

## ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FLORES DE LANTANA CAMARA NA REGIÃO DO MACIÇO DO BATURITÉ (CE)

Antônio Luthierre Gama Cavalcante <sup>1</sup>, Brunna Angélica Evarista da Silva <sup>2</sup>, Lutuima Ambrósio Capangue Neto <sup>3</sup>, Ícaro Bezerra de Freitas <sup>4</sup>, Regilany Paulo Colares <sup>5</sup>, Aluísio Marques da Fonseca <sup>6</sup>

### RESUMO

A espécie vegetal *Lantana camara* da família Verbenaceae, conhecida popularmente como Cambará de chumbo, é uma planta daninha de origem tropical, presente em áreas cultiváveis, pastagens e terrenos abandonados, tanto em regiões secas quanto úmidas e que, frequentemente, cresce em vales e encostas. Há registro na medicina popular em diversas enfermidades como: antisséptico, antiespasmódico, antihemorrágico, antigripal, além de inibição diarreica. Estudos posteriores reportam que esta espécie possui propriedades alelopáticas, efeitos repelentes contra larvas de mosquitos e relatos de toxicidade em ruminantes. Este projeto de pesquisa teve como finalidade investigar a composição química de suas flores, de ocorrência na flora da Região do Maciço do Baturité do Estado do Ceará. Além de verificar o potencial antioxidante, o teor de toxicidade, a inibição da enzima acetilcolina e a sensibilidade bacteriana do extrato. A análise do extrato fixo, assim como os constituintes possivelmente isolados, avaliando suas propriedades biológicas. A partir desta análises foi possível realizar algumas determinações acerca dos testes supracitados anteriormente. Atestou-se o LD50 e o IC50 que determinam da dose letal para metade das larvas de artemia salina e a concentração mínima que iniba metade dos radicais livre presentes no ensaio, respectivamente.

### PALAVRAS-CHAVE

*Lantana camara*. Antioxidante. Verbenaceae. Antibacteriano. LC/MS.

<sup>1</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afr-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: luthi2011@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Discente, e-mail: brunna.angelica2@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: mawynetho24@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: bezerraicaro@ymail.com

<sup>5</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Docente, e-mail: regilany@unilab.edu.br

<sup>6</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Docente, e-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

## INTRODUÇÃO

Nativa de regiões tropicais da América, endêmica em todo o Maciço do Baturité-CE, a espécie *Lantana camara* L. (Verbenaceae), vulgarmente denominada camará-de-chumbo, Figura 1, é um relevante arbusto dentro do cenário da vegetação da caatinga. Presente em diversas áreas cultiváveis, pode ser encontrada em terrenos baldios, com facilidade de crescimento em regiões secas quanto úmidas e que, frequentemente, se adapta a diferentes tipos de topologias montanhosas (PEREIRA, 2005; Braga, 1960). Em estudos relacionados à sua atividade biológica, há relatos de propriedades alelopáticas em plantas e efeitos repelentes contra artrópodes da família Culicoideae (ZEMORI & PASIN, 2006). As flores deste arbusto podem induzir a fotossensibilização hepatógena, ou seja, uma resposta exagerada da suscetibilidade da pele à radiação da luz solar, pela presença local de agentes fotodinâmicos, os quais apresentam uma configuração química que é capaz de absorver determinados comprimentos de onda da luz ultravioleta (UV).

Este Projeto de pesquisa tem como finalidade investigar a composição química das flores de exemplares da espécie *Lantana camara* L., de ocorrência no Maciço do Baturité do Estado do Ceará. Além do estudo dos óleos essenciais e do isolamento de seus possíveis metabólitos secundários (flavonóides, saponinas e alcalóides), o referido projeto busca também avaliar as propriedades biológicas desses constituintes tais como: citotóxica, toxicidade, proteção solar e antioxidante.

## METODOLOGIA

### 3.1. Coleta e identificação de material botânico

- Coleta e lavagem das amostras vegetais com água destilada;
- Secagem ao ar de todo o material obtido;

#### 3.1.2. Identificação Botânica

As amostras das flores de *L. camara* foram adquiridas, na região do Maciço do Baturité, mais precisamente nos municípios de Acarape e Redenção, no estado do Ceará. Em estudos anteriores, o tipo já foi previamente autenticado em 2016, pela Profa. Dra. Maria Iracema Loiola Bezerra, e a espécie, cuja exsicata tem número de registro EAC0056696, está depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) no Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 3.2. Determinação estrutural dos constituintes

A determinação estrutural dos metabólitos secundários presentes no extrato metanólico das flores da *Lantana camara*, foi realizada através da análise dos dados espectrométricos por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrômetro de Massas. Estas análises foi efetuada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CE, mediante assistência técnica do Analista Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro.

### 3.3. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas, aparelho Shimadzu QP5050A, operando em 70 eV.

#### 3.4.1. Atividade antioxidante do óleo essencial e dos metabólitos secundários de *L. camara* por DPPH

A atividade sequestradora do óleo/metabólito foi determinada usando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), um radical livre estável (HEGAZI, 2003). À medida que o DPPH é reduzido por um antioxidante, desaparece a banda de absorção em 520nm, a coloração roxa muda para amarela. As medidas foram feitas adicionando à amostra uma mistura contendo 2ml da amostra em várias concentrações (1,0mg.mL<sup>-1</sup>; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>; 0,03125 mg.mL<sup>-1</sup>) em metanol e 2ml de DPPH 60µM. Logo após, a absorbância foi medida em 520nm, para o branco foi feita 1ml de metanol sem amostra. Após a medida dos valores, realizou-se um cálculo para a obtenção do IC50 através da equação da reta. A metodologia utilizada para a atividade antioxidante foi feita em triplicata para cada concentração analisada (TEPE et al., 2005).

