



Universidade Federal do Triângulo Mineiro



PPGMQ - MG

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Dissertação de Mestrado

ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS E FRUTOS DE *Lantana trifolia* L.
(Verbenaceae)

Autora: Gáveni Barbosa Valério

Orientadora: Dra Amanda Danuello Pivatto

Uberaba
2018

GÁVENI BARBOSA VALÉRIO

Estudo dos compostos fenólicos das folhas e frutos de *Lantana trifolia* L.
(Verbenaceae)

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em
Química de Minas Gerais, na Universidade
Federal do Triângulo Mineiro.

Orientadora: Prof. Dra Amanda Danuello Pivatto

Coorientador: Prof. Dr Marcos Pivatto

Uberaba
2018

**Catlogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

V256e Valério, Gáveni Barbosa
Estudo dos compostos fenólicos das folhas e frutos de *Lantana trifolia* L. (Verbenaceae) / Gáveni Barbosa Valério. -- 2018.
102 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

1. Compostos fenólicos. 2. Antioxidantes. 3. Anti-infecciosos.
I. Pivatto, Amanda Danuello. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 547.56

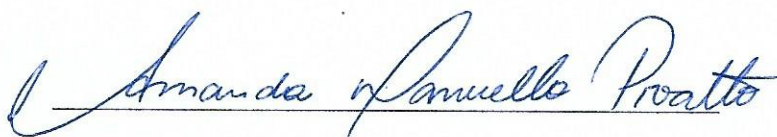
GÁVENI BARBOSA VALÉRIO

Estudo dos compostos fenólicos das folhas e frutos de *Lantana trifolia* L.”.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, área de concentração Química dos Produtos Naturais, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Uberaba, 01 de Março de 2018.

Banca examinadora:



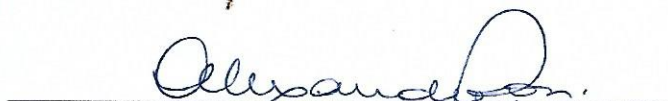
Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto

Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Profa. Dra. Aline Coqueiro

Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Prof. Dr. Alexandre Rossi

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho aos meus pais
Valdomiro e Lourdes

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e força para realizar este trabalho e principalmente pelas pessoas tão especiais que colocou ao meu lado.

Aos meus pais Valdomiro e Lourdes, meu infinito agradecimento por serem meu porto seguro, e por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Líniker e minha cunhada Andressa pelo carinho, apoio e principalmente pelo presente de ser tia da Valentina, que nasceu para alegrar e unir cada vez mais a nossa família.

À minha afilhada Amábilly por todo o carinho.

Agradeço a Dra Fátima Salimena pela identificação do material vegetal.

Aos Prof. (s) Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e Dr. Luís Carlos Scalon Cunha pela realização do ensaio antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque e Dra. Zumira Aparecida Carneiro pela análise de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Norberto Pepporine e ao técnico José Carlos Tomaz pelas análises de espectrometria de massas.

À Profa Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e ao técnico Dr. Nivaldo Borallo pelas análises de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos alunos de pós-graduação do NuPPEM, Thamires, Mário, Michele e Marília, muito obrigada por me acolherem na UFU e por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros e amigos do laboratório Ana, Jacke, Letícia e Raphael pela companhia e brincadeiras que animavam o dia a dia.

Aos meus orientadores Dra. Amanda Danuello Pivatto e Dr. Marcos Pivatto por toda confiança depositada em mim, pela oportunidade na realização desta pesquisa, pelo

aprendizado proporcionado e, principalmente pelos valiosos conselhos. Muito obrigada por tudo, vocês não imaginam o quanto foram importantes para a minha formação acadêmica e pessoal.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta foram importantes para a minha formação.

RESUMO

Lantana trifolia L., conhecida popularmente como milho de grilo, é uma planta arbustiva utilizada na medicina popular para o tratamento de gripes, asma e como calmante. Estudos químicos das folhas desta planta relataram a presença de compostos fenólicos. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo dos compostos fenólicos das folhas e frutos de *L. trifolia* coletadas em Peirópolis/MG e Pontal/SP, além de avaliar o potencial antioxidante e a atividade antimicrobiana das frações obtidas da extração líquido-líquido. As frações acetato de etila e *n*-butanol apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, exceto para as folhas de Peirópolis em que as frações acetato de etila e a hidrometanólica apresentaram maiores quantidades de fenóis totais. As frações mais polares das folhas e frutos dos dois locais apresentaram menores valores de CE₅₀ (maior potencial antioxidante), fato que pode ser justificado pela presença dos compostos fenólicos. No ensaio para avaliação da atividade antibacteriana foi observado que as frações FoPoHex e FoPeAcOEt apresentaram moderada atividade (CIM 200 µg/mL para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) e a fração FoPeAcOEt apresentou atividade moderada contra *Streptococcus mitis* (CIM 200 µg/mL). No ensaio antifúngico foi observado que as frações acetato de etila apresentaram valores de CIM menores que 100 µg/mL para as três linhagens de *Candida* avaliadas (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), com destaque para as frações FrPoAcOEt, FrPeAcOEt e FrPenBut que apresentaram valores de CIM 1,46, 2,93 e 2,93 µg/mL, respectivamente, contra *C. glabrata*, próximos ao controle positivo anfotericina B (0,5–1,0 µg/mL). Com os resultados de citotoxicidade, foi calculado o índice de seletividade e, pela análise dos valores obtidos, foi possível concluir que as frações mais ativas no ensaio antifúngico foram mais seletivas contra o microorganismo *C. glabrata* do que para as células saudáveis. As frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas e frutos foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas (EM) de onde foi possível identificar quinze compostos fenólicos, sendo dez inéditos na planta. Utilizando a CLAE semipreparativa foi possível isolar o composto majoritário verbascosídeo que teve sua estrutura elucidada por EM e RMN.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Potencial antioxidante. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Lantana trifolia L., popularly known as “milho de grilo” is a shrub plant used in folk medicine to treat flu, asthma, and as sedative. Chemical studies of the leaves of this plant reported the presence of phenolic compounds. In this context, the presente study aimed to study the phenolic compounds of *L. trifolia* leaves and fruits collected in Peirópolis/MG and Pontal/SP, and then evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of fractions from liquid-liquid extraction. The ethyl acetate and *n*-butanol fractions presented phenolic compounds in higher levels except for the Peirópolis leaves, where the ethyl acetate and hydromethanolic fractions presented these compounds in higher amounts. The more polar fractions of leaves and fruits from both locations presented lower values of EC₅₀ (higher antioxidant potential), a fact that may be justified by the presence of phenolic compounds. In the assay for antibacterial activity it was observed that the FoPoHex and FoPeAcOEt fractions showed moderate activity (MIC 200 µg/mL for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) and the FoPeAcOEt fraction showed moderate activity against *Streptococcus mitis* (CIM 200 µg/mL). In the antifungal assay it was observed that the ethyl acetate fractions showed MIC values lower than 100 µg/mL for the three *Candida* strains evaluated (*C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*), with emphasis on FrPoAcOEt, FrPeAcOEt and FrPenBut fractions who presented MIC values of 1.46, 2.93 and 2.93 µg/mL, respectively, against *C. glabrata*, close to the amphotericin B used as positive control (0.5–1.0 µg/mL). Along with the cytotoxicity results, the selectivity indexes were evaluated, and analyzing the values obtained was concluded that the most active fractions in the antifungal assay were more selective against *C. glabrata* than healthy cells. The ethyl acetate and *n*-butanol fractions of leaves and fruits were subjected to analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS) from which was possible to identify fifteen phenolic compounds, of which ten are being reported in the plant for the first time. Using semi-preparative HPLC it was possible to isolate the major compound verbascoside that the structure was elucidated by MS and NMR spectroscopy.

Keywords: Phenolic compounds. Antioxidant potential. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Isopreno e Taxol	19
Figura 2 - Morfina.	20
Figura 3 - Classificação dos flavonoides.	22
Figura 4 - <i>Lantana trifolia</i> L. cultivada no Instituto Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba/MG.....	23
Figura 5 - Compostos identificados nos óleos essenciais das folhas e flores de <i>Lantana trifolia</i> L.....	25
Figura 6 - Compostos fenólicos identificados nas folhas da <i>Lantana trifolia</i> L.	27
Figura 7 - Fluxograma da extração líquido-líquido.	31
Figura 8 - Massa em gramas obtida em cada fração das folhas.	43
Figura 9 - Massa em gramas obtida em cada fração dos frutos.....	44
Figura 10 - Frações acetato de etila, <i>n</i> -butanol e hidrometanólica reveladas com NP/PEG.....	46
Figura 11 - Frações acetato de etila, <i>n</i> -butanol e hidrometanólica reveladas com Liebermann- Burchard.....	46
Figura 12 - Reação do ácido gálico com molibdênio.....	47
Figura 13- Reação DPPH com compostos fenólicos.....	49
Figura 14 - Citotoxicidade das frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol.....	55
Figura 15 - Cromatograma da fração FoPeAcOEt.	57
Figura 16 - Cromatograma da fração FoPoAcOEt	57
Figura 17 - Cromatograma da fração FrPeAcOEt	58
Figura 18 - Cromatograma da fração FrPoAcOEt.	58
Figura 19 - Cromatograma da fração FrPenbut.....	58
Figura 20 - Cromatograma da fração FrPonbut.....	59
Figura 21 - Compostos fenólicos identificados nas folhas e frutos de <i>L. trifolia</i>	60
Figura 22 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (<i>t_R</i> 25,7 min).	61
Figura 23 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (<i>t_R</i> 26,5 min).	62
Figura 24 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (<i>t_R</i> 27,9 min).	62
Figura 25 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (<i>t_R</i> 32,1 min).	62
Figura 26 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (<i>t_R</i> 33,1 min).	63
Figura 27 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (<i>t_R</i> 36,3 min).	63
Figura 28 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (<i>t_R</i> 36,6 min).	63

Figura 29 - EM-IES(–) da fração FrPeAcOEt (t_R 19,0 min).	64
Figura 30 - EM-IES(–) da fração FrPeAcOEt (t_R 25,7 min).	65
Figura 31 - EM-IES(–) da fração FrPeAcOEt (t_R 26,6 min).	65
Figura 32 - EM-IES(–) da fração FrPeAcOEt (t_R 28,0 min).	65
Figura 33 - EM-IES(–) da fração FrPeAcOEt (t_R 36,3 min).	66
Figura 34 - EM-IES(–) da fração FrPenbut (t_R 19,0 min).	66
Figura 35 - EM-IES(–) da fração FrPenbut (t_R 25,7 min).	66
Figura 36 - EM-IES(–) da fração FrPenbut (t_R 26,5 min).	67
Figura 37 - EM-IES(–) da fração FrPenbut (t_R 28,0 min).	67
Figura 38 - EM-IES(–) da fração FrPenbut (t_R 29,0 min).	67
Figura 39 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 25,7 min).	68
Figura 40 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 26,6 min).	68
Figura 41 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 28,1min).	69
Figura 42 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 32,2min).	69
Figura 43 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 33,4 min).	69
Figura 44 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 36,5min).	70
Figura 45 - EM-IES(–) da fração FrPoAcOEt (t_R 25,7 min).	70
Figura 46 - EM-IES(–) da fração FrPoAcOEt (t_R 26,6 min).	71
Figura 47 - EM-IES(–) da fração FrPoAcOEt (t_R 28,0 min).	71
Figura 48 - EM-IES(–) da fração FrPoAcOEt (t_R 36,5 min).	71
Figura 49 - EM-IES(–) da fração FrPonbut (t_R 19,0 min).	72
Figura 50 - EM-IES(–) da fração FrPonbut (t_R 25,7 min).	72
Figura 51 - EM-IES(–) da fração FrPonbut (t_R 26,7 min).	72
Figura 52 - EM-IES(–) da fração FrPonbut (t_R 28,0 min).	73
Figura 53 - Cromatograma da fração FrPenBut em coluna semipreparativa.	73
Figura 54 - Cromatograma do verbascosídeo (45) em coluna analítica.	74
Figura 55 – EM-IES(–) em alta resolução do glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (45).	74
Figura 56 - EM/EM-IES(–) do glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (45).	75
Figura 57 - Proposta de fragmentação para o glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (45).	75
Figura 58 - Espectro de RMN de ^{13}C do verbascosídeo (45) (150 MHz, CD_3OD).	76
Figura 59 - Ampliação do espectro ^{13}C (δ 85–190) do verbascosídeo (45).	77

Figura 60 - Ampliação do espectro ^{13}C (δ 10–90) do verbascosídeo (**45**).....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos.	21
Tabela 2 - Compostos identificados nos óleos essenciais de <i>Lantana trifolia</i> L.	24
Tabela 3 - Compostos fenólicos identificados nas folhas de <i>Lantana trifolia</i> L.	26
Tabela 4 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE-EM.....	39
Tabela 5 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE	40
Tabela 6 - Rendimento do material vegetal coletado em Peirópolis.....	41
Tabela 7 - Rendimento do material vegetal coletado em Pontal	41
Tabela 8 - Rendimento dos extratos etanólicos das folhas e frutos	42
Tabela 9 - Rendimento da partição líquido – líquido dos extratos.....	45
Tabela 10 - Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas e frutos	45
Tabela 11 - Teor de fenóis totais das folhas <i>L. trifolia</i>	48
Tabela 12 - Teor de fenóis totais dos frutos de <i>L. trifolia</i>	48
Tabela 13 - Potencial antioxidante das folhas <i>L. trifolia</i>	50
Tabela 14 - Potencial antioxidante dos frutos <i>L. trifolia</i>	50
Tabela 15 - Bactérias aeróbias.....	52
Tabela 16 - Bactérias anaeróbias.....	53
Tabela 17 - Controle das bactérias anaeróbias.....	53
Tabela 18 - Atividade antifúngica.	54
Tabela 19 - Controle das leveduras.	55
Tabela 20 - Índice de seletividade (IS).	56
Tabela 21 - Compostos identificados nas folhas de <i>L. trifolia</i> (Peirópolis) por EM-IES- (-) em alta resolução.....	61
Tabela 22 - Compostos identificados nos frutos de <i>L. trifolia</i> (Peirópolis) por EM-IES- (-) em alta resolução.....	64
Tabela 23 - Compostos identificados nas folhas de <i>L. trifolia</i> (Pontal) por EM-IES-(-) em alta resolução.	68
Tabela 24 - Compostos identificados nos frutos de <i>L. trifolia</i> (Pontal) por EM-IES-(-) em alta resolução.	70
Tabela 25 - Dados de RMN de ¹³ C de 45 (CD ₃ OD).	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Collection
BHT - 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol
CC₅₀ - Concentração citotóxica
CCD - Cromatografia de camada delgada
CE₅₀ - Concentração eficiente
CIM - Concentração inibitória mínima
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI - Clinical and Laboratory Standards
DMSO - Dimetilsulfóxido
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazila
EAG - Equivalentes de ácido gálico
EEFoPe - Extrato etanólico folhas Peirópolis
EEFoPo - Extrato etanólico folhas Pontal
EEFrPe - Extrato etanólico frutos Peirópolis
EEFrPo - Extrato etanólico frutos Pontal
EM - Espectrometria de massas
FoPe AcOEt - Fração acetato de etila folhas Peirópolis
FoPe Hex - Fração hexano folhas Peirópolis
FoPe HM - Fração hidrometanólica folhas Peirópolis
FoPe *n*-But - Fração *n*-butanol folhas Peirópolis
FoPo AcOEt - Fração hexano folhas Pontal
FoPo Hex - Fração hexano folhas Pontal
FoPo HM - Fração hidrometanólica folhas Pontal
FoPo *n*-But - Fração *n*-butanol folhas Pontal
FrPe AcOEt - Fração Acetato de etila frutos Peirópolis
FrPe Hex - Fração hexano frutos Peirópolis
FrPe HM - Fração hidrometanólica frutos Peirópolis
FrPe *n*-But - Fração *n*-butanol frutos Peirópolis
FrPo AcOEt - Fração Acetato de etila frutos Pontal
FrPo Hex - Fração hexano frutos Pontal
FrPo HM - Fração hidrometanólica frutos Pontal

FrPo *n*-But - Fração *n*-butanol frutos Pontal

HAT - Transferência de átomos de hidrogênio

IES - Ionização por electrospray

IS - Índice de seletividade

MTT - 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazoilium

NP - Ácido β -etilaminodifenilbórico ester

OMS - Organização Mundial de Saúde

PEG – Polietilenoglicol - 4000

RMN - Ressonância magnética nuclear

SPLET - Transferência de elétrons de perda sequencial de prótons

TBS - Triptona de soja

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 PRODUTOS NATURAIS	17
1.2 <i>LANTANA TRIFOLIA</i> L.....	23
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1 MATERIAIS	29
3.2 EQUIPAMENTOS	29
3.3 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	30
3.4 EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO	30
3.5 EXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO DOS EXTRATOS	31
3.6 TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES.....	32
3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS	33
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	33
3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	34
3.9.1 Determinação da atividade antibacteriana.....	31
3.9.1.1 <i>Microrganismos utilizados nos ensaios</i>	<i>34</i>
3.9.1.2 <i>Preparo das amostras para o método de microdiluição</i>	<i>34</i>
3.9.1.3 <i>Preparo do inóculo</i>	<i>35</i>
3.9.1.4 <i>Preparo dos controles</i>	<i>35</i>
3.9.1.5 <i>Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima</i>	<i>35</i>
3.9.2 Determinação da atividade antifúngica.....	33
3.9.2.2 <i>Microrganismos</i>	<i>36</i>
3.9.2.3 <i>Preparo do inóculo</i>	<i>36</i>
3.9.2.3 <i>Preparo dos controles</i>	<i>36</i>

3.9.2.4 Método da microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima	37
3.10 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DAS FRAÇÕES	37
3.11 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	38
3.12 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
4.1 RENDIMENTO DA COLETA DO MATERIAL VEGETAL	41
4.2 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO - LÍQUIDO	41
4.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	42
4.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	45
4.5 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	47
4.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	49
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	51
4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	55
4.9 ANÁLISE POR CLAE-EM DAS FRAÇÕES DE <i>L. trifolia</i>	57
4.10 ANÁLISE POR CLAE PREPARATIVO DA FRAÇÃO FrPenbut	73
4.11 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO VERBASCOSÍDEO (45).....	74
5 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FoPeAcOEt.....	84
APÊNDICE C – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPeAcOEt.....	91
APÊNDICE D – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPoAcOEt	97
APÊNDICE E – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPenbut	101
APÊNDICE F – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPonbut.....	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS

Há milhares de anos, o homem faz uso de recursos naturais para sua sobrevivência, como por exemplo, na alimentação, proteção, pintura e remédios. Há alguns registros sobre a utilização de plantas na medicina tradicional, fazendo parte deles o papiro de Ebers, que foi escrito por volta de 1500 a.C. e descreve o uso de mais de 700 medicamentos populares, sendo a maioria de origem vegetal (BORCHARDT, 2002 apud NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015).

As plantas, como fonte de cura, continuam desenvolvendo um papel importante nas diferentes culturas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca 80% da população que vive em países em desenvolvimento, faz uso de plantas para o tratamento de suas enfermidades (BRASIL, 2006).

Os constituintes químicos produzidos pelos organismos são denominados metabólitos, que são moléculas orgânicas oriundas de reações biossintéticas. Eles são classificados como primários e secundários, sendo os metabólitos primários responsáveis pelas funções metabólicas essenciais do organismo, dentre elas a respiração e crescimento. Como exemplos, fazem parte dessa classe de substâncias os carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (EMERY et al., 2010).

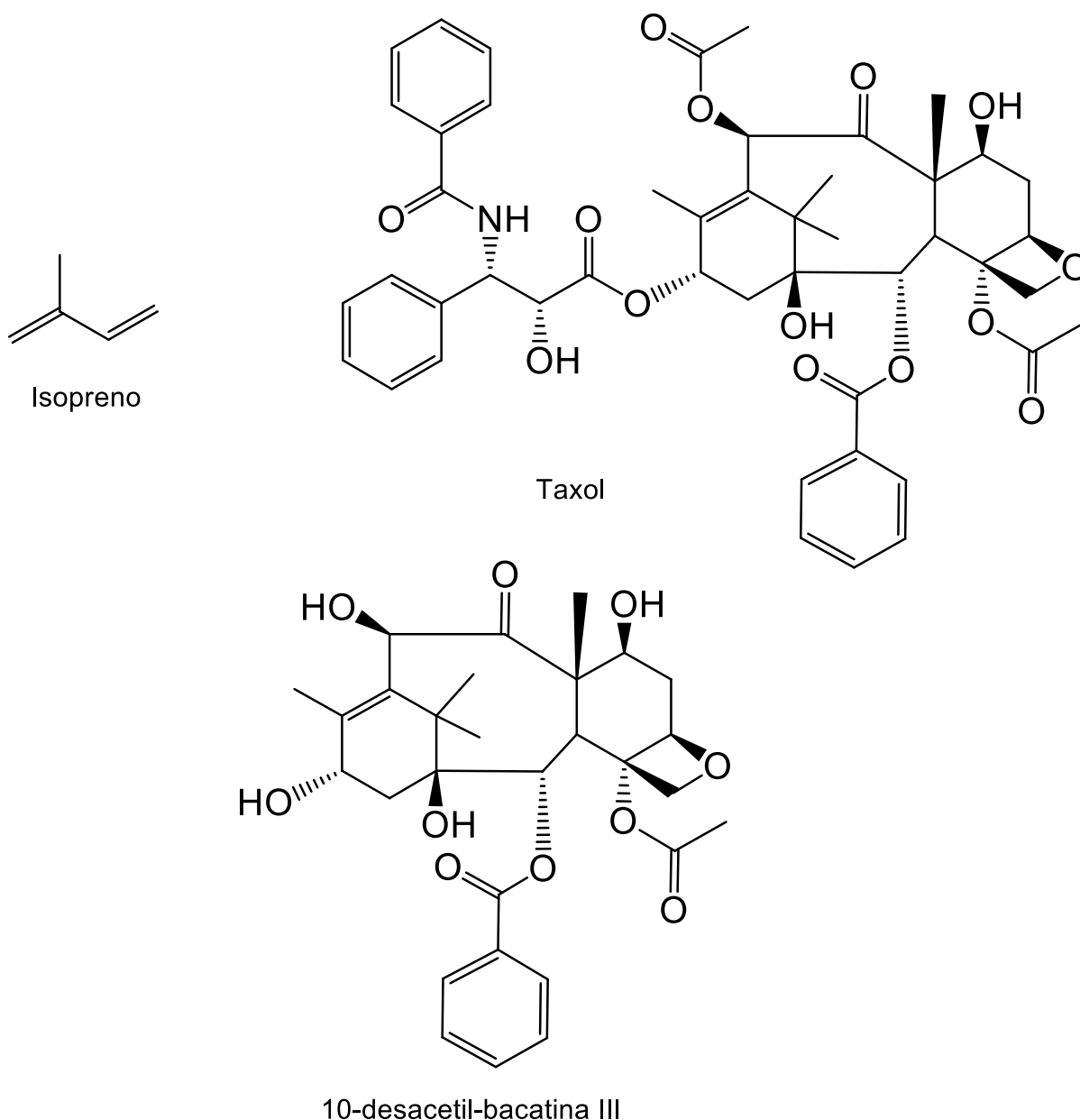
Os metabólitos secundários ou produtos naturais são responsáveis pela sobrevivência e interação entre o organismo e o meio ambiente, sendo a biossíntese desses compostos, geralmente afetada pelas condições ambientais, como a presença ou ausência de água, nutrientes, temperatura, intensidade de luz solar e ataque de predadores. Esses metabólitos desempenham diversas funções importantes na proteção (defesa contra predadores) e desenvolvimento dos organismos. como a presença ou ausência de água, nutrientes, temperatura, intensidade de luz solar e ataque de predadores (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; EMERY et al., 2010).

De acordo com as vias metabólicas, a maioria dos produtos naturais pode ser distribuída em três grupos os mais estudados atualmente, sendo eles: os terpenos, os alcaloides e os compostos fenólicos (CROTEAU et al., 2000).

A classe dos terpenos é a que possui maior diversidade estrutural, tendo mais de 20.000 compostos conhecidos, alguns são hidrocarbonetos simples, mas outros podem ter ligados à cadeia carbônica átomos de nitrogênio ou oxigênio. Os terpenos podem ser divididos de acordo com o número de unidades de isopreno (2-

metilbutadieno) (Figura 1) presentes em sua estrutura: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos com 2, 3, 4, 6 e 8 unidades de isopreno, respectivamente. O paclitaxel, (Figura 1) é um diterpeno isolado das cascas de *Taxus brevifolia* e que possui propriedades anticâncer, comercializado atualmente como Taxol®. Devido à baixa concentração desse composto nas cascas da *T. brevifolia* e da alta complexidade para obtê-lo por meio de síntese, atualmente este fármaco é obtido por meio de semi-síntese com o diterpeno isolado das cascas das folhas da *Taxus baccata*, 10-desacetil-bacatina III (Figura 1) (VIEGAS et al., 2006, CROTEAU et al., 2000; EMERY et al., 2010;).

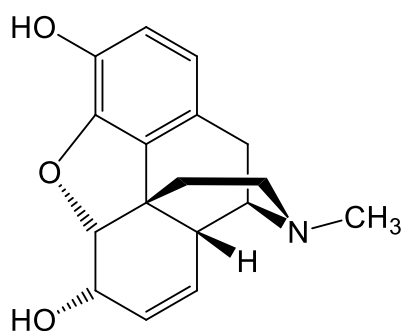
Figura 1 - Isopreno e Taxol



Fonte: CROTEAU et al., 2000

Os alcaloides são metabólitos cíclicos que possuem nitrogênio em sua estrutura, apresentam caráter básico e são produzidos por algumas plantas como forma de proteção contra insetos e herbívoros, sendo que a maioria tem origem biossintética nos aminoácidos. A morfina (Figura 2), foi o primeiro alcaloide a ser isolado de plantas, este foi isolado da papoula (*Papaver somniferum*), e possui potentes propriedades analgésicas. Após sua descoberta, mais de 12.000 compostos desta classe já foram isolados (CROTEAU et al., 2000; EMERY et al., 2010).

Figura 2 - Morfina.



Fonte: VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006

Os compostos fenólicos são muito importantes para as plantas, pois podem atuar de diversas maneiras para sua sobrevivência, seja contribuindo com a sustentação, pigmentação e odores dos órgãos dessa planta ou atuando como mecanismo de proteção contra radiação solar e crescimento de microrganismos (CROTEAU et al., 2000; QUIDEAU et al., 2011). Contando com mais de 8000 compostos identificados, os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura carbônica (Tabela 1) (MALBERT, 2014; SOUSA, 2015). Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, devido a sua abundância, compreendendo mais 4.500 compostos conhecidos. De acordo com a substituição dos anéis A e B, os flavonoides podem ser divididos em nove classes: flavonas, flavonóis, flavononas, dihidroflavonóis, isoflavononas, flavan-3-óis, antocianinas, chalconas e auronas (Figura 3) (CROTEAU et al., 2000; MALBERT, 2014).

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos.

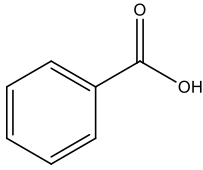
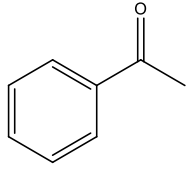
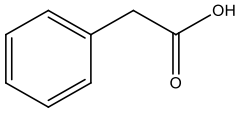
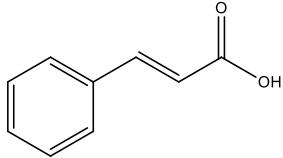
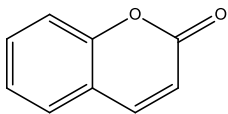
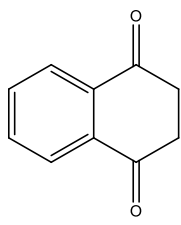
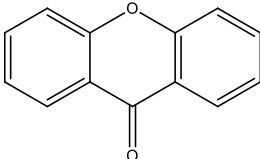
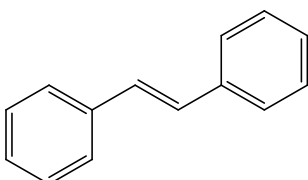
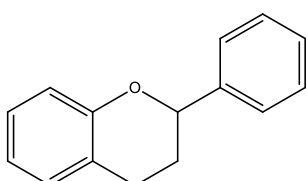
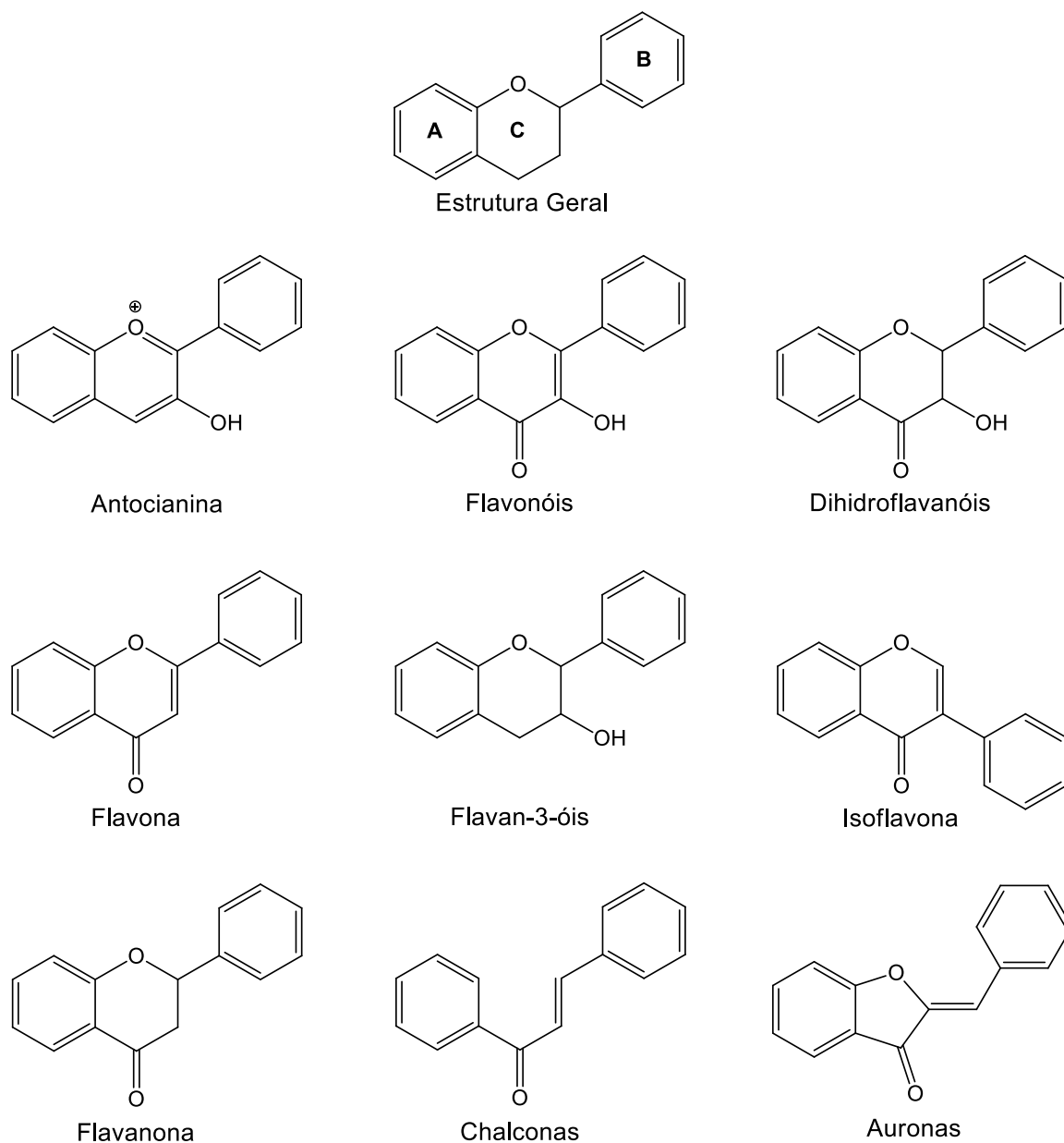
Nº de carbonos	Esqueleto	Classificação	Estrutura
7	C ₆ -C ₁	Ácido benzoico	
8	C ₆ -C ₂	Acetofenona	
8	C ₆ -C ₂	Ácido fenilacético	
9	C ₆ -C ₃	Ácido cinâmico	
9	C ₆ -C ₃	Cumarina	
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinona	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantona	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbeno	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoide	

Figura 3 - Classificação dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de MALBERT, 2014

Os compostos fenólicos estão relacionados a diversas atividades farmacológicas, tais como: atividades antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, anticarcinogênica e neuroprotetora (MALBERT, 2014). Dentro deste contexto, muitas plantas são conhecidas por produzir compostos fenólicos, sendo uma delas a *Lantana trifolia* L., cujas folhas apresenta uma grande variedade destes metabólitos (JULIÃO et al., 2010).

1.2 *Lantana trifolia* L.

O gênero *Lantana* pertence à família Verbenaceae e abrange cerca de 150 espécies, sendo *Lantana trifolia* L., conhecida popularmente como milho de grilo, cambará e uvinha do mato. Essa espécie é nativa das regiões tropicais da Ásia e África e no Brasil está presente nas regiões norte, centro-oeste e sudeste (GHISALBERTI, 2000; SILVA et al., 2005; JULIÃO et al., 2009).

L. trifolia é um pequeno arbusto que pode chegar a dois metros de altura, com pequenas flores e frutos esféricos roxos (Figura 4). Relatos populares descrevem que *L. trifolia* é utilizada na forma de infusões e xaropes para o tratamento de tosse, gripes, asma, sinusite, dor de ouvido, febre, dor de estômago e como calmante (JULIÃO et al., 2009; NALUBEGA et al., 2013).

Figura 4 - *Lantana trifolia* L. cultivada no Instituto Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba/MG.



