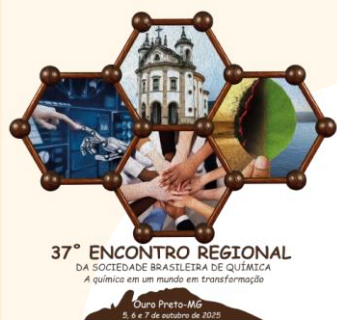




Desreplicação de folhas e frutos de *Lantana trifolia* L. por UFLC-DAD-(+)-ESI-MS/MS e suas atividades antifúngica e citotóxica

Gáveni B. Valério (PG)¹, Camila C. Godinho (PG)², Leonardo Gobbo-Neto (PQ)², Carlos Henrique G. Martins (PQ)³, Marcos Pivatto (PQ)¹, Amanda Danuello (PQ)^{1*}.

*danuello@ufu.br

¹ NPCBio - Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos, Instituto de Química, UFU, Uberlândia, MG; ² NPPNS - Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; ³ LEA - Laboratório de Ensaaios Antimicrobianos, Instituto de Ciências Biomédicas, UFU, Uberlândia, MG.

RESUMO

Lantana trifolia L. (Verbenaceae) é um arbusto cujas folhas são utilizadas na medicina popular para tratar angina, tosse, resfriados e como tranquilizante. Este estudo investigou a atividade anti-*Candida* de frações obtidas de folhas e frutos de dois espécimes da planta. As frações foram analisadas por UFLC-DAD-(+)-ESI-MS/MS, com apoio de ferramentas estatísticas multivariadas (HCA, PCA, PLS-DA) e análise de redes moleculares para anotação de compostos. As frações de acetato de etila apresentaram valores de CIM inferiores a 100 µg mL⁻¹ contra *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, sendo FrPo AcOEt, FrPe AcOEt e FrPe *n*But as mais ativas contra *C. glabrata* (CIM de 1,46 a 2,93 µg mL⁻¹), valores próximo ao do controle positivo, anfotericina B (0,5–1,0 µg mL⁻¹). Conclui-se que as frações mais ativas mostraram seletividade para *C. glabrata* e permitiram a anotação de 29 compostos, nove deles anotados como potenciais bioativos pertencentes à classe dos fenólicos.

Palavras-chave: Anti-*Candida*; Milho de grilo; Redes moleculares; Produtos naturais.

Introdução

Lantana trifolia L. (Verbenaceae), popularmente conhecida como milho de grilo, calmante de pomba e uvinha do mato, é uma planta arbustiva amplamente empregada na medicina tradicional, sobretudo na forma de infusões e xaropes, para o tratamento de angina, tosse, resfriados e como agente tranquilizante (1,2). Estudos prévios evidenciam o potencial antimicrobiano dos compostos presentes em suas folhas. Considerando o cenário atual de resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos convencionais, o que dificulta a seleção de terapias eficazes, torna-se necessária a busca por alternativas farmacológicas mais eficientes. Nesse sentido, investigações bioguiadas com produtos naturais, especialmente aqueles com uso etnofarmacológico, configuram uma estratégia promissora para a descoberta de novos agentes com atividade anti-*Candida* (3, 4, 5). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar o perfil químico de *L. trifolia* e avaliar a atividade antifúngica dos extratos e frações obtidos das folhas e frutos de dois espécimes da espécie.

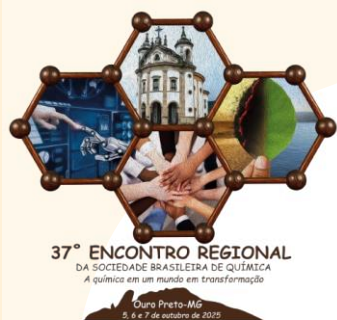
Experimental

Inicialmente foram coletadas folhas de *L. trifolia* (HUFU nº 74.121), no município Peirópolis/MG e município de Pontal/SP. O material foi seco, triturado e submetido à extração por maceração com etanol. Em seguida o extrato etanólico foi submetido à extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente como hexano, acetato de etila e *n*-butanol, restando a fração aquosa. As frações foram submetidas ao ensaio antifúngico com três cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, sendo os resultados expressos em concentração inibitória mínima (CIM). Após o ensaio biológico, as frações de *L. trifolia* foram submetidas a UFLC-DAD-(+)-ESI-MS/MS, e os dados foram analisados utilizando ferramentas estatísticas multivariadas (HCA, PCA, PLS-DA) e análises de

similaridade espectral baseadas em redes moleculares, o que auxiliou a desreplicação dos compostos bioativos.

