

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Gáveni Barbosa Valério

Estudo químico e avaliação do potencial antifúngico das folhas e frutos de
Lantana trifolia L. (Verbenaceae)

UBERABA
2023

Gáveni Barbosa Valério

Estudo químico e avaliação do potencial antifúngico das folhas e frutos de
Lantana trifolia L. (Verbenaceae)

Exame geral de defesa de doutorado
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
2023

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

V256e Valério, Gáveni Barbosa
Estudo químico e avaliação do potencial antifúngico das folhas e
frutos de *Lantana trifolia* L. (Verbenaceae) / Gáveni Barbosa Valério. --
2024.
19 f. : il., graf., tab.

Tese (Doutorado Multicêntrico em Química de Minas Gerais) --
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024
Orientadora: Profa. Dra Amanda Danuello Pivatto
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

1. Lantana. 2. Quimiometria. 3. Estrutura Molecular. 4. Anti -
infeciosos. I. Pivatto, Amanda Danuello. II. Universidade Federal do
do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 582.929.3:54



Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais
Uberaba - MG

ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais				
Evento:	EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO				
Data:	29/09/2023	Início em:	14h00	Término em:	19:30
Número de matrícula aluno:	2018.1096.4				
Nome do aluno:	Gáveni Barbosa Valério				
Título do trabalho:	"Estudo químico e avaliação do potencial antifúngico das folhas e frutos de Lantana trifolia L. (Verbenaceae)"				
Área de concentração:	Produtos Naturais				
Linha de Pesquisa:	Química Orgânica				
Projeto de pesquisa vinculado:	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade de Produtos Naturais - INCT BioNat				

Reuniu-se de forma remota, utilizando-se a plataforma Googlemeet (<https://meet.google.com/pfm-zofu-jkn>) em conformidade com as recomendações do Ofício Circular n.º 03F/2020/PROPPG/UFTM, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, assim composta dos Professores Doutores: **Denise Brentan da Silva (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), **João Henrique Ghilardi Lago (Universidade Federal do ABC)**, **Raquel Maria Ferreira de Sousa (Universidade Federal de Uberlândia)**, **Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine (Universidade Federal do Triângulo Mineiro)** e **Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto Orientadora da candidata**. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Concluída a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca se reuniu e atribuiu o resultado final, considerando a candidata:**

APROVADA

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFTM.

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada, dela sendo lavrada a presente ata, que foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Denise Brentan da Silva, Usuário Externo**, em 04/10/2023, às 01:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Usuário Externo**, em 04/10/2023, às 22:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **KARINA FERRAZZOLI DEVIENNE VICENTINE, Professor do Magistério Superior**, em 16/10/2023, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joao Henrique Ghilardi Lago, Usuário Externo**, em 17/10/2023, às 07:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Danuello Pivatto, Usuário Externo**, em 17/10/2023, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1066743** e o código CRC **BFB772CA**.

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, que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava, me deram suporte durante toda a trajetória. Ao meu pai que se aventurou desde as buscas pela espécie correta, exsiccatas e coletas do material vegetal, me auxiliando na base do trabalho.

Ao meu irmão Liniker e minha cunhada Andressa pelo carinho. A minha sobrinha Valentina, que veio para tornar a vida mais leve com a sua inocência e motivação. 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 antifúngicos.

A Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim pela análise de citotoxicidade.

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

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto pelas análises de quimiometria.

A Dra Camila Capel Godinho, que durante o seu projeto de doutorado, topou colaborar com a parte essencial desse trabalho (Quimiometria e GNPS), obrigada por todas as conversas e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro e a aluna de pos doutorado Dra. Isabel Duarte Coutinho pelo auxílio nas análises de cromatografia.

À Profa Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e aos técnicos Dr. Nivaldo Boralle, Dr João Luiz Bronzel Júnior e Dra Juliana Rodrigues pelas análises de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

Aos Prof. (s) Dr. Alan Pilon e Dra Aline Coqueiro por todo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico Flaysner Magayver pelas análises de ressonância magnética.

Aos alunos de pós-graduação do NuPPEn e do NPCBio. De um modo especial a Leticia, Michelle, Marília, Thamires, Karina, Tiara, Debora, Diego, Ingrede e Raul, pelos bons momentos vividos durante esses anos, muito obrigada por me acolherem

na UFU, tornando os dias mais leves, foi uma honra dividir bancada e a vida com vocês.

Aos meus “pais científicos” Dra. Amanda Danuello Pivatto e Dr. Marcos Pivatto por toda confiança e orientação. Obrigada pelo tempo dedicado e pelos ensinamentos.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPEMIG, CNPq, RQ-MG e INCT-BioNat pelo apoio financeiro ao projeto vinculado a este trabalho. A UFTM e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais.

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

Epígrafe

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

RESUMO

Lantana trifolia L. (Verbenaceae), conhecida popularmente como milho de grilo, calmante de pomba e uvinha do mato, é uma planta arbustiva utilizada na medicina popular na forma de infusões e xaropes para o tratamento de diversas enfermidades. Estudos encontrados na literatura relatam o potencial antimicrobiano dos compostos presentes nas folhas desta planta, o que despertou o interesse para um estudo mais detalhado do perfil químico e avaliação do potencial antifúngico dos extratos etanólicos e frações das folhas e frutos de *L. trifolia*. Adicionalmente, foi realizado um estudo comparativo do perfil químico e farmacológico dos extratos e frações de diferentes espécimes coletados em Pontal/SP e Peirópolis/MG. No ensaio para avaliação da atividade antifúngica foi observado que as frações acetato de etila apresentaram bons resultados para as três linhagens de *Candida* avaliadas (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), com destaque para as frações acetato de etila oriundas dos frutos coletados em Pontal e Peirópolis e *n*-butanol dos frutos de Peirópolis que apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 1,46, 2,93 e 2,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, contra *C. glabrata*, próximos do controle positivo anfotericina (0,5–1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os extratos e frações foram avaliados quanto à citotoxicidade, e a partir dos resultados foram calculados os índices de seletividade (IS), que permitiu inferir que as frações mais ativas no ensaio antifúngico foram mais seletivas contra a cepa de *C. glabrata* do que para as células saudáveis. Com auxílio de técnicas quimiométricas e através do uso de redes moleculares (*Global Natural Products Social Molecular Networking* - GNPS) foi possível analisar o perfil químico das frações, assim como fazer a anotação de 29 compostos fenólicos (fenilpropanoides e flavonoides), sendo que nove são biomarcadores indicados pelas variáveis importantes para projeção (VIP) e pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O estudo químico da fração acetato de etila das folhas coletadas em Peirópolis levou ao isolamento do flavonoide escutelareina-7-*O*-apiosídeo e do ácido protocateuico, e o estudo da fração *n*-butanol das folhas de Peirópolis levou ao isolamento do fenilpropanoide verbascosídeo que também foi anotado pelas redes moleculares. Com as análises de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) da fração hexano das folhas de Peirópolis foi possível realizar a identificação de 16 compostos, dentre eles terpenos, ácidos graxos e seus derivados. Dessa forma, o presente trabalho comprova o potencial antifúngico de *L. trifolia* e contribui com o conhecimento químico e biológico de espécies presentes no território brasileiro que são utilizadas na medicina tradicional.

Palavras-chave: *Lantana trifolia*, quimiometria, redes moleculares e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Lantana trifolia L. (Verbenaceae), popularly known as milho de grilo, calmante de pomba and uvinha do mato, is a shrubby plant used in folk medicine in the form of infusions and syrups to treat several illnesses. Studies found in the literature report the antimicrobial potential of the compounds present in the leaves of this plant, which aroused our interest for a more detailed study aiming to evaluate the chemical profile and the antifungal potential of the extracts from the *L. trifolia* leaves and fruits. Further, it was performed a chemical and pharmacological comparison between ethanol extracts and fractions of leaves and fruits from different specimens collected in Pontal/SP and Peirópolis/MG. In the antifungal activity assay was observed that the ethyl acetate fractions presented a highest activity against the three *Candida* strains evaluated (*C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*), with emphasis on the ethyl acetate fraction of the fruits collected in Pontal and Peirópolis and *n*-butanol fraction from fruits collected in Peirópolis, which presented minimum inhibitory concentration (MIC) values of 1.46, 2.93 and 2.93 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, against *C. glabrata*, that were close to the positive control amphotericin (0.5–1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The extracts and fractions were evaluated as cytotoxicity and used to calculate the selectivity index (SI), which allowed us to notice that the most active fractions in the antifungal assay were more selective against *C. glabrata* strain than healthy cells. Furthermore, chemometric techniques and molecular networks (global natural products social molecular networking - GNPS) gave support to analyze the chemical profile of the fractions, as well as to annotate 29 phenolic compounds (phenylpropanoids and flavonoids); among then 9 biomarkers were indicated by the variable importance in projection (VIP) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA). The chemical study of the ethyl acetate fraction from leaves collected in Peirópolis allowed the isolation of the flavonoid scutellarein-7-*O*-apioside and protocatechuic acid, as well as the study of the *n*-butanol fraction from leaves collected in Peirópolis allowed the isolation of the phenylpropanoid verbascoside, which was also annotated by the molecular networks. Additionally, gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS) of hexane fractions from leaves collected in Peirópolis allowed the identification of 16 compounds, including terpenes, fatty acids and derivatives. Therefore, the present work proves the antifungal potential of *L. trifolia* and contributes to the chemical and biological knowledge of this species present in the Brazilian territory that are used in medicine folk.

Keywords: *Lantana trifolia*, chemometrics, molecular networks, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da artesiminina.....	19
Figura 2 – Estrutura química do isopreno e paclitaxel.....	21
Figura 3 - Estrutura química da atropina, vimblastina, vincristina e morfina.	22
Figura 4 – Estrutura química (+)-catequina e (–)-epicatequina	22
Figura 5 - Classificação de flavonoides.....	23
Figura 6 - Estrutura do cromofeler e quercetina 3- <i>O</i> -beta-glucosideo.....	24
Figura 7 - Fármacos utilizados no tratamento contra <i>Candida spp.</i>	25
Figura 8 - Classificação dos fármacos aprovados no período de 1981 a 2019.	26
Figura 9 - Estruturas da enfumafungina, ibrexafungerp e acetato de rezafungina. ...	27
Figura 10 – Estrutura Umuhengerina	28
Figura 11 - <i>Lantana trifolia</i> L.....	28
Figura 12 - Terpenos identificados no óleo essencial das folhas e/ou flores de <i>L. trifolia</i>	30
Figura 13 - Compostos fenólicos identificados nas folhas <i>L. trifolia</i>	31
Figura 14 - Fluxograma da extração líquido-líquido.	37
Figura 15- Dendrograma gerado pela HCA das frações das folhas e frutos no modo positivo.	62
Figura 16 – PLS-DA atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i> (ATCC 28366). 64	
Figura 17 - PLS-DA atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i> (ATCC 28366). 64	
Figura 18 - Variáveis Importantes para a Projeção (VIP) obtida através do PLS-DA, supervisionado de acordo com as frações ativas e inativas contra <i>Candida albicans</i> (ATCC 28366).	65
Figura 19 – Resumo da elaboração das redes moleculares	66
Figura 20 – Representação do redes moleculares das frações de <i>Lantana trifolia</i> usando ionização por eletrospray no modo positivo e filtrado de acordo com o local de coleta	67
Figura 21 - Representação da rede molecular filtrada de acordo com os valores de CIM contra <i>Candida glabrata</i>	68
Figura 22 - Estrutura dos compostos anotados pelo redes moleculares.....	73
Figura 23 – Estrutura dos biomarcadores determinado pela análise PLS–DA e anotação utilizando redes moleculares.	74
Figura 24 - Representação da rede molecular filtrado pelos valores de CIM contra <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> and <i>C. glabrata</i>	75
Figura 25- Representação da rede molecular filtrada de acordo com as datas de coleta.....	76
Figura 26- Cromatograma MPLC da fração FoPeAcOEt-C2.....	77
Figura 27- Fluxograma das frações da FoPeAcOEt-C2	78
Figura 28- Cromatograma CLAE em 254 nm do precipitado da fração 6-18.	80
Figura 29- Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD)	82
Figura 30- Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD)	83
Figura 31- Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CD ₃ OD)	84
Figura 32- Ampliação mapa de contorno HMBC (400 MHz, CD ₃ OD)	84
Figura 33– Cromatograma CLAE em 254 nm da fração 0-5	85
Figura 34- Cromatograma CLAE em 254 nm do pico 3 da fração 0-5	86
Figura 35- EM-IES(–) em alta resolução do pico 3 da fração 0-5	86
Figura 36- Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD)	88
Figura 37- Espectro de RMN de Dept (150 MHz, CD ₃ OD).....	89

Figura 38– Mapa de contorno HMBC 600 MHz, CD ₃ OD.....	89
Figura 39- Cromatograma MPLC da fração FoPenbut-C2	91
Figura 40- Fluxograma das frações da FoPenbut-C2	93
Figura 41- Cromatograma da fração 32-33 (254 nm) em coluna semipreparativa....	94
Figura 42- Cromatograma do verbascosídeo (31) (254nm) em coluna analítica.....	94
Figura 43- Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD)	97
Figura 44– Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD)	98
Figura 45- Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD)	99
Figura 46- Espectro EM-IES(-) em alta resolução composto verbascosídeo	100
Figura 47– Espectro EM/EM-IES(-) do composto verbascosídeo	100
Figura 48- Proposta de fragmentação para o glicosídeo feniletanoídeo verbascosídeo (31).....	101
Figura 49- Cromatograma da mistura em coluna analítica.....	101
Figura 50- Espectro EM-IES(-) em alta resolução.....	102
Figura 51- Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD)	103
Figura 52– Ampliação na região dos hidrogênios anoméricos do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD).....	104
Figura 53 - Ampliação dos sinais de metila característicos da ramnose do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD).....	105
Figura 54 – Estrutura Samiosídeo e Betanosídeo F	105
Figura 55 - Cromatograma (CG-EM) das frações FoPeHex-C2 e FoPeHex-C3	107
Figura 56 – Compostos identificados por CG-EM	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sistema de eluição gradiente para análise em UFLC-EM.....	42
Tabela 2- Parâmetros utilizados no MzMine™ software para o pré processamento dos dados obtidos pela ionização no modo positive UFLC-DAD-IES(+)-EM/EM (microTOF-QII) análises.	43
Tabela 3 - Sistema de eluição gradiente para análise em MPLC da Fração FoPeAcOEt-C2.....	45
Tabela 4 - Sistema de eluição gradiente para análise em MPLC FoPenbut-C2.....	46
Tabela 5 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLUE-DAD.	46
Tabela 6 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE fração 32 – 33.....	47
Tabela 7 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE fração 35 - 40.	47
Tabela 8- Sistema de eluição gradiente para análise em CLUE-EM.....	48
Tabela 9– Dados da coleta do material vegetal.	51
Tabela 10– Rendimento da extração com etanol.....	51
Tabela 11- Rendimento em gramas da Extração líquido – líquido dos extratos.	53
Tabela 12- Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas e frutos	54
Tabela 13 - Triagem fitoquímica das frações das folhas e frutos	55
Tabela 14– Avaliação da atividade antifúngica de folhas e frutos de <i>L. trifolia</i>	57
Tabela 15- Controle das leveduras.	58
Tabela 16– Ensaio citotoxicidade e índice de seletividade das frações da planta <i>Lantana trifolia</i>	59
Tabela 17– Anotação dos compostos nas frações de <i>L. trifolia</i> por redes moleculares.....	70
Tabela 18- Atividade antifúngica das Frações FoPeAcOEt-C2.....	79
Tabela 19 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (400/100 MHz, CD ₃ OD) do precipitado em MeOD.....	81
Tabela 20- Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (600/150 MHz, CD ₃ OD) do ácido protocatecuico em MeOD.....	87
Tabela 21- Atividade antifúngica dos compostos isolados da fração FoPeAcOEt-C2.	90
Tabela 22 - Atividade antifúngica das Frações FoPenbut-C2	92
Tabela 23 - Dados de RMN de ¹ H de 45 (CD ₃ OD).....	96
Tabela 24 - Atividade antifúngica dos compostos isolados da fração FoPenBut-C2.	106
Tabela 25 – Atividade antifúngica das frações hexano das folhas	106
Tabela 26 – Compostos identificados das frações FoPeHex-C2 e FoPeHex-C3....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC - American Type Collection
CC50 - Concentração citotóxica
CCD - Cromatografia de camada delgada
CG-EM - Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas
CIM - Concentração inibitória mínima
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI - Clinical and Laboratory Standards
CLUE - cromatografia líquida de ultra eficiência
DMSO - Dimetilsulfóxido
EEFoPe - Extrato etanólico folhas Peirópolis
EEFoPo - Extrato etanólico folhas Pontal
EEFrPe - Extrato etanólico frutos Peirópolis
EEFrPo - Extrato etanólico frutos Pontal
EM - Espectrometria de massas
EM/EM – Espectrometria de massas sequencial
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
GNPS - Global Natural Products Social

IES - Ionização por eletrospray
IS - Índice de seletividade
LEA - Laboratório de Ensaio Antimicrobianos
ME - metabólitos especiais
MPLC - Cromatografia líquida de média pressão
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NP - Ácido β -etilaminodifenilbórico ester
NPCBio - Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos
NPPNS - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos
NuBBE - Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia
PEG – Polietilenoglicol 4000
PLS-DA - Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PN - Produtos naturais
RELAM - Rede de Laboratórios Multiusuários
RMN - Ressonância magnética nuclear
RPMI Roswell Park Memorial Institute 1640
TBS - Triptona de soja
VIP - Variáveis importantes para projeção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 PRODUTOS NATURAIS.....	20
1.2 CEPAS DE CANDIDA.....	24
1.3 <i>Lantana Trifolia</i> L.....	28
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1 MATERIAIS.....	33
3.2 EQUIPAMENTOS.....	34
3.3 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	35
3.4 EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO.....	36
3.5 EXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO DOS EXTRATOS.....	36
3.6 TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	37
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	39
3.7.1 Determinação da atividade antifúngica	39
3.7.1.1 <i>Microrganismos</i>	39
3.7.1.2 <i>Preparo do inóculo</i>	39
3.7.1.3 <i>Preparo dos controles</i>	40
3.7.1.4 <i>Método da microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima</i>	40
3.8 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	41
3.9 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRA-RÁPIDA acoplada A ESPECTROMETRIA de massas (UFLC-EM).....	41
3.10 QUIMIOMETRIA.....	42
3.11 REDES MOLECULARES.....	44
3.12 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO.....	45
3.13 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA.....	46
3.14 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	47
3.15 ANÁLISE DE CLUE-EM.....	48
3.16 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	49
3.17 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
4.1 COLETA, PREPARO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO– LÍQUIDO DAS FOLHAS E FRUTOS DE <i>L. trifolia</i>	50
4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	54
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	56

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	58
4.5 QUIMIOMETRIA.....	60
4.6 REDES MOLECULARES.....	66
4.7 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO FoPeAcoEt-C2.....	77
4.8 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO FoPenbut-c2.....	90
4.9 ANÁLISES CG-EM.....	106
5 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
APENDICE A – TABELAS.....	118
APÊNDICE B – ESPECTROS EM DOS COMPOSTOS ANOTADOS.....	127
APÊNDICE C – ESPECTROS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CG-EM.....	188

1 INTRODUÇÃO

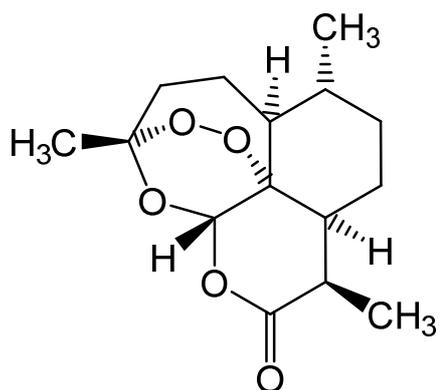
Os produtos naturais são empregados pelo homem há milhares de anos na sua alimentação, proteção, cuidados primários de saúde e entre outros. A utilização de plantas medicinais desde a antiguidade pode ser comprovada pela tábua de Nippur, que data aproximadamente 2500 a.C. considerada o texto medicinal mais antigo em que está descrito o uso de aproximadamente 250 plantas para fins medicinais. O manuscrito Codex Badianus, escrito em 1552 por Martín de la Cruz, inclui 249 plantas medicinais originárias dos povos pré-colombianos e conhecido como o primeiro livro médico das américas (Gomez, 2008; Soriano-Castell et al., 2021). Cabe destacar que registros arqueológicos relataram a presença de plantas medicinais nos dentes de fósseis de Neandertais (Weyrich et al., 2017).

A “*historia naturalis brasiliae*” publicada em 1648 na Europa, é um dos primeiros livros que retratam a fauna, flora, topografia e outras características do território brasileiro da época, assim como as suas enfermidades, venenos, antídotos e o uso de plantas medicinais pelos indígenas, sendo considerado o primeiro livro sobre a história natural completa da América do Sul (Pinto et al., 2002).

O conhecimento sobre o uso dos recursos naturais é o somatório da contribuição de diversas culturas e a transmissão para as próximas gerações, fazendo parte de uma das mais antigas práticas medicinais. A utilização destes recursos associada aos conhecimentos e costumes tradicionais de diferentes grupos étnicos serve como fonte inspiração de pesquisas na área de química dos produtos naturais e no desenvolvimento de novos fármacos (Brasil, 2006).

A Dra. Tu Youyou (Academia de Medicina Tradicional Chinesa, Pequim, China), inspirada pelos relatos populares da planta *Artemisia annua* que era utilizada no tratamento de febres intermitentes, descobriu o produto natural artemisinina (**1**) (Figura 1) que, após diversos experimentos e ensaios clínicos, se tornou um medicamento empregado no tratamento da malária. Esta descoberta lhe rendeu o prêmio Nobel de fisiologia ou medicina em 2015 (Tu, 2016).

Figura 1- Estrutura química da artesiminina



Artemisinina (1)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 60% da população mundial utiliza produtos naturais no tratamento de doenças, sendo que em alguns países o uso desses produtos está inserido no sistema de saúde pública. No Brasil, o emprego de plantas e fitoterápicos está incorporado no sistema único de saúde (SUS). Em 2006, por meio do decreto nº 5.813, foi criada a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, cujo objetivo é garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país (Brasil, 2006; Organização Mundial de Saúde, 2015).

Em 2010 foi implementado o Programa Farmácia Viva, cujo objetivo é a produção de fitoterápicos levando em consideração todos os processos como cultivo de plantas medicinais, coleta, armazenamento e preparo de fitoterápicos. Na segunda edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira publicado em 2021, está incluso 85 monografias, cada uma sobre uma espécie de planta com propriedades medicinais, descrevendo o modo de preparo e as indicações para consumo, bem como as contraindicações (Brasil, 2021).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou em 2022 uma cartilha informativa sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, considerando o risco do consumo destes produtos sem o auxílio de um profissional especializado. Tais informações são extremamente relevantes, pois o consumo inadequado de algumas plantas pode gerar sérios riscos à saúde.

Desta forma, fica destacada a importância de estudos para identificação correta das espécies, confirmação da eficácia, avaliação da toxicidade e entre outros (Brasil, 2022).

1.1 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais, também conhecidos como metabólitos especializados (ME), podem ser encontrados em plantas, microrganismos, fungos e animais. Estes compostos são produtos do metabolismo secundário dos seres vivos, ou seja, não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento, porém são produzidos de acordo com a interação e/ou adaptação do organismo com o ambiente em que está inserido (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

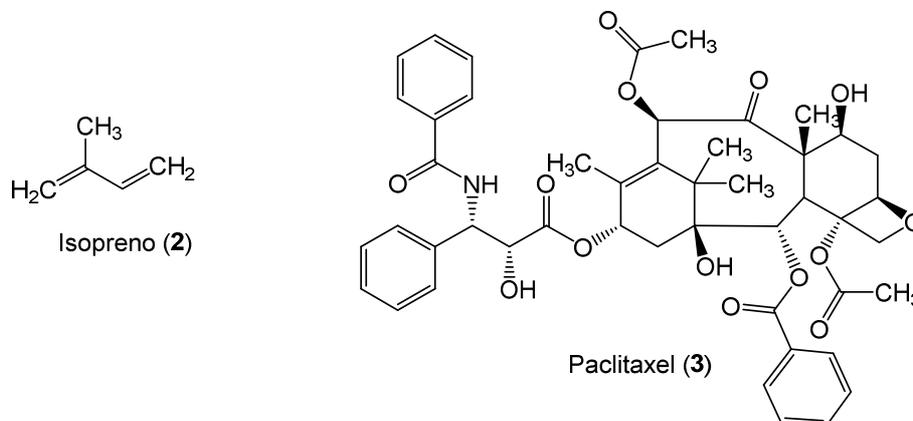
Os ME são conhecidos por sua diversidade estrutural e potencial para atividades biológicas, e a biossíntese geralmente é afetada pelas condições ambientais de onde o organismo está inserido, como a presença de radiação solar, temperatura, presença de água, estações do ano, nutrientes, presença de predadores e entre outros (Gobbo-Neto; Lopes, 2007). Estes compostos podem ser classificados de acordo com as vias metabólicas das quais foram produzidas, existem mais de 2.140.000 metabólitos e dentre as classes mais estudadas estão os terpenos, alcaloides e flavonoides (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000; Pant; Pandey; Dall, 2021).

Terpenos, também conhecidos como isoprenoides, conta com mais de 29 mil compostos identificados até o momento e podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) (2) presentes em sua estrutura (Figura 2). Os hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, tetraterpenos ou carotenoides e politerpenos, apresentam uma, duas, três, quatro, cinco, seis, oitos e mais que oito unidades de isopreno, respectivamente (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000).

Esta classe apresenta uma grande diversidade de compostos assim como uma vasta gama de atividades biológicas. Dentre estes, cabe destacar o

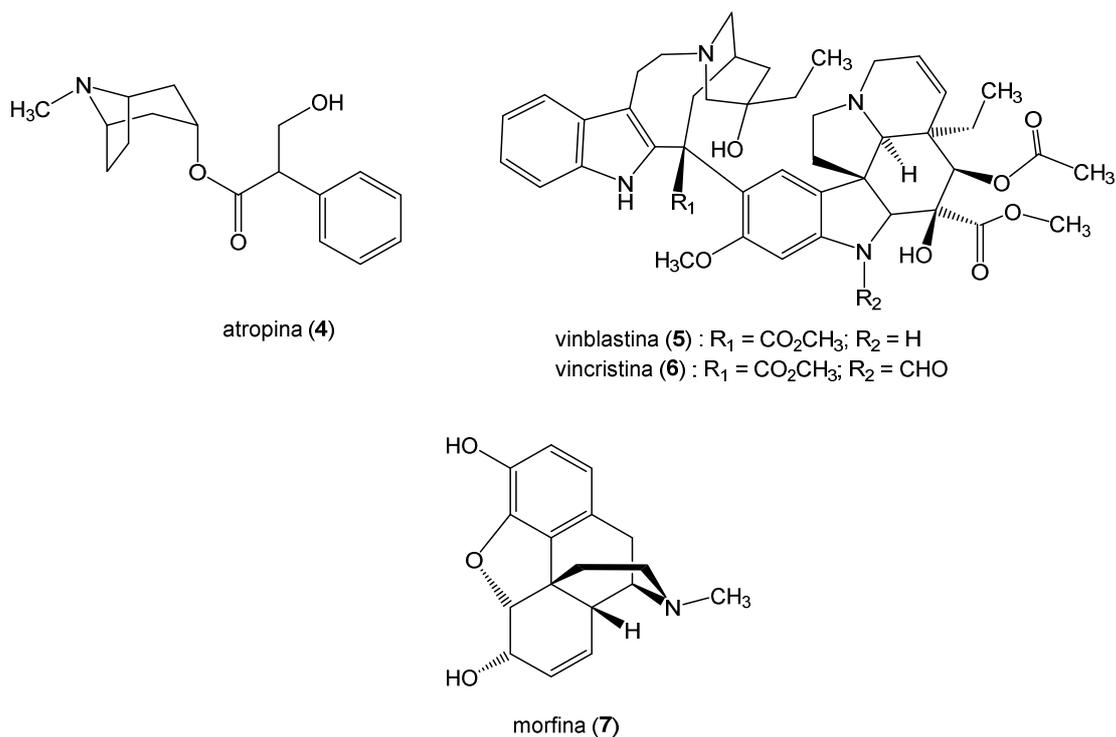
diterpeno com propriedades anticâncer paclitaxel **(3)** (Figura 1) (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000).

Figura 2 – Estrutura química do isopreno e paclitaxel.



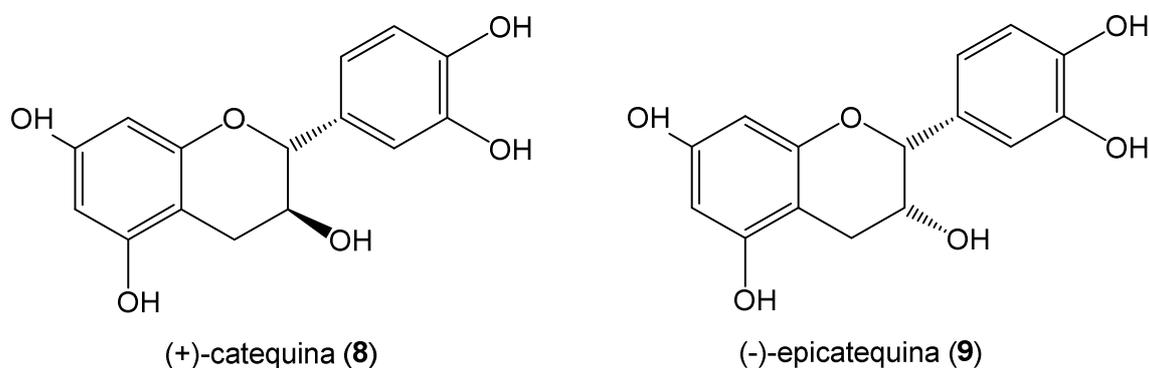
A segunda classe de ME, que merece destaque devido ao seu potencial farmacológico, é a dos alcaloides que possui nitrogênio em sua estrutura, contando com mais de 27 mil metabólitos identificados (Kukulu-Koch; Widelski, 2017). Dentre compostos estão a atropina **(4)**, utilizada geralmente em exames oftalmológicos para dilatar a pupila, a vimblastina **(5)** e a vincristina **(6)**, utilizadas como quimioterápicos, e a morfina **(7)** que apresenta potentes propriedades analgésicas (Figura 3) (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000).

Figura 3 - Estrutura química da atropina, vimblastina, vincristina e morfina.



Por fim, os compostos fenólicos contam com mais de 8 mil metabólitos identificados e estão presentes em várias frutas e vegetais do cotidiano, por exemplo a catequina e a epicatequina presentes em uvas (*Vitis spp*) (Figura 4) (Georgiev; Ananga; Tsoleva, 2014) .

Figura 4 – Estrutura química (+)-catequina e (-)-epicatequina

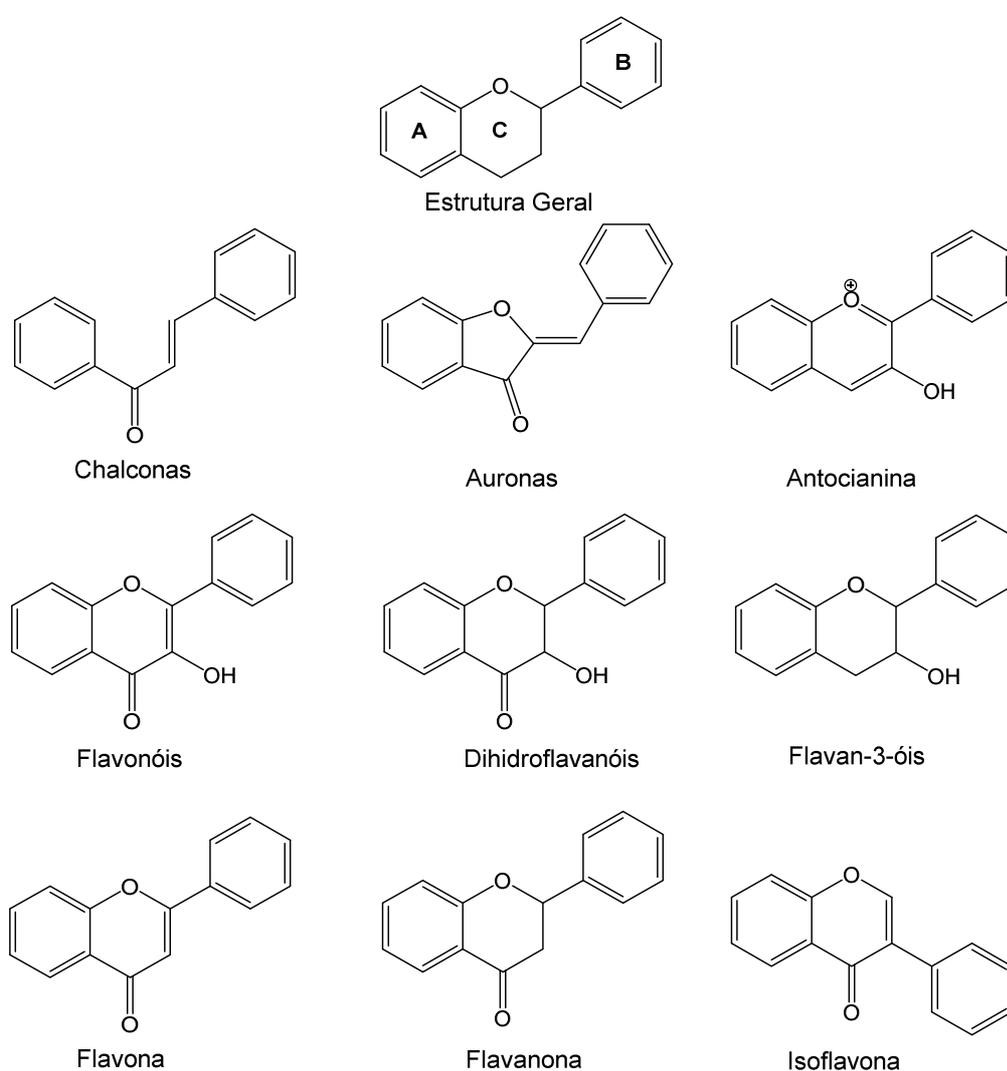


Os flavonoides são metabólitos polifenólicos que merecem destaque, pois dentre os compostos fenólicos são os mais abundantes com mais de

4.500 compostos identificados. Estes compostos são formados por um núcleo base de 15 átomos de carbono (2-fenil-benzopirano), constituído por dois anéis benzeno (A e B), ligados a um anel heterocíclico (C, Figura 5) (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000; Simpson e Amos, 2017).

De acordo com a substituição dos anéis A e B, os flavonoides são classificados em nove subclasses: chalconas, auronas, antocianinas, flavonóis, dihidroflavonóis, flavan-3-óis, flavonas, flavononas e isoflavonas (Figura 5) (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000).

Figura 5 - Classificação de flavonoides



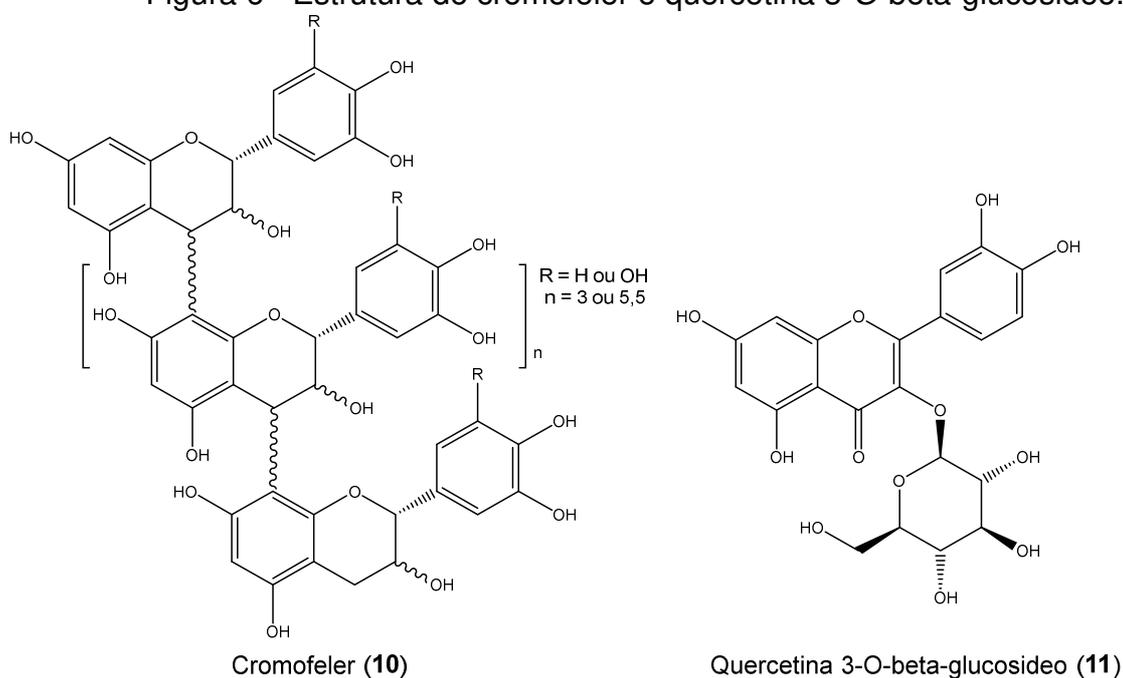
Fonte: Adaptado de (Simpson e Amos, 2017).

Muitas atividades biológicas já foram descritas para os flavonoides, como propriedades antioxidante, antiviral e antimicrobiano. Dentre esses

compostos está o crofelemer (**10**) (Figura 6), que é uma proantocianidina oligomérica extraída do látex da casca da *Croton lechleri*, que foi aprovado pelo FDA no alívio de diarreias (Frampton, 2013).

Cabe destacar o potencial antifúngico que diversos flavonoides demonstraram com valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) menores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, como a quercetina 3-*O*-beta-glucosideo (**11**) (CIM $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 6) contra cepa *Candida albicans* (Seleem; Pardi; Murata, 2017).

Figura 6 - Estrutura do cromofeler e quercetina 3-*O*-beta-glucosideo.



1.2 CEPAS DE CANDIDA

Candida é um agente patogénico fúngico que pertence à microbiota de cerca 50-70% dos seres humanos saudáveis (Pappas et al., 2018). As espécies do género *Candida* podem ser responsáveis por várias doenças infecciosas, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade de pessoas imunocomprometidas (Soliman et al., 2017).

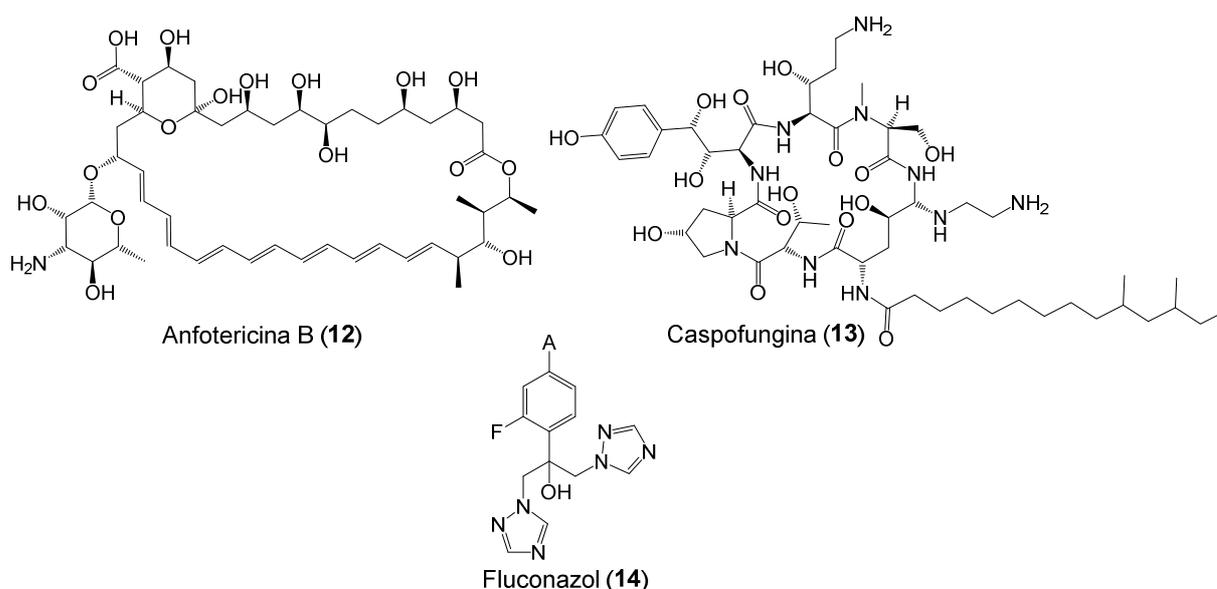
Em pessoas com a imunidade comprometida, a capacidade da *Candida* spp. causar candidíase é estimada em 80-95%, algo que também pode

acontecer durante tratamentos quimioterápicos. Dentre as consequências da infecção oral pode ocorrer dificuldades para engolir (disfagia), perda de peso ou até candidíase sistêmica (infecção invasiva do sangue) (Seleem; Pardi; Murata, 2017).

A taxa de mortalidade da forma sistêmica ou também conhecida como invasiva é cerca de 35-60% entre as pessoas imunocomprometidas. Pelo menos 15 espécies de *Candida* spp. podem causar doenças em humanos, mas grande parte das infecções são causadas pelas seguintes cepas: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e casos de infecções por *Candida auris* que é um patógeno emergente e foi reportado em mais de 39 países (Jallow; Govender, 2021; Pappas et al., 2018; Seleem; Pardi; Murata, 2017).

As cepas de *Candida* spp. são capazes de formar biofilmes, o que as torna resistentes a muitos tratamentos, sendo o padrão realizado com três tipos de fármacos antifúngicos, tais como polienos (anfotericina B) (**12**), equinocandinas (caspofungina) (**13**) e azoles (fluconazol) (**14**) (Figura 7) (Pappas et al., 2018; Rodrigues; Silva; Henriques, 2013).

Figura 7 - Fármacos utilizados no tratamento contra *Candida* spp.



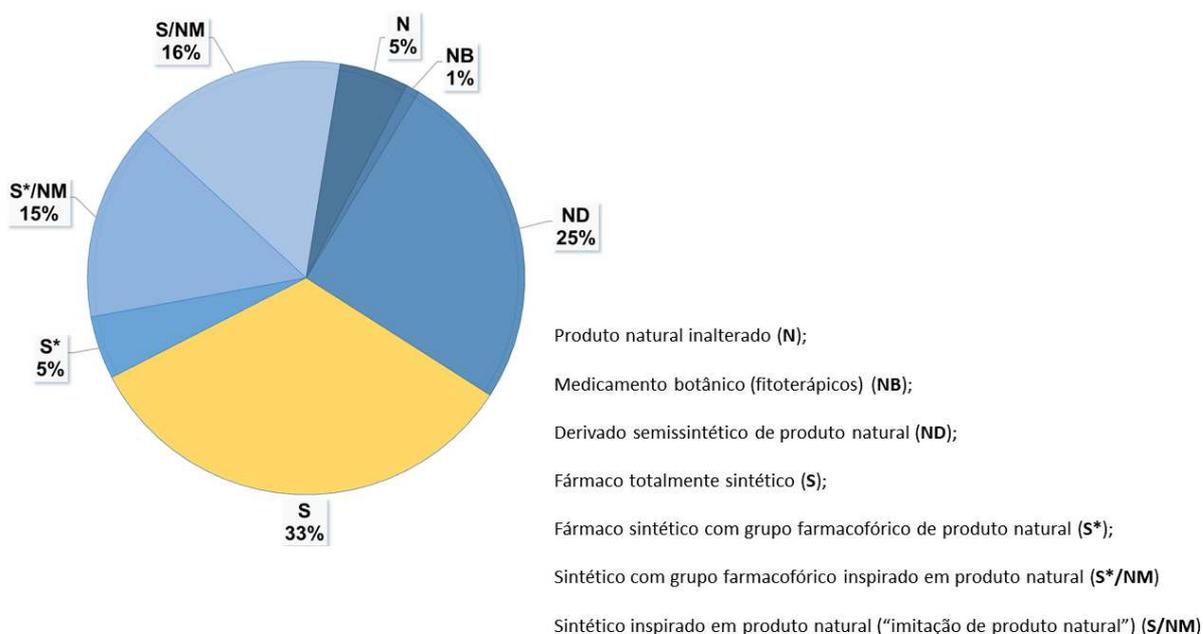
A resistência das espécies de *Candida* ao tratamento tem se tornado um problema, pois torna cada vez mais difícil a seleção de um medicamento para o

tratamento eficaz (Pappas et al., 2018; Rodrigues; Silva; Henriques, 2013). Neste contexto, torna-se necessária a busca de compostos com propriedades antifúngicas, especialmente propriedades anti-*Candida*.

Uma forma de superar o problema descrito acima é por meio de estudos bioguiados de produtos naturais, levando em consideração o uso na medicina tradicional, estratégia que pode ser utilizada para orientar e guiar a descoberta de novos fármacos (Newman; Cragg, 2020).

Segundo o levantamento realizado por (Newman; Cragg, 2020), dos 1394 fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) entre os anos de 1981 e 2019, cerca de 66% (Figura 8) foram baseados em produtos naturais ou derivados dos mesmos. Estes fármacos foram classificados como: produto natural inalterado (N) (5,1%), produto natural botânico (fitoterápicos) (NB) (1%), derivado de produto natural (ND) (27,5), fármaco sintético (S) (33,3%), sintético com grupo farmacofórico de produto natural (S*) (14,8%), sintético inspirado em produto natural (S/NM) (15,7%) e sintético com grupo farmacofórico inspirado em produto natural (S*/NM) (14,8%).

Figura 8 - Classificação dos fármacos aprovados no período de 1981 a 2019.

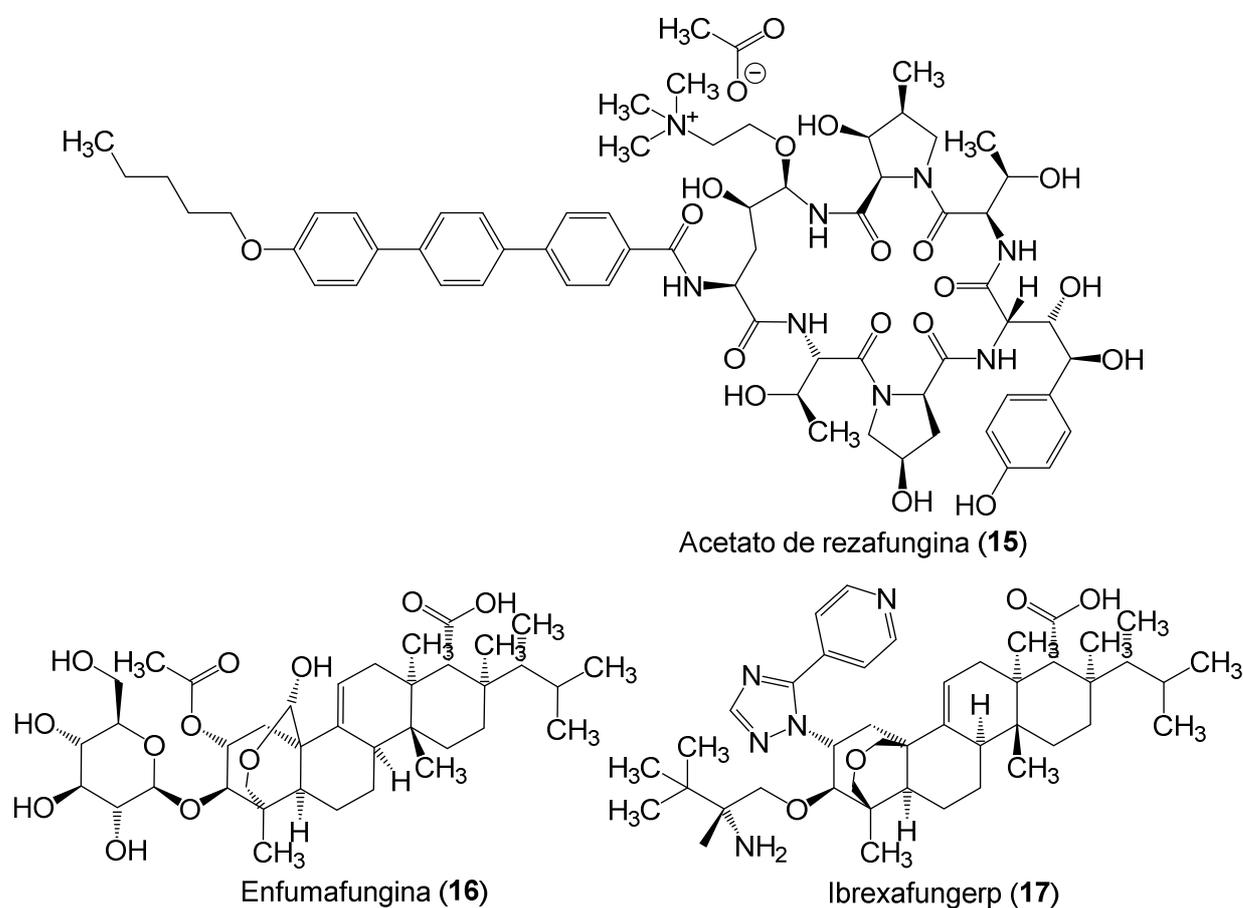


Adaptado de: Newman e Cragg, 2020.

Dos medicamentos com propriedades antifúngicas, cerca de 20,6% foram inspirados, derivados de produtos naturais ou possuem grupos

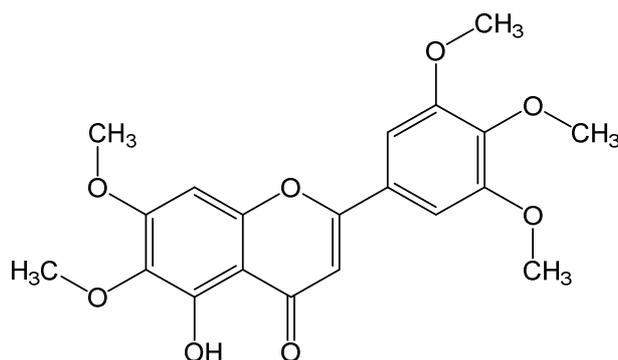
farmacofóricos inspirado em produto natural. Atualmente existem mais dois compostos inspirados em produtos naturais (PN) com potencial antifúngico um que se encontram em estudos clínicos de fase III: a rezafungina (**15**) que é inspirada no esqueleto de equinocandinas e a enfumafungina (**16**), que é um triterpeno que conduziu a semissíntese do ibrexafungerp (**17**), aprovado para o tratamento da candidíase vulvovaginal em dezembro de 2020 pelo FDA (Figura 9) (Newman; Cragg, 2020; Scynexis, 2020).

Figura 9 - Estruturas da enfumafungina, ibrexafungerp e acetato de rezafungina.



Dentro deste contexto, muitas plantas são conhecidas pelo potencial antifúngico, sendo uma delas a *Lantana trifolia* L., onde um estudo de um flavonoide (umuhengerina **18**) (Figura 10) isolado das folhas dessa planta apresentou CIM 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em ensaios realizados *in vitro* contra *Candida tropicalis* (Rwangabo et al., 1988).

Figura 10 – Estrutura Umuhengerina



Umuhengerina (18)

1.3 *Lantana trifolia* L.

Lantana trifolia é um pequeno arbusto que pode chegar a dois metros de altura, com pequenas flores e frutos esféricos roxos (Figura 11), nativa das regiões de clima tropicais da África, América e Ásia, esta planta é conhecida popularmente como milho de grilo, fruta de grilo, camomila de pomba e uvinha do mato (Silva; Schaefer; Silva, 2020).

Figura 11 - *Lantana trifolia* L.

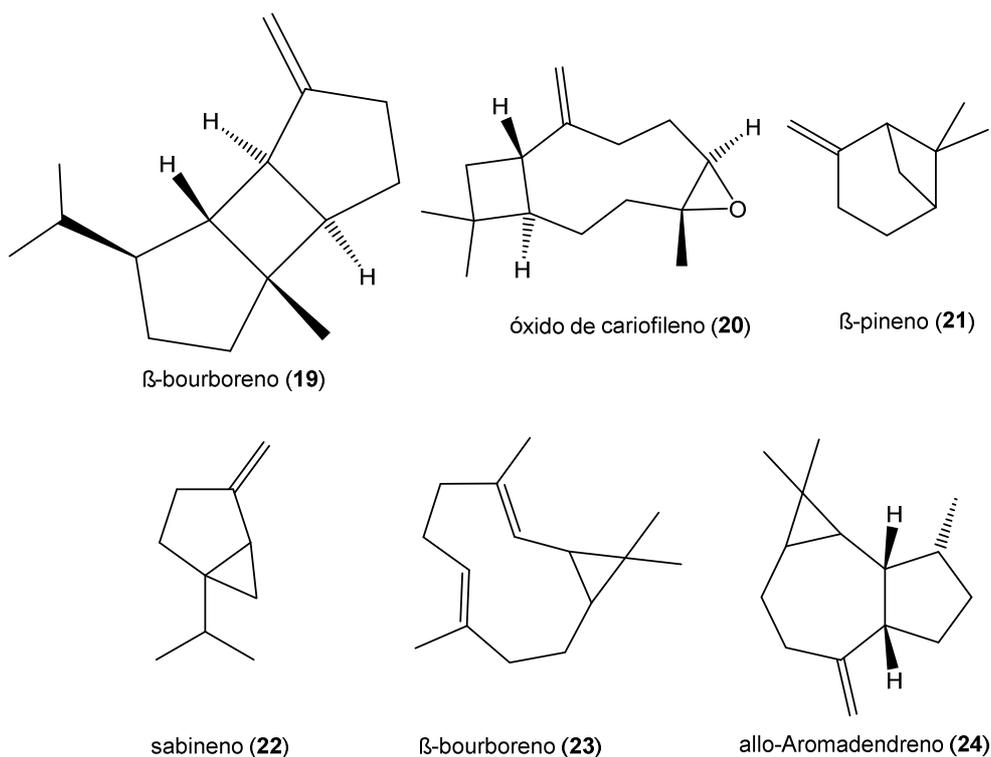
Relatos populares descrevem o uso da *L. trifolia* na medicina tradicional na forma de infusões e xaropes para o tratamento de angina, hepatite, lepra, malária, tosses, gripes, asma, sinusite, dor de ouvido, febre, dor de estômago e como calmante (Dzoyem; Kuete, 2013).

Estudos prévios relatam diversas atividades para *Lantana trifolia* como anti-inflamatória, analgésica (Silva et al., 2005; Uzcátegui et al., 2004), antimicrobiana (Rwangabo et al., 1988), antipirética (Silva et al., 2005), antibacteriana (Julião et al., 2009), e possui propriedades sedativas (Julião et al., 2010). Além disso, Rwangabo et al. (1988) relatou o potencial antifúngico do produto natural umuhengerina, um flavonoide que foi isolado das folhas de *Lantana trifolia* em ensaios *in vitro* contra *Candida tropicalis*.

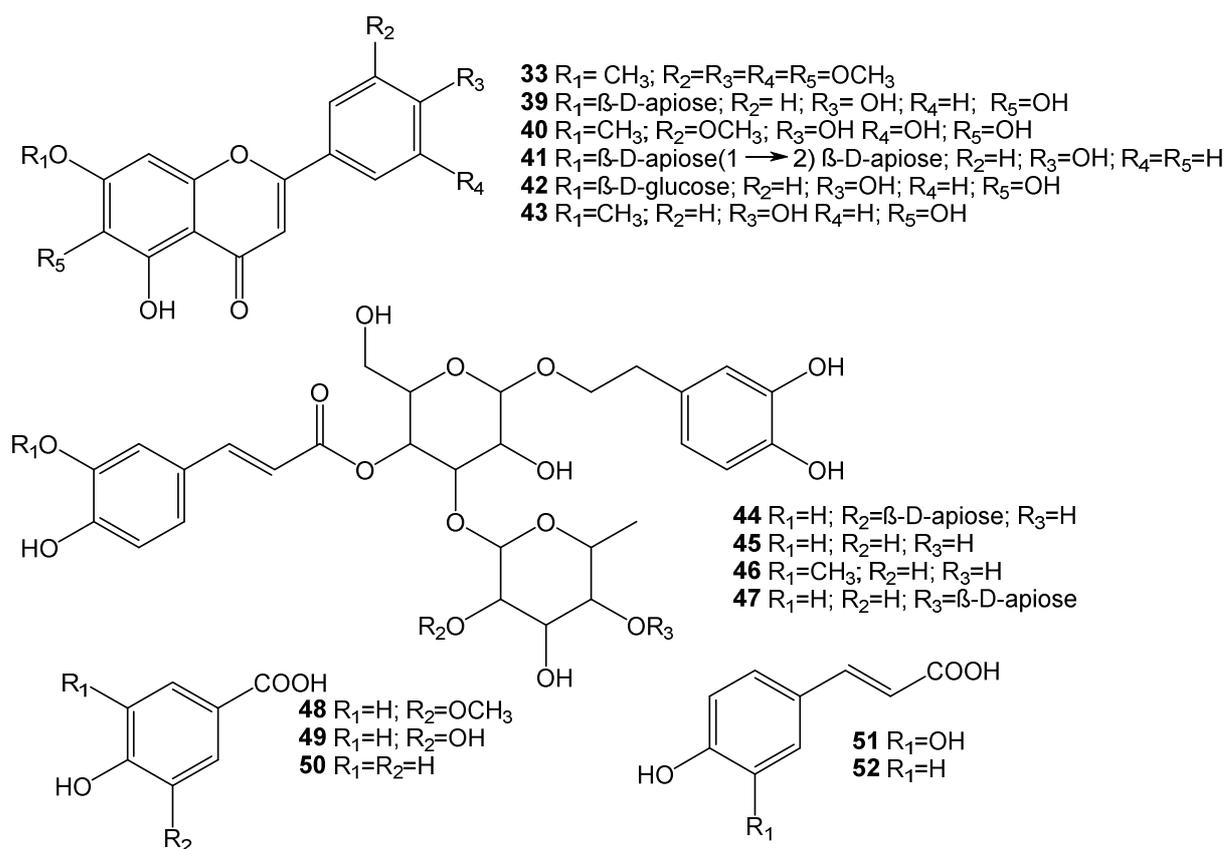
Em 2018, o Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos (NPCBio), realizou ensaios *in vitro* com frações hexano, acetato de etila, *n*-butanol e hidrometanólica das folhas e frutos de dois espécimes desta planta, sendo que as frações acetato de etila tanto das folhas quanto dos frutos dos dois locais apresetaram valores de CIM na faixa 2,93 a 93,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, contra as cepas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, o que salienta a importância desta espécie como fonte de compostos com propriedades antifúngicas (VALÉRIO, 2018).

Os metabólitos especiais relatados na literatura para *Lantana trifolia* fazem parte das classes dos terpenos, esteróides, flavonóides, e glicosídeos feniletanóides (Julião et al., 2010; Rwangabo et al., 1988). Dentre os terpenos que foram descritos nos óleos essenciais extraídos das folhas de *L. trifolia*, estão o β -bourboreno (**19**) e o óxido de cariofileno (**20**), já nas flores o β -pineno (**21**) e o sabineno (**22**), e em ambos os órgãos da planta (folhas e flores) biciclogermanocreno (**23**) e allo-aromadendreno (**24**) (Figura 12) (Julião et al., 2009; Montanari, 2010).

Figura 12 - Terpenos identificados no óleo essencial das folhas e/ou flores de *L. trifolia*.



Dentre os compostos fenólicos identificados nas folhas de *L. trifolia* estão os flavonoides umuhengerina (18), escutelareina-7-*O*-D-apiosideo (25), 5,6,4',5'-tetrahidroxi-7,3'-dimetoxiflavona (26), apigenina-7-*O*- β -D-apio-(1 \rightarrow 2)- β -D-apiosideo (27), escutelareina-7-*O*-D-glucosideo (28), sorbifolineo (29), os fenilpropanoides betanosideo F (30), verbascosideo (31), martinossideo (32), samiosideo (33), e os ácidos orgânicos como o ácido vanílico (34), ácido protocatecuico (35), ácido 4-hidroxibenzoico (36), ácido cafeico (37) e ácido p-cumárico (38) (Figura 13) (Julião et al., 2010).

Figura 13 - Compostos fenólicos identificados nas folhas *L. trifolia*.

Fonte: Adaptado de Julião, 2010

Com base no que foi exposto, esse trabalho propõe a continuidade de pesquisas já realizadas pelo NPCBio, consistindo no estudo químico bioguiado dos extratos etanólicos das folhas e frutos de *L. trifolia* e avaliação do seu potencial antifúngico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil químico e avaliar o potencial antifúngico dos extratos obtidos das folhas e frutos de *L. trifolia* L., bem como realizar a comparação química e farmacológica das folhas e frutos de espécimes diferentes.

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 o potencial antifúngico *in vitro* das folhas e frutos contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*;
- Avaliar a citotoxicidade das frações;
- Comparar os compostos e potencial antifúngico *in vitro* das folhas e frutos de *L. trifolia*, e avaliar através de técnicas quimiométricas de análises multivariadas (PCA e HCA), a semelhança ou diferença entre os espécimes.
- Aplicar a técnica de desreplicação para realizar a identificação e/ou anotação estrutural dos compostos já conhecidos, presentes nas frações.
- Realizar o fracionamento bioguidado das folhas de *L. trifolia*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes e solventes

- Ácido acético (CAS 64-19-7) - Vetec.
- Ácido fórmico (CAS 64 -18-6) - Vetec.
- Ácido fosfomolibdico (CAS 51429-74-4) - INLAB.
- Difenilborinato de 2- aminoetila (NP) (CAS 524-95-8) - SigmaAldrich.
- Ácido sulfúrico (CAS 7664-93-9) - Quemis PA ACS.
- Anisaldeido (CAS 123-11-5) - Sigma Aldrich PA.
- Anidrido acético (CAS 108-24-7) - Synth PA.
- Acetonitrila (CAS 75-05-8) - Sigma Aldrich HPLC.
- Etanol (CAS 64-17-5) - LS Chemicals PA.
- Etanol (CAS 64-17-5) - Merck HPLC.
- Metanol (CAS 67-56-1) - Sigma Aldrich HPLC.
- Metanol deuterado (CAS 811-98-3) - Deutero.
- Polietilenoglicol-4000 (PEG) (CAS 25322-68-3) - Vetec Química Fina LTDA.
- Vanilina (CAS 121-33-5) - Vetec.
- Os solventes hexano (CAS 110-54-3), acetato de etila (CAS 141-78-6), metanol (CAS 67-56-1) e *n*-butanol (CAS 71-36-3) utilizados para desenvolver este trabalho foram das marcas Vetec, Proquímios e Merck.

3.1.2 Materiais e reagentes utilizados nos ensaios antimicrobianos

- Microplacas estéreis de 96 poços.
- Incubadora para microaerofilia.
- Câmara de anaerobiose.
- Caldo triptona de soja (TSB) e caldo Schaedler suplementado.
- Solução aquosa de resazurina a 0,01% (m v⁻¹).
- Ágar Sabouraud.
- Solução salina 0,85%.

- Caldo RPMI.
- Anfotericina B (controle positivo para as leveduras), diluída em caldo para obter a concentração de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica – Shimadzu, modelo Ax200.
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm.
- Moinho de facas da marca Tecnal (modelo TE-648).
- Rotaevaporador da marca Buchi (modelo R-100), com banho termostático Buchi (modelo B-100) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e refrigeração a $6 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Cromatografia líquida ultra-rápida da shimadzu, acoplada a espectrômetro de massas micrOTOF-QII da Bruker Daltonics, com ionização por eletrospray (UFLC-DAD-IES(+)-EM/EM (micrOTOF-QII), no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da FCFRP/USP em Ribeirão Preto.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência semipreparativo, o sistema utilizado foi o modelo SHIMADZU LC-6AD com degaseificador DGU-20A5E, sistema de bomba binário LC-6AD, coletor de frações FRC-10A, detectores de UV/VIS por arranjo de diodos (DAD, modelo SPD-M20A), modelo ELSD-LTII), na rede de laboratórios multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla) na rede de laboratórios multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), operando em frequências de 400 MHz para os núcleos de hidrogênio e 100 MHz para o carbono. Os experimentos foram realizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando o solvente residual como padrão interno ($\delta_{\text{MeOH}} = 49,00$).
- 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 600 MHz para os núcleos de hidrogênio e 150 MHz para os núcleos de carbono. Os

experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando o solvente residual como padrão interno ($\delta\text{MeOH} = 49,00$) .

- Equipamento MPLC-ELSD-DAD modelo X2 Reveleris® da Büchi equipado com um sistema de bombas quaternário, pressão máxima de trabalho 17 bar (243 psi), acoplado ao detector de arranjo de diodos e espalhamento de luz, do Instituto de Química da Unesp/Araraquara.
- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), modelo Ultimate3000, Dionex® equipado com dois sistemas de bombas, amostrador automático, acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD), do Instituto de Química da Unesp/Araraquara.
- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), modelo Acquity QSM HClass da marca Waters, composto de bomba quaternária, com amostrador automático, forno de coluna e detector de arranjo de diodos (PDA) acoplado ao espectrômetro de Massas Xevo G2-XS QTof - fonte de ionização eletrospray (ESI), do Instituto de Química da Unesp/Araraquara.
- Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de espectrometria de massas (CG-EM) Shimadzu, modelo QP2010. Foi utilizada uma coluna capilar do tipo uma coluna capilar do tipo ZB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25um), no NPPNS da FCFRP/USP em Ribeirão Preto.
- Leitor de microplacas Glomax (Promega).

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), nos dias 16 de novembro de 2015; 09 de dezembro de 2018 e 31 de março de 2019. 2) Pontal/SP (20°43'18.858"S; 47°53'30.588"O), no dia 22 de dezembro de 2015. Após as primeiras coletas foram preparadas exsiccatas, 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. O material foi pesado e secado a temperatura ambiente durante 7 dias e pesado novamente.

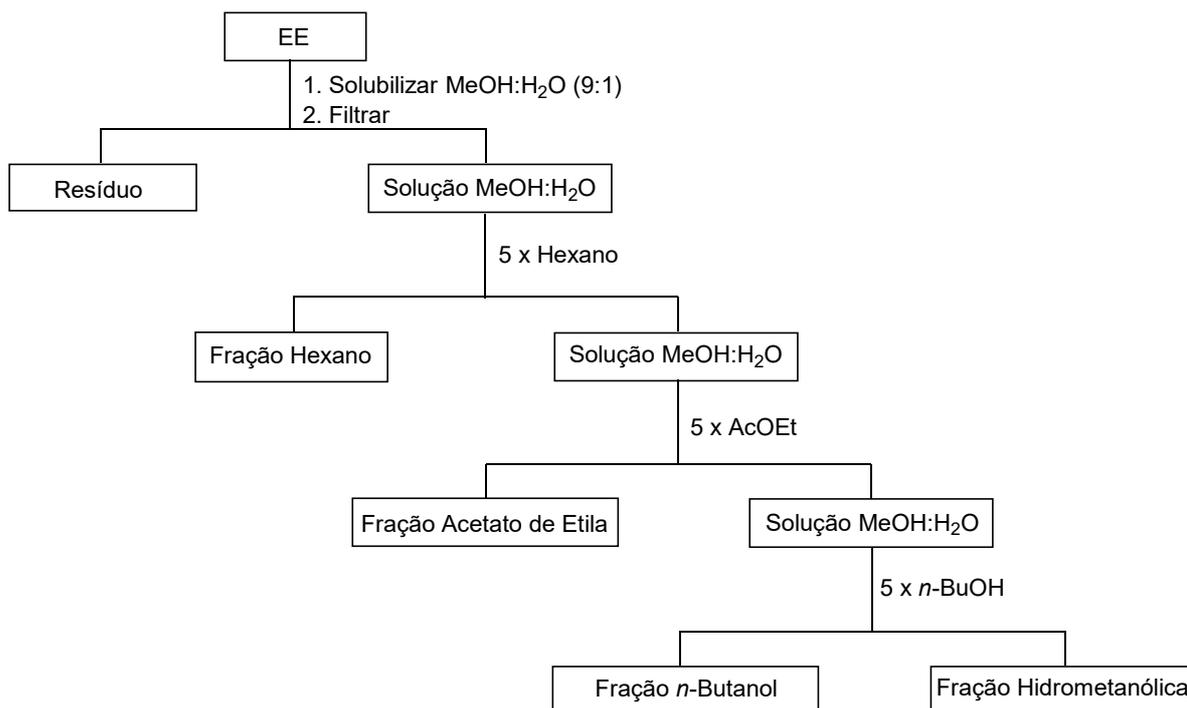
3.4 EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO

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, m/v), 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 extração líquido – líquido com diferentes solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (Figura 14).

Figura 14 - Fluxograma da extração líquido-líquido.



3.6 TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Para análise das classes de produtos naturais presentes nos extratos etanólicos e frações, foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD) e foram utilizados alguns reveladores químicos como anisaldeído, vanilina, NP/PEG, ácido fosfomolibdico e liebermann – burchard, após o desenvolvimento das CCD com a fase móvel. As placas foram aspergidas com o revelador, e aquecidas (somente o revelador NP/PEG não foi aquecido) (Wagner e 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 e 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), acetato de etila:ácido acético: ácido fórmico: metanol (10:1:1:2,3). acetato de etila:ácido acético: ácido fórmico:água (10:1:1:2,3).

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios para determinar atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), Universidade Federal de Uberlândia com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e o Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha.

3.7.1 Determinação da atividade antifúngica

O ensaio antifúngico das frações das folhas e frutos de *L. trifolia*, foi realizado de acordo com a CLSI, utilizando o método de microdiluição em caldo.

3.7.1.1 Microrganismos

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

3.7.1.2 Preparo do inóculo

Foi utilizado o meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) contendo L-glutamina sem bicarbonato de sódio (pH 7,0) e complementado com ácido morfolinepropanossulfônico 165,0 mM (ambos de Sigma). O método espectrofotométrico foi utilizado para preparar o inóculo a 530 nm, e as medições foram comparadas com uma escala de 0,5 McFarland para obter uma concentração de 5×10^6 UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias). Foram realizadas diluições com RPMI até atingir 5×10^2 UFC mL⁻¹ em solução de trabalho. Soluções de frações (192.000 µg mL⁻¹) foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO) e diluídas a 12.000 µg mL⁻¹ em meio RPMI.

3.7.1.3 Preparo dos controles

Para o controle positivo, foi utilizado o fármaco anfotericina B, sendo diluída em caldo para obter a concentração de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$. 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 $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 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.

3.7.1.4 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 $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$. 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 $200 \mu\text{L}$. Para o controle positivo, foi realizado o mesmo processo com concentrações de 8 a $0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$. 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.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade das frações FoPe Hex, FoPe AcOEt, FoPe nBut, FrPe AcOEt, FrPe nBut, FoPo Hex, FoPo AcOEt, FrPo AcOEt, FrPo nBut foram avaliadas através da realização de um ensaio MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich), utilizando células Vero naïve, como previamente descrito (Oliveira et al. 2018; S. Silva et al. 2019) com algumas modificações. As células foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células em placas de 96 poços no dia anterior ao ensaio. Em seguida, as células foram tratadas com cada fração em concentrações que variaram de 375 a $0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após 72 horas, foi efetuado um ensaio de MTT e a absorbância foi medida a 560 nm no leitor de microplacas Glomax (Promega). A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi calculada com o Prism (Graph Pad).