Fonte: Da autora, 2015

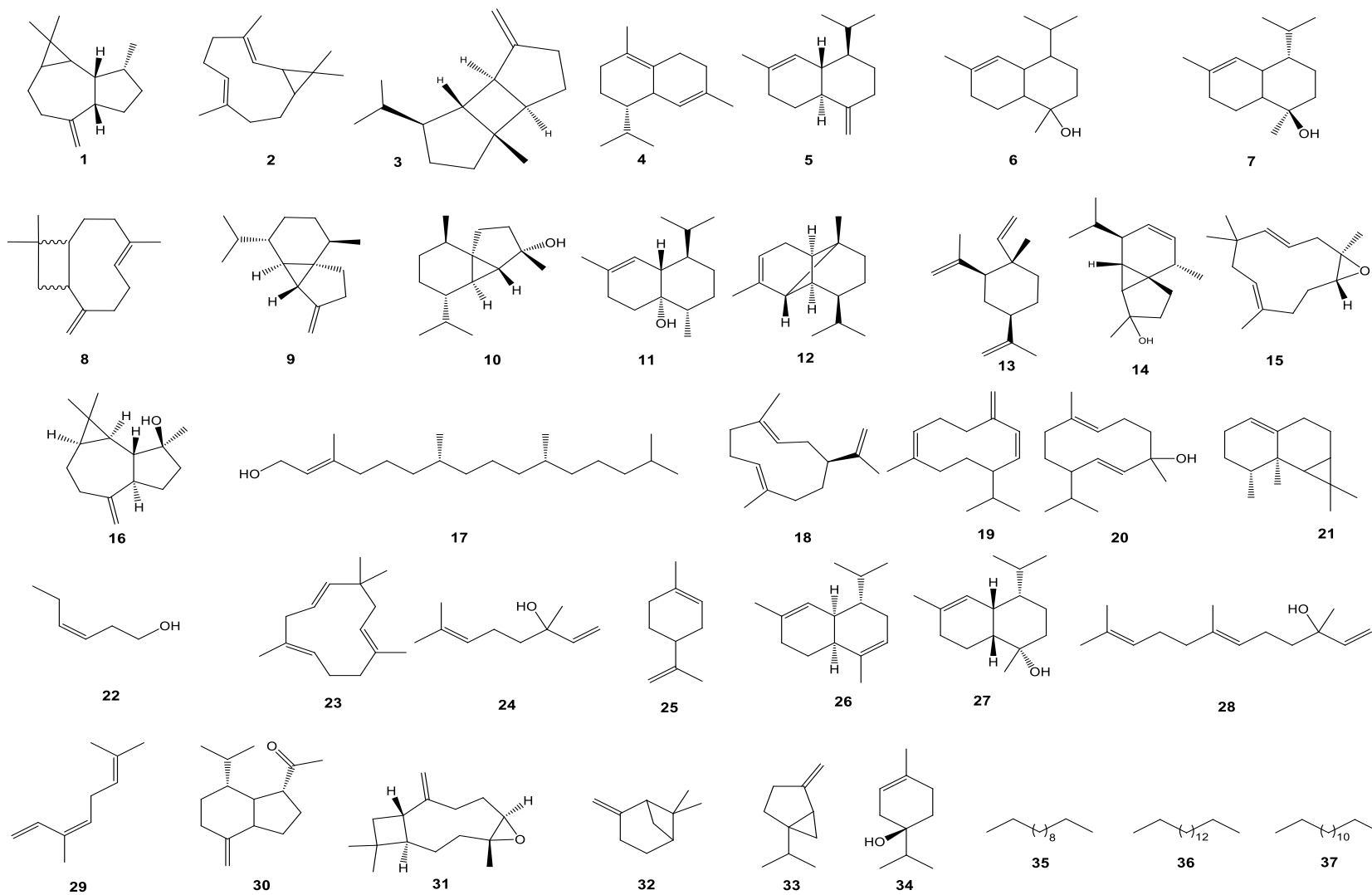
Relatos na literatura descrevem que os óleos essenciais extraídos das folhas e flores de *L. trifolia* apresentam ampla diversidade química (Tabela 2) (Figura 5) (JULIÃO et al., 2009; MONTANARI, 2010).

Tabela 2 - Compostos identificados nos óleos essenciais de *Lantana trifolia* L.

	Composto	Órgão
1	Allo-Aromadendreno	Folhas e flores
2	Biciclogermacreno	Folhas e flores
3	β -Bourborene	Folhas
4	δ -Cadineno	Folhas e flores
5	γ -Cadineno	Folhas
6	Cadinol	Folhas
7	α -Cadinol	Folhas e flores
8	(<i>E</i>)-Cariofileno	Folhas e flores
9	β -Cubebeno	Folhas
10	Cubebol	Folhas
11	Cubenol	Folhas
12	α -Copaeno	Folhas e flores
13	β -Elemeno	Folhas e flores
14	Epi- α -Cubebol	Folhas
15	Epóxido de humuleno II	Folhas
16	Espatulanol	Flores
17	Fitol	Folhas
18	Germacreno A	Folhas e flores
19	Germacreno D	Folhas e flores
20	Germacreno D-4-ol	Flores
21	β -Gurjuneno	Folhas
22	(<i>Z</i>)-3-Hexenol	Folhas
23	α -Humuleno	Folhas e flores
24	Linalol	Folhas e flores
25	Limoneno	Folhas e flores
26	α -Muuroleno	Folhas e flores
27	α -Muurolol	Folhas
28	(<i>E</i>)-Nerolidol	Folhas
29	β -Ocimeno	Flores
30	β -Oplopenona	Folhas
31	Óxido de cariofileno	Folhas
32	β -Pineno	Flores
33	Sabineno	Flores
34	Terpinen-4-ol	Flores
35	Dodecano	Folhas
36	Hexadecano	Folhas
37	Tetradecano	Folhas e flores

Fonte: Adaptado de JULIÃO et al., 2009; MONTANARI, 2010

Figura 5 - Compostos identificados nos óleos essenciais das folhas e flores de *Lantana trifolia* L.



Fonte: Da autora, 2018

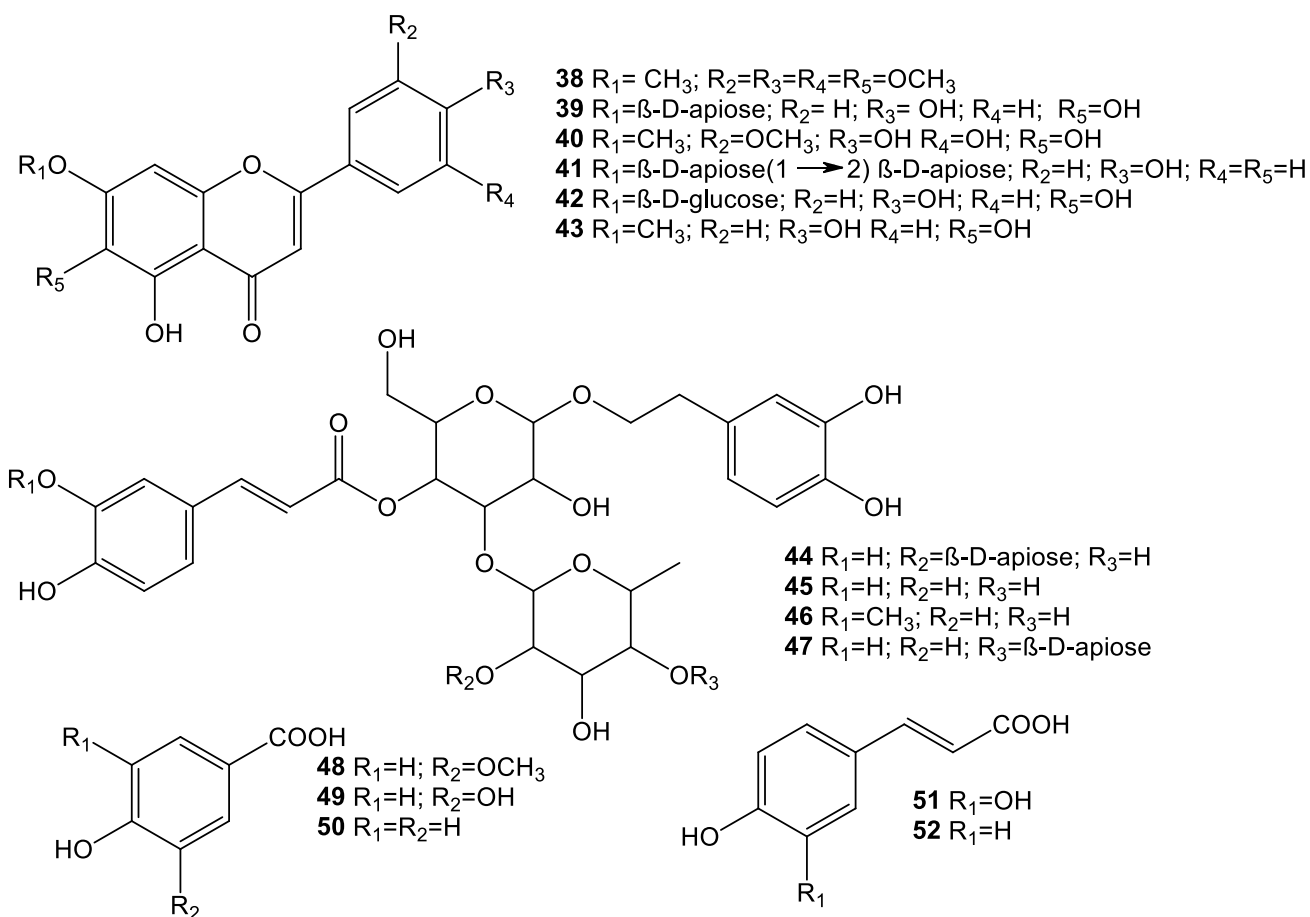
Em 1988, foi isolada a partir do extrato metanólico das folhas, a umuhengerina (**38**), uma flavona polimetoxilada que apresentou atividades antifúngica e antibacteriana em ensaios *in vitro* (RWANGABO et al., 1988). Além dessa substância, foram identificados outros compostos fenólicos (Tabela 3) (Figura 6) que foram isolados da fração acetato de etila das folhas da *L. trifolia*, sendo que os extratos etanólicos e acetato de etila, em ensaios realizados com ratos demonstraram propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas e efeitos sedativos (JULIÃO et al., 2010).

Tabela 3 - Compostos fenólicos identificados nas folhas de *Lantana trifolia* L.

	Composto
38	Umuhengerina
39	Esculareina-7-O- β -apiofuranosideo
40	5,6,4',5'-tetrahidroxi-7,3'-dimetoxiflavona
41	Apigenina-7-O- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-apiofuranosideo
42	Esculareina-7-O- β -D-glucopiranosideo
43	Sorbifolin
44	Betaniosideo F
45	Verbascosideo
46	Martinosideo
47	Samiosideo
48	Ácido vanílico
49	Ácido protocatecuico
50	Ácido 4-hidroxibenzoico
51	Ácido cafeico
52	Ácido p-cumárico

Fonte: Da autora, 2017

Figura 6 - Compostos fenólicos identificados nas folhas da *Lantana trifolia* L.



Fonte: Adaptado de JULIÃO, 2010

Cabe destacar que *L. trifolia* não apresenta estudos sobre a composição química dos frutos, o que estimulou uma pesquisa mais dirigida para esse órgão, visando a identificação dos metabólitos secundários presentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo dos compostos fenólicos presentes nos frutos de *L. trifolia* L. e comparar com a composição fenólica presente nas folhas do mesmo espécime, bem como avaliar o potencial fungicida das folhas e frutos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato em etanol das folhas e frutos de *L. trifolia*;
- Particionar o extrato etanólico das folhas e frutos com solventes de polaridade crescente;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos e frações das folhas e frutos;
- Avaliar o teor de fenóis dos extratos etanólicos e frações das folhas e frutos;
- Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* das folhas e frutos contra *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii*;
- Avaliar o potencial fungicida *in vitro* das folhas e frutos contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*;
- Avaliar a toxicidade das frações das folhas e frutos com maior potencial fungicida;
- Comparar os compostos fenólicos e potencial fungicida *in vitro* das folhas e frutos de *L. trifolia* coletada em dois locais distintos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes e solventes

- Ácido fosfomolibdico: INLAB;
- Ácido gálico: Sigma Aldrich PA;
- Ácido β -etilaminofenilbórico ester (NP)
- Ácido sulfúrico: Quemis PA ACS
- Anisaldeído: Sigma Aldrich PA;
- Anidrido acético: Synth PA;
- Carbonato de sódio: Sigma Aldrich PA;
- Etanol: LS Chemicals PA
- Folin-Ciocalteu: Cromoline;
- Metanol: Sigma Aldrich HPLC;
- Polietilenoglicol-4000 (PEG): Vetec Química Fina LTDA;
- 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH): Sigma Aldrich PA;
- 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT): Sigma Aldrich PA;
- Vanilina: Vetec;
- Os solventes acetato de etila, hexano, metanol e *n*-butanol utilizados para desenvolver este trabalho foram das marcas Vetec, Proquímios e Merck.

3.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica – Shimadzu, modelo AY220;
- Moinho de facas da marca Tecnal (modelo TE-648);
- Rotaevaporador da marca Tecnal (modelo TE-2005), com banho a 40 °C e refrigeração a 5 °C;
- Espectrofotômetro (UV-VIS) Genesysis, modelo 10S;
- Espectrofotômetro (UV-VIS) Shimadzu, modelo UV 1800.
- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE–EM), o sistema de CLAE utilizado foi da shimadzu modelo prominence com bombas de alta pressão modelo LC-20AD, sistema de detector espectrofotométrico modelo SPD- M20A, marca Shimadzu, desgaseificador

modelo DGU-20A-5, marca shimadzu, bomba de infusão modelo Cole-Parmer. O espectrômetro de massas utilizado foi o da Bruker Daltonics modelo amazon SL - IES-TOF.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência semipreparativo, o sistema utilizado foi do modelo SHIMADZU LC-6AD com injetor automático modelo SIL-10AF e degaseificador DGU-20A5E, sistema de bomba binário LC-6AD, forno CTO20A, coletor de frações FRC-10A, detectores de UV/VIS por arranjo de diodos (DAD, modelo SPD-M20A), modelo ELSD-LTII).
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend™ 600 Avance III HD (14,1 Tesla) do Instituto de Química da Unesp/Araraquara, operando em frequência de 150 MHz para os núcleos de carbono. Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando o solvente residual como padrão interno ($\delta_{\text{MeOH}} = 49,00$).

3.3 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal foi realizada em dois locais, às 10h: 1) Peirópolis/MG (19°44'17"S; 47°44'41"O), no dia 16 de novembro de 2015 e 2) Pontal/SP (20°43'18.858"S; 47°53'30.588"O), no dia 22 de dezembro de 2015. Em seguida foram preparadas exsicatas, uma para cada local de coleta, identificadas pela especialista Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena (Universidade Federal de Juiz de Fora) e depositadas no Herbário Uberlandense da Universidade Federal de Uberlândia, com o número 74.121 para o local 1 e 73.929 para o local 2.

O material vegetal coletado foi separado de acordo com o ponto de coleta e dividido em duas partes: 1- as folhas da planta e 2- frutos. Esse material foi pesado e seco a temperatura ambiente durante 7 dias.

3.4 EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO

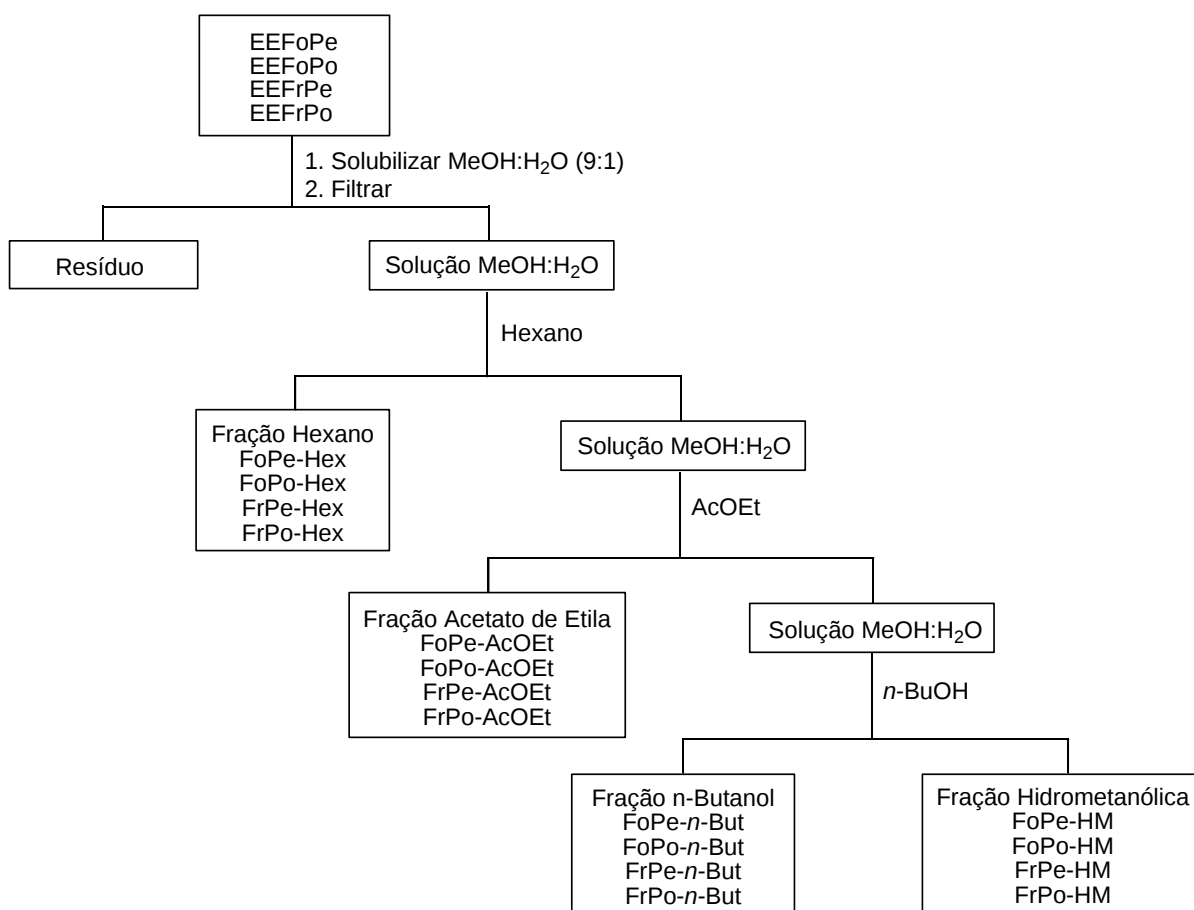
O processo de extração das folhas e frutos secos e triturados da *L. trifolia* foi realizado por maceração com etanol, na proporção de 4:1 (solvente: material vegetal), à temperatura ambiente por um período de 3 dias. Após esse período, a solução obtida foi filtrada com papel de filtro e os extratos foram concentrados separadamente

utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C, o processo foi repetido cinco vezes para cada órgão da planta (IMBENZI et al., 2014).

3.5 EXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO DOS EXTRATOS

Os extratos obtidos no item 3.4 foram solubilizados em metanol:água (9:1), a solução obtida foi filtrada com papel de filtro e em seguida as soluções foram submetidas à partição líquido – líquido com diferentes solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (Figura 7) (SILVA et al., 2005; IMBENZI et al., 2014).

Figura 7 - Fluxograma da extração líquido-líquido.



Fonte: Da autora, 2017

3.6 TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES

Para análise das classes de produtos naturais presentes nos extratos etanólicos e frações, foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD) e alguns reveladores químicos como anisaldeído, vanilina, NP/PEG, ácido fosfomolibdico e liebermann-burchard (WAGNER; BLADT, 2001).

- ANISALDEÍDO:

Solução com anisaldeído: ácido acético:metanol:ácido sulfúrico na proporção 0,5:10:85:5.

Utilizado como revelador universal (JORK, et al., 1990).

- VANILINA SULFÚRICA:

Solução de vanilina em etanol 1% (m/v) com solução de ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v).

Indica a presença de esteroides, triterpenos, saponinas e compostos fenólicos (JORK, et al., 1990).

- ÁCIDO FOSFOMOLIBDICO:

Solução de ácido fosfomolibdico em etanol 20% (m/v).

Indica a presença de substâncias redutoras (antioxidantes), esteroides, ácidos biliares e seus conjugados, lipídios, ácidos graxos e seus derivados (JORK, et al., 1990).

- LIEBERMANN-BURCHARD:

Solução com anidrido acético:ácido sulfúrico:etanol na proporção 5:5:50, sob banho de gelo.

Indica terpenos e esteroides (WAGNER; BLADT, 2001).

- NP/PEG:

Solução com 10 mL de NP 1% em metanol e 8 mL de solução de PEG 5% em etanol.

Indica a presença de flavonoides, carboidratos e antocianidinas (JORK, et al., 1990).

Foram utilizadas como fase estacionária placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) (0,2 mm, Macherey-Nagel), e como fase móvel hexano:acetato de etila (3:2) e acetato de etila:ácido acético: ácido fórmico:água (10:1:1:2,3).

3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

Foi realizado o procedimento segundo Moraes et al. (2008), no qual, em tubo de ensaio foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL de solução metanólica do extrato/partição (200 µg/mL), 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10 % (v/v) e 2 mL de uma solução de carbonato de sódio 7,5 % (m/v). A mistura foi mantida por 5 min em banho a 50 °C. Em seguida, a absorbância foi lida a 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 0,5 mL de metanol para obtenção do branco. O teor de fenóis totais das amostras foi determinado pela equação da reta da curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de extrato. Foi descontada a absorbância do branco da absorbância das amostras e as análises foram realizadas em triplicata.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Foi realizado procedimento segundo Moraes et al. (2008), pelo método espectrofotométrico de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e posterior análise espectrofotométrica em 517 nm. Inicialmente preparou-se uma solução de DPPH 100 µg/mL em metanol. A partir desta solução, retirou-se alíquotas de diferentes quantidades a fim de preparar soluções de concentrações 0, 10, 20, 30, 40 e 60 µg/mL para a leitura de absorbância no espectrofotômetro e posterior construção da curva de calibração de DPPH. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,3 mL de solução dos extratos/frações e 2,7 mL de solução de DPPH (apresentando absorbância 0,99 em 517 nm). A mistura contendo extrato/partição e DPPH foi deixada em repouso, protegidos da luz e a temperatura ambiente, durante 1 hora.

Após esse intervalo, a absorbância foi medida no espectrofotômetro em 517 nm. O controle foi realizado com 0,3 mL de extrato/fração e 2,7 mL de metanol. O branco foi realizado substituindo 2,7 mL de DPPH por metanol. Como controle positivo foi utilizado 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) e as análises foram realizadas em triplicata.

3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios para determinar atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMa), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e o Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha.

3.9.1 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2012a) e CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2012b).

3.9.1.1 Microrganismos utilizados nos ensaios

Foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomyces naeslundii*, (ATCC 19039) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

3.9.1.2 Preparo das amostras para o método de microdiluição

As amostras foram preparadas com concentrações de 8.000 µg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Desta solução, foram retirados 125 µL e acrescentados a 1.875 µL de caldo triptona de soja (TSB), obtendo-se uma solução mãe para

microrganismos aeróbios de concentração 500 µg/mL. Para microrganismos anaeróbios, foram retirados 162,5 µL da solução de partida e acrescentados a 2.437,5 µL de caldo Schaedler suplementado, para obtenção de uma solução mãe de 500 µg/mL.

3.9.1.3 Preparo do inóculo

As culturas dos microrganismos aeróbios crescidos no meio ágar triptona de soja enriquecido com 5% de sangue de carneiro durante 24 horas foram transferidas para uma solução salina. O mesmo procedimento foi realizado para preparação das culturas das bactérias anaeróbias com crescimento de 72 horas em ágar Schaedler. O inóculo foi padronizado fazendo a comparação deste com o tubo 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para bactérias na escala McFarland.

3.9.1.4 Preparo dos controles

Foram utilizados como controle positivo o dicloridrato de clorexidina para bactérias aeróbias, testado nas concentrações de 0,0115 µg/mL a 59,0 µg/mL e o metronidazol para bactérias anaeróbias, testado nas concentrações de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL. Também foram realizados os controles de esterilidade dos caldos TSB e Schaedler, do inóculo, da esterilidade da clorexidina e do metronizadol, da esterilidade das amostras e do solvente DMSO (5 a 1%).

3.9.1.5 Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar e os materiais utilizados (vidrarias, ponteiras e os meios de cultura) foram esterilizados. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços. Em cada poço, foram adicionados o inóculo, o caldo triptona soja ou caldo Schaedler e as soluções das amostras. O volume final em cada poço foi de 100 µL para os microrganismos aeróbios e 200 µL para os anaeróbios. As soluções das amostras foram avaliadas nas concentrações de 400 a 0,195 µg/mL.

As placas, que continham bactérias aeróbias, foram seladas com parafilme e incubadas a 36 °C por 24 h em microaerofilia. Após o período de incubação, foram

adicionados em cada poço 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,01% (m/v). Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 48 a 72 h em câmara de anaerobiose, a 36 °C. Foi utilizado o mesmo revelador (resazurina) para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os microrganismos anaeróbios.

3.9.2 Determinação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo para determinação da CIM.

3.9.2.2 Microrganismos

Para a determinação da atividade antifúngica das amostras, foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126).

3.9.2.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o protocolo de referência CLSI M27-A3 (2008). Primeiramente, os fungos foram cultivados em placas de petri contendo ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Após esse período, com o auxílio de alça de platina esterilizada, foram transferidas colônias das leveduras para tubos contendo 2,0 mL de solução salina 0,85%. O inóculo foi preparado usando método espectrofotométrico (530 nm) e comparado com a escala de McFarland 0,5 para se obter o valor de 6×10^6 UFC/mL. Em seguida, foram realizadas as diluições em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $1,2 \times 10^3$ UFC/mL.

3.9.2.4 Preparo dos controles

Para o controle positivo, foi utilizado o fármaco anfotericina B, sendo diluída em caldo para obter a concentração de 8 µg/mL a 0,031 µg/mL. Para a validação dos ensaios, o controle anfotericina B foi testado frente a cepas de referência *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, para se obter uma faixa de CIM entre 0,5 a 2,0 µg/mL

para validação da metodologia e dos resultados para as demais leveduras segundo o CLSI M27-A3 (2008).

Foram realizados os controles de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), do inóculo (que apresentou crescimento devido à ausência de agentes antimicrobianos), de esterilidade dos antifúngicos, de esterilidade dos extratos e do solvente (DMSO), que é o controle negativo. O controle do solvente foi realizado para que não haja dúvidas a respeito da inibição do crescimento do microrganismo, pois em algumas concentrações o solvente pode levar a inibição do crescimento microbiano.

3.9.2.5 Método da microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas diluições seriadas em concentrações de 3000 a 1,46 µg/mL. O meio de cultura utilizado foi o caldo RPMI tamponado com MOPS e pH final de 7,2. Nas microplacas, foram realizadas diluições seriadas, com volume final no poço de 200 µL. Para o controle positivo, foi realizado o mesmo processo com concentrações de 8 a 0,031 µg/mL. Para controle negativo, a concentração utilizada foi de 1% a 10% v/v.

Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 horas a 37 °C, decorrido este período foi determinada a CIM através do uso do revelador resazurina. A leitura foi realizada observando-se a mudança da coloração da resazurina, onde a presença da cor azul representou ausência de crescimento, enquanto a cor vermelha foi interpretada como presença de crescimento fúngico.

3.10 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DAS FRAÇÕES

Os ensaios para determinar a citotoxicidade das frações foram realizados no Laboratório de Parasitologia FCFRP/USP em Ribeirão Preto/SP, com a colaboração da Dra. Zumira Aparecida Carneiro e Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque.

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos foi utilizado o teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium). O princípio deste método descrito por Mosmann, consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática de oxirredutases das células vivas (MOSMANN, 1983). Para o teste, $1,0 \times 10^5$ células da linhagem Vero (ATCC® CCL-81™) foram semeadas em microplacas de

96 poços na ausência ou presença dos compostos (1,95 a 250 μM) ou Anfotericina-B (1,95 a 250 μM) e incubadas em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 por 72 horas. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular 50,0 μL de MTT (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) na concentração de 2,0 mg/mL, e após 3 horas de incubação com o MTT, foram acrescentados 50,0 μL DMSO para dissolver os cristais de azul de formazan. A absorbância foi determinada em 570 nm usando espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = (Absorbância do tratamento)/(Absorbância do controle negativo) x 100. O valor de CC_{50} (concentração citotóxica (μM) que inibe 50% o crescimento celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.11 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP/USP em Ribeirão Preto sob a supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

As frações FoPeAcOEt, FoPoAcOEt, FrPeAcOEt, FrPoAcEt, FrPenbut e FrPonbut foram solubilizadas em metanol e injetado o volume de 20 μL , e a fase móvel utilizada foi um gradiente (Tabela 4) de acetonitrila (ACN) e água (H_2O) acidificados com ácido fórmico (HCO_2H) (0,1% v/v) com fluxo de 1 mL/min, temperatura 40° C, e como fase estacionária foi utilizada coluna de fase reversa C_{18} (Phenomenex®, Lunna 250 x 4,6 mm, 5 μm). A ionização foi realizada com gás nebulizante a 60 psi, sendo o gás secante aquecido a 330 °C com fluxo de 9 L/min e no capilar foi aplicado 3,5 KV.

Tabela 4 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE-EM

Tempo (min)	Bomba A (H ₂ O + 0,1% HCO ₂ H)	Bomba B (ACN + 0,1% HCO ₂ H)
0,01	95%	5%
60,0	0%	100%
65,0	0%	100%
70,0	95%	5%
75,0	95%	5%

A aquisição dos dados foi realizada no software da Bruker, Compass Dataanalysis versão 4.3.

O erro em ppm, foi calculado com o auxílio da equação abaixo, onde a massa experimental é a massa observada nos espectros de massas de cada composto e a massa exata foi obtida no ChemDraw Ultra 12.0.

$$\text{Erro}_{\text{ppm}} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] 10^6$$

3.12 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPEN), na Universidade Federal de Uberlândia.

A fração FrPenbut foi solubilizada em metanol (250,0 mg/mL) e injetado o volume de 50 µL, e a fase móvel utilizada foi um gradiente (Tabela 5) de acetonitrila (ACN) e água (H₂O) acidificados com ácido fórmico (HCO₂H) (0,1% v/v) com fluxo de 2,0 mL/min, temperatura 40°C.

Como fase estacionária para as análises de CLAE, foram utilizadas as respectivas colunas:

- Analítica Phenomenex Lunna C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm)
- Semipreparativa Phenomenex Synergi Hydro-RP C₁₈ 80 Å Axia Packed (100 × 21,20 mm, 4 µm).

Tabela 5 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE

Tempo (min)	Bomba A (H ₂ O + 0,1% HCO ₂ H)	Bomba B (ACN + 0,1% HCO ₂ H)
0,01	95%	5%
37,0	50%	50%
50,0	0%	100%
55,0	0%	100%
60,0	95%	5%

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 RENDIMENTO DA COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Nas tabelas 6 e 7, encontram-se os rendimentos das coletas das folhas e frutos de *L. trifolia* dos dois locais, os rendimentos foram obtidos após a secagem e trituração do material vegetal.

Tabela 6 - Rendimento do material vegetal coletado em Peirópolis

Material vegetal	Massa <i>in natura</i> (Kg)	Massa seca (Kg)	Rendimento (%)
Folhas (FoPe)	2,000	0,797	39,8
Frutos (FrPe)	1,380	0,362	26,2

Tabela 7 - Rendimento do material vegetal coletado em Pontal

Material vegetal	Massa <i>in natura</i> (Kg)	Massa seca (Kg)	Rendimento (%)
Folhas (FoPo)	2,200	1,025	46,6
Frutos (FrPo)	1,600	0,727	45,4

4.2 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO - LÍQUIDO

O rendimento da extração por maceração com etanol 98% a temperatura ambiente (Tabela 8), mostra a diferença dos rendimentos de cada órgão da planta de acordo com o ponto de coleta. O rendimento dos frutos do local 1 (13,07%) foi maior do que o das folhas (9,7%) do mesmo local e para o local 2 as folhas apresentaram (8,6%) o rendimento foi maior do que o dos frutos (5,6%), o que pode estar relacionado a quantidade de metabólitos presentes nos órgãos da planta.

Tabela 8 - Rendimento dos extratos etanólicos das folhas e frutos

Extração n.	Material vegetal			
	FoPe (g)	FrPe (g)	FoPo (g)	FrPo (g)
1 ^a	25,3739	13,5008	27,4156	12,2368
2 ^a	25,7042	12,6269	30,1533	8,8241
3 ^a	12,6450	9,7581	11,6782	7,5210
4 ^a	7,2893	8,4557	10,8531	7,2766
5 ^a	6,1644	5,1491	8,1489	4,5675
Total	77,1714	49,4906	88,2491	40,415
Rendimento %	9,7	13,7	8,6	5,6

Fonte: Da autora, 2017

4.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO

Os extratos etanólicos obtidos das folhas e frutos da *L. trifolia* foram solubilizados em metanol:água (9:1) e fracionados através da partição líquido-líquido com os solventes de polaridade crescente: hexano, acetato de etila e *n*-butanol (Figura 8).

Figura 8 - Massa em gramas obtida em cada fração das folhas.