Resultados e Discussão

As frações de acetato de etila de *L. trifolia* demonstraram atividade antifúngica significativa contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, apresentando valores de CIM inferiores a 100 µg·mL⁻¹ (Tabela 1), o que, segundo Holetz *et al.* (2002) (6), é uma atividade considerada boa para extratos. Destacando às frações FrPoAcOEt (1,46 µg·mL⁻¹), FrPeAcOEt (2,93 µg·mL⁻¹) e FrPenBut (2,93 µg·mL⁻¹), cujos valores de CIM contra *C. glabrata* foram próximos ao da anfotericina B (0,5–1,0 µg·mL⁻¹), que foi utilizada como controle positivo, e se situam abaixo de 10 µg·mL⁻¹ considerado promissor para compostos isolados, e nesse caso se torna favorável por se tratar de uma mistura de compostos (7). A atividade das frações de *n*-butanol foram variáveis, o que pode ser atribuído ao local de coleta do material vegetal. A análise estatística por PLS-DA (Figura 1) permitiu identificar metabólitos discriminantes associados à atividade antifúngica, enquanto as redes moleculares feitas com o auxílio da plataforma GNPS, baseada nos valores de CIM (Figura 2), indicou compostos com maior potencial bioativo pelos nodos destacados em rosa (1–5 µg·mL⁻¹) e azul (<100 µg·mL⁻¹), sugerindo que os nodos compartilhados por amostras ativas e inativas não contribuem significativamente para a bioatividade. A partir dessas análises, foi possível anotar vinte e nove compostos. Entre estes compostos estão nove biomarcadores que foram indicados pelo VIP e pela análise PLS-DA, são eles ácidos fenólicos como ácido clorogênico, ácido 4-coumaroilquínico, e ácido 5-cafeoil chiquímico, flavonóides como apigenina 7-glucuronideo, escutelareina, chisosplenitina B,



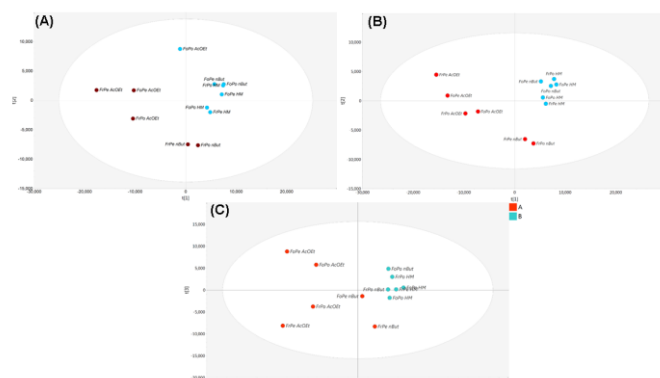
tricina, crisosplenol D, e fenilpropanoides como verbascosídeo. No cluster destacado (Figura 2) demonstra o destaque de seis compostos fenólicos e as projeções de bioatividade, (1) 2-(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxi- 7- [(2S,3R,4S,5S,6R)- 3,4,5- trihidroxi- 6- [(3,4,5 trihidroxi oxan-2-il) oximetil]oxan-2-il]oxichromen-4-ona, (2) Miquelianina, (3) Kuromanina, (4) Calistefina, (5) Apigenina 7-glucuronídeo e (6) Escutelareína. Neste caso, os nodos do aglomerado coloridos de rosa e azul sugerem compostos com maior potencial antifúngico (2).

Tabela 1. Atividade antifúngica.

Amostra	CIM ($\mu\text{g/mL}$) ^a		
	<i>Candida albicans</i> ^b	<i>Candida tropicalis</i> ^c	<i>Candida glabrata</i> ^d
FoPo Hex	750	750	46,87
FoPo AcOEt	23,43	93,75	5,86
FoPo <i>n</i> But	3000	3000	>3000
FoPo HM	750	750	750
FrPo Hex	>3000	>3000	375
FrPo AcOEt	93,75	93,75	1,46
FrPo <i>n</i> But	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 <i>n</i> But	46,87	93,75	2,93
FrPe HM	>3000	>3000	>3000

Nota:^aOs valores de CIM menores que 100, entre 100–500, entre 500–1000 e acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados bom, moderado, fraco e inativo, respectivamente. ^b(ATCC 28366). ^c(ATCC 13803). ^d(ATCC 15126).