3.9 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRA-RÁPIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UFLC-EM)

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

As frações foram solubilizadas em metanol/água (8/2, v/v) e injetado o volume de 12 μL na concentração de 10 mg mL^{-1} , a fase móvel utilizada foi um gradiente de acetonitrila (ACN) e água (H₂O) acidificados com ácido fórmico (HCO₂H) (0,1% v/v) (Tabela 1) com fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura 40° C, e como fase estacionária foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ Ascentis® Express C18 (2,7 μm 15 cm \times 4,6 mm). A ionização foi realizada com gás nebulizante a 5,5 bar, sendo o gás secante aquecido a 220 °C com fluxo de 10 L min^{-1} , e no capilar foi aplicado 3,5 KV no modo positivo.

Tabela 1- Sistema de eluição gradiente para análise em UFLC-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 16.0.

$$\text{Erro}_{\text{ppm}} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] 10^6 \quad \text{Equação 1}$$

3.10 QUIMIOMETRIA

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Professor Dr. Leonardo Gobbo Neto – NPPNS, Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.10.1 Processamento de dados

Os dados foram convertidos para o formato *.mzxml* utilizando o programa ProteoWizard-MSconvert (versão 3 para Windows, Proteowizard Software Foundation, Palo Alto, CA, EUA) e carregados para o MzMineTM (versão 2.51 para Windows, BMC Bioinformática, Reino Unido) (KATAJAMAA; MIETTINEN; ORESIC, 2006) para deconvolução, agrupamento de isótopos e alinhamento de dados (Tabela 2). Subsequentemente, a matriz de dados (*.csv*) contendo dados quantitativos MS1 foi utilizada na análise estatística

multivariada, e o ficheiro *.mgf* com dados de perfil de fragmentação e a matriz de dados (*.csv*) contendo dados quantitativos MS1 selecionados para varredura MS2 foi utilizada na Rede Molecular.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados no MzMine™ software para o pré processamento dos dados obtidos pela ionização no modo positive UFLC–DAD–IES(+)-EM/EM (microTOF–QII) análises.

<i>Raw data methods/</i>	<u>Detecção dos espectros EM¹:</u>
<i>Peak detection</i>	Scans: Retention Time: 0–65 min ^a ; MS level: MS1 Mass Detector: Centroid - Noise level = 1.0 E ³
	<u>Detecção dos espectros EM²:</u>
	Scans: Retention Time: 0–65 min ^a ; MS level: MS2 Mass Detector: Centroide - Noise level = 1.0 E ²
	<u>Construção do cromatograma de EM¹:</u>
	Scans: Retention Time: 0–65 min ^a ; MS level: MS1 Minimum time span (min) = 0.01; Minimum height = 1.5 E ³ ; <i>m/z</i> tolerance = 0,005 <i>m/z</i> or 10.0 ppm
<i>Peak list methods</i>	<u>Deconvolução espectral dos cromatogramas:</u>
	Baseline cut-off: Minimum peak height = 2.1 E ³ ; Peak duration = 0.01–4.0; Baseline level = 2.0 E ³
	<u>Agrupamento de isótopos :</u>
	<i>m/z</i> tolerance = 0.005 <i>m/z</i> or 10 ppm; Retention time tolerance = 0.3 min ^a ; Maximum charge = 2; Representative isotope= most intense.
	<u>Alinhamento:</u>
	Join aligner: <i>m/z</i> tolerance = 0.005 <i>m/z</i> or 10 ppm; Weight for <i>m/z</i> = 75; Retention time tolerance = 0.2 min; weight for RT = 25
	<u>Filtro:</u>
	Peak list rows filter: Keep only peaks with MS2 scan (GNPS): OK
	Reset the peak number ID: OK

Os dados (bruto e mzXML) foram depositados no conjunto de dados MassIVE (<http://massive.ucsd.edu>, número MassIVE: MSV000091744). Todas as redes podem ser acessadas, pelo link disponível no apêndice A.

3.10.2 Análise estatística multivariada

Os dados da matriz de dados foram centrados e escalados para a Variância de Pareto e submetidos a análise estatística supervisionada, realizada na SIMCA P 13.0.3.0© (Umetrics AB Malmö, Suécia). Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi realizada utilizando informação de bioatividade obtida a partir dos ensaios *in vitro*. Os modelos foram validados pela ferramenta de validação cruzada, utilizando as abordagens leave-1/7-out e permutação em bruto. O gráfico de pontuação representa a correlação entre as amostras e o gráfico de carga entre as variáveis.

Para cada modelo PLS-DA, os biomarcadores foram determinados utilizando o gráfico VIP e o gráfico de coeficiente, selecionando variáveis com $VIP > 1$ e valores de coeficiente positivos. O gráfico VIP indica a importância das variáveis para a projeção do grupo num modelo estatístico e as variáveis com valores VIP superiores a 1 são importantes para a separação dos grupos. O gráfico Coeficiente contém os coeficientes de regressão que representam os vetores de previsão para os Y (atividades biológicas) selecionados, em que os valores positivos correspondem aos biomarcadores ativos.

3.11 REDES MOLECULARES

Os dados que foram processado no programa MzmineTM (.csv e .mgf) e o arquivo metadata foram carregados na plataforma Global Natural Products Social - GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) (Wang et al., 2016), e foi criado o Feature Based Molecular Network .

Os dados foram agrupados com tolerância 0,02 Da para massa de íons precursores e tolerância dos fragmentos de EM/EM. Para a construção de arcos, estas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7, e combinação de mais de 3 picos combinados e outro com mais de 6 picos combinados, e arcos entre dois nós, pelo menos, nas 10 pontuações de cosseno mais elevadas (parâmetro K). O tamanho máximo de um aglomerado foi fixado em 130. Os espectros foram pesquisados em bibliotecas espectrais

do GNPS, considerando pontuações acima de 0,7 e no mínimo 3 e 6 picos combinados. A visualização gráfica foi realizada com auxílio do programa Cytoscape 3.2 (Shannon et al., 2003).

3.12 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

As análises de cromatografia líquida de média pressão (MPLC) foram realizadas no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia (NuBBE), na Universidade Estadual Paulista sob a supervisão do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro.

A amostra foi injetada a partir da dispersão em fase sólida, utilizando como suporte sílica-C18. A separação foi realizada empregando um gradiente etanol/água, fluxo de 20 mL min⁻¹ e coluna de separação sílica-C18 (18 x 3,0 cm x 40 µm, 80 g). Sistema de cromatografia Reveleris™ Flash, equipado com a coluna Reveleris™ sílica-C18 (80 g), detecção: UV e ELSD.

As fases móveis utilizadas foi um gradiente (Tabela 3 e 4) de etanol (EtOH) e água (H₂O) acidificados com ácido fórmico (HCO₂H) (0,1% v/v) com fluxo de 20,0 mL min⁻¹.

Tabela 3 - Sistema de eluição gradiente para análise em MPLC da Fração FoPeAcOEt-C2.

Tempo (min)	Bomba A (H ₂ O)	Bomba B (EtOH)
0,01	95%	5%
151,0	60%	40%
180,0	49%	51%
277,0	22%	78%
290,0	0%	100%
380,0	0%	100%

Tabela 4 - Sistema de eluição gradiente para análise em MPLC FoPenbut-C2.

Tempo (min)	Bomba A (H ₂ O + 0,1% HCO ₂ H)	Bomba B (EtOH + 0,1% HCO ₂ H)
0,01	95%	5%
151,0	95%	5%
180,0	20%	80%
277,0	0%	100%
290,0	0%	100%

3.13 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

As frações obtidas no item 3.11, foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Esta parte do trabalho foi realizada no NuBBE, na Universidade Estadual Paulista sob a supervisão do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro.

Uma alíquota de 5 µL de cada fração foi injetada, a fase móvel utilizada foi um gradiente de EtOH e H₂O, acidificados com HCO₂H (0,1% v/v) (Tabela 5), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹, na temperatura de 40°C, como fase estacionária foi utilizada uma coluna de fase reversa Kinetex® C₁₈ (50 x 2,1 mm x 2,6 µm). Os cromatogramas foram registrados a 254 nm e os espectros no UV-Vis foram adquiridos na faixa de 200 a 600 nm. O processamento dos dados foi realizado com o software Chromeleon 6.8 (Dionex).

Tabela 5 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLUE-DAD.

Tempo (min)	Bomba A (H ₂ O + 0,1% HCO ₂ H)	Bomba B (EtOH + 0,1% HCO ₂ H)
0,01	95%	5%
15,0	0%	100%
20,0	0%	100%
25,0	95%	5%

3.14 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas na rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) na Universidade Federal de Uberlândia.

As frações coletadas na análise (3.12), foram solubilizadas com a mesma proporção de solvente da fase móvel inicial de cada análise, e injetado o volume de 20 μL . A fase móvel utilizada foi um gradiente (Tabela 6 e 7) de metanol (MeOH) e água (H_2O) acidificados com ácido fórmico (HCO_2H) (0,1% v/v) com fluxo de 1,0 mL min^{-1} para coluna analítica e 2,0 para coluna semipreparativa.

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

- Analítica Phenomenex Lunna C_{18} (250 mm \times 4,6 mm, 5 μm)
- Semipreparativa Phenomenex Synergi Hydro-RP C_{18} 80 Å Axia Packed (100 \times 21,20 mm, 4 μm).

Tabela 6 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE fração 32 – 33.

Tempo (min)	Bomba A (H_2O + 0,1% HCO_2H)	Bomba B (MeOH + 0,1% HCO_2H)
0,01	55%	45%
20,0	30%	70%
25,0	0%	100%
30,0	0%	100%
35,0	55%	45%

Tabela 7 - Sistema de eluição gradiente para análise em CLAE fração 0 - 5.

Tempo (min)	Bomba A (H_2O + 0,1% HCO_2H)	Bomba B (MeOH + 0,1% HCO_2H)
0,01	90%	10%
30,0	0%	100%
40,0	90%	10%
45,0	90%	10%

3.15 ANÁLISE DE CLUE-EM

As análises de CLUE-EM das frações obtidas nos itens 3.11 e 3.13, foram realizadas no NuBBE, no instituto de Química na Universidade Estadual Paulista.

As frações foram solubilizadas em acetonitrila e injetado o volume de 10 μL na concentração de 1 mg mL^{-1} , a fase móvel utilizada foi um gradiente de acetonitrila (ACN) e água (H_2O) acidificados com ácido fórmico (HCO_2H) (0,1% v/v), com fluxo de 0,5 mL min^{-1} (Tabela 8) no cromatógrafo líquido UPLC Acquity H-Class 12060 em coluna Acquity UPLC HSS T3 C18 (100,0 mm x 2,1 x 1,8 μm).

Tabela 8- Sistema de eluição gradiente para análise em CLUE-EM.

Tempo (min)	Bomba A ($\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{HCO}_2\text{H}$)	Bomba B (ACN + 0,1% HCO_2H)
0,01	95%	5%
14,0	0%	100%

A aquisição dos dados foi realizada no software Software MassLynx, da Waters.

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 16.0.

$$\text{Erro}_{\text{ppm}} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] 10^6 \quad \text{Equação 1}$$

3.16 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), foram realizados no espectrômetro Bruker Model Ascend™ 400 Avance III HD (9.2 Tesla) presente no do laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), operando em frequências de 400 MHz para os núcleos de hidrogênio e 100 MHz para o carbono. E Espectrômetro de RMN Bruker modelo Ascend™ 600 Avance III HD (14,1 Tesla) do Instituto de Química da Unesp/Araraquara, operando em frequência de 600 MHz para núcleos de hidrogênio e 150 MHz para os núcleos de carbono. As frações foram solubilizadas em metanol deuterado (CD_3OD).

3.17 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foi realizada em colaboração com o Professor Dr. Norberto Pepporine Lopes – NPPNS, Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas, (CG-EM) Shimadzu, modelo QP2010. Foi utilizada uma coluna capilar do tipo ZB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25um) A análise foi realizada utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo de $1,12 \text{ mL min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e detector foram de $280 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. O volume de injeção foi de $1,0 \text{ } \mu\text{L}$ de solução em diclorometano. Foi utilizado o modo de injeção splitless (1:10). A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 60°C por três minutos e depois aumentada a uma velocidade de 6°C min^{-1} até 300°C , mantida durante 19 min. Os espectros de massa foram obtidos por ionização de elétrons (EI) a 70 eV. Todos os picos registados foram identificados por comparação dos espectros de massa com os disponíveis nas bibliotecas NIST e WILLEY.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COLETA, PREPARO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO- LÍQUIDO DAS FOLHAS E FRUTOS DE *L. trifolia*

Os dados da coleta vegetal dos dois locais foram expressos em gramas na Tabela 9, após foram preparados os extratos por maceração com etanol a temperatura ambiente (Tabela 10).

A diferença na composição de produtos naturais pode variar de acordo com o ambiente em que a planta se encontra, fatores como incidência de luz, recursos hídricos, presença de predadores, horário de coleta entre outros (Gobbo-Neto; Lopes, 2007), desta maneira foi possível observar que o rendimento dos extratos do material vegetal coletado em Peirópolis foi maior do que os extratos do material coletado em Pontal, o que pode estar relacionado com a quantidade de metabólitos presentes em cada espécime.

Tabela 9– Dados da coleta do material vegetal.

Amostra	Material vegetal	Local de coleta	Data de coleta	Massa <i>in natura</i> (g)	Massa seca (g)	Massa seca (%)
FoPo	Folhas	Pontal	22/12/15	2200	1025	46,6
FrPo	Frutos			1600	727	45,4
FoPe C1	Folhas	Peirópolis	16/11/15	2000	797	39,8
FoPe C2			09/11/18	715	225,3	31,5
FoPe C3			31/03/18	625	309,0	49,4
FrPe C1	Frutos	Peirópolis	16/11/15	1380	362	26,2
FrPe C2			09/11/18	885	278,3	31,4
FrPe C3			31/03/18	175	67,2	38,4

Tabela 10– Dados da massa em gramas e rendimento da extração com etanol.

Extração n.	Extrato do material vegetal (g)							
	FoPo	FrPo	FoPe C1	FoPe C2	FoPe C3	FrPe C1	FrPe C2	FrPe C3
1 ^a	27,4	12,2	25,4	10,3	7,7	13,5	7,3	1,9
2 ^a	30,2	8,8	25,7	6,1	7,5	12,6	2,9	1,8
3 ^a	11,7	7,5	12,6	4,9	7,2	9,8	2,7	1,2
4 ^a	10,9	7,3	7,3	3,3	6,6	8,5	2,1	1,0
5 ^a	8,1	4,6	6,6	2,9	3,2	5,1	1,9	0,9
Total	88,2	40,4	77,1	27,5	32,3	49,5	17,0	6,9
Rendimento %	8,6	5,6	9,7	12,2	10,5	13,7	6,1	10,3

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

Analisando os rendimentos (Tabela 11), é possível observar que as frações mais polares obtiveram um maior rendimento, o que pode sugerir a presença de compostos mais polares do que compostos com baixa polaridade.

Tabela 11- Rendimento e massa em gramas da extração líquido – líquido dos extratos.

Fração	FoPo	FrPo	FoPe – C1	FoPe - C2	FoPe – C3	FrPe – C1	FrPe - C2	FrPe - C3
Extrato	50,36	10,01	50,97	27,46	31,22	10,48	17,01	6,95
Resíduo	13,43 (26,7)	2,61 (26)	19,54 (38,3)	1,16 (4,2)	6,71 (21,5)	2,48 (23,7)	2,66 (15,6)	1,78 (25,6)
Hexano	1,69 (3,4)	0,48 (4,8)	1,03 (2)	2,25 (8,2)	0,68 (2,2)	0,11 (1)	1,97 (11,6)	0,48 (7)
Acetato de etila	12,90 (25,6)	1,20 (12)	7,88 (15,5)	4,15 (15,1)	7,96 (25,5)	0,20 (2)	4,86 (28,6)	1,51 (21,7)
n-butanol	14,76 (29,3)	2,08 (20,8)	5,88 (11,5)	12,51 (45,6)	10,33 (33,1)	1,01 (9,6)	5,13 (30,1)	2,26 (32,5)
Metanol - Água	7,57 (15)	3,64 (36,4)	16,64 (32,7)	7,38 (26,9)	5,53 (17,7)	6,68 (63,7)	2,39 (14,1)	0,91 (13,2)

Legenda : Massa em gramas (porcentagem)

4.2 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 12, 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. Não foram utilizados reveladores específicos para classe de alcaloides, pois estudos anteriores, realizados durante a pesquisa de mestrado da autora, os extratos não revelaram com reveladores específicos, sugerindo que esta classe de metabólitos não está presente na planta (Valério, 2018).

Como pode ser observado na Tabela 13, todos os extratos, exceto as frações hexano, apresentaram compostos pertencentes à classe dos flavonoides, sendo sugerida essa classe de compostos pelo surgimento de fluorescência verde, amarelo ou laranja, a depender da estrutura, quando exposto a luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$) após aspensão do revelador NP/PEG.

Tabela 12- Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas e frutos

Amostra	NP/PEG	Anisaldeído	Vanilina	Ácido fosfomolibdico
EEFoPo	+	+	+	+
EEFrPo	+	+	+	+
EEFoPe	+	+	+	+
EEFrPe	+	+	+	+
EEFoPe-C2	+	+	+	+
EEFrPe-C2	+	+	+	+
EEFoPe-C3	+	+	+	+
EEFrPe-C3	+	+	+	+

Tabela 13 - Triagem fitoquímica das frações das folhas e frutos

Frações	NP/PEG	Liebermann-Burchard:
FoPo Hex	-	+
FoPo AcOEt	+	+
FoPo nBut	+	+
FoPo HM	+	+
FrPo Hex	-	+
FrPo AcOEt	+	+
FrPo nBut	+	+
FrPo HM	+	+
FoPe Hex	-	+
FoPe AcOEt	+	+
FoPenBut	+	+
FoPe HM	+	+
FrPe Hex	-	+
FrPe AcOEt	+	+
FrPe nBut	+	+
FrPe HM	+	+
FoPeHex-C2	-	+
FoPeAcOEt-C2	+	+
FoPenbut-C2	+	+
FoPeHM-C2	+	+
FrPeHex-C2	-	+
FrPeAcOEt-C2	+	+
FrPenbut-C2	+	+
FrPeHM-C2	+	+
FoPeHex-C3	-	+
FoPeAcOEt-C3	+	+
FoPenbut-C3	+	+
FoPeHM-C3	+	+
FrPeHex-C3	-	+
FrPeAcOEt-C3	+	+
FrPenbut-C3	+	+
FrPeHM-C3	+	+

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A resistência microbiana aos medicamentos utilizados tradicionalmente nos tratamentos de infecções fúngicas, tem se tornado um problema de saúde pública global, e torna cada vez mais necessária a busca de compostos com propriedades antimicrobianas (Padilha et al., 2010; Pappas et al., 2018).

4.3.1 Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi expressa em CIM (Tabela 14) e com estes valores pode-se classificar a atividade dos extratos como boa para valores menores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, moderada para $100\text{--}500 \mu\text{g mL}^{-1}$, baixa para $500\text{--}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ pode ser considerada inativa (Holetz et al., 2002).

Tabela 14– Avaliação da atividade antifúngica de folhas e frutos de *L. trifolia*.

Frações	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>C. albicans</i> ^a	<i>C. tropicalis</i> ^b	<i>C. glabrata</i> ^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
FoPeHex-C2	500	500	1000
FoPeAcOEt-C2	15,6	31,25	15,6
FoPenbut-C2	500	500	500
FoPeHM-C2	1000	1000	1000
FrPeHex-C2	500	500	500
FrPeAcOEt-C2	15,6	31,25	31,25
FrPenbut-C2	500	500	500
FrPeHM-C2	1000	1000	500
FoPeHex-C3	15,6	500	500
FoPeAcOEt-C3	250	31,25	65,5
FoPenbut-C3	15,6	500	500
FoPeHM-C3	500	500	500
FrPeHex-C3	500	500	500
FrPeAcOEt-C3	15,6	31,25	31,25
FrPenbut-C3	15,6	62,5	31,25
FrPeHM-C3	500	500	500

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

As frações acetato de etila apresentaram boa atividade para todas as linhagens de *Candida* avaliadas com CIM menores que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, exceto a fração FoPeAcOEt-C3 que apresentou atividade moderada contra a cepa *C. albicans*. As frações FrPoAcOEt (1,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$), FrPeAcOEt (2,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e FrPenBut (2,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$) merecem destaque, pois apresentaram valores de CIM contra *C. glabrata* próximos ao controle positivo anfotericina B (0,5–1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 15), também é possível notar que estes valores de CIM são menores que os valores considerados promissores para compostos isolados ($\text{MIC} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Ríos e Recio, 2005), o que ressalta o alto potencial antifúngico destas frações.

As frações *n*-butanol apresentaram diferentes valores de CIM, o que pode estar relacionado com a composição dos metabólitos produzidos de acordo com o local e/ou época do ano em que o material vegetal foi coletado.

Tabela 15- Controle das leveduras.

Microrganismos	Anfotericina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1,0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

As frações mais ativas no ensaio antifúngico contra as cepas de *Candida*, foram selecionadas para avaliação da citotoxicidade (FoPo Hex, FoPo AcOEt, FrPo AcOEt, FrPo *n*But, FoPo Hex, FoPo AcOEt, FoPo *n*But, FrPe AcOEt e FrPe *n*But) (Tabela 16). Segundo (Ríos e Recio, 2005), extratos que apresentam valores de CIM menores que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, podem ser considerados promissores.

A citotoxicidade foi expressa em concentração citotóxica onde 50% das células são viáveis (CC_{50}), e com esses valores foi possível calcular o índice de seletividade (IS) com auxílio da equação abaixo (Case et al., 2006).

$$\text{IS} = \text{Log} \frac{[\text{CC}_{50}]}{[\text{CIM}]} \quad \text{Equação 2}$$

Tabela 16– Ensaio citotoxicidade e índice de seletividade das frações da planta *Lantana trifolia*.

Fração	CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Índice de seletividade (IS) ^a		
		<i>C. albicans</i> ^b	<i>C. tropicalis</i> ^c	<i>C. glabrata</i> ^d
FoPo Hex	181,1	- 0,62	- 0,62	0,59
FoPo AcOEt	163,7	0,84	0,24	1,45
FrPo AcOEt	43,88	- 0,33	- 0,33	1,48
FrPo <i>n</i> But	302,3	0,51	0,51	-
FoPo Hex	169,9	- 0,34	- 0,64	0,56
FoPe AcOEt	37,83	- 0,09	- 0,39	0,51
FoPe <i>n</i> But	88,49	-	-	0,28
FrPe AcOEt	84,41	- 0,05	- 0,05	1,46
FrPe <i>n</i> But	89,59	0,28	- 0,02	1,49

^aIS = log [CC₅₀]/[CIM], ^b*C. albicans*, ^c*C. tropicalis*, ^d*C. glabrata*.

Os valores de IS demonstram a seletividade do extrato ou fração em inibir o crescimento de uma célula saudável ou o crescimento dos microrganismos. Segundo (Case et al., 2006), valores de IS positivos e próximos a 2 apresentam maior seletividade contra os microrganismos, enquanto valores negativos demonstram maior citotoxicidade. Três frações (FoPo AcOEt, FrPo *n*But, FrPe *n*But) foram mais seletivas contra *C. albicans* do que contra células Vero, e duas frações (FoPo AcOEt e FrPo *n*But) foram mais ativas contra *C. tropicalis* do que para células Vero, enquanto a maioria das frações mostrou maior seletividade contra a cepa *C. glabrata* do que contra as células Vero.

De forma geral, as frações apresentaram maior seletividade contra os fungos, com destaque para os valores de IS contra o microrganismo *C. glabrata*, na faixa 0,28 – 1,49, demonstrando maior seletividade dessas frações contra os fungos do que contra as células saudáveis. Estes resultados mostram que as frações de *L. trifolia* são uma fonte promissora de compostos antifúngicos devido à baixa citotoxicidade associada com boa atividade antifúngica.

4.5 QUIMIOMETRIA

O extrato vegetal é constituído por uma mistura complexa de diversos metabólitos e, para facilitar o processo de anotação e/ou identificação dos compostos presentes nessa mistura, pode ser utilizada a desreplcação que visa a anotação de compostos que já foram relatados na literatura (Cordell e Shin, 1999).

A desreplcação é uma etapa importante, pois não necessita dos compostos isolados, podendo ser realizado com misturas, o que torna a pesquisa menos onerosa, já que economiza recursos que seriam utilizados no processo de purificação. Dentre as técnicas utilizadas na desreplcação encontram-se as técnicas hifenadas, que consistem no acoplamento de duas ou mais técnicas analíticas. Um exemplo é cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas que une um processo analítico de separação e um detector espectométrico que permite a determinação dos íons moleculares protonados presentes nas amostras (Funari et al., 2013).

Devido à atividade promissora de algumas frações, o perfil químico da planta *L. trifolia* foi analisado por UFLC-DAD-IES (+)-MS/MS, análises quimiométricas, e redes moleculares utilizando a plataforma GNPS.

Embora análises visuais dos cromatogramas e espectros de massas permitam reconhecer as diferenças entre as frações, foram realizadas análises quimiométricas para auxiliar nesse processo, sendo elas a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA, do inglês *hierarchical component analysis*) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês: *partial least squares*).

A HCA permite observar a separação de grupos de acordo com a similaridade do perfil químico entre amostras, sem classificá-las. As amostras foram agrupadas em forma de dendrograma (Figura 15), onde a distância entre as amostras indica as suas semelhanças e/ou diferenças, quanto menor a distância maior a semelhança entre elas (Correia e Ferreira, 2007).

O dendrograma demonstra que as frações foram reunidas de acordo com o solvente utilizado na extração líquido-líquido. Assim como é possível observar que as amostras FrPeAcOEt (2,93 µg mL⁻¹) e FrPoAcOEt

(1,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$), que apresentaram menores valores de CIM contra *C. glabrata*, estão próximas no dendrograma, mostrando assim uma certa similaridade entre os seus compostos.

As duas frações *n*-butanol dos frutos, que apresentaram valores de CIM diferentes contra a cepa *C. glabrata*, sendo que a fração FrPenbut apresentou uma boa atividade (2,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e a FrPonbut foi considerada inativa ($>3000 \mu\text{g mL}^{-1}$), estas frações estão distantes entre si no dendrograma, o que mostra que elas apresentam diferenças significativas entre os seus metabólitos, o que corrobora a diferença significativa entre os valores de CIM.

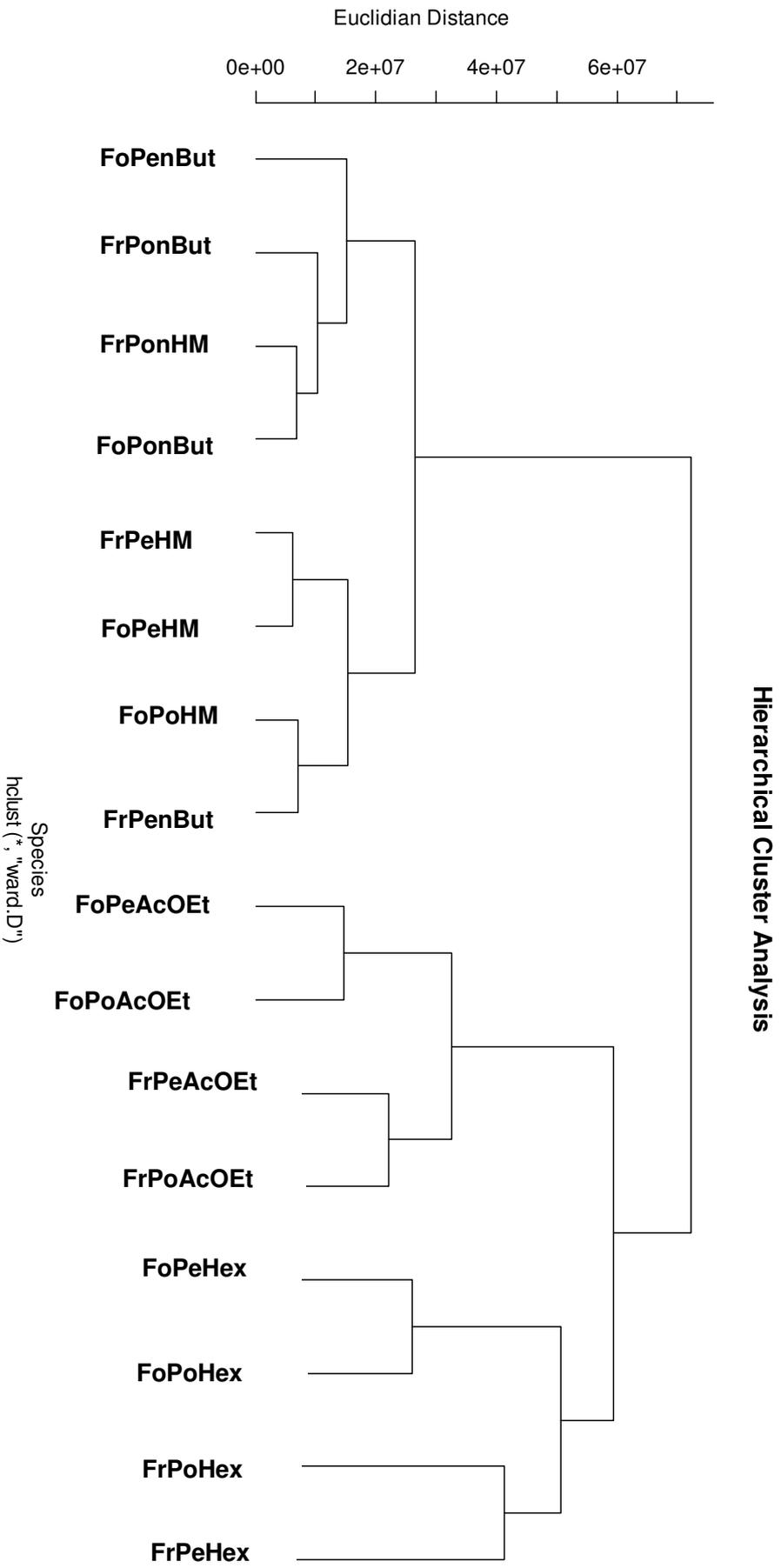


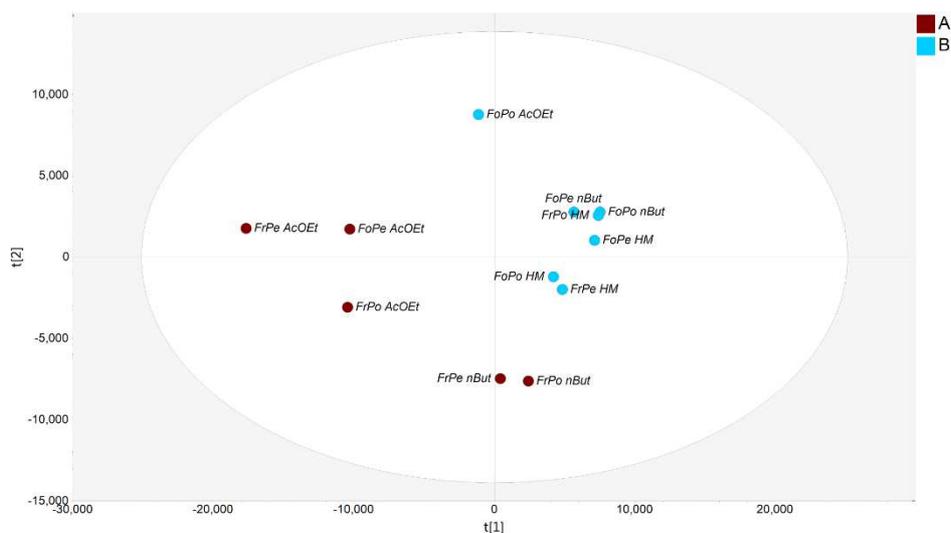
Figura 15- Dendrograma gerado pela HCA das frações das folhas e frutos no modo positivo.

Foi realizada a PLS-DA para a atividade antifúngica contra as três cepas de *Candida*: *C. albicans* (ATCC 28366) (Figura 16), *C. tropicalis* (ATCC 13803) (Figura A1), e *C. glabrata* (ATCC 15126) (Figura A2), utilizando os resultados obtidos nos ensaios e os correlacionando com os dados processados a partir do perfil químico das amostras.

Para cada ensaio as amostras foram classificadas em grupos de acordo com os valores de atividades, os modelos estatísticos construídos foram de PLS-DA, a fim de encontrar os discriminantes (Hits-Bioativos) dos grupos de amostras que possuíram maior atividade. Esta análise permite a determinação de variáveis (biomarcadores) relacionadas com a atividade antifúngica.

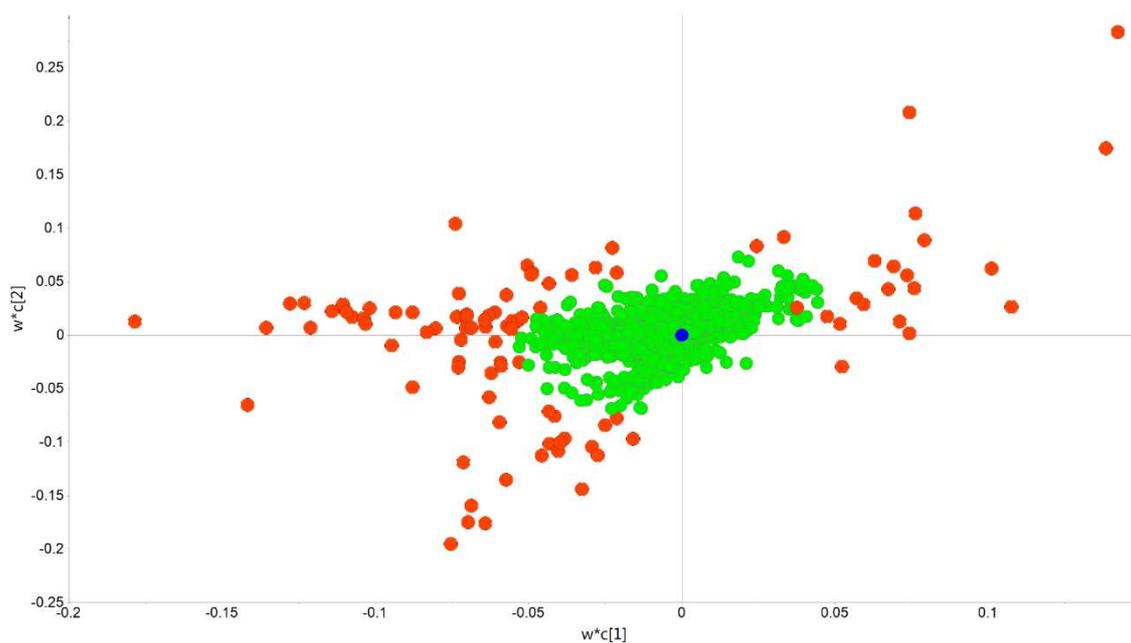
Nas figuras 16, A3-A4, Apêndice A, é possível observar a separação entre dois grupos de amostras, o grupo A que são as frações que apresentaram CIM menores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e está representado pela cor vermelha, e o grupo B que representa as frações com CIM maiores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e está representado na cor azul, as Figuras 17 (Figuras A5-A7, Apêndice A) serviram para analisar a separação dos discriminantes entre as amostras (em vermelho), ou seja, o que está em vermelho é o que diferencia as amostras mais ativas das demais. Esses discriminantes foram selecionados utilizando os gráficos de variáveis importantes para projeção (VIP), e foram selecionadas as primeiras 30 variáveis (Figuras 18, Figuras A8-A9, Apêndice A) (Tabelas A1- A3, Apêndice A), que se mostraram importantes para a projeção das frações mais ativas (grupo A, CIM 0 - $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 16 – PLS-DA atividade antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC 28366).



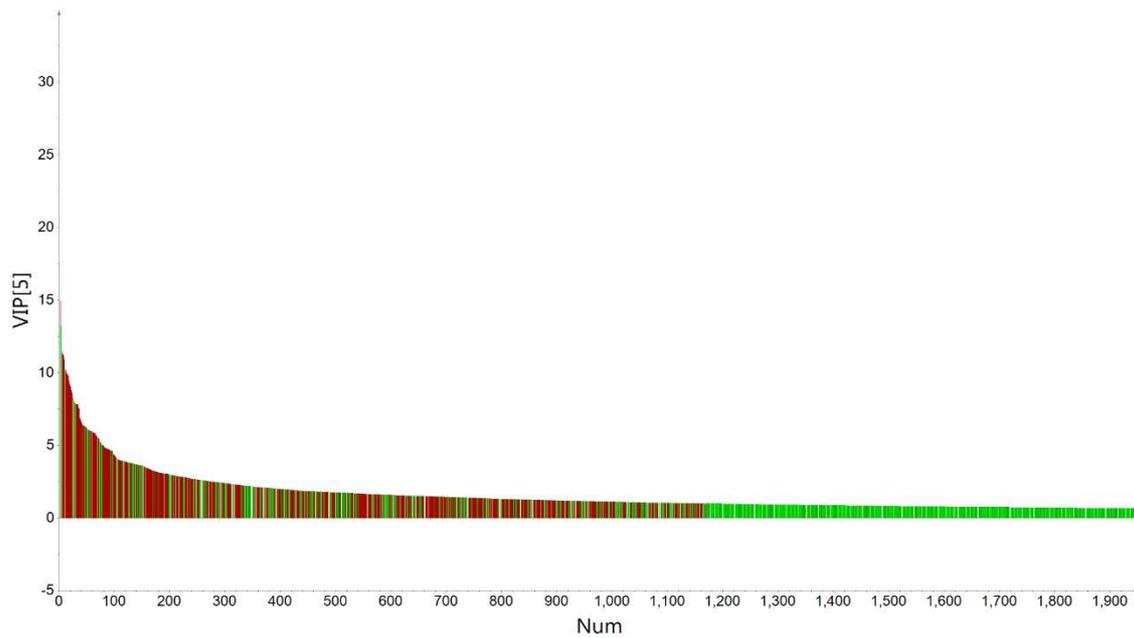
(A) classe ativa, (B) classe inativa, número de componentes, 5; $R^2X(cum)$, 0.781; $R^2Y(cum)$, 0.997 e $Q^2(cum)$, 0.829.

Figura 17 - PLS-DA atividade antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC 28366).



Discriminantes VIP (Vermelho), número de componentes, 5; $R^2X(cum)$, 0.781; $R^2Y(cum)$, 0.997 and $Q^2(cum)$, 0.829.

Figura 18 - Variáveis Importantes para a Projeção (VIP) obtida através do PLS-DA, supervisionado de acordo com as frações ativas e inativas contra *Candida albicans* (ATCC 28366).



Discriminantes VIP (Vermelho), número de componentes, 5; $R^2X(\text{cum})$, 0.781; $R^2Y(\text{cum})$, 0.997 and $Q^2(\text{cum})$, 0.829.

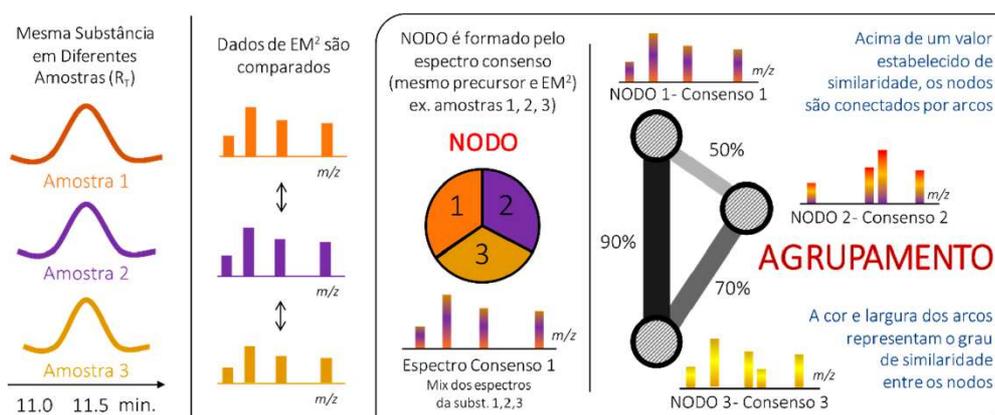
4.6 REDES MOLECULARES

Para a construção das redes moleculares foi utilizado a plataforma de livre acesso e gratuita GNPS (do inglês *Global Natural Products Social Molecular Networking*), essas redes são formadas a partir de dados de espectrometria de massas, avaliando o padrão de fragmentação e comparando com dados de bibliotecas espectrais, a fim de reconhecer padrões de fragmentação de classes metabólicas, funções orgânicas e substituintes (Pilon et al., 2021).

O GNPS utiliza algoritmos que organiza cada espectro e realiza a comparação com espectros disponíveis nas bibliotecas, a plataforma se baseia na similaridade entre esses espectros, que é calculado de acordo com o valor de cosseno, quanto maior esse valor maior à similaridade entre os espectros (Pilon et al., 2021).

A Figura 19 demonstra de forma resumida um pouco sobre como as redes moleculares são elaboradas, onde os nodos representam os espectros consensos (conjuntos de espectros do mesmo íon), e os arcos que conectam os nodos representam a similaridade entre esses, esse processo visa facilitar a identificação e/ou anotação de metabólitos (Pilon et al., 2021).

Figura 19 – Resumo da elaboração das redes moleculares

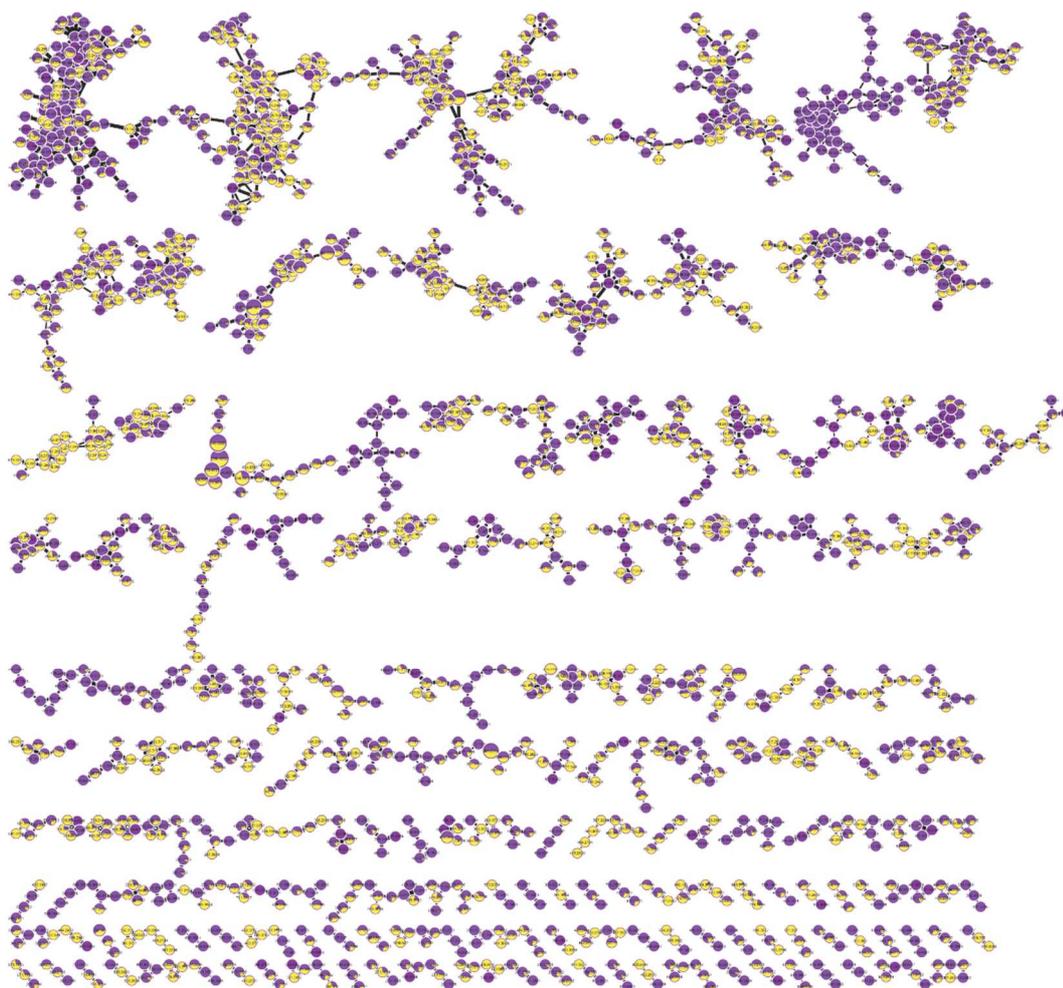


Fonte: (Pilon et al., 2021).

As redes moleculares resultantes (RM) (Figuras 20 – 21, A10-A11, Apêndice A) revelaram o agrupamento de classes de metabólitos, contando com 1614 nodos unidos por 3320 arcos, diferentes cores foram atribuídas aos nodos, considerando aspectos que permitem avaliar a correlação dos metabólitos presentes no local de

coleta e a correlação com a maioria dos seus compostos (nodos) com algumas diferenças na concentração destes de acordo com cada local, onde o roxo representa Peirópolis e o amarelo Pontal. A abundância relativa dos íons foi representada pelo tamanho do nodo (quanto maior o tamanho, maior a intensidade do íon precursor), e a largura dos arcos que conecta os nodos representa os valores de cosseno, ou seja, quanto maior a espessura da linha maior à similaridade (Figura 20).

Figura 20 – Representação do redes moleculares das frações de *Lantana trifolia* usando ionização por eletrospray no modo positivo e filtrado de acordo com o local de coleta

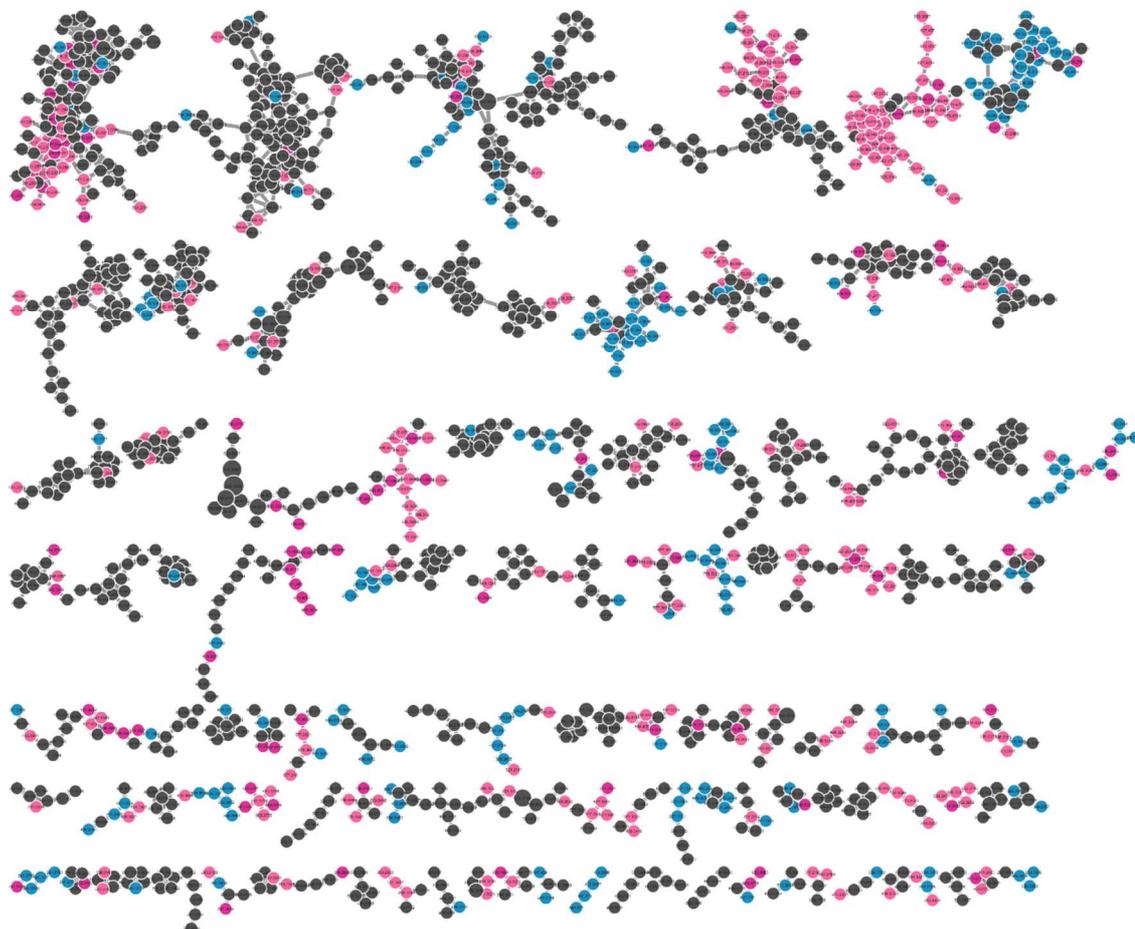


Sinais das injeções do branco foram removidos. As cores dos nodos representam o local de coleta, onde roxo representa Peirópolis e amarelo Pontal.

Além disso, para avaliação da rede molecular foi utilizado como filtro a atividade antifúngica de cada cepa de *Candida*, onde os nodos foram coloridos de acordo com os valores de CIM: sendo rosa para a faixa 1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, azul para valores menores que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e cinza para valores acima de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esses filtros sugerem alguns nodos que podem ser importantes para a atividade biológica, pois os compostos/nodos presentes tanto nas amostras inativas quanto nas ativas, é possível sugerir que estes não influenciam na atividade antifúngica, uma vez que estes nodos estão presentes em ambas amostras (Figura 21, A12-A13, Apêndice A)

É importante ressaltar que estas são projeções de bioatividade, mas podem ser utilizadas como guia para regiões/metabólitos a serem exploradas. Neste caso, os nodos do aglomerado coloridos de rosa e azul sugerem compostos com maior potencial antifúngico.

Figura 21 - Representação da rede molecular filtrada de acordo com os valores de CIM contra *Candida glabrata*.



A rede molecular revelou diversas classes de metabólitos presentes no gênero *Lantana*, tais como compostos fenólicos com propriedades antifúngicas e alguns deles como o ácido clorogênico, que de acordo com a literatura apresentou CIM $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. albicans* (Sung e Lee, 2010).

Com as redes moleculares foi possível realizar a anotação de vinte e nove compostos (Tabela 17) (Figura 22). Entre estes compostos estão nove biomarcadores que foram indicados pelo VIP e pela análise PLS-DA, são eles ácidos fenólicos como ácido clorogênico (**39**), ácido 4-coumaroilquínico (**43**), e ácido 5-cafeoil chiquímico (**44**), flavonóides como apigenina 7-glucuronideo (**54**), escutelareina (**55**), chisosplenitina B (**57**), tricina (**62**), crisosplenol D (**63**), e fenilpropanoídes como verbascosideo (**31**) (Figura 23).

Tabela 17– Anotação dos compostos nas frações de *L. trifolia* por redes moleculares.

Número	t_R (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	Erro ^a (ppm)	cosseno	Fórmula Molecular	Anotação GNPS	Referências
39a	6,68	355,1039	4,2	0,92	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido clorogênico ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00005778073
39b	8,83	355,1034	2,8	0,97	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido clorogênico ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00005778073
40a	8,35	595,1662	0,8	0,86	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Vicenina II ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000845378
40b	9,01	595,1664	1,2	0,80	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Vicenina II ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000845378
41	9,45	611,1613	1,0	0,76	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]-8-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]chromen-4-ona	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00005745962
42a	10,39	565,1542	-1,8	0,79	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Vicenina I ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00005721165
42b	11,37	565,1527	-4,4	0,80	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Vicenina I ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00005721165
43	10,82	339,1081	2,1	0,87	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Ácido 4-p-coumaroilquínico	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000854975
44	11,18	337,0927	2,7	0,93	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	Ácido 5-cafeoil chiquímico	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000848306
45	11,47	581,1503	0	0,87	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	2-(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxi-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-[(3,4,5-trihidroxioxan-2-il) oximetil]oxan-2-il]oxichromen-4-ona	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000845835

46	12,19	479,0803	-3,5	0,84	$C_{21}H_{18}O_{13}$	Miquelianina	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000845058
47a	12,95	479,1542	-1,3	0,82	$C_{23}H_{26}O_{11}$	Calceolariosideo B ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000848884
47b	15,01	479,1550	0,4	0,85	$C_{23}H_{26}O_{11}$	Calceolariosideo B ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000848884
31a	14,11	625,2123	-0,63	0,87	$C_{29}H_{36}O_{15}$	Verbascosideo ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00005716581
31b	15,01	625,2123	-0,63	0,84	$C_{29}H_{36}O_{15}$	Verbascosideo ^b	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00005716581
48	13,01	369,1197	4,6	0,90	$C_{17}H_{20}O_9$	Éster metílico do ácido clorogénico	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000847734
49	13,24	435,1353	15,4	0,72	$C_{21}H_{22}O_{10}$	3,4,5-trihidroxi-6-(4- hidroxifenoxi)oxan-2-il]metil (E)-3- (3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoato	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000846362
50	13,56	433,1132	0,7	0,96	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Isovitexina	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000578385
51	15,60	579,1720	2,1	0,95	$C_{27}H_{30}O_{14}$	Apigenina-7-O-neohesperidosideo	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000213886
52	15,92	449,1093	3,3	0,96	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Kuromanina	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00000408919
53	15,97	433,1135	1,38	0,97	$C_{21}H_{21}O_{10}^+$	Calistefina	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00000409184
54	16,15	447,0922	0	0,93	$C_{21}H_{18}O_{11}$	Apigenina 7-glucuronideo	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000848637

55	18,13	287,0558	2,8	0,91	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Escutelareina	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00003272852
56	18,25	317,0659	0,9	0,85	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	3-O-Metilquercetina	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00000231342
32	18,61	653,2430	-1,5	0,76	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	Martinosideo	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000848397
57	19,33	375,1092	4,8	0,85	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	Chisosplenitina B	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00006525506
58	19,48	345,0974	1,4	0,81	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	5,3'-Dihidroxi-6,7,4'- trimetoxiflavona	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00003323918
59	20,21	287,0560	3,5	0,94	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolina	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000578417
60	20,61	317,0667	3,5	0,89	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	6-metoxiluteolina	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00000231342
61	20,98	301,0714	2,3	0,90	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Chrysoeriol	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00000257836
62	21,84	331,0819	2,1	0,83	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Tricina	GNPS LIBRARY SPECTRUM CCMSLIB00005778067
63	23,15	361,0927	2,5	0,77	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Chrysosplenol D	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000848806
64	24,29	331,0825	3,9	0,87	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Cirsiliol	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000847486
65	31,65	315,0869	1,9	0,85	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Velutina	GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000213961

^a Erro relativo em ppm, ^bRepresenta diferentes isômeros e/ou estéreoisômeros (ex., catequina, que pode ser catequina ou epicatequina).

Figura 22 - Estrutura dos compostos anotados pelo redes moleculares

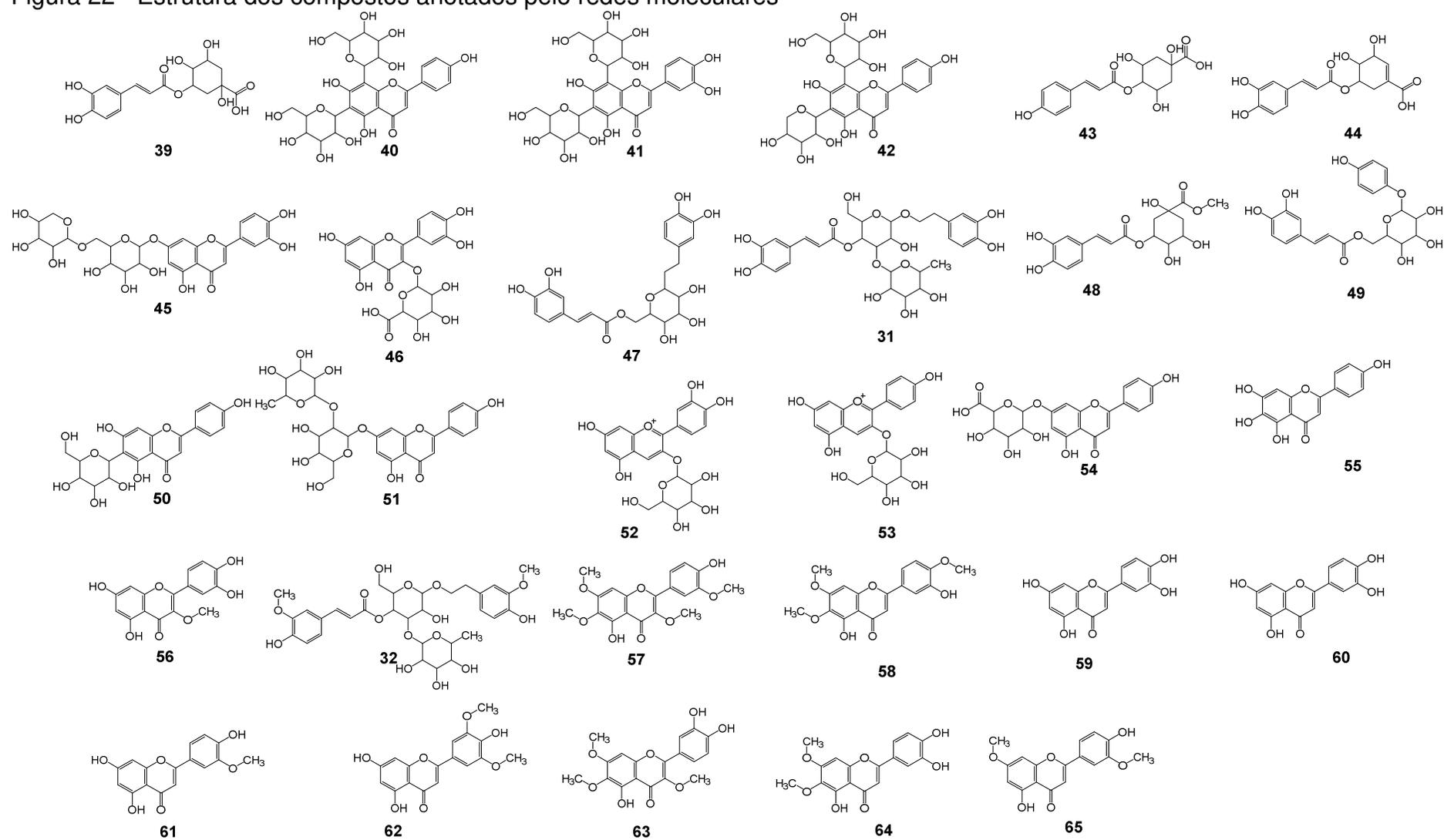
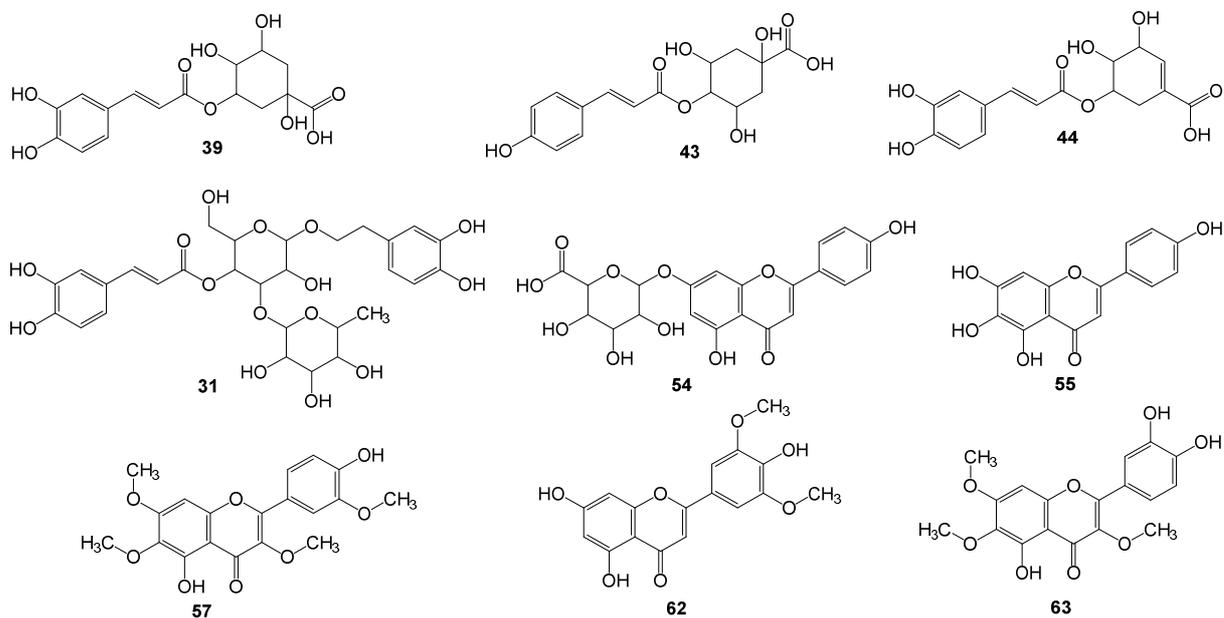
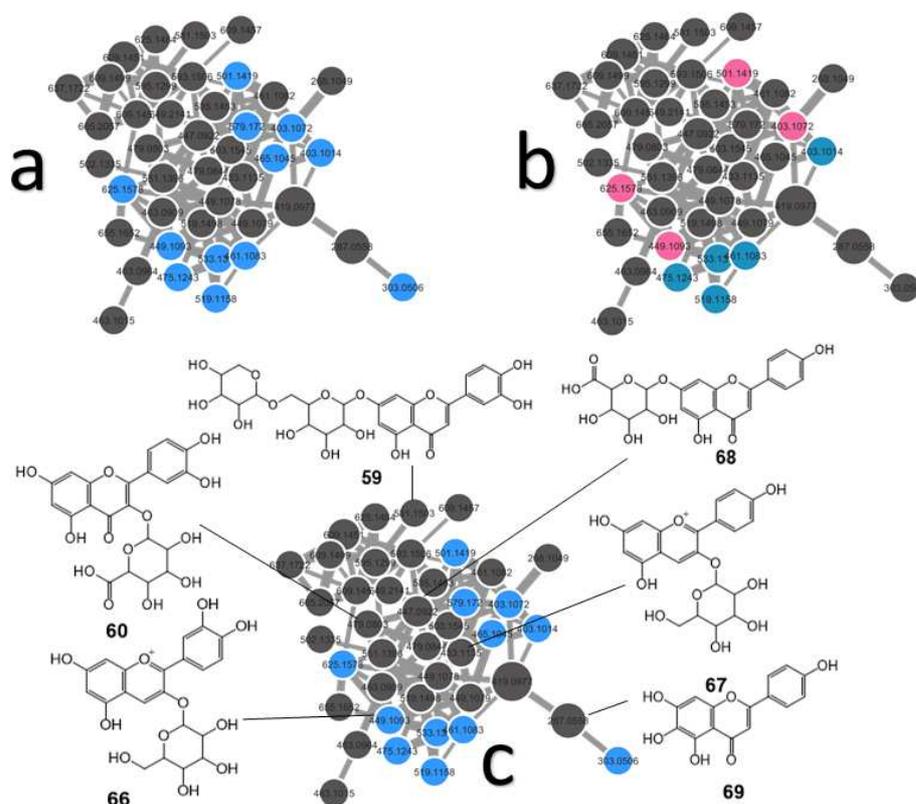


Figura 23 – Estrutura dos biomarcadores determinado pela análise PLS-DA e anotação utilizando redes moleculares.



A Figura 24 representa a ampliação de um cluster da rede molecular, que consta com 42 nodos e 123 arcos, na figura esta representado o mesmo cluster, porém de acordo com os valores CIM que apresentou no ensaio contra cada cepa de *Candida*. Neste cluster é possível observar a anotação de alguns compostos fenólicos.

Figura 24 - Representação da rede molecular filtrado pelos valores de CIM contra *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*.



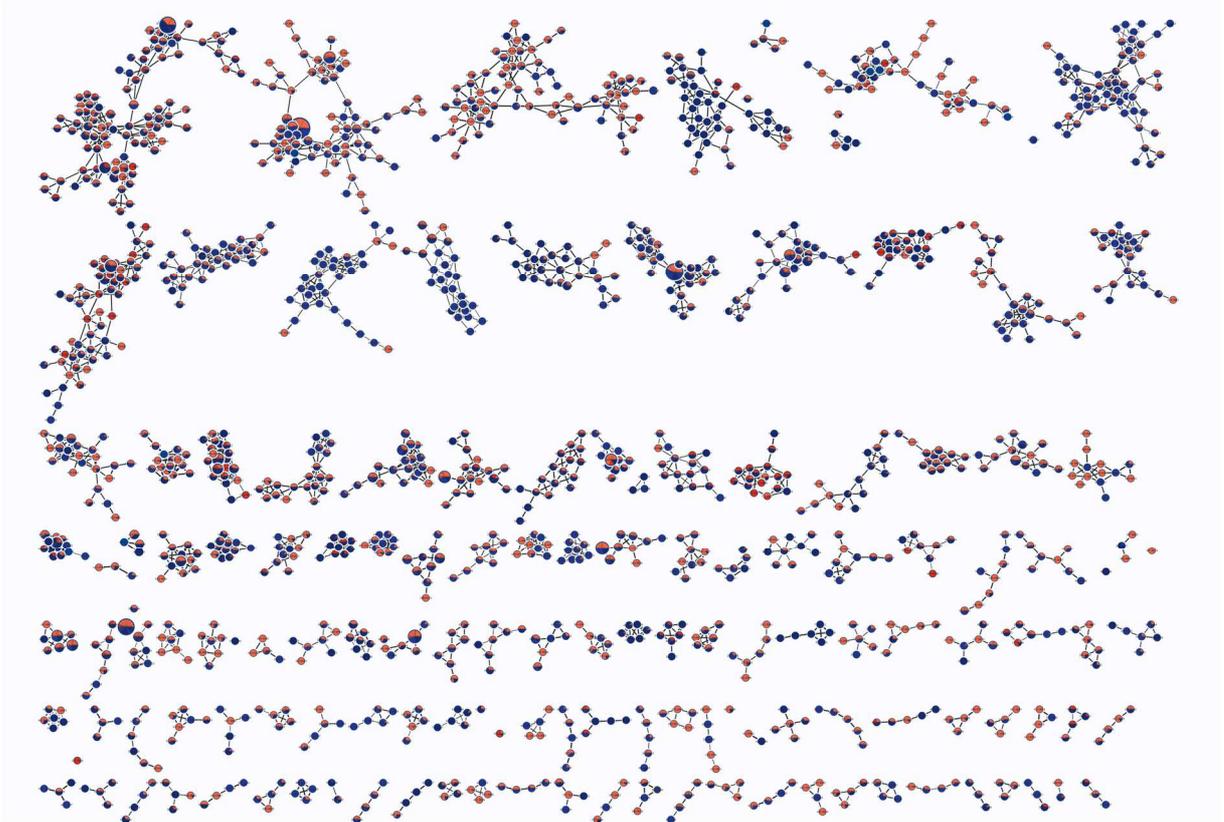
Nota: ^a*Candida albicans*, ^b*Candida glabrata* e ^c*Candida tropicalis*

O perfil químico das frações mais ativas de *L. trifolia* pode explicar a atividade anti-*Candida* observada nestas amostras, pois as frações enriquecidas em compostos fenólicos mostraram resultados relevantes contra as espécies *Candida*. Em particular, os ácidos fenólicos e flavonóides que possuem potencial reconhecido em inibir o crescimento de espécies de *Candida* em baixas concentrações (Martins et al., 2015).

Além das redes moleculares, mostradas anteriormente foram feitas algumas análises com as frações das duas últimas coletas realizadas Peirópolis, onde foi possível observar a presença de 1736 nodos unidos por 3224 arcos, foi utilizado como filtro as datas de coleta do material vegetal (Figura 25). Foi possível realizar a anotação dos mesmos vinte e nove compostos anotados nas redes anteriores, uma vez que a espécie é a mesma, mudando somente a intensidade desses compostos em relação às datas de coleta, pois períodos diferentes do ano podem interferir nas

concentrações dos metabólitos presentes (Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Valério et al., 2023) (Tabela 17) (Figura 22).

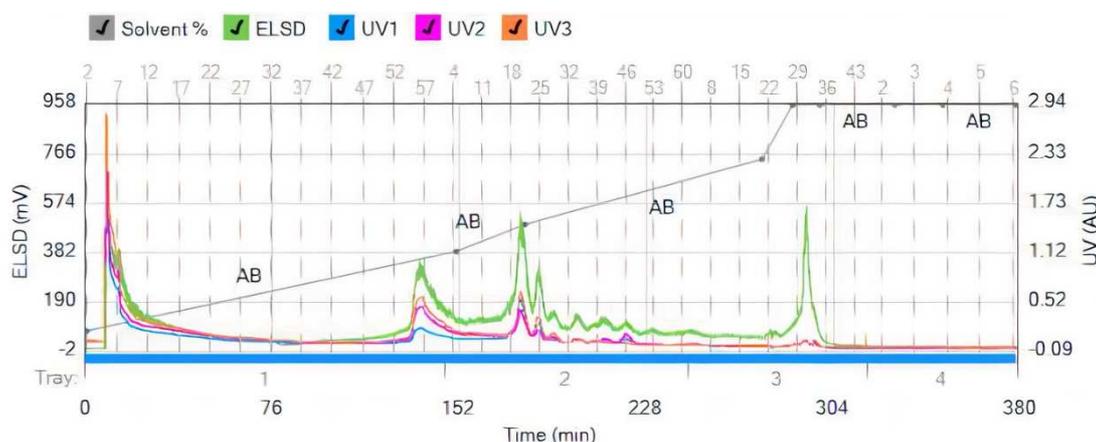
Figura 25- Representação da rede molecular filtrada de acordo com as datas de coleta.



4.7 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO FOPEACOET-C2

A fração FoPeAcOEt-C2 (1,6 g) foi selecionada para fracionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC) (Figura 26), por causa da sua atividade antifúngica que apresentou valores de CIM promissores, sendo menores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra as três cepas de *Candida* avaliadas (15,6; 31,25 e 15,6 respectivamente *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*). O fracionamento foi realizado, com coluna C18 (18 x 3,0 cm x $40 \mu\text{m}$, 80 g) e como fase móvel foi utilizado um gradiente de etanol e água com fluxo de $20,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 26- Cromatograma MPLC da fração FoPeAcOEt-C2



As 164 frações coletadas foram analisadas por UPLC e reagrupadas de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico, resultando em 26 frações (Figura 27). Nos tubos de ensaio em que foram coletadas as frações 6 a 18 ocorreu a formação de um precipitado, que foi separado do sobrenadante com auxílio de uma centrífuga. As frações foram submetidas ao ensaio antifúngico (Tabela 18) e, com os valores de CIM, foi possível observar que houve uma redução da atividade antifúngica, que antes do fracionamento era considerado como uma boa atividade para algumas frações passaram para atividade moderada, essa diminuição da atividade pode ocorrer considerando que algumas misturas de compostos produzem efeitos mais pronunciados do que os compostos isolados, essas interações são conhecidas como efeito sinérgico (Casanova e Costa, 2017).