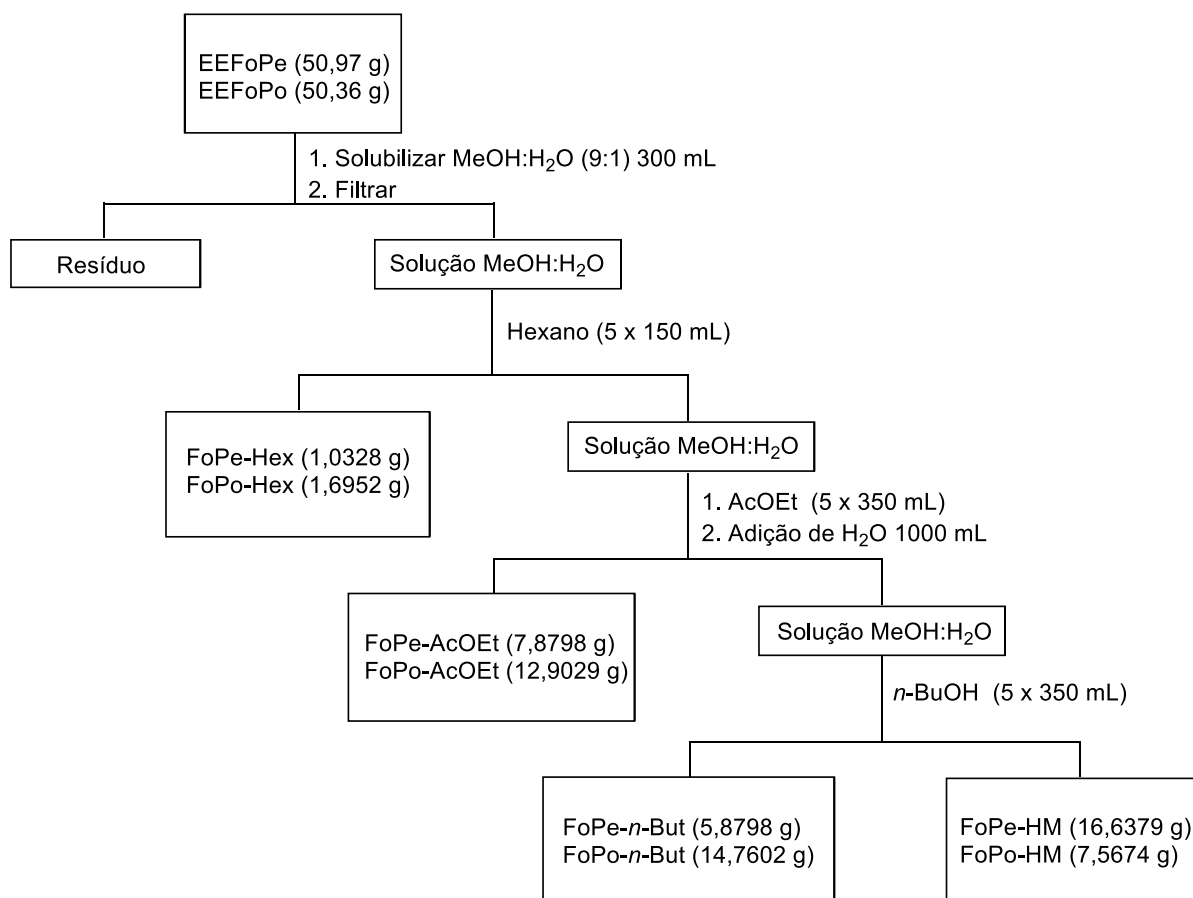
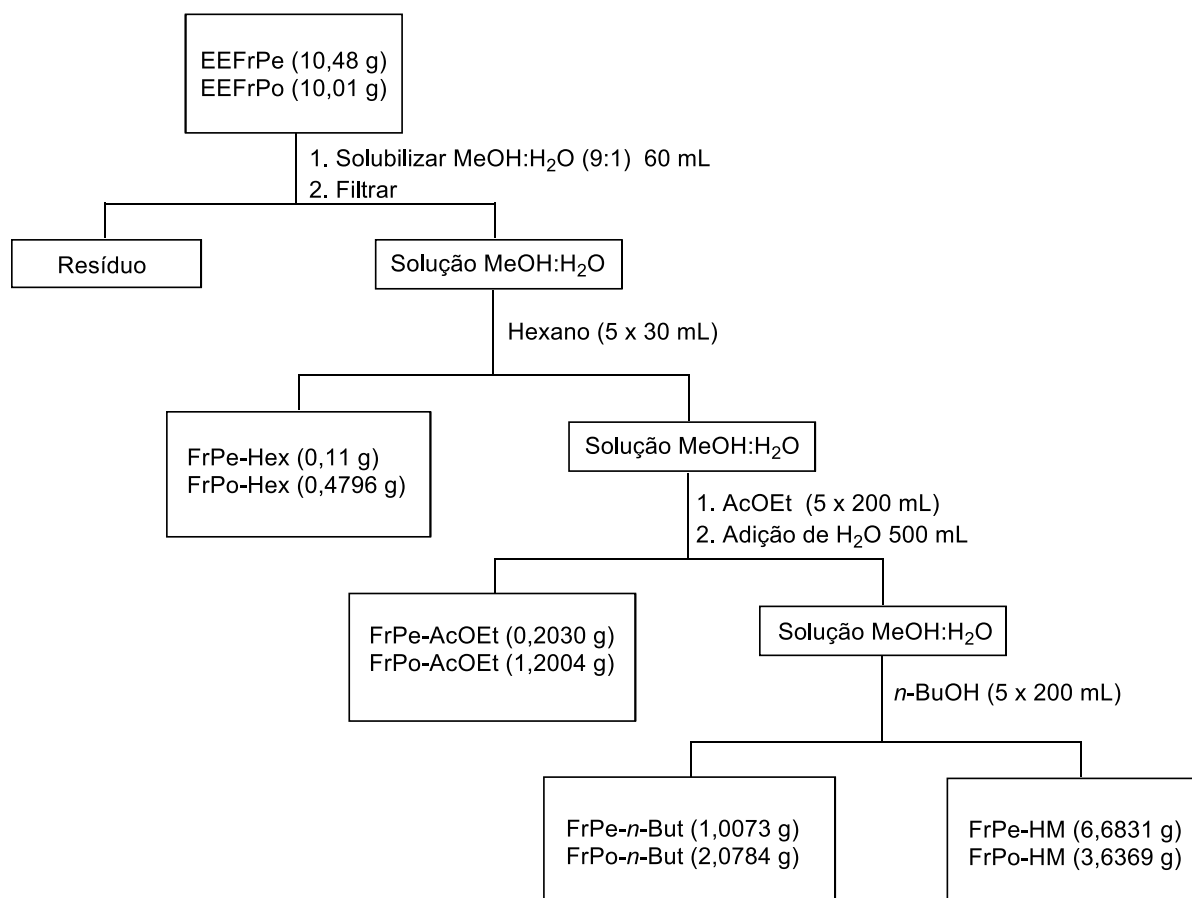


Figura 9 - Massa em gramas obtida em cada fração dos frutos.



Analisando os rendimentos (Tabela 9), é possível observar que as frações mais polares obtiveram um maior rendimento. Para FoPe a fração hidrometanólica (32,7%) foi a que obteve maior rendimento, seguida da fração acetato de etila (15,5%), já para FoPo, o maior rendimento foi a fração *n*-butanol (29,3 %), seguida da fração acetato de etila (25,6 %). Para FrPe e FrPo, as partições de maiores rendimentos foram as hidrometanólicas, seguidas das frações acetato de etila.

Tabela 9 - Rendimento da partição líquido – líquido dos extratos.

Fração	FoPe	FoPo	FrPe	FrPo
Resíduo	42,3%	26,7%	23,7%	26,3%
Hexano	2,0 %	3,4 %	1,0 %	4,8 %
Acetato de etila	15,5 %	25,6 %	1,9 %	12,0 %
<i>n</i>-butanol	11,5 %	29,3 %	9,6 %	20,8 %
Metanol - Água	32,7 %	15,0 %	63,8 %	36,3 %

4.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA

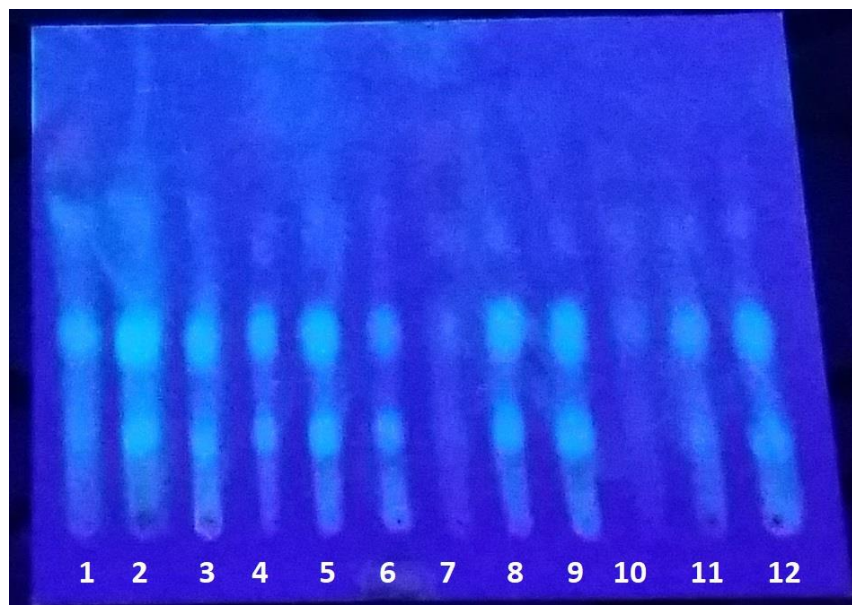
Foi realizada a triagem fitoquímica com os extratos etanólicos das folhas e frutos da *L. trifolia*, para análise das classes de metabólitos presentes nos extratos (tabela 10), as amostras foram solubilizadas em metanol, aplicadas em placas de CCD e a fase móvel utilizada foi hexano:acetato de etila (6:4). Após o desenvolvimento das cromatoplasas, elas foram reveladas com reveladores químicos que sugerem a presença de determinadas classes metabólitos secundários.

Tabela 10 - Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas e frutos

Amostra	NP/PEG	Anisaldeído	Vanilina	Ácido fosfomolibdico
EEFoPo	+	+	+	+
EEFrPo	+	+	+	+
EEFoPe	+	+	+	+
EEFrPe	+	+	+	+

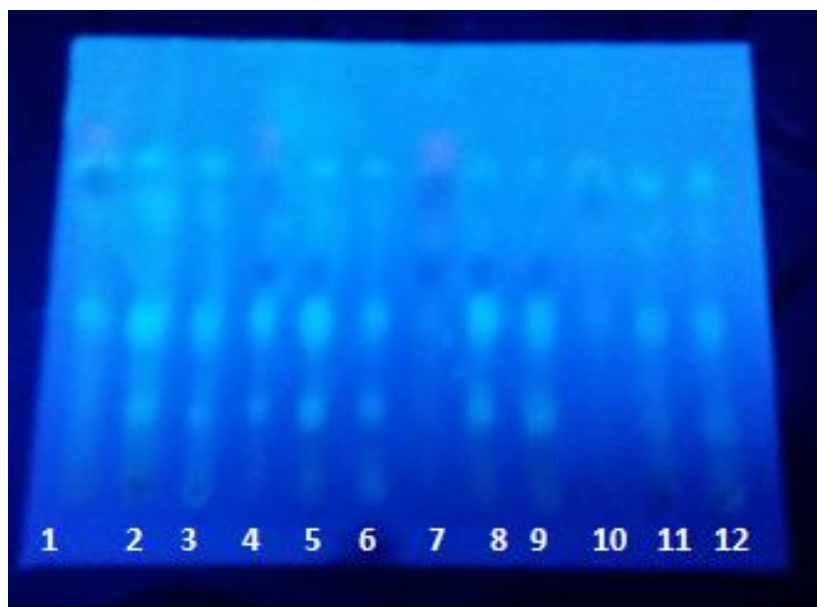
As frações acetato de etila, *n*-butanol e hidrometanólica foram submetidas a triagem fitoquímica com os reveladores NP/PEG (Figura 10) e Liebermann- Burchard (Figura 11) e foi observado maior intensidade dos metabólitos quando revelados com NP/PEG, o que sugere a presença de compostos fenólicos nessas amostras.

Figura 10 - Frações acetato de etila, *n*-butanol e hidrometanólica reveladas com NP/PEG



¹ FoPoAcOEt, ² FoPonBut, ³ FoPoHM, ⁴ FrPoAcOEt, ⁵ FrPonBut, ⁶ FrPoHM, ⁷ FoPeAcOEt, ⁸ FoPenBut, ⁹ FoPeHM, ¹⁰ FrPeAcOEt, ¹¹ FrPenBut, ¹² FrPeHM.

Figura 11 - Frações acetato de etila, *n*-butanol e hidrometanólica reveladas com Liebermann- Burchard

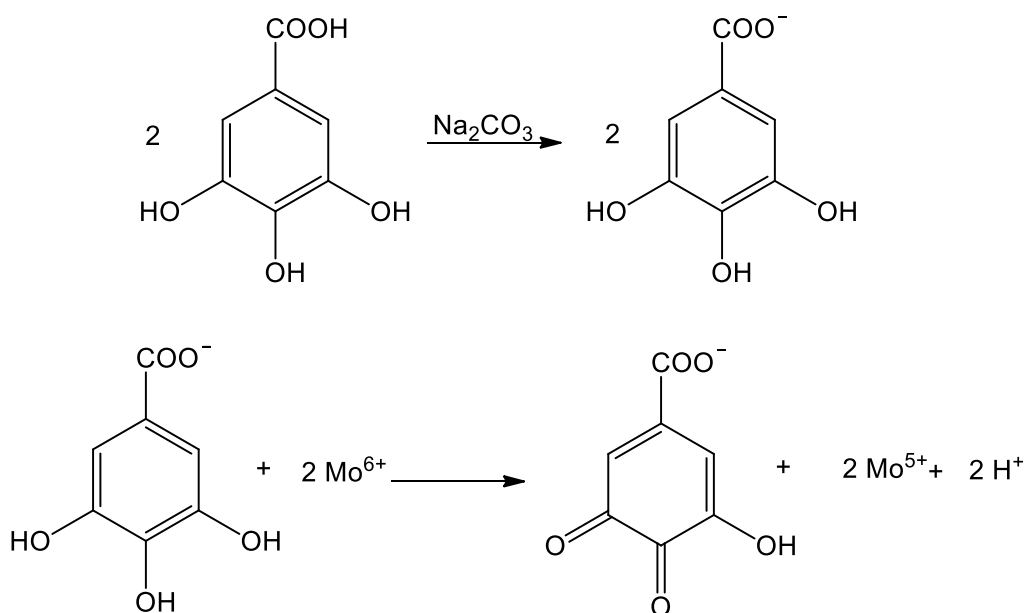


¹ FoPoAcOEt, ² FoPonBut, ³ FoPoHM, ⁴ FrPoAcOEt, ⁵ FrPonBut, ⁶ FrPoHM, ⁷ FoPeAcOEt, ⁸ FoPenBut, ⁹ FoPeHM, ¹⁰ FrPeAcOEt, ¹¹ FrPenBut, ¹² FrPeHM.

4.5 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Para análise de teor de fenóis totais, foi utilizado o método espectrofotométrico com reagente Folin - Ciocalteau (coloração amarelo), mistura de ácido fosfomolibdico e ácido fosfotungstico, onde o molibdênio está no estado de oxidação (VI). Os compostos fenólicos em meio básico formam fenolatos, que atuam como agentes redutores na reação com o Folin - Ciocalteau (Figura 12), o estado de oxidação do molibdênio após a reação passa a ser (V) e possui coloração azul, o que permite a quantificação dos compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 12 - Reação do ácido gálico com molibdênio



Fonte: Oliveira et al., 2009

Para calcular o teor de fenóis das amostras, foi construída uma curva de calibração da reação de ácido gálico (utilizado como padrão) com o Folin-Ciocalteau em meio básico versus a concentração de ácido gálico. A absorbância dos extratos e frações foram realizados em triplicata e os cálculos foram realizados pela interpolação dos valores de absorbância obtidos com a curva de calibração (SOUSA et al., 2007).

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteau, são expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Teor de fenóis totais das folhas *L. trifolia*.

Material Vegetal		Fenóis totais (mg EAG/g extrato)
Folhas Po	EEFoPo	332,2 ± 0,6
	FoPo Hex	70,1 ± 1,1
	FoPo AcOEt	363,1 ± 3,7
	FoPo <i>n</i> -But	409,4 ± 3,2
	FoPo HM	169,4 ± 1,7
Folhas Pe	EEFoPe	202,1 ± 1,9
	FoPe Hex	72,7 ± 9,8
	FoPe AcOEt	254,1 ± 8,0
	FoPe <i>n</i> -But	151,0 ± 0,8
	FoPe HM	298,7 ± 6,9

Tabela 12 - Teor de fenóis totais dos frutos de *L. trifolia*.

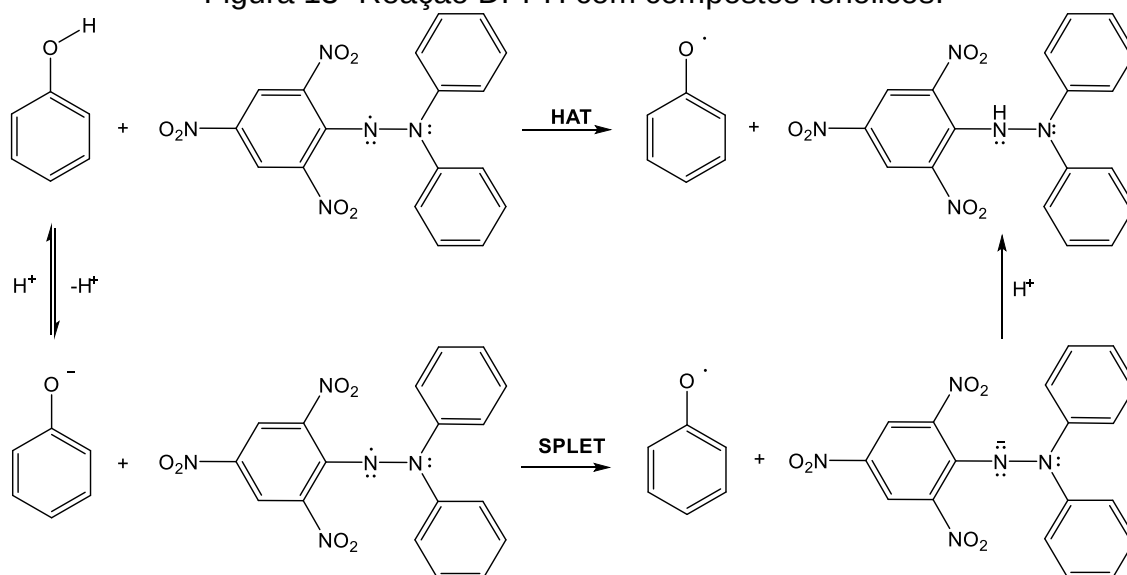
Material Vegetal		Fenóis totais (mg EAG/g extrato)
Frutos Po	EEFrPo	123,2 ± 5,1
	FrPo Hex	3,9 ± 0,4
	FrPo AcOEt	152,8 ± 9,4
	FrPo <i>n</i> -But	249,4 ± 8,2
	FrPo HM	90,9 ± 1,2
Frutos Pe	EEFrPe	43,9 ± 4,1
	FrPe Hex	11,7 ± 2,1
	FrPe AcOEt	216,9 ± 5,6
	FrPe <i>n</i> -But	183,2 ± 1,2
	FrPe HM	118,9 ± 1,6

As frações acetato de etila e *n*-butanol foram as que apresentaram maiores valores de compostos fenólicos, somente as folhas Pe apresentaram como maiores valores as frações acetato de etila e hidrometanólica.

4.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes, devido a sua capacidade de sequestro de radicais livres. O potencial antioxidante foi realizado pelo método de sequestro do radical DPPH. Os mecanismos que ocorrem durante este método são transferência de átomos de hidrogênio (“hydrogen atom transfer” – HAT) e transferência de elétrons de perda sequencial de prótons (“sequential próton loss electron transfer” – SPLET) (Figura 13). O potencial antioxidante (Tabelas 13 e 14) dos extratos e frações das folhas e frutos da *L. trifolia* foi expresso em concentração eficiente (CE₅₀) que é a concentração necessária para consumir 50% de DPPH (SOUSA et al., 2015)

Figura 13- Reação DPPH com compostos fenólicos.



Fonte: SOUSA et al., 2015

Tabela 13 - Potencial antioxidante das folhas *L. trifolia*.

	Amostra	DPPH (CE₅₀, µg/mL)
Folhas Po	EEFoPo	7,0 ± 0,4
	FoPo Hex	> 200
	FoPo AcOEt	6,9 ± 0,2
	FoPo nBut	5,2 ± 0
	FoPo HM	16,1 ± 1,1
Folhas Pe	EEFoPe	12,1 ± 0,1
	FoPe Hex	> 200
	FoPe AcOEt	12,4 ± 0,2
	FoPe nBut	8,5 ± 0,1
	FoPe HM	8,6 ± 0,2
Controle Positivo	BHT	4,5 ± 0,1

Tabela 14 - Potencial antioxidante dos frutos *L. trifolia*.

	Amostra	DPPH (CE₅₀, µg/mL)
Frutos Po	EEFrPo	28,7 ± 0,7
	FrPo Hex	> 200
	FrPo AcOEt	21,9 ± 0,9
	FrPo nBut	10,4 ± 0,1
	FrPo HM	37,0 ± 1,1
Frutos Pe	EEFrPe	192,9 ± 0,9
	FrPe Hex	> 200
	FrPe AcOEt	17,9 ± 0,2
	FrPe nBut	19,9 ± 0,8
	FrPe HM	40,1 ± 0,3
Controle Positivo	BHT	5,9 ± 0,2

De acordo com os valores de CE_{50} das amostras, foi possível classificar a atividade antioxidante como elevada em valores menores que 50 $\mu\text{g/mL}$, moderada para 50–100 $\mu\text{g/mL}$, baixa para 100–200 $\mu\text{g/mL}$ e acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ pode ser considerada inativa (REYNERTSON et al., 2005 apud SOUSA et al., 2015).

As frações como acetato de etila e *n*-butanol das folhas e dos frutos dos dois pontos de coleta apresentaram menores valores de CE_{50} e maior concentração de fenóis totais, fato que pode ser justificado pela capacidade dos compostos fenólicos em formar radicais menos reativos que são estabilizados por ressonância.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.7.1 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi expressa em concentração inibitória mínima (CIM), para as bactérias aeróbias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tabela 15) e para as bactérias anaeróbias *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii* (Tabelas 16 e 17).

Tabela 15 - Bactérias aeróbias.

Amostras	CIM (µg/mL)			
	ATCC 25175 ^a	ATCC 49456 ^b	ATCC 10556 ^c	ATCC 43717 ^d
FoPo Hex	400	>400	>400	200
FoPo AcOEt	>400	400	>400	400
FoPo <i>n</i> But	>400	>400	>400	>400
FoPo HM	>400	>400	>400	>400
FrPo Hex	>400	>400	>400	>400
FrPo AcOEt	>400	>400	>400	>400
FrPo <i>n</i> But	>400	>400	>400	>400
FrPo HM	>400	>400	>400	>400
FoPe Hex	>400	>400	>400	>400
FoPe AcOEt	400	200	400	200
FoPe <i>n</i> But	>400	>400	>400	>400
FoPe HM	>400	>400	>400	>400
FrPe Hex	>400	>400	>400	>400
FrPe AcOEt	>400	>400	>400	>400
FrPe <i>n</i> But	>400	>400	>400	>400
FrPe HM	>400	>400	>400	>400
Clorexidina	0,922	1,844	1,844	0,922

^a*Streptococcus mutans* (ATCC 25175); ^b*Streptococcus mitis* (ATCC 49456); ^c*Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556); ^d*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717).

Tabela 16 - Bactérias anaeróbias.

Amostras	CIM (µg/mL)		
	ATCC 33277 ^a	ATCC 25586 ^b	ATCC19039 ^c
FoPo Hex	>400	>400	>400
FoPo AcOEt	>400	>400	>400
FoPo <i>n</i> But	>400	>400	>400
FoPo HM	>400	>400	>400
FrPo Hex	>400	>400	>400
FrPo AcOEt	>400	>400	>400
FrPo <i>n</i> But	>400	>400	>400
FrPo HM	>400	>400	>400
FoPe Hex	>400	>400	>400
FoPe AcOEt	>400	>400	>400
FoPe <i>n</i> But	>400	>400	>400
FoPe HM	>400	>400	>400
FrPe Hex	>400	>400	>400
FrPe AcOEt	>400	>400	>400
FrPe <i>n</i> But	>400	>400	>400
FrPe HM	>400	>400	>400

^a*Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277); ^b*Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586); ^c*Actinomyces naeslundii* (ATCC19039).

Tabela 17 - Controle das bactérias anaeróbias.

Microrganismos	Metronidazol (µg/mL)
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	0,74
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	1,48

Em se tratando das bactérias aeróbias frações FoPoHex e FoPeAcOEt apresentaram moderada atividade antibacteriana nas concentrações avaliadas, para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (CIM 200 µg/mL) e somente a fração FoPeAcOEt apresentou atividade moderada contra *Streptococcus mitis* (CIM 200 µg/mL) (HOLETZ et al., 2002).

4.7.2 Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi expressa em CIM (Tabela 18), com esses valores de CIM pode-se classificar a atividade dos extratos como boa para valores menores que 100 µg/mL, moderada para 100–500 µg/mL, baixa para 500–1000 µg/mL e acima de 1000 µg/mL pode ser considerada inativa (HOLETZ et al., 2002).

Tabela 18 - Atividade antifúngica.

Amostras	CIM (µg/mL)		
	ATCC 28366 ^a	ATCC 13803 ^b	ATCC 15126 ^c
FoPo Hex	750	750	46,87
FoPo AcOEt	23,43	93,75	5,86
FoPo nBut	3000	3000	>3000
FoPo HM	750	750	750
FrPo Hex	>3000	>3000	375
FrPo AcOEt	93,75	93,75	1,46
FrPo nBut	93,75	93,75	>3000
FrPo HM	>3000	>3000	>3000
FoPe Hex	375	750	46,87
FoPe AcOEt	46,87	93,75	11,72
FoPenBut	>3000	>3000	46,87
FoPe HM	>3000	>3000	>3000
FrPe Hex	>3000	>3000	375
FrPe AcOEt	93,75	93,75	2,93
FrPe nBut	46,87	93,75	2,93
FrPe HM	>3000	>3000	>3000

^a*C. albicans* (ATCC 28366); *C. tropicalis* (ATCC 13803); *C. glabrata* (ATCC 15126).

As frações acetato de etila apresentaram boa atividade para todas as linhagens de *Candida* avaliadas, com destaque para as frações FrPoAcOEt (1,46 µg/mL), FrPeAcOEt (2,93 µg/mL) e FrPenBut (2,93 µg/mL) que apresentaram valores de CIM

contra *C. glabrata* próximos ao controle positivo anfotericina B (0,5–1,0 µg/mL) (Tabela 19).

Tabela 19 - Controle das leveduras.

Microrganismos	Anfotericina (µg/mL)
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1,0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

As frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas e dos frutos foram selecionados para a realização dos ensaios de citotoxicidade (Figura 14), já que apresentaram valores promissores no ensaio antifúngico. Segundo Rios e Recio (2005) são considerados promissores valores de CIM até 100 µg/mL para extratos.

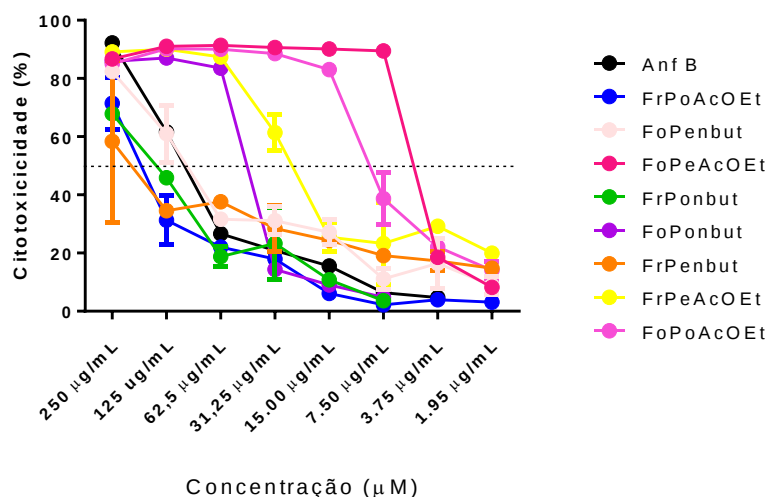
A citotoxicidade foi expressa em concentração citotóxica onde 50% das células são viáveis (CC₅₀) (CASE et al., 2006).

As frações FrPonbut, FoPonbut, FrPenbut apresentaram menor toxicidade do que o fármaco padrão (anfotericina B) e FoPenbut apresentou toxicidade similar ao medicamento.

Figura 14 - Citotoxicidade das frações acetato de etila e *n*-butanol

Células Vero

Anf B	FrPonbut	FrPoAcOet	FoPonbut	FrPeAcOEt	FoPoAcOet	FrPenbut	FoPenbut	FoPeAcOEt
179.0	323.7	89.96	289.2	44.23	16.43	475.8	153.4	9.987



Com os valores de CIM obtidos no ensaio antifúngico e os valores de CC₅₀, foi calculado o índice de seletividade (IS) (Tabela 20) utilizando a seguinte equação $IS = \log (CC_{50}/CIM)$. O valor de IS mostra se o extrato ou fração é seletivo para inibir o crescimento de uma célula saudável ou o crescimento dos microrganismos. Valores de IS positivos e próximos a 2 possuem potencial para ser estudados, já que esses valores demonstram maior seletividade para células infectadas, enquanto valores negativos demonstram maior citotoxicidade (CASE et al., 2006).

Tabela 20 - Índice de seletividade (IS).

Amostras	IS		
	ATCC 28366 ^a	ATCC 13803 ^b	ATCC 15126 ^c
FoPo AcOEt	-0,15	-0,76	0,45
FoPo <i>n</i> But	-1,02	-1,02	-
FrPo AcOEt	-0,02	-0,02	1,79
FrPo <i>n</i> But	0,54	0,54	-
FoPe AcOEt	-0,67	-0,97	-0,07
FoPenBut	-	-	0,51
FrPe AcOEt	-0,33	-0,33	1,18
FrPe <i>n</i> But	1,00	0,71	2,21

^a*C. albicans* (ATCC 28366); ^b*C. tropicalis* (ATCC 13803); ^c*C. glabrata* (ATCC 15126).

Através da análise dos valores de IS foi possível concluir que as frações mais ativas no ensaio antifúngico (FrPoAcOEt, FrPeAcOEt e FrPenBut) foram mais seletivas contra o microorganismo *C. glabrata* do que para as células saudáveis. O microorganismo *C. glabrata* está entre as principais causas de candidíase em pessoas imunocomprometidas, e é resistente ao tratamento convencional com o antifúngico fluconazol, o que demonstra a importância de estudar compostos que são seletivos contra este microorganismo (JUNIOR FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999).

4.9 ANÁLISE POR CLAE-EM DAS FRAÇÕES DE *L. trifolia*

As frações FrPeAcOEt, FrPoAcOEt, FrPenbut, FrPonbut, FoPeAcOEt e FoPoAcOEt foram selecionadas por apresentarem melhores resultados no ensaio antifúngico, para serem analisadas por CLAE-EM, com a ionização por *electrospray* (IES), no modo negativo.

Nos cromatogramas (Figuras 15-20) só foram considerados os picos cromatográficos, nos diferentes tempos de retenção (t_R), com área maior que 5%.

Figura 15 - Cromatograma da fração FoPeAcOEt.

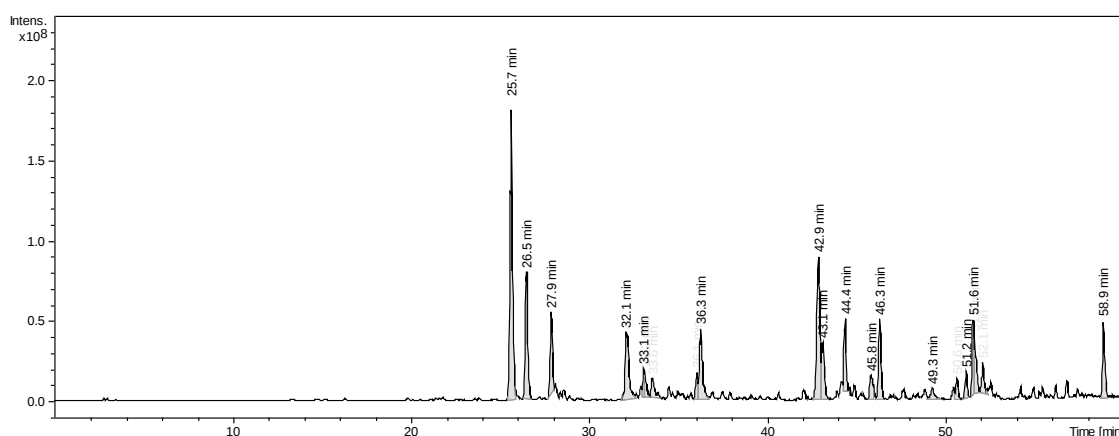


Figura 16 - Cromatograma da fração FoPoAcOEt

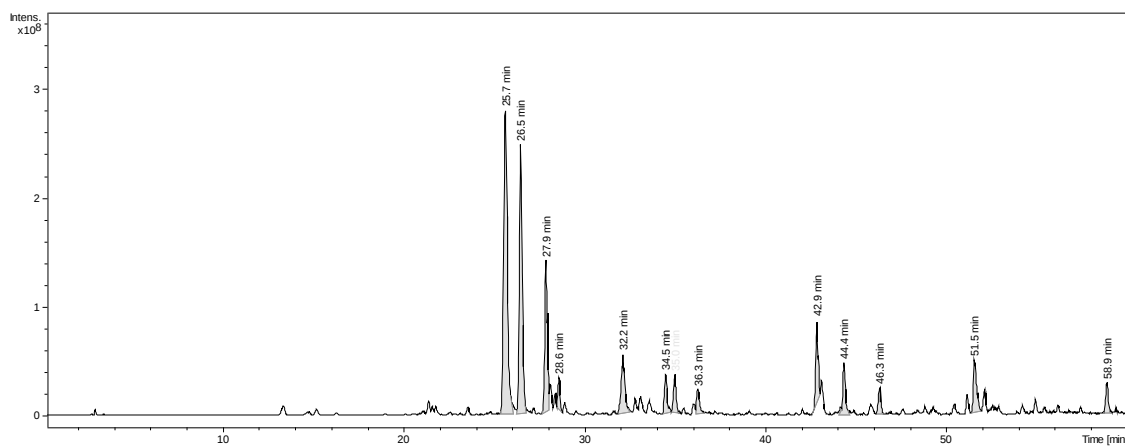


Figura 17 - Cromatograma da fração FrPeAcOEt

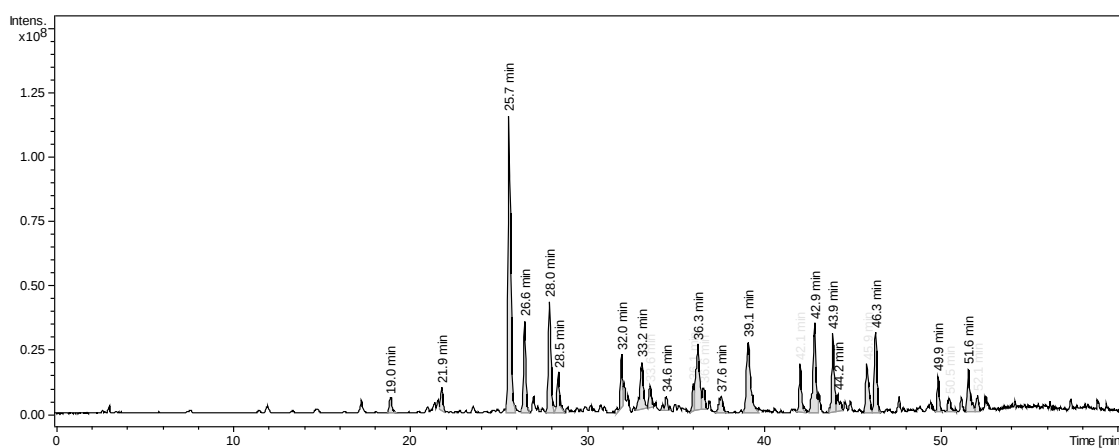


Figura 18 - Cromatograma da fração FrPoAcOEt.