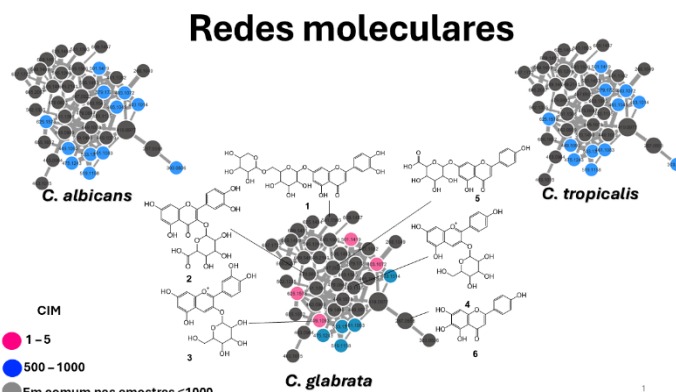
Figura 1. Gráfico da Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) do bioensaio antifúngico de espécies de *Candida*.



Nota: Classes ativas (A-vermelho) e inativas (B-azul), (1A) *C. albicans*, número de componentes, 5; R2X(cum), 0.781; R2Y(cum), 0.997 e Q2(cum), 0.829. (1B) *C. tropicalis*, número de componentes, 5; R2X(cum), 0.775; R2Y(cum), 0.998 e Q2(cum), 0.834. (1C) *C. glabrata*, número de componentes, 5; R2X(cum), 0.778; R2Y(cum), 0.996 e Q2(cum), 0.879. Fração acetato de etila das folhas (FoPe AcOEt e FoPo AcOEt) e frutos (FrPe AcOEt and FrPo AcOEt), fração *n*-butanol das folhas (FoPe *n*But e FoPo

*n*But) e frutos (FrPe *n*But e FrPo *n*But) e fração hidrometanólica das folhas (FoPe HM e FoPo HM) e frutos (FrPe HM e FrPo HM).

Figura 2. Representação da rede molecular filtrado pelos valores de CIM contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.



Conclusões

Com base em nossos dados, as frações mais ativas no ensaio antifúngico foram mais seletivas contra *C. glabrata* do que contra células não infectadas com valores de índice de seletividade na faixa de 0,28 a 1,49. A abordagem analítica adotada nos permitiu anotar 29 compostos, nove dos quais eram bioativos (resultados PLS-DA) e pertencentes à classe dos compostos fenólicos. Informações mais detalhadas sobre os resultados obtidos estão disponíveis no artigo publicado em 2023 na revista Metabolomics (2).

Agradecimentos

À FAPEMIG, CAPES, CNPq e INCT-BioNat pelo auxílio à pesquisa e bolsas concedidas.

Referências

1. L. JULIÃO; H. R. BIZZO; A. M. SOUZA; M. C. S. LOURENCO; P. E. A. SILVA; E. S. TAVARES; L. RASTRELLI; S. G. LEITAO. *Natural Product Communications*. **2009**, v. 4, n. 12, p. 1733–1736.
2. G. B. VALÉRIO, C.C. GODINHO, T.R. FREITAS, M. B. SANTIAGO, D. O. S. MARTINS, A.C.G. JARDIM, L. GOBBO-NETO, C.H.G. MARTINS, L.C.S. CUNHA, A.C. PILON, A. COQUEIRO, M. PIVATTO, A. DANUELLO. *Metabolomics*. **2023**, 19, 68.
3. P. G. PAPPAS; M. S. LIONAKIS; M. C. ARENDRUP; L. OSTROSKYZEICHNER; B. J. KULLBERG. *Nature Reviews Disease Primers*. **2018**, v. 4, n. May, p. 1–20.
4. C. F. RODRIGUES; S. SILVA; M. HENRIQUES. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **2013**, v. 33, n. 5, p. 673–688.
5. D. J. NEWMAN; G. M. CRAGG. *Journal of Natural Products*. **2020**, v. 83, n. 3, p. 770–803.
6. F. B. HOLETZ; G. L. PESSINI; N. R. SANCHES; A. G. CORTEZ; C. V. NAKAMURA; B. PRADO; D. FILHO. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2002**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031.
7. J. L. RÍOS; M. C. RECIO. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, v. 100, n. 1–2, p. 80–84.