Figura 27- Fluxograma das frações da FoPeAcOEt-C2

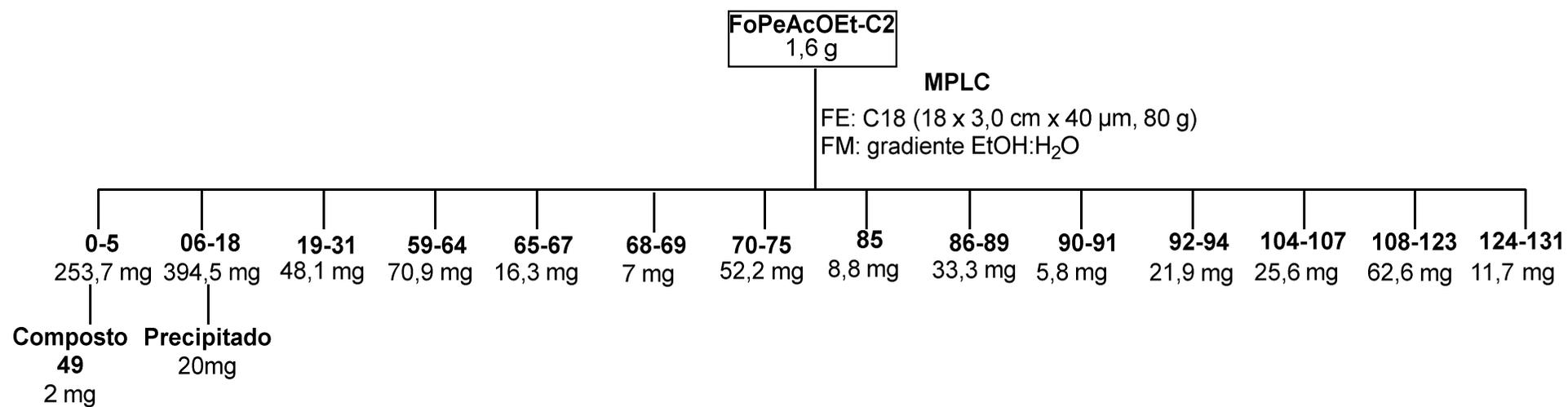


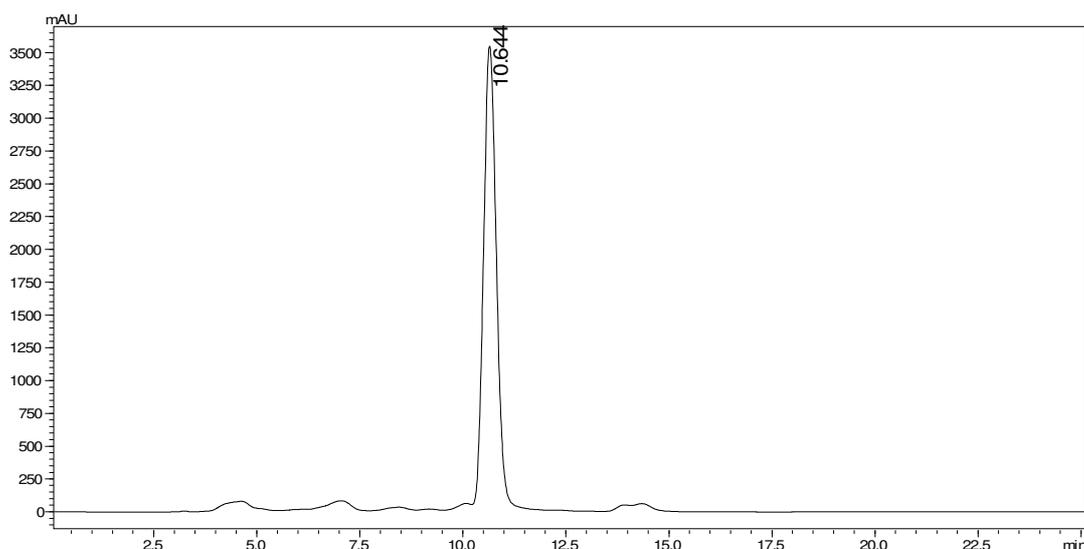
Tabela 18- Atividade antifúngica das Frações FoPeAcOEt-C2.

Frações	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>Candida albicans</i> ^a	<i>Candida tropicalis</i> ^b	<i>Candida glabrata</i> ^c
FoPeAcOEt-C2	15,6	31,25	15,6
0-5	250	62,5	15,62
6-18	31,25	250	62,5
19-31	62,5	250	62,5
32-46	250	>500	500
47-54	500	500	500
55-58	>500	>500	>500
59-64	62,5	250	31,25
65-67	31,25	62,5	15,62
68-69	31,25	125	31,25
70-75	31,25	125	31,25
76	500	500	>500
77-79	500	>500	>500
80-81	250	>500	250
82-84	500	>500	500
85	125	500	250
86-89	125	250	500
90-91	250	500	125
92-94	125	250	125
95-103	250	>500	125
104-107	62,5	125	125
108-123	125	250	62,5
124-131	62,5	250	125

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

O precipitado obtido durante o fracionamento, foi submetido a análise por CLAE no modo analítico utilizando uma coluna de fase reversa (C18) com detector de DAD, o que possibilitou a visualização de um único sinal (t_R 10,6 min) no cromatograma (Figura 28).

Figura 28- Cromatograma CLAE em 254 nm do precipitado da fração 6-18.



O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) (Figura 37, Tabela 19) apresentou seis sinais na região referentes aos hidrogênios aromáticos, sendo os sinais 6,94 e 7,88 ppm dos quatro hidrogênios do anel B. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 29, Tabela 18), foram observados 9 sinais de carbonos aromáticos: Anel A, δ 145,8 (C-5), 130,1 (C-6), 150,6 (C-7), 93,4 (C-8) e 149,2 (C-9); Anel B: δ 121,2 (C-1'), 127,4 (C-2' e C-6'), 114,9 (C-3' e C-5'), 160,6 (C-4'), além de um sinal característico de carbonila δ 182,3, sendo este composto identificado como o flavonoide escutelareina-7-*O*-apiosídeo. Com o auxílio do mapa de contorno HMBC (Figura 30-32), foi possível observar a correlação do hidrogênio anomérico δ 5,75 (H-1'') com o carbono δ 150,6 (C-7), com essa correlação foi possível confirmar a posição que a apiose está ligada na aglicona (Carbono C-7).

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, CD_3OD) do precipitado em MeOD

Posição	δ_{H}	δ_{C}	$^{\text{c}}\delta_{\text{H}}$	$^{\text{c}}\delta_{\text{C}}$
	^a mult. ^b (J em Hz)		^a mult. ^b (J em Hz)	
2		164,7		164,5
3	6,65 (s)	101,3	6,8 (s)	102,8
4		182,3		182,7
5		145,8		147,2
6		130,1		131,1
7		150,6	-	151,9
8	6,96 (s)	93,4	6,8 (s)	94,6
9		149,2		149,4
10		105,0		105,9
1''		121,2		121,7
2''	7,88 (d; 8,9)	127,4	7,9 (d, 8,8)	128,9
3''	6,94 (d; 8,9)	114,9	6,9 (d, 8,8)	116,4
4''		160,6		161,6
5''	6,94 (d; 8,9)	114,9	6,9 (d, 8,8)	116,4
6''	7,88 (d; 8,9)	127,4	7,9 (d, 8,8)	128,9
Apiose				
1''	5,75 (d; 2,7)	107,4	5,6 (d; 3,2)	108,08
2''	4,42 (d; 2,7)	76,1	4,3 (d; 3,2)	76,56
3''		78,8		79,28
4''	3,97; 4,19 (d; 9,7)	74,0	3,7; 4,0 (d; 9,6)	75,16
5''	3,70	62,6	3,4 (m)	62,84

^aDeslocamentos químicos em ppm estabelecidos em relação ao solvente residual

^bMultiplicidade: s (simpleto), d (duplete), ^c(JULIÃO et al., 2010).

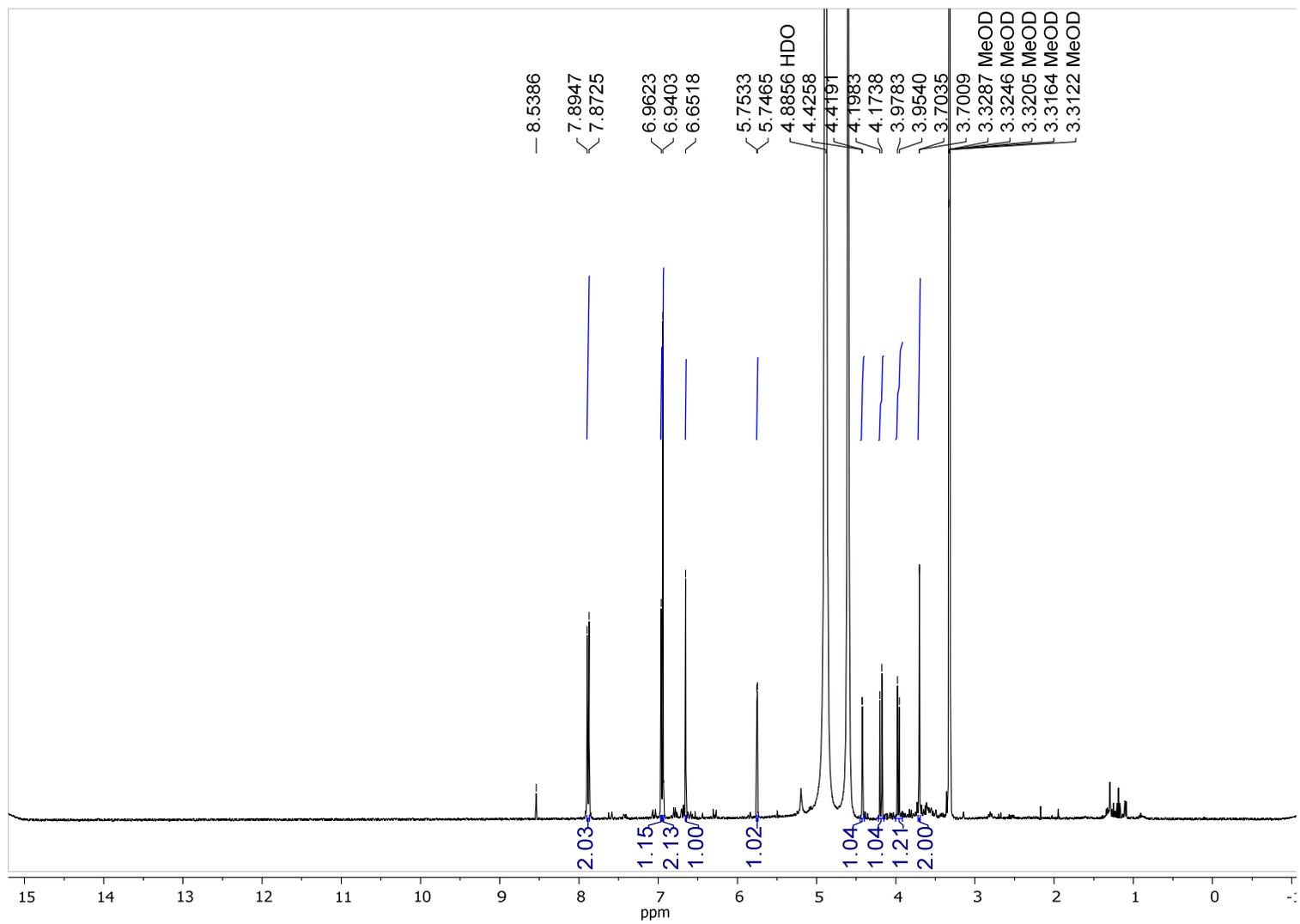
Figura 29- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD)

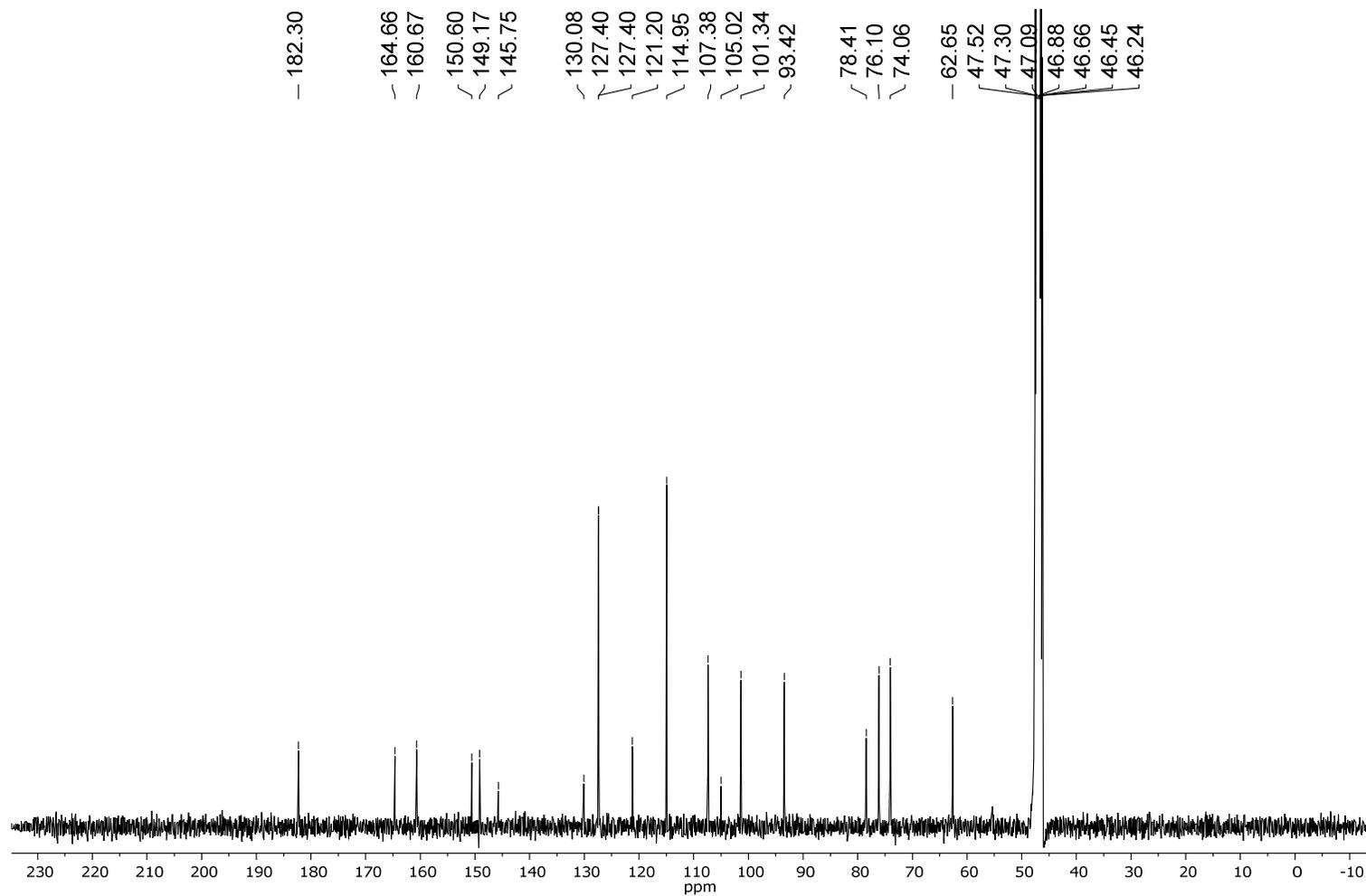
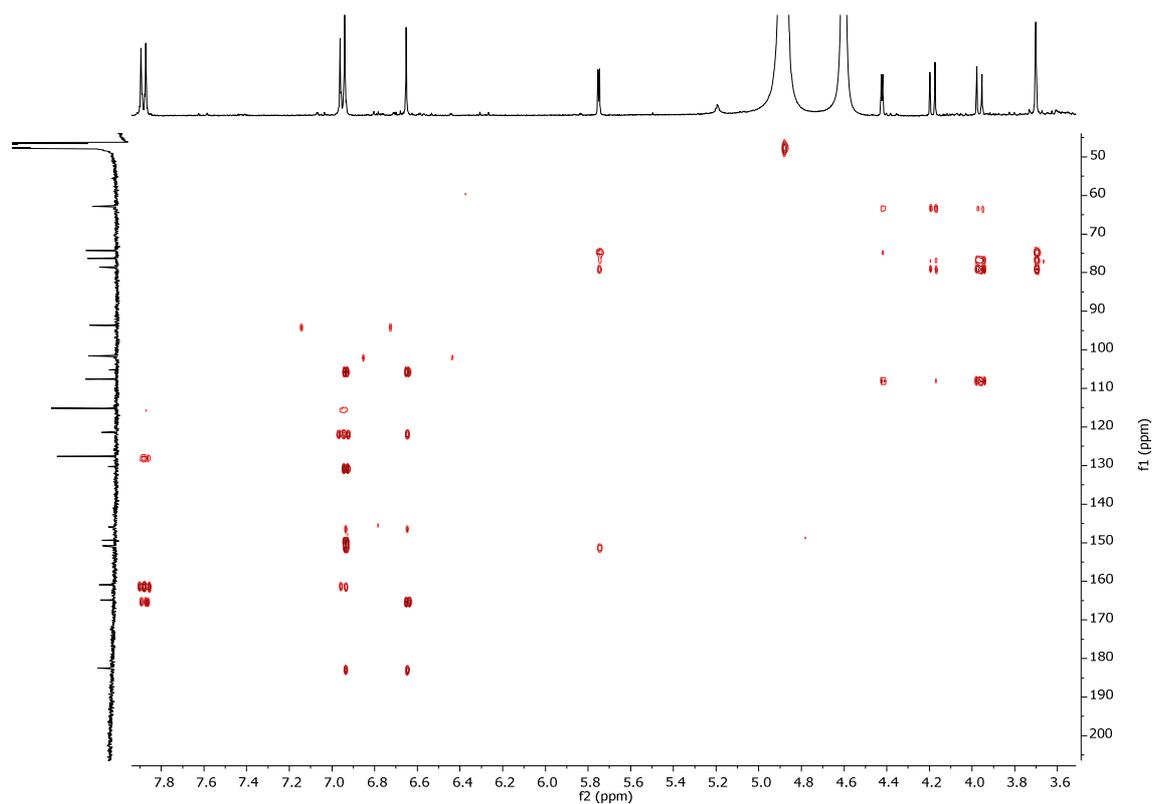
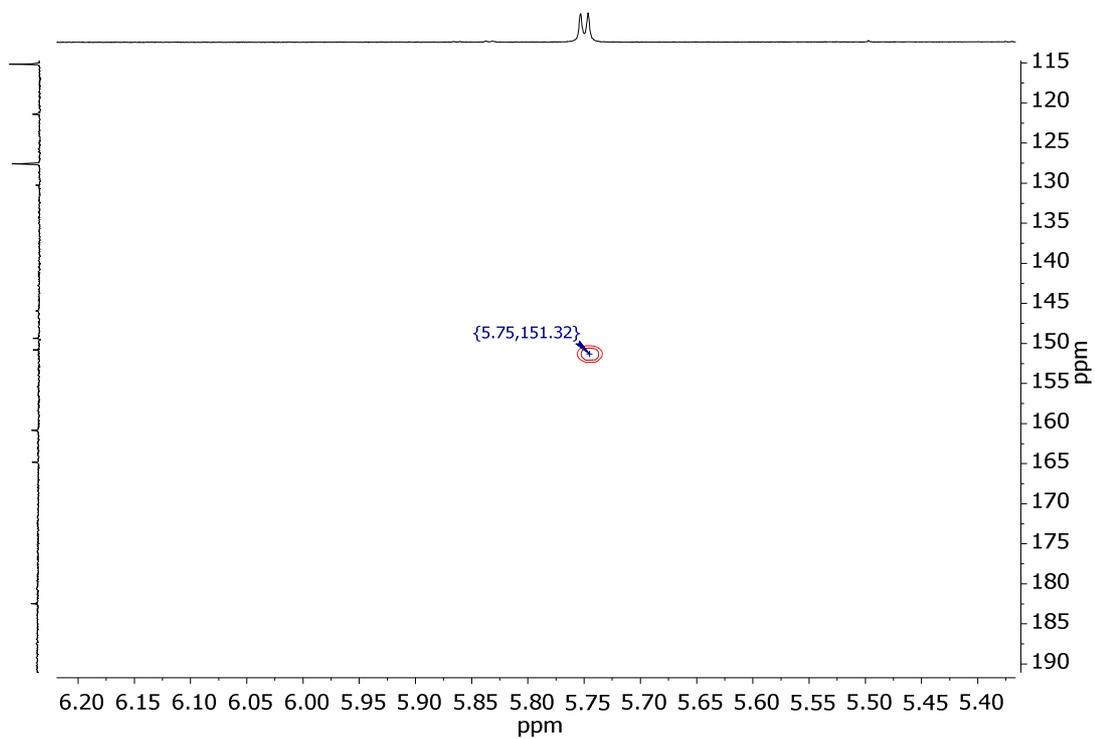
Figura 30- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD)

Figura 31- Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CD₃OD)Figura 32- Ampliação mapa de contorno HMBC (400 MHz, CD₃OD)

A fração 0-5 (Figura 33) foi submetida à análise por CLAE no modo semipreparativo utilizando uma coluna de fase reversa (C₁₈), o que possibilitou a separação do composto (**35**) (t_R 19,0 min). O solvente presente nesta fração foi removido através de evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. O composto obtido (2 mg) foi solubilizado em metanol (1,0 mg mL⁻¹) e analisado por CLAE analítico (t_R 9,0 min), utilizando uma coluna de fase reversa (C₁₈), para avaliar se o procedimento cromatográfico foi eficiente (Figura 34).

Figura 33– Cromatograma CLAE em 254 nm da fração 0-5

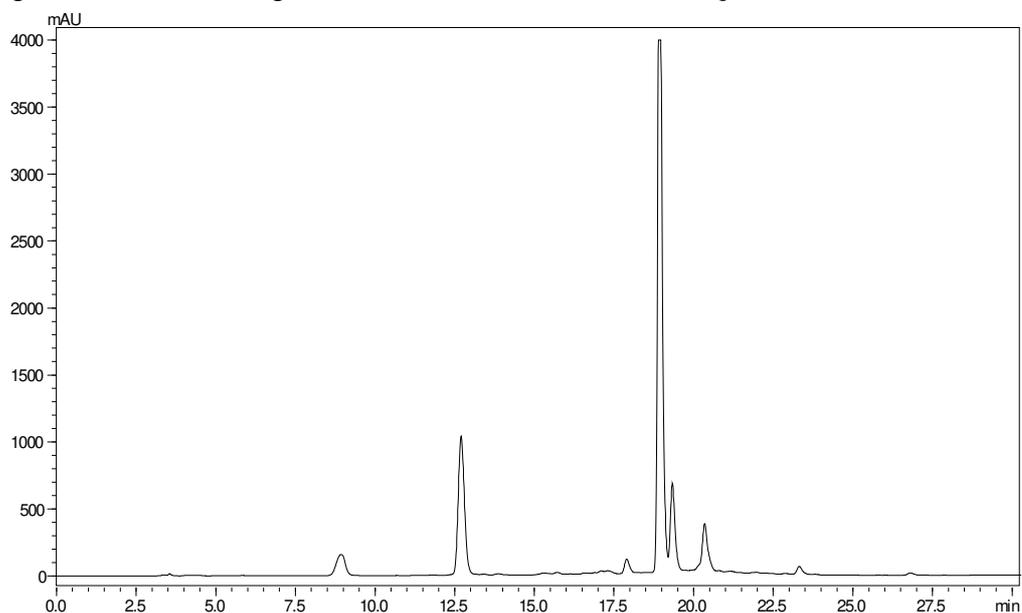
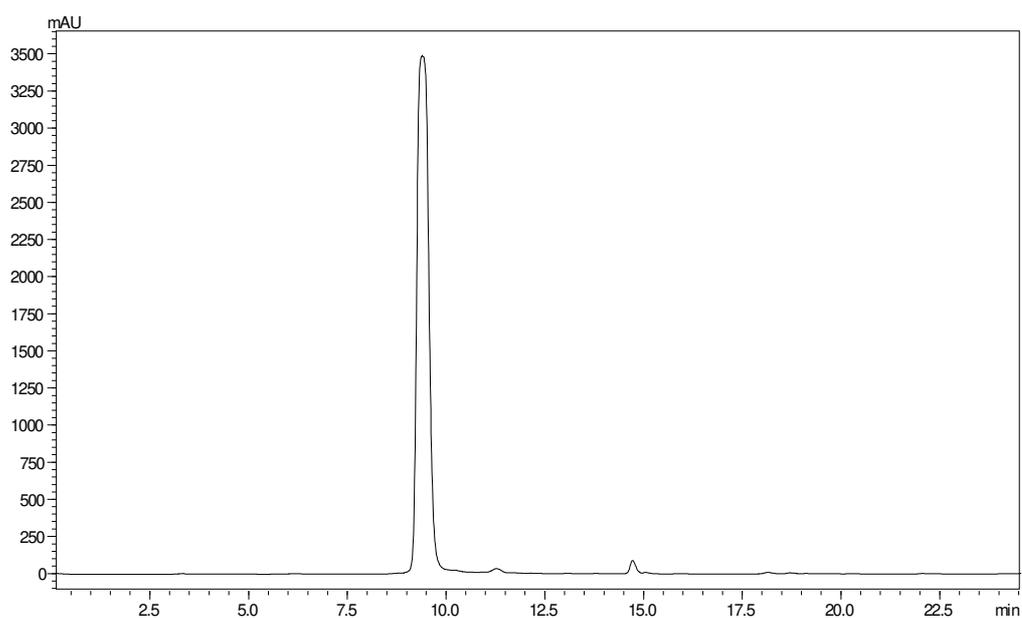
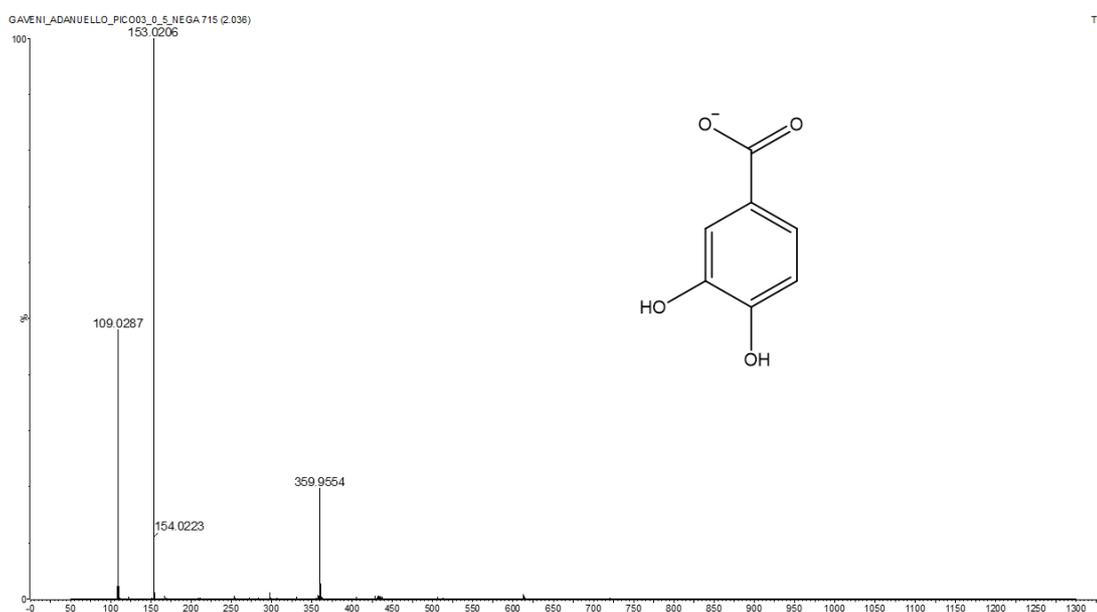


Figura 34- Cromatograma CLAE em 254 nm do pico 3 da fração 0-5



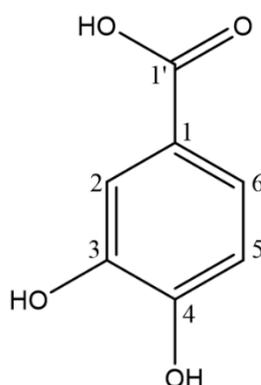
O composto (49) (t_R 2,0 min) (Figura 35) foi analisado por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_7H_5O_4^-$. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 153,0206 $[M - H]^-$, calculado para 153,0193 (Δ 8,5 ppm) (Figura 35).

Figura 35- EM-IES(-) em alta resolução do pico 3 da fração 0-5



A análise comparativa dos dados de RMN ^1H , com valores disponíveis na literatura (Silva et al., 2021), permitiu confirmar a estrutura do ácido fenólico como ácido protocatecuico (**35**) (Tabela 20) (Figura 36 – 38). Os deslocamentos químicos para RMN ^1H e constantes de acoplamento do composto confirmam a presença do ácido protocatecuico. Os sinais 6,67 d ($J = 8,0$ Hz) e os dois hidrogênios em 7,42 ppm (m) na região característica de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos evidenciam o anel aromático trissubstituído do ácido.

Tabela 20- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, CD_3OD) do ácido protocatecuico em MeOD



Posição	δ_{H}	δ_{C}	$^{\text{c}}\delta_{\text{H}}$	$^{\text{c}}\delta_{\text{C}}$
	^a mult. ^b (J em Hz)		^a mult. ^b (J em Hz)	
1	-	123,0	-	127,6
2	7,42 (m)	117,15	7,33 (d, 8,0)	118,2
3	-	145,44	-	147,0
4	-	150,78	-	150,5
5	6,79 (d, 1,8)	115,14	6,67 (d, 1,8)	115,8
6	7,42 (m)	117,15	7,29 (dd, 8,1 e 1,8)	123,8
7	-	170,5	-	173,7

^aDeslocamentos químicos em ppm estabelecidos em relação ao solvente residual

^bMultiplicidade: s (simpleto), d (duplete), ^c(Julião et al., 2010). (CD_3OD 600 e 150 MHz)

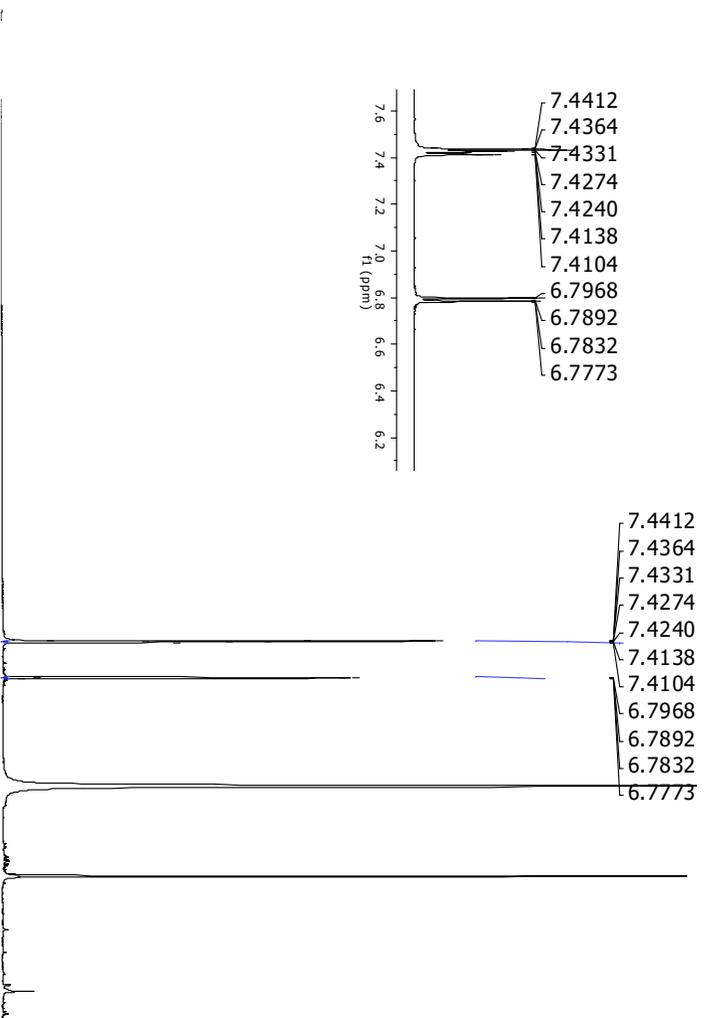
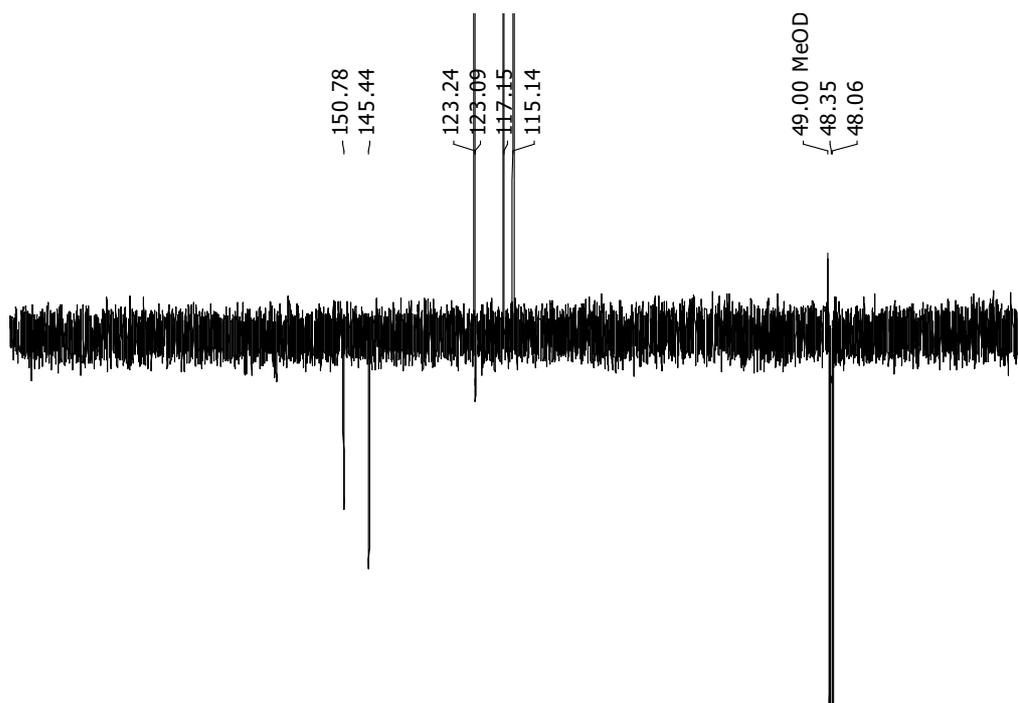
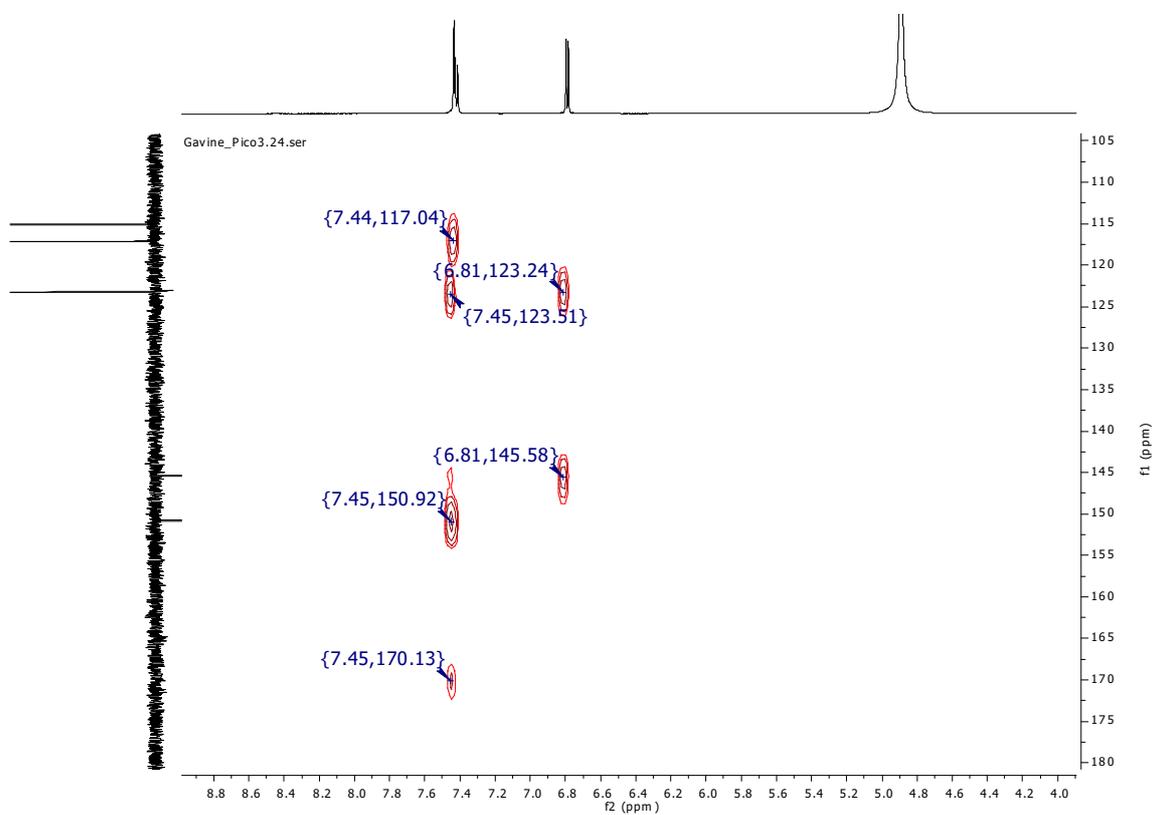
Figura 36- Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD)

Figura 37- Espectro de RMN de Dept (150 MHz, CD₃OD)Figura 38– Mapa de contorno HMBC 600 MHz, CD₃OD

Os dois compostos isolados foram submetidos ao ensaio antifúngico (Tabela 21) e, ao comparar os valores de atividade, foi possível observar que o ácido protocateuico apresentou valor de CIM maior que a fração de origem, onde observa-se a perda da atividade antifúngica. Enquanto ao composto escutelareina-7-*O*-apiosideo, que foi isolado da fração 6-18, observa-se um aumento significativo da atividade antifúngica em relação à fração, destacando-se o valor de CIM contra a cepa *C. glabrata* que foi 1,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$, segundo Holetz et al (2002), valores até 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ considerados promissores para compostos isolados, o que destaca o potencial antifúngico desse composto.

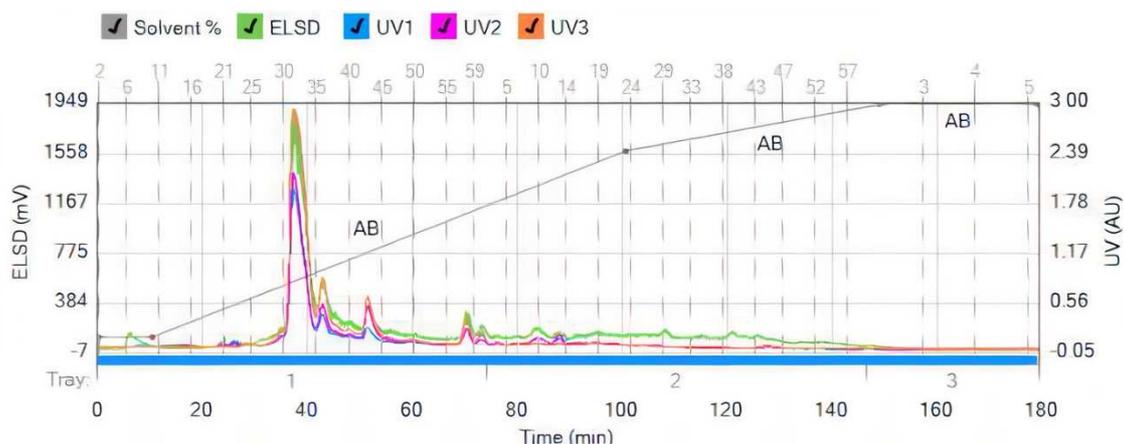
Tabela 21- Atividade antifúngica dos compostos isolados da fração FoPeAcOEt-C2.

Frações	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
FoPeAcOEt-C2	15,6	31,25	15,6
0-5	250	62,5	15,62
Escutelareina-7- <i>O</i> -apiosideo	15,6	31,25	1,95
Ácido protocateuico	>500	>500	>500

4.8 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO FoPenbut-C2

A fração FoPenbut-C2 (1,8 g), foi selecionada para o fracionamento por cromatografia líquida de média pressão (MPLC) (Figura 39), por ser a fração com o maior rendimento em massa, o fracionamento foi realizado com coluna C18 (18 x 3,0 cm x 40 μm , 80 g) e como fase móvel foi utilizado um gradiente de etanol e água acidificado com 0,1% de HCO_2H , com fluxo de 20,0 mL min^{-1} .

Figura 39- Cromatograma MPLC da fração FoPenbut-C2



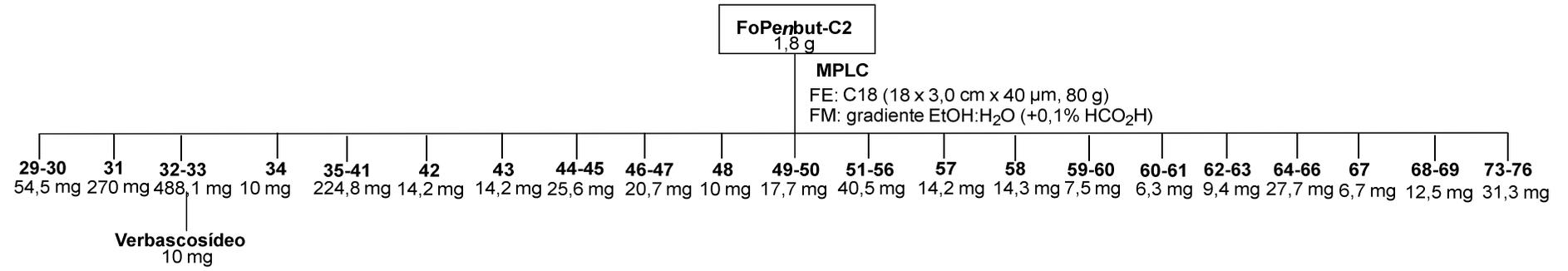
As 124 frações coletadas foram analisadas por UPLC e reagrupadas de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico, resultando em 30 frações (Figura 40). As frações foram enviadas para ensaio biológico para avaliar o seu potencial antifúngico (Tabela 22).

Com o resultado do ensaio antifúngico das frações FoPenbut-C2, foi possível observar que o valor de CIM que antes era $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (atividade moderada), teve um decréscimo nos valores, ou seja, as frações foram mais ativas do que a fração de origem, o que demonstra que o fracionamento foi eficaz. Pode-se observar a fração 32-33 que apresentou os valores $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $15,62$ e $15,62$ para as cepas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente.

Tabela 22 - Atividade antifúngica das Frações FoPenbut-C2

Frações	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
FoPenbut-C2	500	500	500
4-20	>500	>500	>500
21-23	>500	>500	>500
24-28	>500	>500	>500
29-30	62,5	250	15,62
31	500	62,5	15,62
32-33	31,25	15,62	15,62
34	500	62,5	15,62
35-41	500	62,5	31,25
42	62,5	125	15,62
43	62,5	250	15,62
44-45	125	250	250
46-47	62,5	250	31,25
48	125	250	31,25
49-50	31,25	125	15,62
51-56	125	250	62,5
57	250	62,5	125
58	500	250	125
59	125	250	62,5
60-61	250	250	62,5
62-63	125	62,5	15,62
64-66	125	62,5	31,25
67	250	250	125
68-69	62,5	125	250
70	250	500	500
71-72	>500	500	500
73-76	125	250	125
77	>500	>500	>500
78-89	250	>500	>500

Figura 40- Fluxograma das frações da FoPenbut-C2



A fração 32-33 (Figura 41) foi submetida à análise por CLAE no modo semipreparativo utilizando uma coluna de fase reversa (C₁₈), o que possibilitou a separação do composto (**31**) (t_R 11,4 min). O solvente presente nesta fração foi removido através de evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. O composto obtido (10 mg) foi solubilizado em metanol (1,0 mg mL⁻¹) e analisado por CLAE analítico (t_R 6,4 min), utilizando uma coluna de fase reversa (C₁₈), para avaliar se o procedimento cromatográfico foi eficiente (Figura 42).

Figura 41- Cromatograma da fração 32-33 (254 nm) em coluna semipreparativa

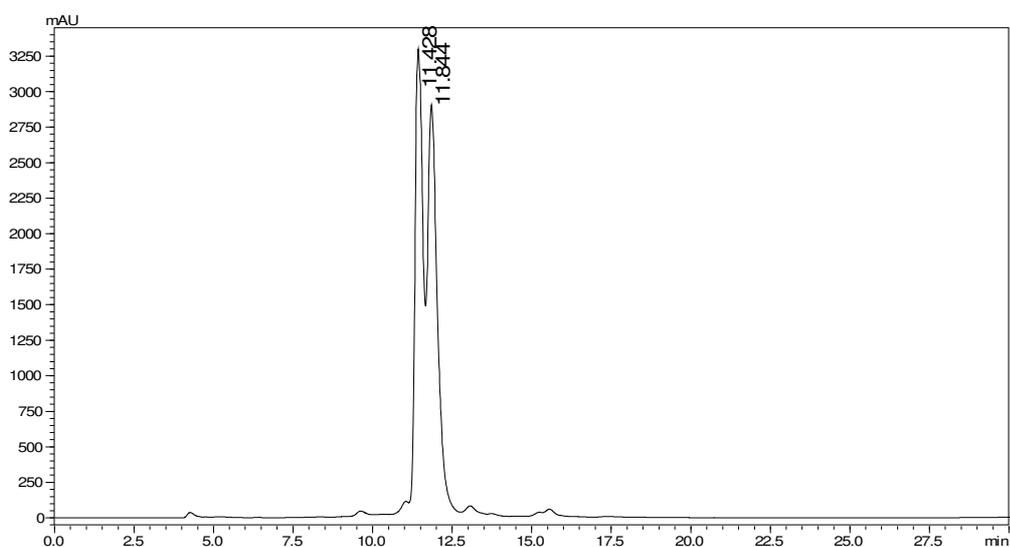
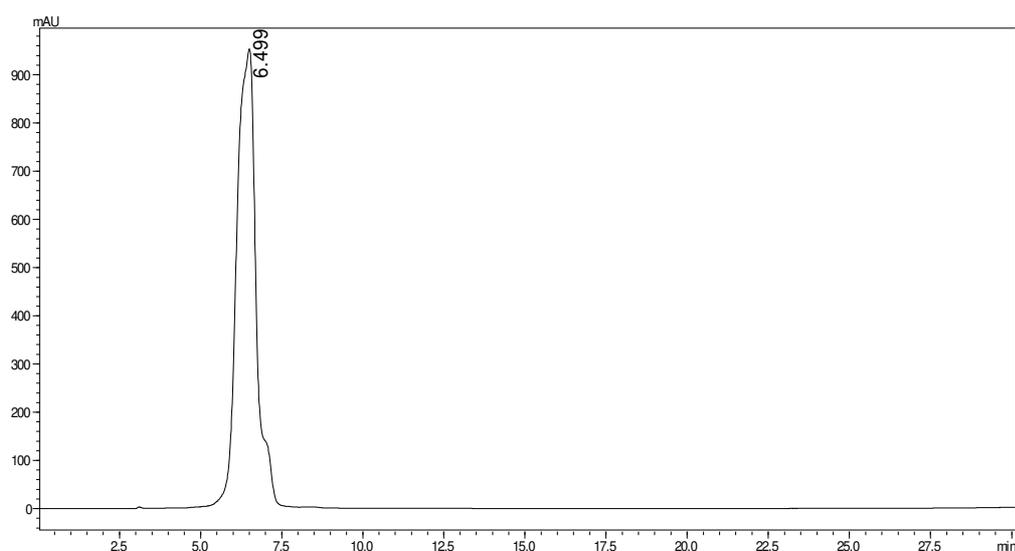


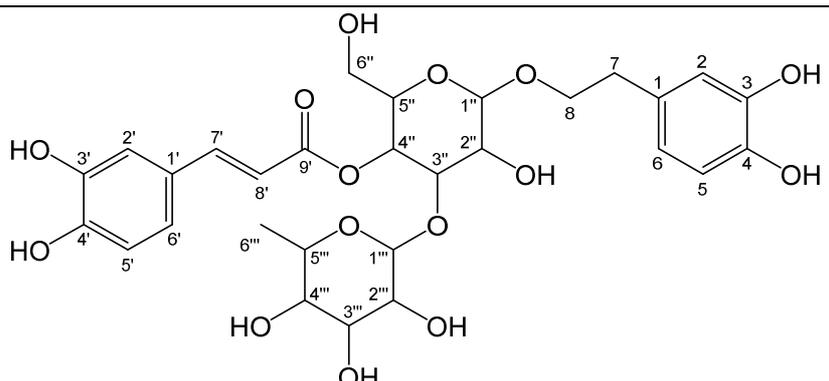
Figura 42- Cromatograma do verbascosídeo (**31**) (254nm) em coluna analítica.



Este composto foi anotado previamente pelas redes moleculares realizado pelo GNPS, e com as análises de RMN comparativas foi possível validar a anotação realizada anteriormente.

A análise comparativa dos dados de RMN ^1H , com valores disponíveis na literatura (Silva et al., 2021), permitiu confirmar a estrutura do glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (**31**) (Tabela 23) (Figura 43 - 45). Os deslocamentos químicos ^1H e constantes de acoplamento do composto confirmam a presença do fenilpropanoide verbascosídeo, também denominado acteosídeo. Os prótons anoméricos a 4,39 d ($J = 7,9$ Hz) e 5,20 d ($J = 1,8$ Hz) confirmam a presença dos grupos glucose e ramnose, respectivamente. Os sinais a 7,61 d ($J = 16,0$ Hz) e 6,29 d ($J = 16,0$ Hz) são típicos para a dupla ligação entre H-7' e H-8' do grupo cafeoil, e os sinais a 6,71 d, 6,58 dd ($J = 8,1; 2,1$ Hz) e 6,68 d evidenciam o anel aromático trissubstituído para o aglicona do verbascosídeo (Silva et al., 2021).

O verbascosídeo foi analisado por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$, onde o sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 623,1998 $[\text{M} - \text{H}]^-$, calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{O}_{15}^-$, 623,1981 (Δ 2,7 ppm) (Figura 46 - 47), com a análise do íon molecular protonado por EM sequencial (EM/EM) no modo negativo foi possível observar algumas fragmentações características desse fenilpropanoide (Figura 48), como os fragmentos m/z 461 e 161, que podem ser atribuídos à eliminação da cafeoil, e a eliminação neutra da unidade glicosídica a partir do íon m/z 461 observa-se a formação do fragmento de m/z 315 (Valério et al., 2023)

Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H de **31** (CD_3OD).


	Posição	Experimental $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (J em Hz)	(SILVA et al., 2021) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (J em Hz)
Aglicona	1		
	2	6,71 d	6,72 d (1,7)
	3		
	4		
	5	6,68 d	6,70 d (8,0)
	6	6,58 dd (8,1; 2,1)	6,59 dd (8,0; 1,7)
	7	2,79 m	2,82 td(7,3; 3,5)
	8	4,09-4,01 m	4,07; 3,75
Cafeoil	1'		
	2'	7,07 d (2,0)	7,08 d (1,7)
	3'		
	4'		
	5'	6,79 d (8,2)	6,80 d (8,2)
	6'	6,97, dd (8,2)	6,98 dd (8,2; 1,7)
	7'	7,61 d (15,9)	6,30 d (15,8)
	8'	6,29 d (15,9)	7,61 d (15,9)
	9'		
Glucose	1''	4,39 d (7,9)	4,40 d (7,9)
	2''	3,41 m	3,41 t (8,4)
	3''	3,83 t (9,2)	3,84 t (9,2)
	4''	4,93 m	4,94 t (9,4)
	5''	3,68-3,50 m	3,54 d (3,7)
	6'' a	3,68-3,50 m	3,56 s
	6'' b	3,68-3,50 m	3,63 s
Ramnose	1'''	5,20 d (1,8)	5,21 d (1,8)
	2'''	3,93 dd (3,3; 1,8)	3,94 m
	3'''	3,65-3,50 (m)	3,60 m
	4'''	3,30 m	3,30 d (9,5)
	5'''	3,68-3,50 m	3,58 d (6,3)
	6'''	1,10 d (6,20)	1,11 d (6,2)

^a Deslocamento químico em ppm em relação ao solvente residual, ^b multiplicidade e J em Hz

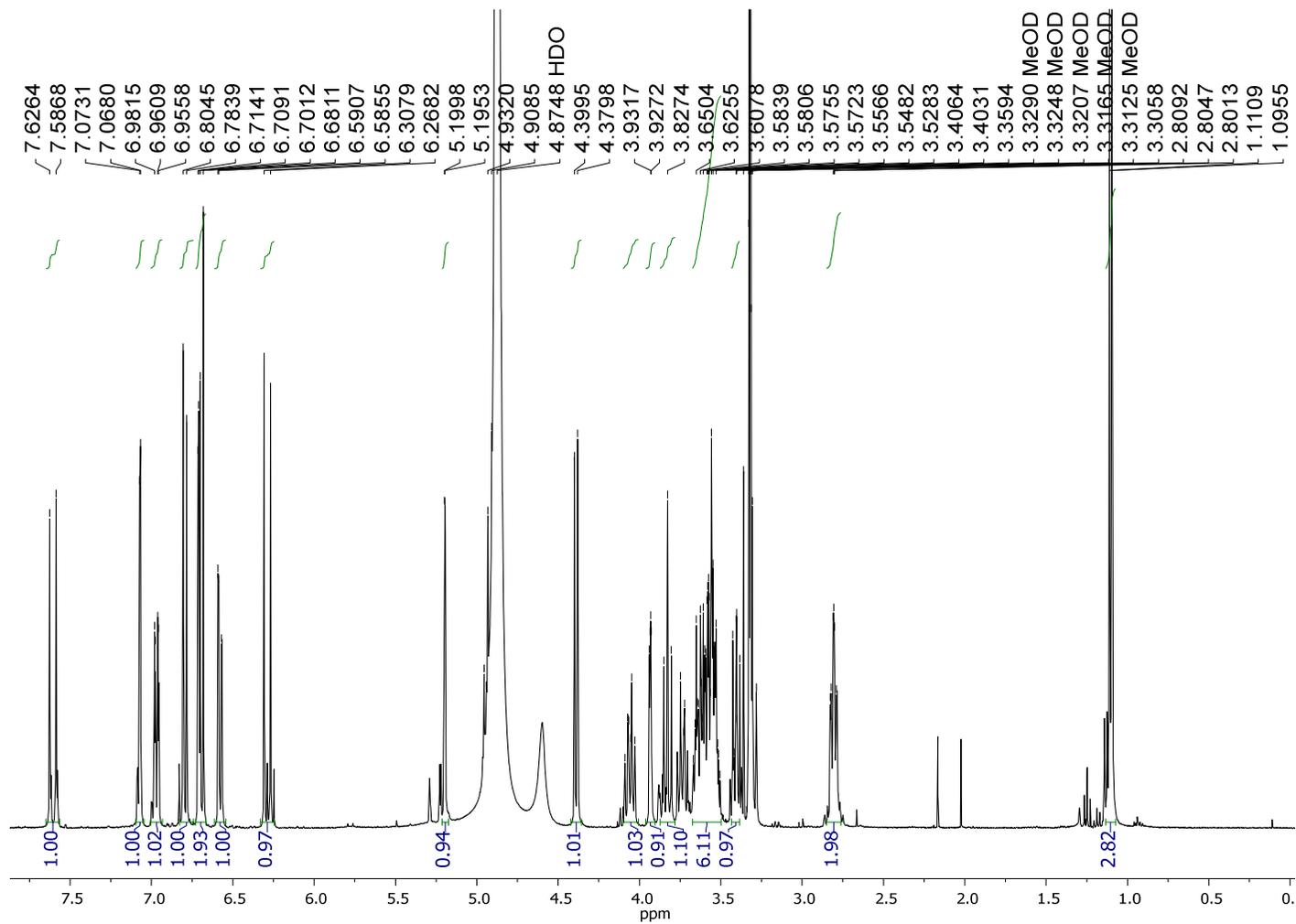
Figura 43- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD)

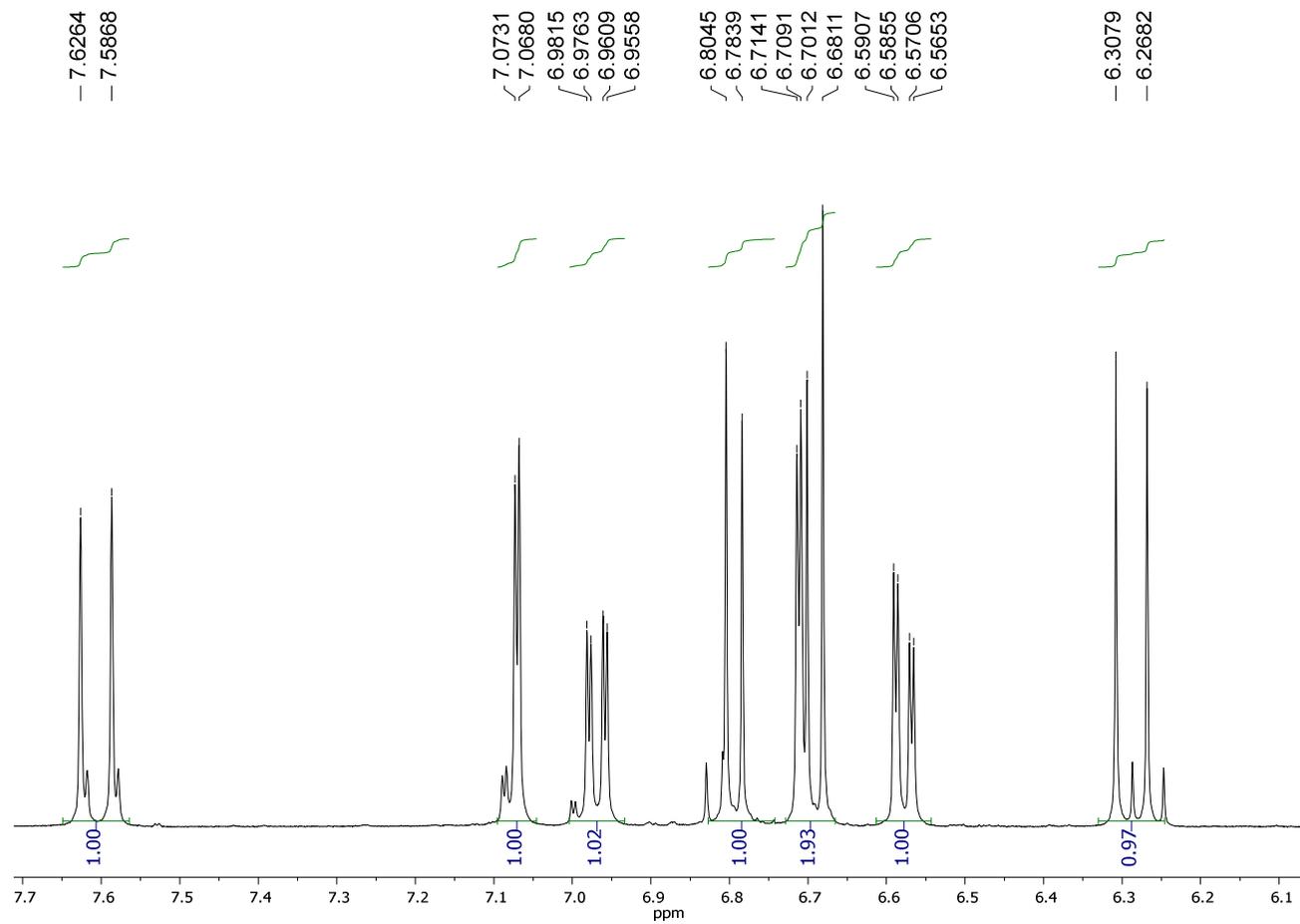
Figura 44– Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD)

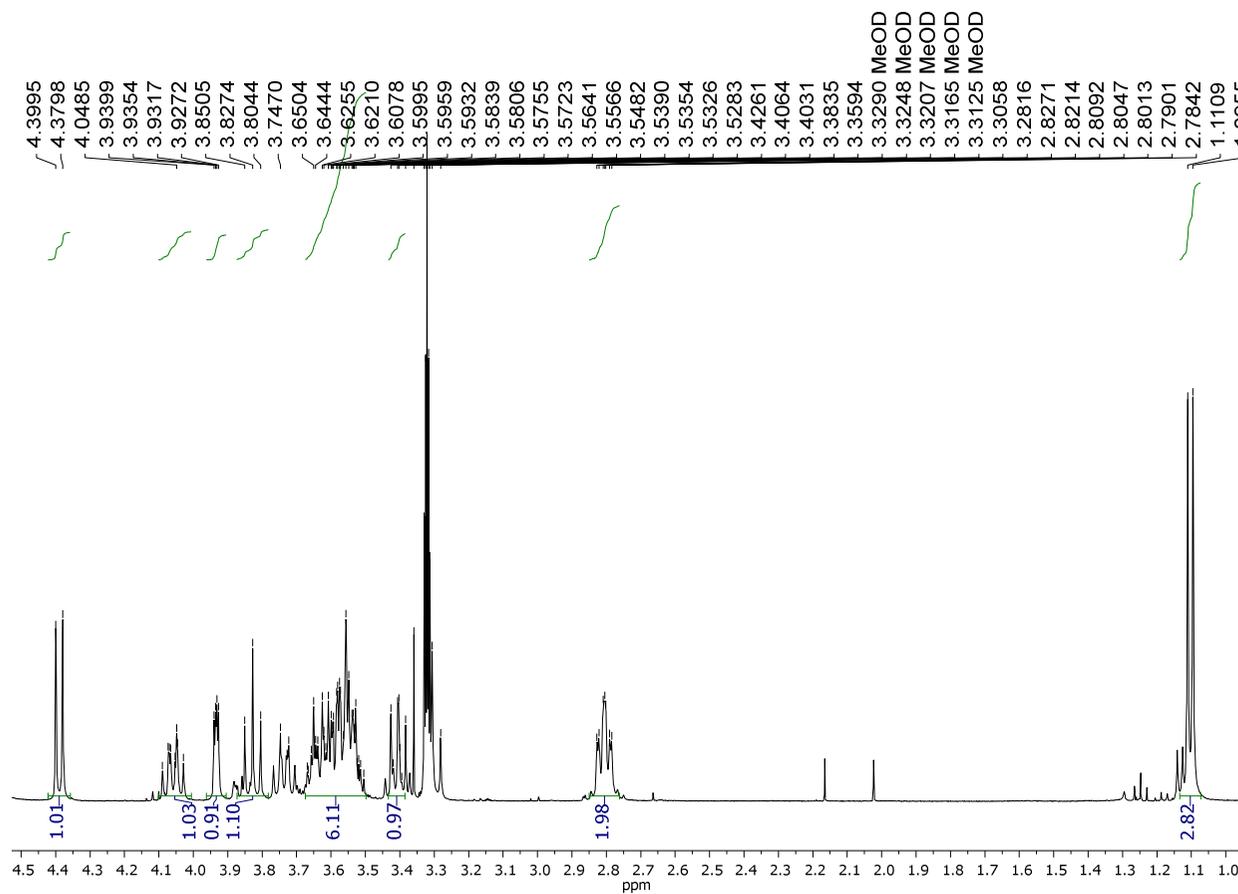
Figura 45- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD)

Figura 46- Espectro EM-IES(-) em alta resolução composto verbascosideo

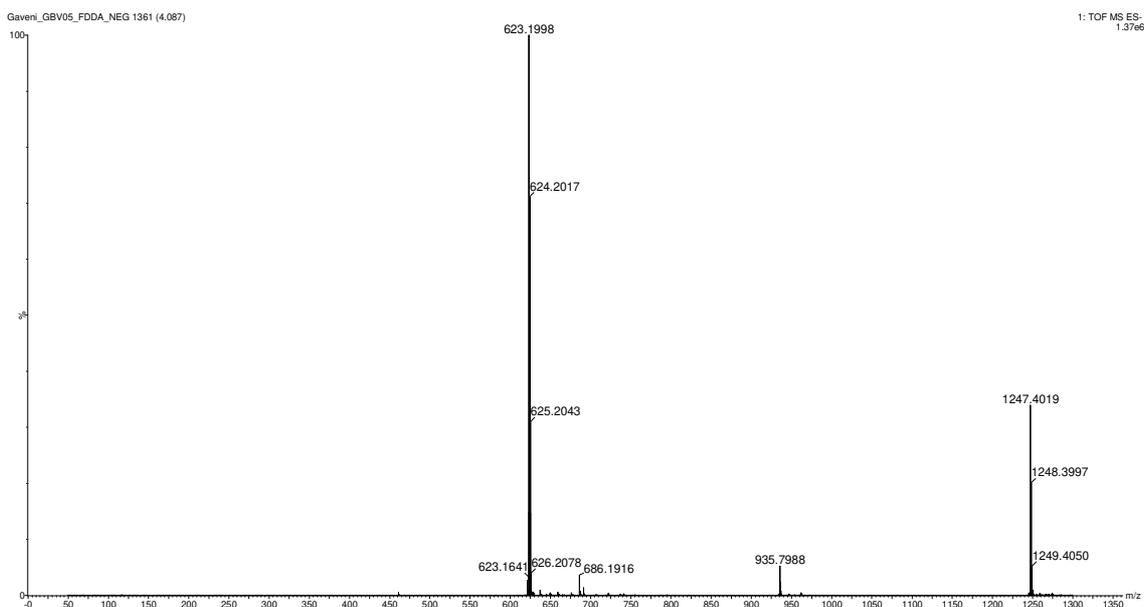


Figura 47- Espectro EM/EM-IES(-) do composto verbascosideo

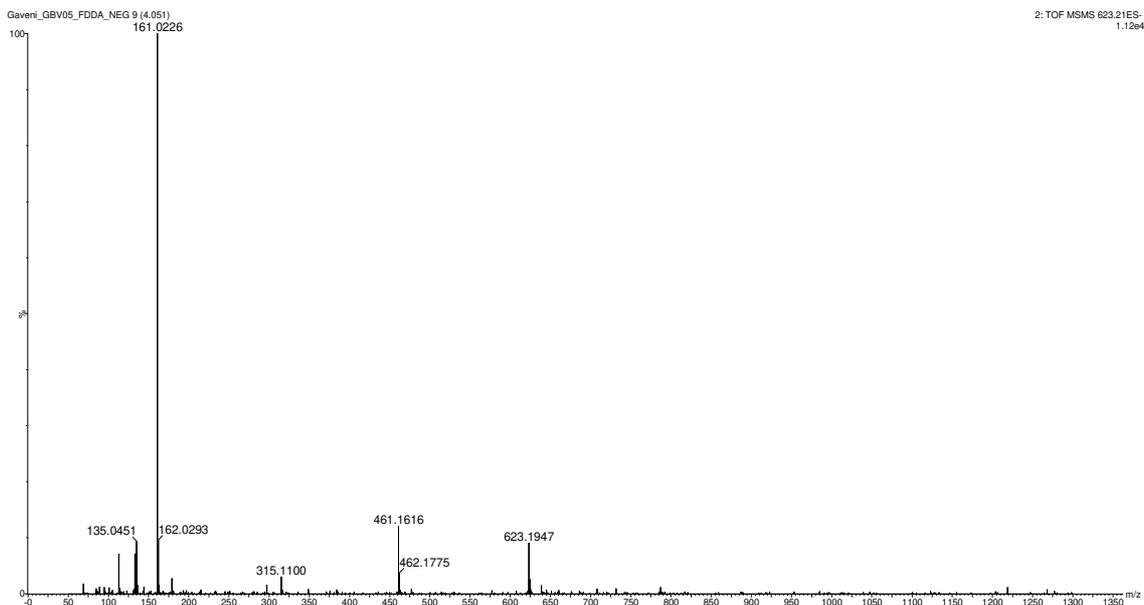
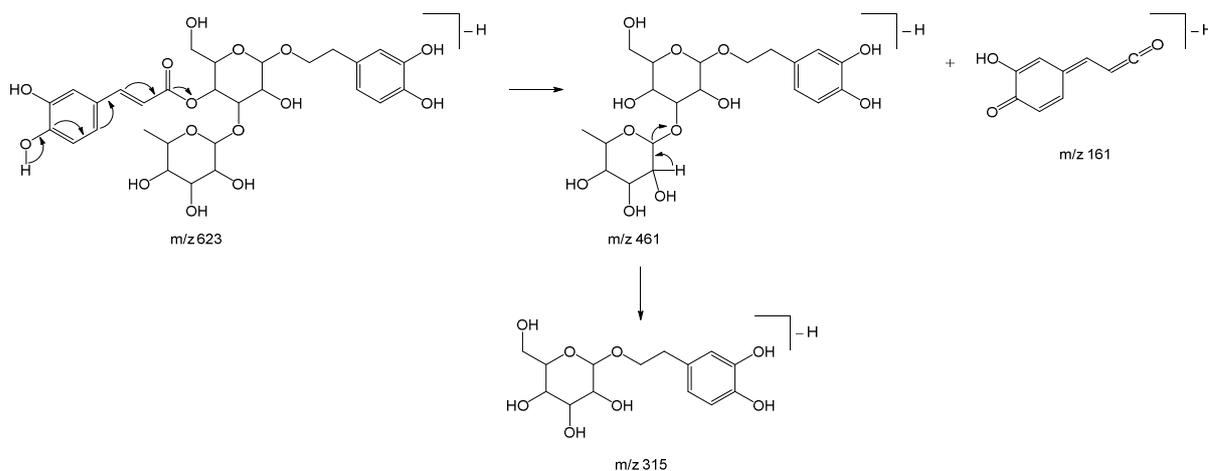
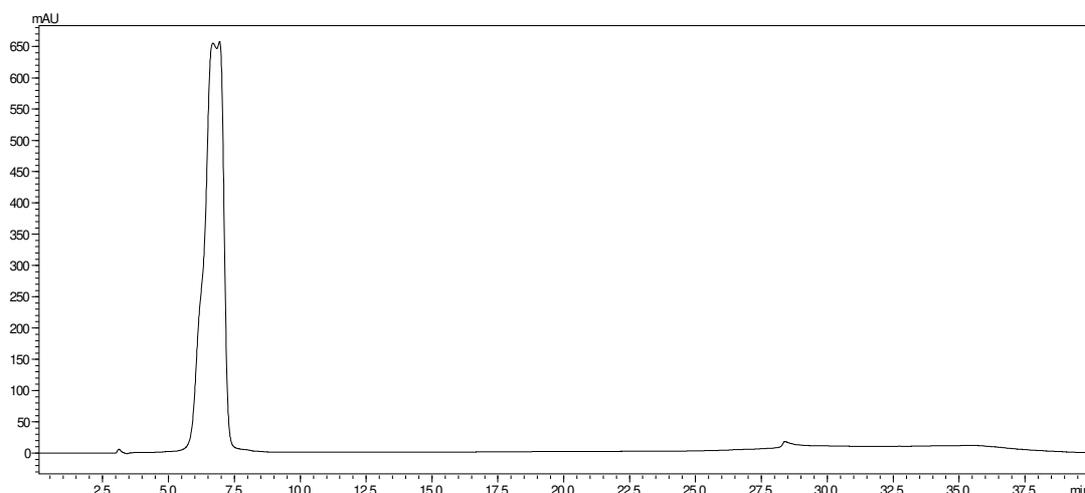


Figura 48- Proposta de fragmentação para o glicosídeo feniletanoide verbascosídeo (**31**).