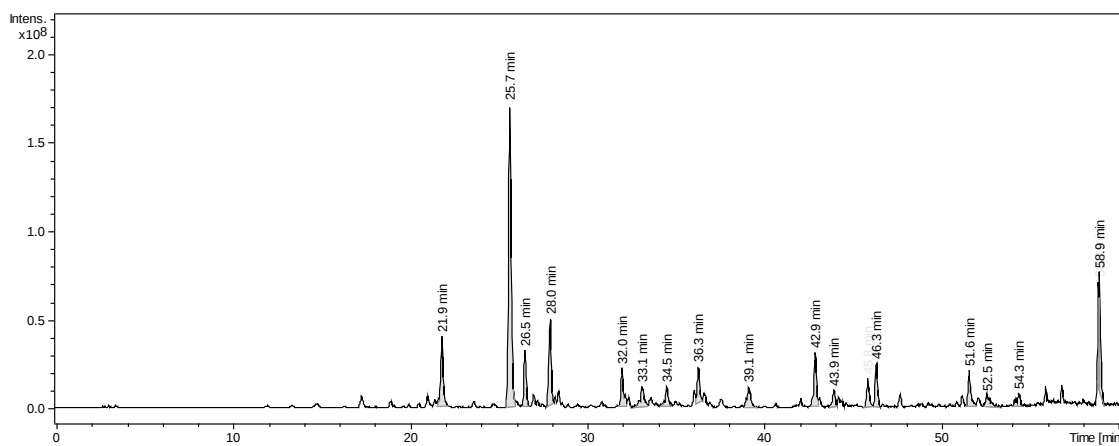


Figura 19 - Cromatograma da fração FrPenbut.

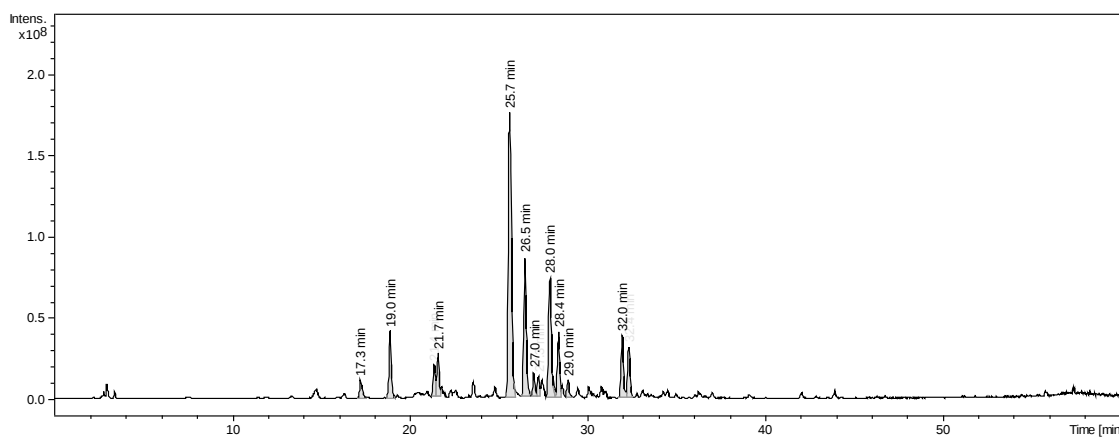
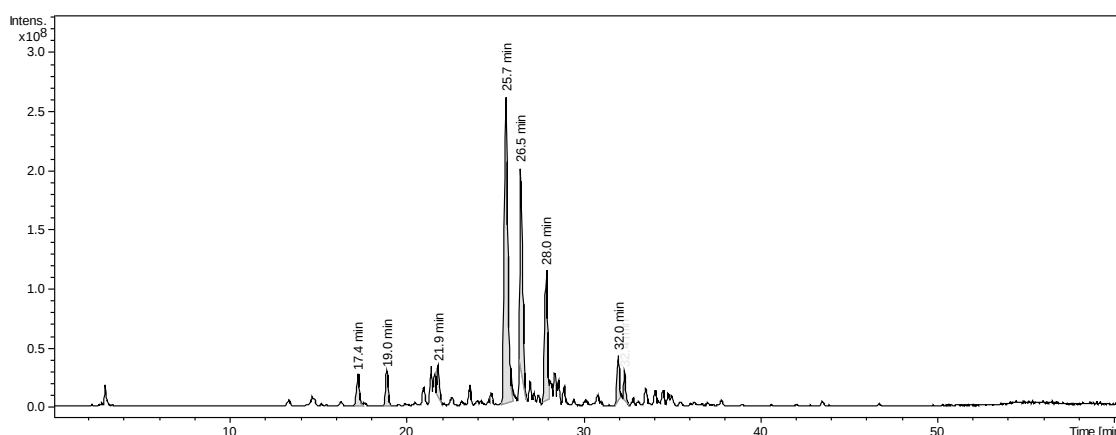


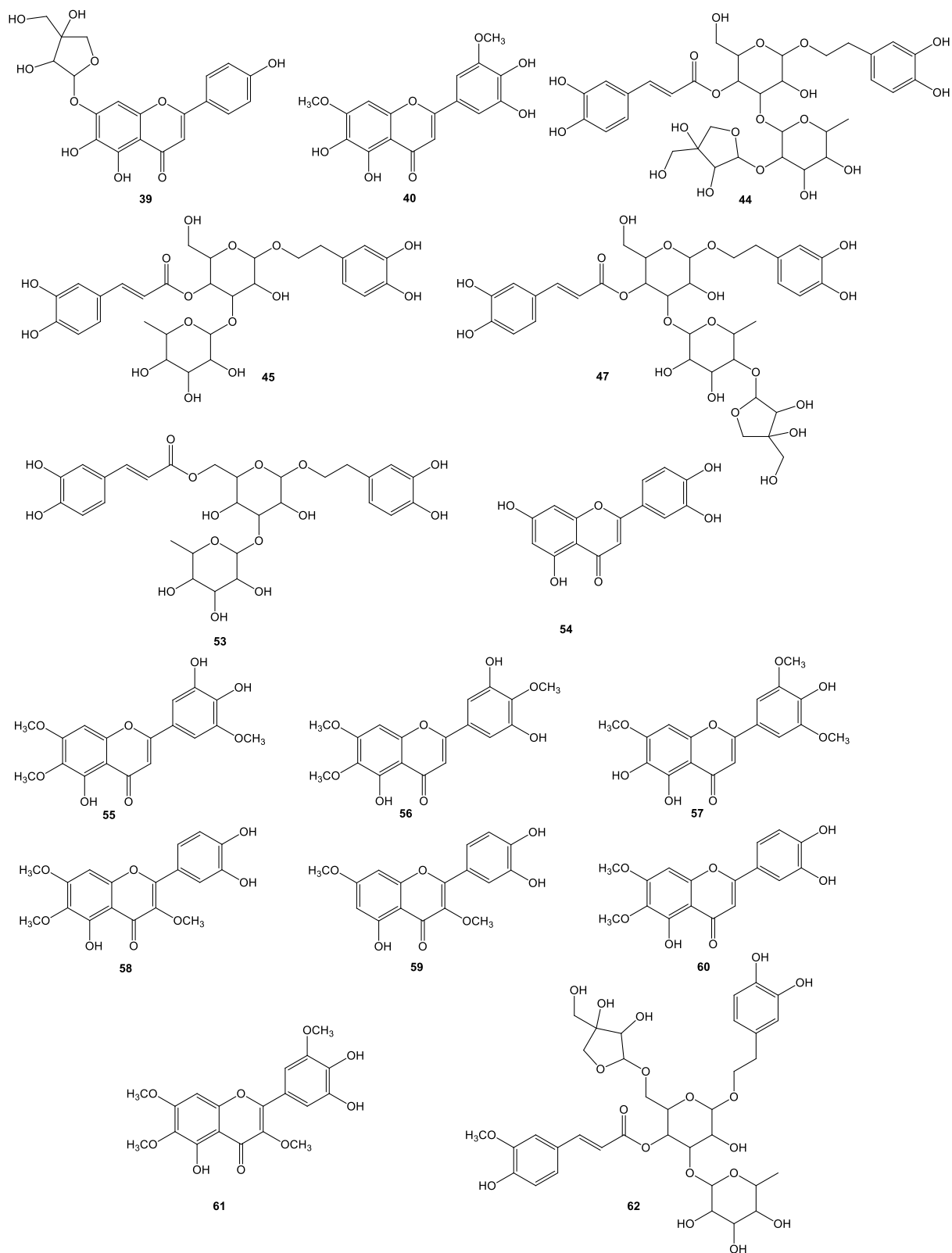
Figura 20 - Cromatograma da fração FrPonbut



Para cada pico nos cromatogramas, foi selecionado um espectro de massas (EM-IES(-)), que foi correlacionado a uma molécula desprotonada ($[M - H]^-$). A partir da análise dos espectros e por comparação com compostos fenólicos identificados na literatura da mesma espécie e em outras plantas do gênero *Lantana*, foi possível identificar 15, ; compostos (Figura 21), sendo eles o esculareina-7-O-D-apiofuranosídeo (**39**); 5,6,4',5'-tetrahidroxi-7,3'-dimetoxiflavona (**40**); betaniosídeo F (**44**); verbascosídeo (acteosídeo) (**45**) e o samiosídeo (**47**), que são derivados fenólicos já identificados nas folhas da *L. trifolia* (JULIÃO et al., 2010).

Os compostos isoverbascosídeo (isoacteosídeo) (**53**); luteolina (**54**); hispidulina (**55**); 5,3',5'-trihidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona (**56**); 5,3',4'-trihidroxi-6,7,5'-trimetoxiflavona (**57**); penduletina (**58**); cirsiol (**59**); 3-metoxi-3,7-dimetoxi-quercetina (**60**); crisosplenitina (**61**), e o alissonosídeo (**62**) que são metabólitos identificados, inclusive em outras espécies do gênero *Lantana* (SOUSA; COSTA, 2012).

Figura 21 - Compostos fenólicos identificados nas folhas e frutos de *L. trifolia*.



Fonte: Da autora, 2017

As folhas e frutos coletados em Peirópolis e Pontal (Tabelas 21 a 25), apresentaram alguns compostos comuns nas suas frações. A partir da análise

cromatográfica e dos EMs dos picos observados na fração acetato de etila das folhas, foi possível sugerir a presença dos compostos **39**, **40**, **44**, **45**, **47**, **53**, **59** e **60** sendo que os compostos **39** e **40** estão presentes somente nas frações acetato de etila das folhas.

Os frutos dos dois locais apresentam seis compostos comuns (**44**, **45**, **47**, **53**, **61**), presentes nas frações acetato de etila e *n*-butanol. No entanto, somente na fração *n*-butanol dos frutos coletados em Peirópolis foi identificado o composto **62**.

Os compostos **55–58** foram identificados somente nas frações acetato de etila das folhas e frutos (Peirópolis), e o composto **54** foi identificado na fração acetato de etila dos frutos (Peirópolis). Assim, foi possível observar que existe uma diferença significativa dos metabólitos nos diferentes locais de coleta.

Tabela 21 - Compostos identificados nas folhas de *L. trifolia* (Peirópolis) por EM-IES(-) em alta resolução.

Fração	t_R (min)	Composto	$[M - H]^-$	Teórico	Erro (ppm)	EM
FoPeAcOEt	25,7	45 ou 53	623,1961	623,1981	-3,2	Figura 21
	26,5	44 ou 47	755,2393	755,2404	-1,5	Figura 22
	27,9	45 ou 53	623,2038	623,1981	9,1	Figura 23
	32,1	39	417,0819	417,0827	-1,9	Figura 24
	33,1	40	345,0557	345,0616	-17,1	Figura 25
	36,3	55 ou 56 ou 57 ou 58	359,0823	359,0772	14,2	Figura 26
	36,6	59 ou 60	329,0628	329,0667	-11,9	Figura 27

Figura 22 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (t_R 25,7 min).

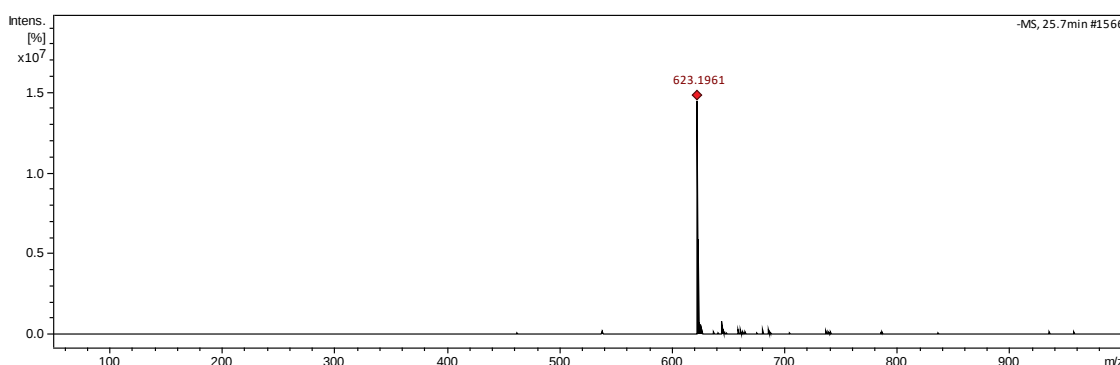


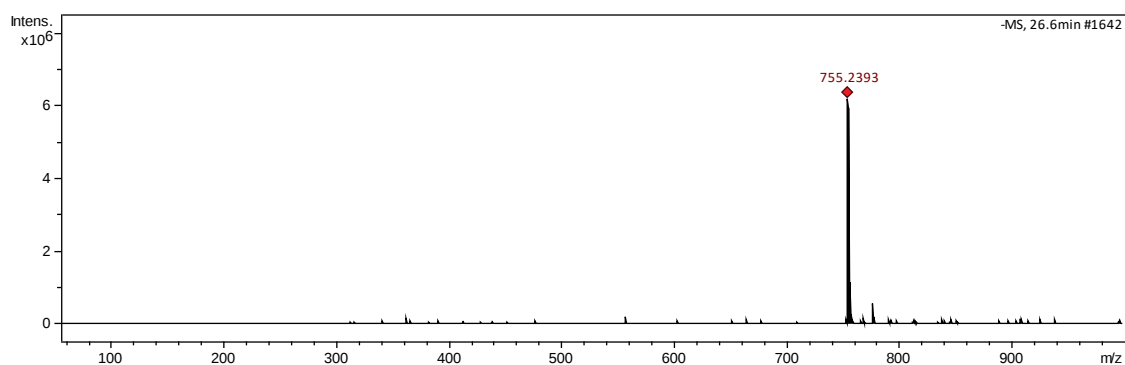
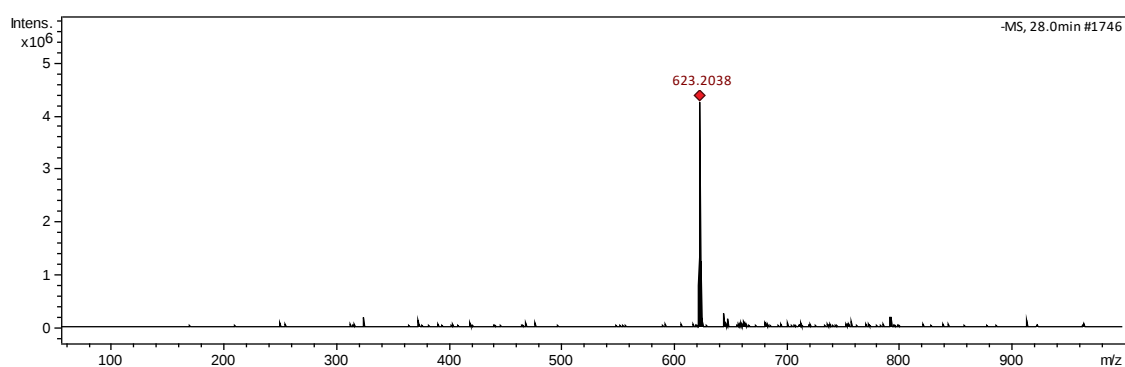
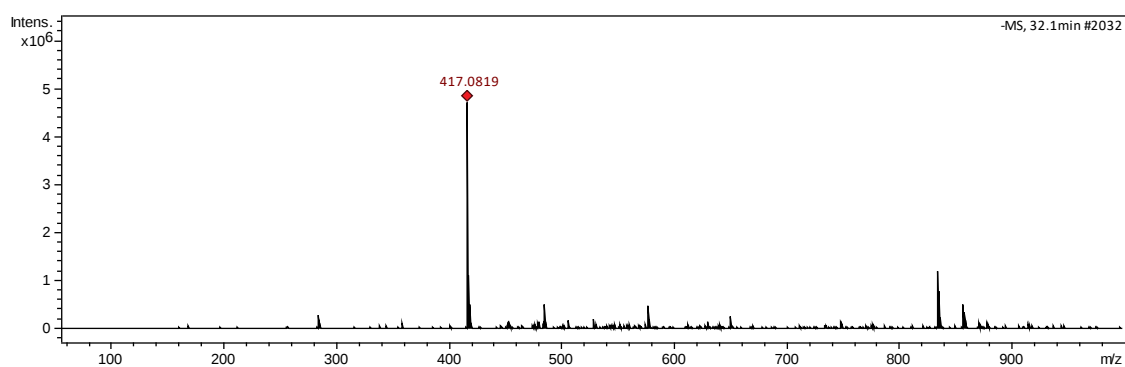
Figura 23 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (t_R 26,5 min).Figura 24 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (t_R 27,9 min).Figura 25 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (t_R 32,1 min).

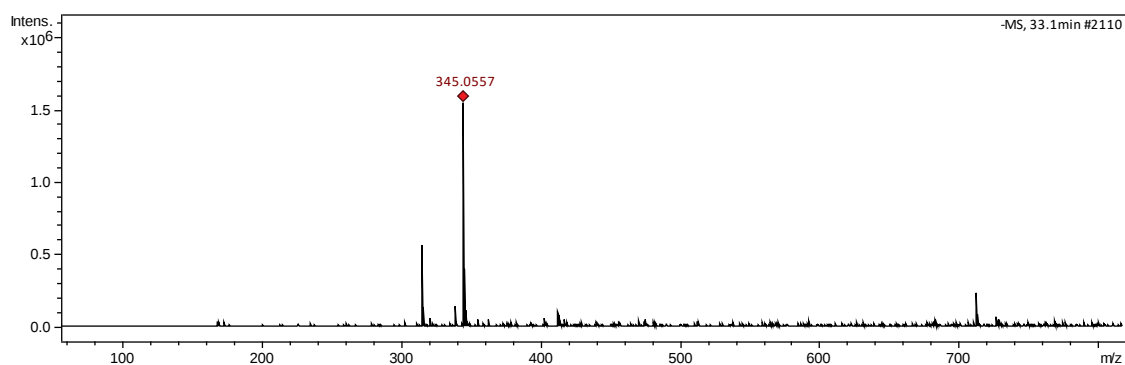
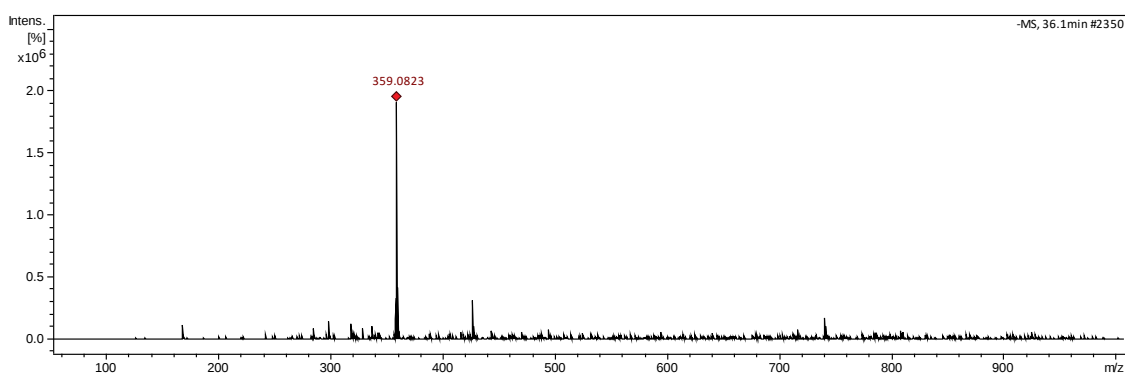
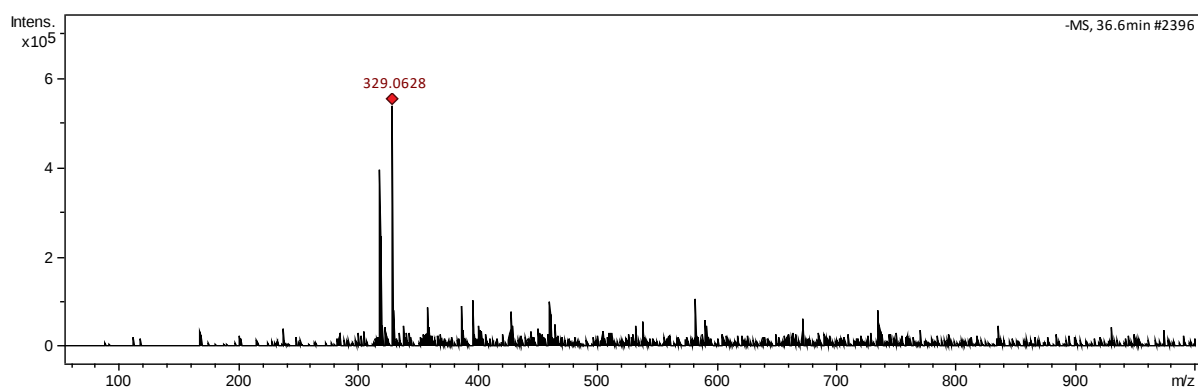
Figura 26 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (t_R 33,1 min).Figura 27 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (t_R 36,3 min).Figura 28 - EM-IES(-) da fração FoPeAcOEt (t_R 36,6 min).

Tabela 22 - Compostos identificados nos frutos de *L. trifolia* (Peirópolis) por EM-IES-(-) em alta resolução.

Fração	t_R (min)	Composto	$[M - H]^-$	Teórico	Erro (ppm)	EM
FrPeAcOEt	19,0	61	389,0919	389,0878	10,5	Figura 28
	25,7	45 ou 53	623,2026	623,1981	7,2	Figura 29
	26,6	44 ou 47	755,2519	755,2404	15,2	Figura 30
	28,0	45 ou 53	623,1958	623,1981	-3,7	Figura 31
	36,3	55 ou 56 ou 57 ou 58	359,0751	359,0772	-5,8	Figura 32
FrPenBut	19,0	61	389,0918	389,0878	10,3	Figura 33
	25,7	45 ou 53	623,1863	623,1981	-18,9	Figura 34
	26,5	44 ou 47	755,2387	755,2404	-2,2	Figura 35
	28,0	45 ou 53	623,2038	623,1981	9,1	Figura 36
	29,0	62	769,2530	769,2561	-4,0	Figura 37

Figura 29 - EM-IES-(-) da fração FrPeAcOEt (t_R 19,0 min).

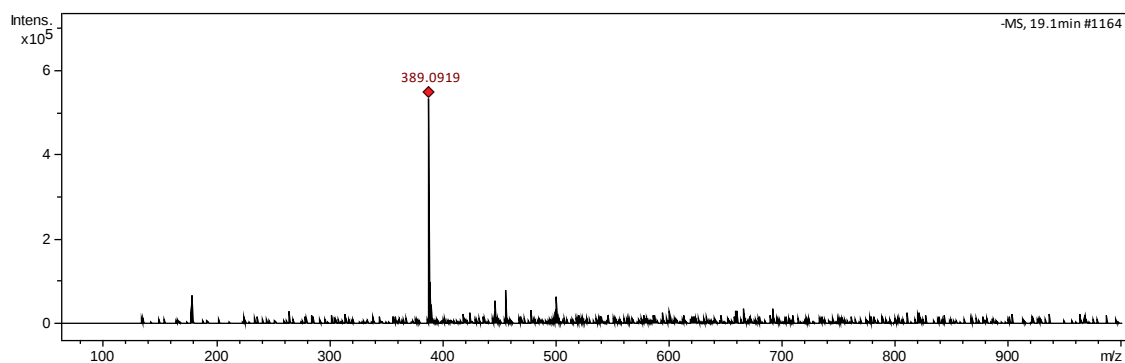


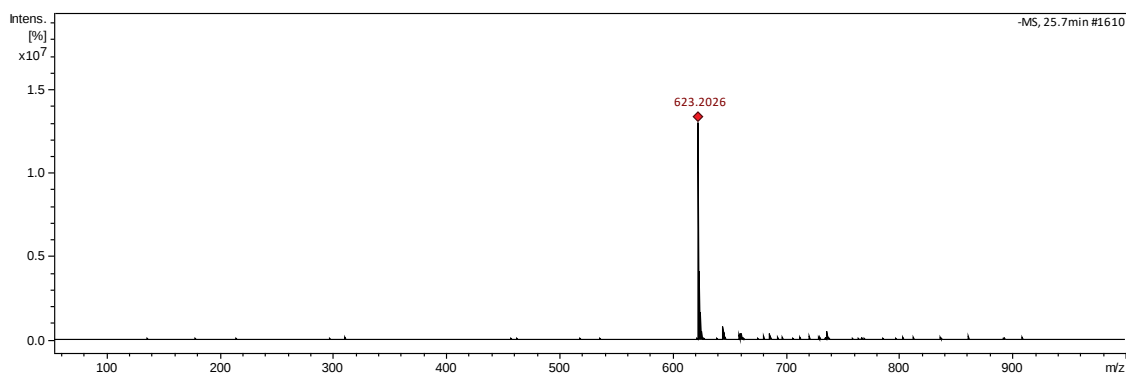
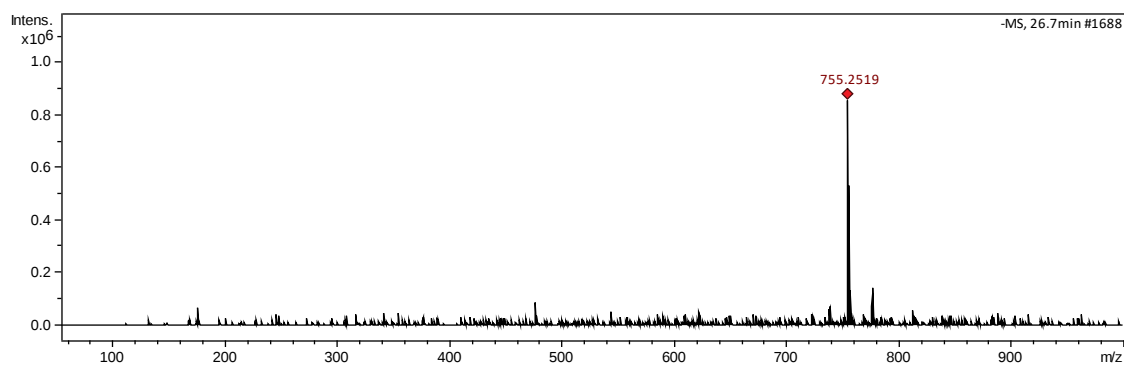
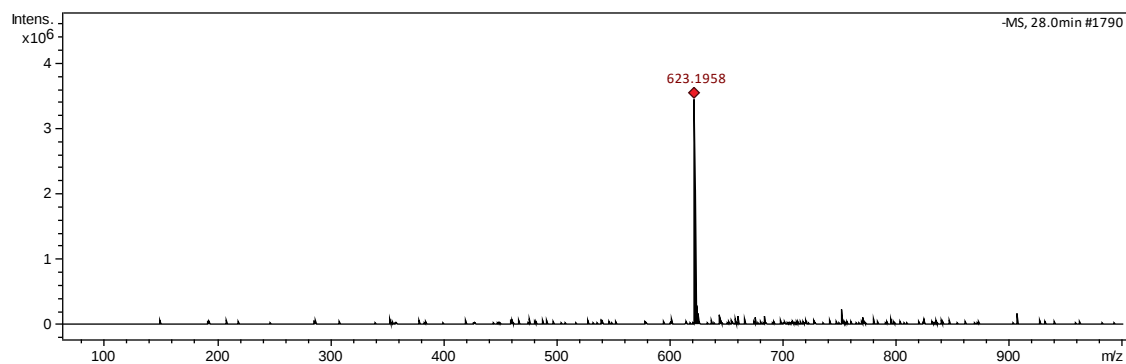
Figura 30 - EM-IES(-) da fração FrPeAcOEt (t_R 25,7 min).Figura 31 - EM-IES(-) da fração FrPeAcOEt (t_R 26,6 min).Figura 32 - EM-IES(-) da fração FrPeAcOEt (t_R 28,0 min).

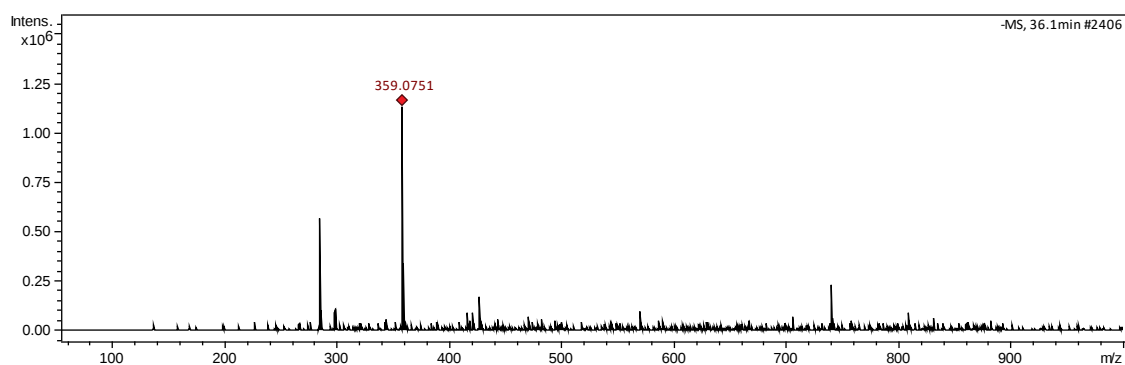
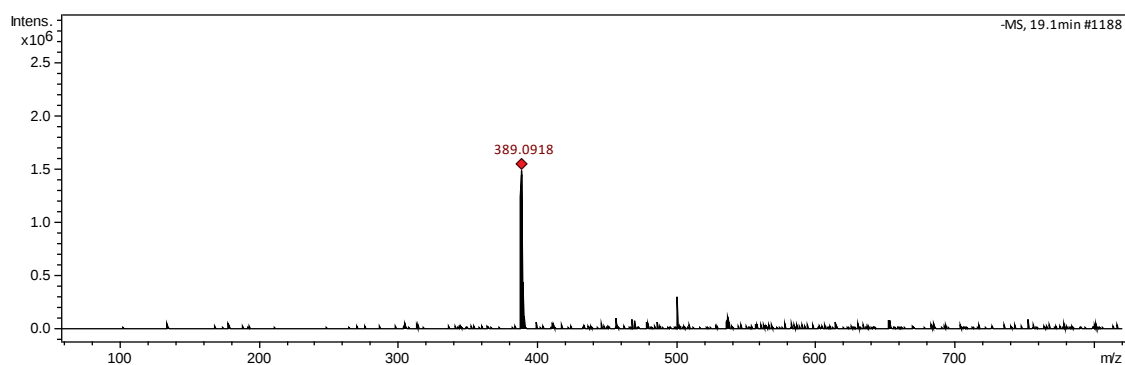
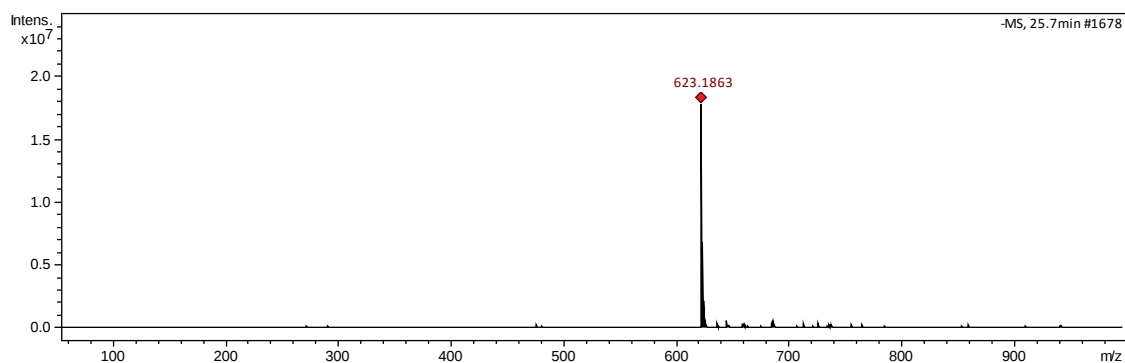
Figura 33 - EM-IES(-) da fração FrPeAcOEt (t_R 36,3 min).Figura 34 - EM-IES(-) da fração FrPenbut (t_R 19,0 min).Figura 35 - EM-IES(-) da fração FrPenbut (t_R 25,7 min).

