endophytic fungus of Pacific yew*; Sci., 26:210-14, 1993.

Strobel, G.; Daisy B.; *Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products*, Micro. Molec. Bio. Rev., 67 (4): 491-502, 2003.

Suchý, M.; Kutschy, P.; Monde, K.; Goto, H.; Harada, N.; Takasugi, M.; Dzurilla, M.; Balentová, E.; *Synthesis, Absolute Configuration and Enantiomeric Enrichment of a Cruciferous Oxindole Phytoalexin, (S)-(-)-Spirobrassinin, and Its Oxazoline Analog*, J. Org. Chem., 66, 3940-3947, 2001.

Wainer, I. W.; *Drug stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 2nd Ed.; Dekker, New York, 1993.

Weger, L.A.; Van Boxtel, R.; Van der Burg, B.; Gruters, A.; Geels, P.; Schippers, B.; Lugtenberg, B.; *Siderophores and outer membrane proteins of*

antagonistic, plant growth stimulating, root-colonizing Pseudomonas spp, J. Bacteriol., 585-594, 1986.

WHO (2014), Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 2014, acessado a 2 de junho de 2014.

Xing, J.; Yan, H.; Zhang, S.; Ren, G.; Gao, Y.; *A high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemisinin in rat plasma*, Rapid Commun. Mass Spectr., 20, 1463-1468, 2006.

Xing, J.; Xie, C.; Lou, H.; *Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in natural products bioanalysis*, J. Pharma. Biomed. Anal., 44, 368-378, 2007.

Yang, X.; Strobel, G.; Stielle, A.; Hess, W.; Lee, J.; Clardy, J.; *A fungal endophyte relationship: Phoma sp. In Taxus wallachiana*; Plant Scienc, 102:1-9, 1994.

Yang, Y.; Shah J.; Klessig, D.; *signal perception and transduction in plant defense responses*, Genes Dev, 11:1621-39, 1997.

Zhang, H.; Yuchun, X.; Hongyue, Z.; Yanjie, Y.; Caiyun, Z.; Cuiping, Y.; Chunping, X.; *An antimicrobial compound from the endophytic fungus Phoma sp isolated from the medicinal plant Taraxacum mongolicum*; J. Taiwan inst. Of Chem. Eng., 44, 177-181, 2013.