Além do composto **31**, foi possível obter uma mistura de compostos, após a submissão da fração 32-33 (Figura 41) CLAE no modo semipreparativo. O solvente presente na mistura fração foi removido através de evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. A mistura (10 mg) foi solubilizada em metanol (1,0 mg mL⁻¹) e analisado por CLAE analítico (t_R 7,0 min), utilizando uma coluna de fase reversa (C18), onde foi possível observar que a separação não foi eficiente (Figura 49). Essa mistura foi submetida à análise de CLUE-EM e RMN (Figuras 50 - 53).

Figura 49- Cromatograma da mistura em coluna analítica.



A partir da análise em alta resolução no modo negativo da mistura, foi possível observar a presença de dois íons, sendo o primeiro do verbascosídeo (m/z 623,1998) (t_R 4,02 min) e de um composto com m/z 755,2385, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{34}H_{44}O_{19}$. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 755,2385 $[M - H]^-$, calculado para $C_{34}H_{43}O_{19}^-$, 755,2404 (Δ 2,5 ppm) (Figura 53).

No RMN de hidrogênio (Figuras 51 – 53) foi possível observar sinais característicos do composto verbascosídeo na mistura, e além desses sinais a amostra apresenta sinais característicos de hidrogênios anoméricos de açúcares, como a apiose e ramnose. Após a análise dos espectros não foi possível identificar de forma exata qual o isômero presente nessa mistura, betanosídeo F (**30**) ou o samiosídeo (**33**) (Figura 54), ambos já foram identificados previamente nas folhas da planta *Lantana trifolia* (Julião et al., 2010).

Esses dois fenilpropanoides apresentam a mesma fórmula molecular $C_{34}H_{44}O_{19}$, ou seja, mesma massa molecular, a única diferença entre eles, está na posição em que o açúcar apiose está ligado, sendo no composto **30** essa ligação da apiose ocorre na posição 2 da ramnose (Figura 54), enquanto no composto **33** a apiose está ligada na posição 4 (Figura 54).

Figura 50- Espectro EM-IES(-) em alta resolução

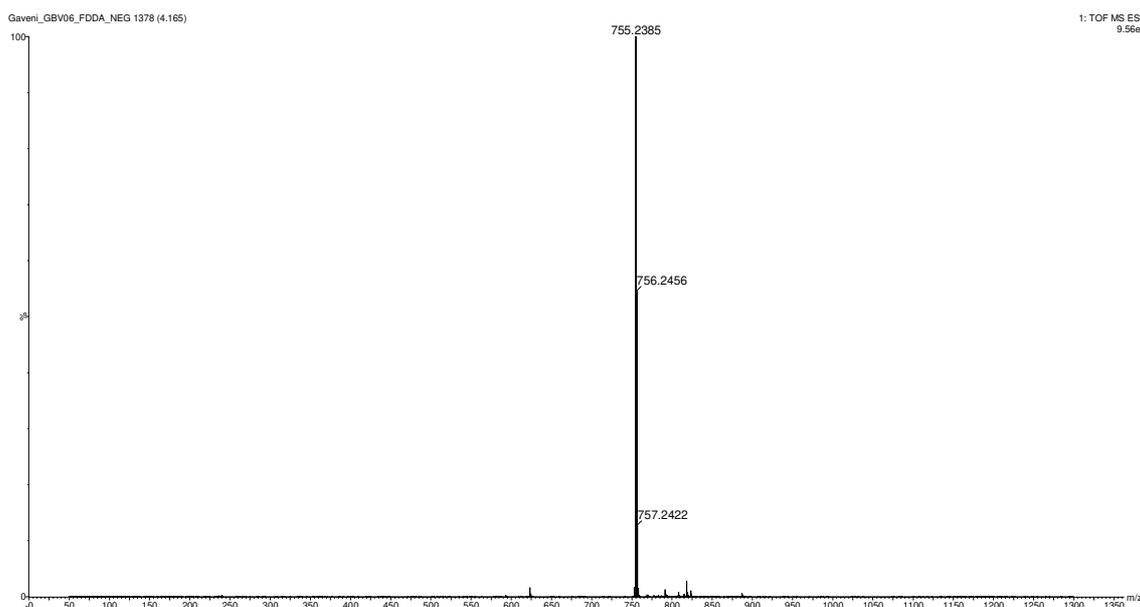


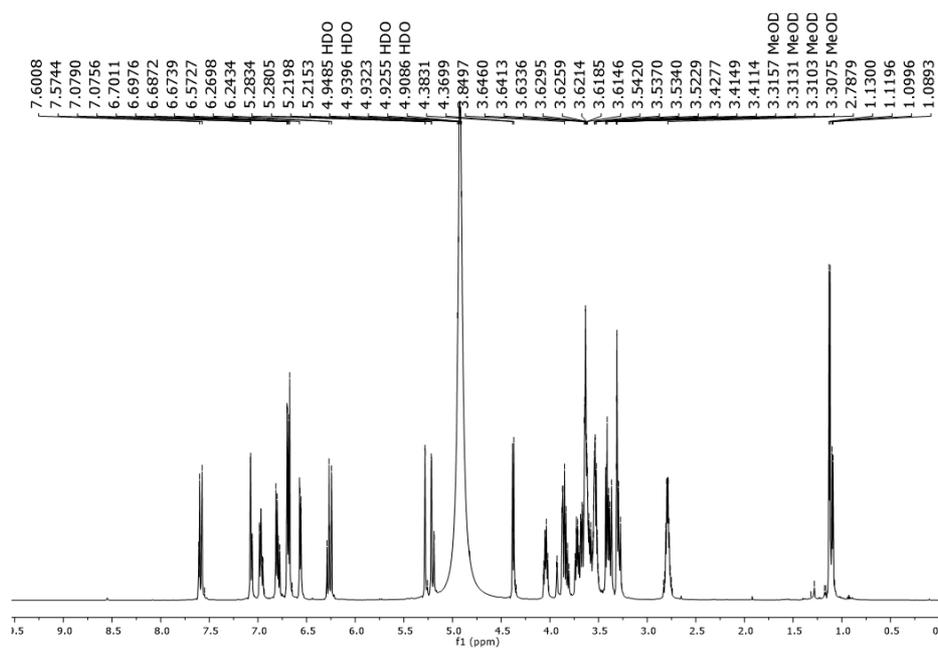
Figura 51- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD)

Figura 52– Ampliação na região dos hidrogênios anoméricos do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD)

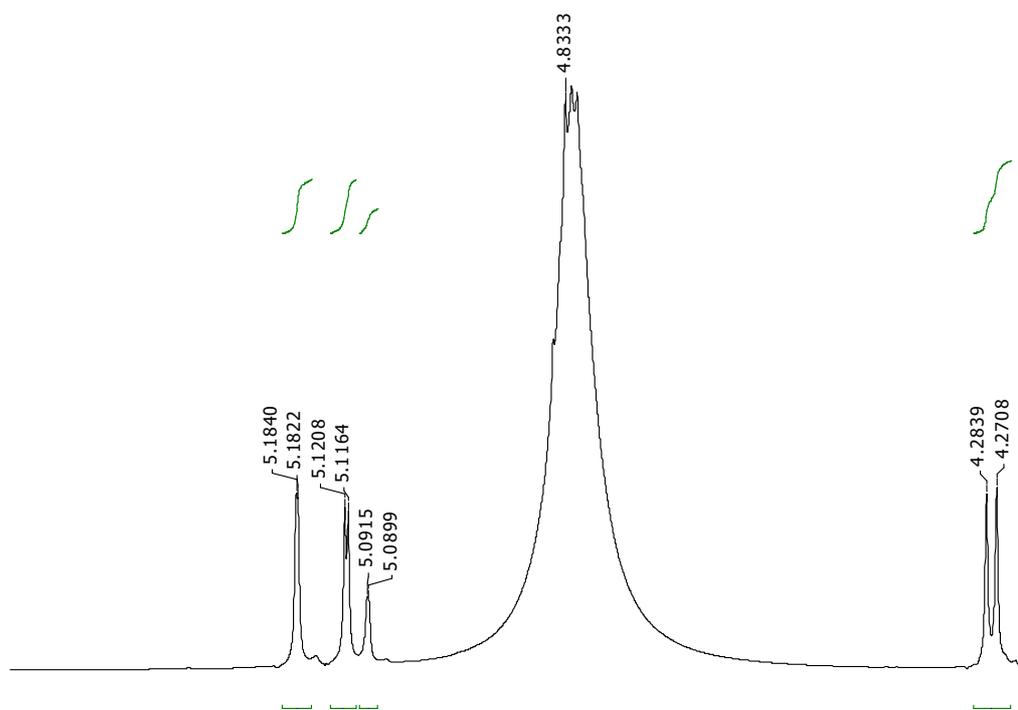


Figura 53 - Ampliação dos sinais de metila característicos da ramnose do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD)

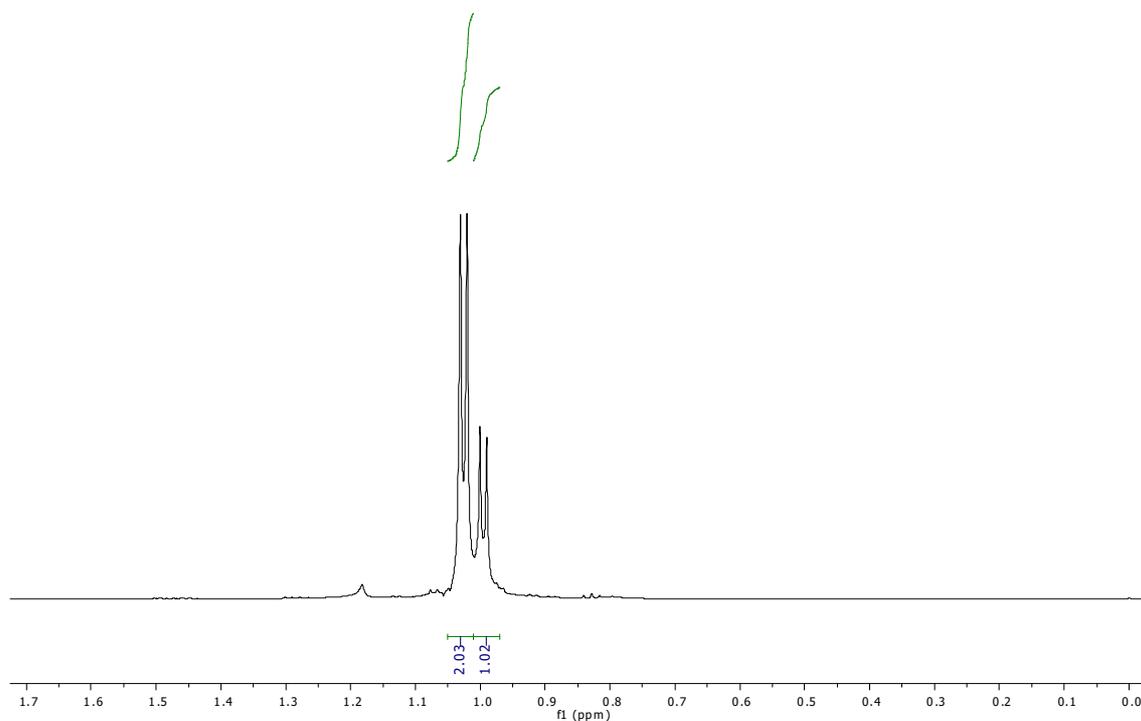
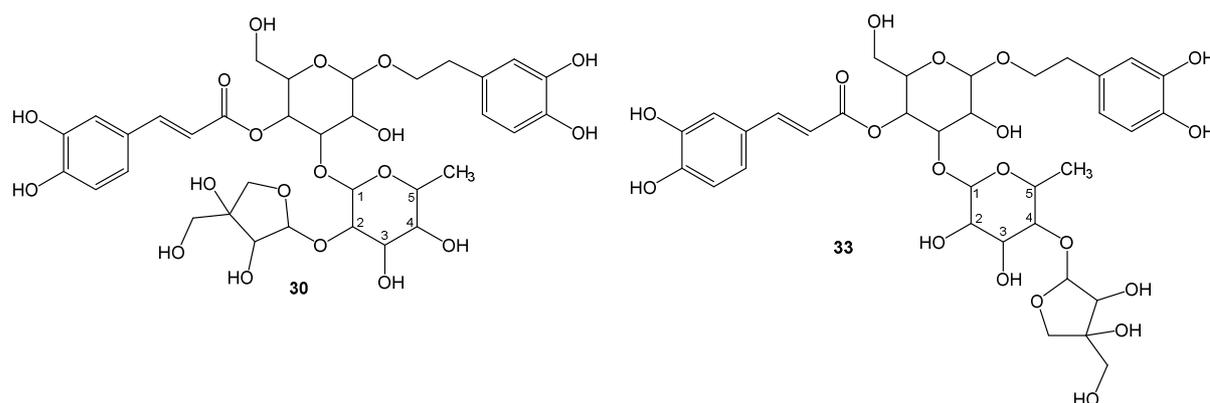


Figura 54 – Estrutura Samiosideo e Betaniosideo F



O verbascosideo e a mistura coletada da fração 32-33, foram submetidos a ensaio antifúngico (Tabela 24), e ao comparar os valores de CIM, foi observada a melhora do potencial antifúngico, sendo mais ativos do que a

fração de origem FoPenbut-C2. Ambos apresentaram melhoras significativas nos valores de CIM, principalmente contra a cepa *C. albicans* (7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos), o que demonstra que o fracionamento foi eficaz na melhora da atividade antifúngica.

Tabela 24 - Atividade antifúngica dos compostos isolados da fração FoPenBut-C2.

Frações	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
FoPenbut-C2	500	500	500
32-33	31,25	15,62	15,62
Verbascosideo	7,81	31,25	31,25
Mistura	7,81	250	62,5

4.9 ANÁLISES CG-EM

As frações FoPeHex-C2 e FoPeHex-C3, foram selecionadas para análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas devido a diferença entre as atividades antifúngicas dessas frações (Tabela 25). É importante ressaltar que estas frações são derivadas do extrato do mesmo espécime, ou seja, foram coletadas no mesmo local com a diferença nas datas de coleta.

Tabela 25 – Atividade antifúngica das frações hexano das folhas

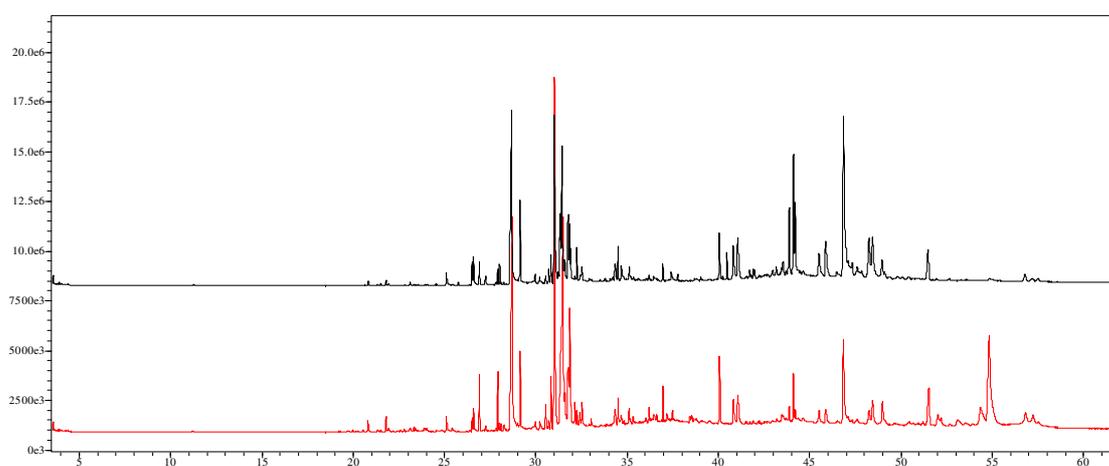
Frações	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
FoPeHex-C2	500	500	1000
FoPeHex-C3	15,6	500	500

A fração FoPeHex-C2 apresentou atividade moderada (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra as cepas *C. albicans*, *C. tropicalis* e baixa contra *C. glabrata*, já a fração FoPeHex-C3 demonstrou atividade moderada contra as cepas *C. tropicalis* e *C. glabrata* (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mas teve uma boa atividade contra a cepa *C. albicans*

($15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), o que despertou o interesse em comparar o perfil químico dessas frações por CG-EM (Figura 63) (Holetz et al., 2002).

Na figura 55, é possível perceber algumas diferenças no perfil cromatográfico das frações, sendo FoPeHex-C2 representado pelo cromatograma em preto e FoPeHex-C3 pelo cromatograma em vermelho. Assim, foi possível observar que existe uma diferença na intensidade de alguns picos presentes nos cromatogramas das frações coletadas em estações do ano diferentes (primavera para FoPeHex-C2 e verão para FoPeHex-C3).

Figura 55 - Cromatograma (CG-EM) das frações FoPeHex-C2 e FoPeHex-C3



Fração FoPeHex-C2 em preto e FoPeHex-C3 em vermelho.

Foi realizada a identificação de alguns compostos presentes nessas frações por meio de comparação com as bibliotecas NIST e Willey. Nessa análise foram identificados, somente os compostos com índice de similaridade maior ou igual a 90 % (Tabela 26).

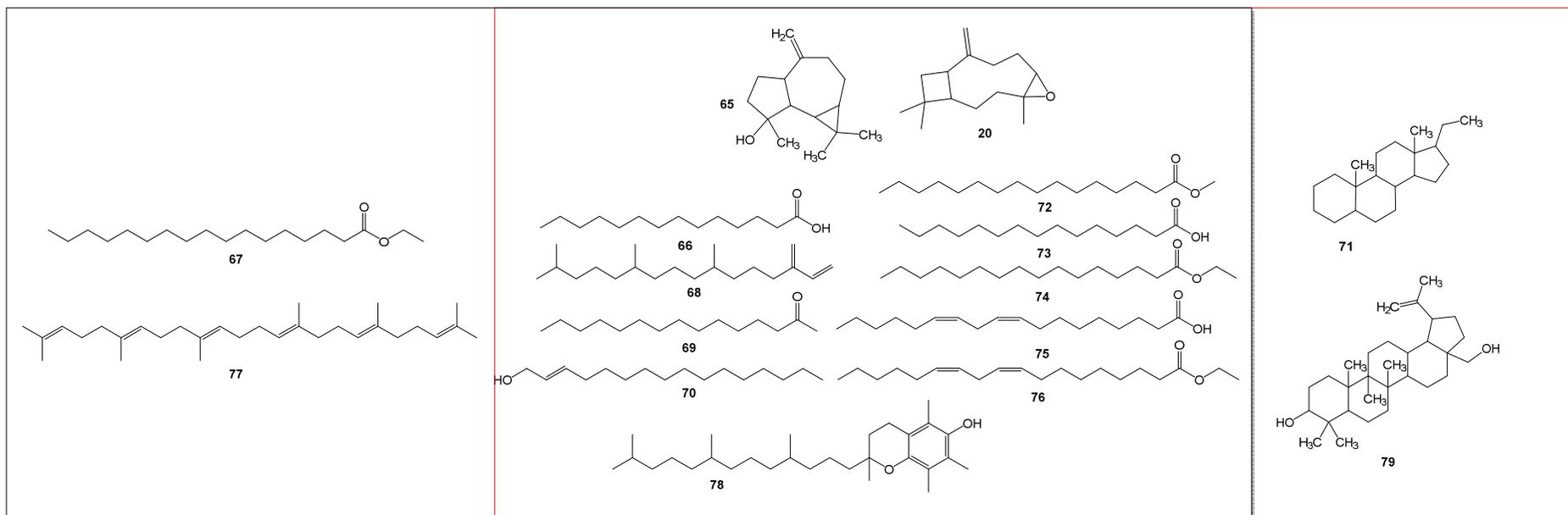
Tabela 26 – Compostos identificados das frações FoPeHex-C2 e FoPeHex-C3

Número	t _R (min)	Composto	Índice de similaridade		Biblioteca
			FoPeHex- C2	FoPeHex- C3	
65	21,8	Espatuleno	90	90	Nist
20	21,9	Oxido de cariofileno	90	90	Willey
66	25,1	Ácido Mirístico	93	93	Willey/Nist
67	25,8	Heptadecanoato de etilo	90	-	Willey
68	26,5	Neofitadieno	94	91	Willey
69	26,6	2- Pentadecanona	91	90	Willey/Nist
70	27,2	^a Fitol	90	90	Willey
71	27,9	14b-Pregna	-	90	Willey
72	28,0	Palmitato de metilo	95	91	Willey
73	28,7	Ácido pentadecanóico	90	90	Nist
74	29,1	Palmitato de etilo	90	94	Willey
70	30,9	^a Fitol	92	93	Willey
75	31,3	^a Ácido linoleico	91	91	Willey
75	31,8	^a Ácido linoleico	90	90	Nist
76	32,2	Linoleato de etilo	91	91	Willey
77	40,5	Esqualeno	90	-	Nist/Willey
78	44,2	Vitamina E	91	90	Willey
79	54,8	Betulina	-	90	Nist

^aRepresenta diferentes isômeros e/ou estereoisômeros (ex., catequina, que pode ser catequina ou epicatequina).

Comparando os compostos em comum das duas coletas foi possível identificar 16 compostos (Figura 56), dentre eles terpenos, ácidos graxos e seus derivados, sendo que os compostos heptadecanoato de etilo (**67**) e esqualeno (**77**) estão presentes somente na fração FoPeHex-C2, enquanto a fração FoPeHex-C3 que é a fração que apresentou melhores valores de CIM, apresenta de diferente os compostos 14b-Pregna (**71**) e betulina (**79**). Ambos compostos pertencem a classe dos terpenos, 14b-Pregna possui um estudo que relata a atividade antifúngica ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. albicans*) do óleo essencial de *Eremomastax speciosa*, onde o composto **71** é majoritário (Ibok et al., 2023). A betulina apresenta diversas atividades biológicas relatadas na literatura, dentre elas a atividade contra cepa de *Candida albicans*, em que apresentou IC_{50} de $6,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Ghaffari et al., 2012) .

Figura 56 – Compostos identificados por CG-EM



Fração FoPeHex-C2 em preto e FoPeHex-C3 em vermelho.

5 CONCLUSÃO

Através das coletas da planta *Lantana trifolia* L., realizadas em diferentes datas, foi possível fazer a extração por maceração com etanol das folhas e frutos desta planta e posteriormente a extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, essas frações foram submetidas a ensaio antifúngico contra três cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*).

As frações acetato de etila apresentaram boa atividade para todas as espécies de *Candida* avaliadas (valores de CIM menores do que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), com destaque para as frações dos frutos FrPoAcOEt, FrPeAcOEt e FrPenBut que apresentaram valores de CIM contra *C. glabrata* próximos ao controle positivo ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. krusei*). A partir dos resultados de citotoxicidade, foi calculado o índice de seletividade (IS) e, pela análise desses valores, foi possível observar que as frações apresentaram maior seletividade contra o fungo *C. glabrata* do que contra as células, ou seja, atividade antifúngica foi maior do que a citotoxicidade das frações.

As análises quimiométricas permitiram a visualização da separação das frações mais ativas das inativas, possibilitando a seleção de 30 biomarcadores (íons) para cada cepa de *Candida*, íons estes que podem ter correlação direta com as atividades antifúngicas.

As redes moleculares realizadas pelo GNPS permitiram a anotação de vinte e nove compostos, e a anotação de nove biomarcadores indicados pelas análises quimiométricas.

O fracionamento da fração FoPeAcOEt-C2 permitiu o isolamento do flavonoide escutelareina-7-*O*-apiofuranosídeo e do ácido protocatecuico, e o fracionamento da fração FoPenBut permitiu o isolamento do verbascosídeo que teve sua anotação que foi realizada anteriormente pelo GNPS validada.

As frações FoPeHex-C2 e FoPeHex-C3, provenientes da planta coletada no mesmo local, porém em diferentes estações do ano, apresentaram diferentes atividades antifúngicas (CIM de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente contra a cepa *C. albicans*). A análise de CG-EM destas frações permitiu verificar a presença de 16 compostos da classe dos terpenos,

esteroides ácidos graxos e seus derivados, sendo que a fração mais ativa apresenta como diferença a presença dos compostos **71** e **79**.

Dessa forma, o presente trabalho relata pela primeira vez a composição química dos frutos da planta *L. trifolia*, uma vez que estudos encontrados na literatura relatam a composição das folhas e flores. Assim como comprova o potencial antifúngico da planta *Lantana trifolia* L., e contribui com o conhecimento químico e biológico de espécies presentes no território brasileiro que são utilizadas na medicina tradicional.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoteráticos**. 2006. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2021. Brasília, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br>>

BRASIL. **Cartilha de orientações sobre o uso de fitoterápicos e plantas medicinais**. 2022. [s. l.], 2022.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais : potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 575–595, 2017.

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**, v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006.

CORDELL, G. A.; SHIN, Y. G. Finding the needle in the haystack . The dereplication of natural product extracts *. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 1089–1094, 1999.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250–1318.

DZOYEM, J. P.; KUETE, V. Review of the Antifungal Potential of African Medicinal Plants. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M.; RAI, M. (Eds.). **Antifungal Metabolites from Plants**. New York: Elsevier, 2013. p. 79–156.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; JOSÉ, A.; BOLZANI, S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

FRAMPTON G. M., FICHTENHOLTZ A., OTTO G. A., WANG K., DOWNING S.R., HE J. et al. **Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing**. *Nat Biotechnol.*, v 31, n .11, p.1023-1031, 2013.

- GEORGIEV V, ANANGA A, TSOLOVA V. **Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals**. *Nutrients*; v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.
- GHAFFARI MOGHADDAM, M.; BIN H. AHMAD, F.; SAMZADEH-KERMANI, A. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 03, n. 02, p. 119–123, 2012.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOMEZ, L. D. Vanilla planifolia , the first Mesoamerican orchid illustrated , and notes on the de la Cruz-Badiano Codex. **lankesteriana**, v. 8, n. 1, p. 81–88, 2008.
- GUIMARÃES ROSA, J. **Grande sertão: veredas**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, A. G.; NAKAMURA, C. V.; PRADO, B.; FILHO, D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.
- IBOK, M. G.; ODEJA, O. O.; OKPALA, E. O.; EGHWUBARE, J. E.; ANIFALAJE, E. O. Eremomastax speciosa (Hochst.): GC/MS profiling, antioxidant and antimicrobial activities of stem essential oil. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, 14 jun. 2023.
- IMBENZI, P. S.; H.E, 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.
- JALLOW, S.; GOVENDER, N. P. Ibrexafungerp : A First-in-Class Oral Triterpenoid Glucan. **Journal of Fungi**. v. 7, n. Figure 1, p. 1–19, 2021.
- JULIÃO, L.; BIZZO, H. R.; SOUZA, A. M.; LOURENCO, M. C. S.; SILVA, P. E. A.; TAVARES, E. S.; RASTRELLI, L.; LEITAO, S. G. Essential oils from two Lantana species with antimycobacterial activity. **Natural Product Communications**. v. 4, n. 12, p. 1733–1736, 2009.
- JULIÃO, L.; 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.
- KATAJAMAA, M.; MIETTINEN, J.; ORESIC, M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. **Bioinformatics**. v. 22, p. 634–636, 2006.
- KUKULU-KOCH, W. A.; WIDELSKI, J. Alkaloids. In: **Pharmacognosy: fundamentals, applications and strategy**. London: Academic Press, 2017. p.

163–198.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**. v. 74, p. 648–670, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.067>>

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbamaceae**. 2010. Universidade Federal de Viçosa, [s. l.], 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**. v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Biodiversity and Health**. 2015. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/biodiversity-and-health>>.

PADILHA, I. Q. M.; PEREIRA, A. V.; RODRIGUES, O. G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. do S. V. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. from northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 1, p. 45–47, 2010.

PANT, P.; PANDEY, S.; DALL, S. The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants : A Literature Review. **Chemistry & Biodiversity**. v. 18, 2021.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 4, n. May, p. 1–20, 2018.

PILON, A. C.; VIEIRA, N. C.; AMARAL, J. G.; MONTEIRO, A. F.; RICARDO, R.; SPÍNDOLA, L. S. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**. v. 44, n. 9, p. 1168–1179, 2021.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.

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

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 33, n. 5, p. 673–688, 2013.

RWANGABO, P. C.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; CORTHOUT, J.; VANDEN BERGHE, 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.

SCYNEXIS. **SCYNEXIS Announces FDA Acceptance and Priority Review of New Drug Application for Oral Ibrexafungerp for the Treatment of Vaginal Yeast Infections**. 2020. Disponível em:

<<https://www.globenewswire.com/news-release/2020/12/07/2140500/0/en/SCYNEXIS-Announces-FDA-Acceptance-and-Priority-Review-of-New-Drug-Application-for-Oral-Ibrexafungerp-for-the-Treatment-of-Vaginal-Yeast-Infections.html>>. Acesso em: 11 abr. 2022.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity in vitro.

Archives of Oral Biology. v. 76, p. 76–83, 2017.

SILVA, G. N.; MARTINS, F. R.; MATHEUS, M. E.; 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.

SILVA, M. V. T. e; GARRET, R.; SIMAS, D. L. R.; KONNO, T. U. P.; MUZITANO, M. F.; PINTO, S. C.; BARTH, T. Chemical profile of Stachytarpheta schottiana by LC-HRMS/MS dereplication and molecular networking. p. 6–10, 2021.

SILVA, T. R. D. S.; SCHAEFER, J.; SILVA, G. B. **Lantana in Flora do Brasil 2020**. 2020. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15168>>.

SIMPSON, D.; AMOS, S. Other Plant Metabolites. In: BADAL, S.; DELGODA, R. (Eds.). **Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies**. New York: Elsevier Inc., 2017. p. 267–280.

SOLIMAN, S.; ALNAJDY, D.; EL-KEBLAWY, A. A.; MOSA, K. A.; KHODER, G. Plants ' Natural Products as Alternative Promising Anti- Candida Drugs. v. 11, n. 22, p. 104–122, 2017.

SORIANO-CASTELL, D.; LIANG, Z.; MAHER, P.; CURRAIS, A. The search for anti-oxytotic/ferroptotic compounds in the plant world. **British Journal of Pharmacology**. v. 178, n. 18, p. 3611–3626, 2021.

SUNG, W. S.; LEE, D. G. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. **Pure and Applied Chemistry**. v. 82, n. 1, p. 219–226, 2010.

TU, Y. Artemisinin—A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie - International Edition**. v. 55, n. 35, p. 10210–10226, 2016.

UZCÁTEGUI, B.; ÁVILA, D.; SUÁREZ-ROCA, H.; QUINTERO, L. Investigación Clínica and antipyretic effects of Lantana trifolia Linnaeus in experimental

animals . Efecto antiinflamatorio , antinociceptivo y antipirético de *Lantana trifolia* Linnaeus en animales de. **Investigación Clínica**. v. 45, n. 4, p. 8 -13, 2004.

VALÉRIO, G. B. **Estudo dos compostos fenólicos das folhas e frutos de *Lantana trifolia* L. (Verbenaceae)**. 2018. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. 2018.

VALÉRIO G. B.; GODINHO C.C.; FREITAS T.R.; SANTIAGO M.B.; MARTINS D.O.S.; JARDIM A.C.G. et al. Dereplication of *Lantana trifolia* L. leaves and fruits by UFLC-DAD-(+)-ESI-MS/MS and its antifungal and cytotoxic activities. **Metabolomics**, v. 19, n. 8, 2023

WANG M.; CARVER J. J.; PHELAN V. V.; SANCHEZ L. M.; GARG N.; PENG Y. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

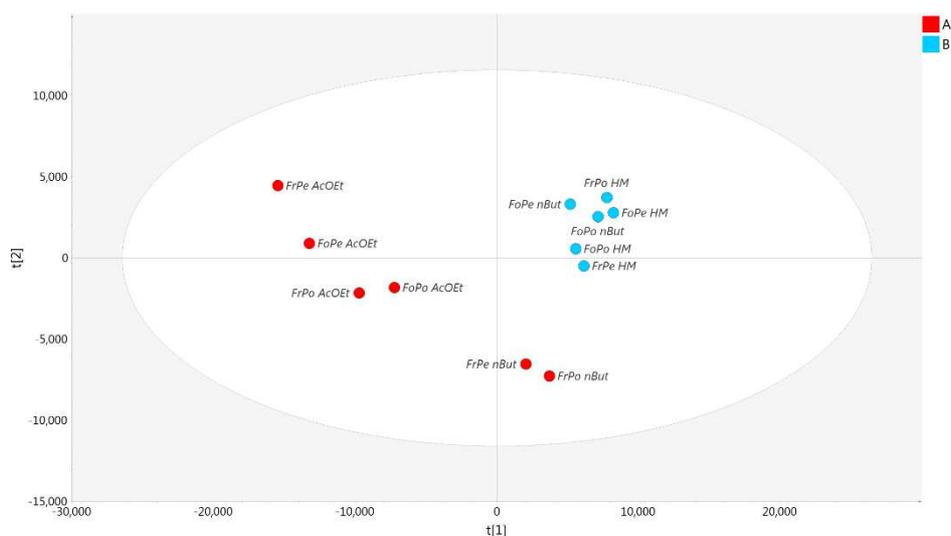
WEYRICH L.S; DUCHENE S.; SOUBRIER J.; ARRIOLA L.; LLAMAS B.; BREEN J. et al. Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. **Nature**. v. 544, n. 7650, p. 357–361, 2017.

APENDICE A – TABELAS E FIGURAS

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=d176e02f47cb4072b32f09d4f4543125> (Gaveni_POS_MZM_A2_Lib.Ric_20_02_23_0.02da_6p)

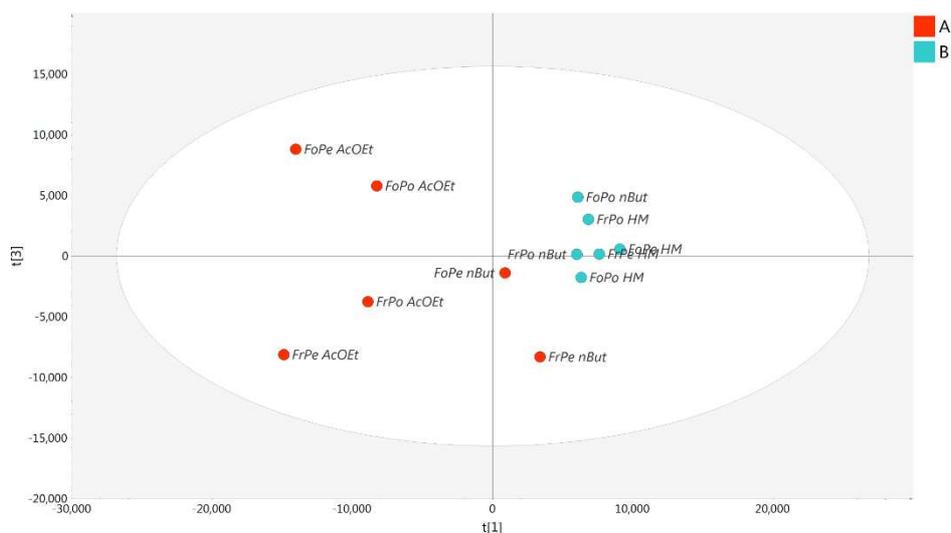
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=4f47cec2ed1a4a7bb1a11c09afaa9ae1> (Gaveni_POS_MZM_A2_Lib.Ric_20_02_23_0.02da_3p)

Figura A1 – PLS-DA atividade antifúngica contra *Candida tropicalis* (ATCC 13803).



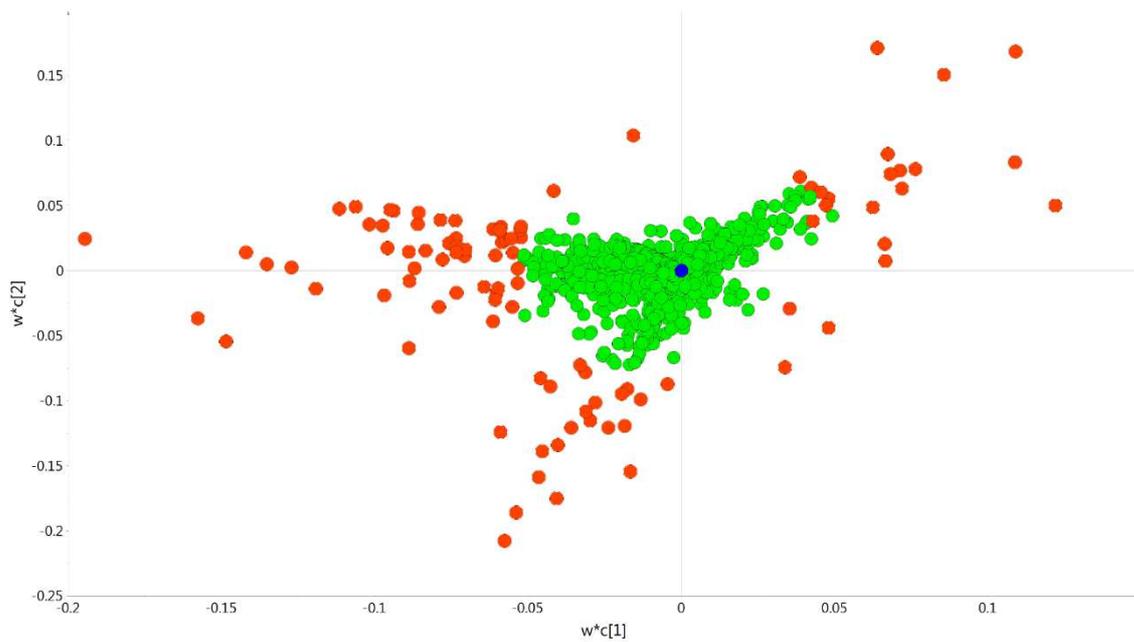
(A) classe ativa, (B) classe inativa, número de componentes, 5; $R^2X(\text{cum})$, 0.775; $R^2Y(\text{cum})$, 0.998 e $Q^2(\text{cum})$, 0.834.

Figura A2 – PLS-DA atividade antifúngica contra *Candida glabrata* (ATCC 15126).



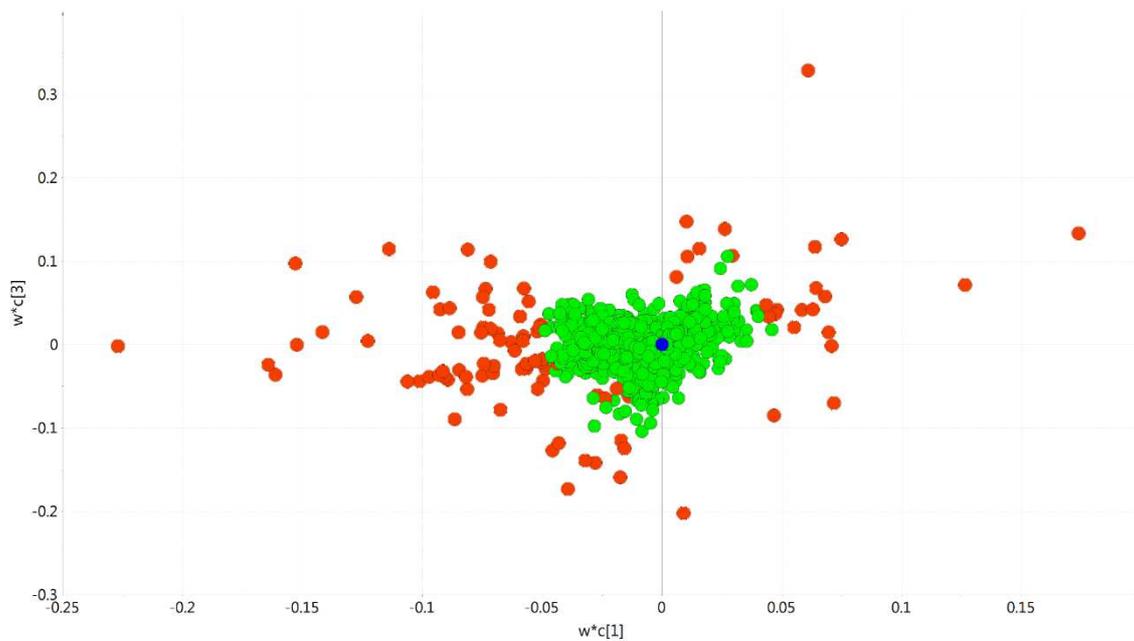
(A) classe ativa, (B) classe inativa, número de componentes, 5; $R^2X(\text{cum})$, 0.778; $R^2Y(\text{cum})$, 0.996 e $Q^2(\text{cum})$, 0.879.

Figura A3 - PLS-DA atividade antifúngica contra *Candida tropicalis* (ATCC 13803).



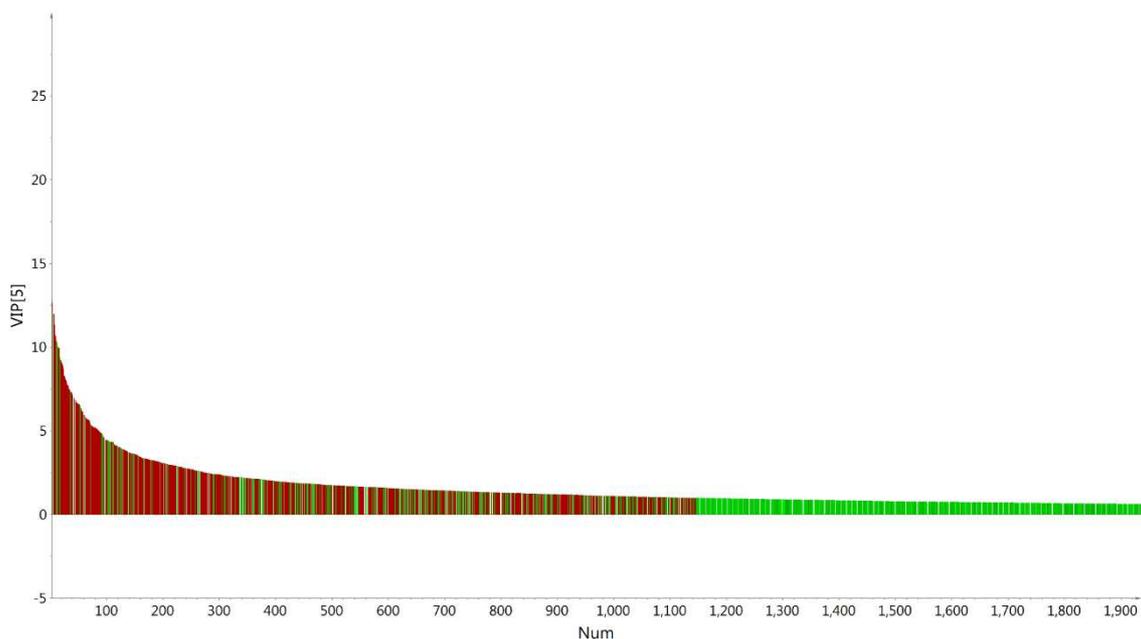
Discriminantes VIP (Vermelho), número de componentes, 5; $R^2X(\text{cum})$, 0.775; $R^2Y(\text{cum})$, 0.998 and $Q^2(\text{cum})$, 0.834.

Figura A4 - PLS-DA atividade antifúngica contra *Candida glabrata* (ATCC 15126).



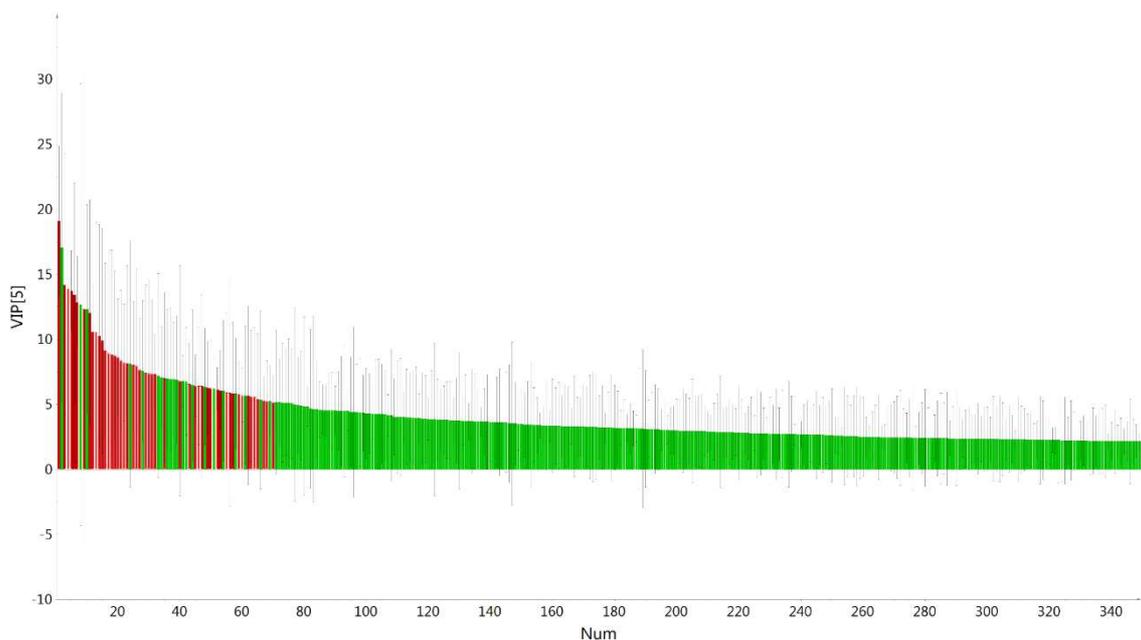
Discriminantes VIP (Vermelho), número de componentes, 5; $R^2X(\text{cum})$, 0.778; $R^2Y(\text{cum})$, 0.996 and $Q^2(\text{cum})$, 0.879.

Figura A5 - Variáveis Importantes para a Projeção (VIP) obtida através do PLS-DA, supervisionado de acordo com as frações ativas e inativas contra *Candida tropicalis* (ATCC 13803).



Discriminantes VIP (Vermelho), número de componentes 5; $R^2X(\text{cum})$, 0.775; $R^2Y(\text{cum})$, 0.998 and $Q^2(\text{cum})$, 0.834.

Figura A6 - Variáveis Importantes para a Projeção (VIP) obtida através do PLS-DA, supervisionado de acordo com as frações ativas e inativas contra *Candida glabrata* (ATCC 15126).



Discriminantes VIP (Vermelho), número de componentes, 5; $R^2X(\text{cum})$, 0.778; $R^2Y(\text{cum})$, 0.996 and $Q^2(\text{cum})$, 0.879.

Figura A7 - Representação da rede molecular filtrada de acordo com os valores de CIM contra *Candida albicans*.

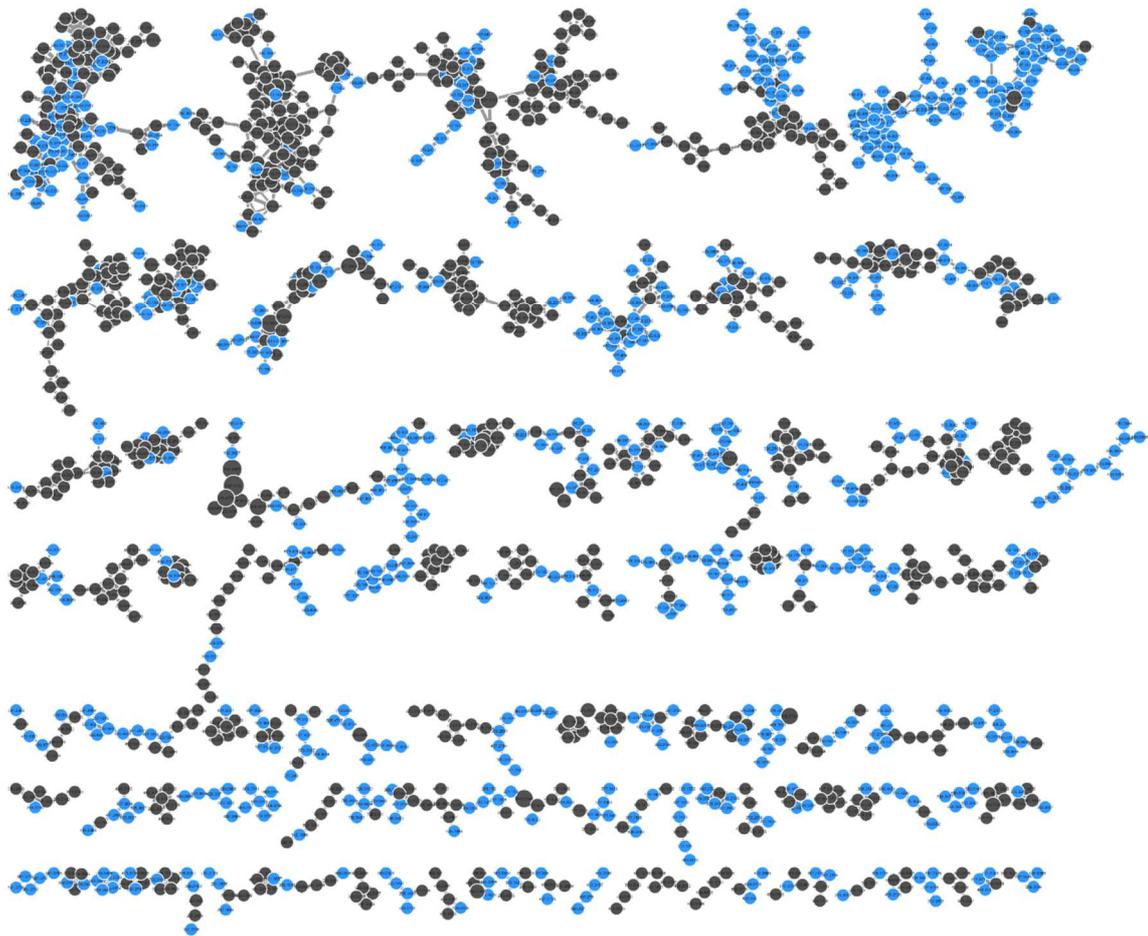


Figura A8- Representação da rede molecular filtrada de acordo com os valores de CIM contra *Candida tropicalis*

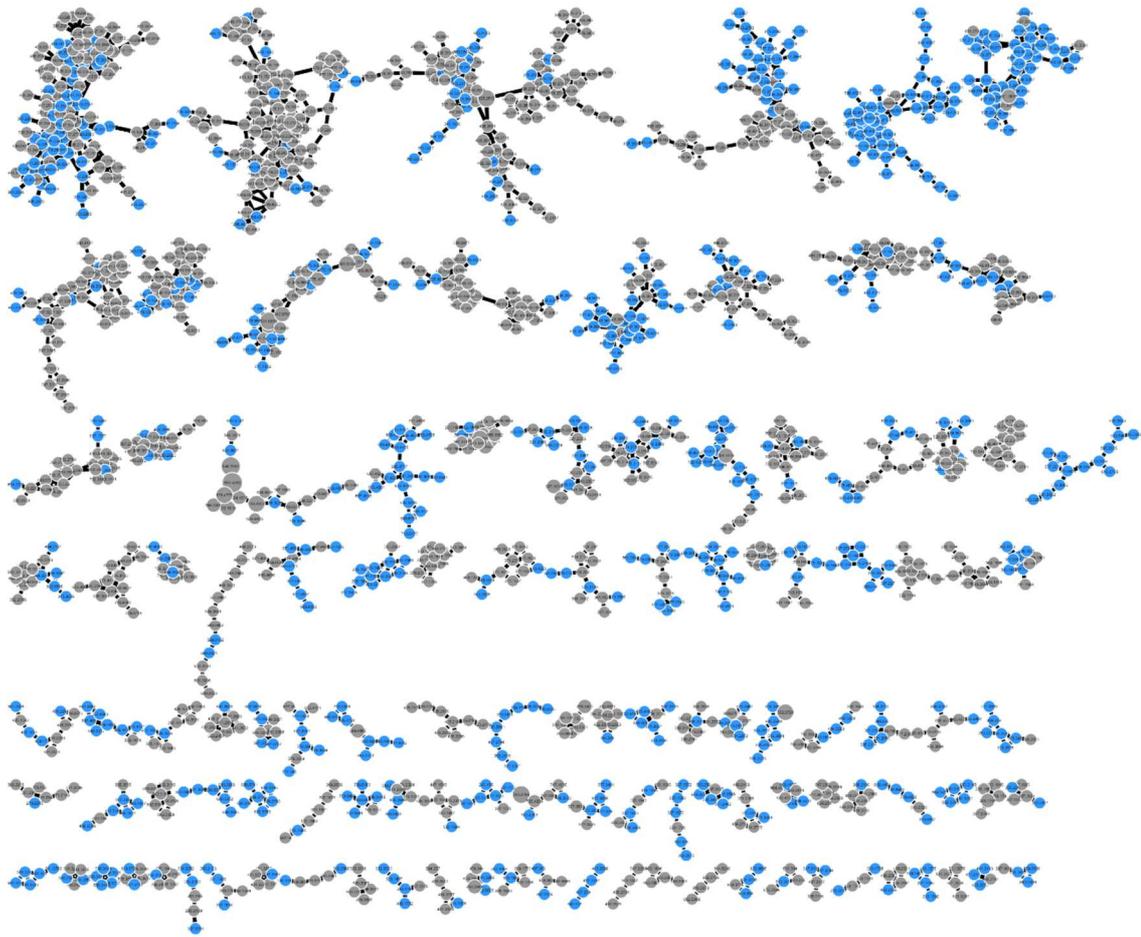


Tabela A1- 30 primeiras variáveis importantes para projeção e seus valores de coeficientes para *C. glabrata*.

Variable ID (Ion ID)	Variable ID (m/z)	Var ID (tr)	Valores VIP	Valores de coeficiente
571	331,081	22,1391	19,0837	2,96E ⁻⁰⁵
585	419,097	16,8665	14,2121	3,97E ⁻⁰⁵
558	361,092	21,9352	13,8825	2,64E ⁻⁰⁵
635	347,076	18,7315	13,7627	3,03E ⁻⁰⁵
1505	321,207	35,5116	13,4415	1,22E ⁻⁰⁵
722	345,097	26,1893	12,8692	1,43E ⁻⁰⁵
861	307,19	27,5808	12,3433	4,47E ⁻⁰⁵
1703	704,444	55,486	12,0368	1,48E ⁻⁰⁵
628	287,056	18,4525	10,5909	2,30E ⁻⁰⁵
1980	308,194	27,582	10,5463	3,11E ⁻⁰⁶
864	590,424	47,4782	10,2746	2,48E ⁻⁰⁶
862	634,45	47,3043	9,9057	1,98E ⁻⁰⁶
890	546,398	47,6585	9,14543	3,44E ⁻⁰⁶
880	639,405	47,2967	8,94126	1,39E ⁻⁰⁶
870	678,477	47,1315	8,83619	1,67E ⁻⁰⁶
907	551,354	47,6636	8,76536	3,02E ⁻⁰⁶
495	375,108	19,6451	8,61803	3,15E ⁻⁰⁵
1044	577,351	35,4568	8,39608	7,38E ⁻⁰⁶
943	507,329	47,8304	8,21567	5,09E ⁻⁰⁶
882	683,432	47,1198	8,14738	1,21E ⁻⁰⁶
1483	635,355	27,5827	8,04982	1,35E ⁻⁰⁵
848	271,061	23,3059	7,98253	3,99E ⁻⁰⁶
1498	291,195	35,2702	7,68221	6,77E ⁻⁰⁶
889	722,503	46,9476	7,41782	1,61E ⁻⁰⁶
345	278,123	2,85088	7,39275	9,69E ⁻⁰⁸
1091	621,306	62,3659	7,35355	1,49E ⁻⁰⁵
852	361,093	23,4624	7,3325	7,20E ⁻⁰⁶
897	727,458	46,956	7,02004	1,18E ⁻⁰⁶
582	422,253	15,6248	6,80388	2,12E ⁻⁰⁵
1078	463,301	47,9513	6,56429	4,41E ⁻⁰⁶

Tabela A2 - 30 primeiras variáveis importantes para projeção e seus valores de coeficientes para *C. tropicalis*

Variable ID (Ion number)	Variable ID (m/z)	Var ID (t _R)	Valores VIP	Valores de coeficiente
571	331,08133	22,139	16,5578	1,67E ⁻⁰⁵
1505	321,20686	35,512	12,9551	2,09E ⁻⁰⁵
1703	704,44418	55,486	12,687	1,47E ⁻⁰⁵
722	345,09732	26,189	12,0075	1,17E ⁻⁰⁵
429	339,10830	18,907	11,9787	4,77E ⁻⁰⁵
558	361,09198	21,935	11,3465	1,49E ⁻⁰⁵
425	485,16539	18,907	10,7595	4,25E ⁻⁰⁵
635	347,07630	18,731	10,6671	1,41E ⁻⁰⁵
864	590,42387	47,478	10,4133	5,25E ⁻⁰⁶
862	634,45029	47,304	10,0554	4,84E ⁻⁰⁶
357	355,10228	9,232	9,9608	2,91E ⁻⁰⁵
1980	308,19366	27,582	9,95903	1,48E ⁻⁰⁵
890	546,39788	47,659	9,24568	5,19E ⁻⁰⁶
355	447,09204	16,492	9,16307	2,86E ⁻⁰⁵
880	639,40525	47,297	9,08544	3,90E ⁻⁰⁶
870	678,47736	47,132	8,97543	4,07E ⁻⁰⁶
907	551,35392	47,664	8,86116	4,77E ⁻⁰⁶
350	342,13905	2,589	8,73	3,01E ⁻⁰⁵
943	507,32881	47,830	8,29172	5,80E ⁻⁰⁶
882	683,43232	47,120	8,28189	3,31E ⁻⁰⁶
430	339,10704	16,395	8,11835	3,18E ⁻⁰⁵
848	271,06150	23,306	8,08899	5,39E ⁻⁰⁶
1044	577,35118	35,457	7,98798	1,21E ⁻⁰⁵
591	337,09205	11,586	7,77555	2,81E ⁻⁰⁵
628	287,05569	18,453	7,76853	8,44E ⁻⁰⁶
415	339,10714	11,250	7,74461	2,48E ⁻⁰⁵
1091	621,30616	62,366	7,55794	1,48E ⁻⁰⁵
889	722,50325	46,948	7,53255	3,27E ⁻⁰⁶
1768	335,22104	38,514	7,4817	6,32E ⁻⁰⁶
1498	291,19471	35,270	7,32529	9,69E ⁻⁰⁶

Tabela A3 - 30 primeiras variáveis importantes para projeção e seus valores de coeficientes para *C. albicans*.

Variable ID (Ion number)	Variable ID (m/z)	Var ID (t _R)	Valores VIP	Valores de coeficiente
571	331,081	22,1391	15,0012	2,11E ⁻⁰⁵
1703	704,444	55,486	11,4687	2,08E ⁻⁰⁵
429	339,108	18,9074	11,3248	4,86E ⁻⁰⁵
864	590,424	47,4782	11,2848	6,00E ⁻⁰⁶
722	345,097	26,1893	11,1504	1,40E ⁻⁰⁵
862	634,45	47,3043	10,9405	5,73E ⁻⁰⁶
558	361,092	21,9352	10,236	1,60E ⁻⁰⁵
425	485,165	18,9074	10,1725	4,34E ⁻⁰⁵
357	355,102	9,23193	9,99452	3,19E ⁻⁰⁵
890	546,398	47,6585	9,91669	5,65E ⁻⁰⁶
880	639,405	47,2967	9,88458	4,77E ⁻⁰⁶
870	678,477	47,1315	9,84562	5,31E ⁻⁰⁶
907	551,354	47,6636	9,51219	5,21E ⁻⁰⁶
635	347,076	18,7315	9,41554	1,28E ⁻⁰⁵
355	447,092	16,492	9,26217	3,06E ⁻⁰⁵
882	683,432	47,1198	9,09952	4,52E ⁻⁰⁶
848	271,061	23,3059	9,03937	6,80E ⁻⁰⁶
354	471,15	14,4565	8,81354	1,84E ⁻⁰⁵
943	507,329	47,8304	8,65238	5,98E ⁻⁰⁶
889	722,503	46,9476	8,28702	4,44E ⁻⁰⁶
350	342,139	2,58903	7,95263	2,88E ⁻⁰⁵
1980	308,194	27,582	7,90374	8,12E ⁻⁰⁶
401	625,212	15,3182	7,85346	4,90E ⁻⁰⁶
897	727,458	46,956	7,84914	4,01E ⁻⁰⁶
415	339,107	11,2503	7,83667	2,75E ⁻⁰⁵
1768	335,221	38,5137	7,79126	2,24E ⁻⁰⁵
591	337,092	11,5858	7,59212	3,06E ⁻⁰⁵
852	361,093	23,4624	7,5369	1,04E ⁻⁰⁵
628	287,056	18,4525	6,90405	6,48E ⁻⁰⁷
1078	463,301	47,9513	6,84345	5,26E ⁻⁰⁶

Tabela A4 - Os códigos representam os nomes, tipo de fração e local de coleta da planta,

Fração	Parte da planta	Local	Solvente
FoPo Hex ^a	Folhas	Pontal	Hexano
FoPo AcOEt ^a			Acetato de etila
FoPo <i>n</i> But ^a			<i>n</i> -butanol
FoPo HM ^a	Frutos	Pontal	Hidrometanólica
FrPo Hex ^a			Hexano
FrPo AcOEt ^a			Acetato de etila
FrPo <i>n</i> But ^a	Folhas	Peirópolis	<i>n</i> -butanol
FrPo HM ^a			Hidrometanólica
FoPe Hex ^b			Hexano
FoPe Hex C2 ^c	Folhas	Peirópolis	Hexano
FoPe Hex C3 ^d			Hexano
FoPe AcOEt ^b			Acetato de etila
FoPe AcOEt C2 ^c	Folhas	Peirópolis	Acetato de etila
FoPe AcOEt C3 ^d			Acetato de etila
FoPe <i>n</i> But ^b			<i>n</i> -butanol
FoPe <i>n</i> But C2 ^c	Frutos	Peirópolis	<i>n</i> -butanol
FoPe <i>n</i> But C3 ^d			<i>n</i> -butanol
FoPe HM ^b			Hidrometanólica
FoPe HM C2 ^c	Frutos	Peirópolis	Hidrometanólica
FoPe HM C3 ^d			Hidrometanólica
FrPe Hex ^b			Hexano
FrPe Hex C2 ^c	Frutos	Peirópolis	Hexano
FrPe Hex C3 ^d			Hexano
FrPe AcOEt ^b			Acetato de etila
FrPe AcOEt C2 ^c	Frutos	Peirópolis	Acetato de etila
FrPe AcOEt C3 ^d			Acetato de etila
FrPe <i>n</i> But ^b			<i>n</i> -butanol
FrPe <i>n</i> But C2 ^c	Frutos	Peirópolis	<i>n</i> -butanol
FrPe <i>n</i> But C3 ^d			<i>n</i> -butanol
FrPe HM ^b			Hidrometanólica
FrPe HM C2 ^c	Frutos	Peirópolis	Hidrometanólica
FrPe HM C3 ^d			Hidrometanólica

^a Pontal/SP coleta 22/12/15. ^{b,c e d}Peirópolis/MG, coletas ^b16/11/15, ^c09/12/18, ^d31/03/19.

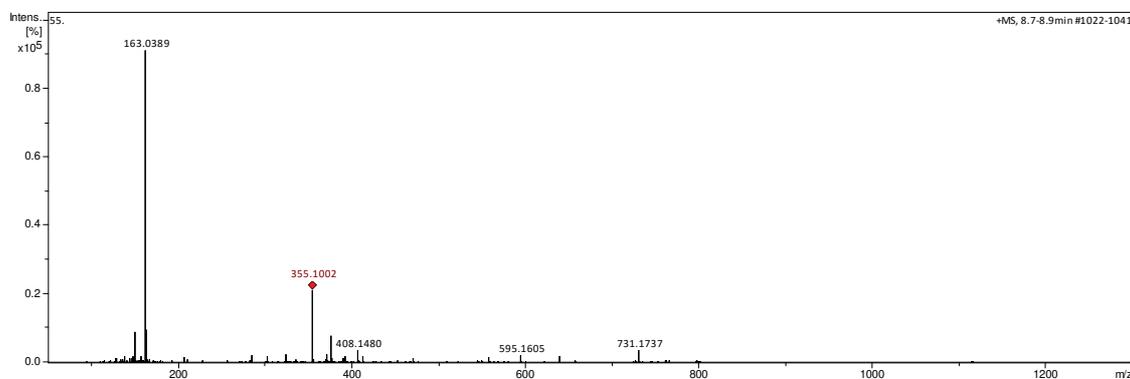
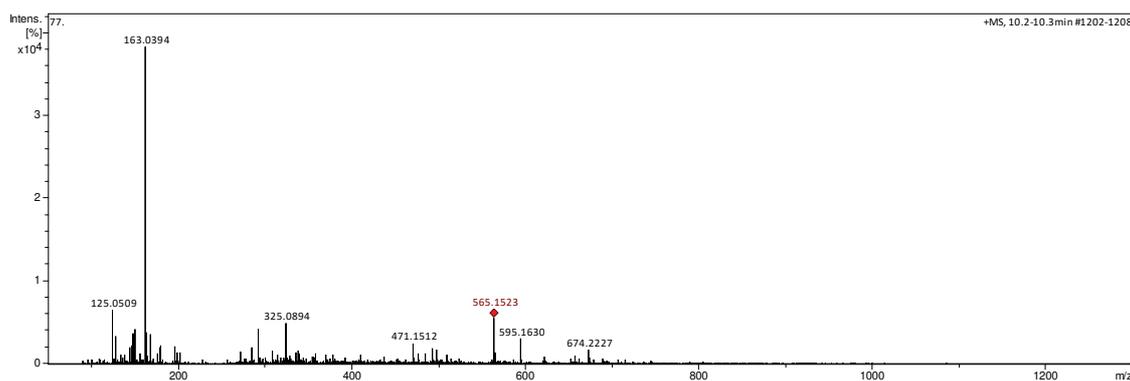
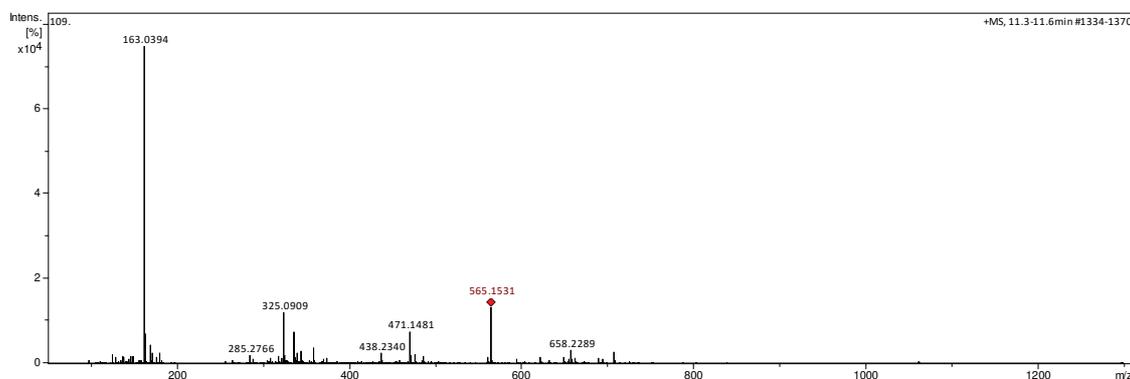
APÊNDICE B – ESPECTROS EM DOS COMPOSTOS ANOTADOS**Figura B1** - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,8 min (composto **53b**) FrPo AcOEt.**Figura B2** - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 10,2 min (composto **56a**) FrPo AcOEt.**Figura B4** - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,5 min (composto **56b**) FrPo AcOEt.

Figura B5 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 11,1 min (composto 58) FrPo AcOEt.

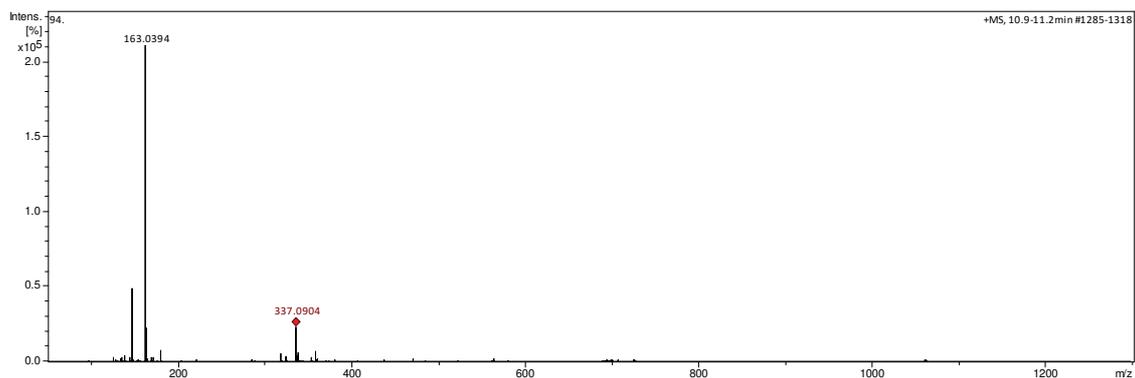


Figura B6 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 12,2 min (composto 60) FrPo AcOEt.

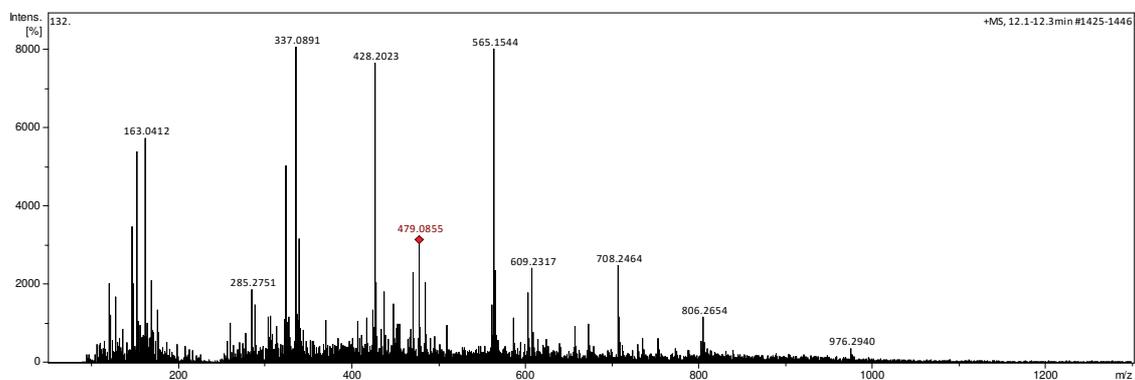


Figura B7 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 12,6 min (composto 61a) FrPo AcOEt.