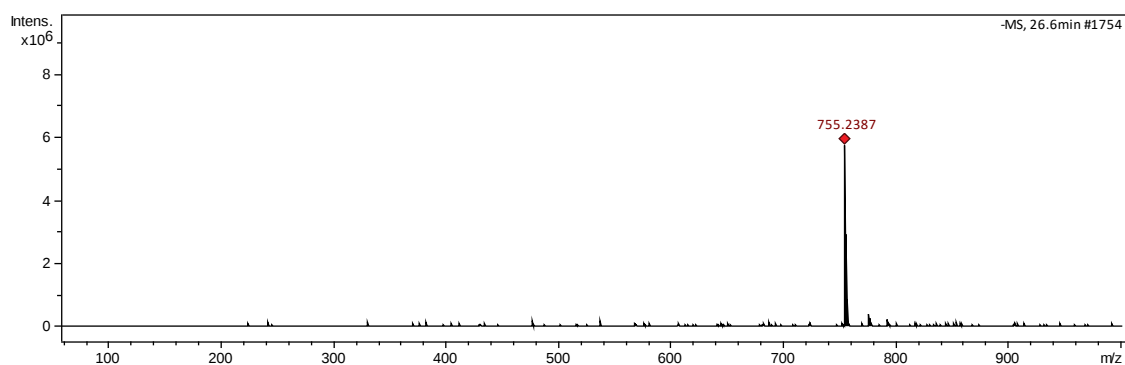
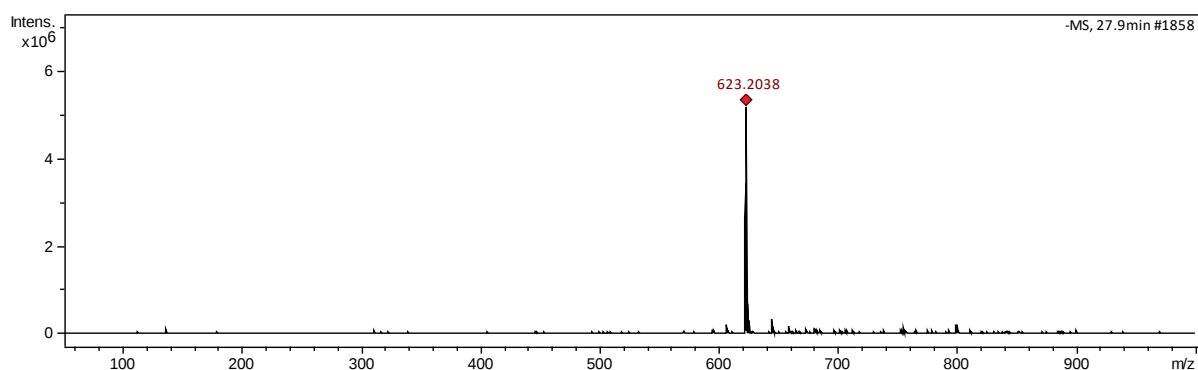
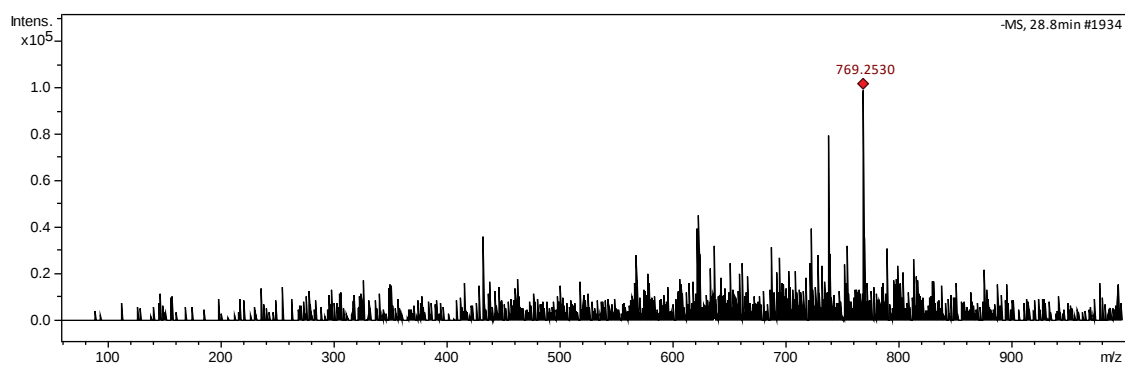
Figura 36 - EM-IES(-) da fração FrPenbut (t_R 26,5 min).Figura 37 - EM-IES(-) da fração FrPenbut (t_R 28,0 min).Figura 38 - EM-IES(-) da fração FrPenbut (t_R 29,0 min).

Tabela 23 - Compostos identificados nas folhas de *L. trifolia* (Pontal) por EM-IES(–) em alta resolução.

Fração	t_R (min)	Composto	$[M - H]^-$	Teórico	Erro (ppm)	EM
FoPoAcOEt	25,7	45 ou 53	623,1989	623,1981	1,3	Figura 38
	26,6	44 ou 47	755,2475	755,2404	9,4	Figura 39
	28,1	45 ou 53	623,1909	623,1981	11,6	Figura 40
	32,2	39	417,0776	417,0827	12,2	Figura 41
	33,4	40	345,0628	345,0616	3,5	Figura 42
	36,5	59 ou 60	329,0648	329,0667	–5,8	Figura 43

Figura 39 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 25,7 min).

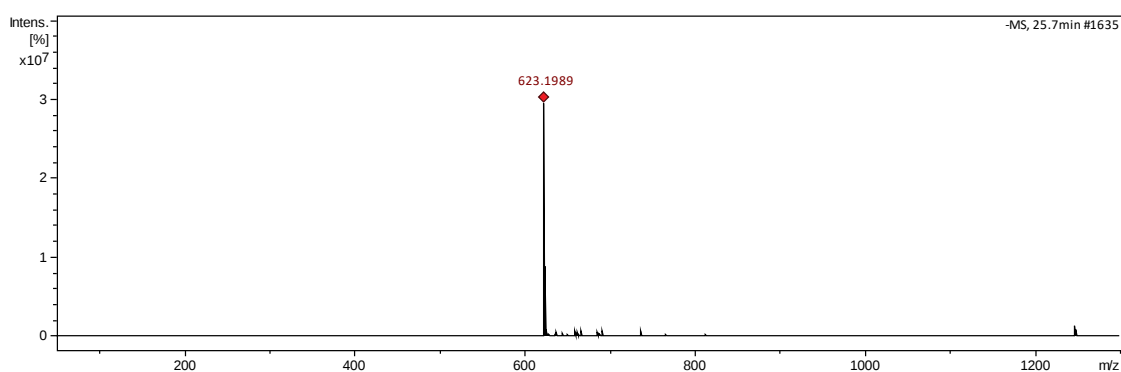


Figura 40 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 26,6 min).

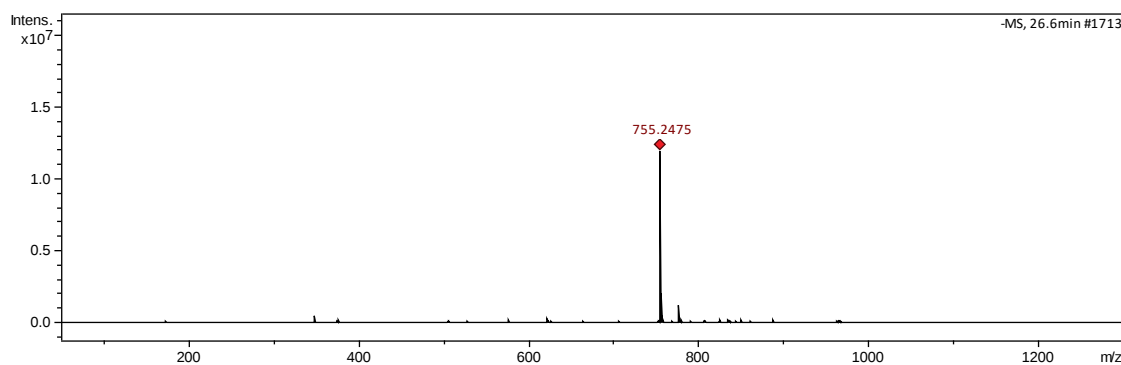


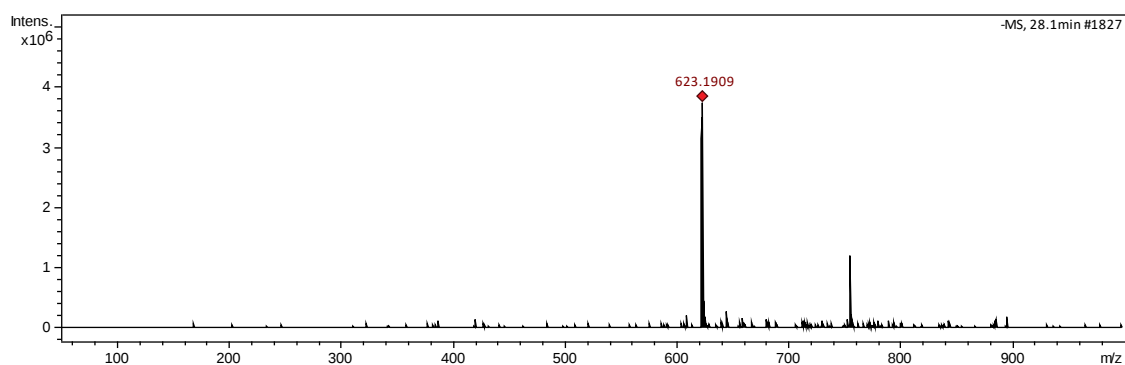
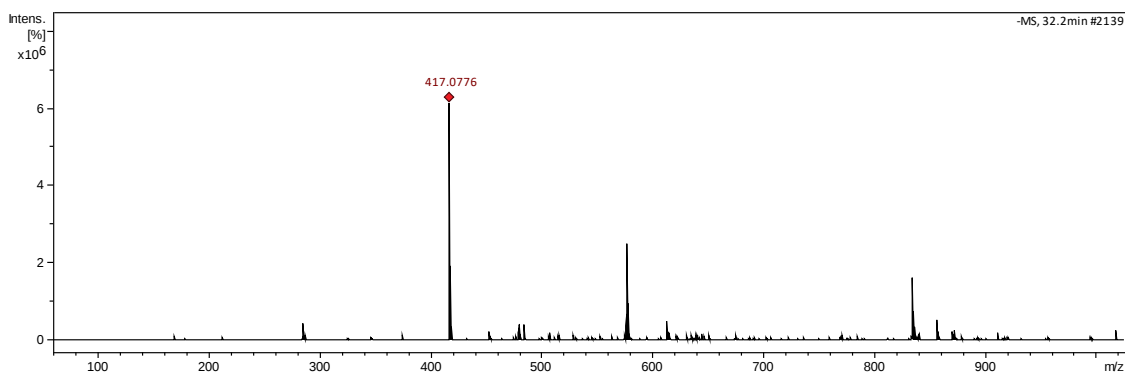
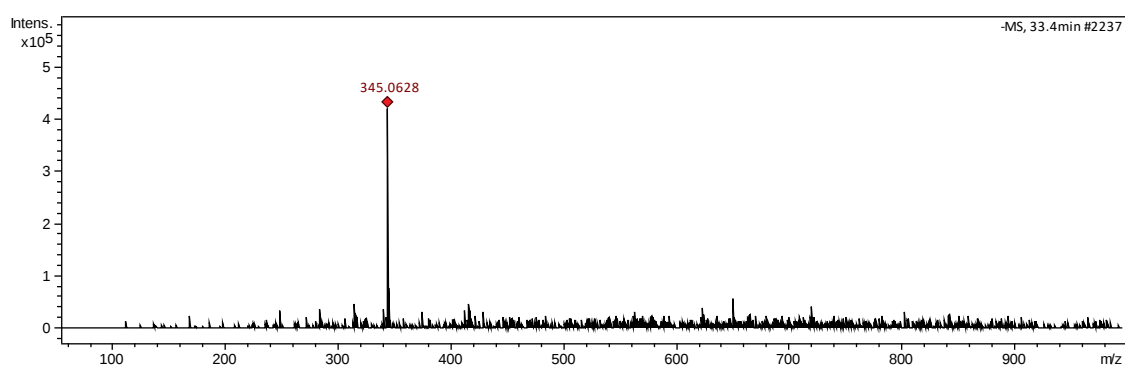
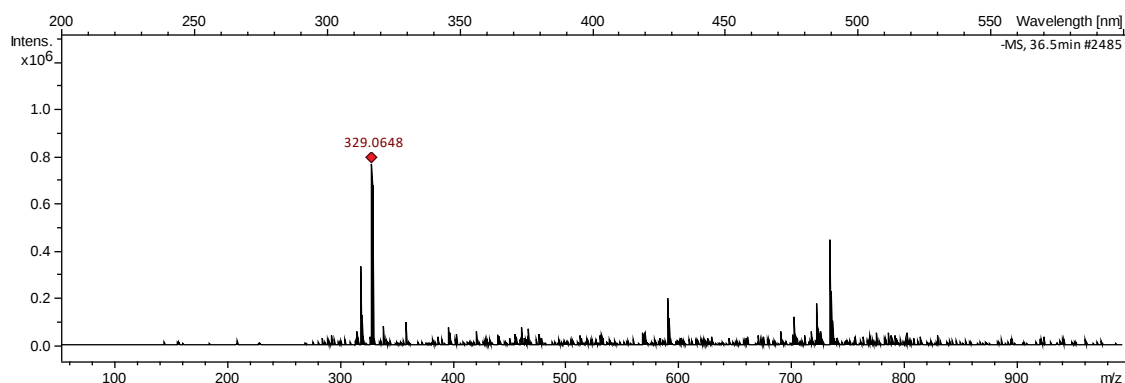
Figura 41 - EM-IES(-) da fração FoPoAcOEt (t_R 28,1min).Figura 42 - EM-IES(-) da fração FoPoAcOEt (t_R 32,2min).Figura 43 - EM-IES(-) da fração FoPoAcOEt (t_R 33,4 min).

Figura 44 - EM-IES(–) da fração FoPoAcOEt (t_R 36,5min).Tabela 24 - Compostos identificados nos frutos de *L. trifolia* (Pontal) por EM-IES(–) em alta resolução.

Fração	t_R (min)	Composto	$[M - H]^-$	Teórico	Erro (ppm)	EM
FrPoAcOEt	25,7	45 ou 53	623,1981	623,1981	0,0	Figura 44
	26,6	44 ou 47	755,2271	755,2404	–17,6	Figura 45
	28,0	45 ou 53	623,1986	623,1981	0,8	Figura 46
	36,5	59 ou 60	329,0648	329,0667	–5,8	Figura 47
FrPonBut	19,1	61	389,0966	389,0878	22,6	Figura 48
	25,7	45 ou 53	623,1970	623,1981	–1,8	Figura 49
	26,7	44 ou 47	755,2412	755,2404	1,1	Figura 50
	28,0	45 ou 53	623,2057	623,1981	12,2	Figura 51

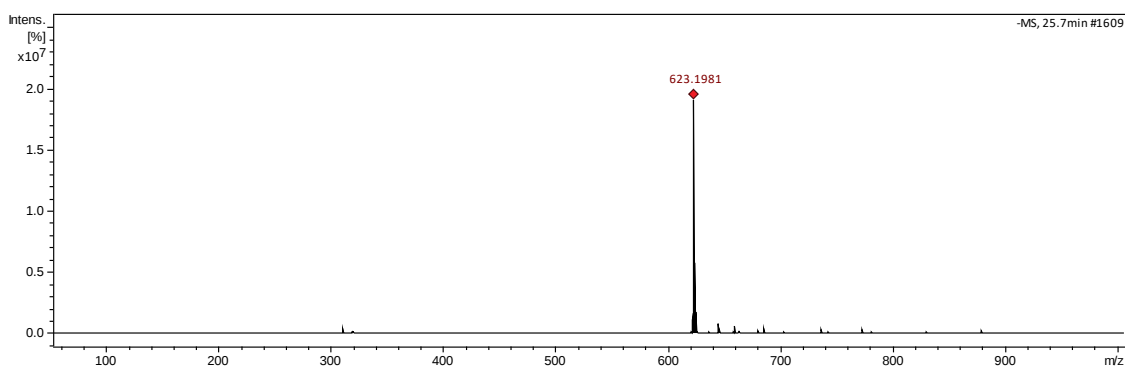
Figura 45 - EM-IES(–) da fração FrPoAcOEt (t_R 25,7 min).

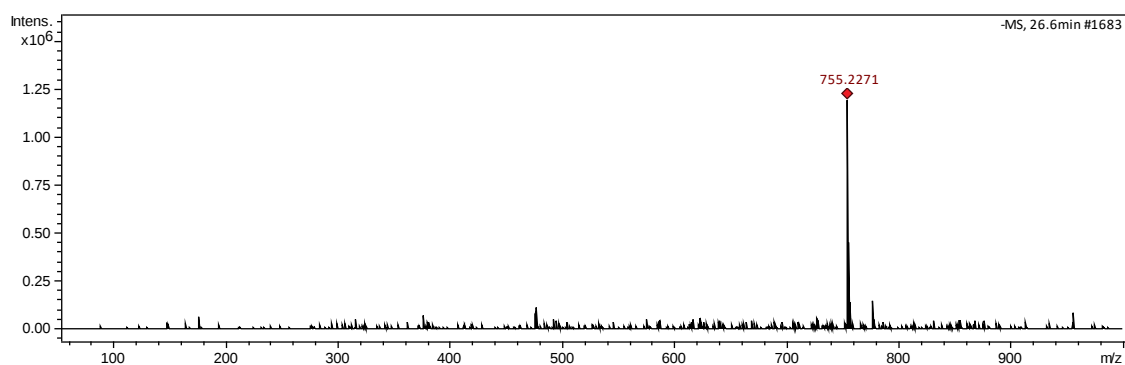
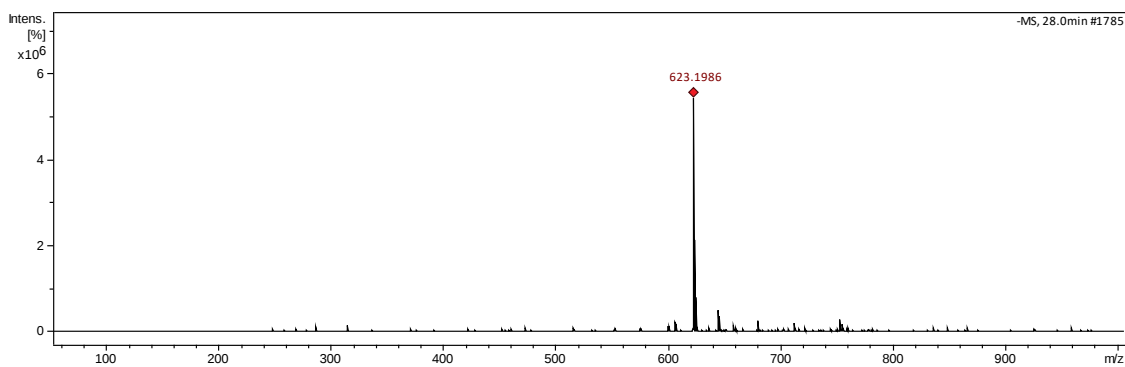
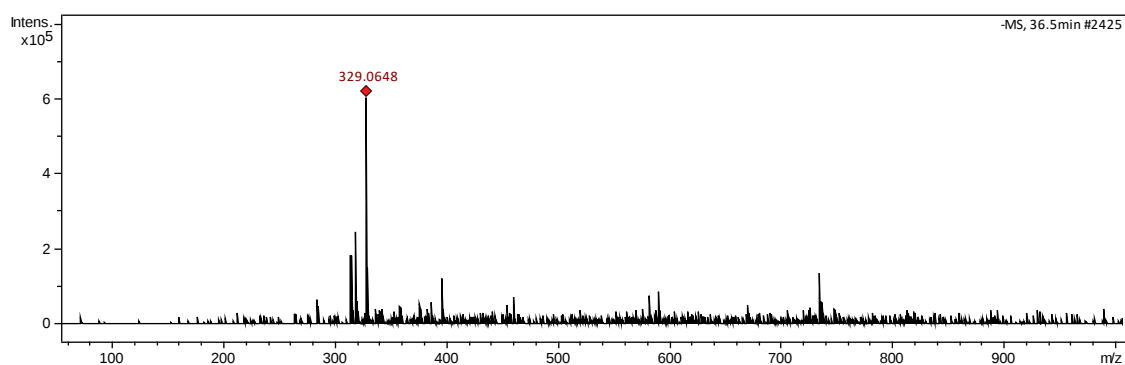
Figura 46 - EM-IES(-) da fração FrPoAcOEt (t_R 26,6 min).Figura 47 - EM-IES(-) da fração FrPoAcOEt (t_R 28,0 min).Figura 48 - EM-IES(-) da fração FrPoAcOEt (t_R 36,5 min).

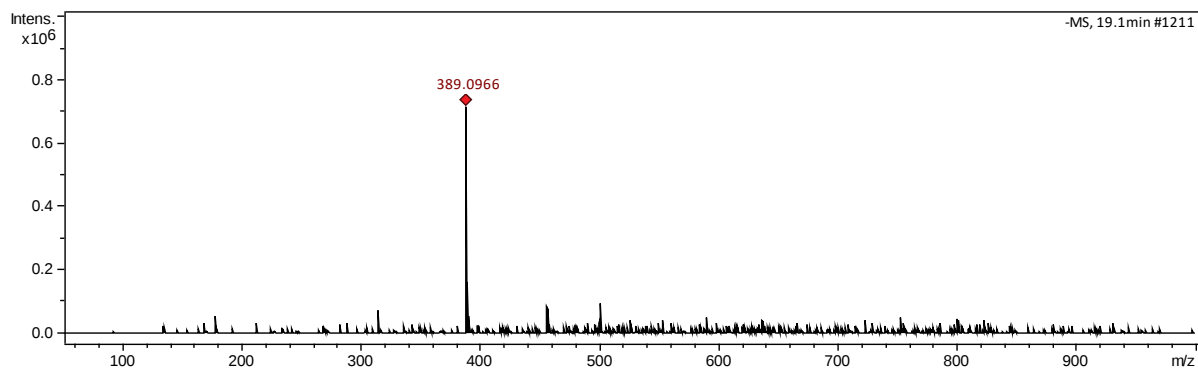
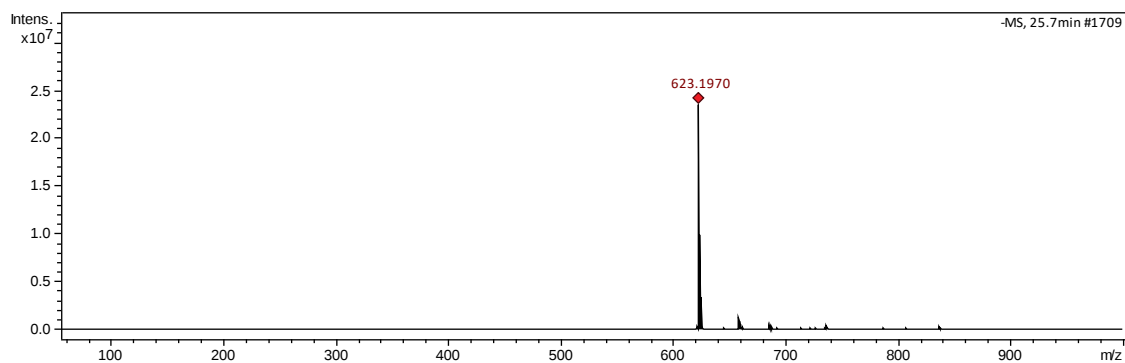
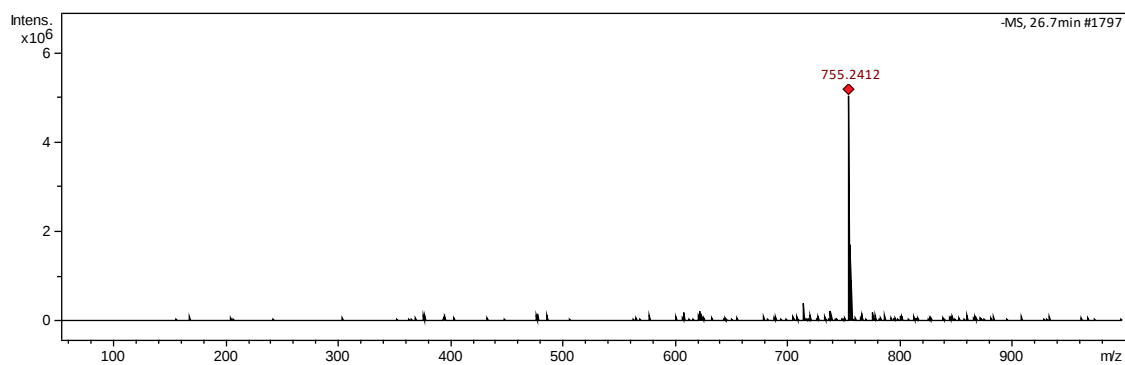
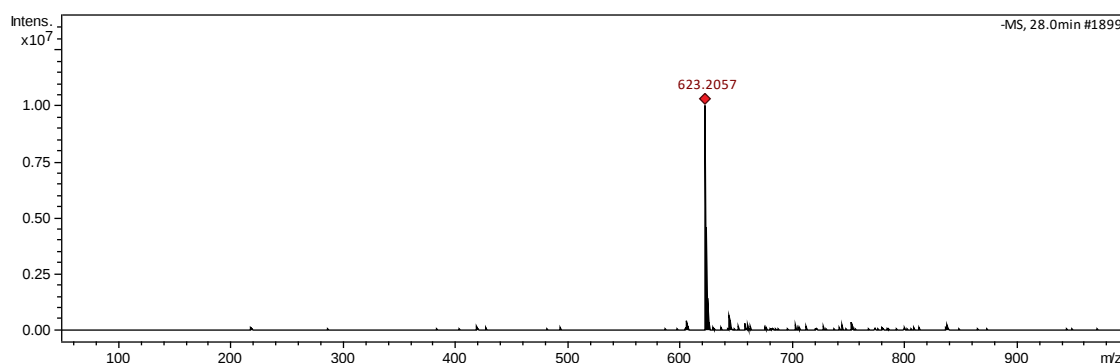
Figura 49 - EM-IES(-) da fração FrPonbut (t_R 19,0 min).Figura 50 - EM-IES(-) da fração FrPonbut (t_R 25,7 min).Figura 51 - EM-IES(-) da fração FrPonbut (t_R 26,7 min).

Figura 52 - EM-IES(–) da fração FrPonbut (t_R 28,0 min).



Os EM-IES(–) dos compostos não identificados presentes nas frações das folhas e frutos estão compilados no apêndice A–F.

4.10 ANÁLISE POR CLAE PREPARATIVO DA FRAÇÃO FrPenBut

A fração FrPenBut foi submetida à análise por CLAE no modo semipreparativo utilizando uma coluna de fase reversa (C_{18}), o que possibilitou a separação do composto **45** (t_R 25,0 min) (Figura 53). O solvente presente nesta fração foi removido através de evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. O composto obtido (8,3mg) foi solubilizado em metanol (1,0 mg/mL) e analisado por CLAE analítico (t_R 20,6 min), utilizando uma coluna de fase reversa (C_{18}), para avaliar se o procedimento cromatográfico foi eficiente (Figura 54).

Figura 53 - Cromatograma da fração FrPenBut em coluna semipreparativa.

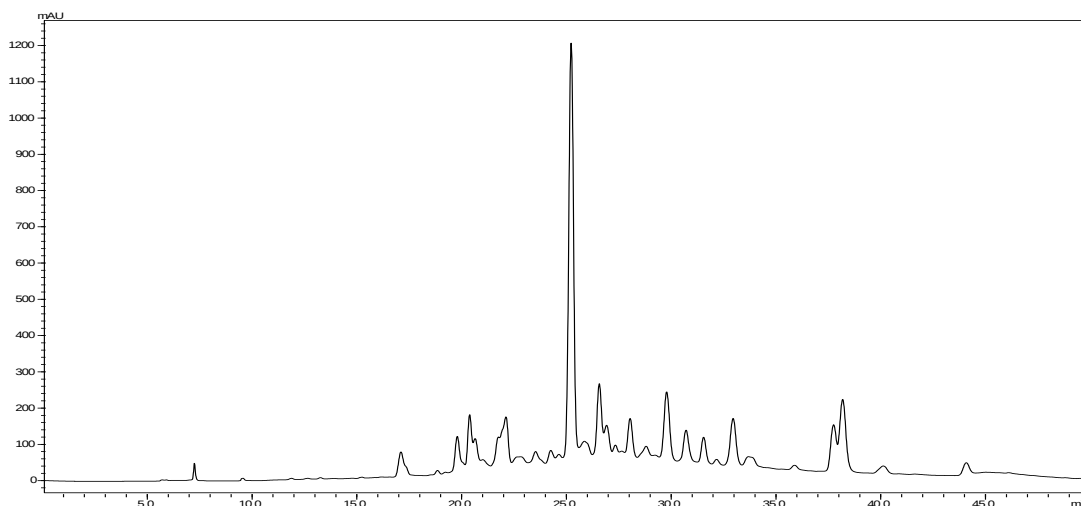
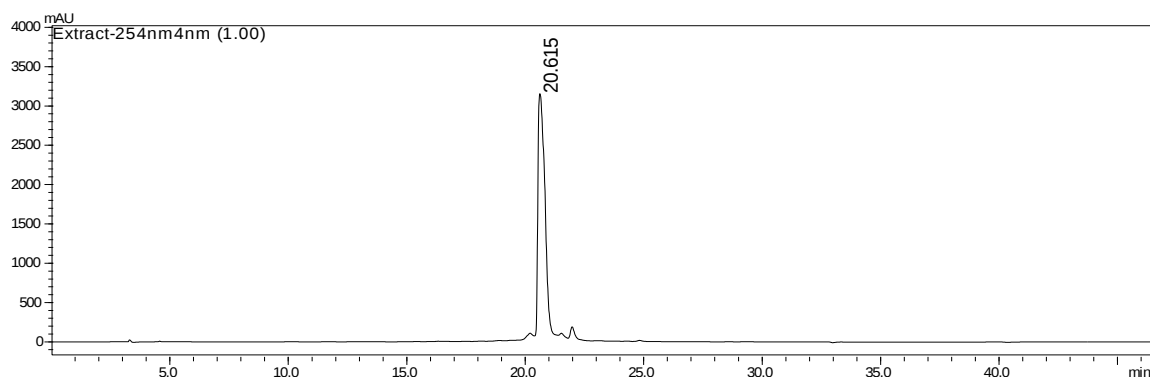


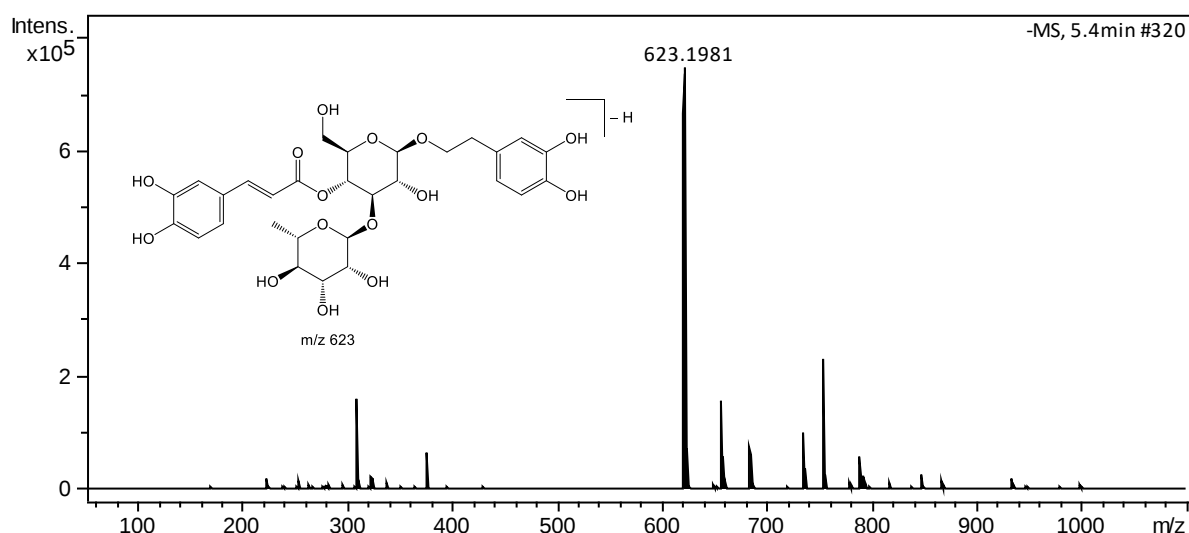
Figura 54 - Cromatograma do verbascosídeo (**45**) em coluna analítica.



4.11 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO VERBASCOSÍDEO (**45**)

O glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (**45**) (t_R 20,6 min) (Figura 54) foi analisado por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{29}H_{36}O_{15}$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a doze. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 623,1981 $[M - H]^-$, calculado para $C_{29}H_{35}O_{15}^-$, 623,1981 (Δ 0,0 ppm) (Figura 55).

Figura 55 – EM-IES(–) em alta resolução do glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (**45**).



Quando o sinal de m/z 623 foi submetido à análise por EM sequencial (EM/EM), foram observados os fragmentos de m/z 461 e 161 (Figura 56), atribuídos à eliminação

da unidade cafeoil, e o fragmento de m/z 315, atribuído à eliminação neutra de ramnose, a partir do íon de m/z 461 (Figura 57).

Figura 56 - EM/EM-IES(–) do glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (**45**).

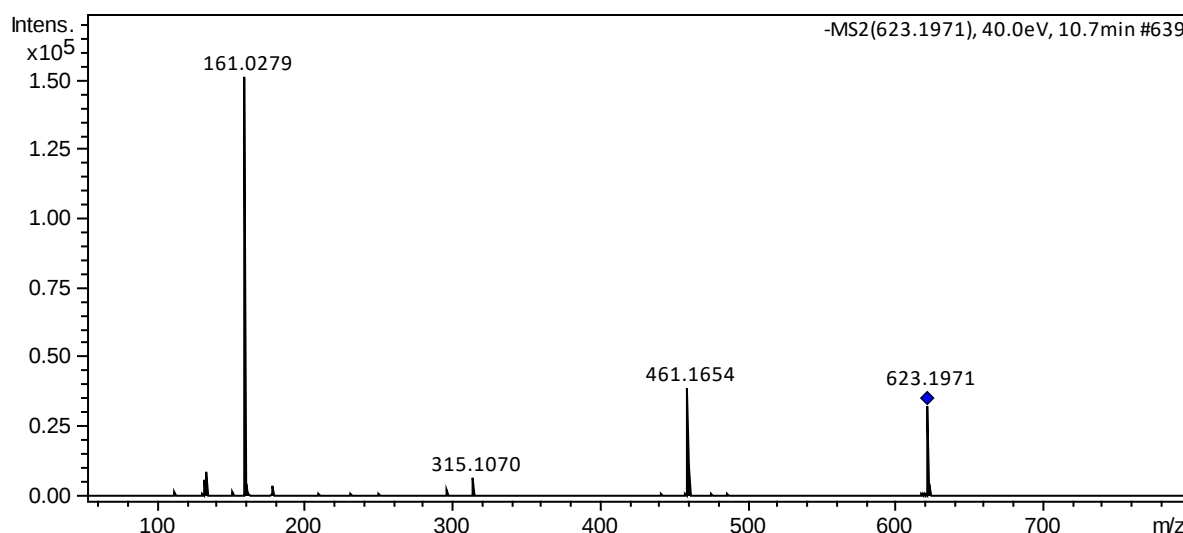
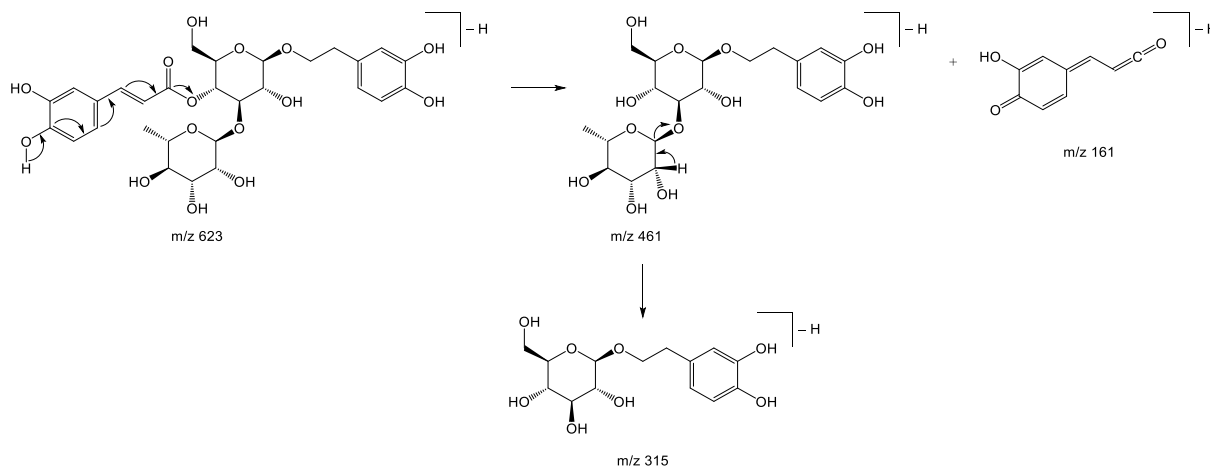


Figura 57 - Proposta de fragmentação para o glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (**45**).



A análise comparativa dos dados de RMN ^{13}C , com valores disponíveis na literatura (SCHLAUER et al., 2004), permitiu confirmar a estrutura do glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (**45**) (Tabela 25) (Figuras 58–60).

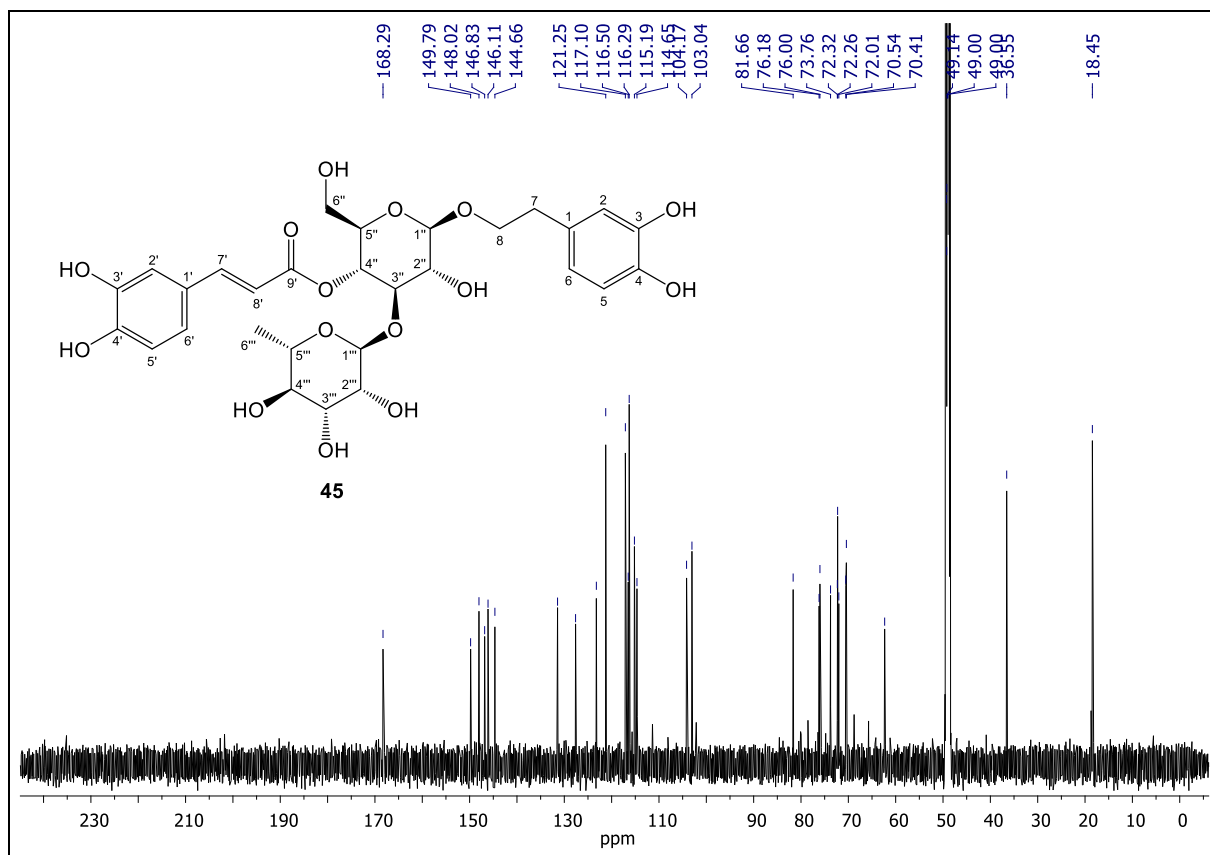
Figura 58 - Espectro de RMN de ^{13}C do verbascosídeo (**45**) (150 MHz, CD_3OD).

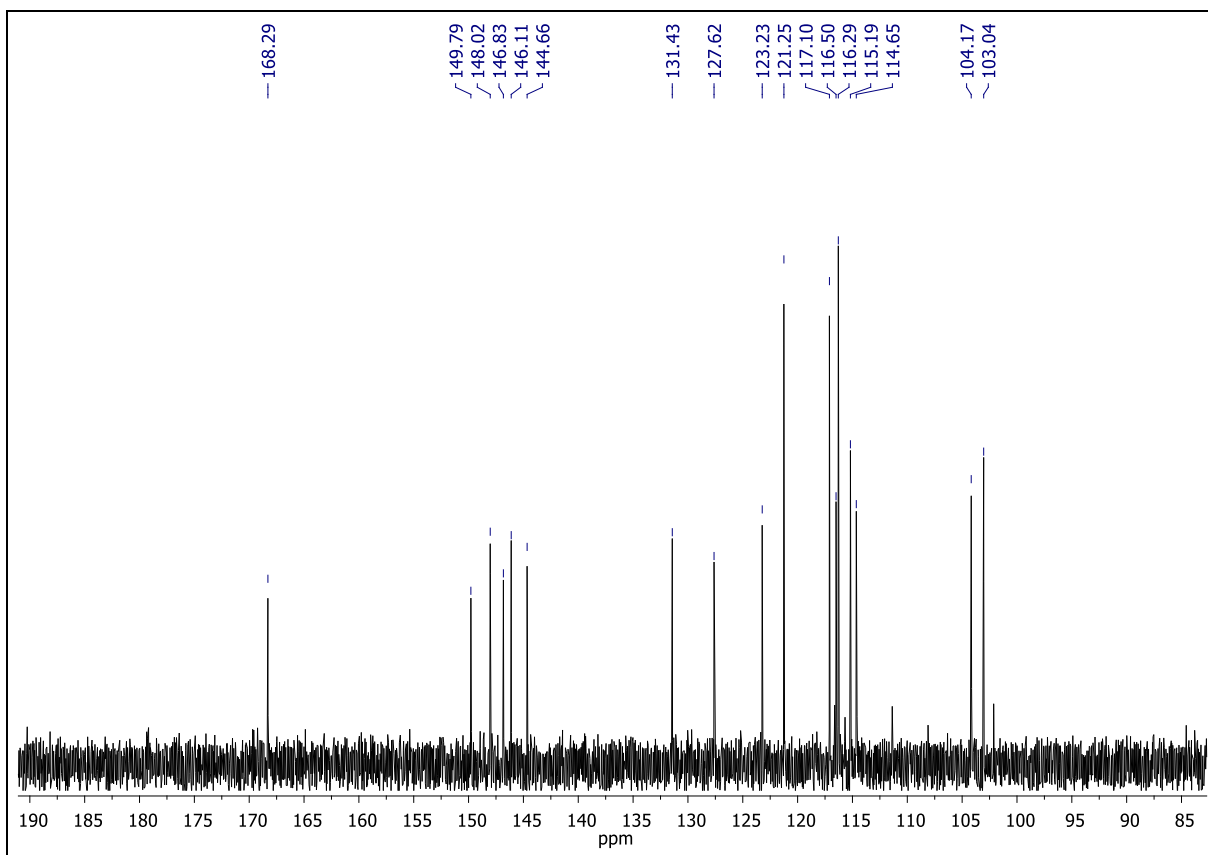
Figura 59 - Ampliação do espectro ^{13}C (δ 85–190) do verbascosídeo (**45**).

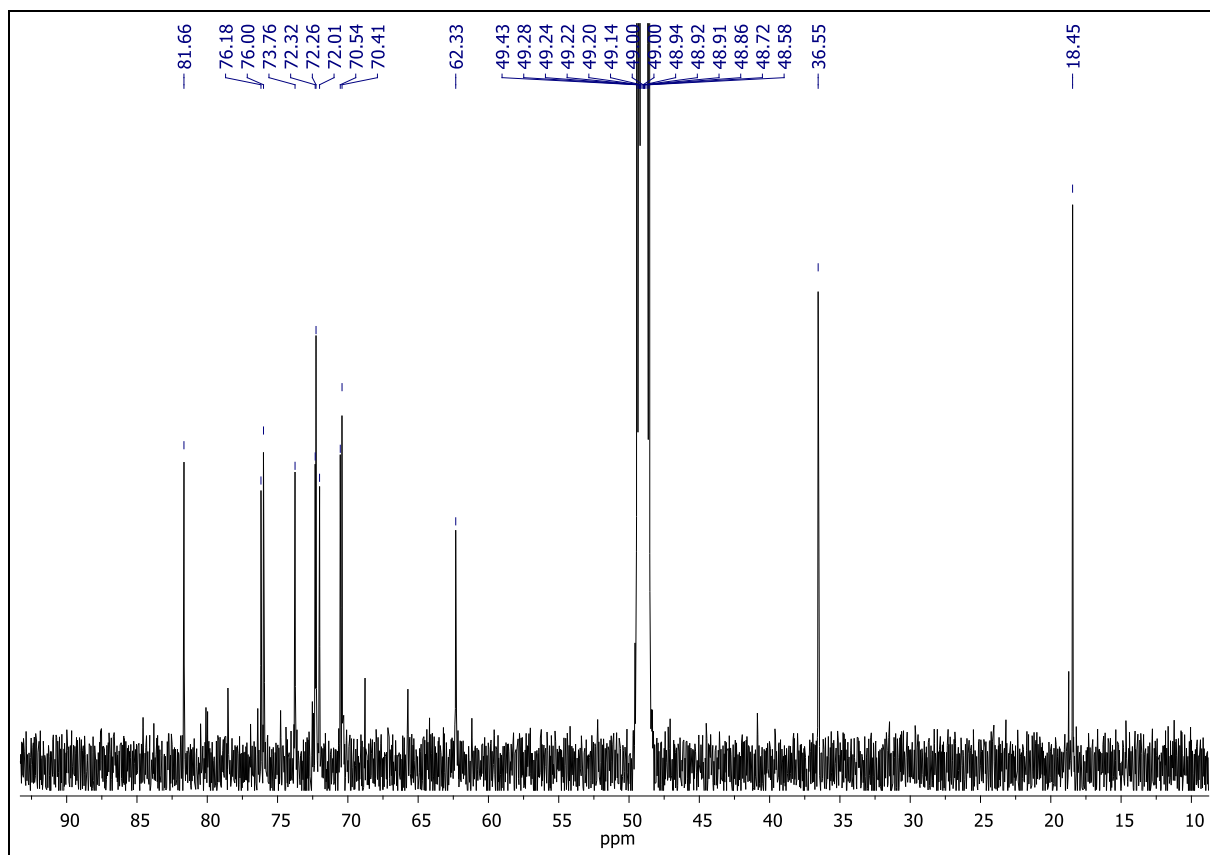
Figura 60 - Ampliação do espectro ^{13}C (δ 10–90) do verbascosídeo (**45**).

Tabela 25 - Dados de RMN de ^{13}C de **45** (CD_3OD).

	Posição	Experimental $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	Schlauer et al (2004) δ_{C}
Aglicona	1	131,4	131,5
	2	117,1	117,1
	3	146,1	146,1
	4	144,7	144,6
	5	116,3	116,4
	6	121,3	121,3
	7	36,5	36,5
	8	72,32	72,33
Cafeoil	1'	127,6	127,7
	2'	114,7	114,7
	3'	146,8	146,8
	4'	149,8	149,8
	5'	116,5	116,6
	6'	123,2	123,3
	7'	148,0	148,1
	8'	115,2	115,3
	9'	168,3	168,4
Glucose	1''	104,2	104,2
	2''	76,2	76,2
	3''	81,7	81,7
	4''	70,4	70,4
	5''	76,0	76,0
	6''	62,3	62,3
Raminose	1'''	103,0	103,0
	2'''	72,26	72,28
	3'''	72,0	72,0
	4'''	73,8	73,8
	5'''	70,5	70,6
	6'''	18,5	18,5

^a Deslocamento químico em ppm em relação ao solvente residual (δ_{MeOH} 49,00).

Os picos t_{R} 25,7 e 28,0 dos cromatogramas obtidos em CLAE-EM para todas as frações (Tabela 21–24), foram correlacionados aos compostos verbascosídeo e isoverbascosídeo, respectivamente. Esta atribuição pode ser justificada pela alta intensidade dos picos em t_{R} 25,7 e comparação com o tempo de retenção de **45** (t_{R} 25,0 min) isolado em CLAE no modo semipreparativo.

5 CONCLUSÕES

As frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas e frutos de *L. trifolia* dos dois pontos de coleta apresentaram menores valores de CE₅₀, no método de sequestro do radical DPPH e maior concentração de fenóis totais.

No ensaio antibacteriano, as frações FoPoHex e FoPeAcOEt apresentaram atividade moderada contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (CIM 200 µg/mL) e a fração FoPeAcOEt apresentou atividade moderada contra *Streptococcus mitis* (CIM 200 µg/mL).

No ensaio antifúngico, as frações acetato de etila apresentaram boa atividade para todas as espécies de *Candida* avaliadas (valores de CIM menores do que 100 µg/mL) com destaque para as frações dos frutos FrPoAcOEt, FrPeAcOEt e FrPenBut que apresentaram valores de CIM contra *C. glabrata* próximos ao controle positivo anfotericina B.

Com os resultados de citotoxicidade, foi calculado o índice de seletividade (IS) e, pela análise dos valores foi possível concluir que as frações mais ativas no ensaio antifúngico (FrPoAcOEt, FrPeAcOEt e FrPenBut) foram mais seletivas contra o microorganismo *C. glabrata* do que para as células saudáveis.

As frações que apresentaram melhores potenciais biológicos foram as mais polares (acetato de etila e *n*-butanol) e, pelas análises de CLAE-EM-IES foi possível identificar 15 compostos fenólicos nessas amostras, sendo que 10 já foram descritos no gênero, porém identificados pela primeira vez em *L. trifolia*. Além disto, foi isolado por CLAE, no modo semipreparativo, o metabólito secundário majoritário na planta, o glicosídeo feniletanoide verbascosídeo.

Certamente o presente trabalho contribui significativamente para o conhecimento do perfil químico de *L. trifolia* e possibilita a continuidade dos estudos vislumbrando a identificação e isolamento de novos compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect**, v. 15, p. 187–192, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 2006.

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006.

CLSI. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**: CLSI document M11-A8. 8. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a. 39 p.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: CLSI document M7-A9. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b. 63 p.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: CLSI document M 27–A3. 34. ed. Wayne: PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 27 p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: Buchanan, B. et al. **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250-1318.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. 1.ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 576 p.

EMERY, F. S.; SANTOS, G. B.; BIANCHI, R. C. **A Química na Natureza**. Coleção Química no Cotidiano, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010. 70 p.

FIDEL JUNIOR, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **American Society for Microbiology**. v. 12. n. 1, p. 80-96, 1999.

GHISALBERTI, E. L. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 467–486, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

IMBENZI, P. S.; HE, Y.; YAN, Z.; OSORO, E. K.; CHEPLOGOI, P. K. Chemical Constituents in extracts from Leaves of *Lantana trifolia* and their in vitro anti-oxidative activity. **Chinese Herbal Medicines**, v. 6, n. 3, p. 242–246, 2014.

JULIÃO, L. S.; BIZZO, H. R.; SOUZA, A. M.; LOURENÇO, M. C.; SILVA, P. E. A.; TAVARES, E. S.; RASTRELLI, L.; LEITÃO, S. G. Essential oils from two *Lantana* species with antimycobacterial activity. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1733–1736, 2009.

JULIÃO, L. S.; LEITÃO, S. G.; LOTTI, C.; PICINELLI, A. L.; RASTRELLI, L.; FERNANDES, P. D.; NOËL, F.; THIBAUT, J. P. B.; LEITÃO, G. G. Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. **Phytochemistry**, v. 71, n. 2/3, p. 294–300, 2010.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. **Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Method**, New York – NY, VCH, v. 1, 1990.

MALBERT, Y. **Flavonoid glucodiversification with engineered sucrose-active enzymes**, 2014. 257 f. Doctorate - Institut National des Sciences, University of Toulouse, Toulouse, 2014.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. S, p. 198–207, dez. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**. v. 65, p. 55–63, 1983.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**, 2010. 173 f. Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

NALUBEGA, R.; NYANZI, S. A.; NAKACAMA, J. L.; KAMATENESI-MUGISHA, M. Ethnobotanical uses of *Lantana trifolia* L. and *Sida cuneifolia* Roxb. in Mukungwe and Wabinyonyi sub-counties of central Uganda. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 2, n. 3, p. 155–164, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: Wermuth, C. G. et al. **The Practice of Medicinal Chemistry**. San Diego: Elsevier Ltd, 2015, cap. 5, p.101–140.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, ago. 2009.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, n. 1, p. 25–35, 2005.

RÍOS, J.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 100, n. 1–2, p. 80–84, Aug. 2005

RWANGABO, P. C.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; CORTHOUT, J.; VANDEN BERGUE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Umuhengerin, a new antimicrobially active flavonoid from *Lantana trifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 5, p. 966–968, 1988.

SHLAUER, J.; BUDZIANOWSKI, J.; KUKULCZANKA, K.; RATAJCZAK, L. Acteoside and related phenylethanoid glycosides in *Byllis liniflora* Salisb. plants propagated in vitro and its systematic significance. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 73, n. 1, p. 9–15, 2004.

SILVA, G. N.; MARTINS, F. R.; MATHEUS, M. F.; LEITÃO, S. G.; FERNANDES, P. D. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lantana trifolia*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 254–259, 2005.

SOUSA, E. O.; COSTA, J. G. M. Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, 1155–1180, 2012.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. D. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUSA, R. M. F. DE. **Estudo químico de *Eugenia calycina* Cambess e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase**, 2015. 222 f. Doutorado–Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, G. K. F.; OLIVEIRA, A. MORAIS, S. A. L.; MUNOZ, R. A. A. Determination of 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Method. In: RUIZ-CAPILLAS, C.; NOLLET, L.M.L. **Flow Injection Analysis of Food Additives**. Boca Raton: CRC press, 2015. cap. 29, p. 539–569.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 2001. 384 p.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FoPeAcOEt

Figura A.1 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 42,9 min.

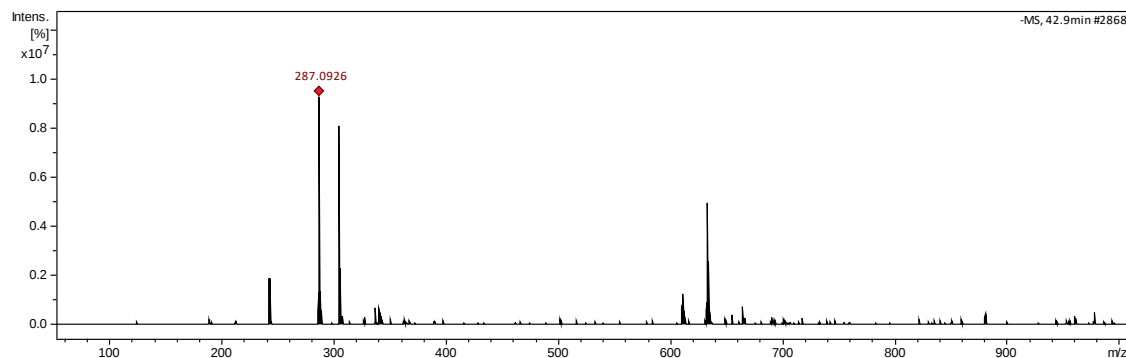


Figura A.2 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 43,1 min.

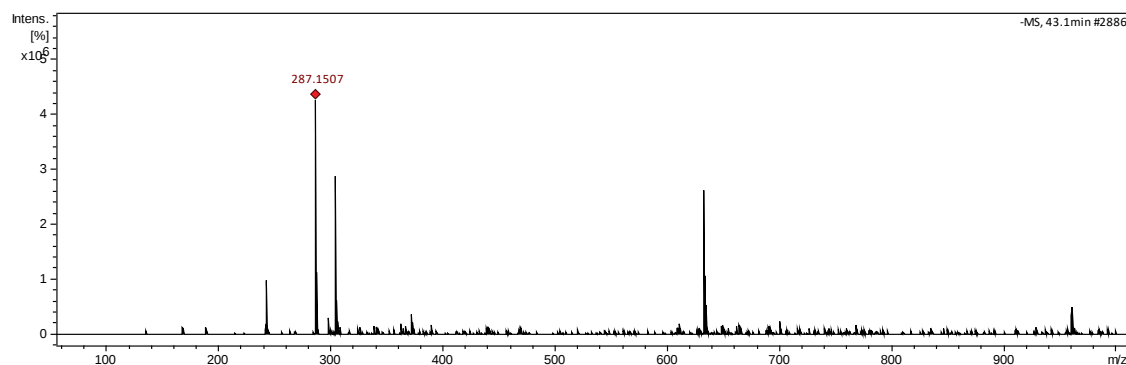


Figura A.3 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 44,4 min.

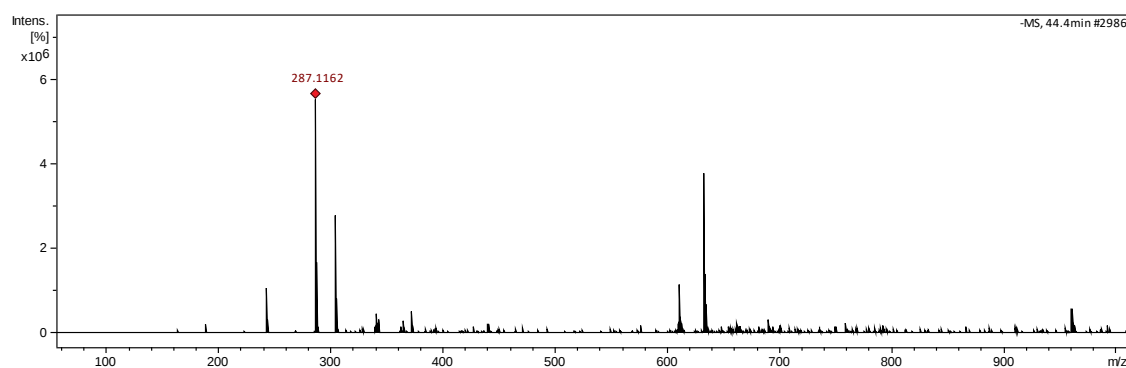


Figura A.4 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 45,8 min.

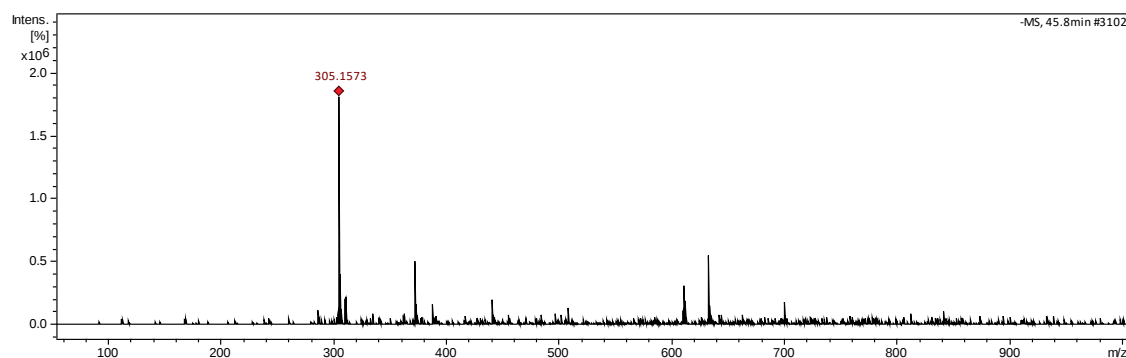


Figura A.5 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 46,3 min.

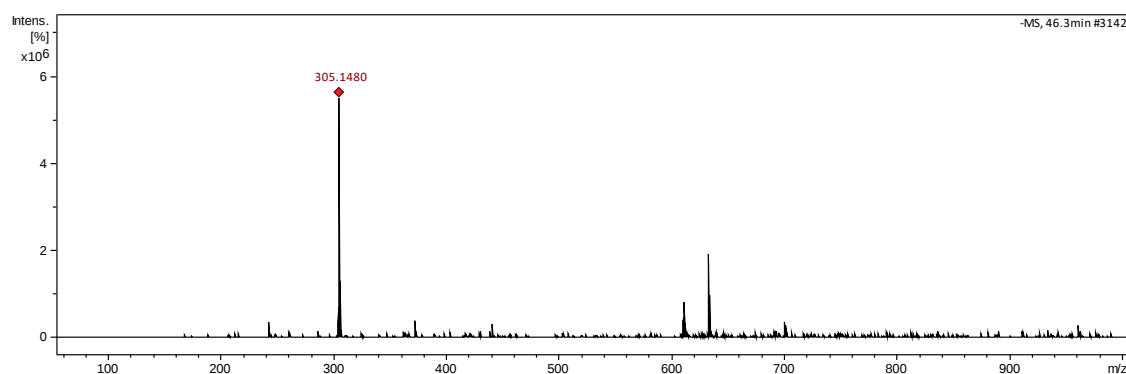


Figura A.6 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 49,3 min.

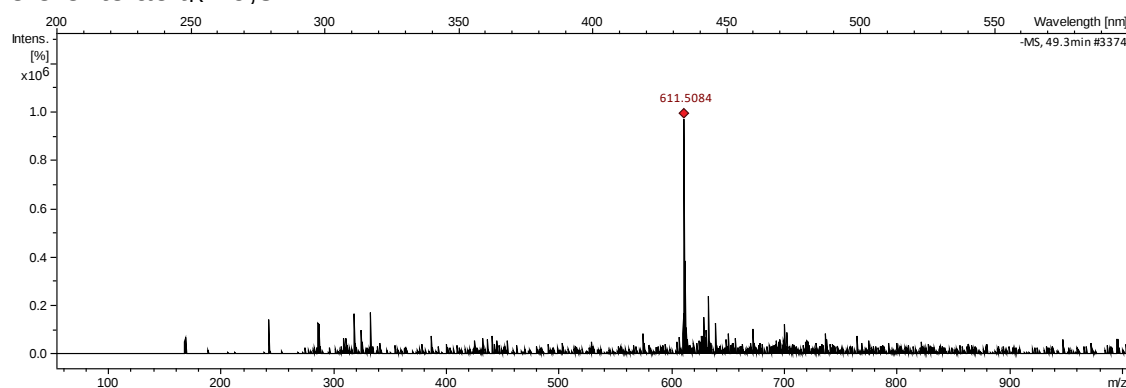


Figura A.7 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 50,6 min.

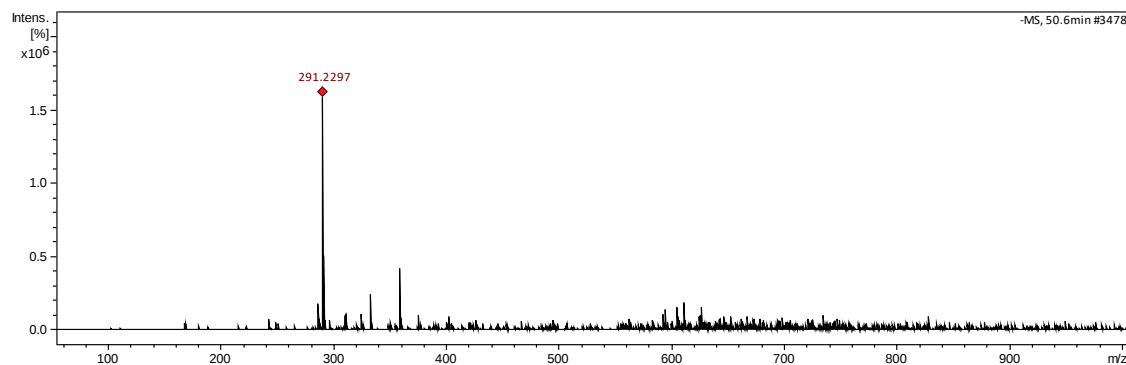


Figura A.8 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 51,2 min.

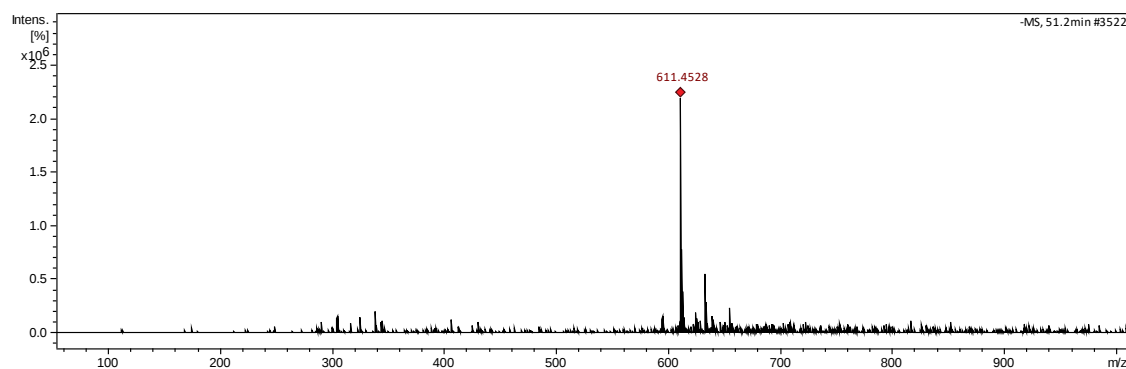


Figura A.9 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 51,6 min.

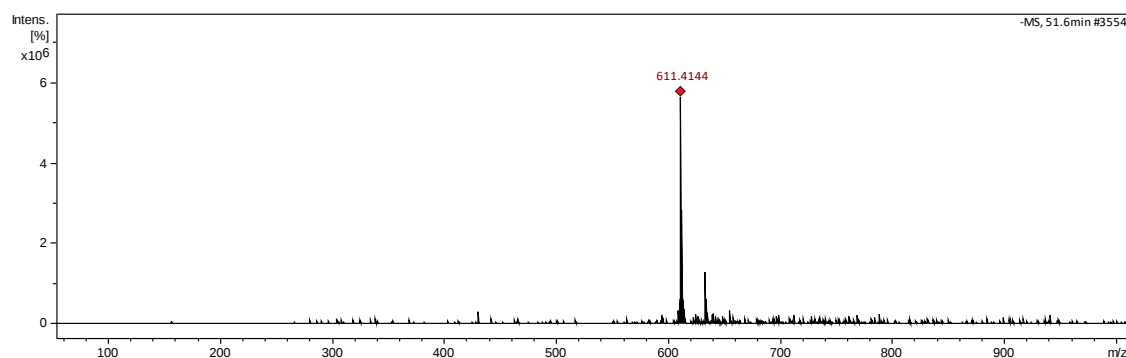


Figura A.10 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 52,1 min.