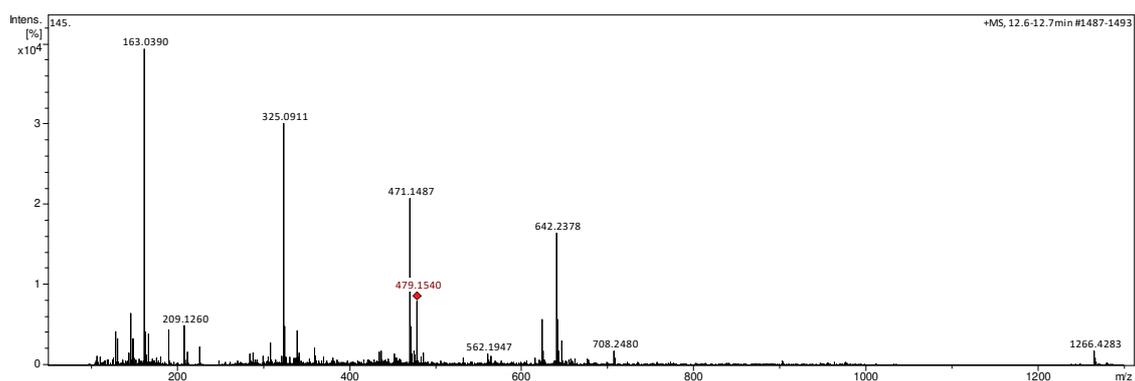


Figura B8 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 15,0 min (composto 61b) FrPo AcOEt.

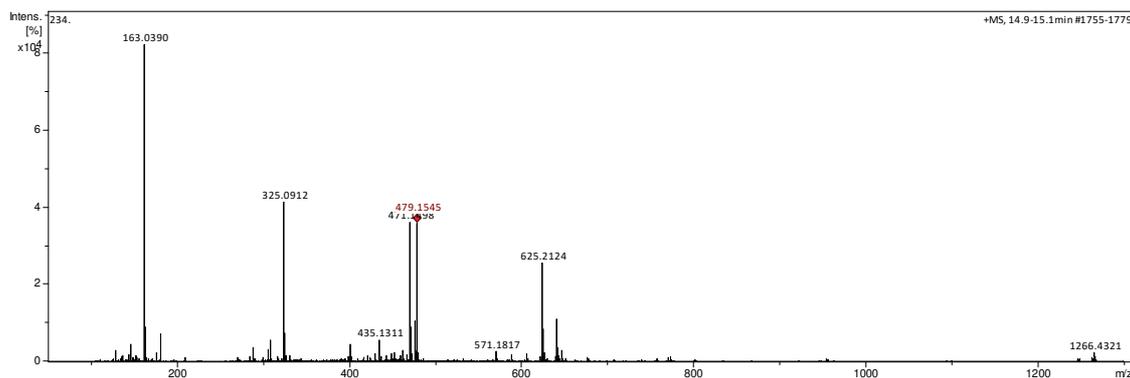


Figura B9 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 45b) FrPo AcOEt.

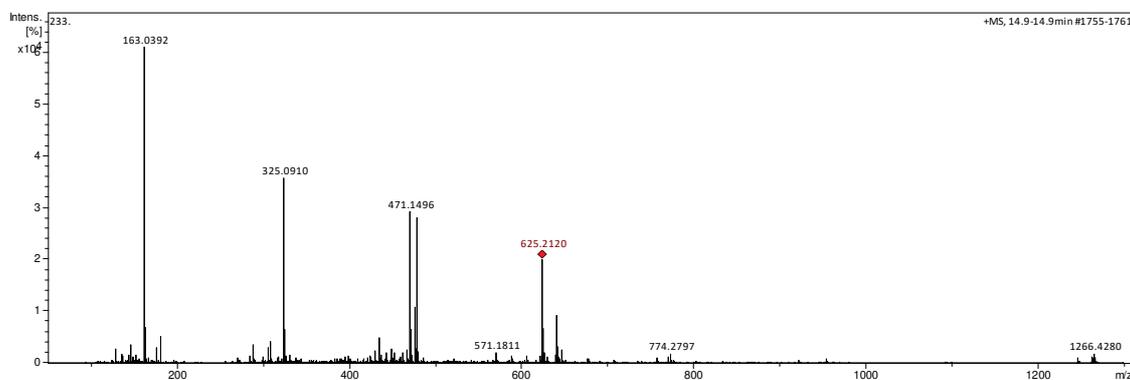


Figura B10 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 13,5 min (composto 64) FrPo AcOEt.

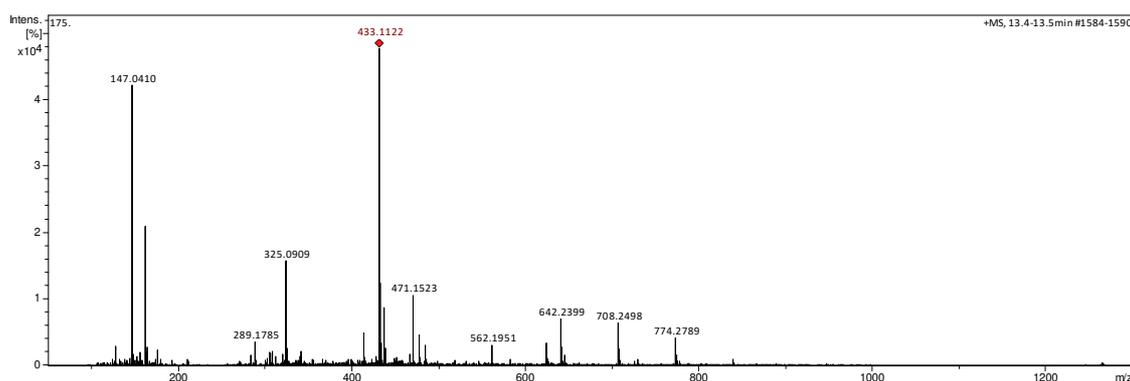


Figura B11 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 13.8 min (composto 45a) FrPo AcOEt.

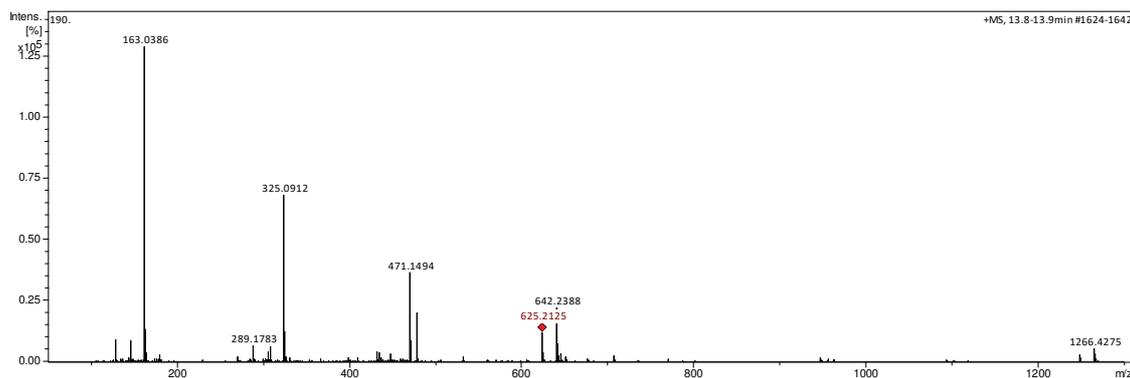


Figura B12 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 15,4 min (composto 66) FrPo AcOEt.

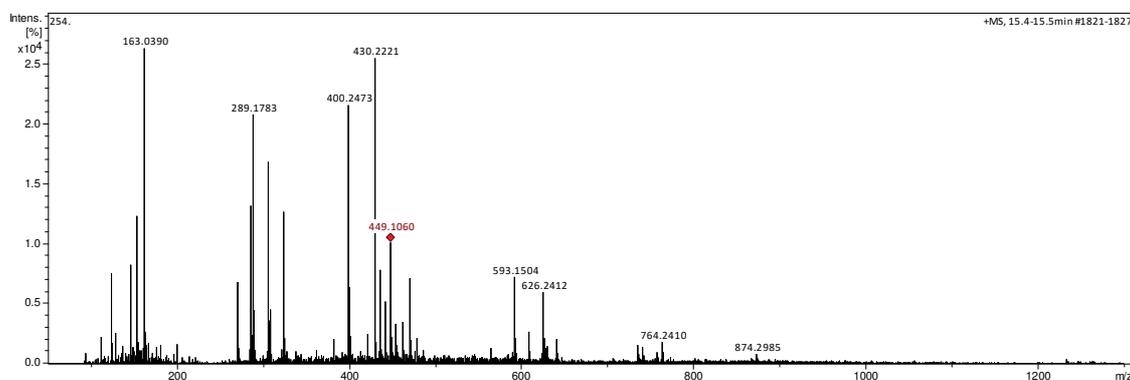


Figura B13 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 15,9 min (composto 67) FrPo AcOEt.

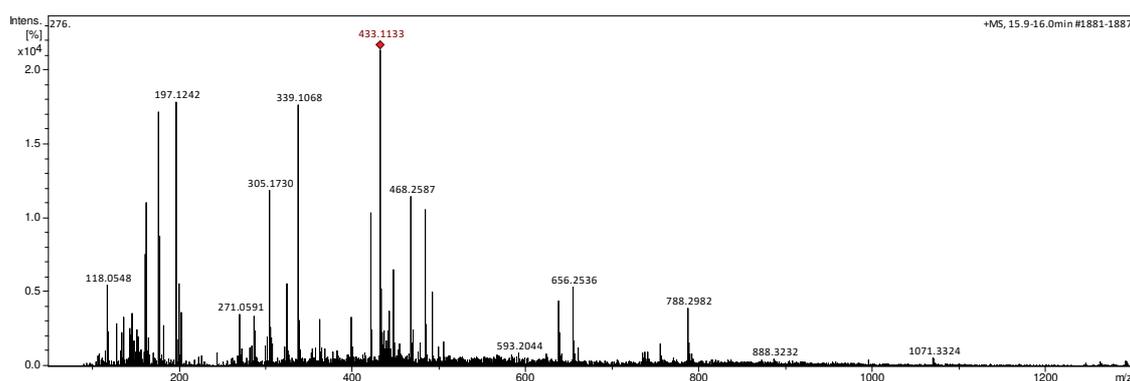


Figura B14 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 16,0 min (composto 68) FrPo AcOEt.

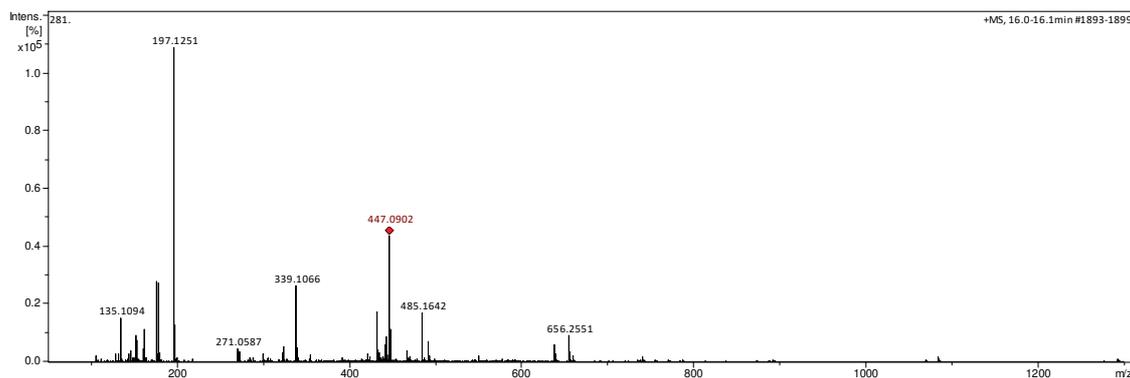


Figura B15 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 69) FrPo AcOEt.

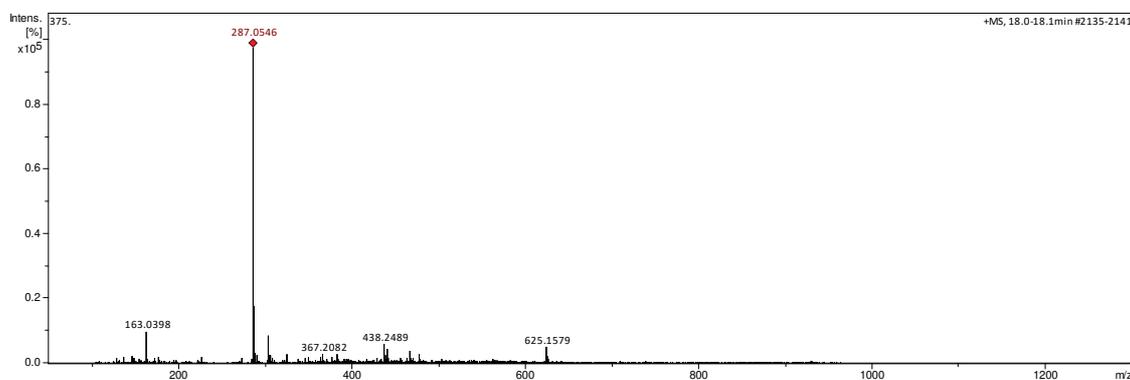


Figura B16 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,3 min (composto 70) FrPo AcOEt.

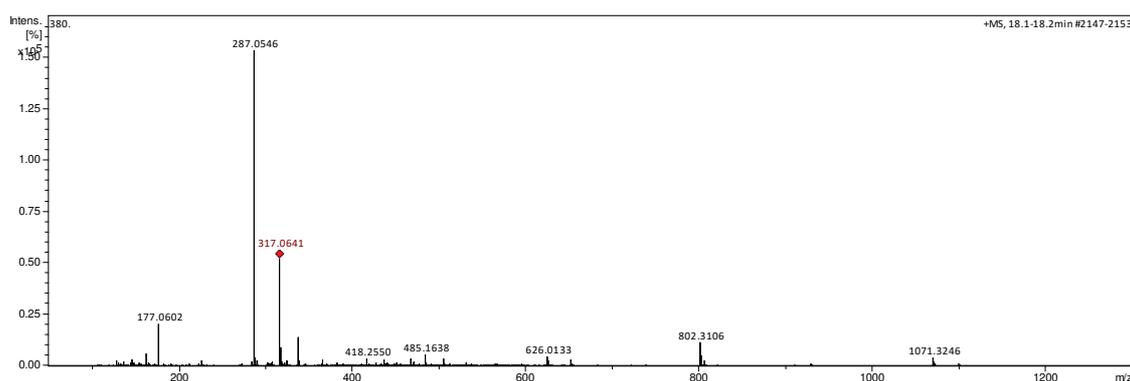


Figura B17 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,3 min (composto 46) FrPo AcOEt.

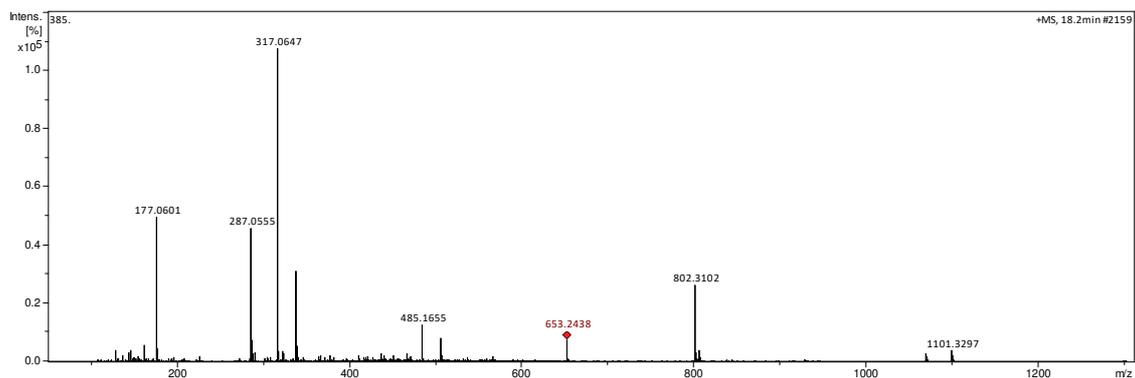


Figura B18 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 19,3 min (composto 71) FrPo AcOEt.

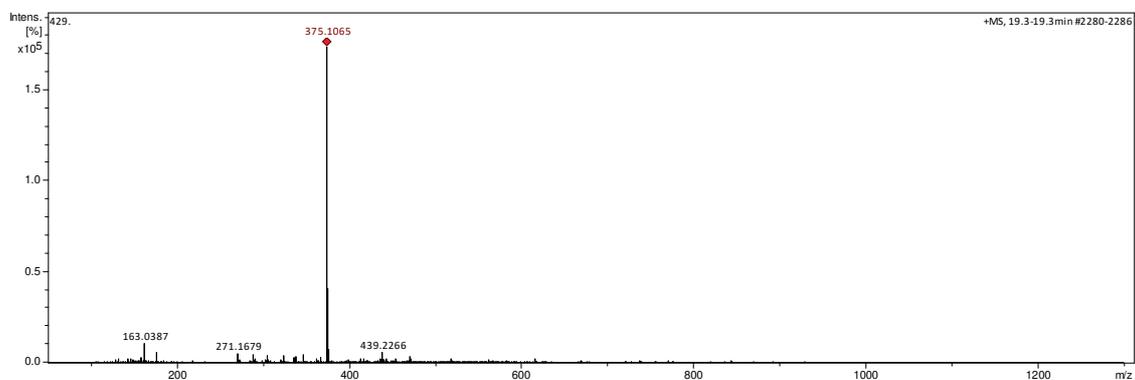


Figura B19 - EM-ESI-(+) of the peak at retention time (Rt) 19,4 min (composto 72) FrPo AcOEt.

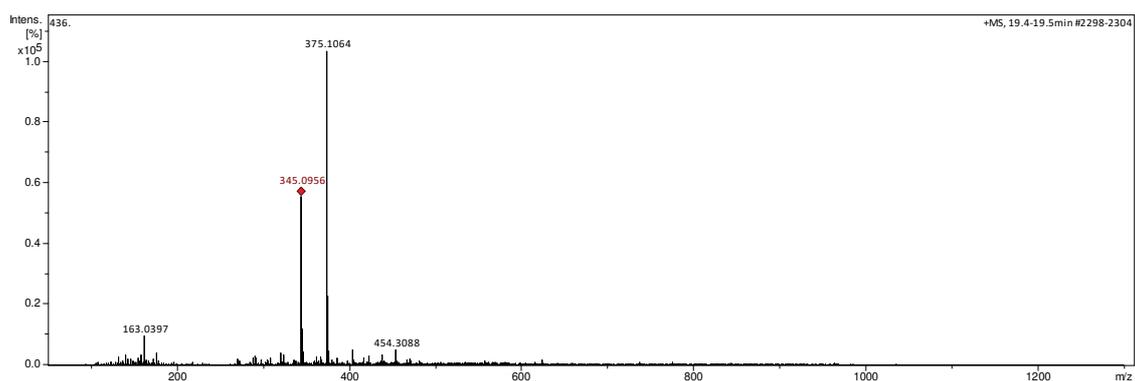


Figura B20 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 20,2 min (composto 73) FrPo AcOEt.

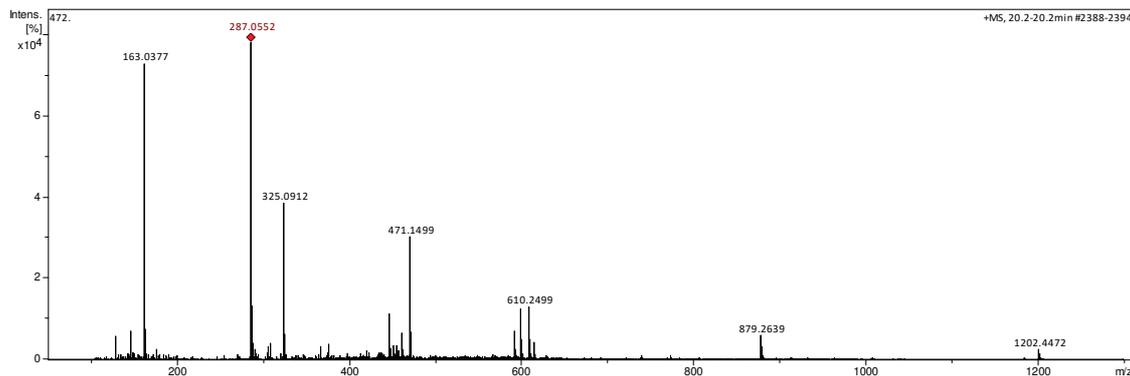


Figura B21 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 20,6 min (composto 74) FrPo AcOEt.

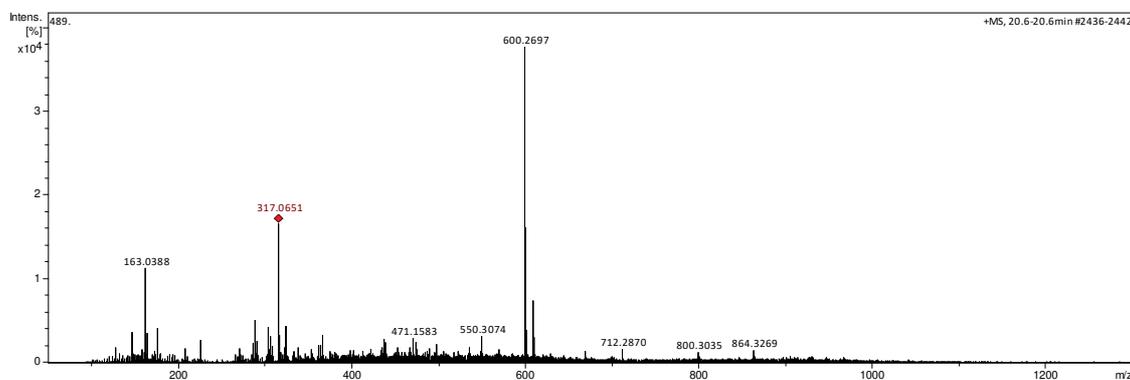


Figura B22 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 20,9 min (composto 75) FrPo AcOEt.

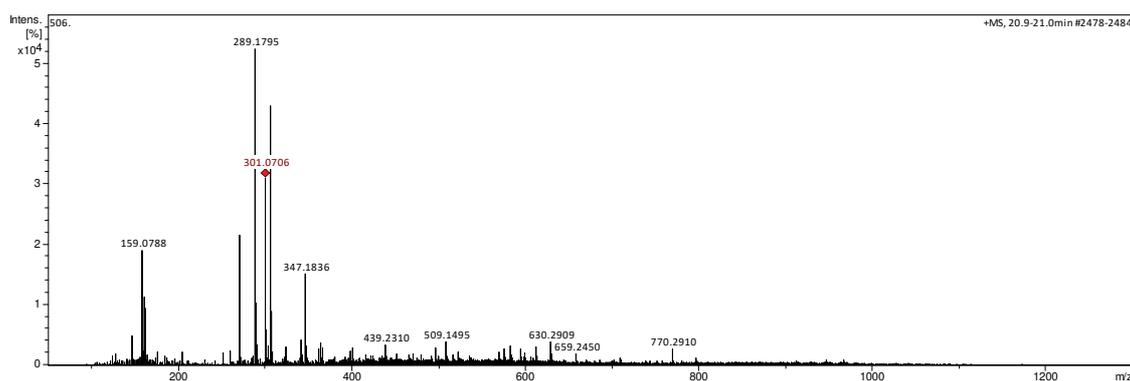


Figura B23 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 21,7 min (composto 76) FrPo AcOEt.

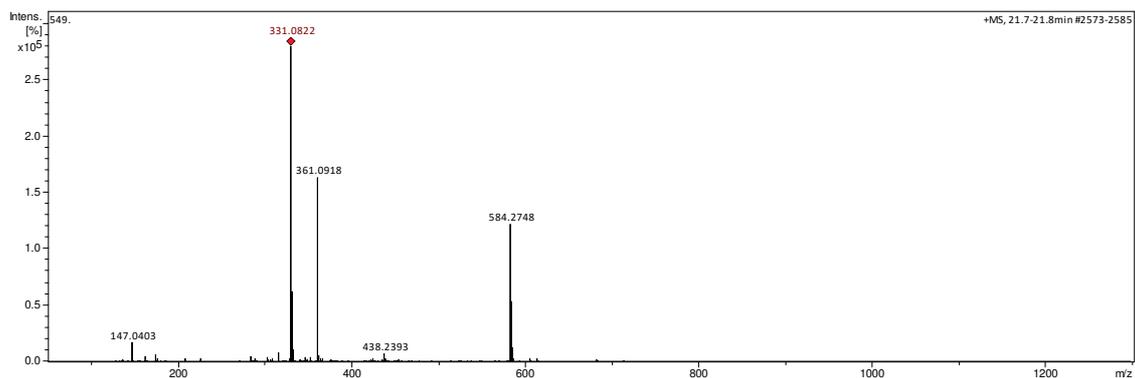


Figura B24 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 23,1 min (composto 77) FrPo AcOEt.

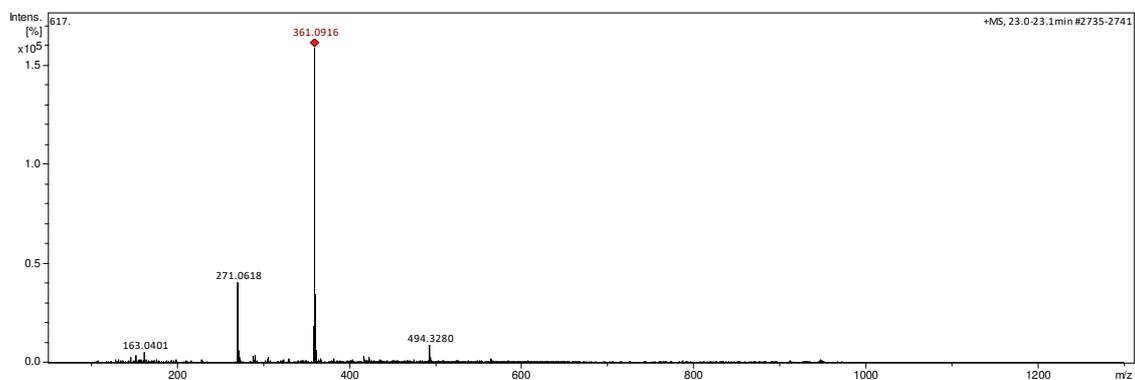


Figura B25 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 31,4 min (composto 29) FrPo AcOEt.

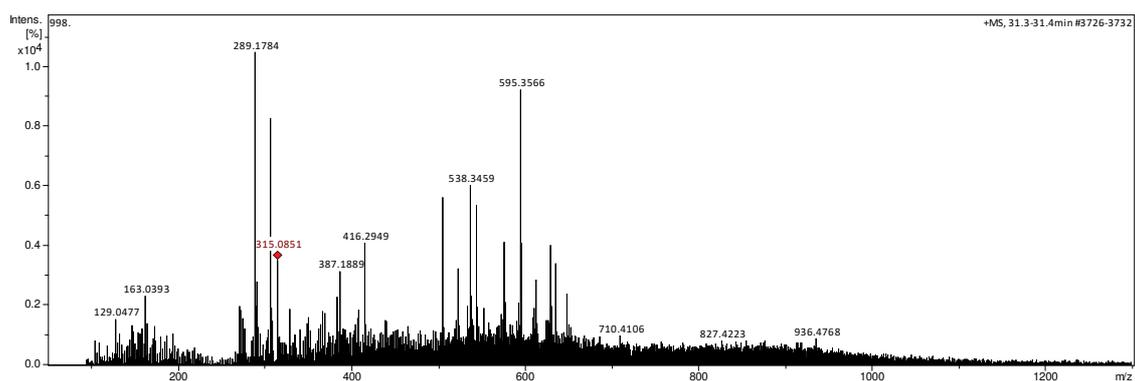


Figura B26 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,6 min (composto **53b**) FrPe AcOEt.

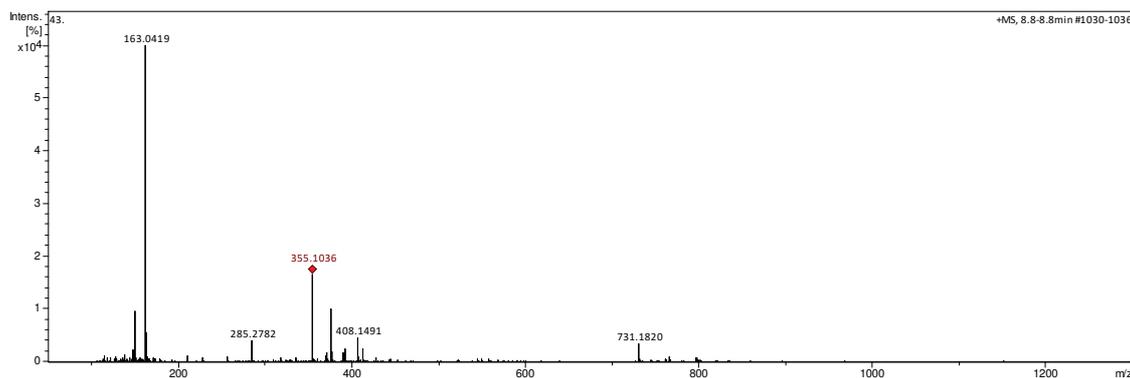


Figura B27 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,7 min (composto **56b**) FrPe AcOEt.

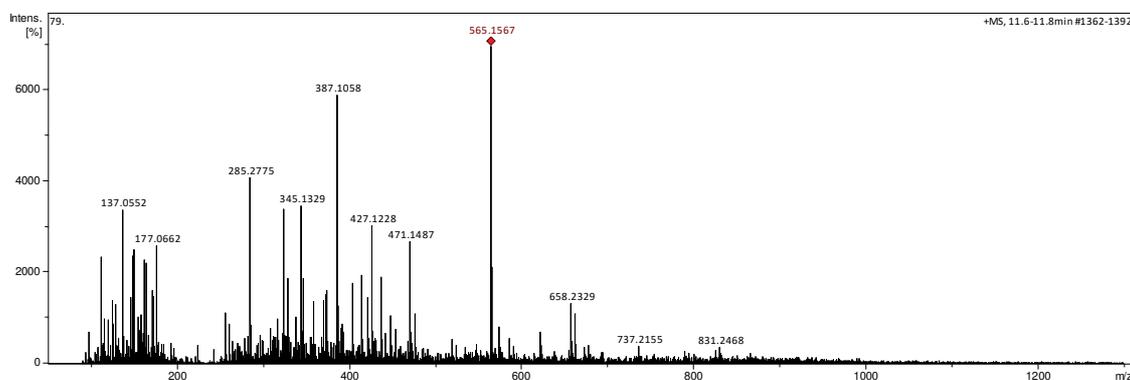


Figura B28 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 10,7 min (composto **5**) FrPe AcOEt.

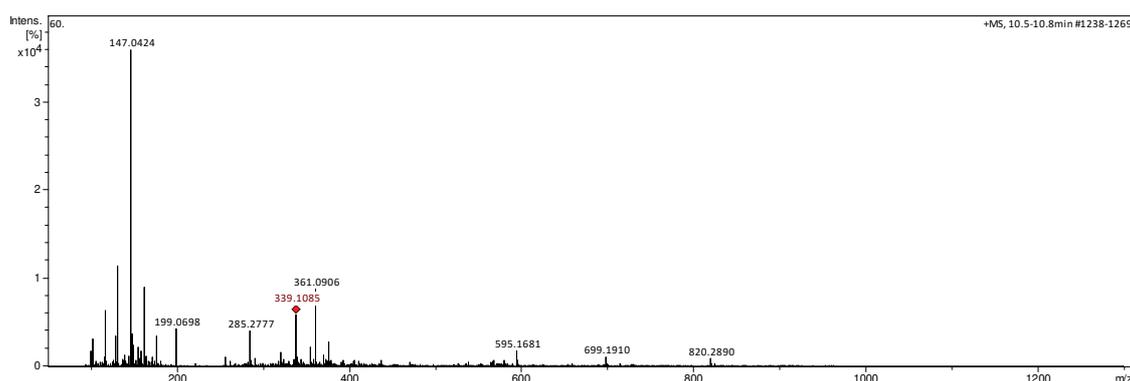


Figura B29 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 11,0 min (composto 58) FrPe AcOEt.

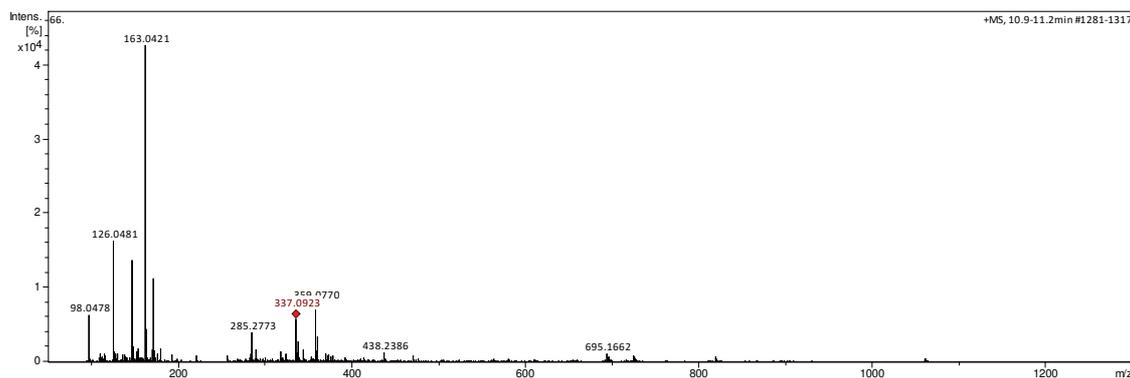


Figura B30 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 12,2 min (composto 60) FrPe AcOEt.

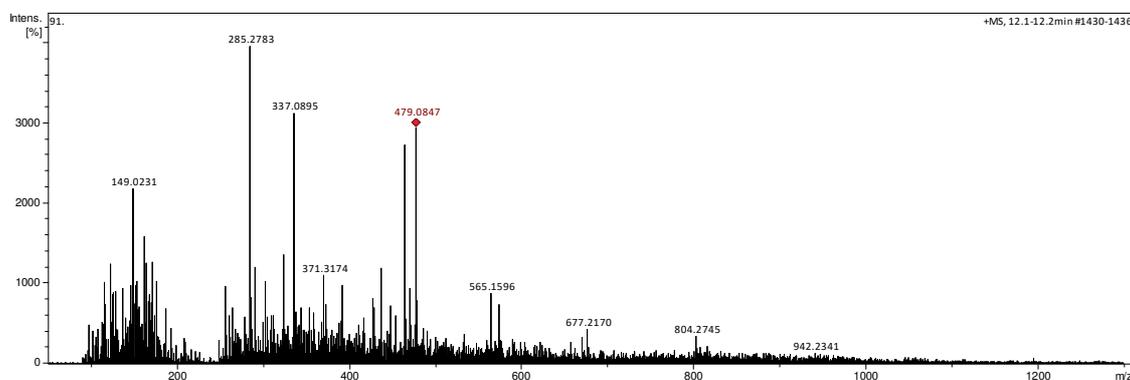


Figura B31 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 12,9 min (composto 61a) FrPe AcOEt.

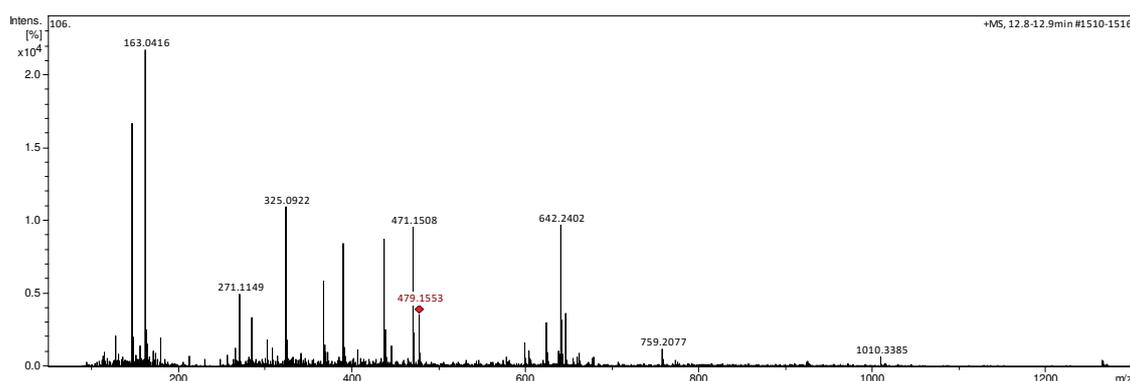


Figura B32 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 15,0 min (composto 61b) FrPe AcOEt.

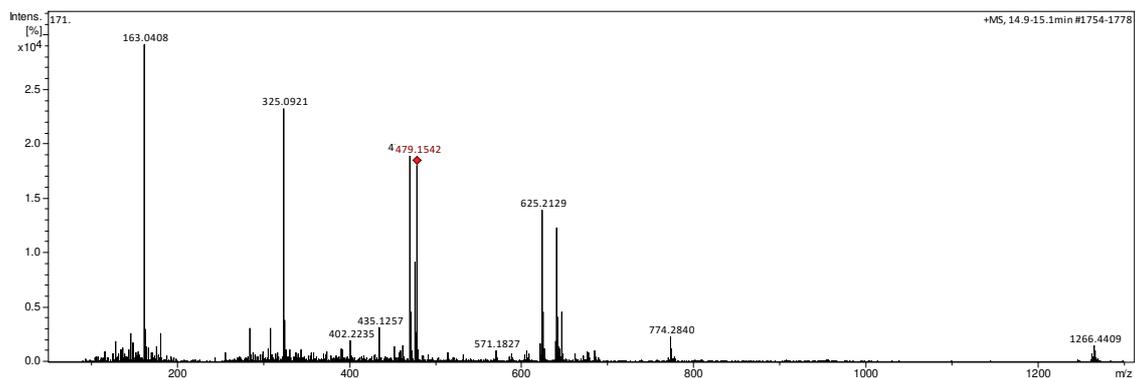


Figura B33 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 15,0 min (composto 45b) FrPe AcOEt fração

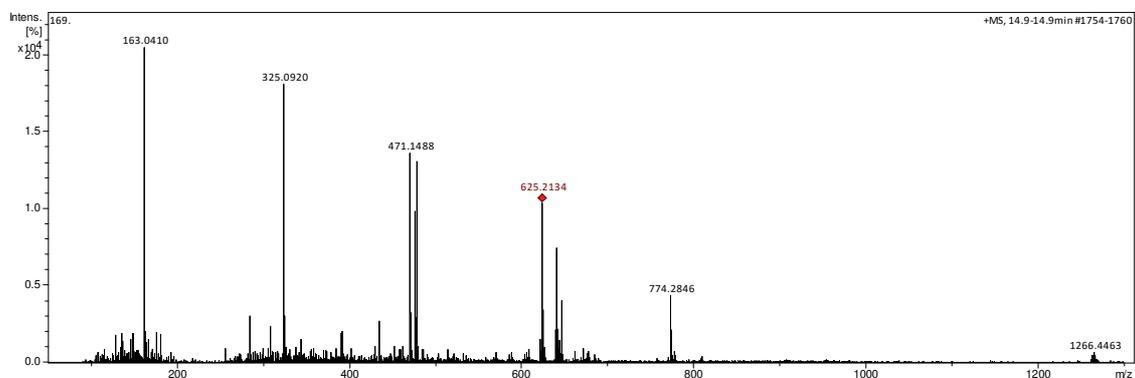


Figura B34 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 12,9 min (composto 62) FrPe AcOEt.

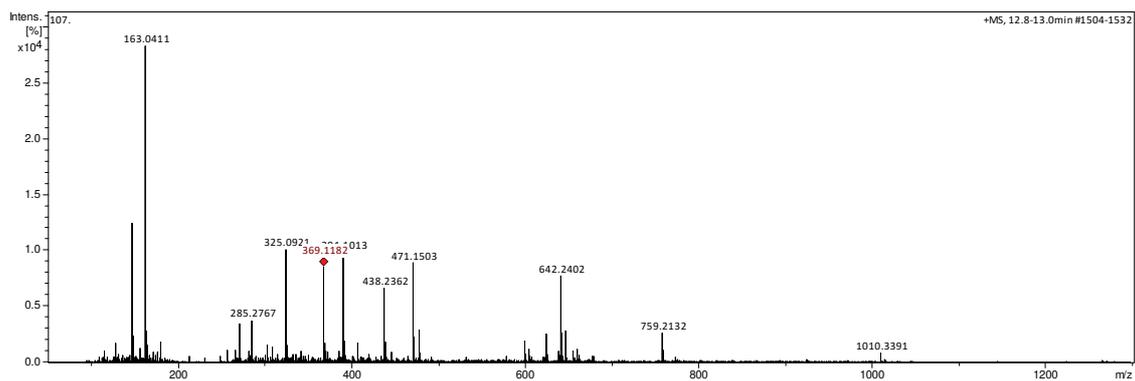


Figura B35 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,8 min (composto 45a) FrPe AcOEt.

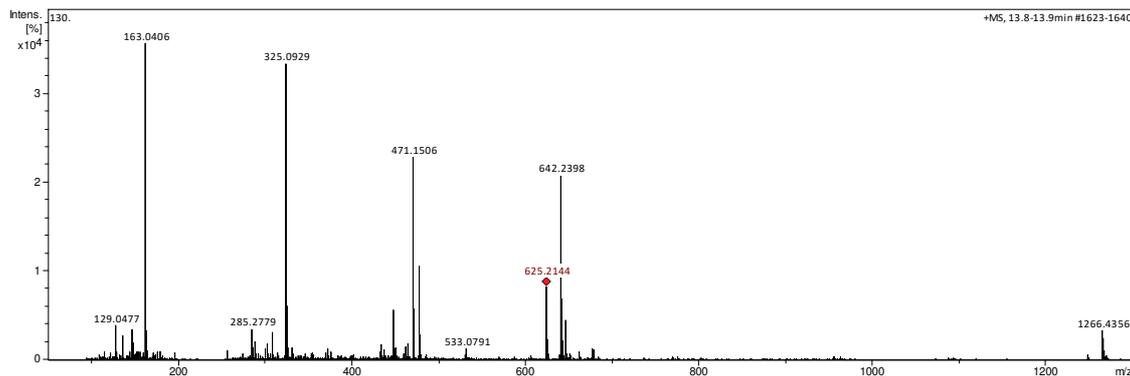


Figura B36 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 15,9 min (composto 66) FrPe AcOEt.

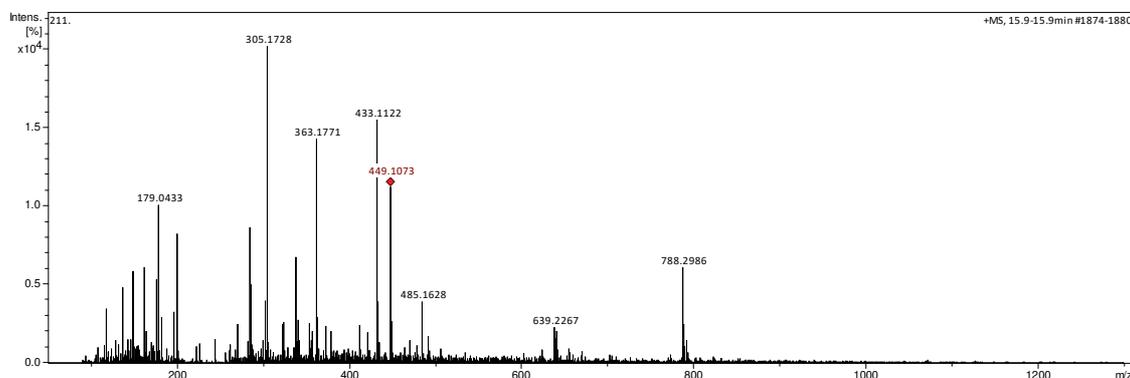


Figura B37 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 15,9 min (composto 67) FrPe AcOEt.

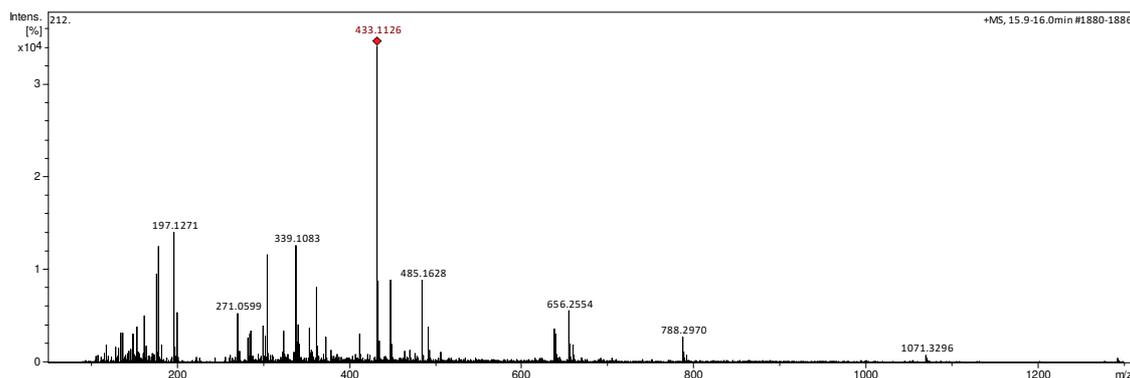


Figura B38 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 16,1 min (composto 68) FrPe AcOEt.

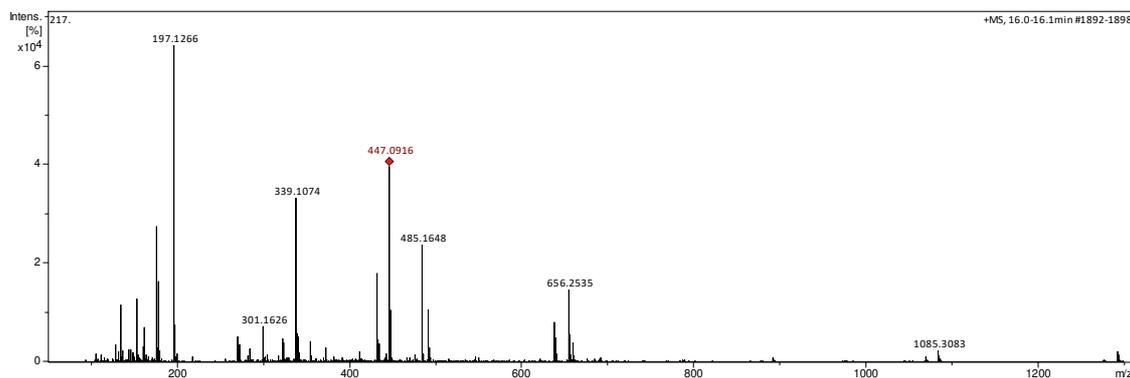


Figura B39 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 69) FrPe AcOEt.

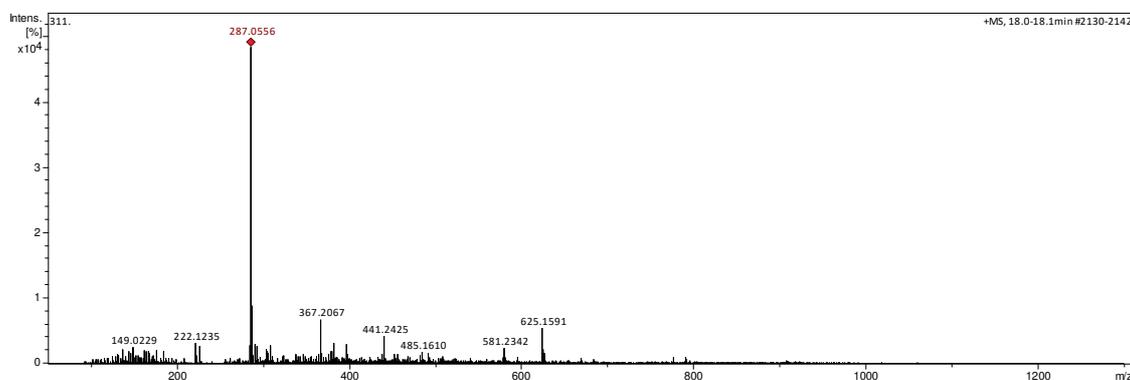


Figura B40 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,2 min (composto 70) FrPe AcOEt.

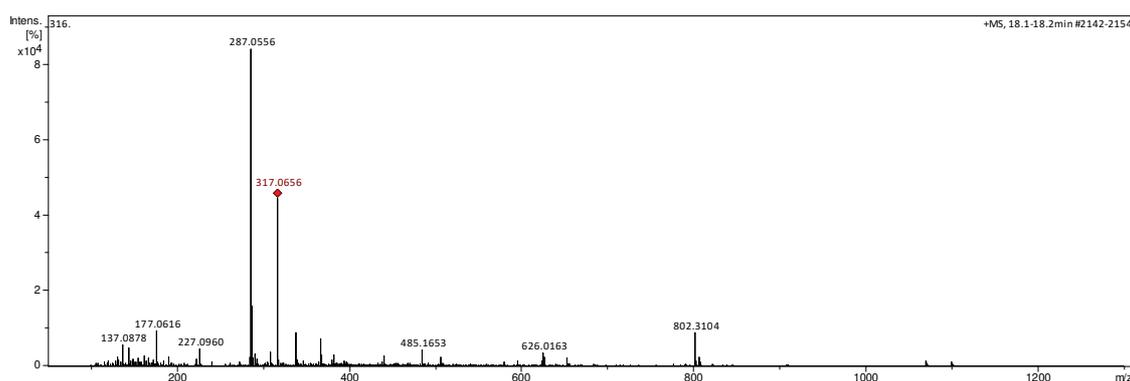


Figura B41 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,3 min (composto 46) FrPe AcOEt.

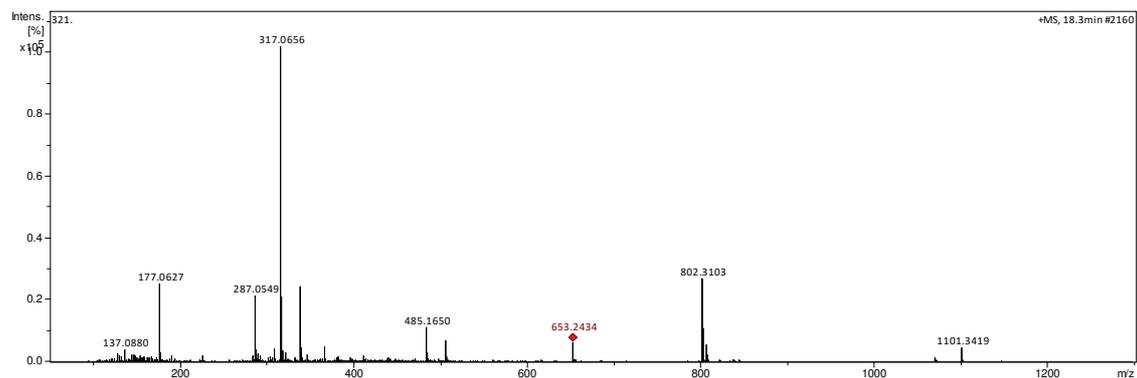


Figura B42 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 19,3 min (composto 71) FrPe AcOEt.

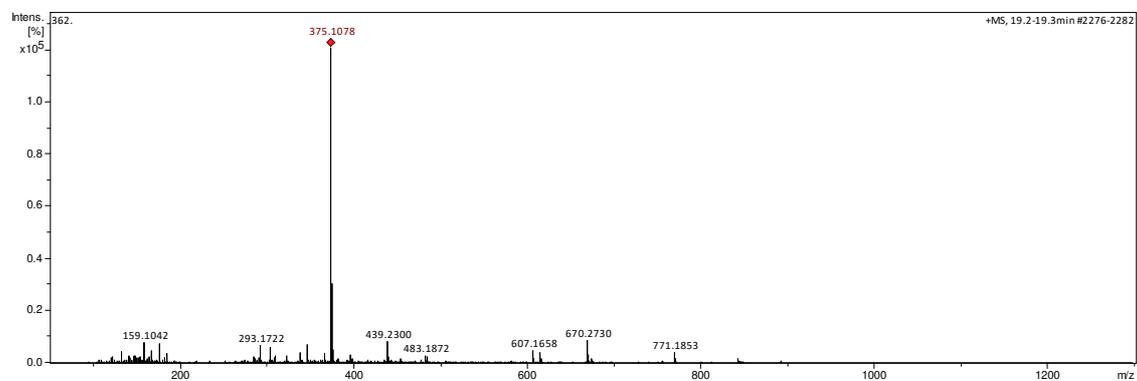


Figura B43 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 19,4 min (composto 72) FrPe AcOEt.

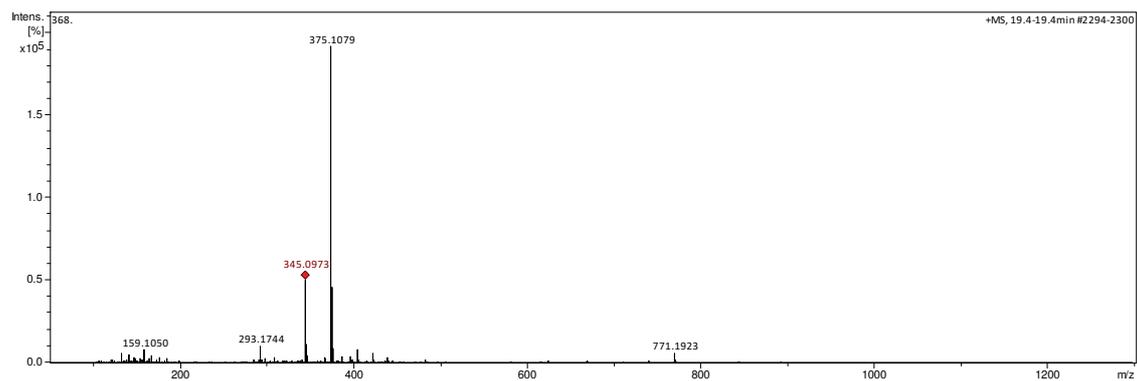


Figura B44 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 20,1 min (composto 73) FrPe AcOEt.

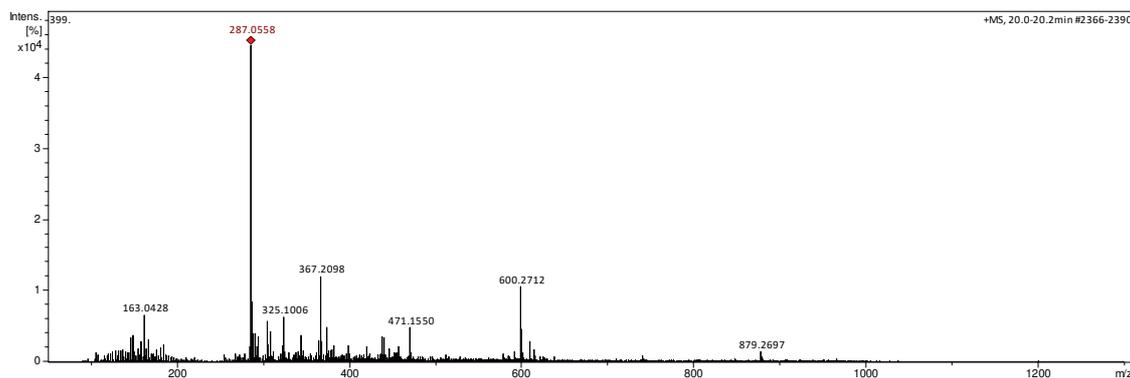


Figura B45 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 20,6 min (composto 74) FrPe AcOEt.

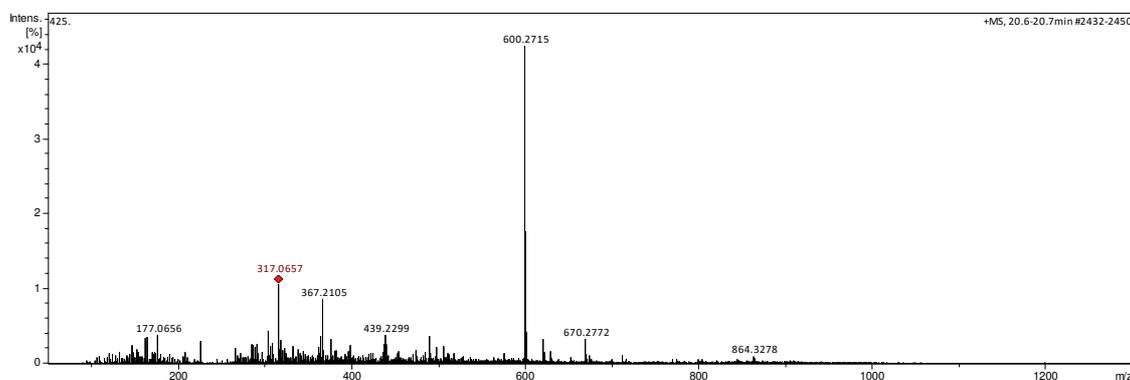


Figura B46 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 21,0 min (composto 75) FrPe AcOEt.

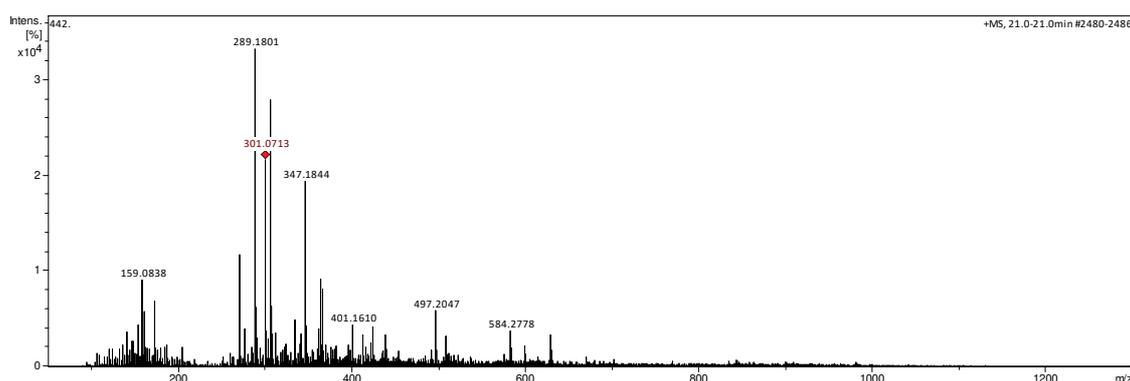


Figura B47 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 21,7 min (composto 76) FrPe AcOEt.

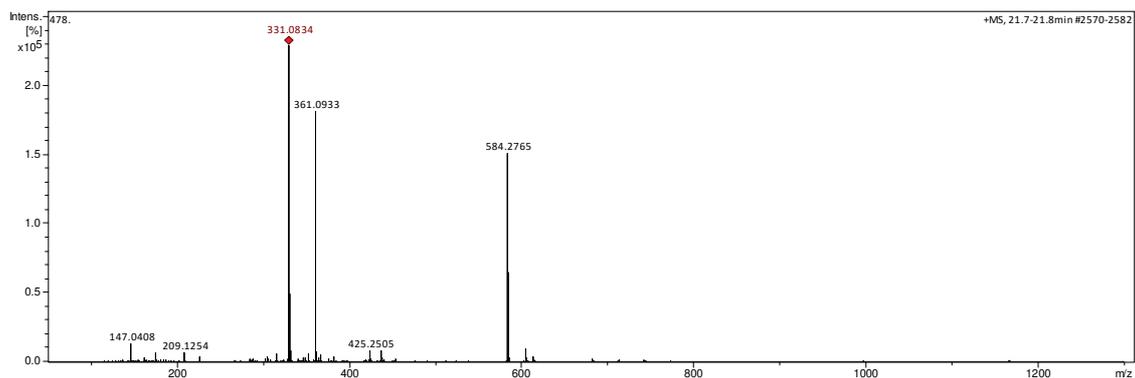


Figura B48 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 23,1 min (composto 77) FrPe AcOEt.

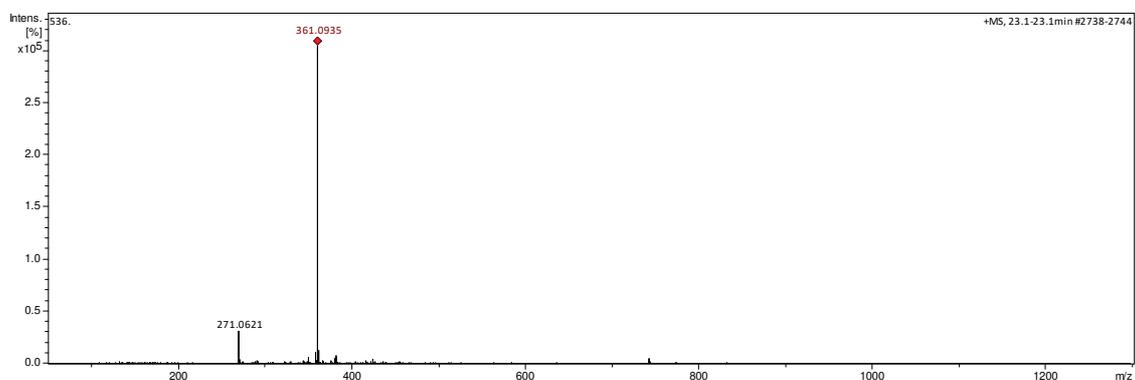


Figura B49 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 24,2 min (composto 78) FrPe AcOEt.

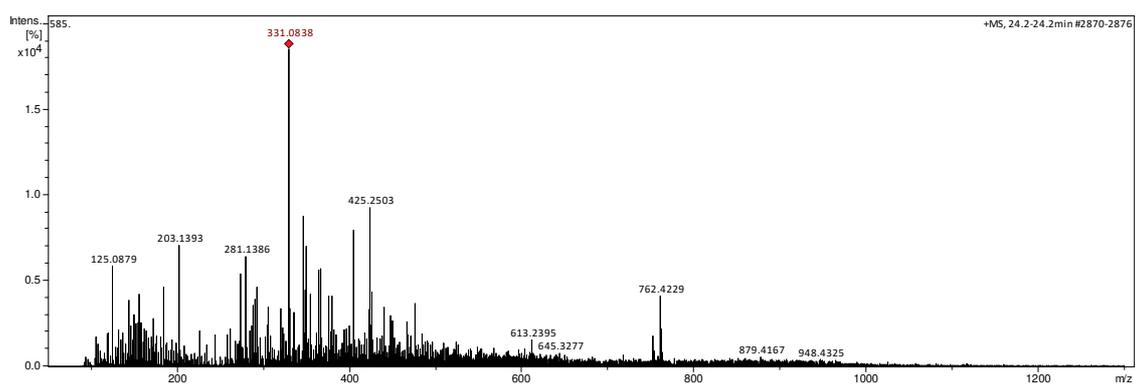


Figura B50 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 2,9 min (composto **53a**) FoPo AcOEt.

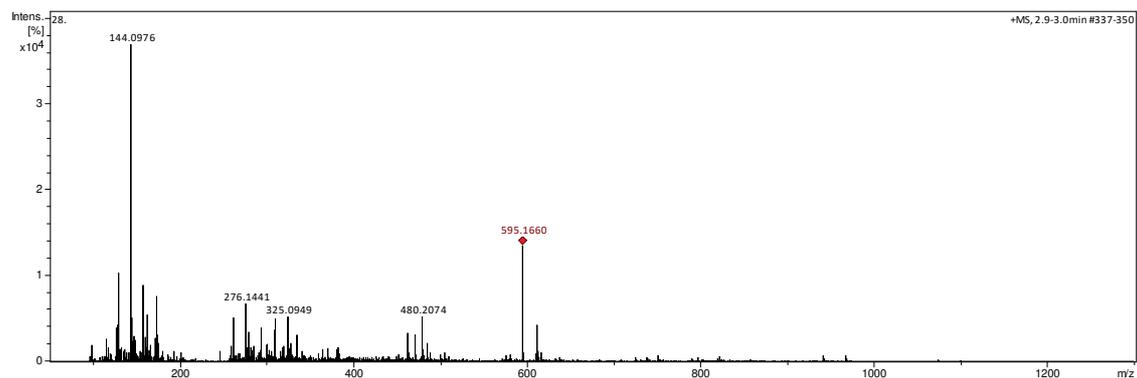


Figura B50 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,3 min (composto **2a**) FoPo AcOEt.

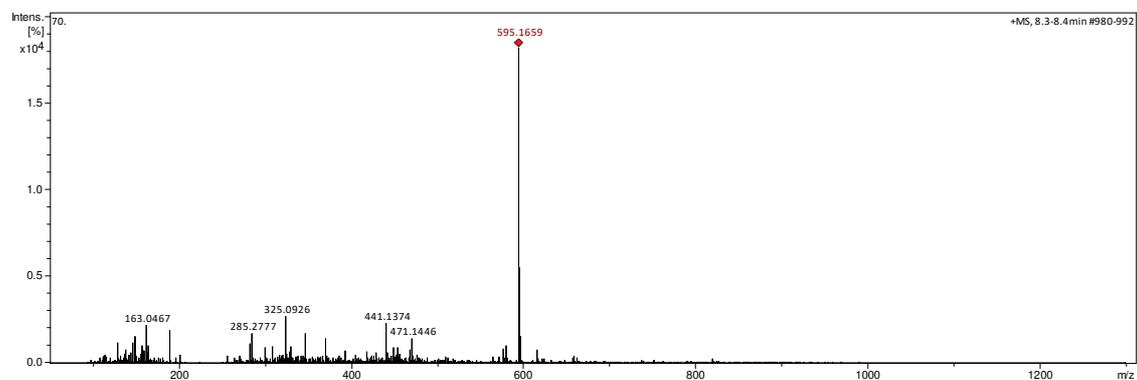


Figura B51 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 9,4 min (composto **2b**) FoPo AcOEt.

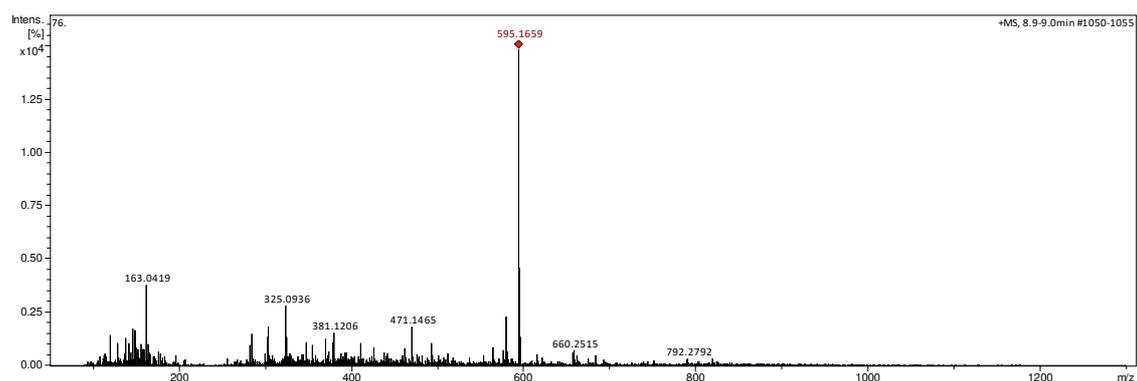


Figura B52 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 10,6 min (composto **3**) FoPo AcOEt.

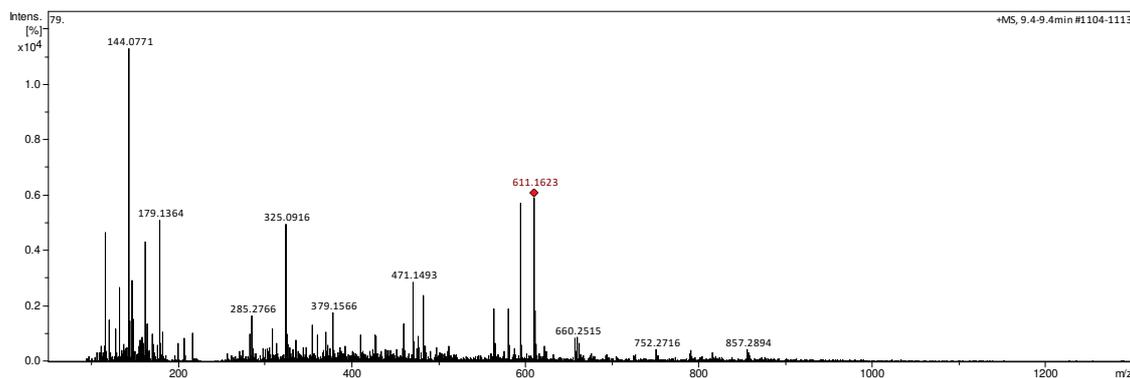


Figura B53 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 10,6 min (composto **56a**) FoPo AcOEt.

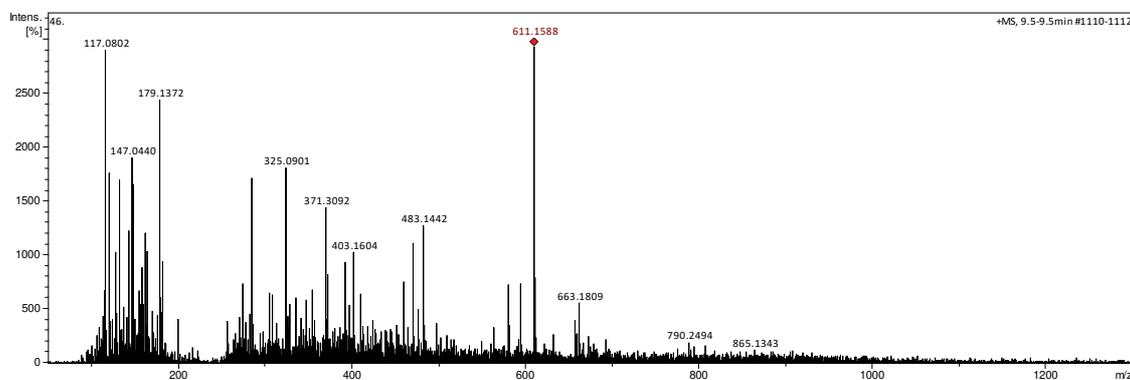


Figura B54 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 10,6 min (composto **56a**) FoPo AcOEt.

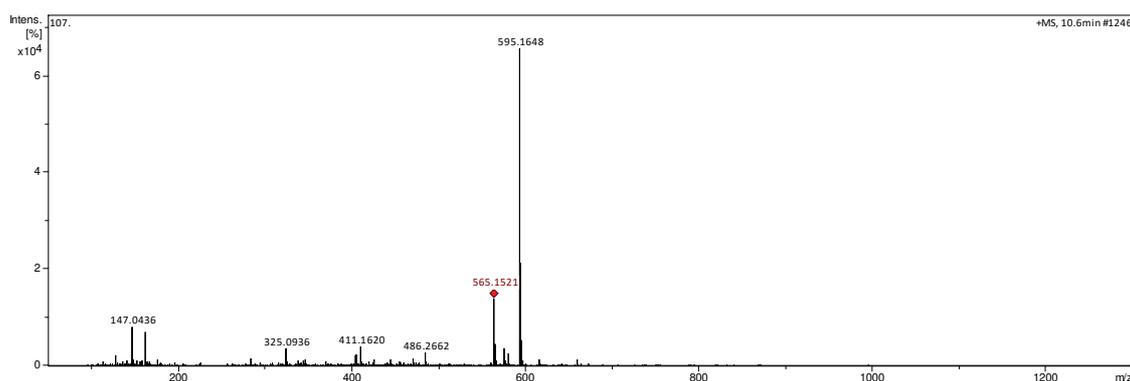


Figura B55 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 11,3 min (composto **56b**) FoPo AcOEt.

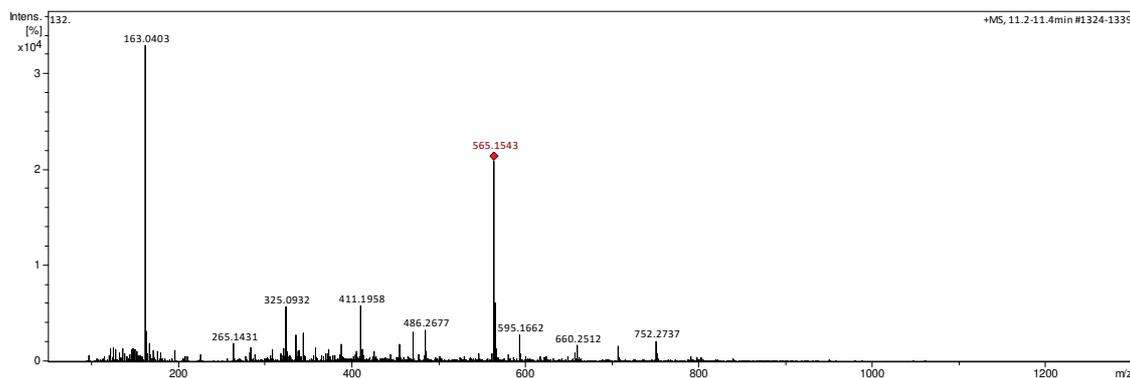


Figura B56 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 11,1 min (composto **58**) FoPo AcOEt.

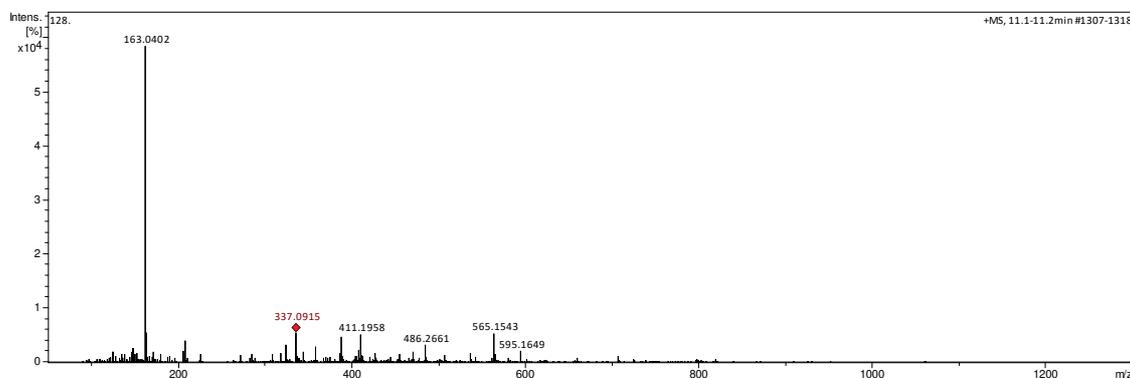


Figura B57 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 11,5 min (composto **59**) FoPo AcOEt.

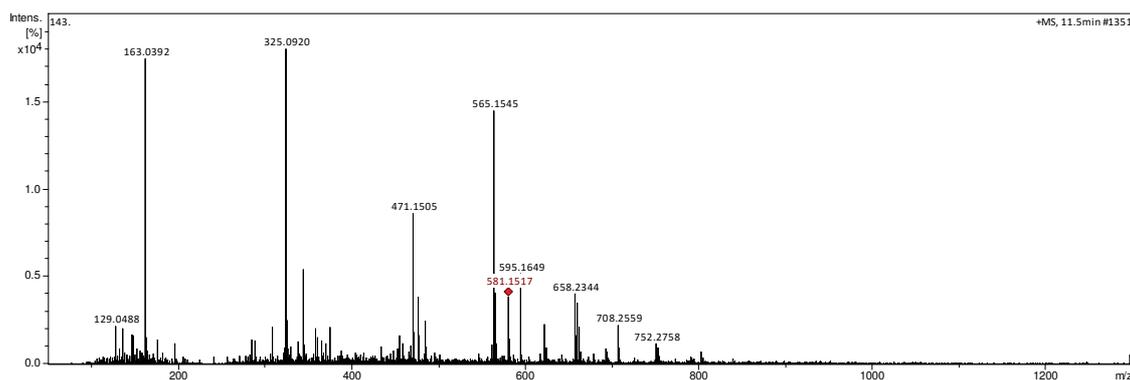


Figura B58 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 12,9 min (composto **61a**) FoPo AcOEt.

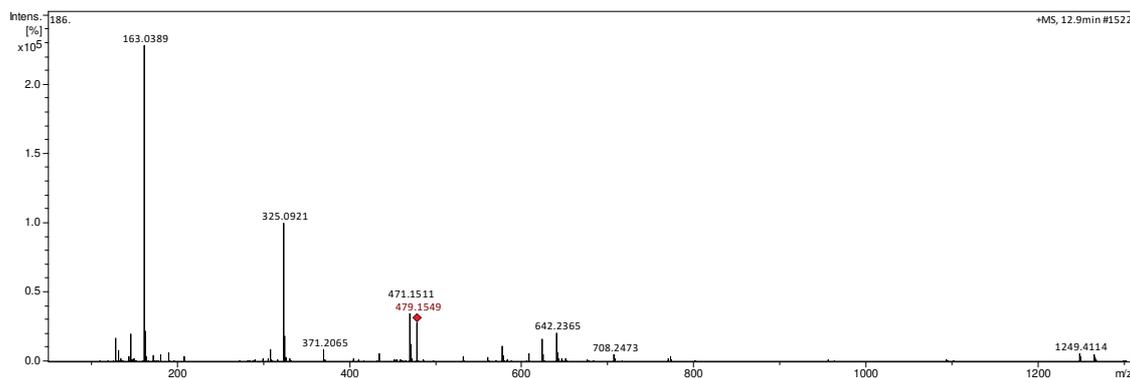


Figura B60 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto **61b**) FoPo AcOEt.

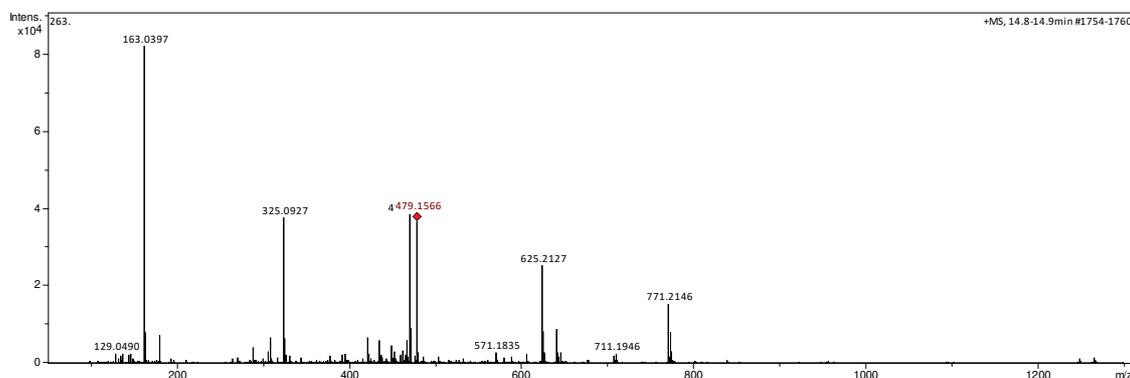


Figura B61 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 13,5 mi (composto **64**) FoPo AcOEt.

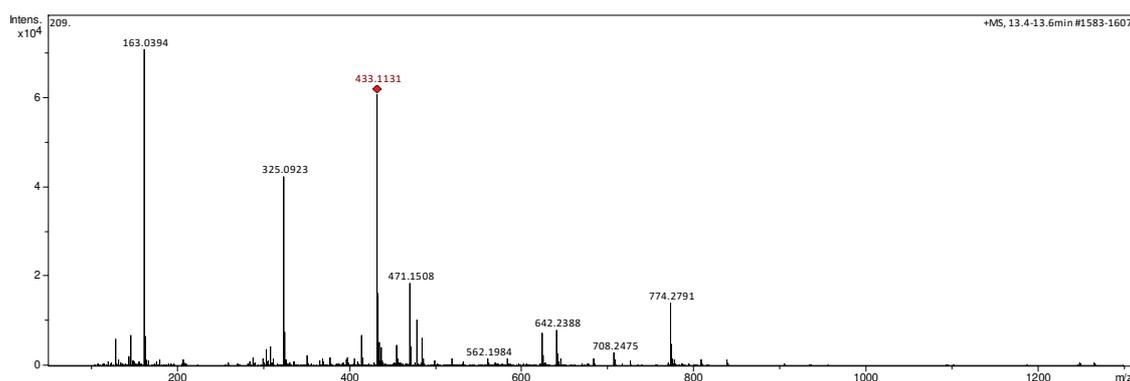


Figura B62 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 13,9 min (composto **45a**) FoPo AcOEt.

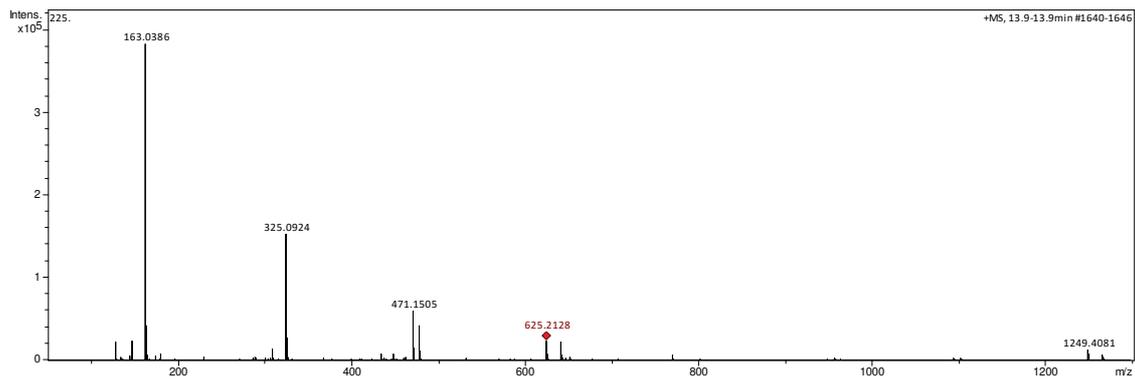


Figura B63 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 45b) FoPo AcOEt.

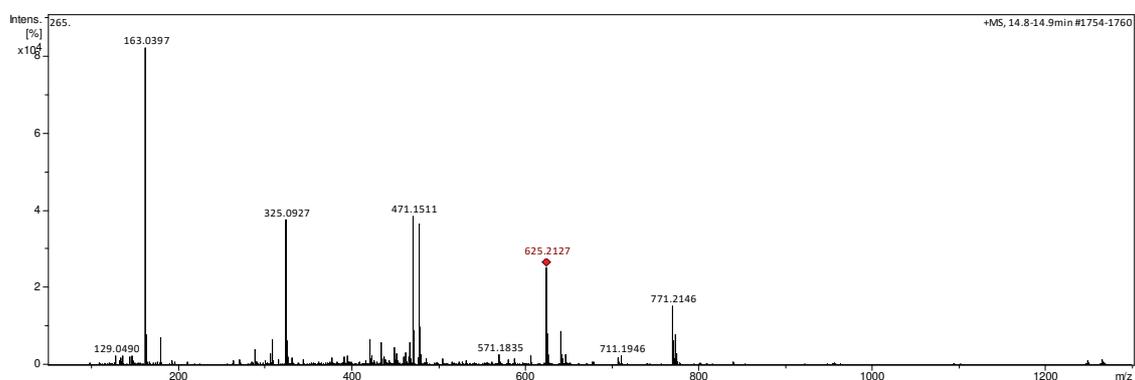


Figura B63 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,0 min (composto 69) FoPo AcOEt.

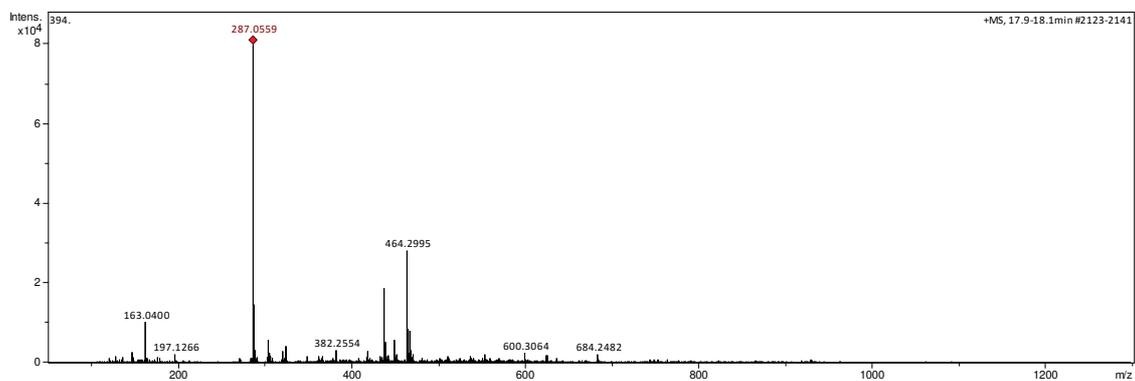


Figura B64 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,2 min (composto 70) FoPo AcOEt.

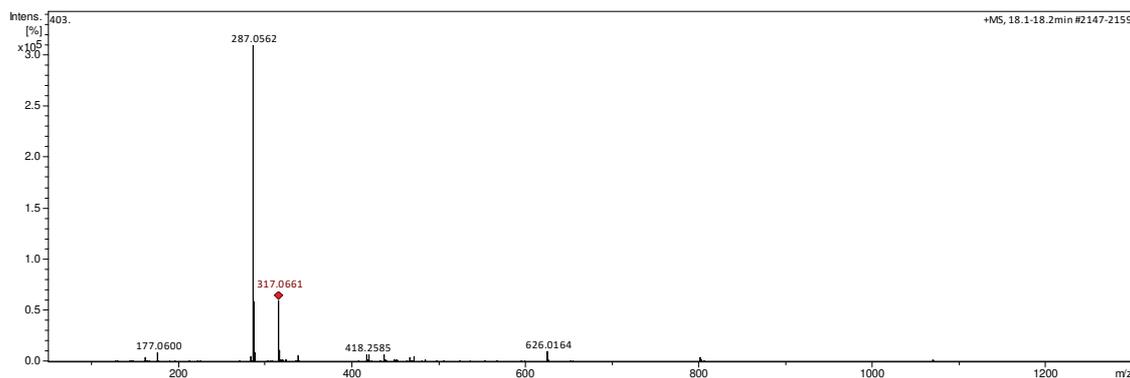


Figura B65 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,3 min (composto 46) FoPo AcOEt.

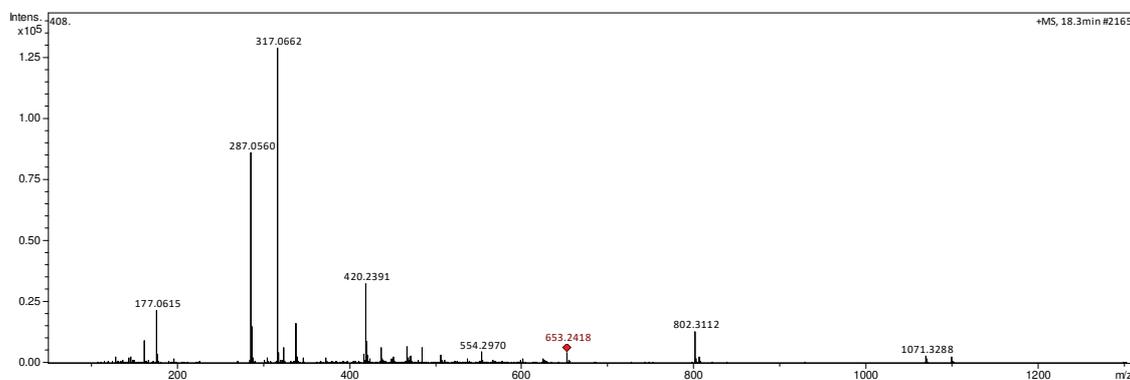


Figura B66 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,3 min (composto 71) FoPo AcOEt.

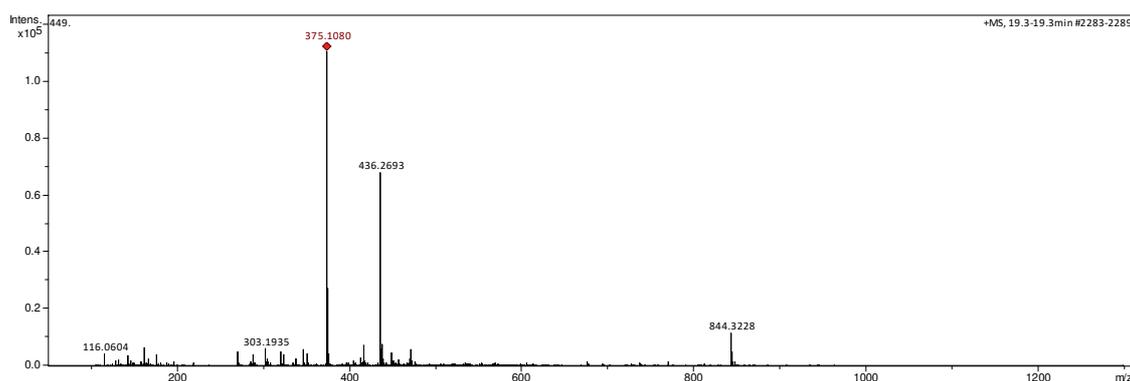


Figura B67 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,4 min (composto 72) FoPo AcOEt.

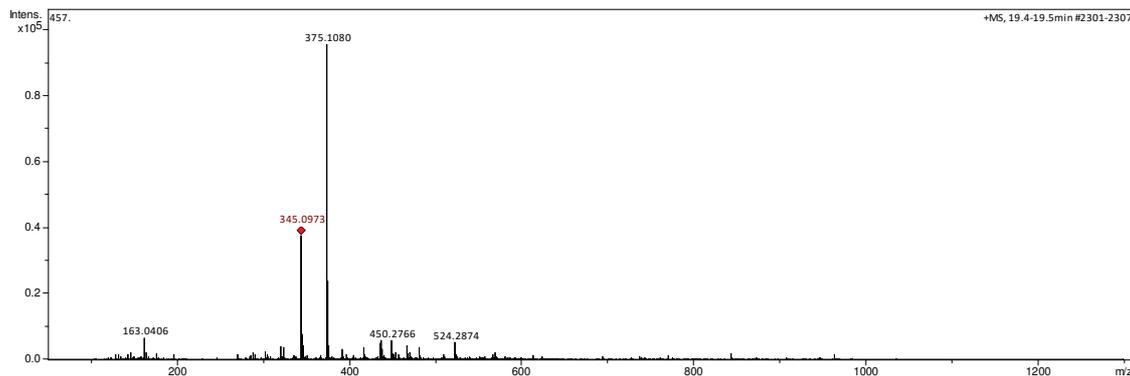


Figura B68 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 20,2 min (composto 73) FoPo AcOEt.

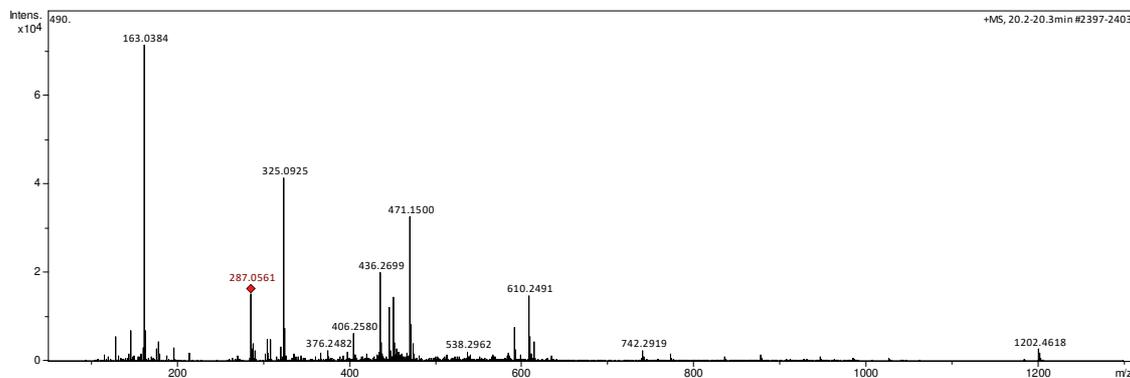


Figura B69 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 20,9 min (composto 75) FoPo AcOEt.

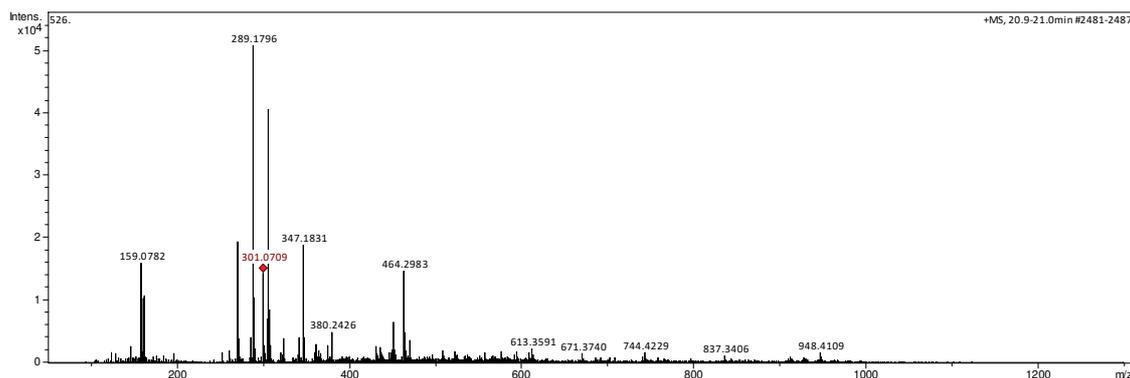


Figura B70 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 21,8 min (composto 76) FoPo AcOEt fração

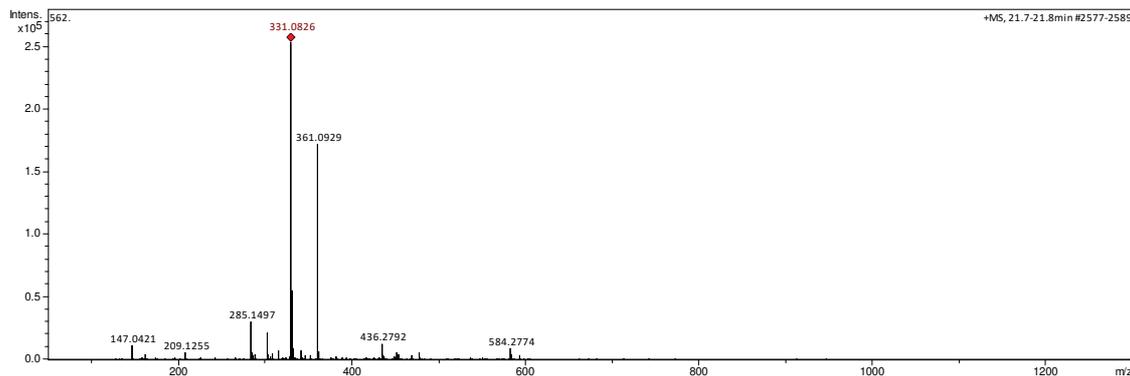


Figura B71 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 23,1 min (composto 77) FoPo AcOEt.

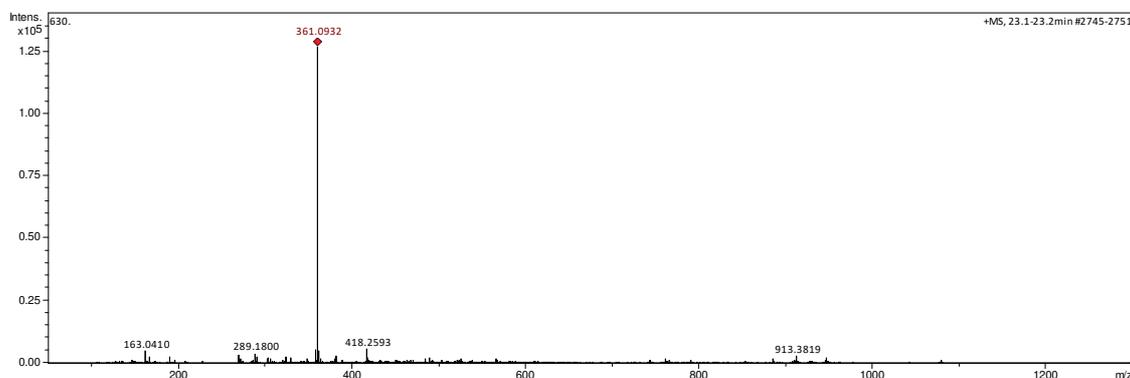


Figura B72 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 24,3 min (composto 78) FoPo AcOEt fração

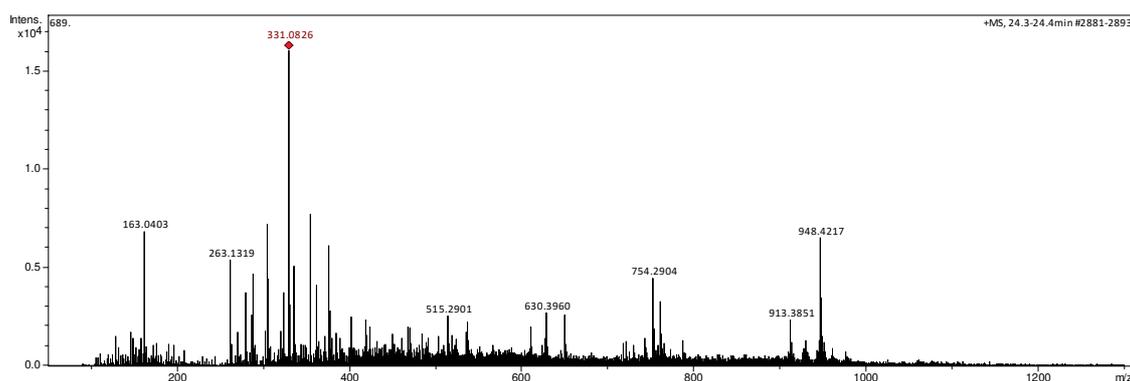


Figura B73 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 31,6 min (composto **29**) FoPo AcOEt.

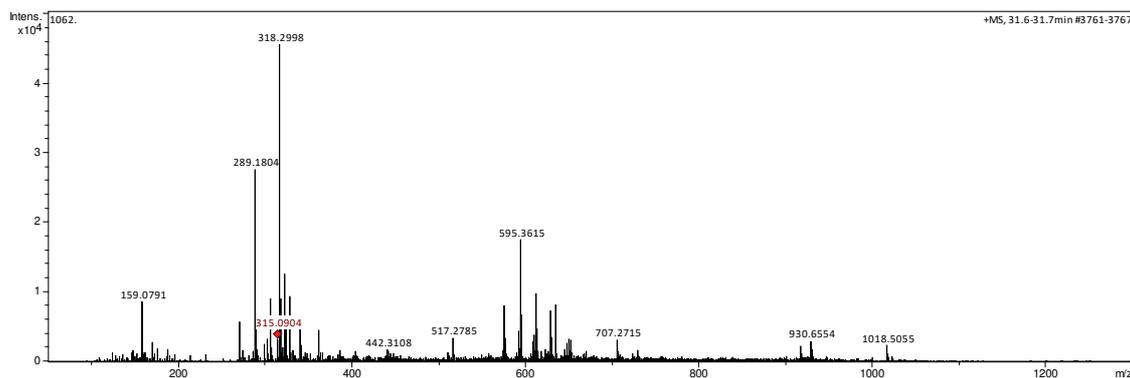


Figura B74 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 9,5 min (composto **3**) FoPe AcOEt.

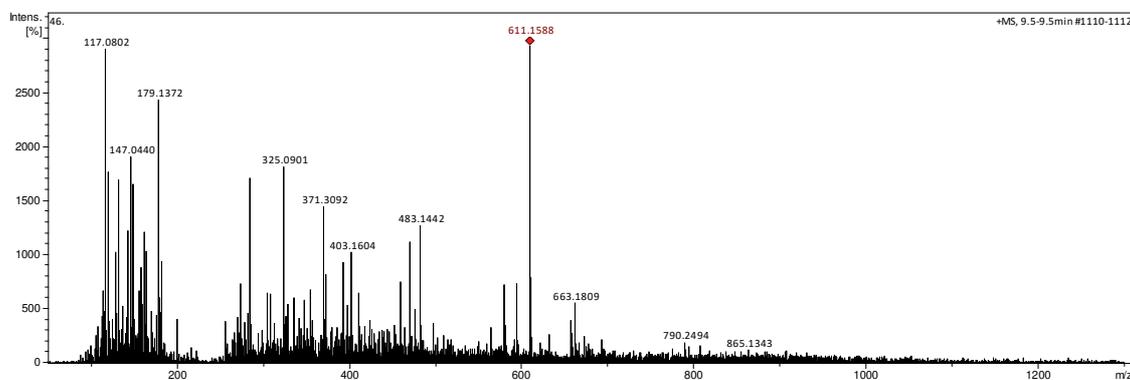


Figura B75 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,8 min (composto **56b**) FoPe AcOEt.

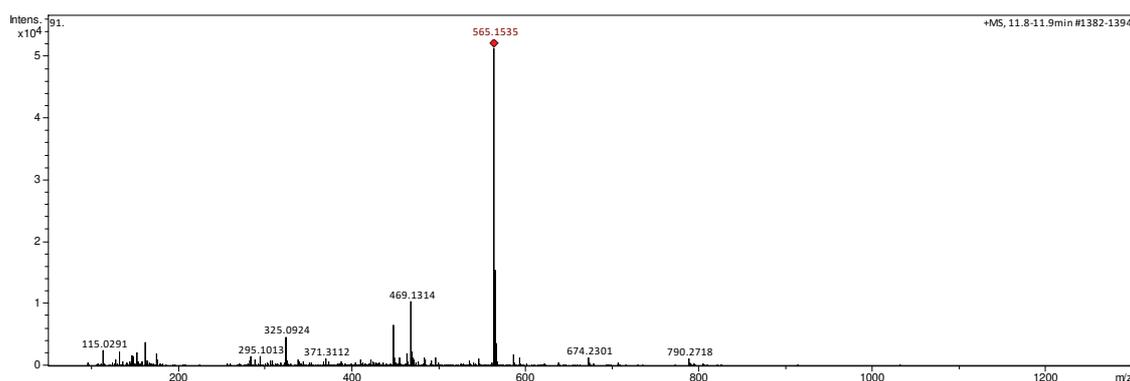


Figura B76 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,7 min (composto 61a) FoPe AcOEt.

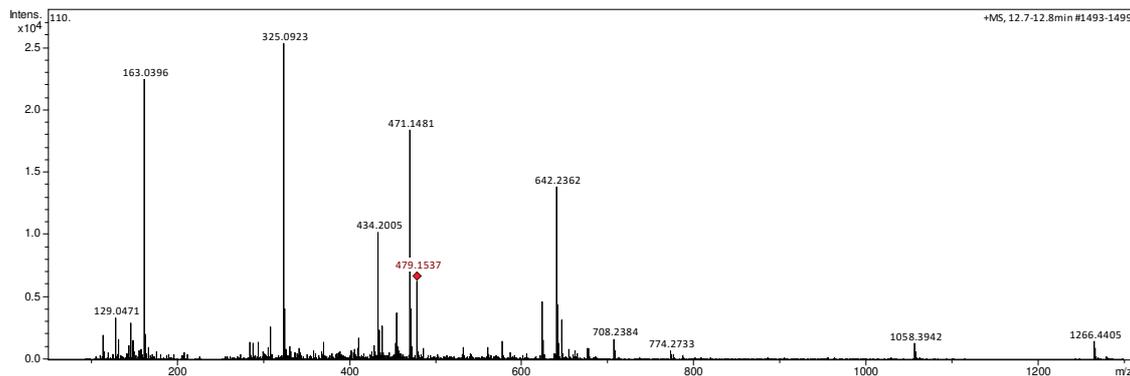


Figura B77 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 61b) FoPe AcOEt.

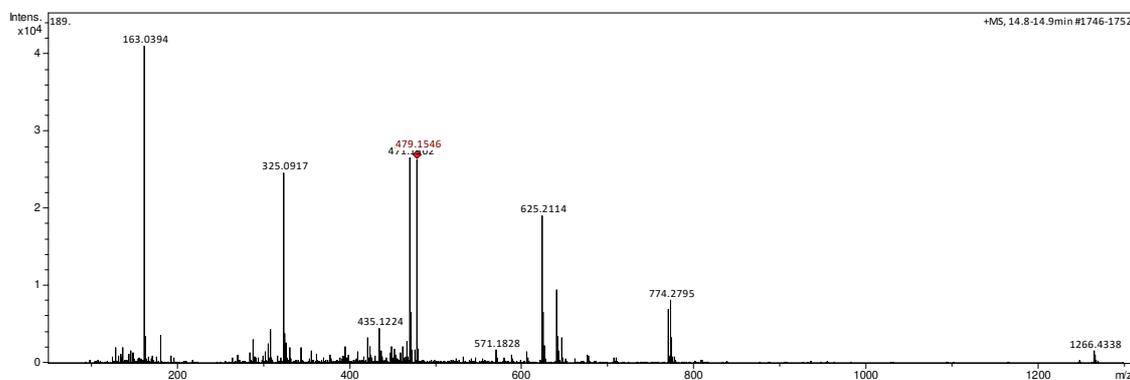


Figura B78 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,9 min (composto 45a) FoPe AcOEt.

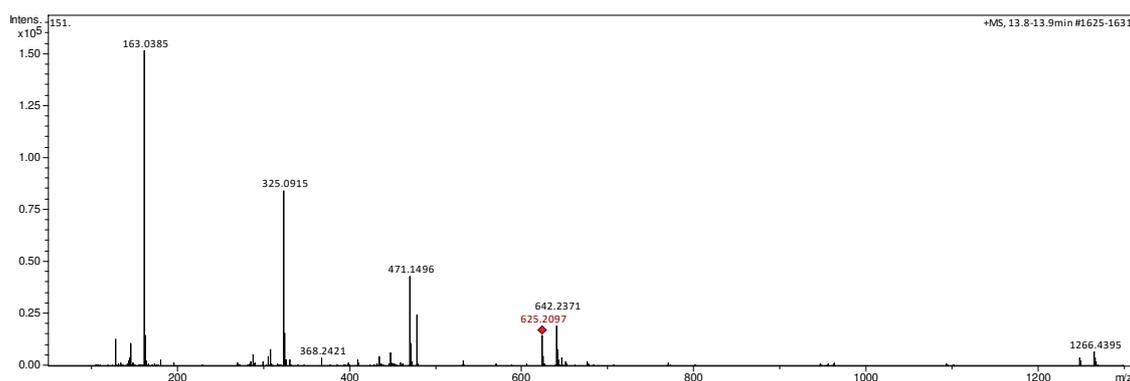


Figura B79 -EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 45b) FoPe AcOEt.

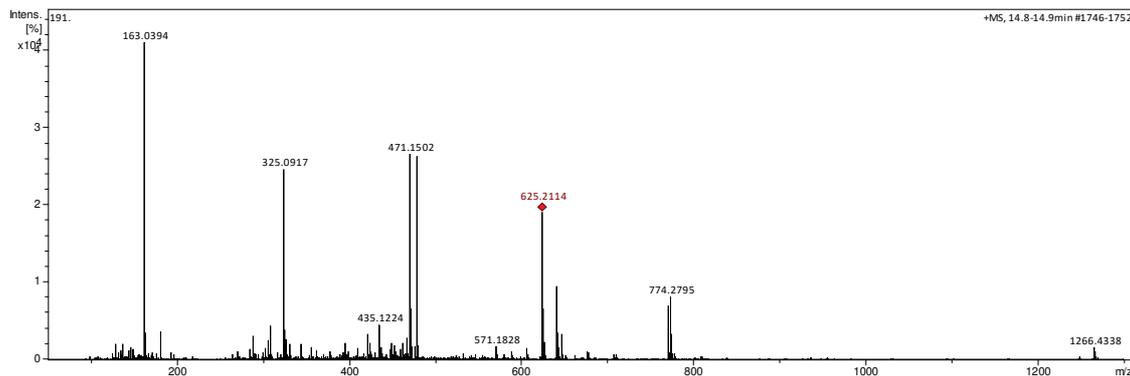


Figura B80 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 13,0 min (composto 63) FoPe AcOEt.

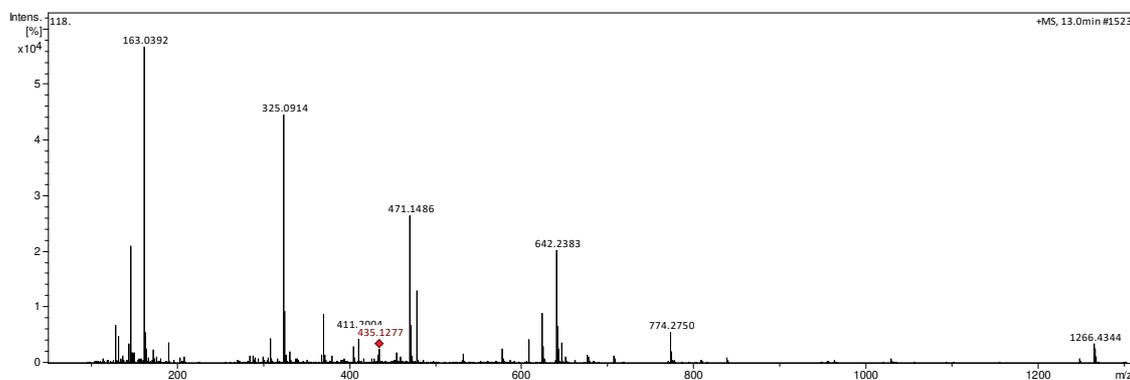


Figura B81 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 15,9 min (composto 67) FoPe AcOEt.

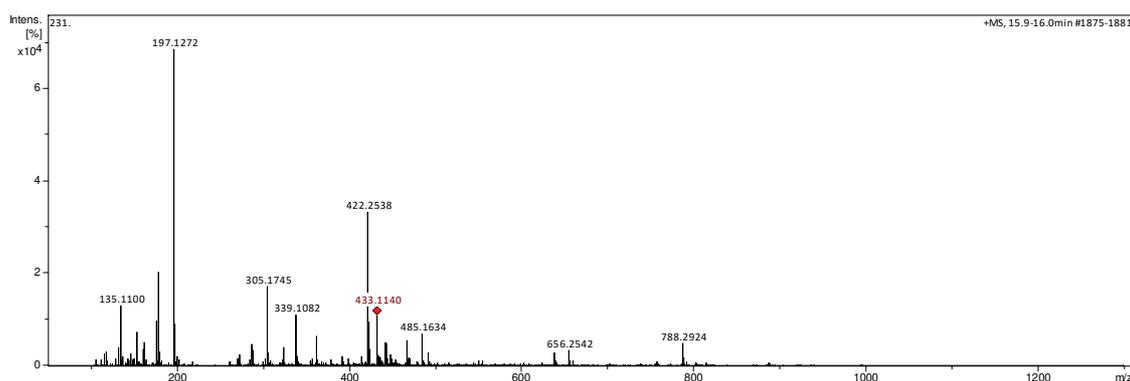


Figura B82 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 69) FoPe AcOEt.

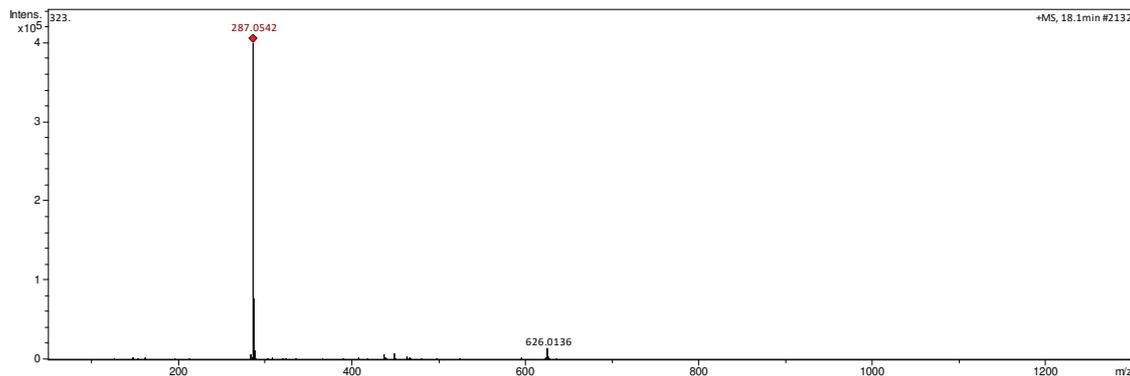


Figura B83 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 70) FoPe AcOEt.

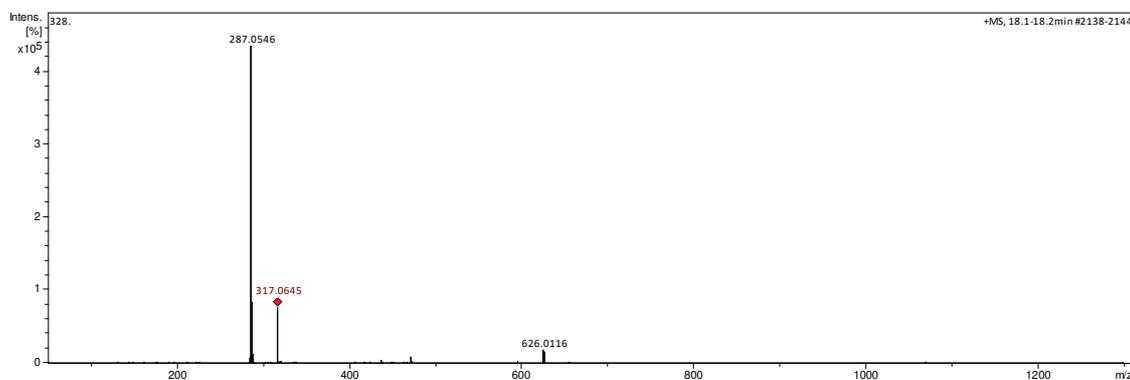


Figura B84 - EM-ESI-(+) of the peak at retention time (Rt) 18,6 min (composto 46) FoPe AcOEt.

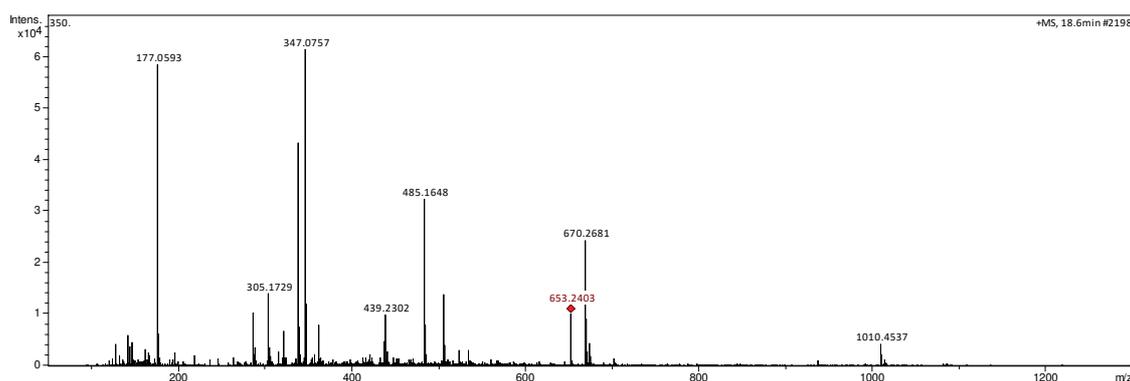


Figura B85 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,3 min (composto 71) FoPe AcOEt.

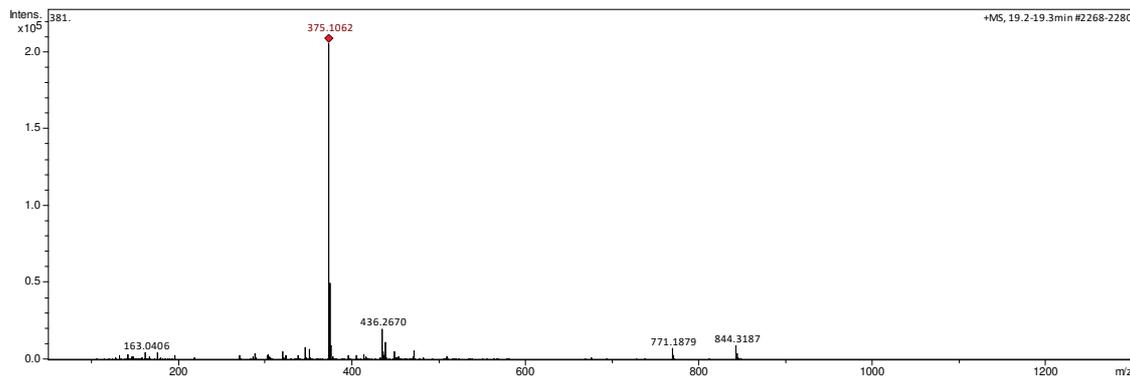


Figura B86 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,4 min (composto 72) FoPe AcOEt.

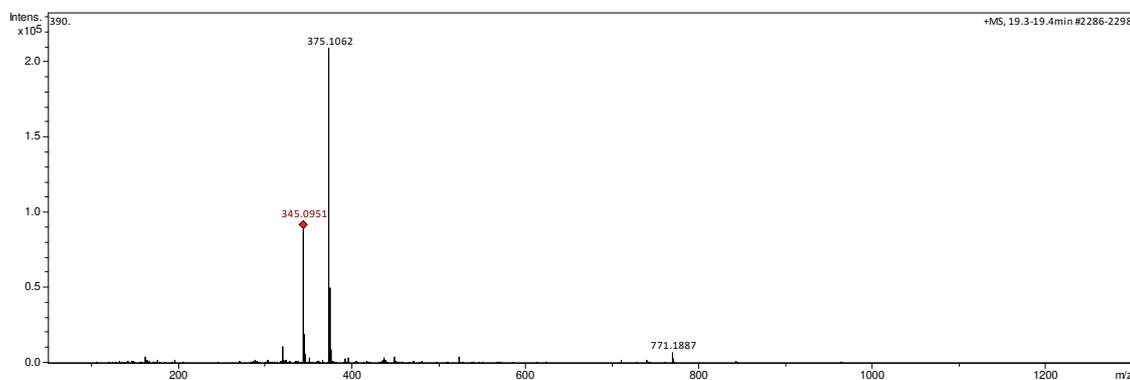


Figura B87 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 20,6 min (composto 74) FoPe AcOEt fração

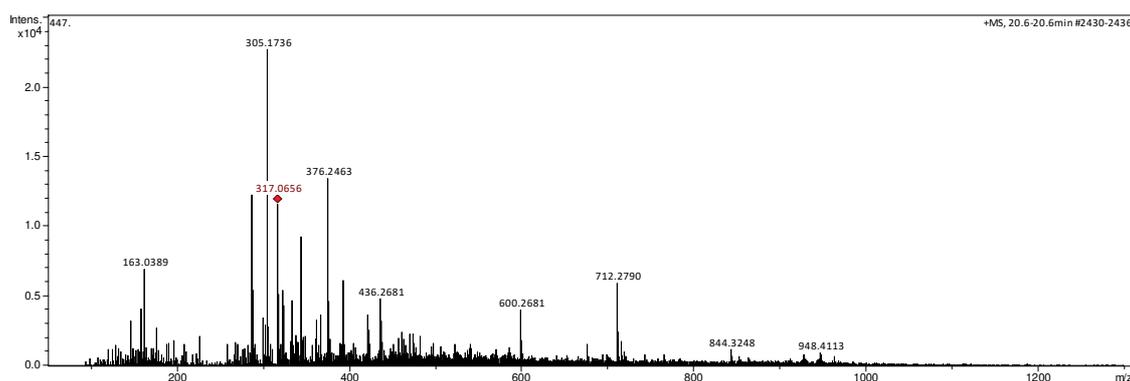


Figura B88 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 23.1 min (composto 77) FoPe AcOEt.

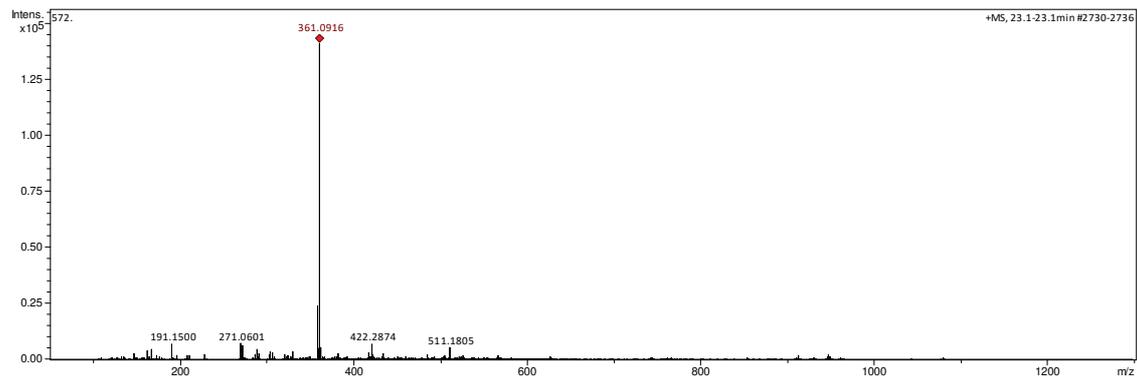


Figura B89 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,2 min (composto 2a) FrPo *n*But .

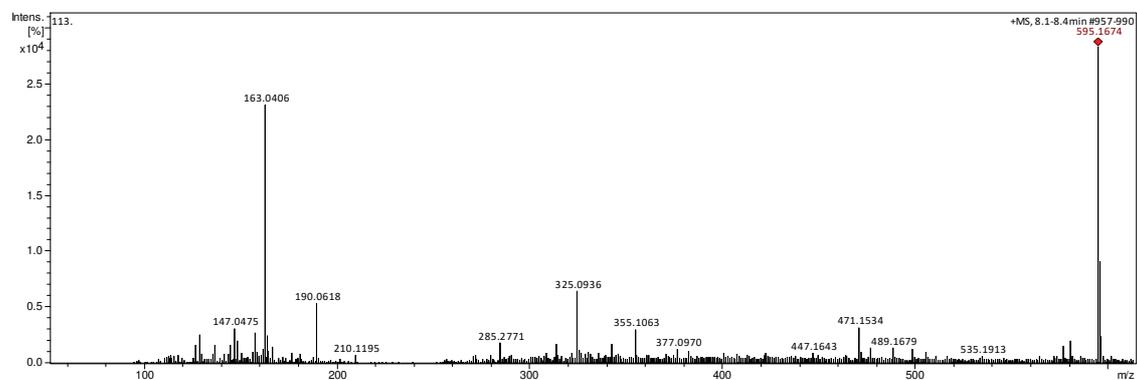


Figura B90 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 9,0 min (composto 2b) FrPo *n*But .

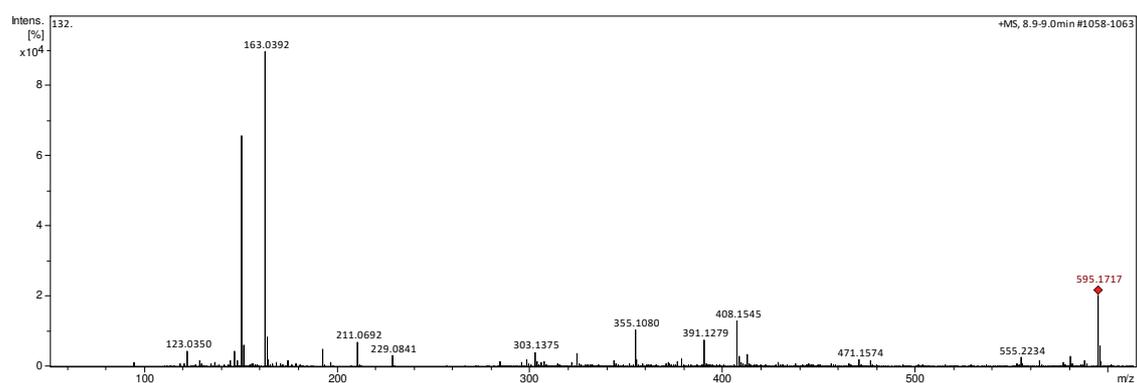


Figura B91 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 6,5 min (composto **53a**) FrPo *n*But .

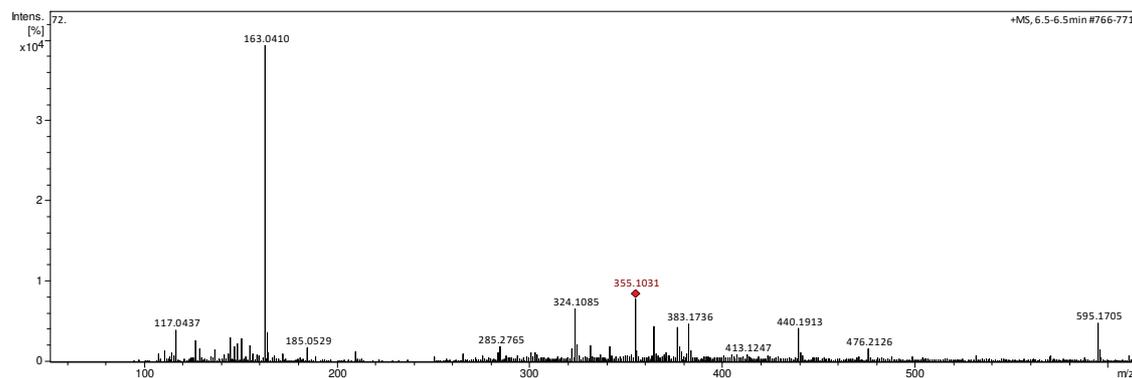


Figura B92 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,5 min (composto **53b**) FrPo *n*But .

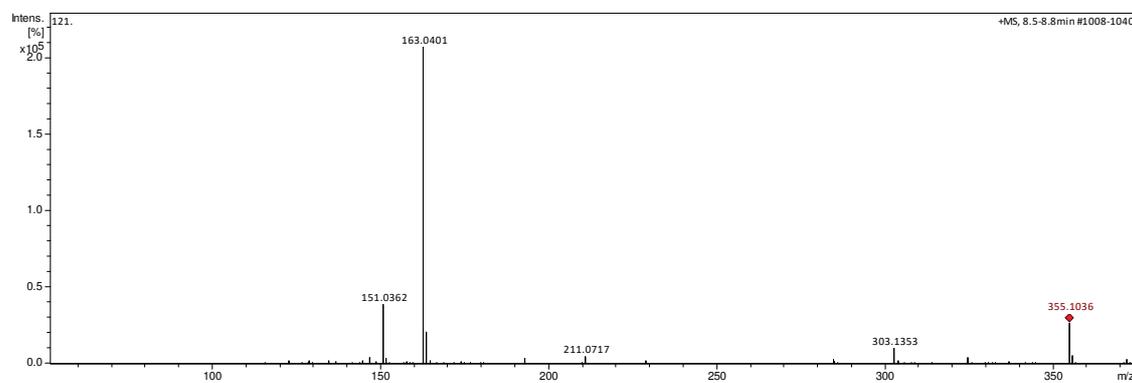


Figura B93 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 9,4 min (composto **3**) FrPo *n*But .

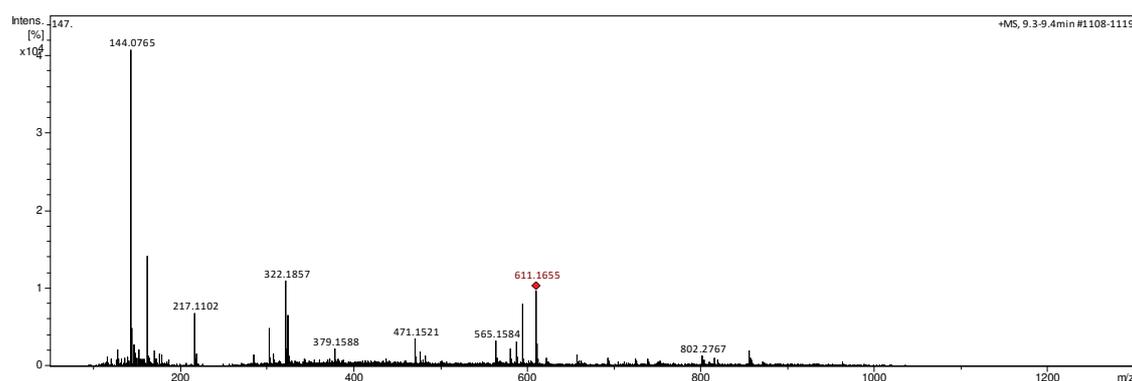


Figura B94 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 10,1 min (composto **56a**) FrPo *n*But .

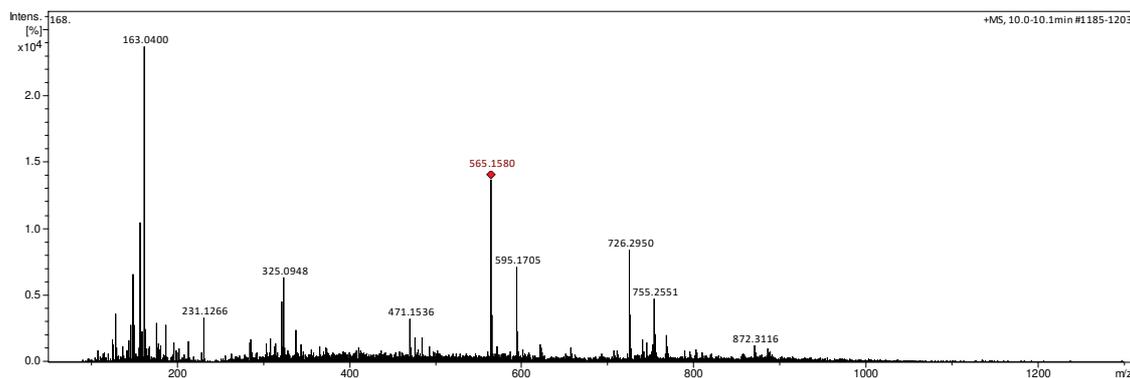


Figura B95 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,2 min (composto **56b**) FrPo *n*But .

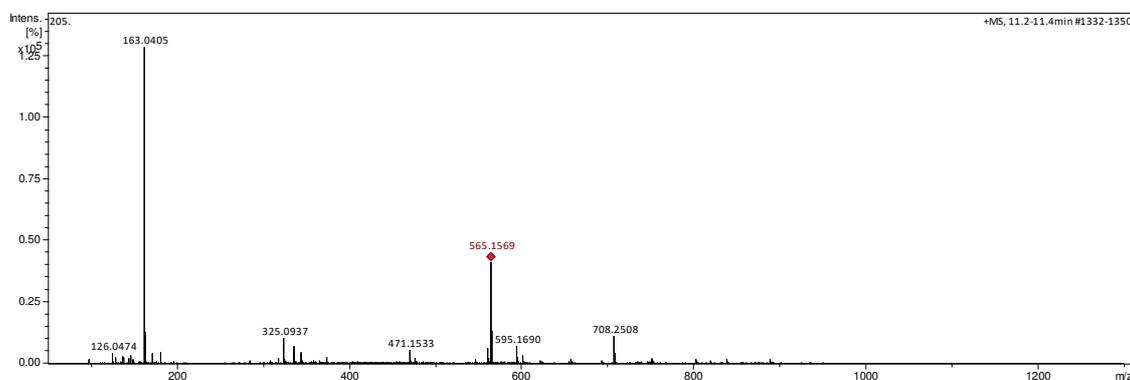


Figura B96 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 10,7 min (composto **5**) FrPo *n*But .

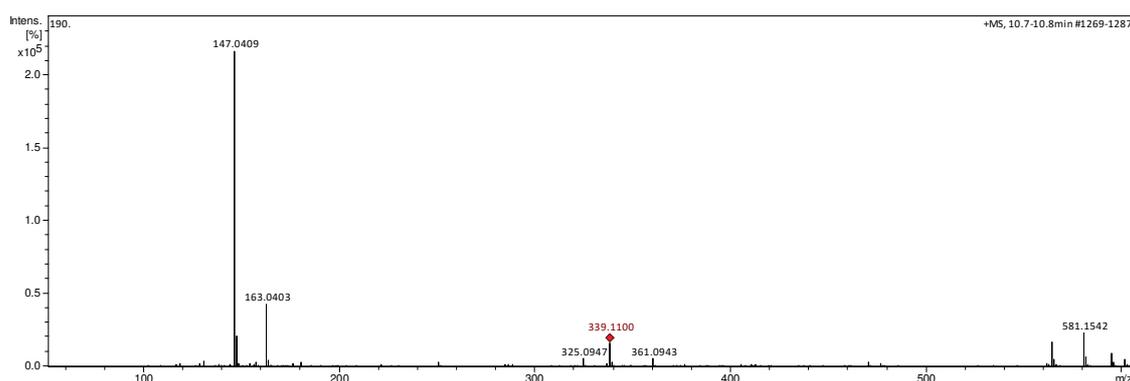


Figura B97 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,0 min (composto 58) FrPo *n*But .

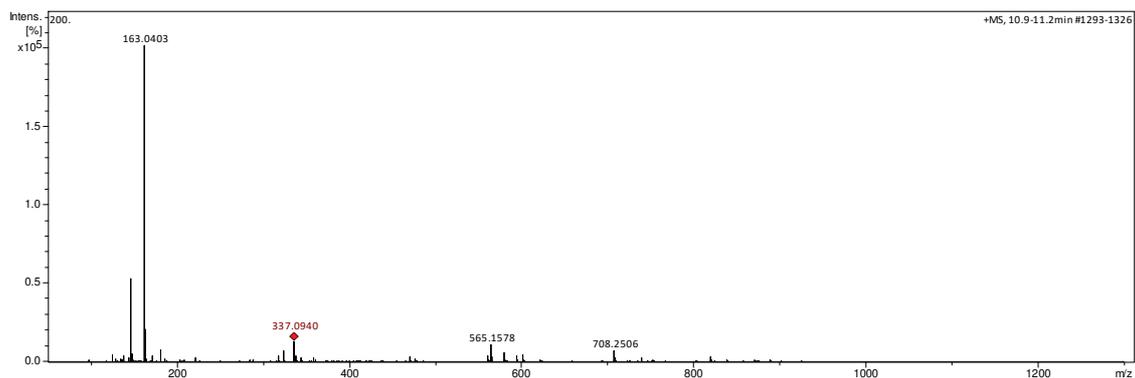


Figura B98 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,0 min (composto 60) FrPo *n*But .

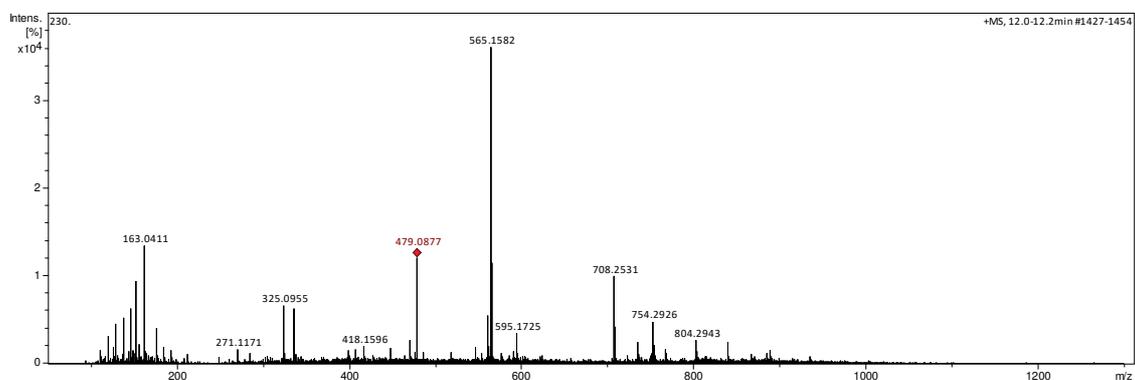


Figura B99 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,9 min (composto 61a) FrPo *n*But .

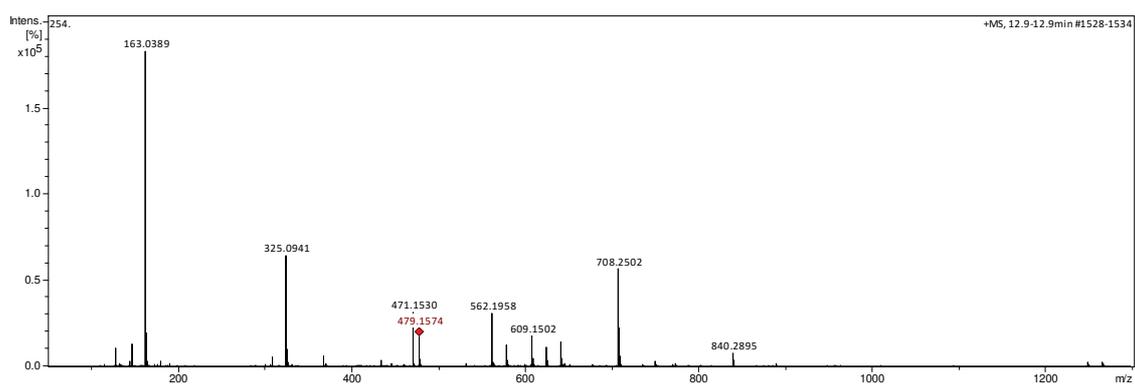


Figura B100 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,9 min (composto 45a) FrPo *n*But .

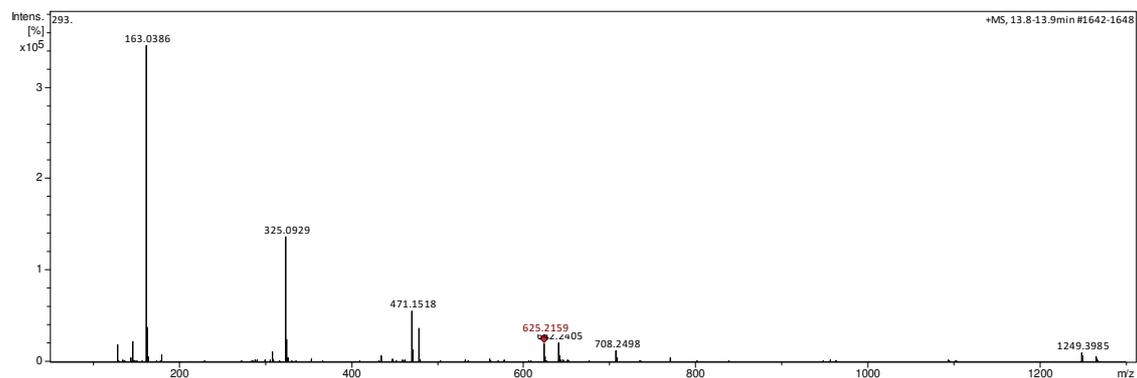


Figura B101 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 45b) FrPo *n*But .

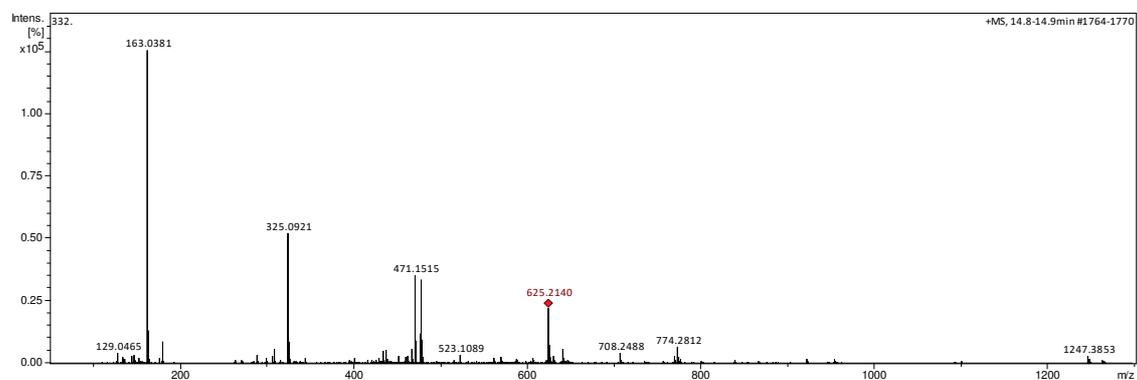


Figura B102 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 15,9 min (composto 67) FrPo *n*But .

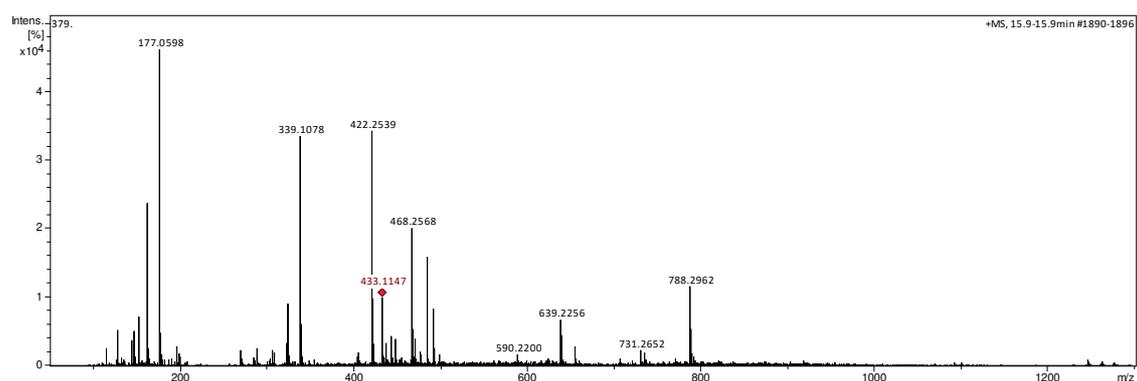


Figura B103 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 15,9 min (composto 66) FrPo *n*But .

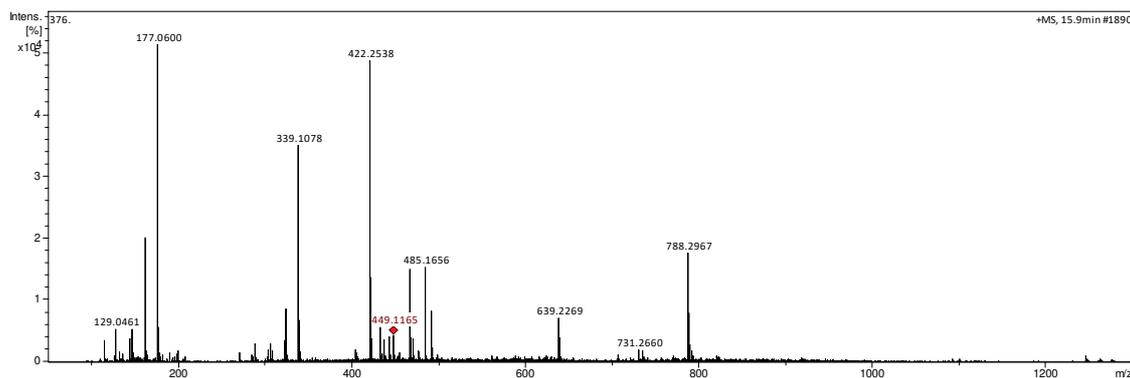


Figura B104 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 16 min (composto 68) FrPo *n*But .