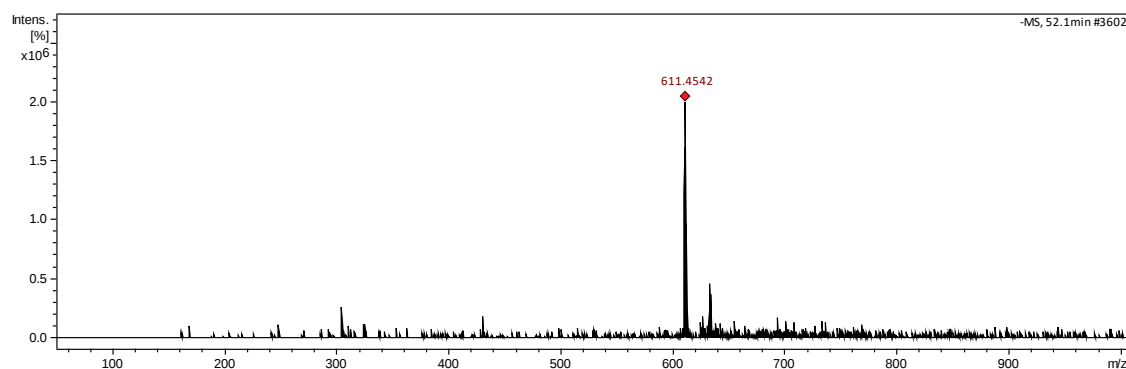
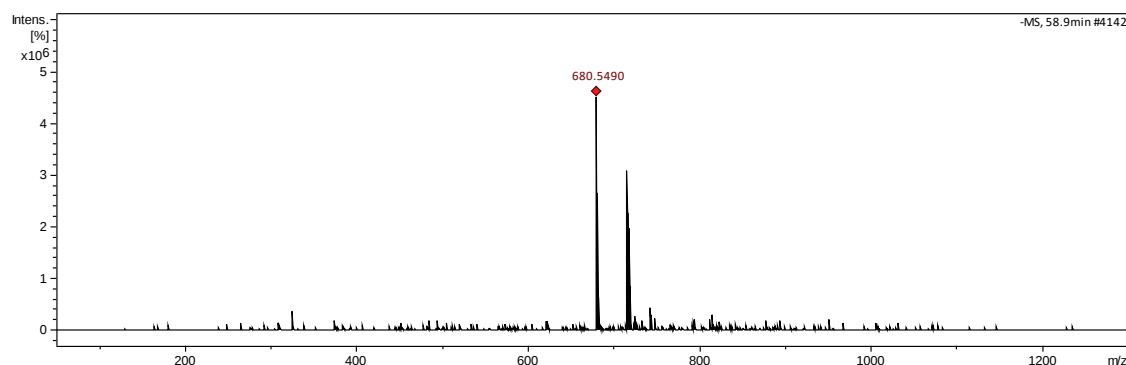


Figura A.11 – Espectro de massas da fração FoPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 58,9 min.



APÊNDICE B – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FoPoAcOEt

Figura B.1 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 28,6 min.

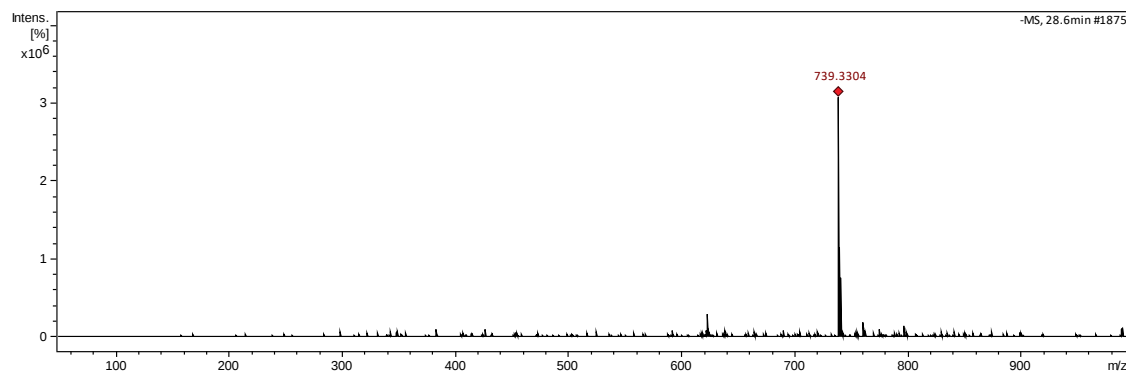


Figura B.2 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 34,5 min.

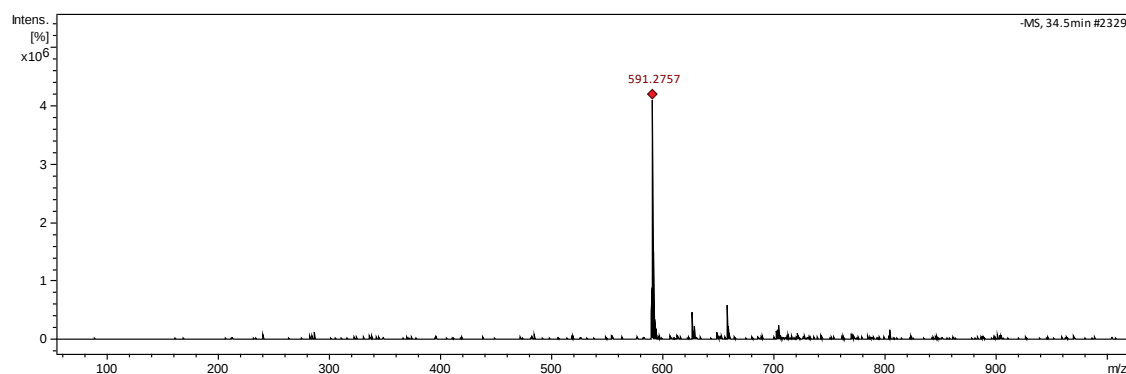


Figura B.3 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 35,0 min.

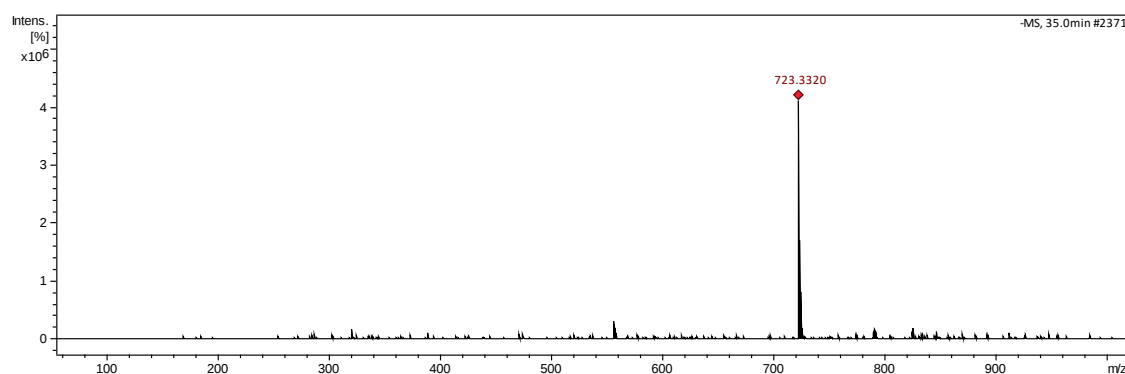


Figura B.4 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 42,9 min.

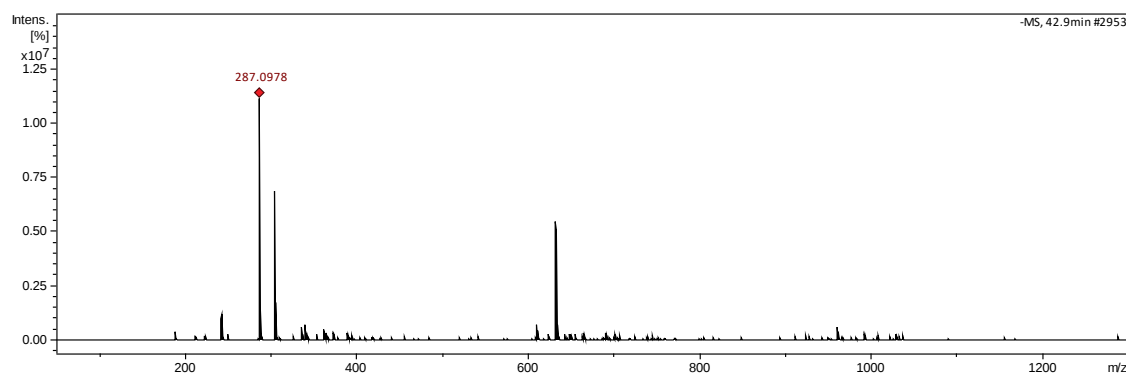


Figura B.5 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 44,4 min.

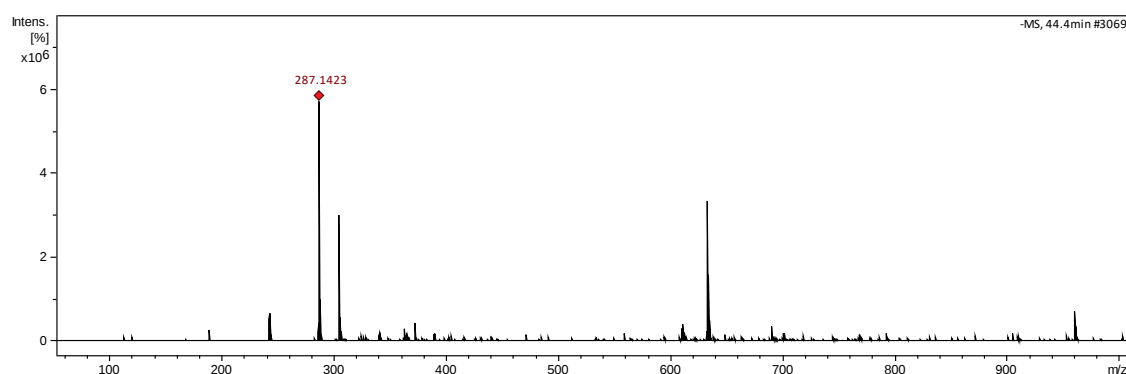


Figura B.6 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 46,3 min.

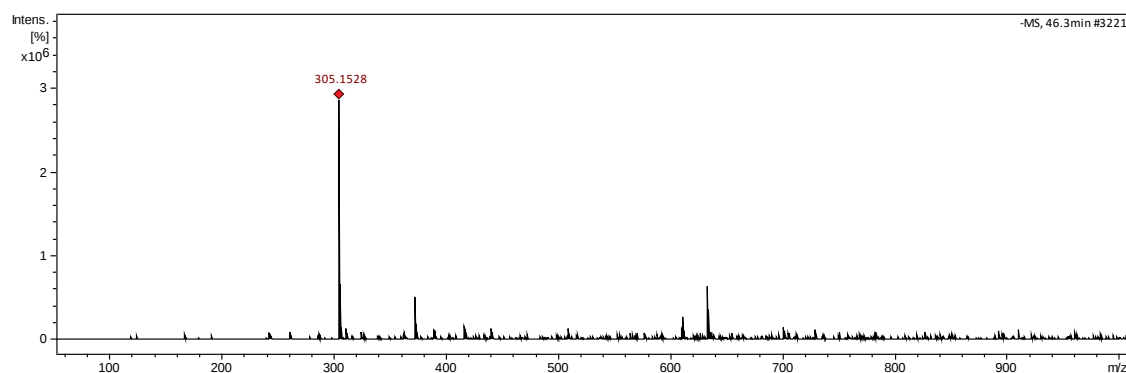


Figura B.7 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 51,5 min.

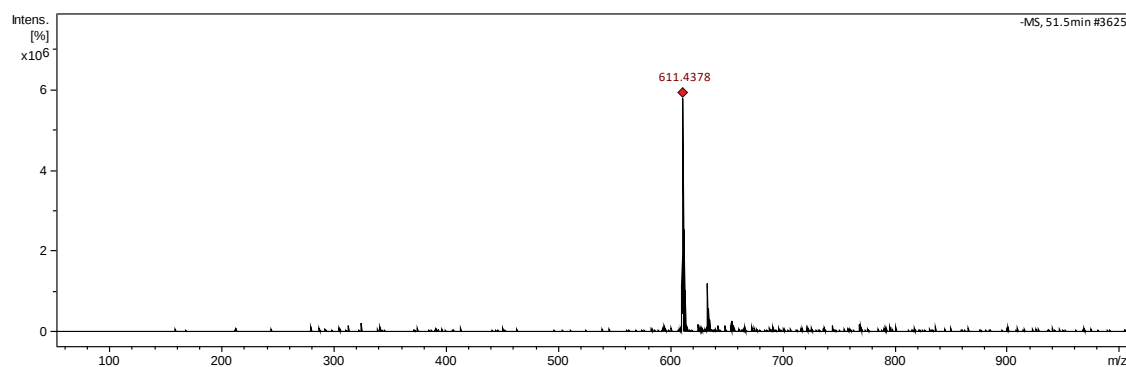
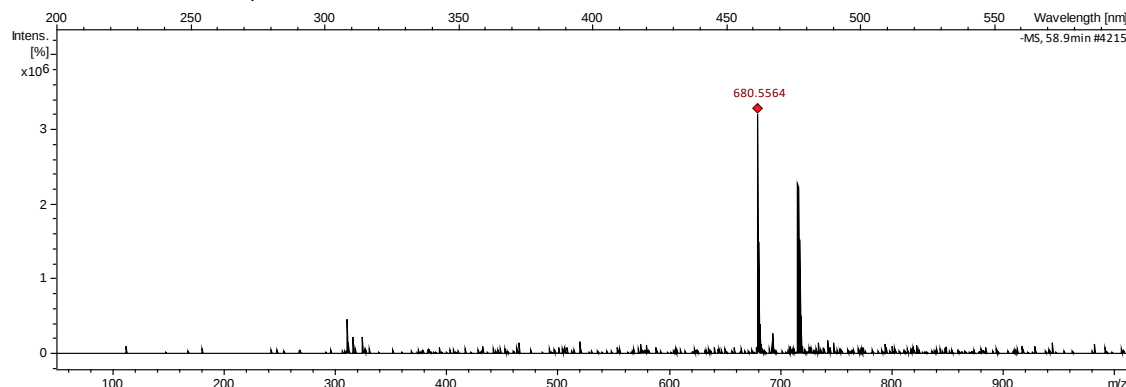


Figura B.8 – Espectro de massas da fração FoPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 58,9 min.



APÊNDICE C – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPeAcOEt

Figura C.1– Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 21,9 min.

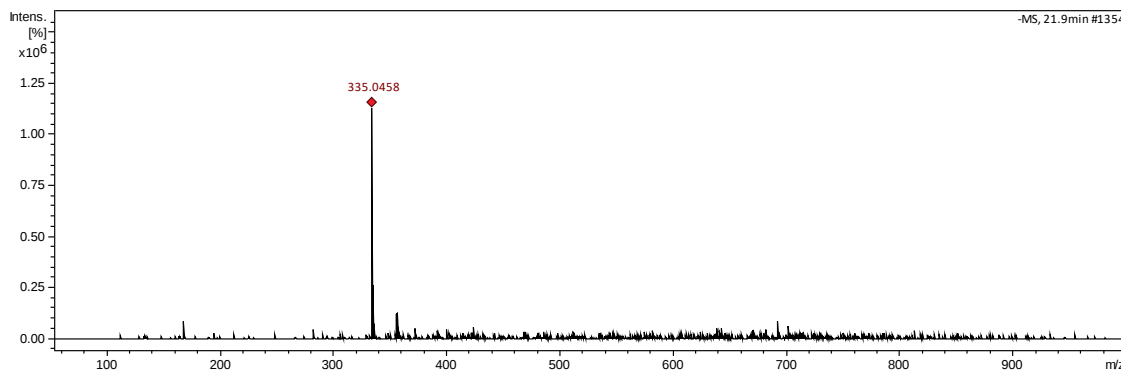


Figura C.2 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 28,5 min.

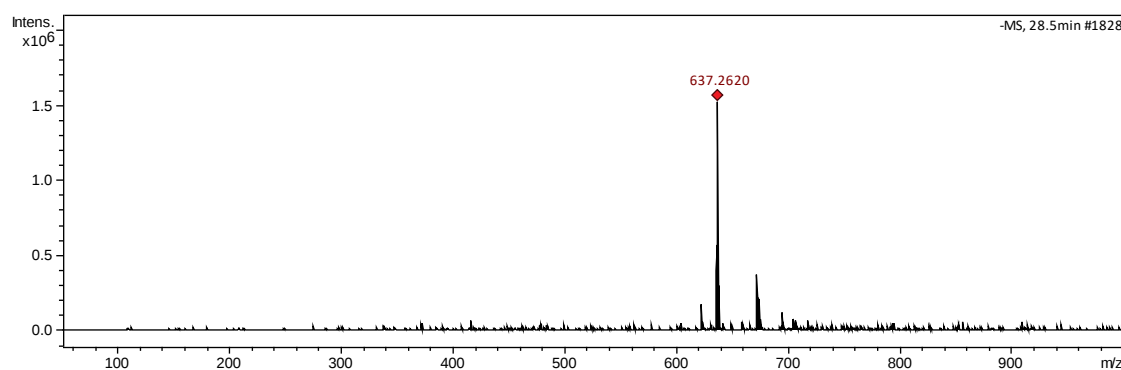


Figura C.3 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 32,0 min.

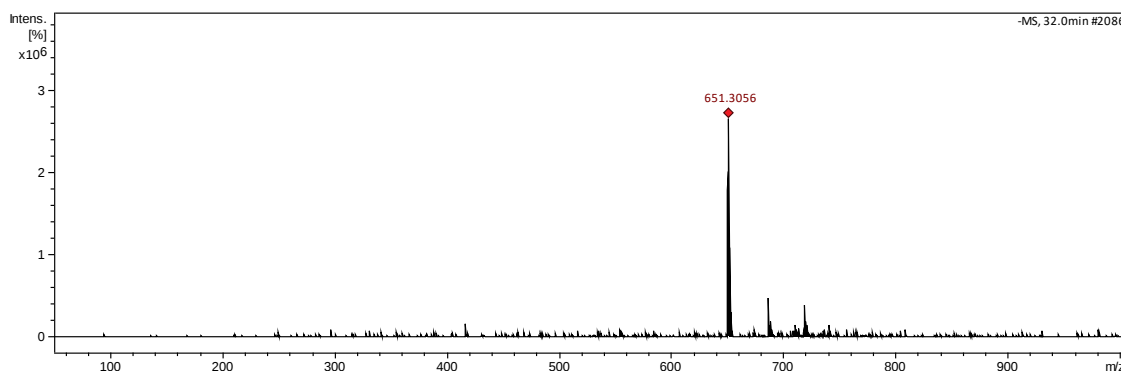


Figura C.4 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 34,6 min.

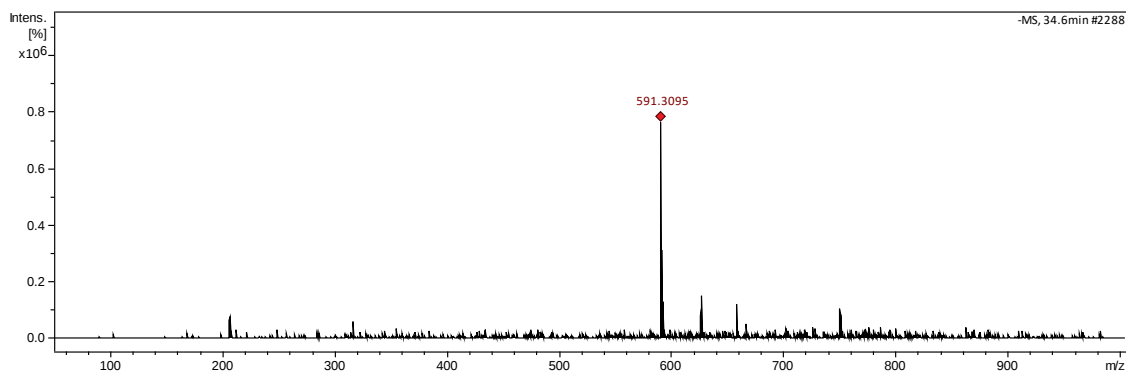


Figura C.5 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 36,3 min.

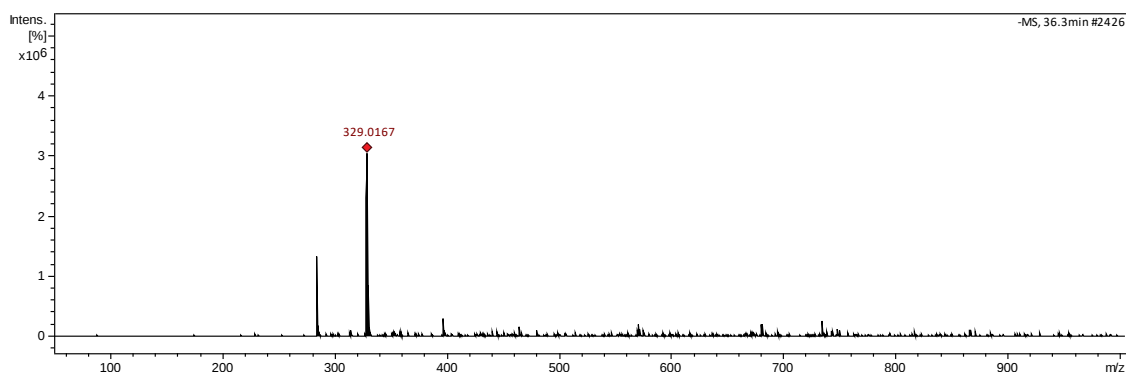


Figura C.6 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 36,6 min.

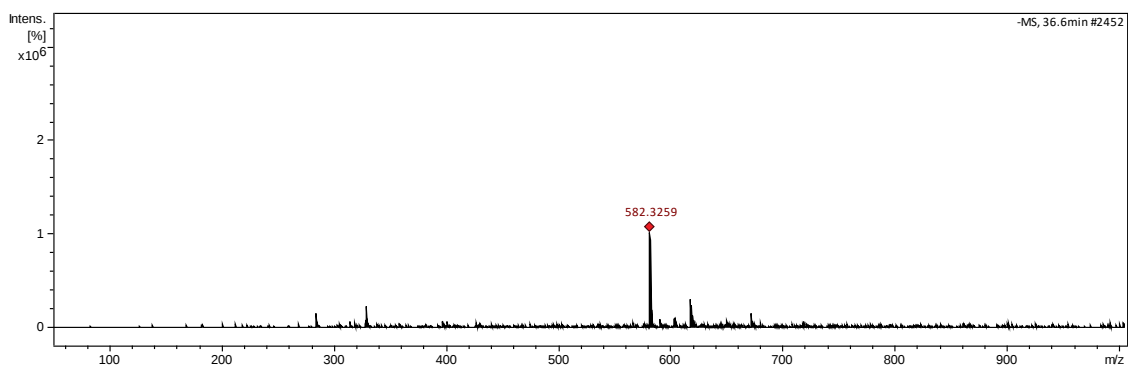


Figura C.7 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 37,6 min.

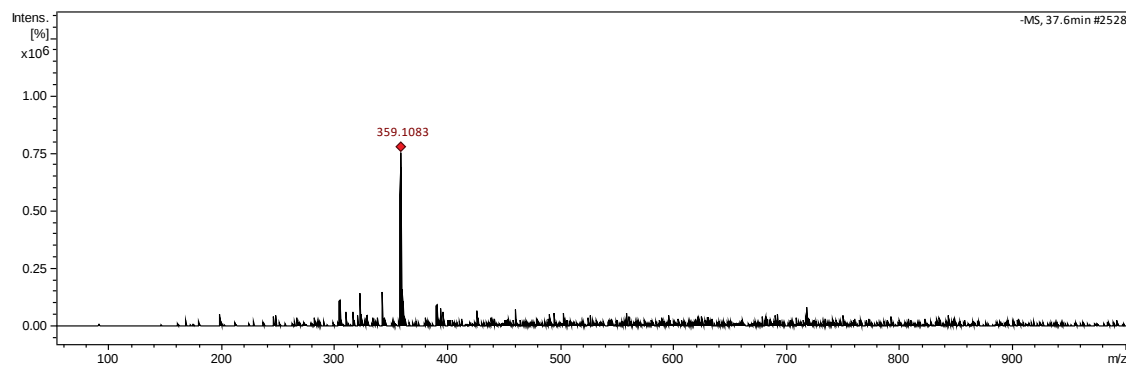


Figura C.8 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 39,1 min.

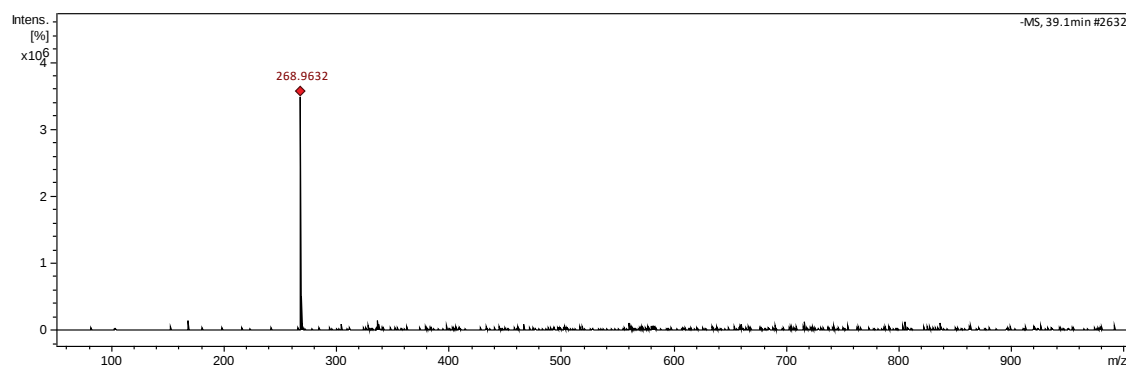


Figura C.9 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 42,1 min.

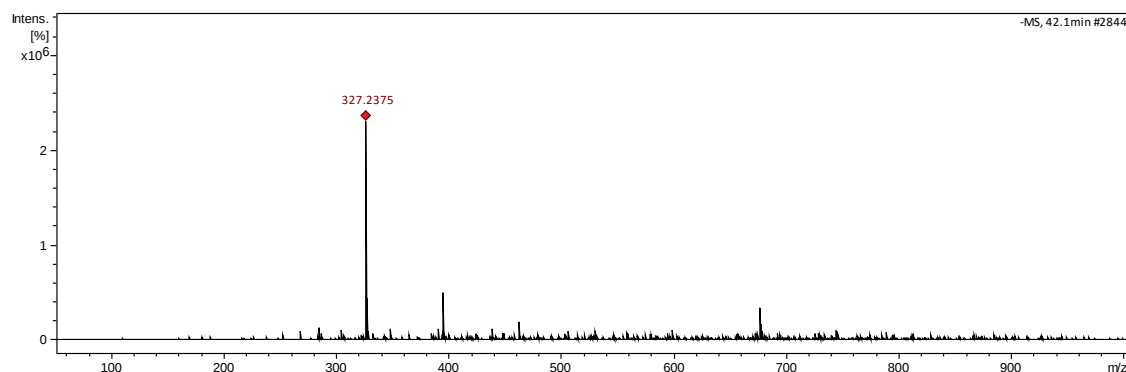


Figura C.10 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 42,9 min.

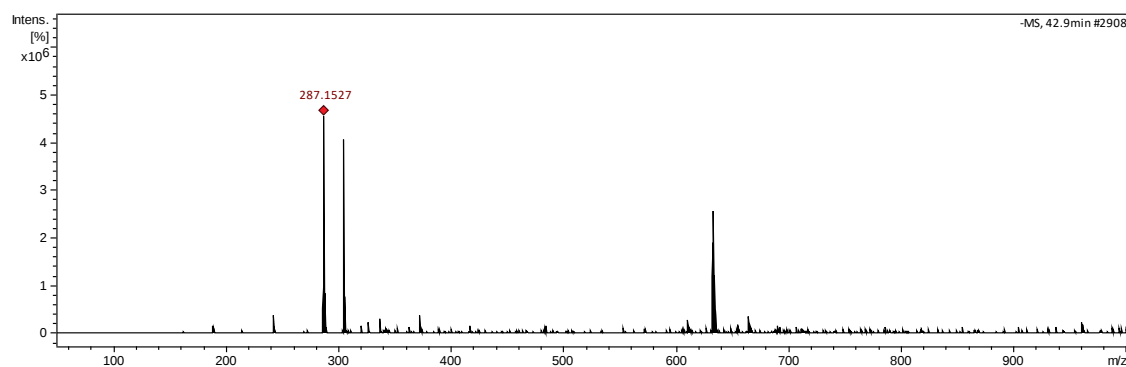


Figura C.11 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 43,9 min.

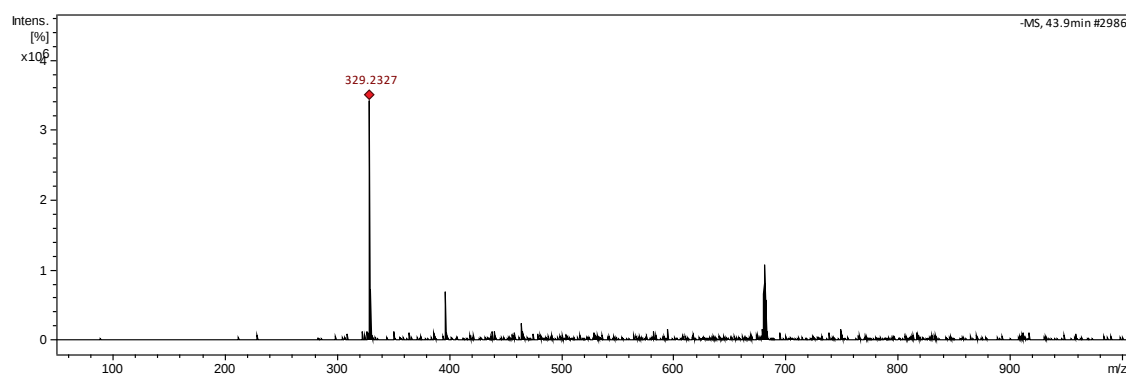


Figura C.12 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 44,2 min

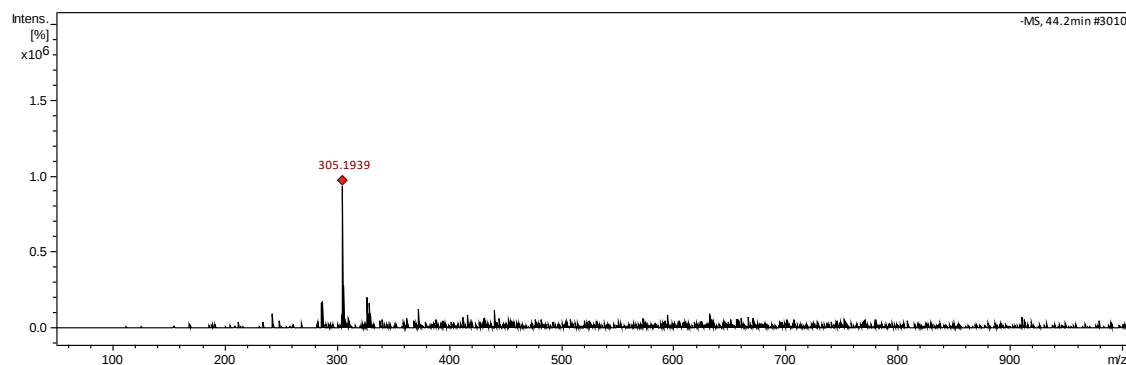


Figura C.13 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 45,9 min

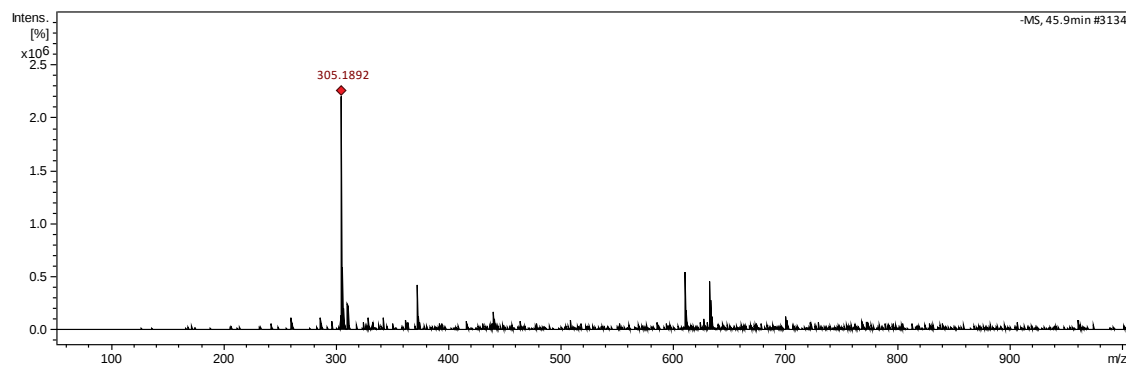


Figura C.14 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 50,5 min

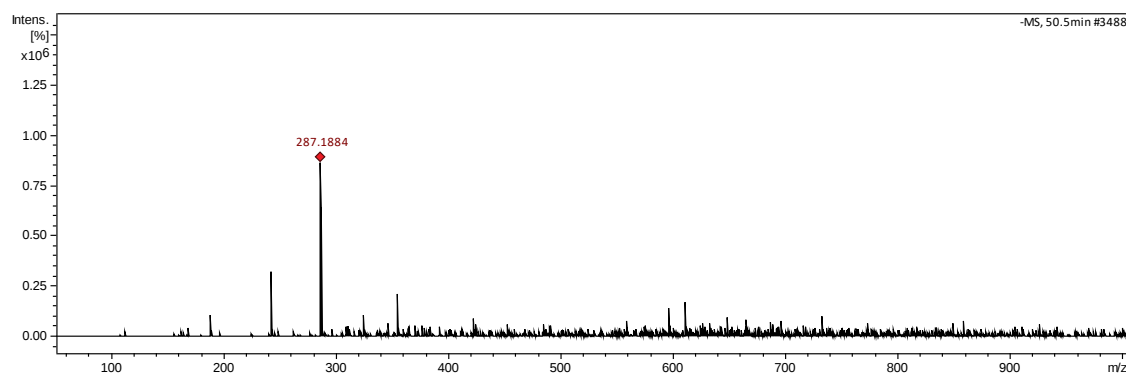


Figura C.15 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 51,6 min

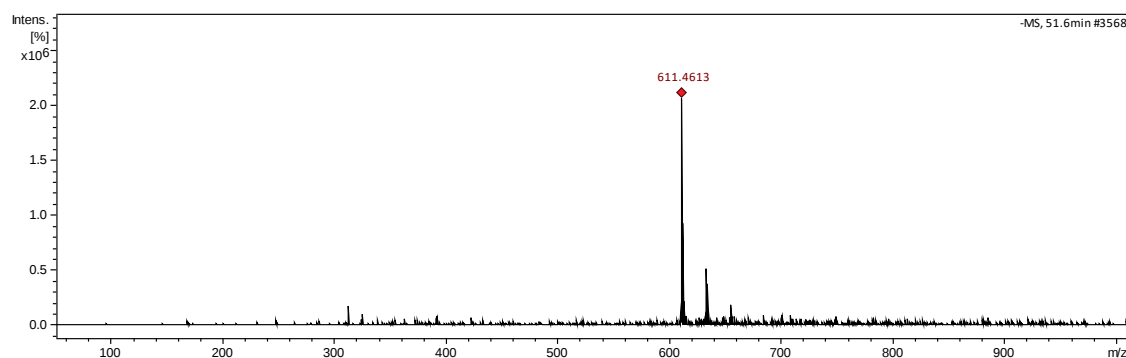
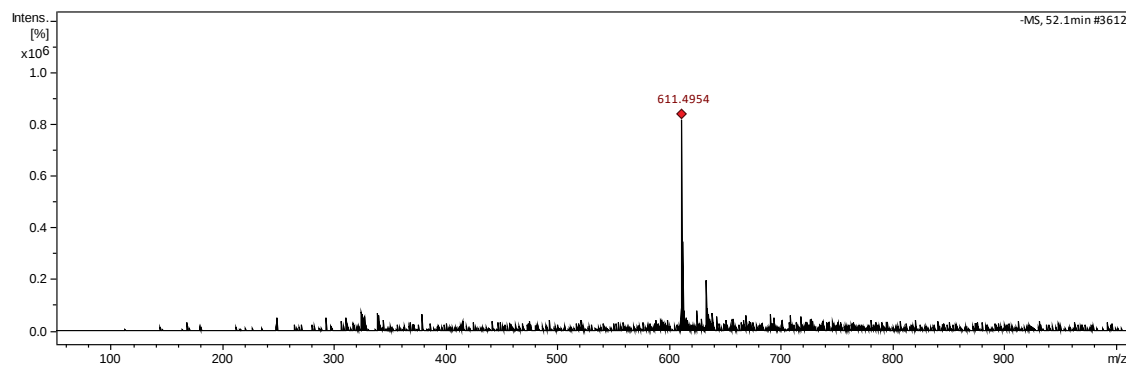


Figura C.16 – Espectro de massas da fração FrPeAcOEt (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 52,1 min



APÊNDICE D – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPoAcOEt

Figura D.1 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 21,9 min.