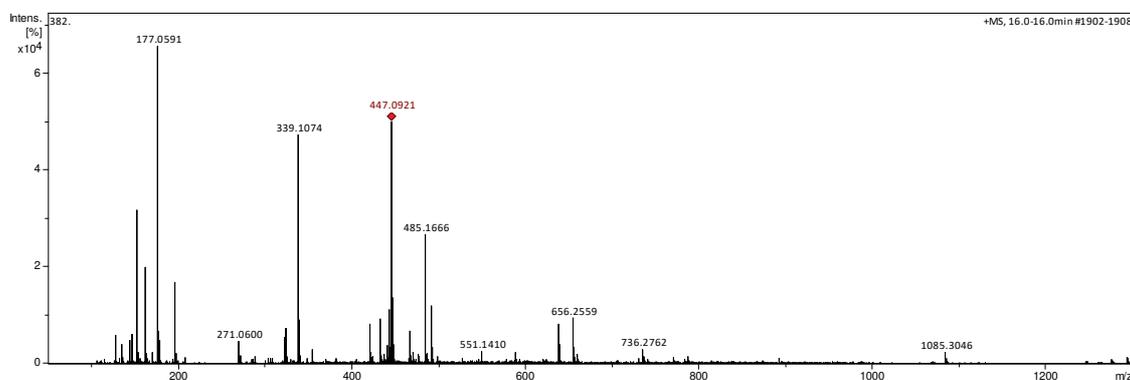


Figura B105 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 69) FrPo *n*But .

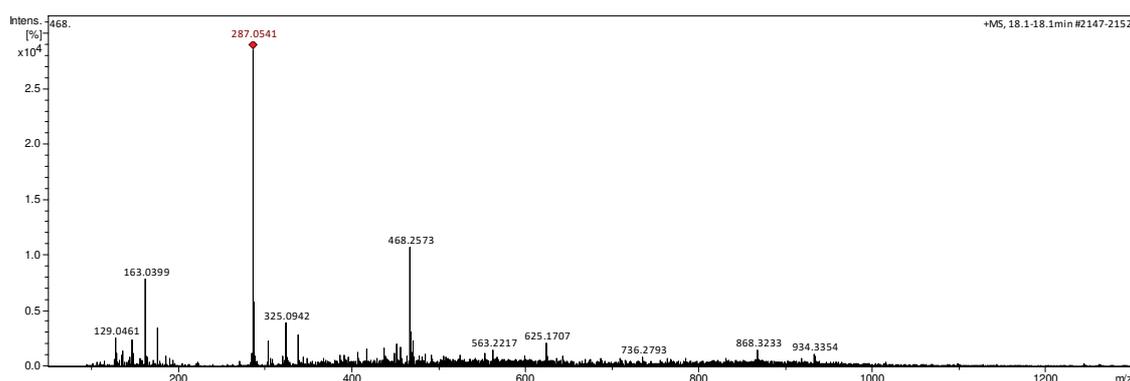


Figura B106 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,3 min (composto 70) FrPo *n*But .

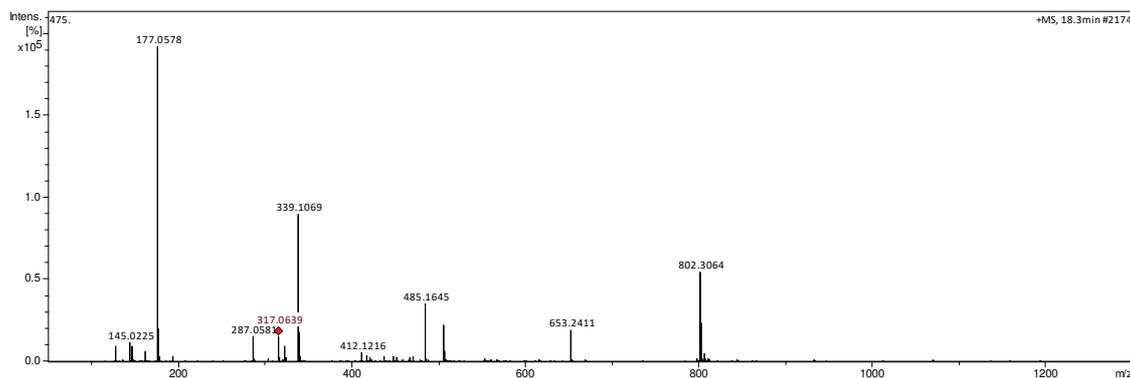


Figura B107 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,2 min (composto 46) FrPo *n*But .

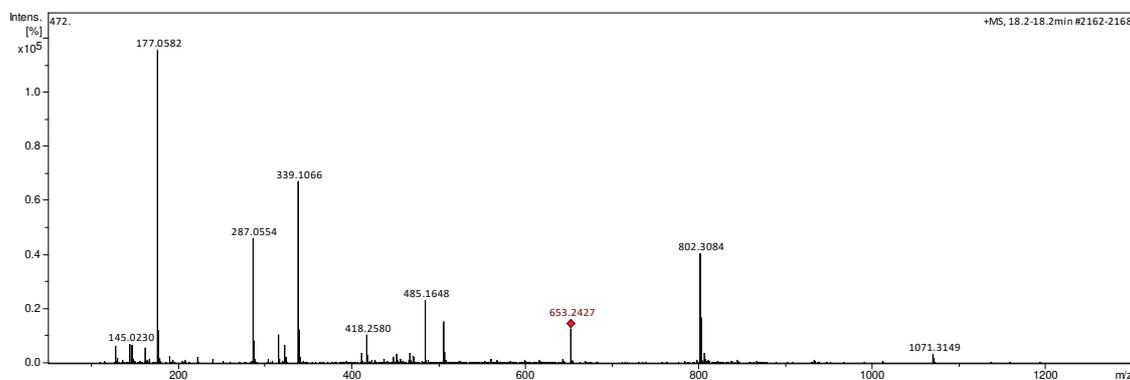


Figura B108 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,4 min (composto 71) FrPo *n*But .

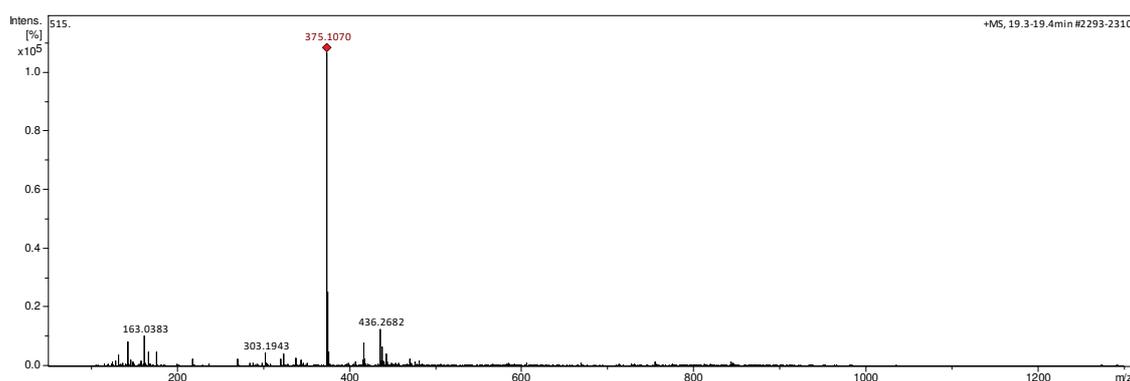


Figura B109 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,5 min (composto 72) FrPo *n*But .

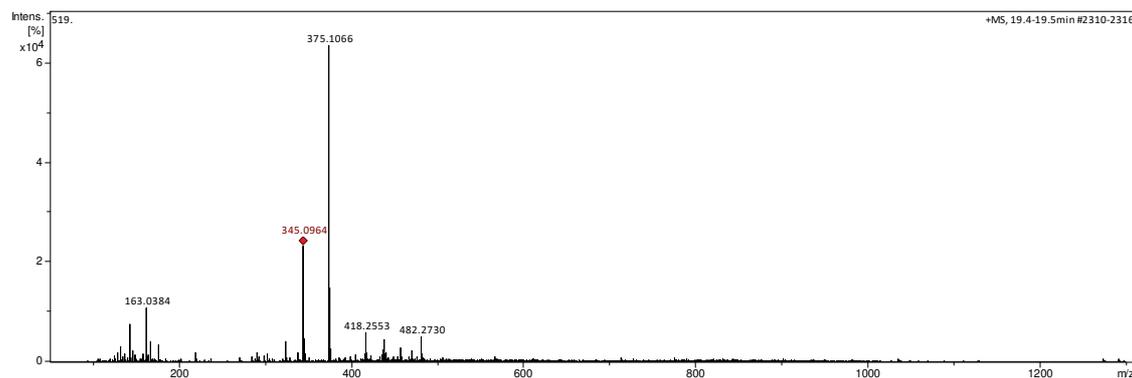


Figura B110 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 20,2 min (composto 73) FrPo *n*But .

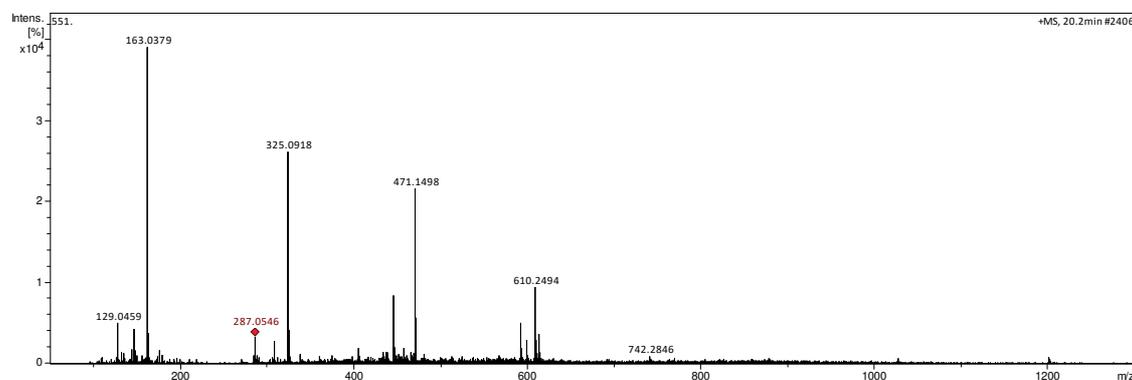


Figura B111 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 23,1 min (composto 77) FrPo *n*But .

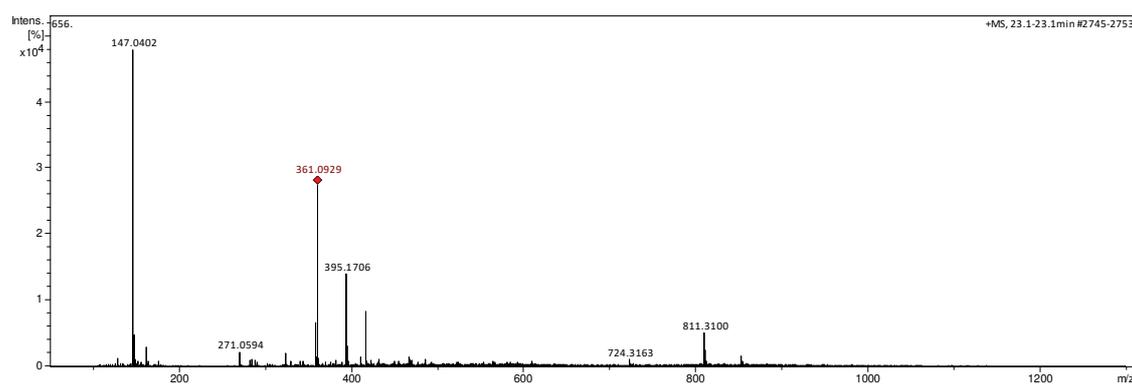


Figura B112 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 24,3 min (composto 78) FrPo *n*But .

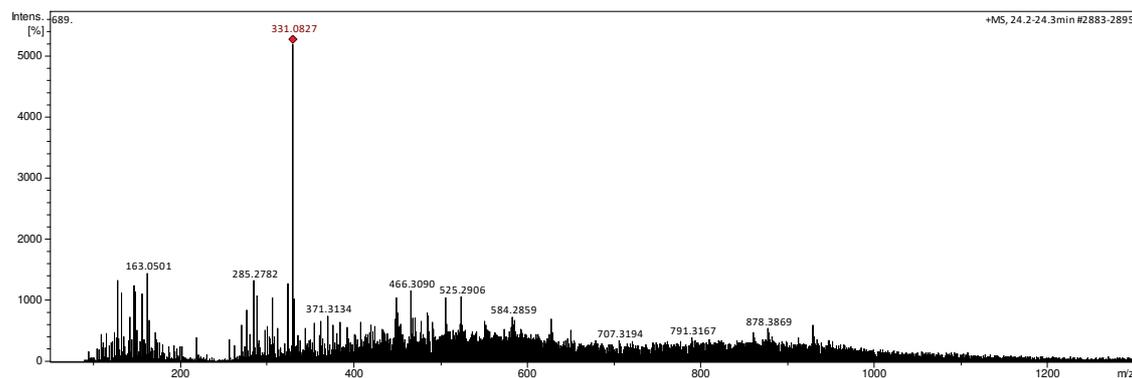


Figura B113 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,8 min (composto 53b) FrPe *n*But .

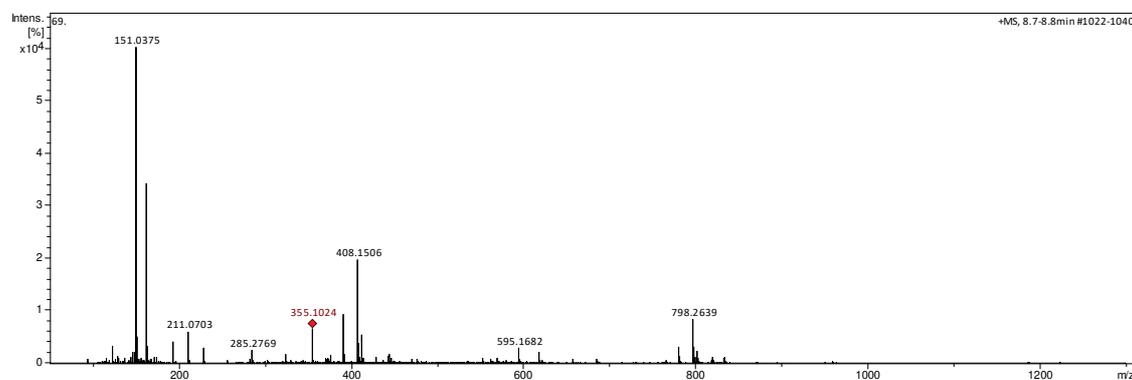


Figura B114 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 9,4 min (composto 3) FrPe *n*But .

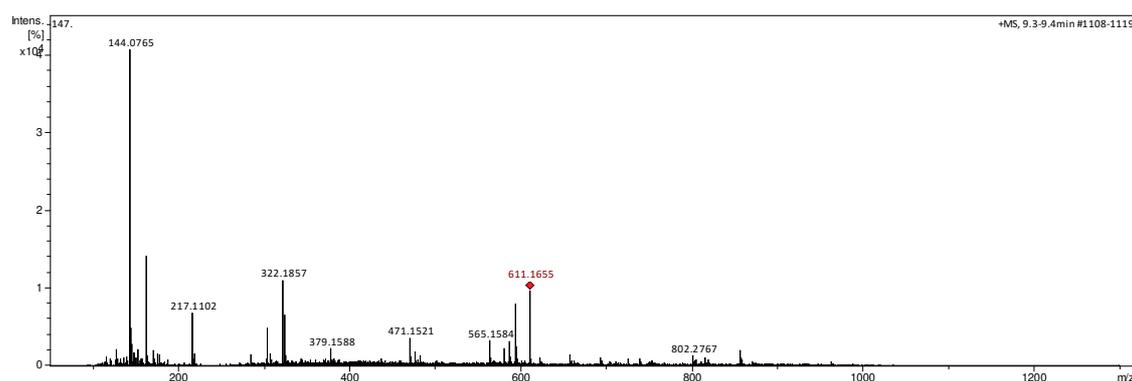


Figura B115 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 10,2 min (composto **56a**) FrPe *n*But .

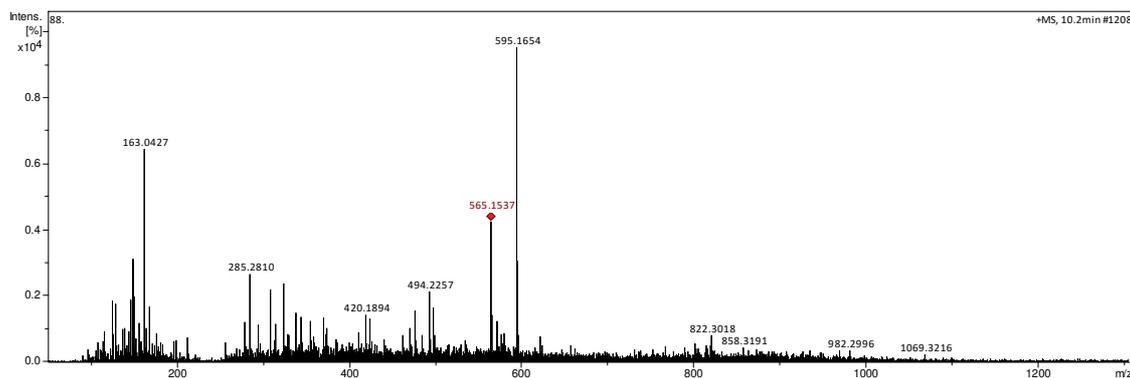


Figura B116 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,2 min (composto **56b**) FrPe *n*But .

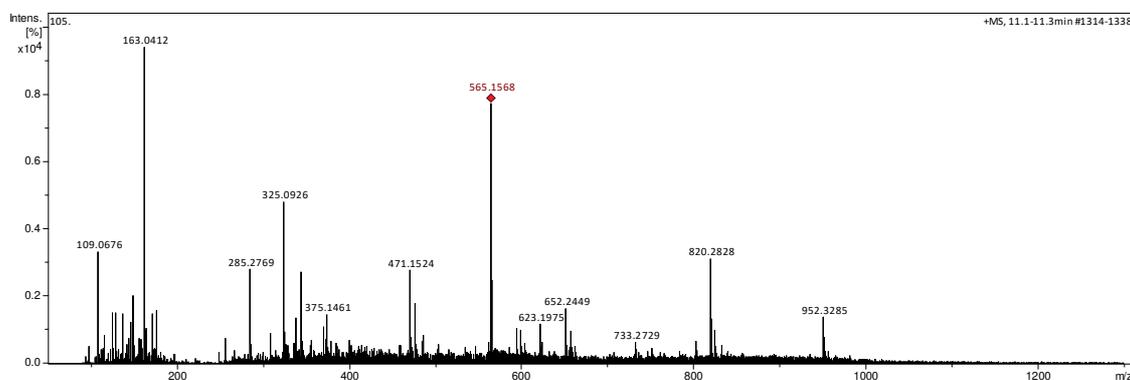


Figura B117 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,1 min (composto **60**) FrPe *n*But .

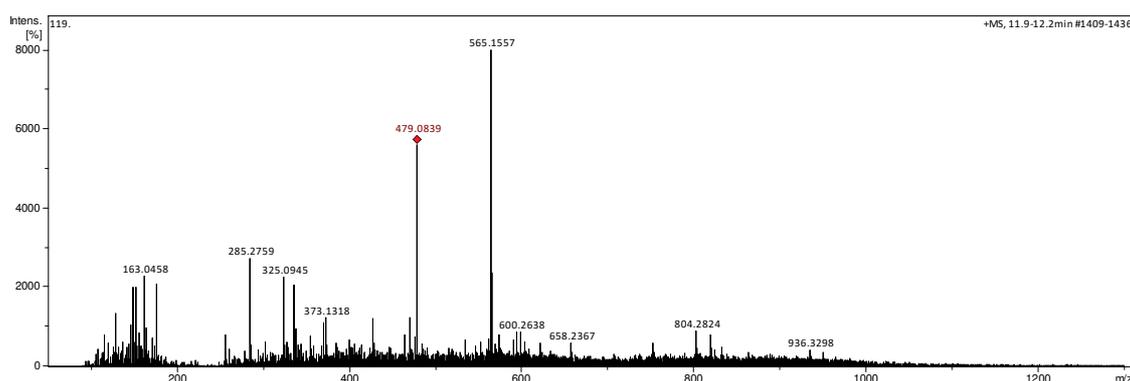


Figura B118 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,9 min (composto 61a) FrPe *n*But .

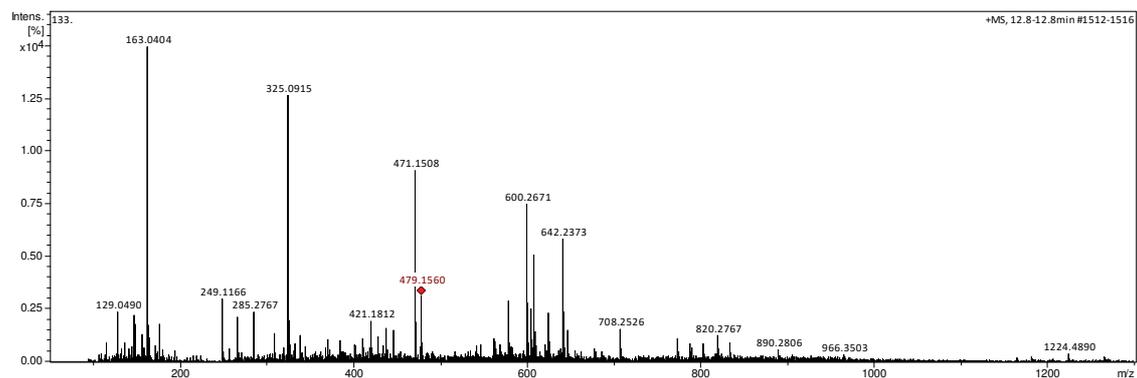


Figura B119 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 61b) FrPe *n*But .

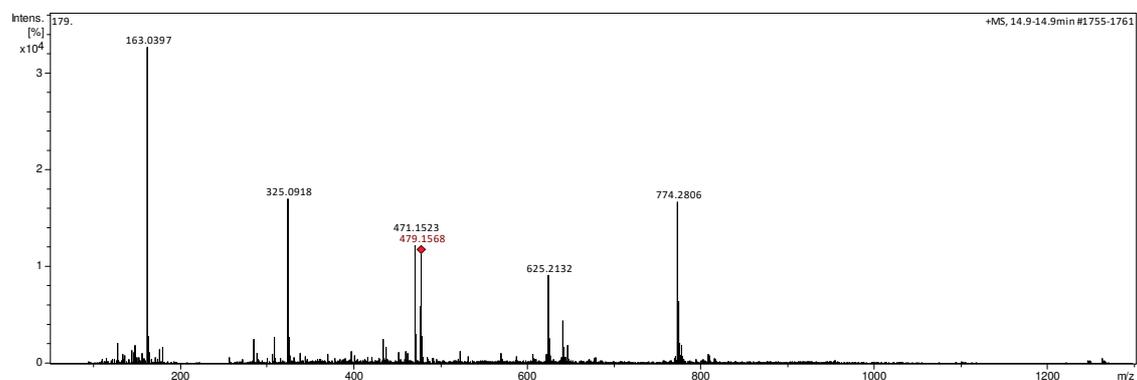


Figura B120 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,9 min (composto 45a) FrPe *n*But .

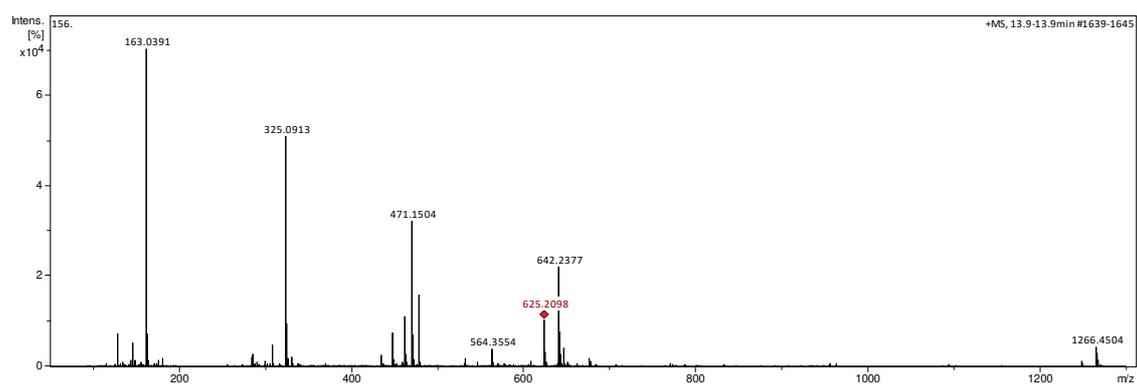


Figura B121 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 45b) FrPe *n*But .

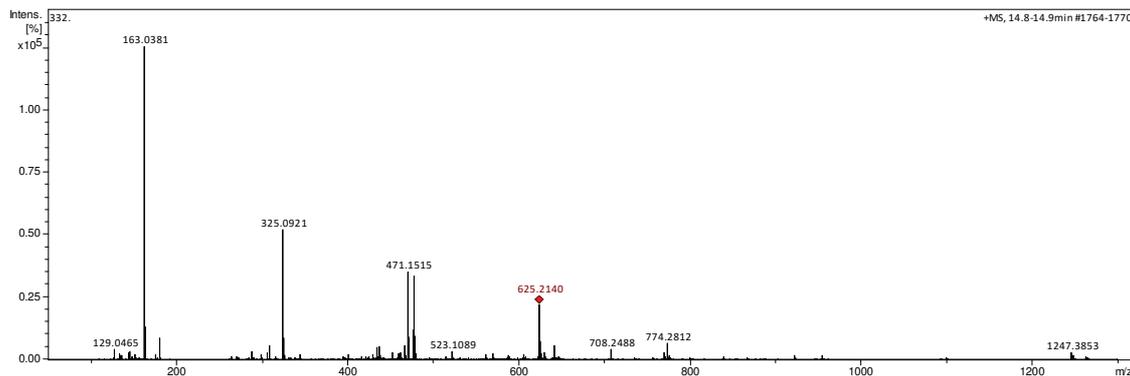


Figura B122 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 15,6 min (composto 65) FrPe *n*But .

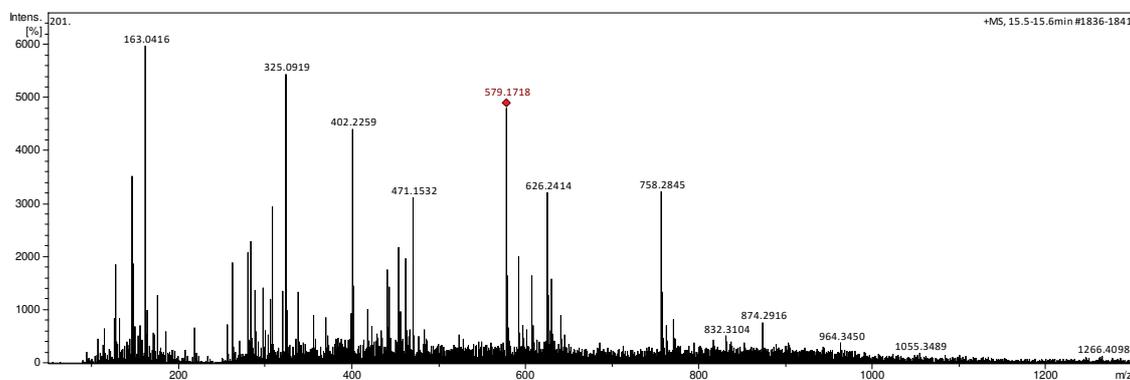


Figura B123 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 16,0 min (composto 66) FrPe *n*But .

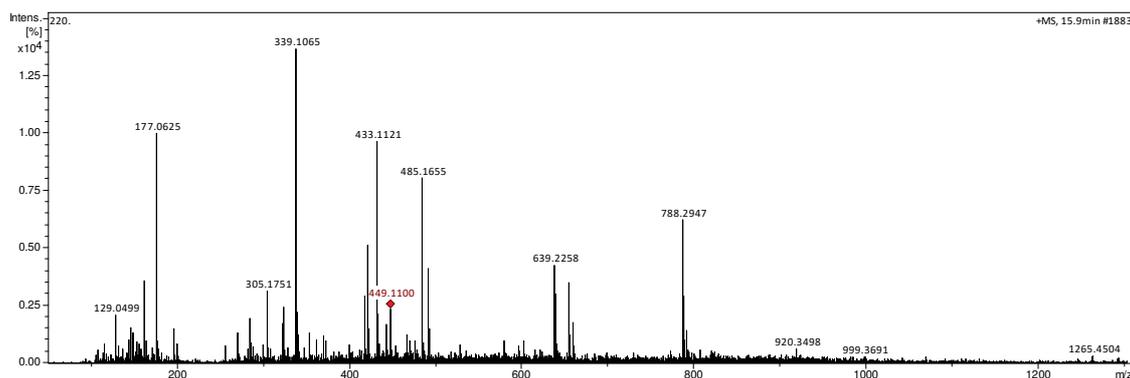


Figura B124 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 15,9 min (composto 67) FrPe *n*But .

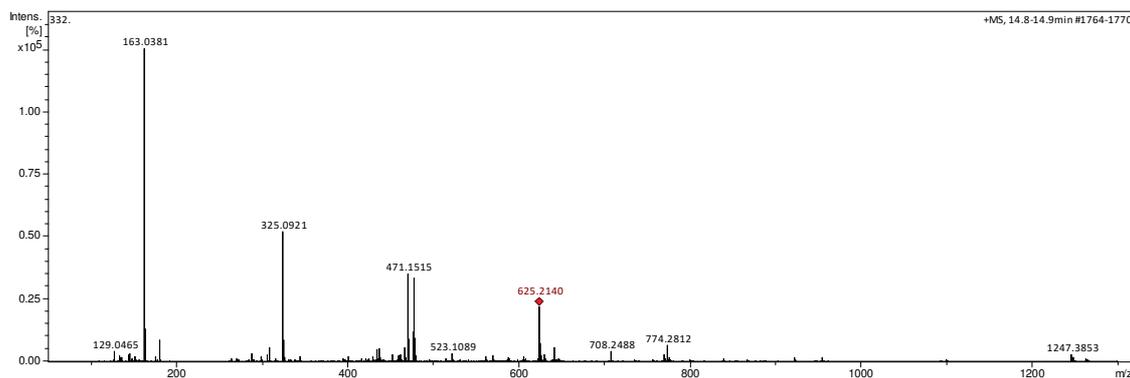


Figura B125 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 16,1 min (composto 68) FrPe *n*But .

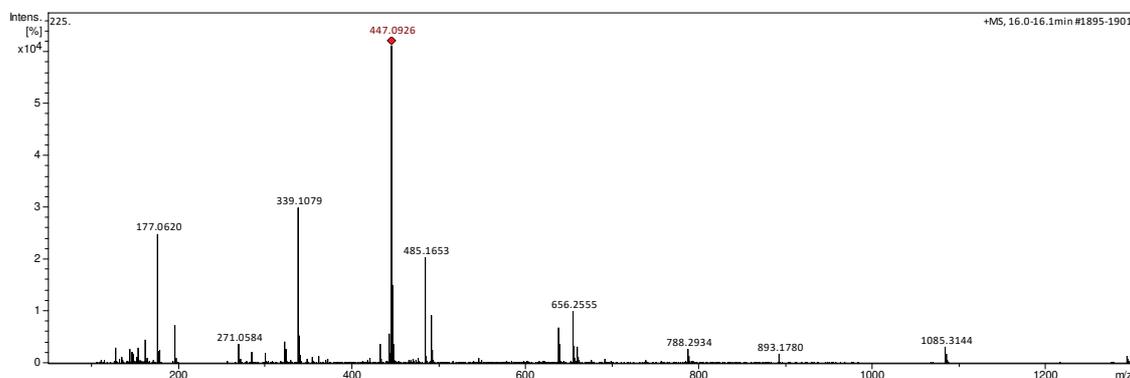


Figura B126 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 69) FrPe *n*But .

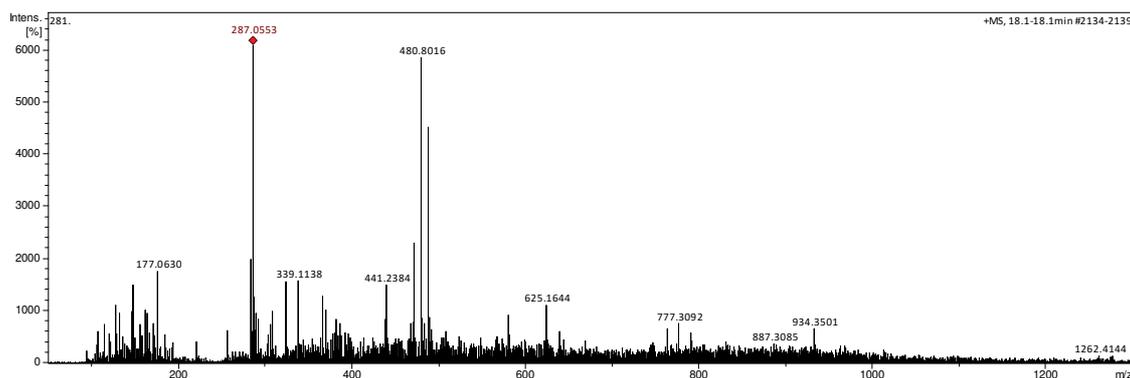


Figura B127 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,3 min (composto 70) FrPe *n*But .

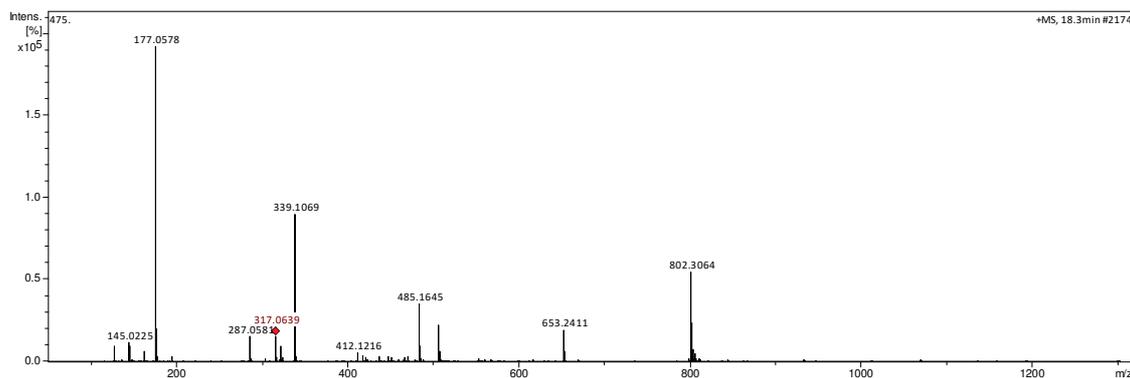


Figura B128 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,2 min (composto 46) FrPe *n*But .

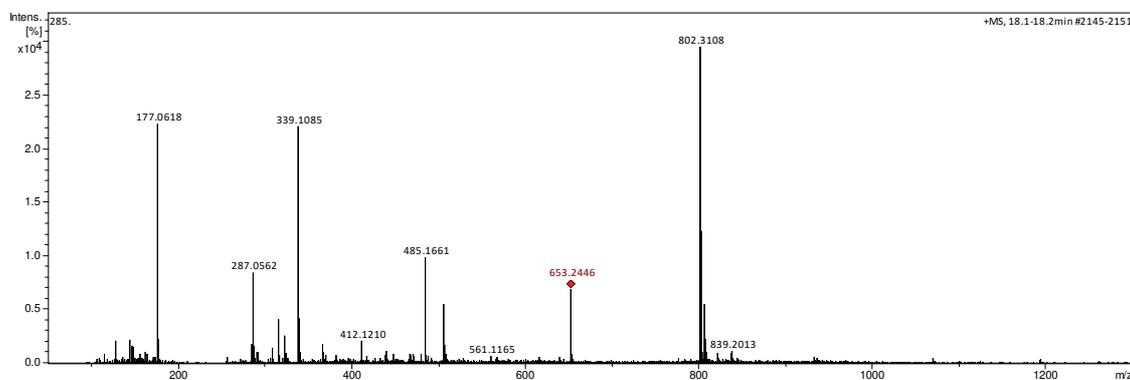


Figura B129 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,3 min (composto 71) FrPe *n*But .

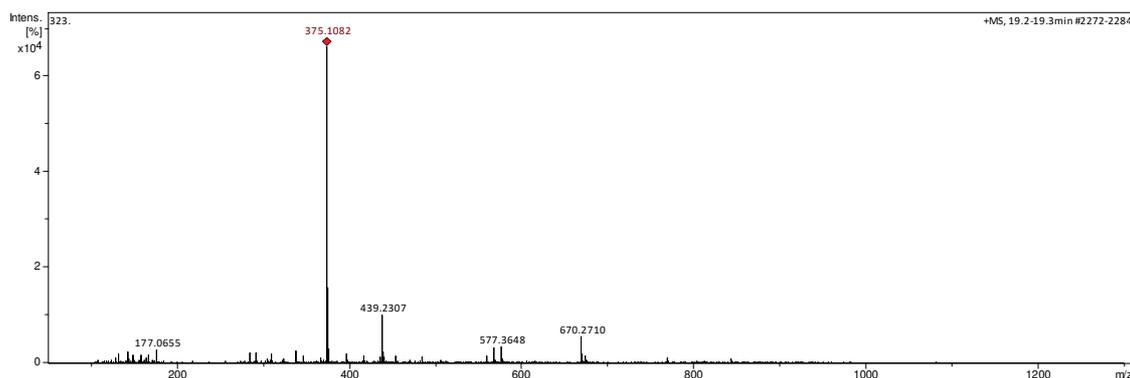


Figura B130 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,5 min (composto 72) FrPe *n*But .

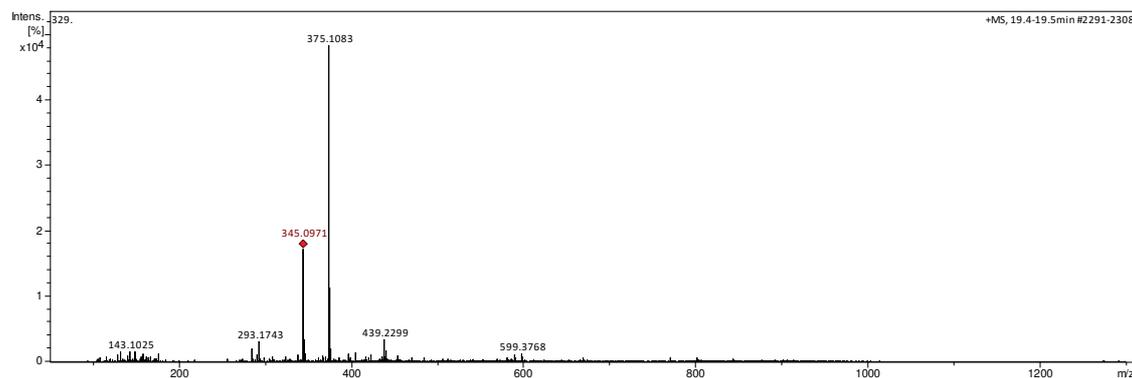


Figura B131 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 20,2 min (composto 73) FrPe *n*But .

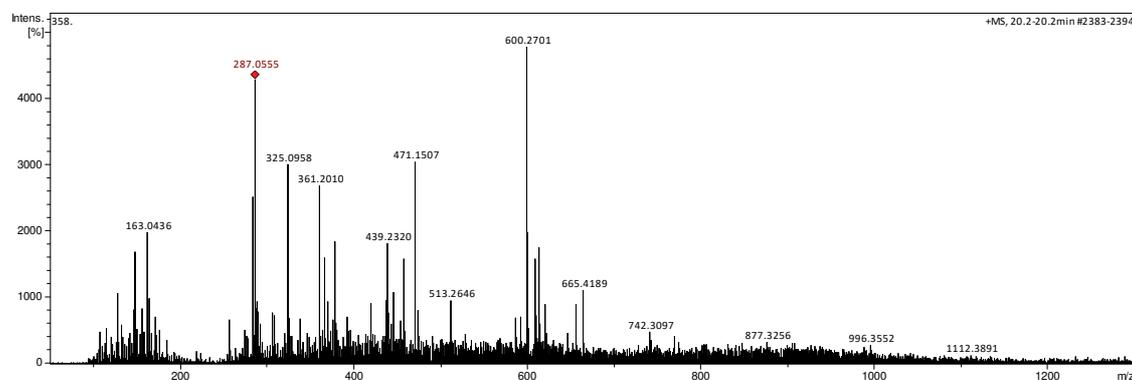


Figura B132 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 21,0 min (composto 75) FrPe *n*But .

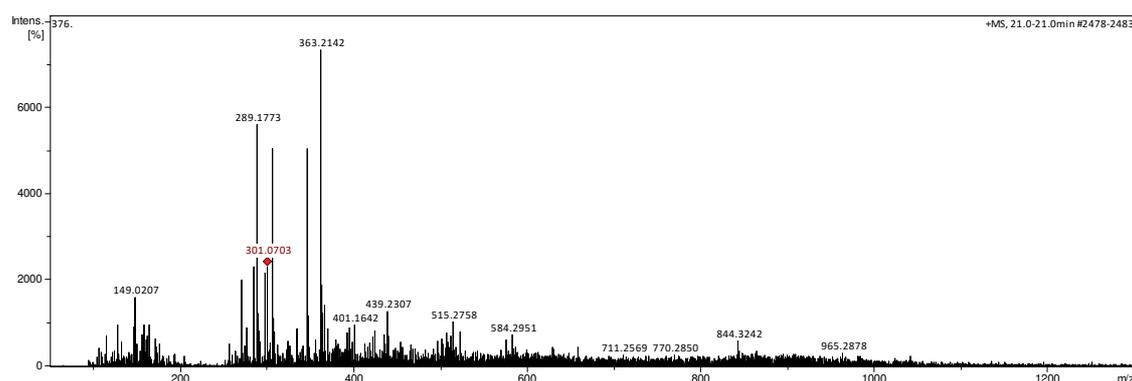


Figura B133 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 21,8 min (composto 76) FrPe *n*But .

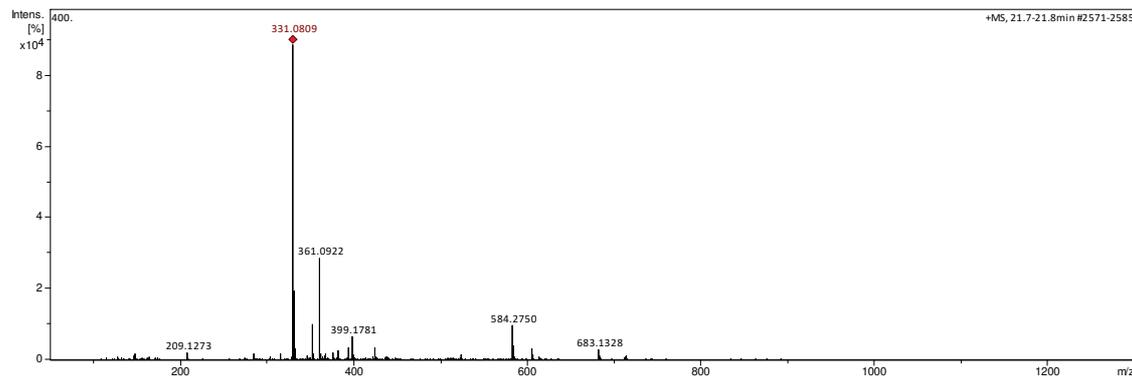


Figura B134 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 21,15 min (composto 77) FrPe *n*But .

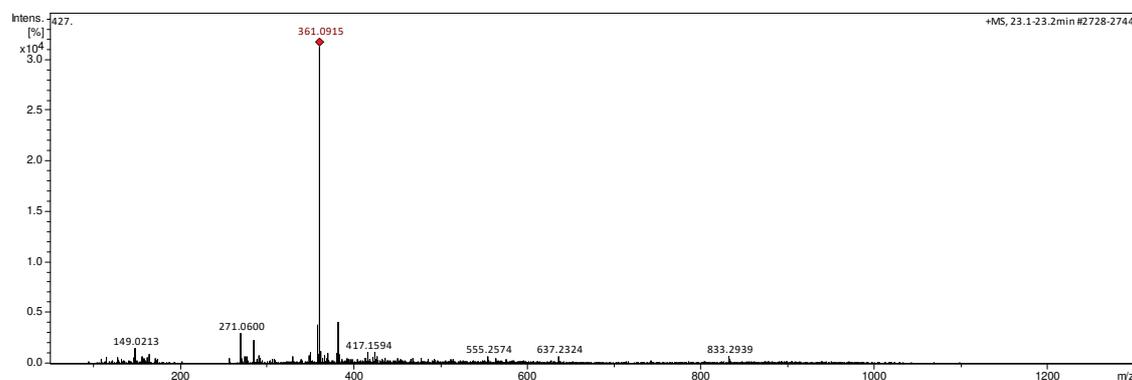


Figura B135 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 24,3 min (composto 78) FrPe *n*But .

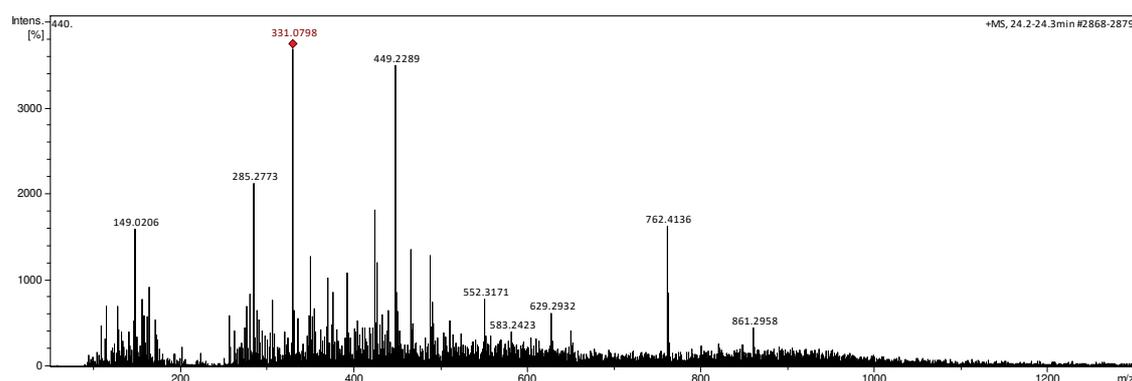


Figura B136 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,8 min (composto **53b**) FoPo *n*But .

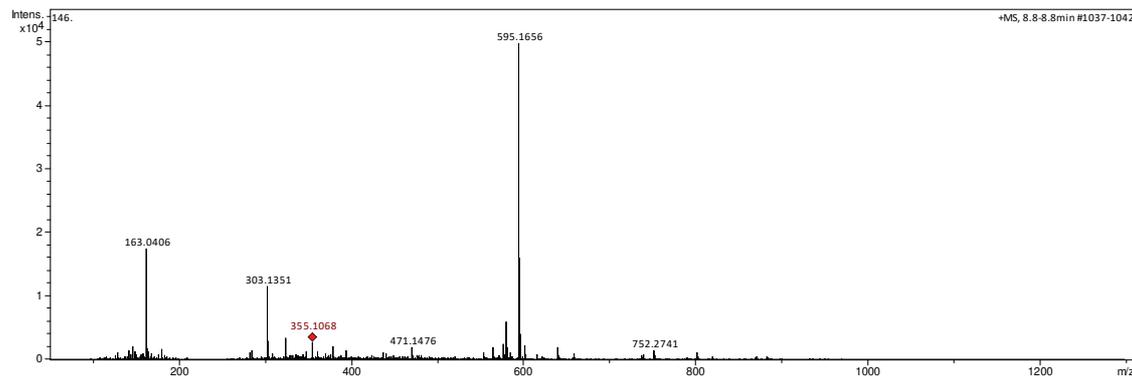


Figura B137 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,3 min (composto **2a**) FoPo *n*But .

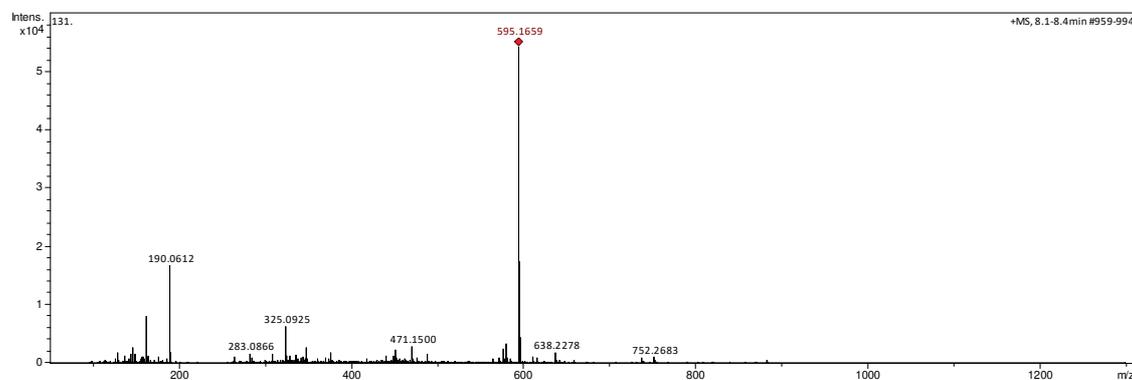


Figura B138 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,9 min (composto **2b**) FoPo *n*But .

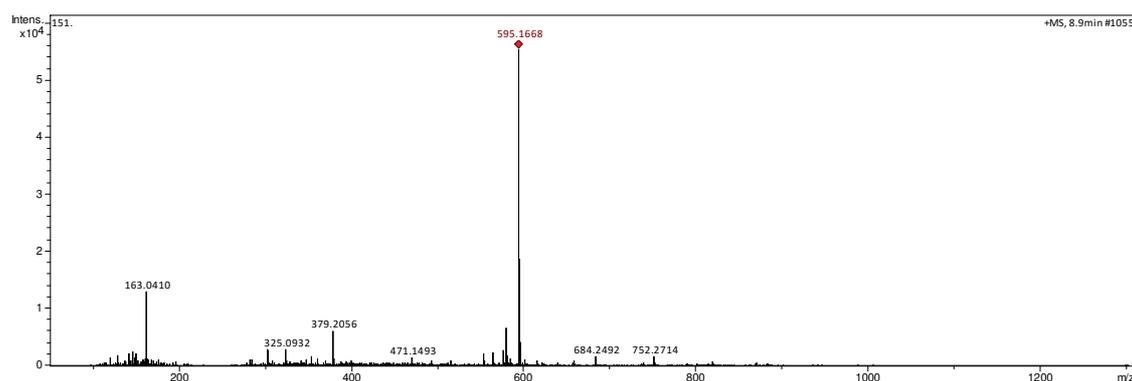


Figura B139 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 9,3 min (composto **3**) FoPo *n*But .

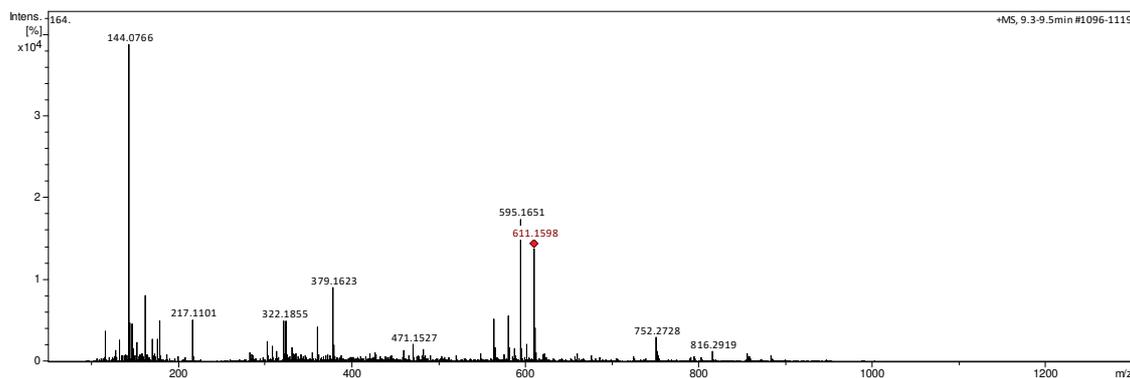


Figura B140 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 10,0 min (composto **56a**) FoPo *n*But .

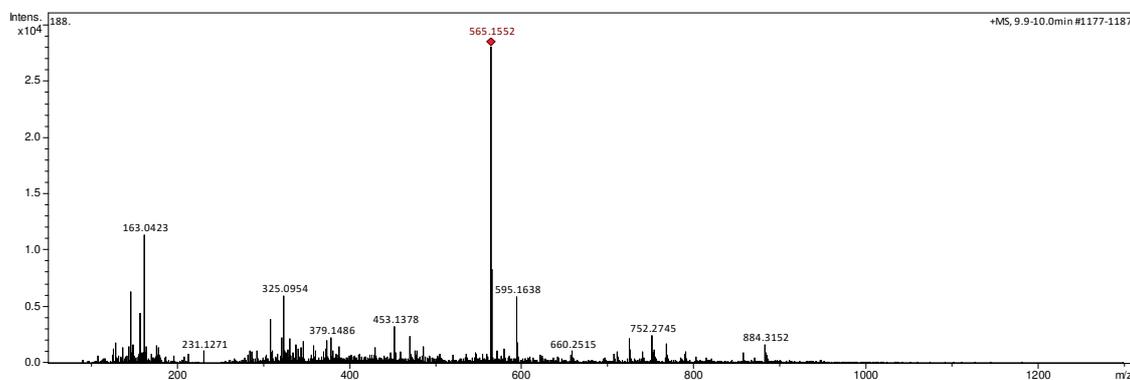


Figura B141 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 11,3 min (composto **56b**) FoPo *n*But .

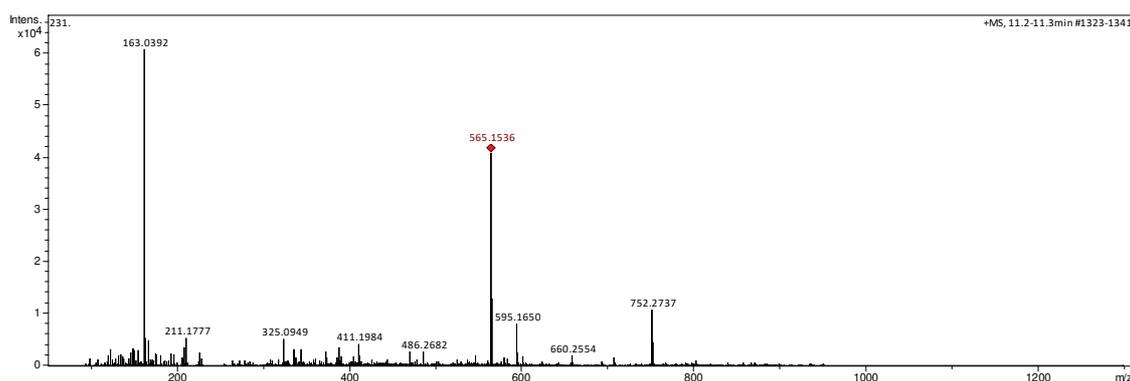


Figura B142 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,2 min (composto 58) FoPo *n*But .

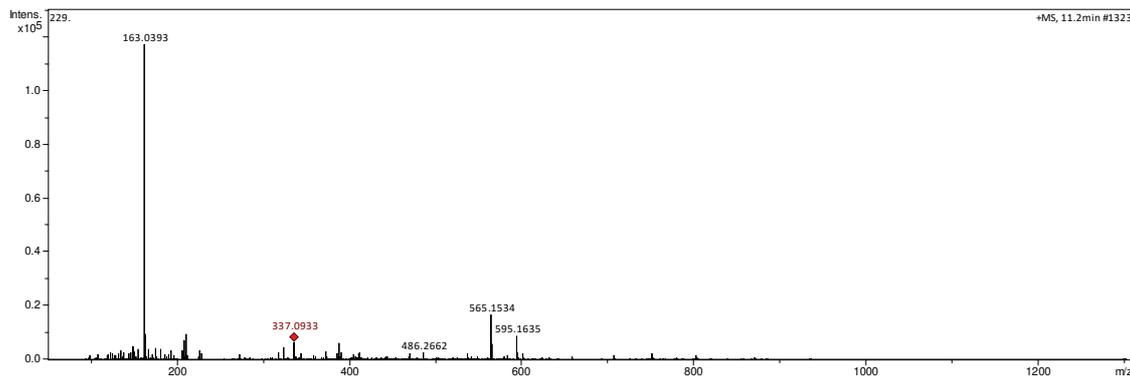


Figura B143 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,5 min (composto 59) FoPo *n*But .

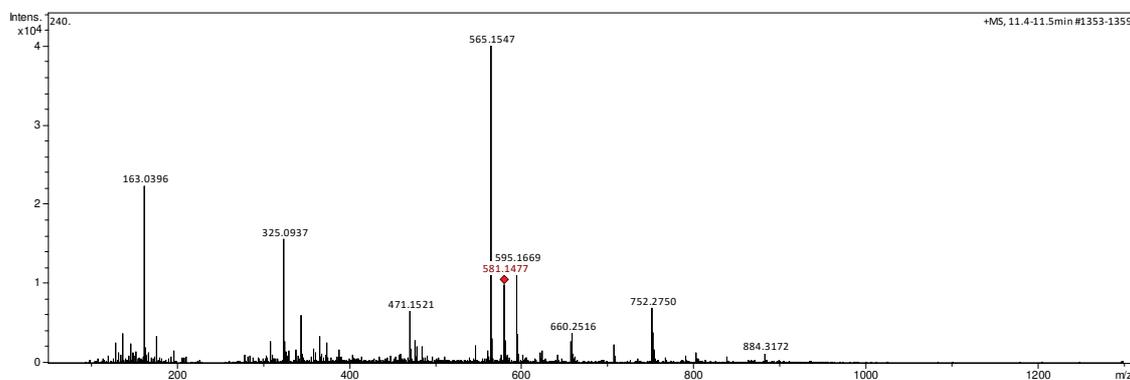


Figura B144 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,1 min (composto 60) FoPo *n*But .

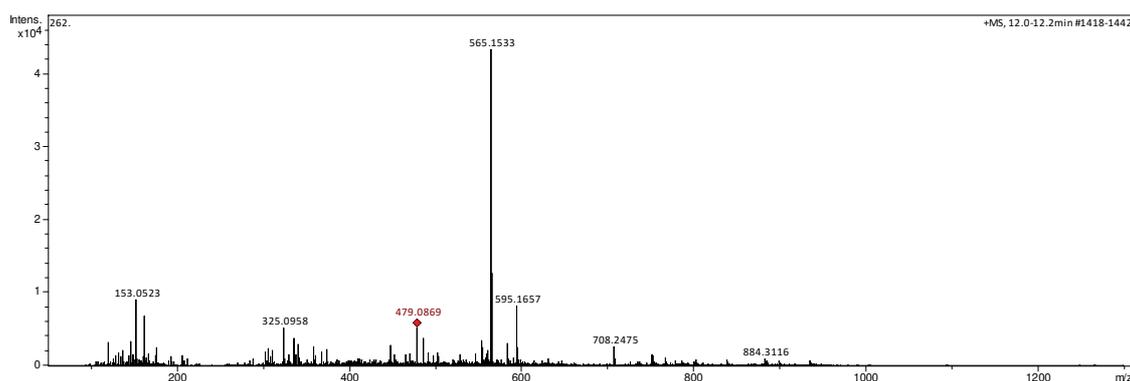


Figura B145 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,7 min (composto 61a) FoPo *n*But .

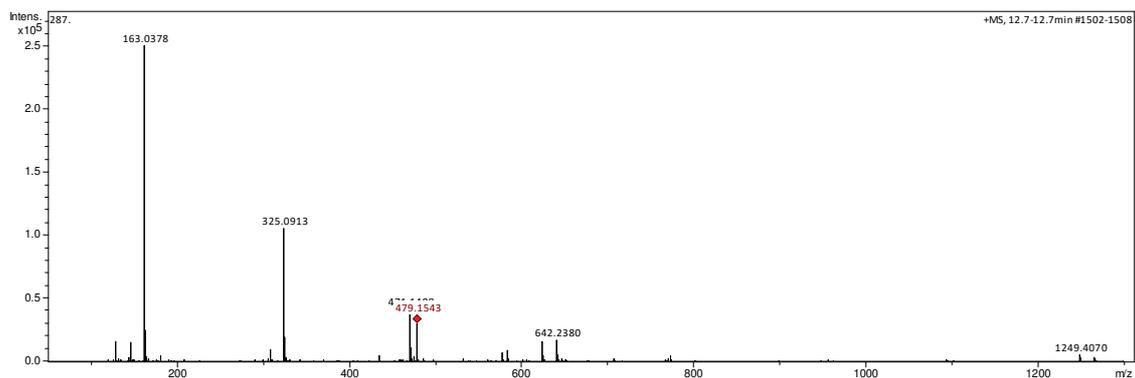


Figura B146 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,8 min (composto 61b) FoPo *n*But .

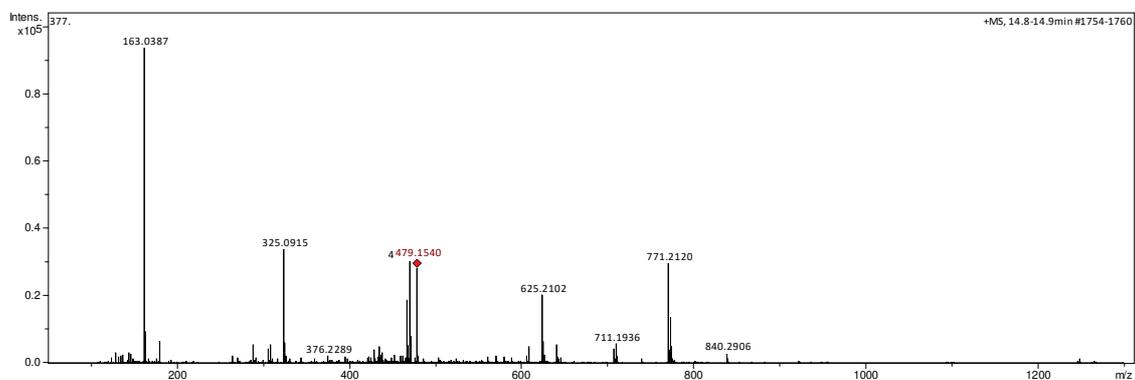


Figura B147 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,9 min (composto 45a) FoPo *n*But .

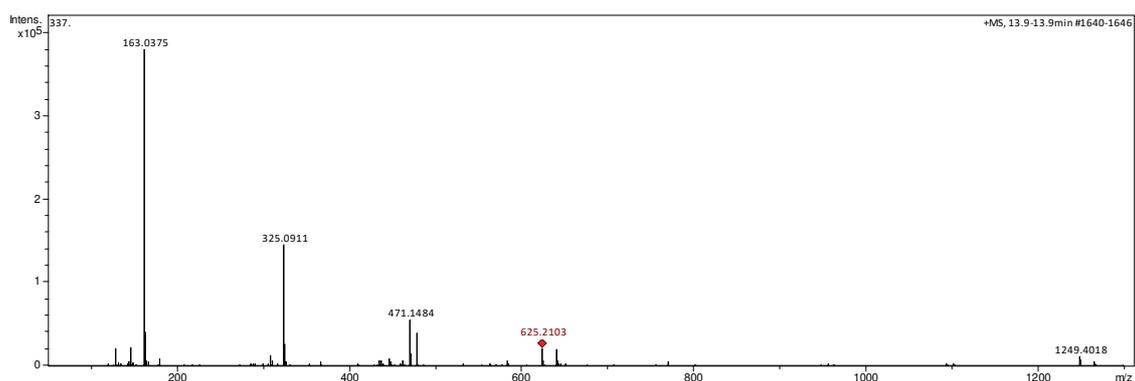


Figura B148 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 45b) FoPo *n*But .

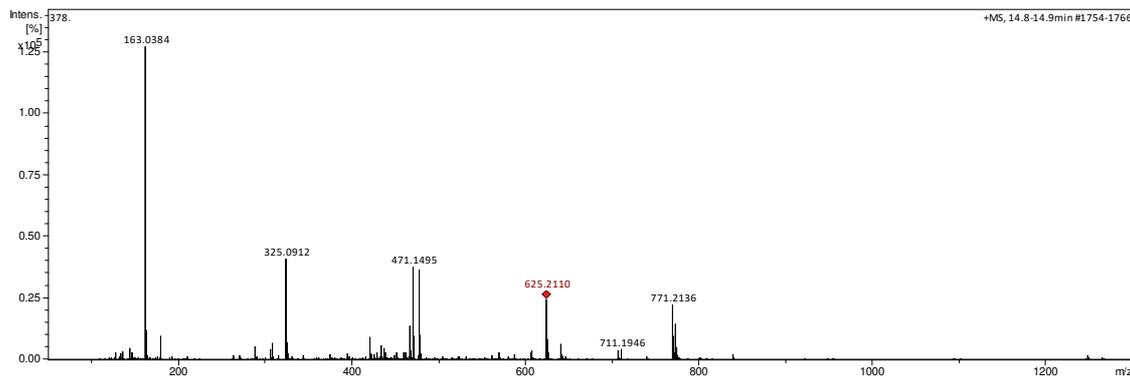


Figura B149 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,1 min (composto 63) FoPo *n*But .

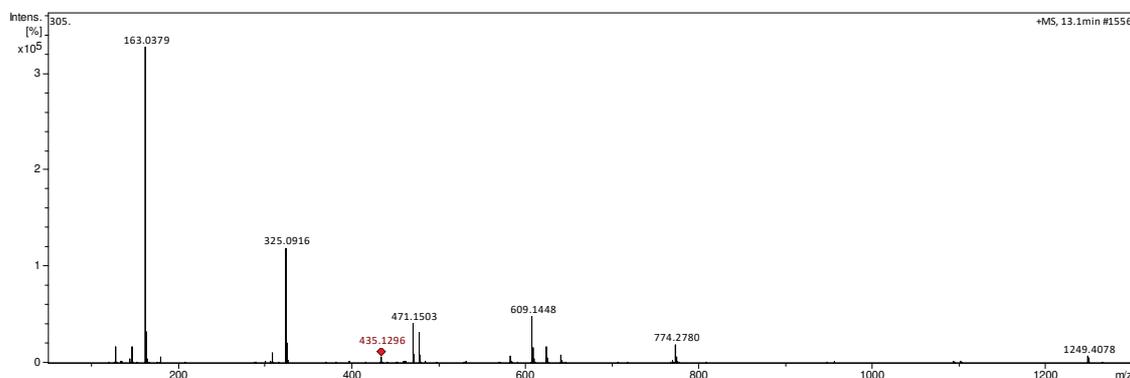


Figura B150 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,5 min (composto 64) FoPo *n*But .

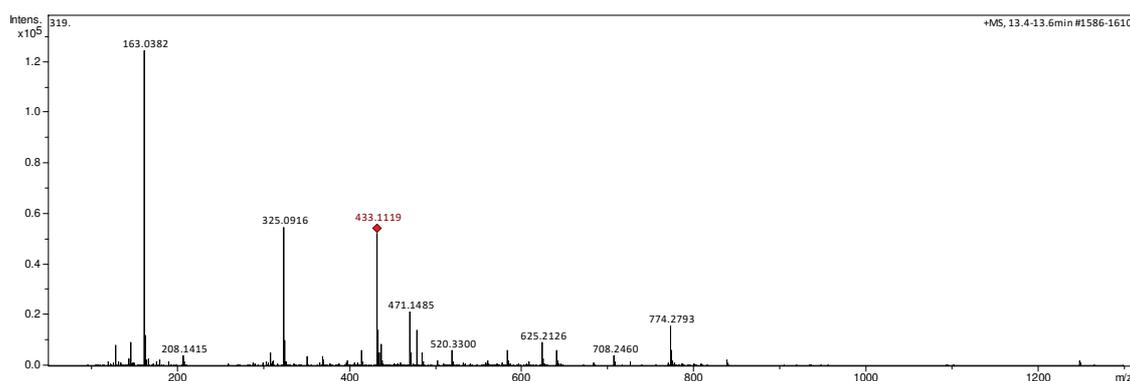


Figura B151 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 16,0 min (composto 67) FoPo *n*But .

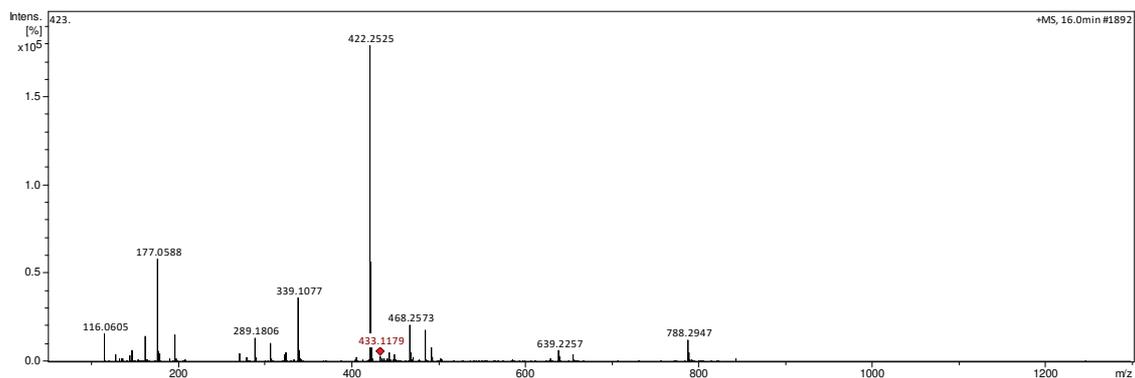


Figura B152 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 16,2 min (composto 68) FoPo *n*But .

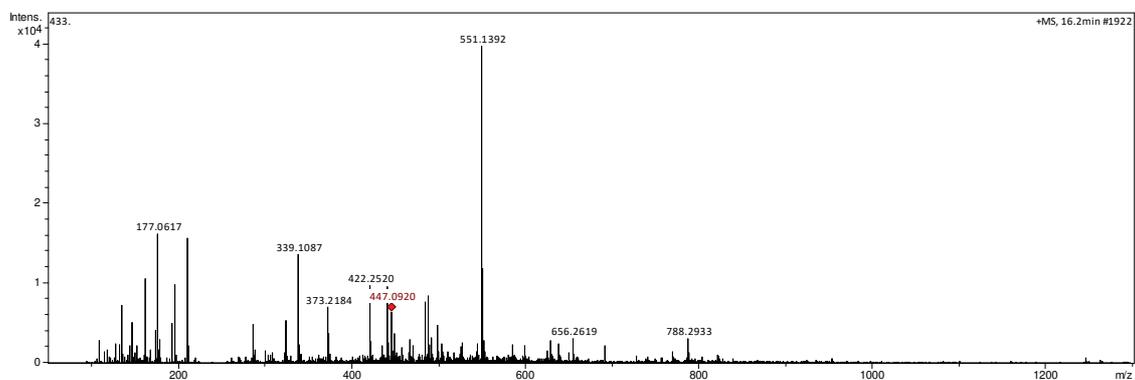


Figura B153 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 69) FoPo *n*But .