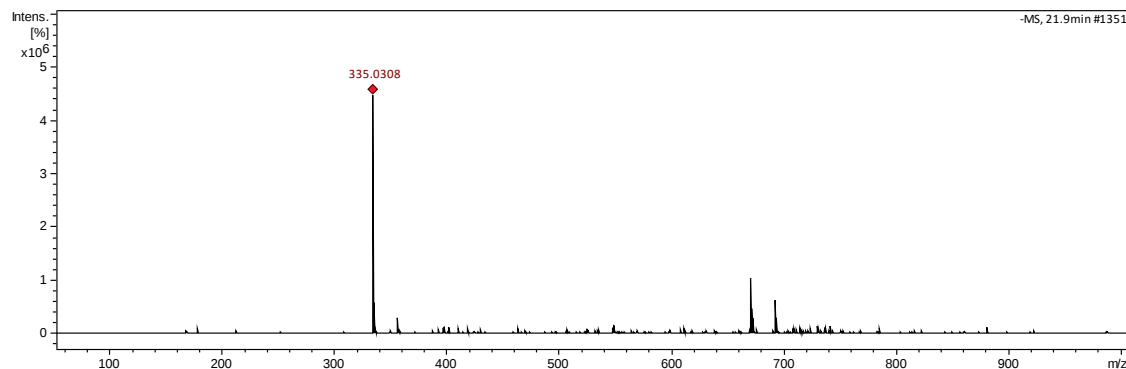


Figura D.2 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 32,0 min.

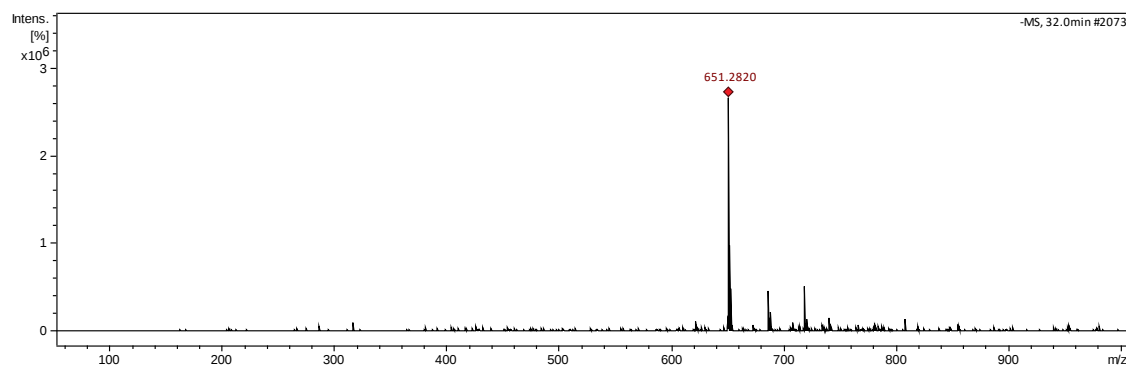


Figura D.3 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 34,5 min.

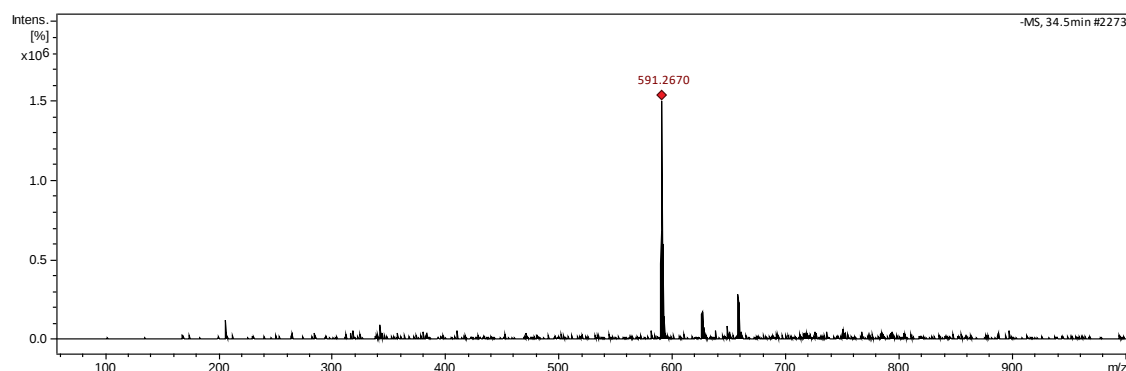


Figura D.4 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 39,1 min.

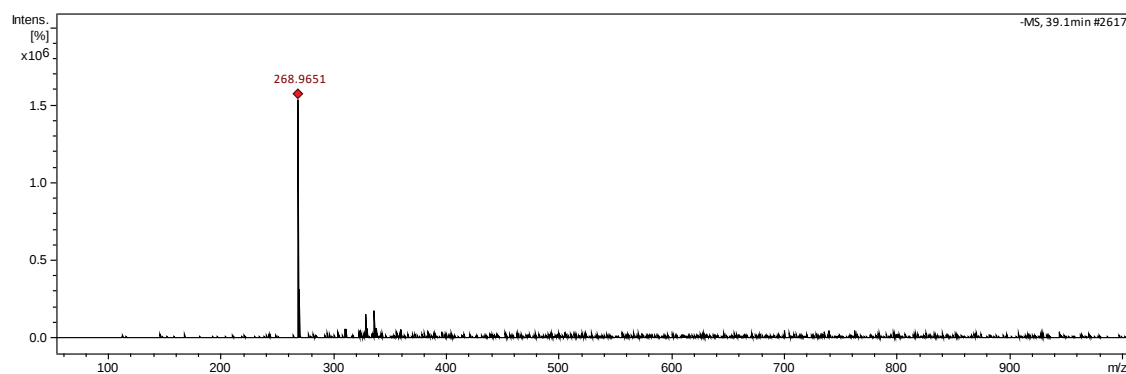


Figura D.5 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 42,9 min.

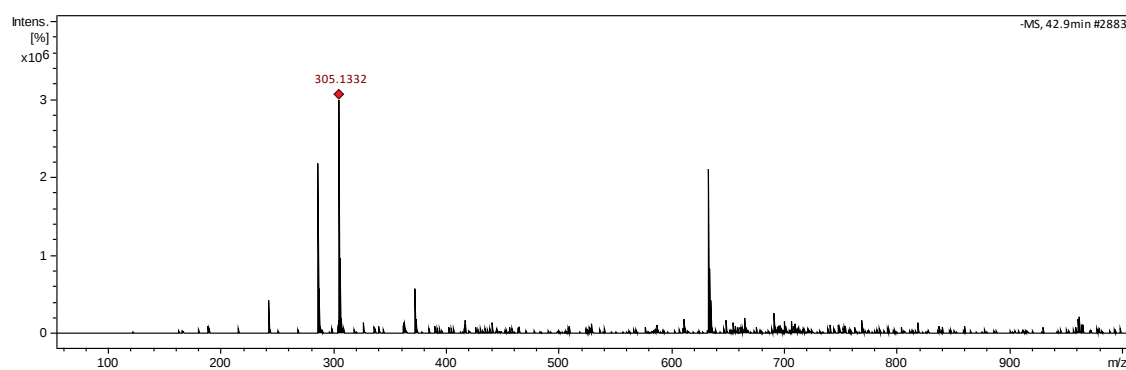


Figura D.6 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 43,9 min.

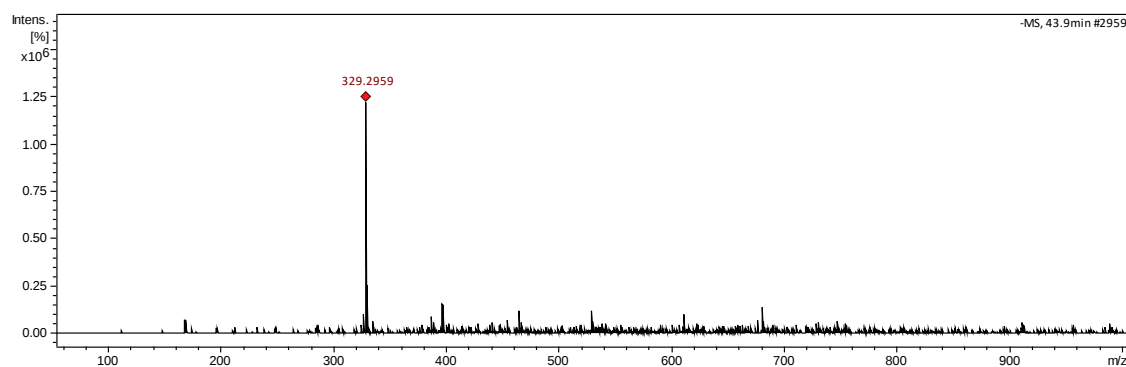


Figura D.7 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 45,8 min.

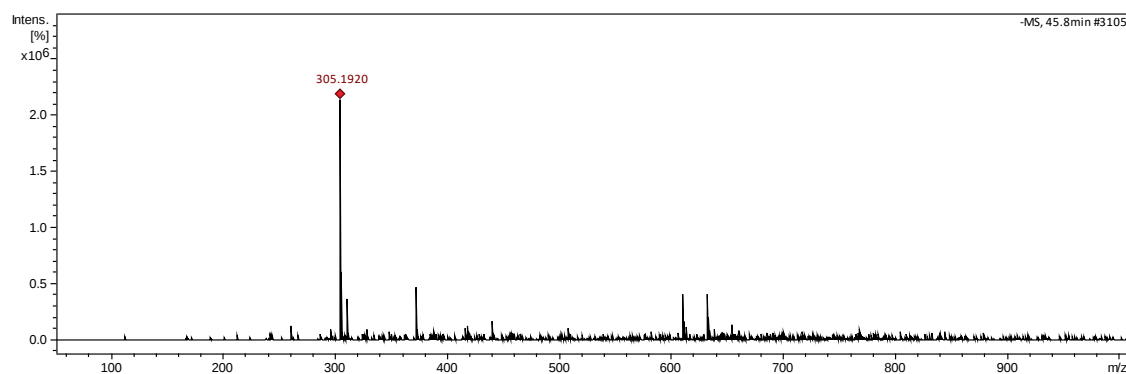


Figura D.8 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 46,3 min.

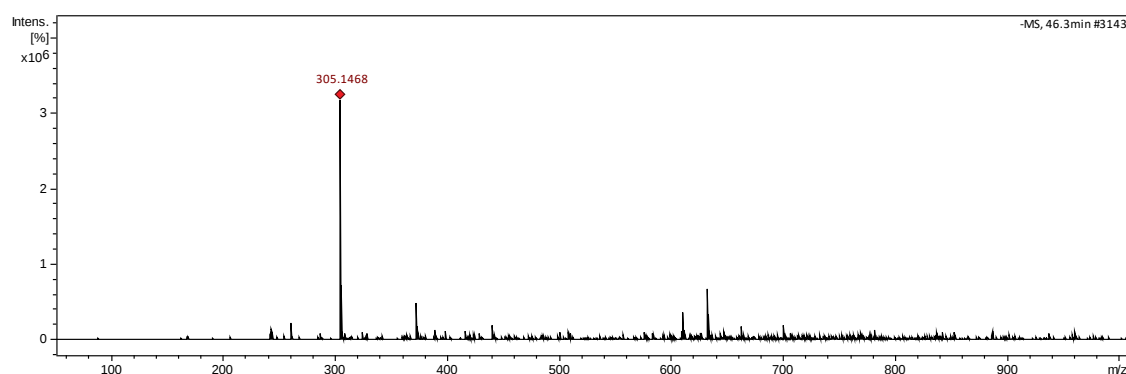


Figura D.9 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 51,6 min.

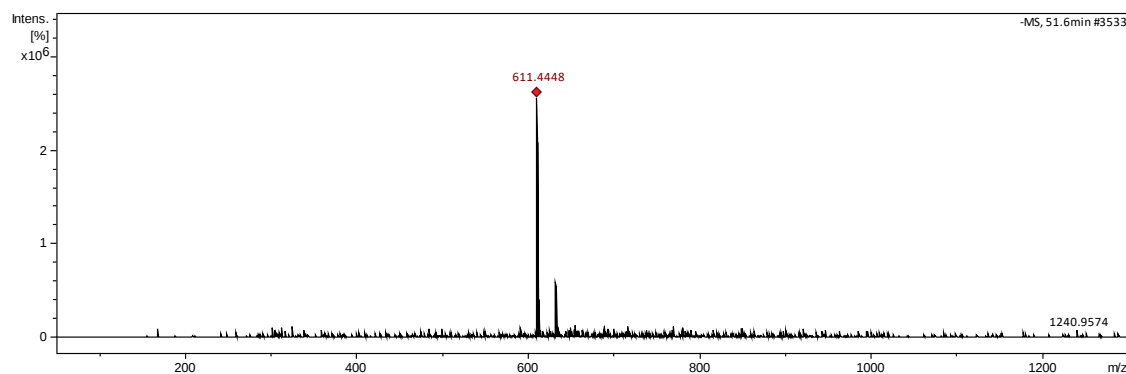
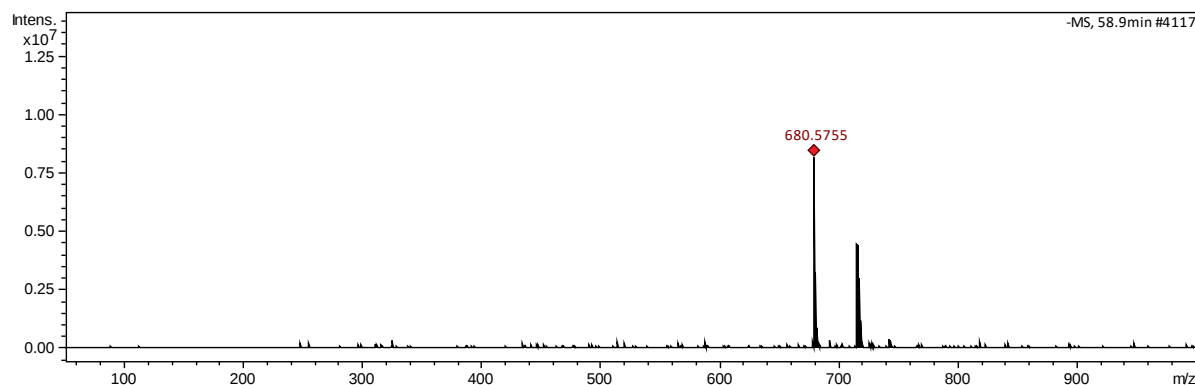


Figura D.10 – Espectro de massas da fração FrPoAcOEt (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 58,9 min.



APÊNDICE E – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPenbut

Figura E.1 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 17,3 min.

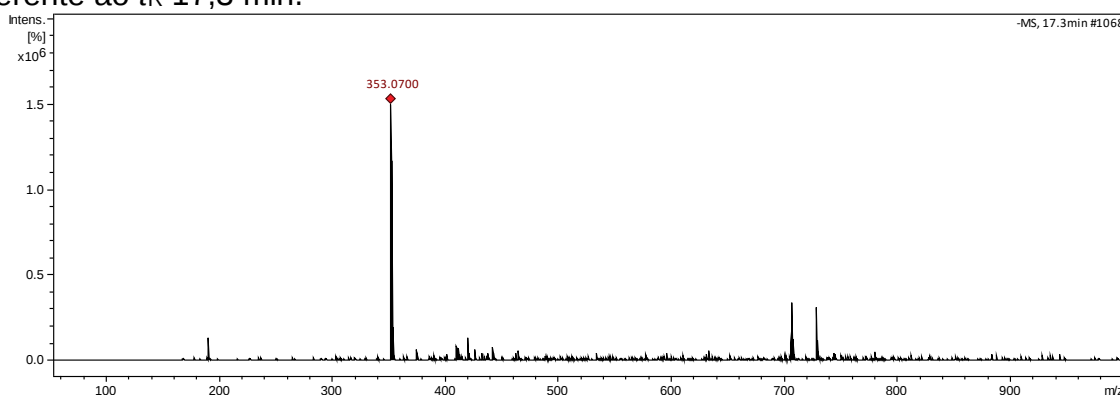


Figura E.2 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 21,4 min.

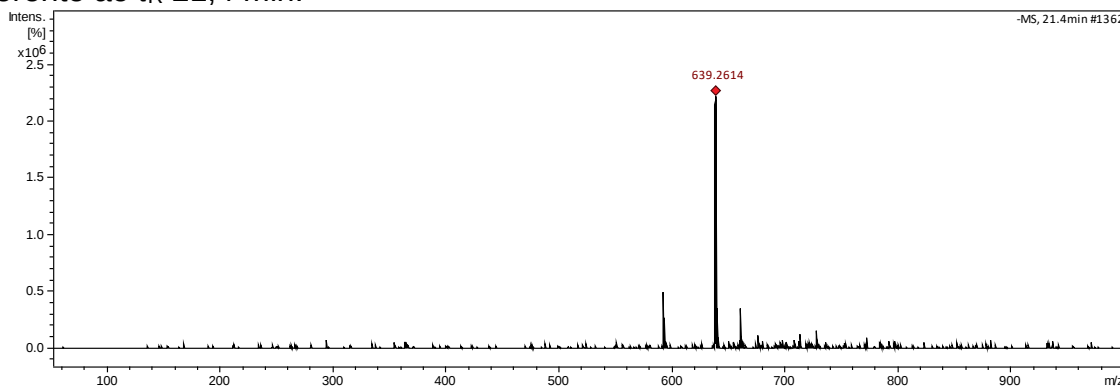


Figura E.3 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM-IES modo negativo) referente ao t_R 21,5 min.

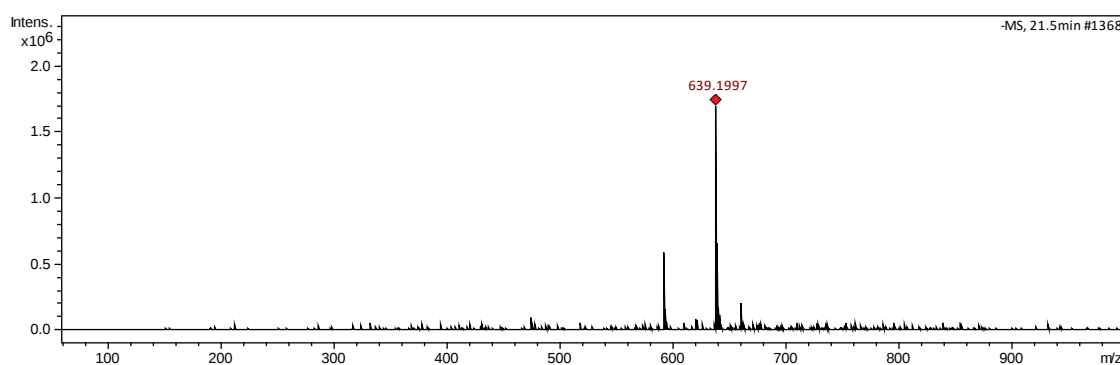


Figura E.4 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 21,7 min.

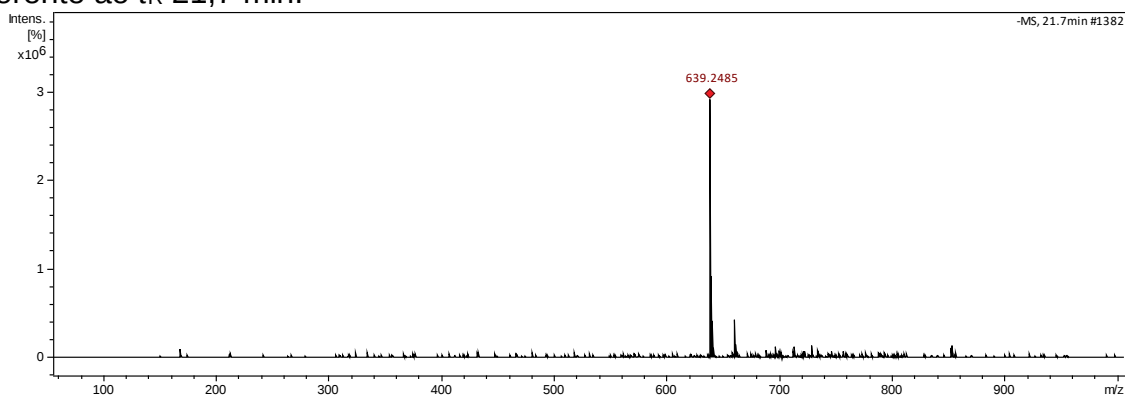


Figura E.5 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 27,0 min.

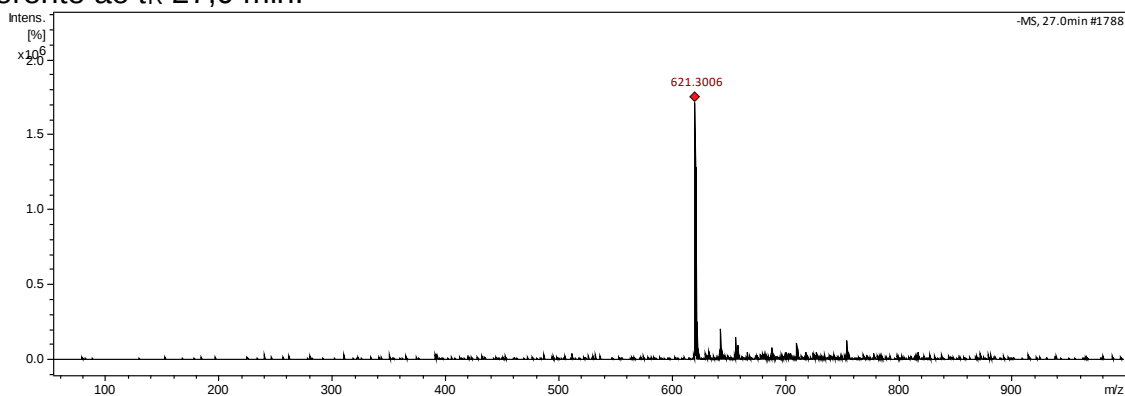


Figura E.6 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 27,3 min.

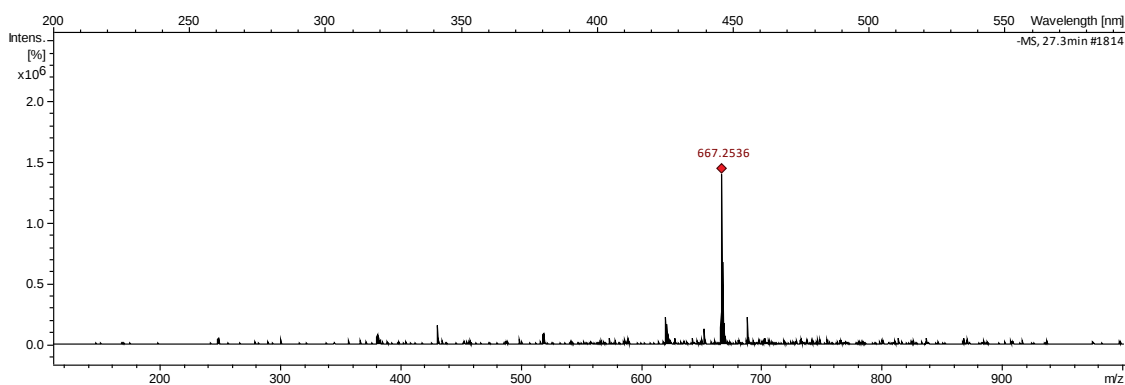


Figura E.7 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 32,0 min.

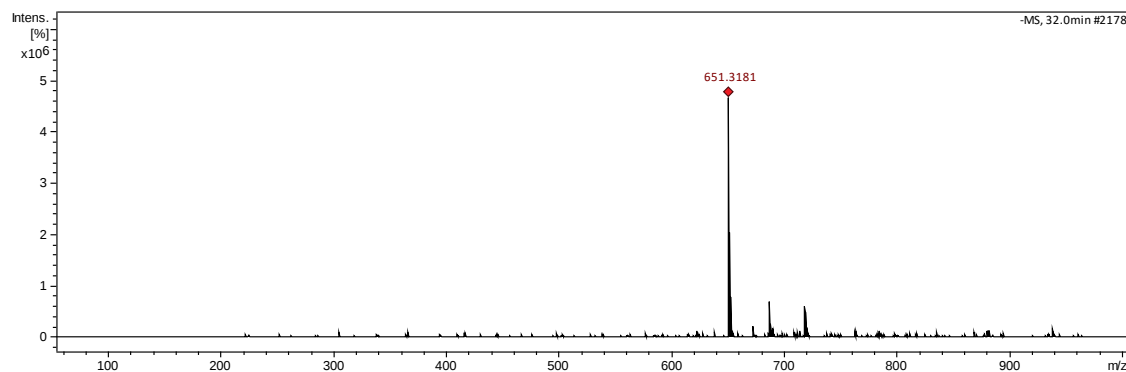
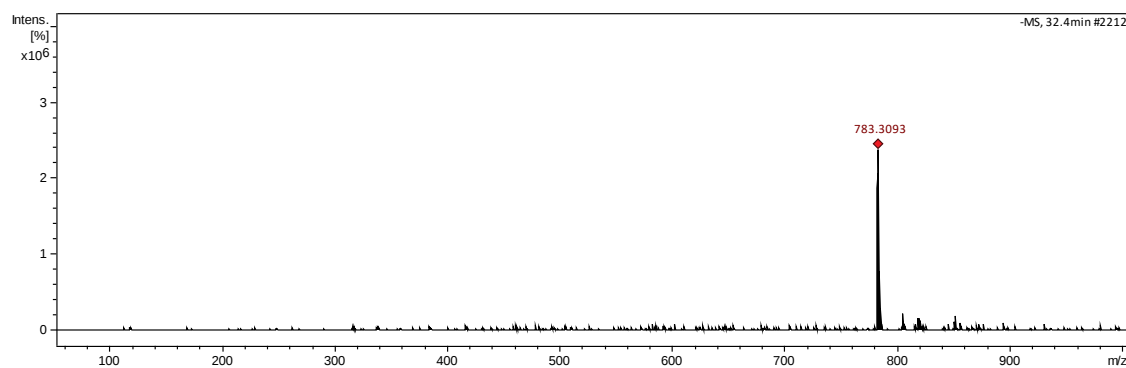


Figura E.8 – Espectro de massas da fração FrPenbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 32,4 min.



APÊNDICE F – ESPECTROS DE MASSAS DA FRAÇÃO FrPonbut

Figura F.1 – Espectro de massas da fração FrPonbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 17,4 min.

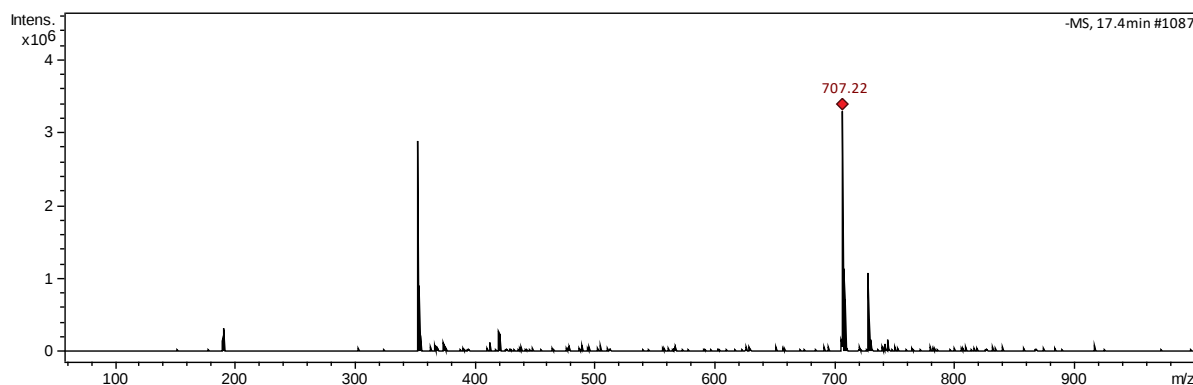


Figura F.2 – Espectro de massas da fração FrPonbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 21,5 min.

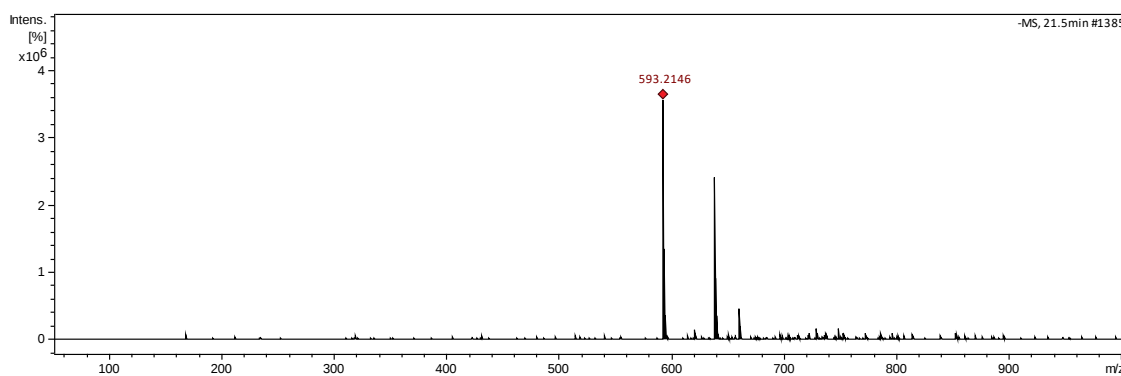


Figura F.3 – Espectro de massas da fração FrPonbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 21,9 min.

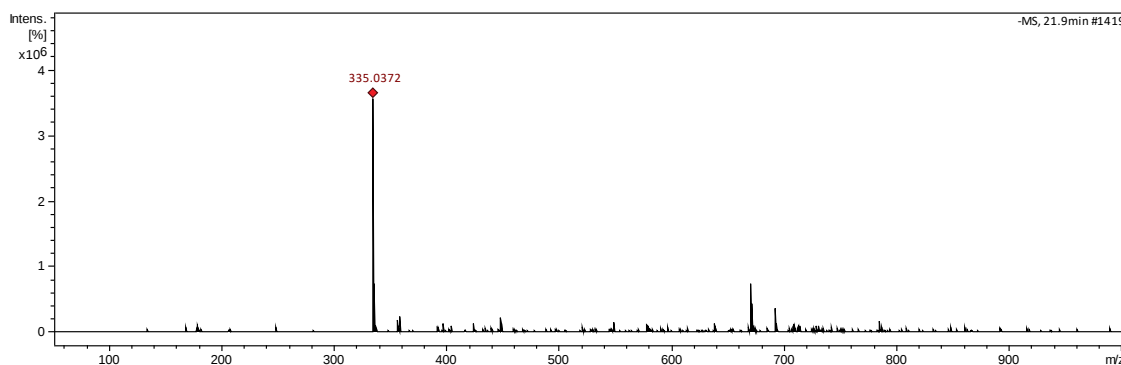


Figura F.4 – Espectro de da fração FrPonbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 32,0 min.

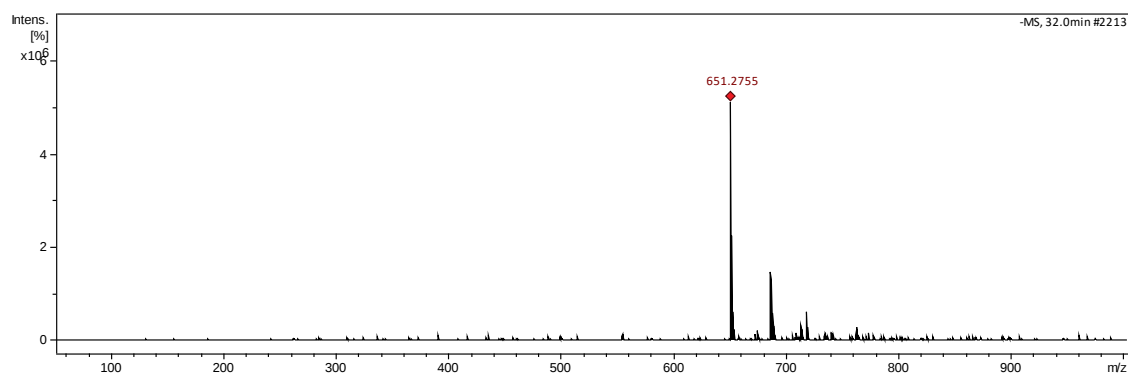


Figura F.4 – Espectro de da fração FrPonbut (EM–IES modo negativo) referente ao t_R 32,4 min.