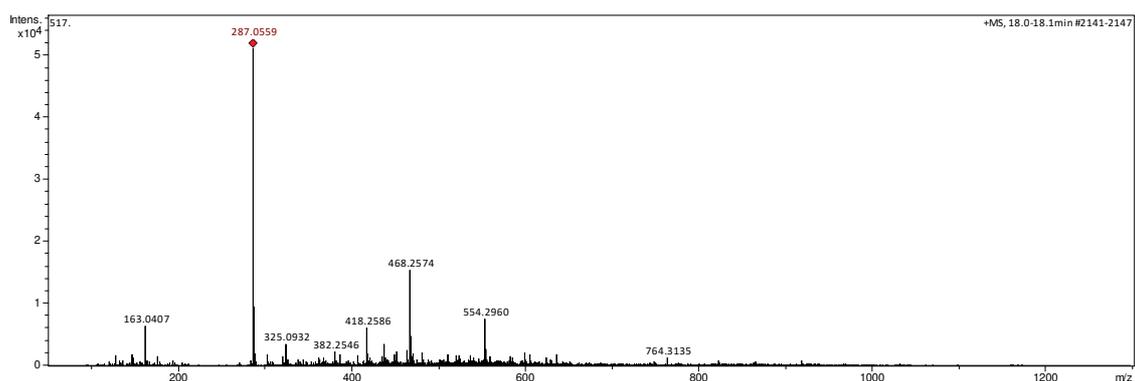


Figura B154 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 70) FoPo *n*But .

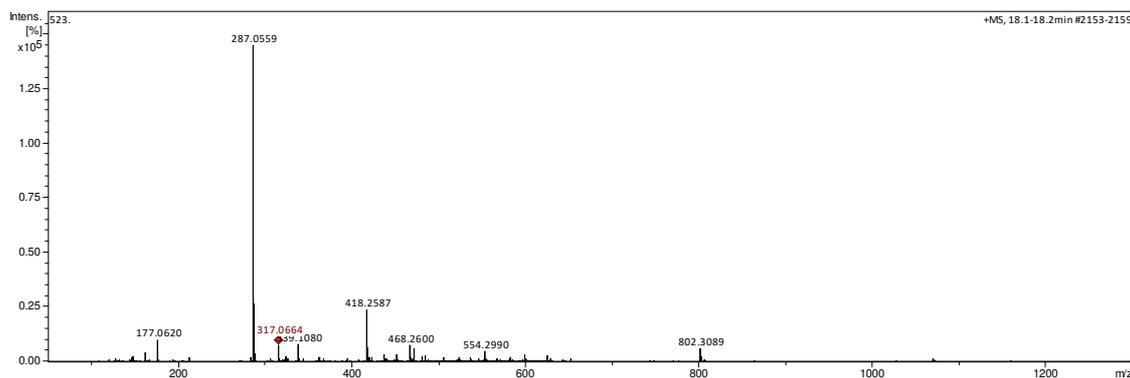


Figura B155 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,6 min (composto 46) FoPo *n*But .

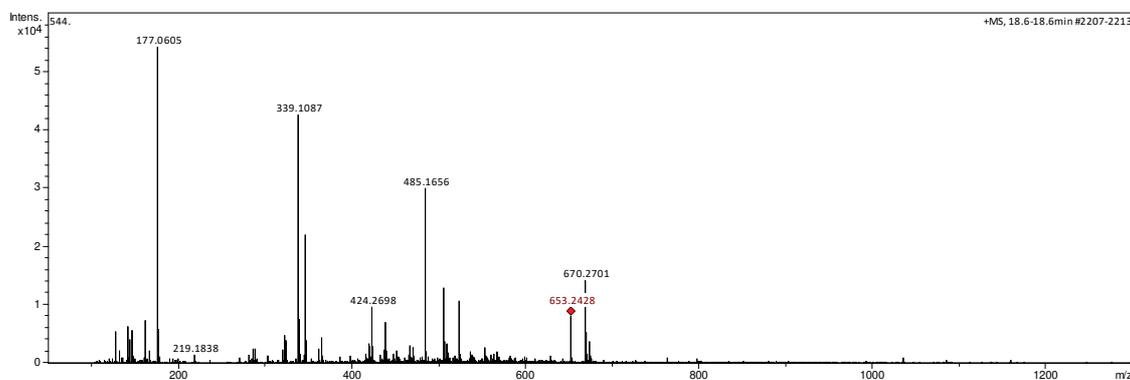


Figura B156 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,3 min (composto 71) FoPo *n*But .

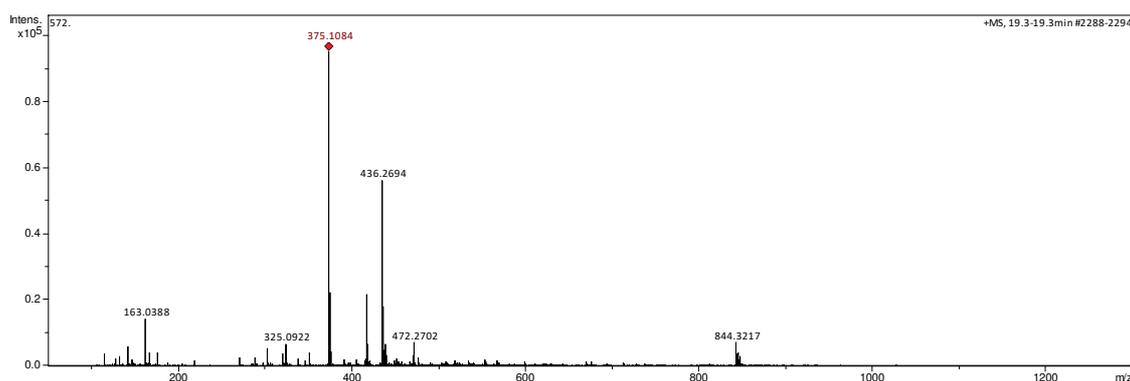


Figura B157 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,4 min (composto 72) FoPo *n*But .

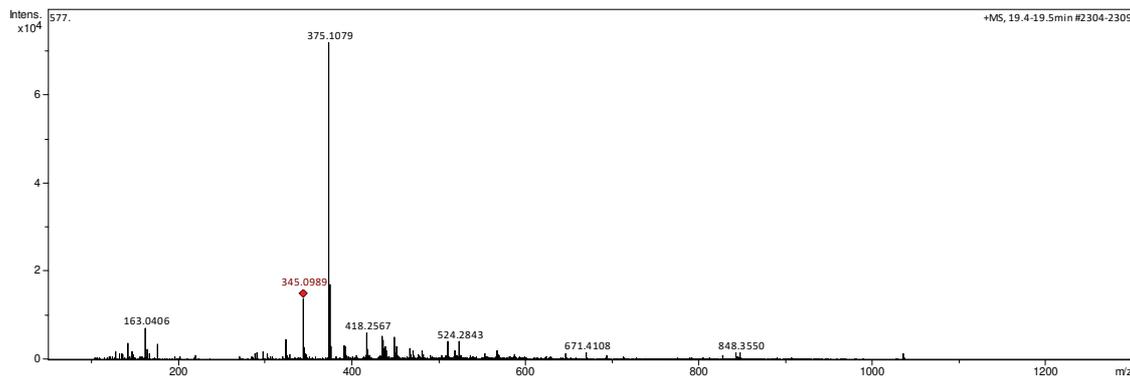


Figura B158 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 21,8 min (composto 76) FoPo *n*But fração

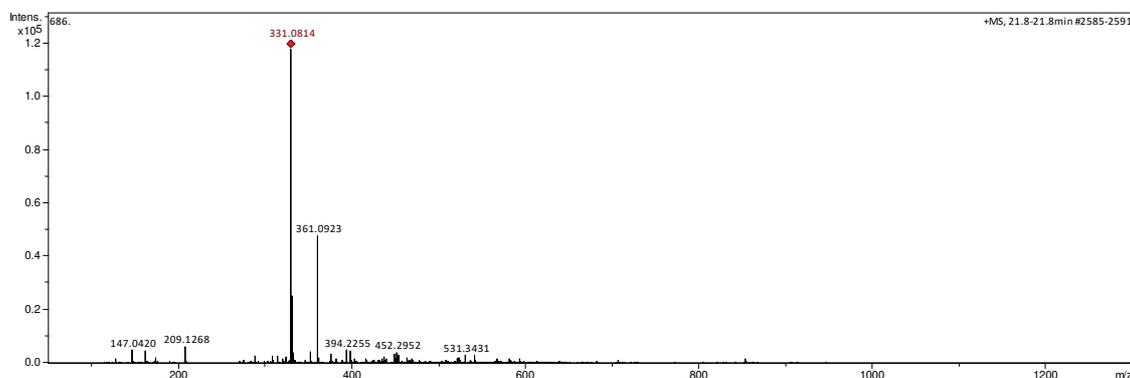


Figura B159 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 23.1 min (composto 77) FoPo *n*But fração

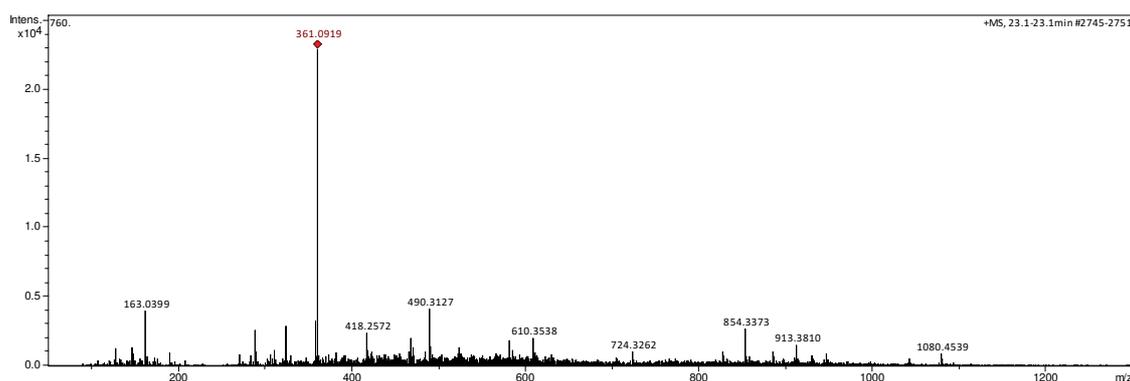


Figura B160 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 2,9 min (composto **53a**) FoPe *n*but .

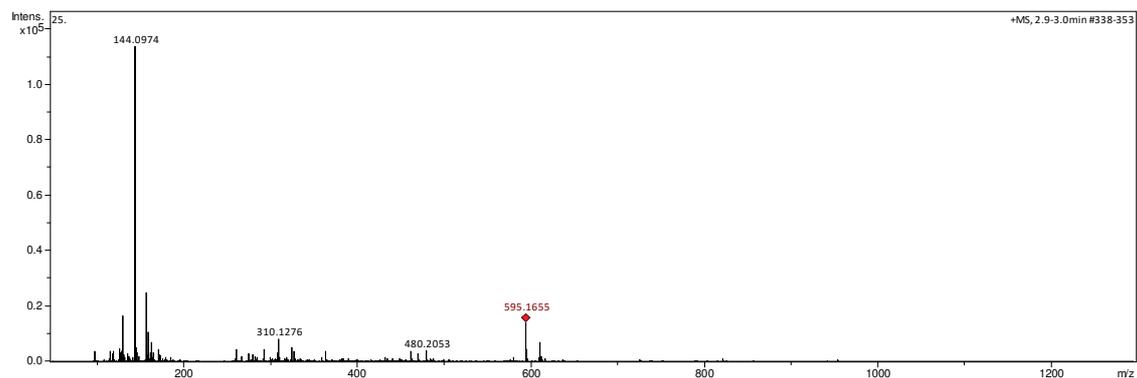


Figura B161 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 8,2 min (composto **2a**) FoPe *n*but .

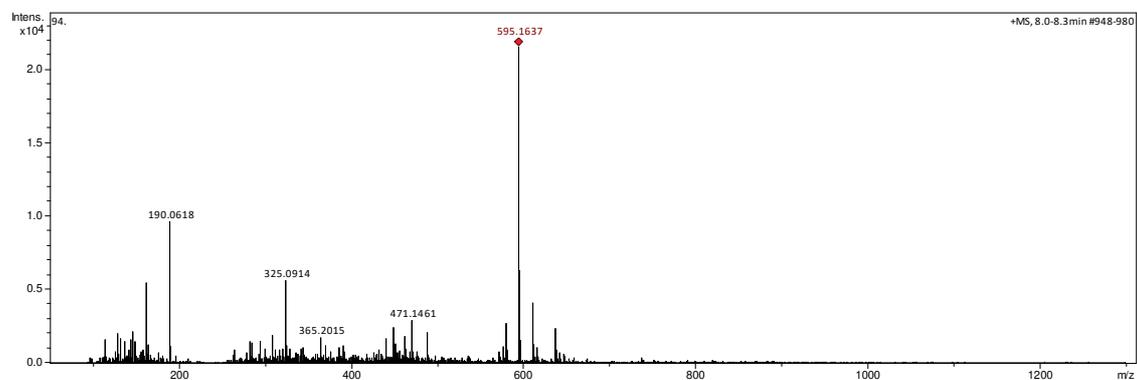


Figura B162 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,8 min (composto **2b**) FoPe *n*but .

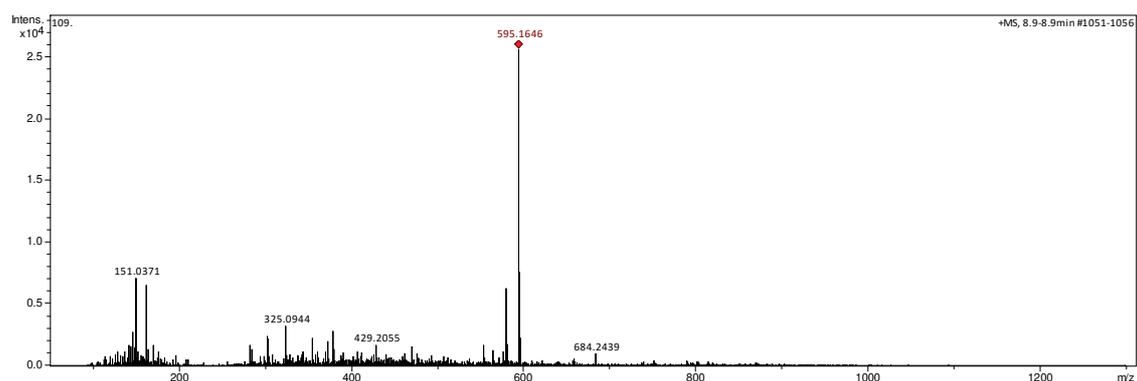


Figura B163 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 9,3 min (composto **3**) FoPe *n*but .

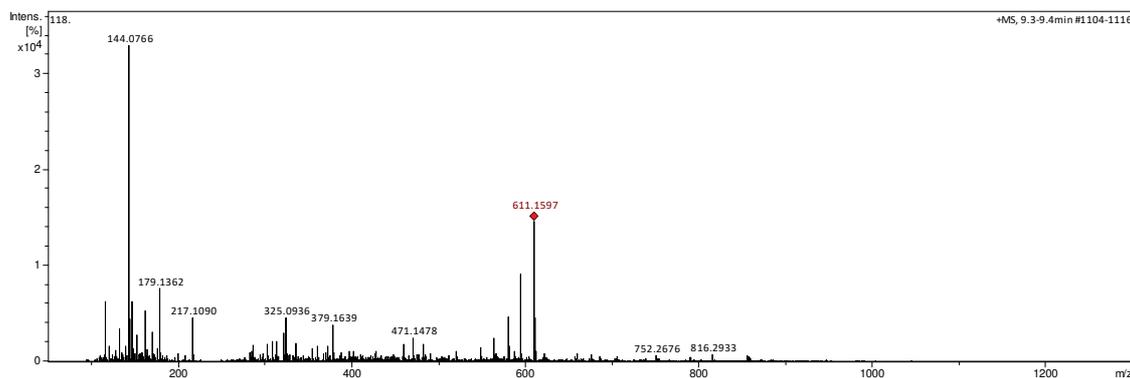


Figura B164 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 10,6 min (composto **56a**) FoPe *n*but .

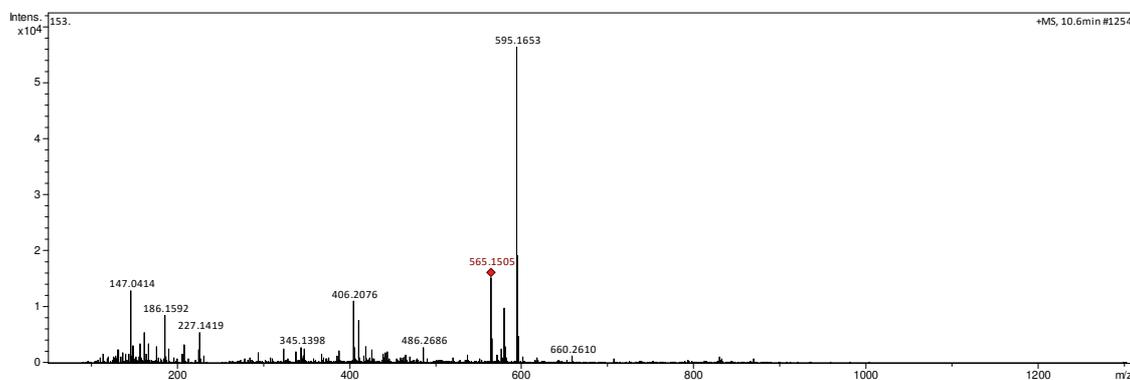


Figura B165 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 11,3 min (composto **56b**) FoPe *n*but .

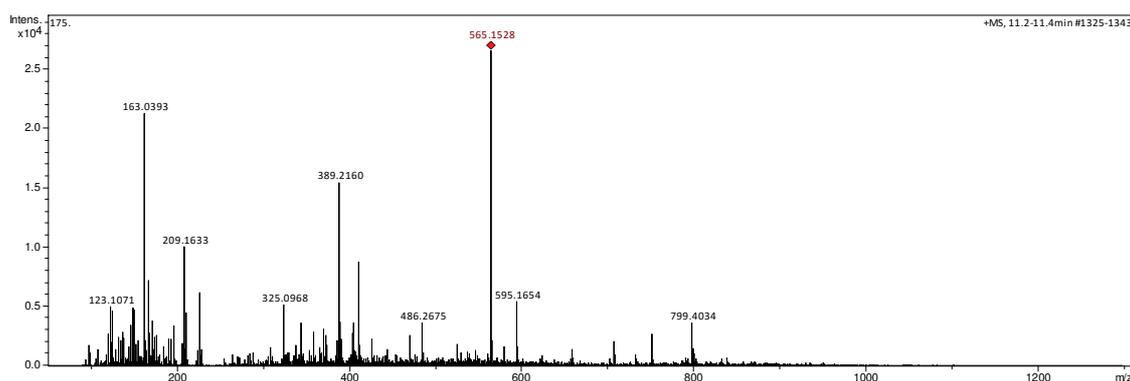


Figura B166 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 10,8 min (composto 5) FoPe *n*but .

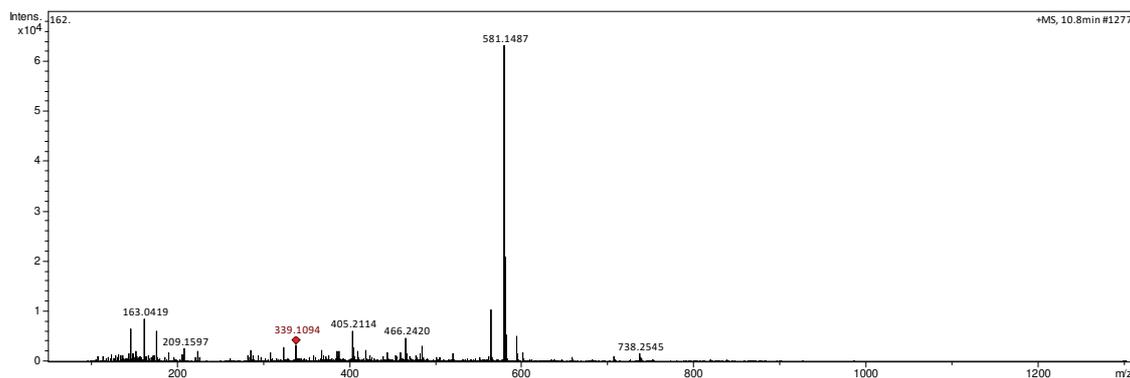


Figura B167 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,1 min (composto 60) FoPe *n*but .

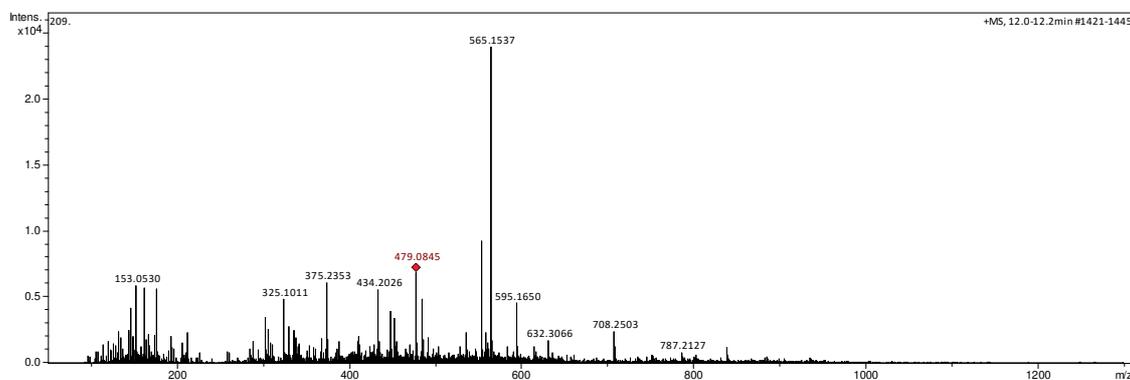


Figura B168 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 12,7 min (composto 61a) FoPe *n*but .

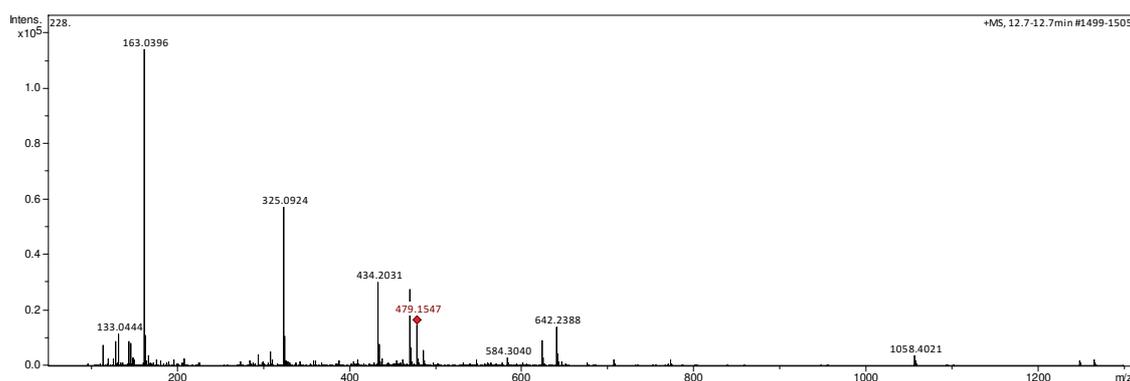


Figura B169 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 61b) FoPe *nbut* .

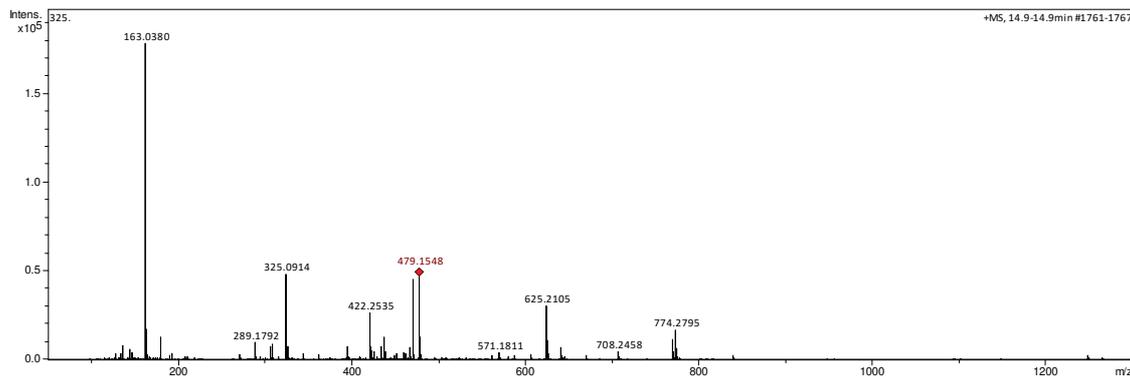


Figura B170 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,4 min (composto 64) FoPe *nbut* .

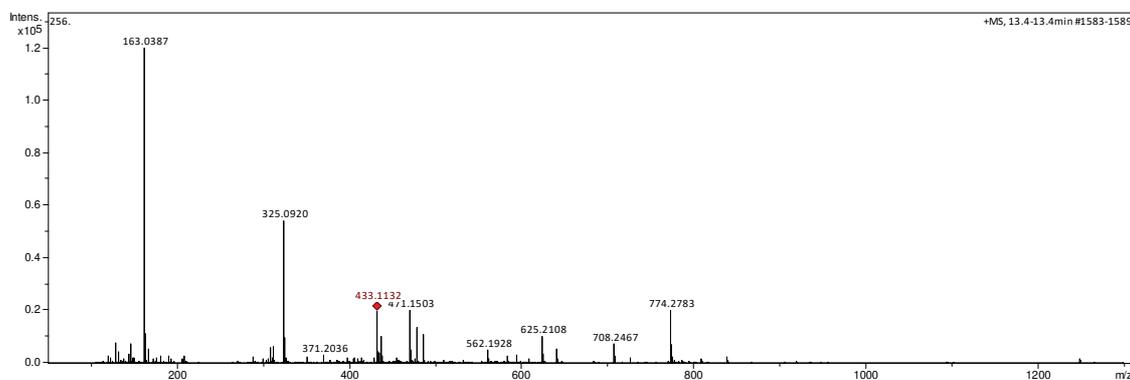


Figura B171 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 13,9 min (composto 45a) FoPe *nbut* .

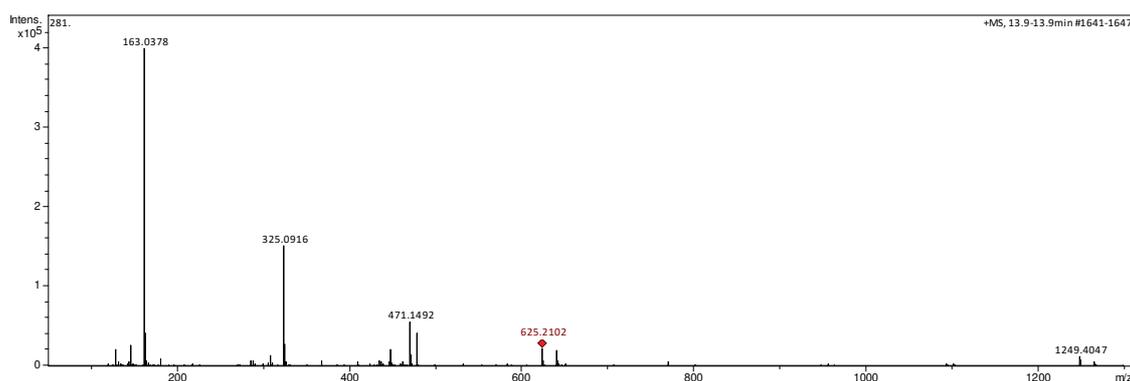


Figura B172 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 14,9 min (composto 45b) FoPe *n*but .

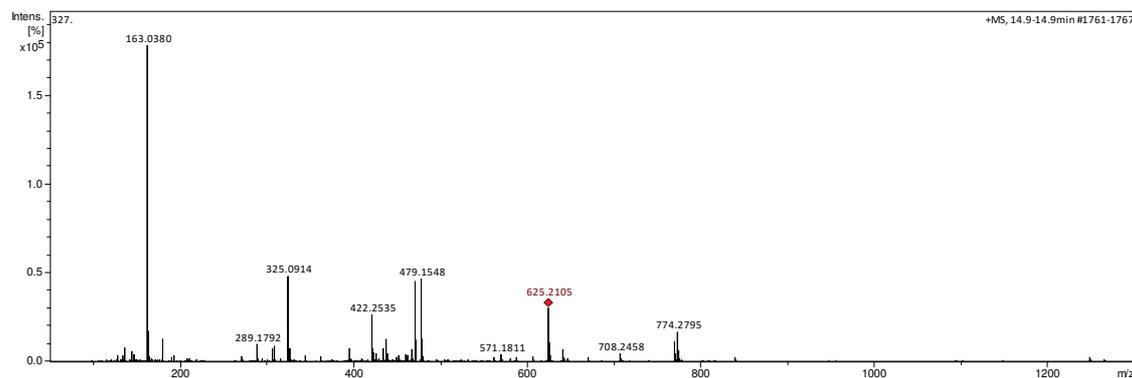


Figura B173 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 16,0 min (composto 67) FoPe *n*but .

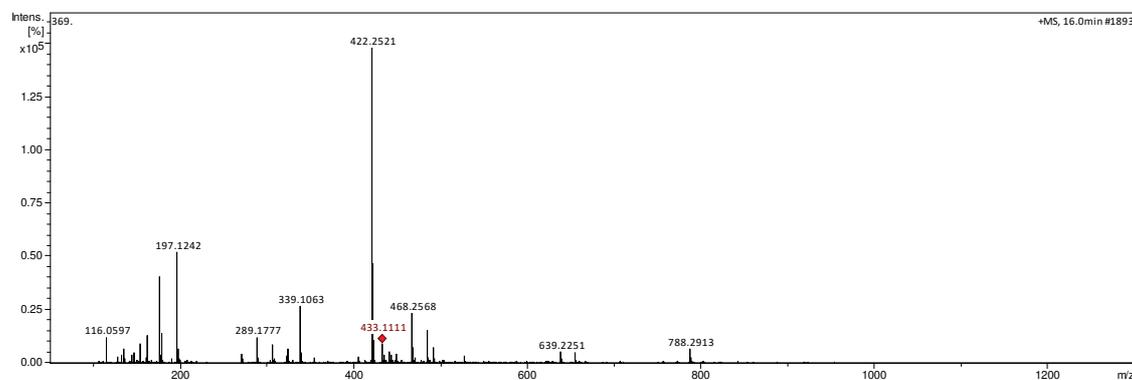


Figura B174 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,1 min (composto 69) FoPe *n*but .

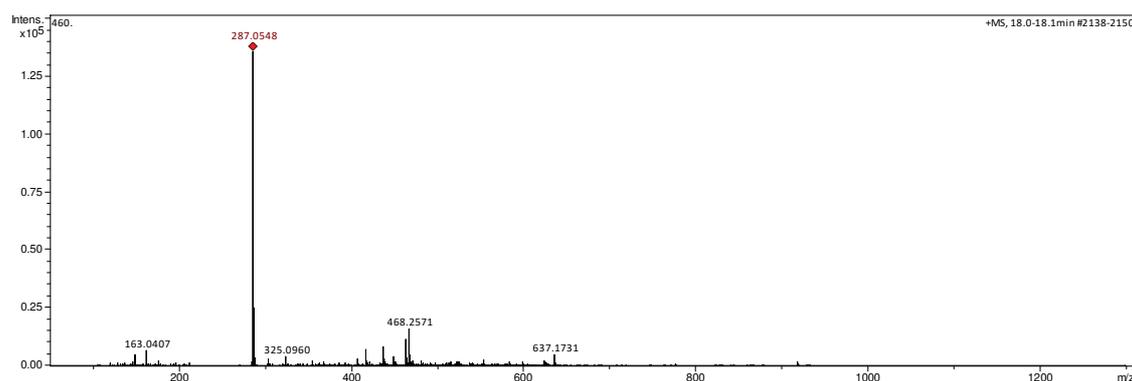


Figura B175 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,6 min (composto 46) FoPe *n*but .

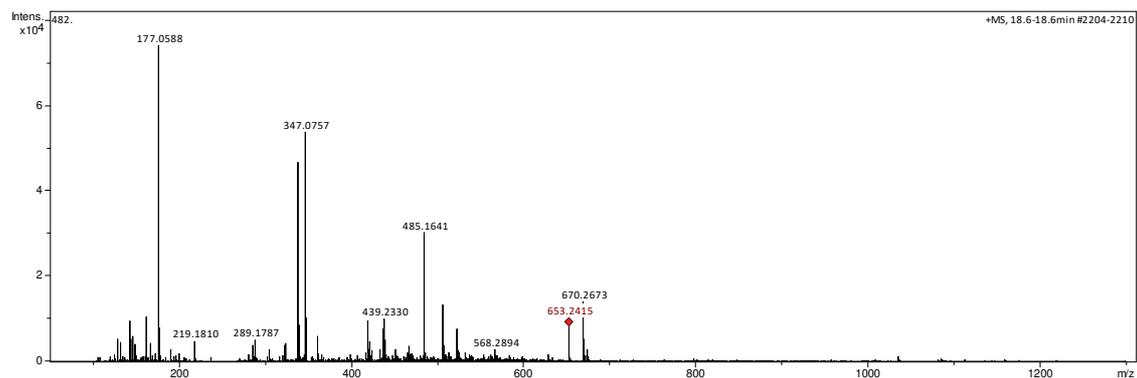


Figura B176 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 18,2 min (composto 70) FoPe *n*but .

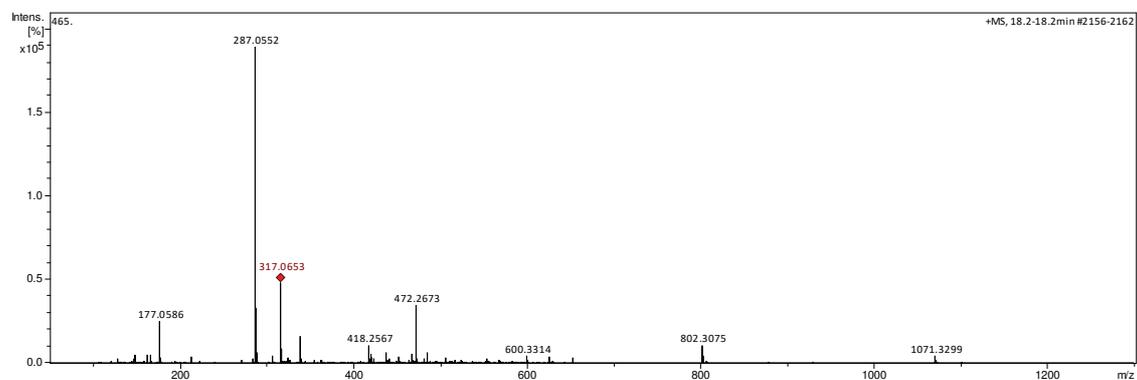


Figura B177 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,3 min (composto 71) FoPe *n*but .

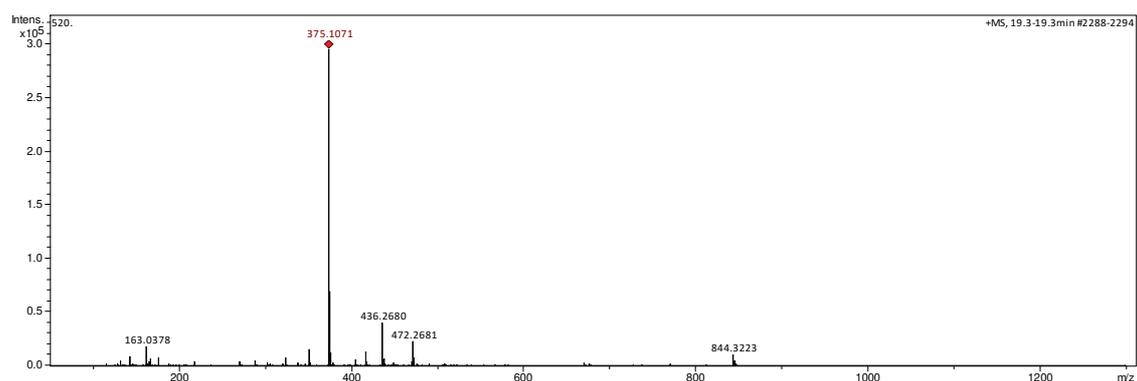


Figura B178 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 19,5 min (composto 72) FoPe *n*but.

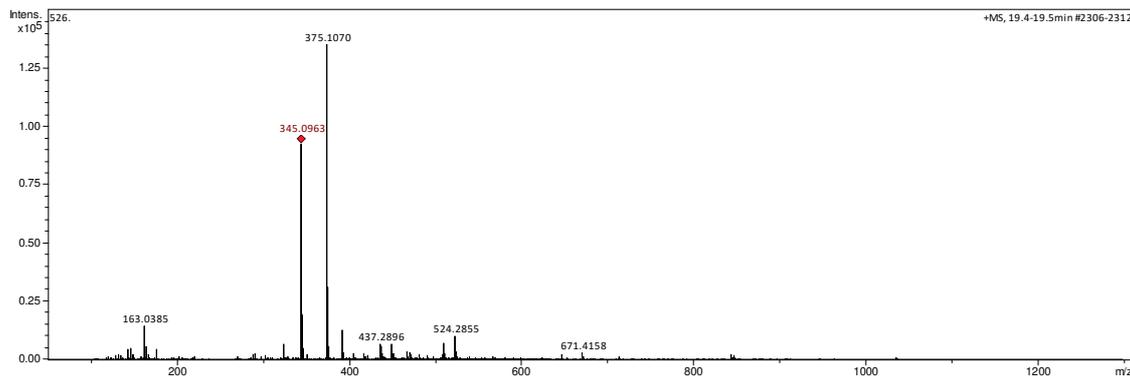


Figura B179 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 21,8 min (composto 76) FoPe *n*but.

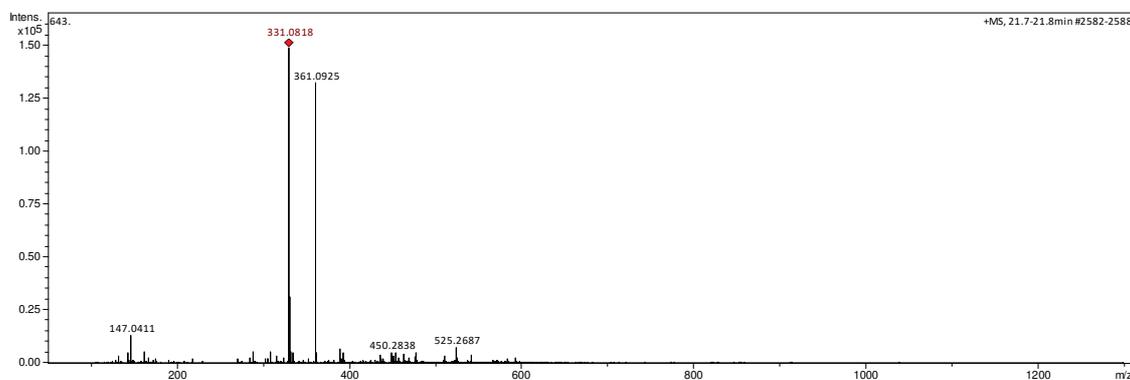


Figura B180 - EM-ESI(+) do sinal com tempo de retenção 23,1 min (composto 77) FoPe *n*but.

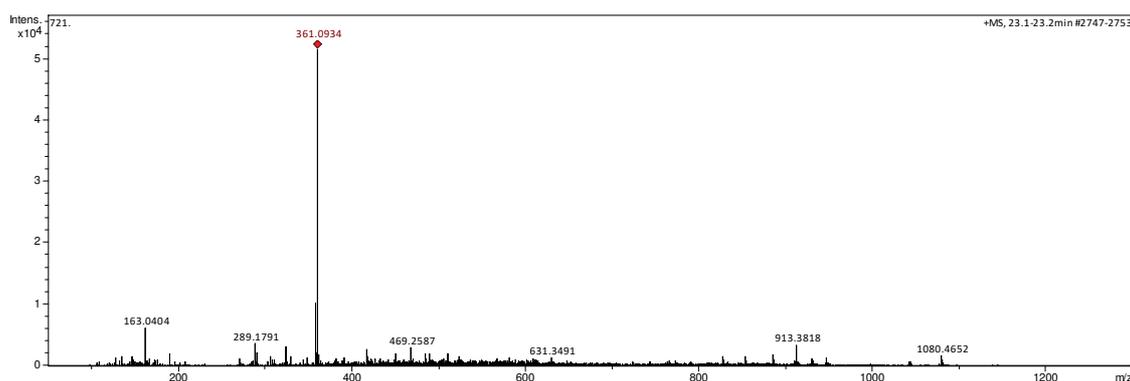
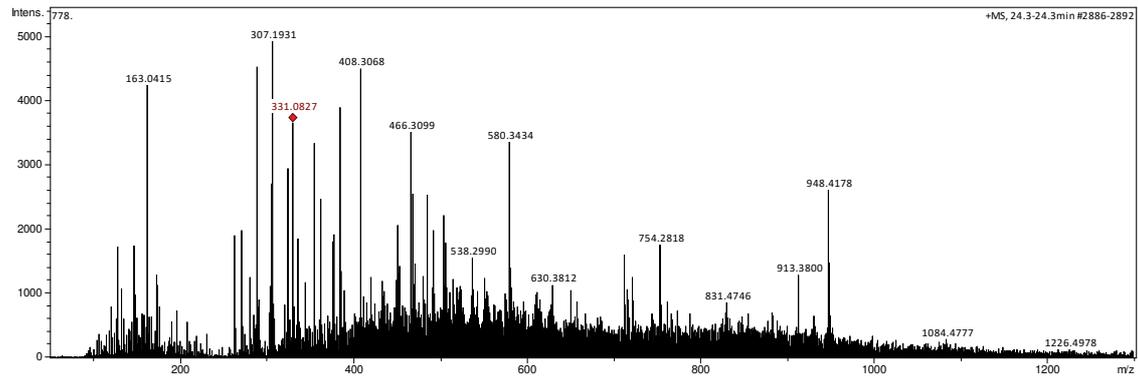


Figura B181 - EM-ESI-(+) do sinal com tempo de retenção 24,3 min (composto 78) FoPe *nbut*.



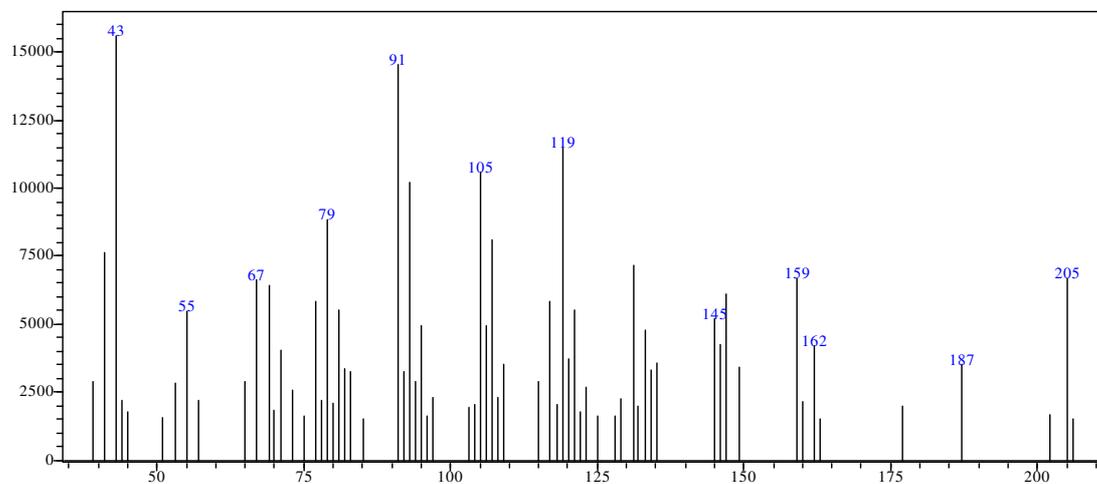
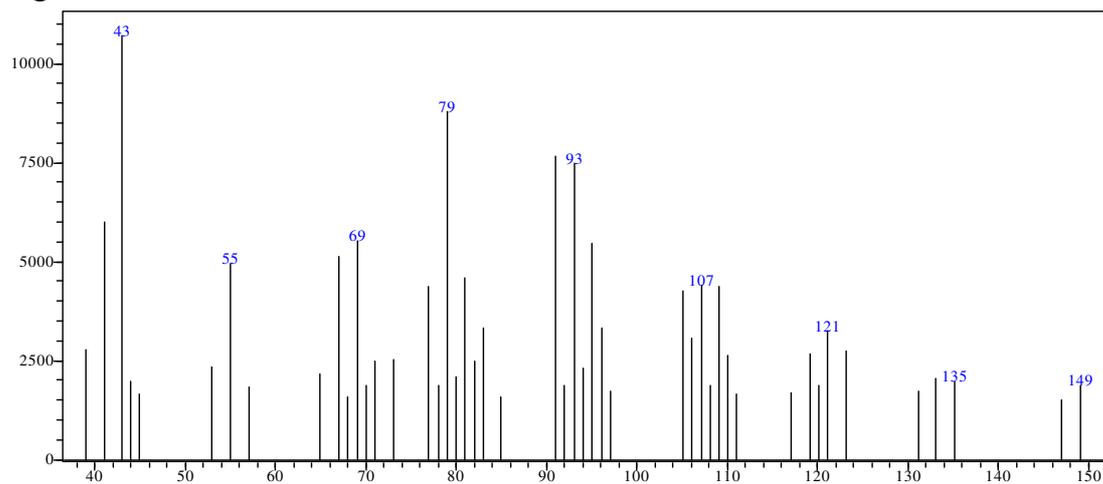
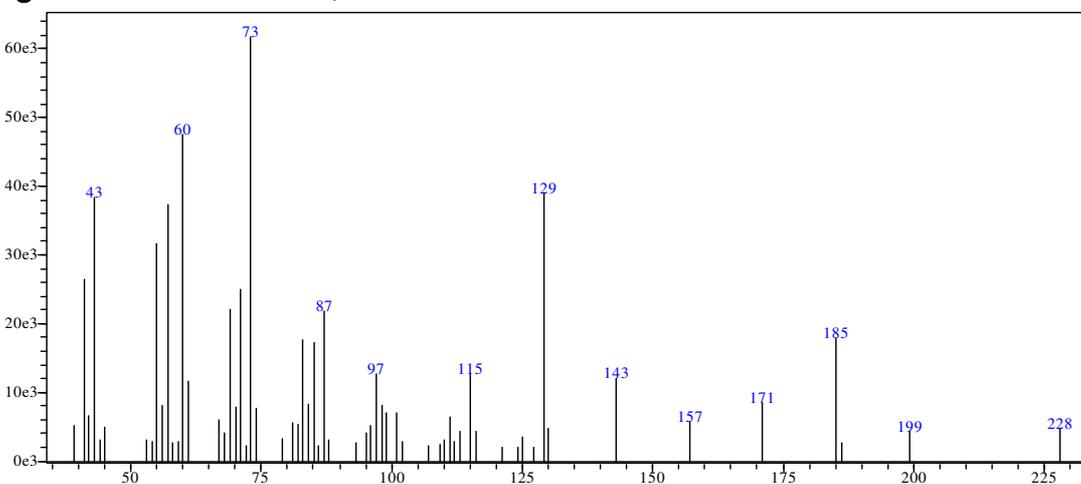
APÊNDICE C – ESPECTROS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CG-EM**Figura C1 - EM-IE t_R 21,8 min****Figura C2 - EM-IE t_R 21,9 min****Figura C3 - EM-IE t_R 25,1 min**

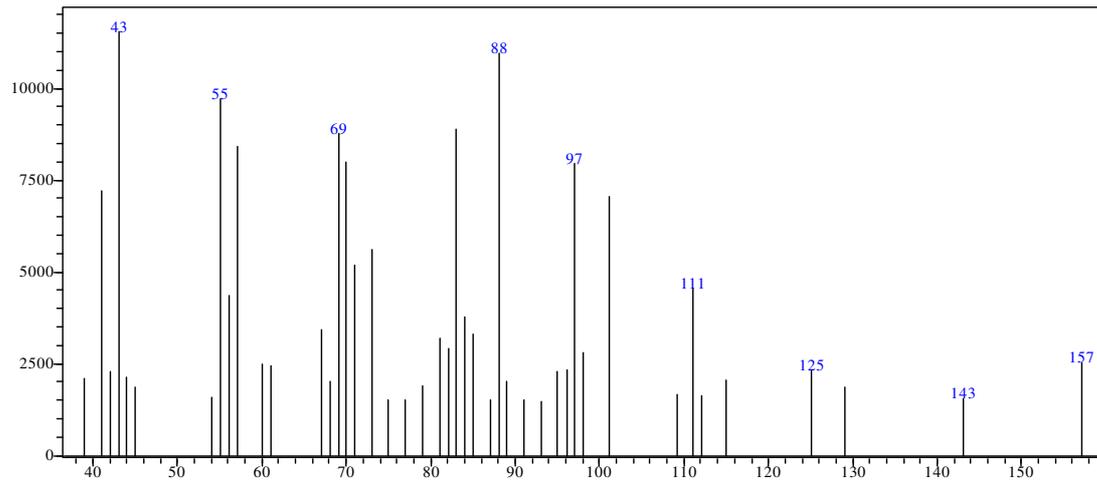
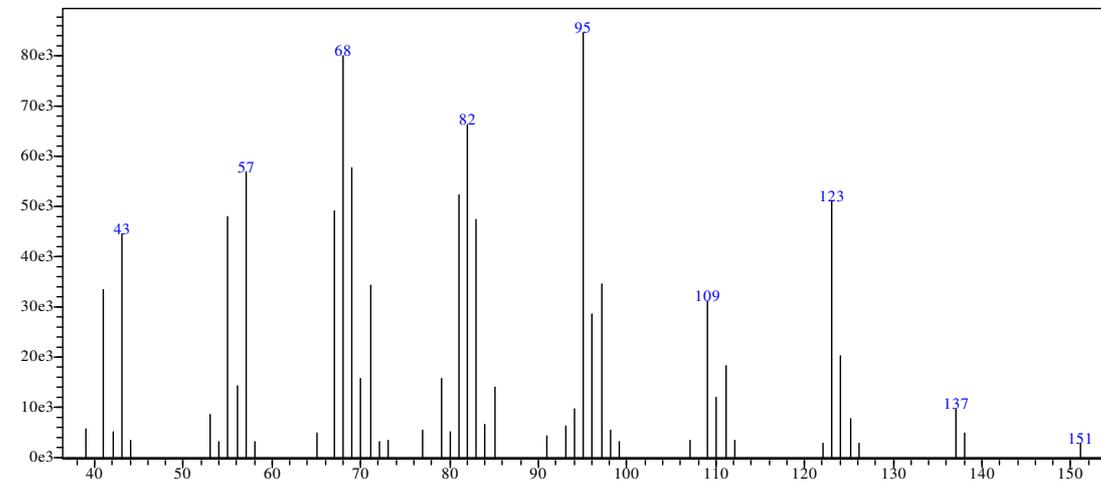
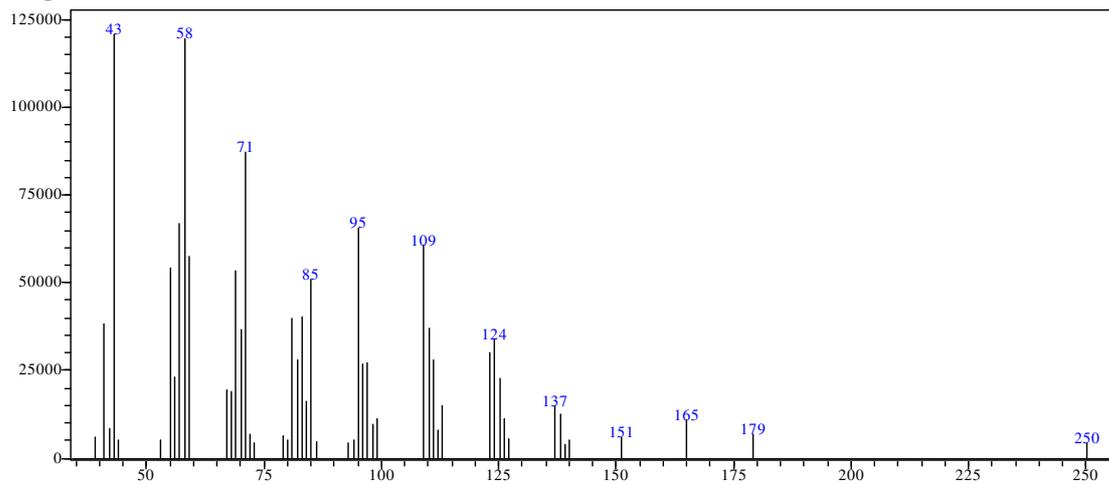
Figura C4 - EM-IE t_R 25,8 min**Figura C5 - EM-IE t_R 26,5 min****Figura C6 - EM-IE t_R 26,6 min**

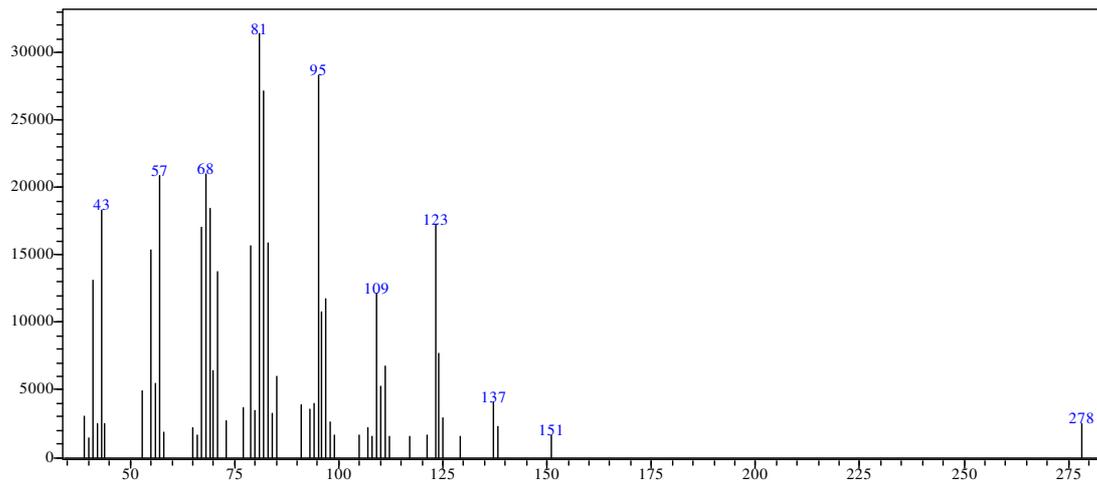
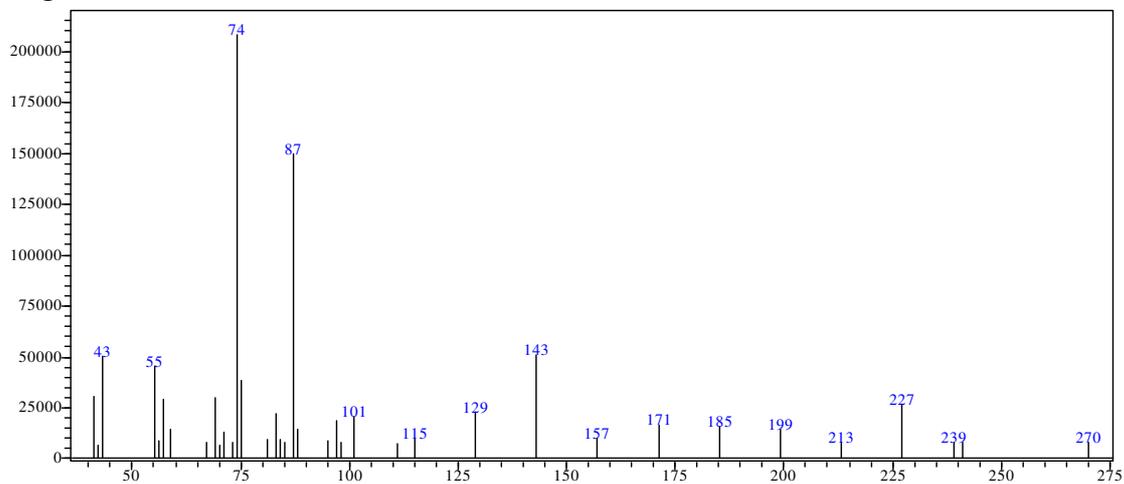
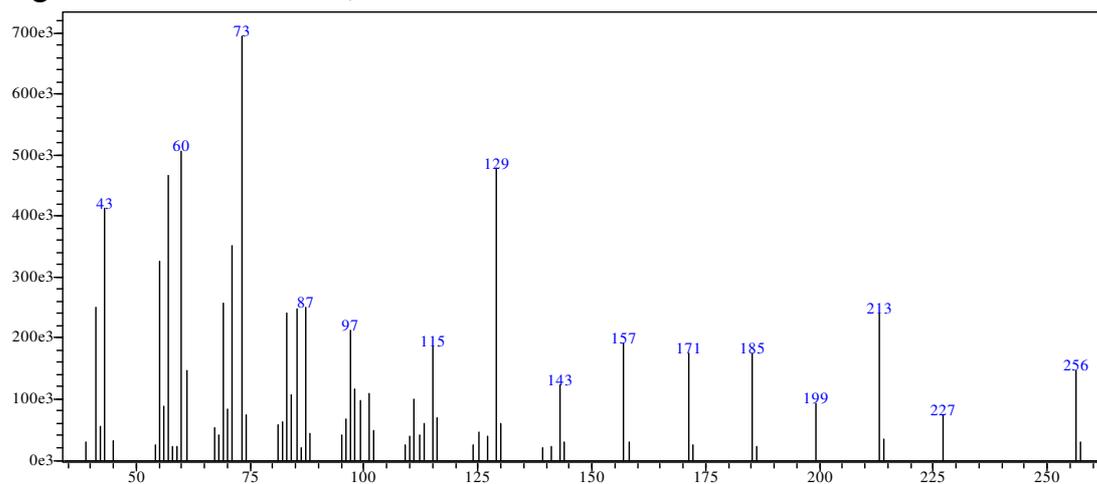
Figura C7 - EM-IE t_R 27,2 min**Figura C8 - EM-IE t_R 28 min****Figura C9 - EM-IE t_R 28,7 min**

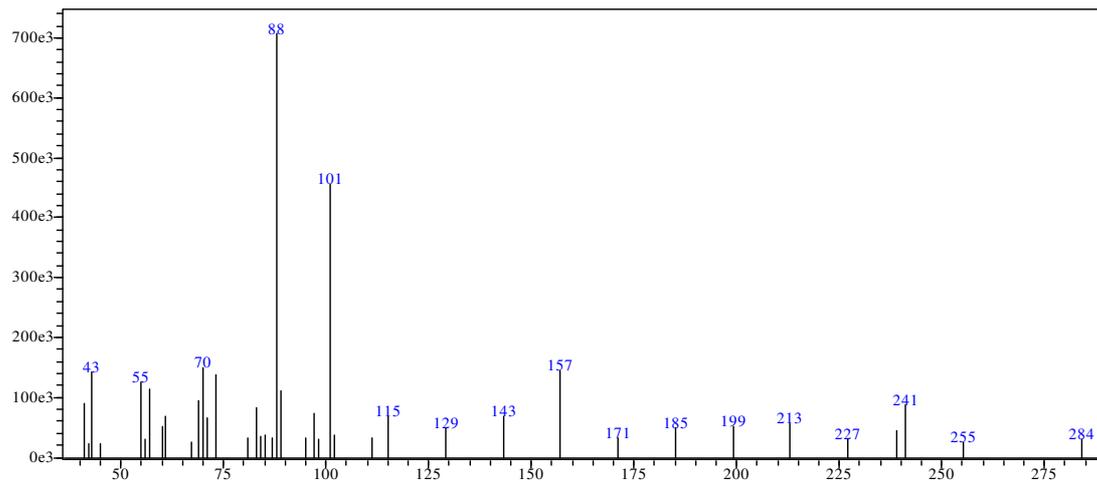
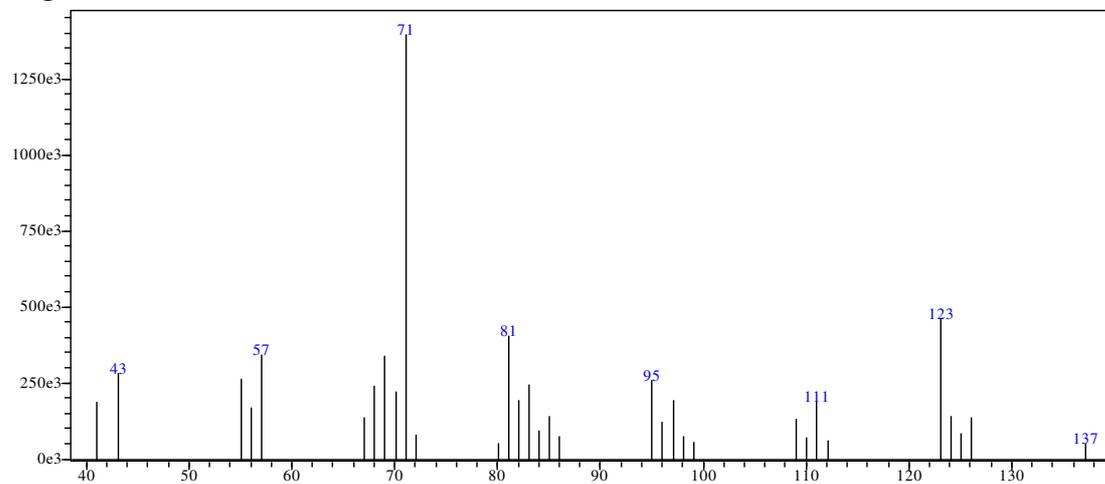
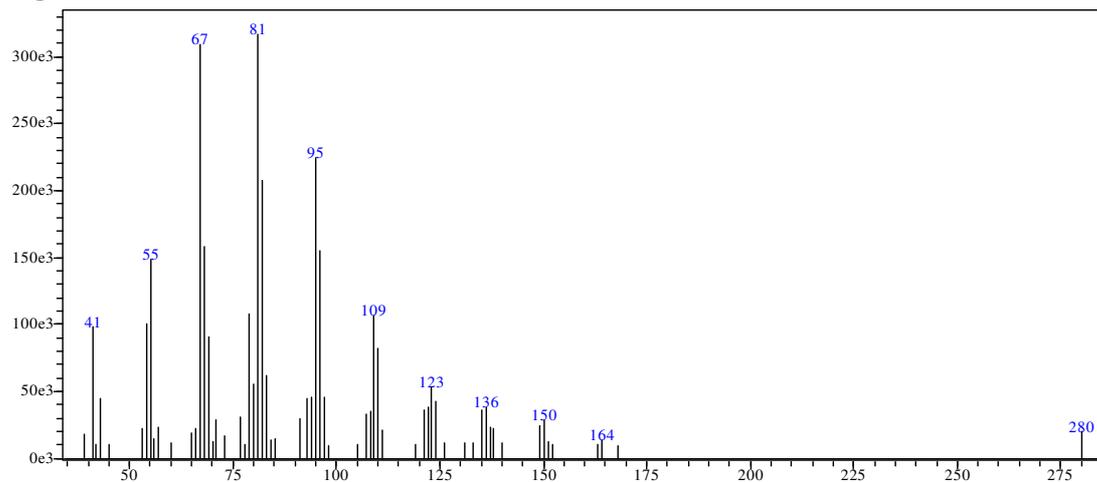
Figura C10 - EM-IE t_R 29,1 min**Figura C11 - EM-IE t_R 30,9 min****Figura C12 - EM-IE t_R 31,3 min**

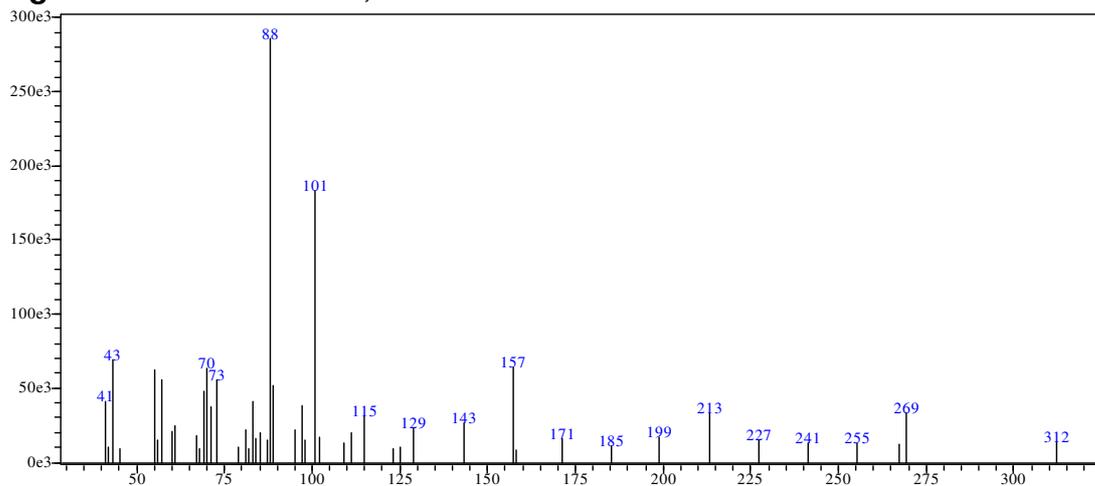
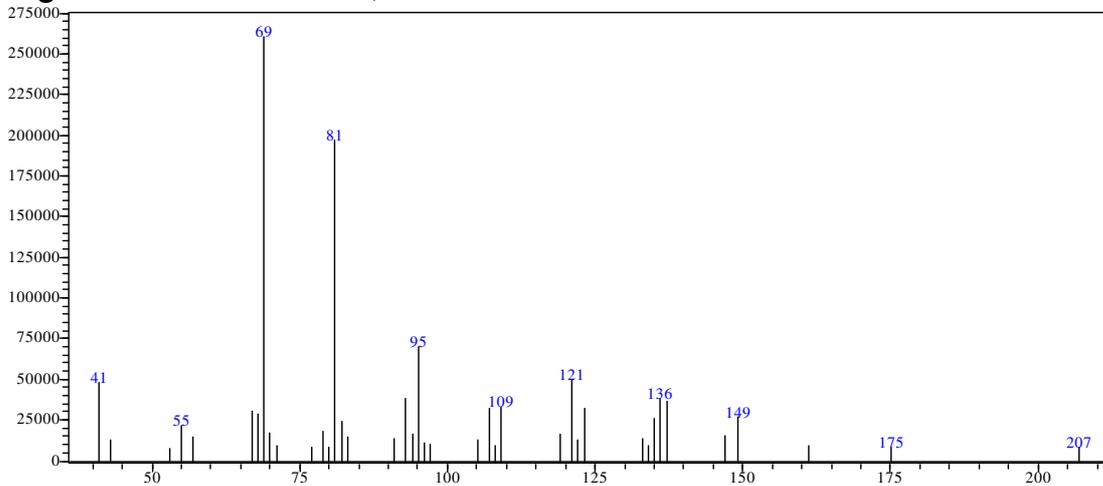
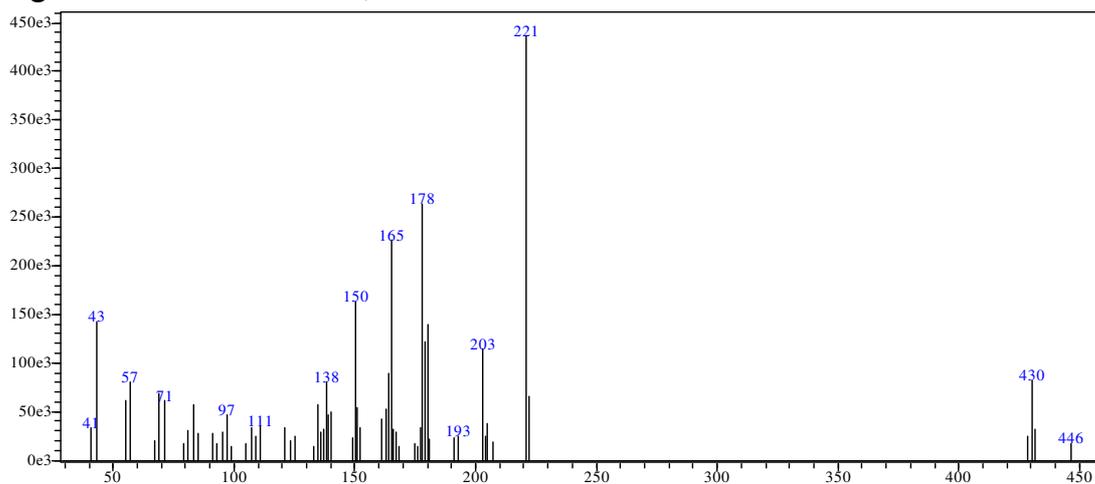
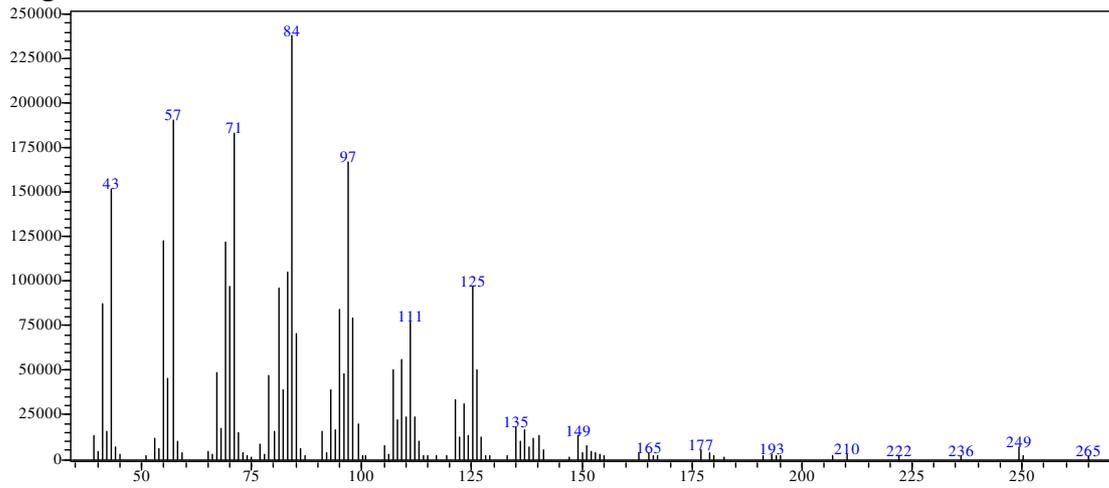
Figura C13 - EM-IE t_R 32,2 min**Figura C14 - EM-IE t_R 40,5 min****Figura C15 - EM-IE t_R 44,2 min**

Figura C16 - EM-IE t_R 27,9 min**Figura C17 - EM-IE t_R 54,8 min**