#### 3.4.2. Atividade da toxicidade de *L. camara* por meio do bioensaio com *Artemia Salina* (*Branchipus stagnalis*)

Utilizou-se 8mg do extrato bruto das flores de *L. camara* dissolvidas em 8mL de solução salina. Logo em seguida, as amostras foram dissolvidas em banho ultrassônico para preparo da solução mãe. A partir da

solução mãe, preparou-se as seguintes soluções 31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000 ppm.

O ensaio foi realizado em triplicata de amostras, e água salina será utilizada como controle negativo. Com o auxílio de uma pipeta de pasteur, serão transferidas 10 larvas para cada tubo de ensaio. Após 24 e 48 horas em contato com a suspensão dos extratos, será realizado a contagem do número de larvas mortas. Serão consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave dos tubos. O cálculo da concentração letal média (LC50) dos extratos será feito a partir das cinco concentrações estudadas utilizando o programa de análise PROBIT log-dose (FINNEY, 1952).

### **3.5 Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase**

O teste para a inibição da enzima acetilcolinesterase é baseado na metodologia de Ellman et al. (1961), adaptado para a metodologia de Rhee et al. (2001) que se utiliza do método de CCD. Retirou-se uma alíquota de 5µl do óleo fixo na concentração 10 mg/mL e 1mg/mL para compostos puro e aplicar em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck). Após a completa evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L-1 com o reagente de Ellman (ácido 5,5' - Ditiobis- (2 -nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L-1), deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (100U/ml). Após 10 minutos, observou-se a formação de um halo branco em torno dos "spots" onde foram aplicadas as amostras. Em 20-30 minutos a coloração desapareceu. Como controle positivo, foi utilizada a solução do padrão de sal Eserina 1mg/mL.

### **3.6 Testes da atividade antibacteriana pelo método da difusão em disco**

As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### **3.6.1 Antibiograma**

A atividade antibacteriana do extrato metanólico das flores da *Lantana Camara* foi avaliada pelo método de difusão em disco de acordo com a metodologia recomendada pela CLSI (2008). Todos os materiais utilizados neste teste foram previamente esterilizados.

#### **3.6.2 Preparos do inóculo e semeadura**

As culturas bacterianas foram inoculadas em tubos contendo Agar Mueller-Hinton, após 24 horas de incubação a 35°C procedeu-se a coloração de Gram, a título de padronização e como teste de pureza das células. Após a técnica, foram feitas diluições das cepas teste até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (a 0.08-0.1nm).

Realizou-se o inóculo em placa contendo Muller-Hinton com o auxílio de swab estéril de cada cultura bacteriana, e sobre a mesma foram aderidos, com auxílio de uma pinça previamente esterilizada discos brancos para antibiograma (6mm) impregnados nas 42 concentrações de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 do extrato metanólico das flores da *Lantana Camara* (figura 9), sendo pressionados levemente sobre a superfície do meio. As placas foram então incubadas a 35°C por 48 horas em uma estufa bacteriológica, e a leitura dos halos de inibição foram feitas com o auxílio de paquímetro.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Teste de toxicidade**

O LD50 do extrato, ou seja, a dose letal ou a concentração mínima para matar metade das larvas de *artemia* salina presente nas referidas diluições. Para calcular o LD50, utilizou-se o Probit Análisis que é uma metodologia de análise semelhante a uma regressão linear para avaliar as variáveis de reposta binomial. Além disso, o mesmo transforma a curva de resposta à dose sigmóide em uma linha reta que pode ser analisada por regressão através de mínimos quadrados ou máxima verossimilhança. A partir da utilização dessa ferramenta estatística observou-se um LD50 de aproximadamente 0,0762315 mg/mL.

De acordo com a literatura (Meyer, et al. 1982) é possível perceber que o extrato de algumas partes da *Lantana camara* apresentam toxicidade significativa com LD50 abaixo de 1000mg/mL. Assim sendo, de acordo com (Aguiar et al. 2015, p. 169), que o LD50 observado foi de 0,0625mg/mL, no óleo essencial das folhas de *lanatana* câmara da região nordeste do Brasil. Em contraposição (Satyal et al. 2016, p. 340), observou-se um LD50 igual a 0,1175 mg/mL, explicitando assim a faixa de variação do valor LD50 para essa

referida planta comum em regiões tropicais.

#### 4.2 Teste antioxidante

Para calcular o IC50 utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de y (Eq. 3) por 50 para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH, como apresentados na tabela 2. A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de extrato utilizado ( $y = 253,24x + 43,986$ ), com  $R^2 = 0,7031$ , forneceu um IC50 de  $23,748 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que é a concentração de extrato metanólico da *Lantana camara* necessária para causar 50% de atividade antioxidante. Estudos realizados por (Prמוד, 2017, p. 694) mostram que o IC50 dos extratos das flores da *Lantana Camara* coletadas na região da Índia é aproximadamente  $13 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e além disso seu maior valor de percentual de inibição do DPPH foi de 93,67% na concentração de  $40 \mu\text{g/mL}$ .

Em contraposição em estudos realizados por (Mistry et al. 2017, p.230) o IC50 calculado pela linearidade da equação foi de aproximadamente  $48,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e o seu potencial máximo de inibição foi de aproximadamente 83,03% na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Assim sendo, confrontando os dados obtidos pela pesquisa com os apresentados na literatura percebe-se que o valor do IC50 da pesquisa está na faixa apresentada pela literatura que é de 13 à  $49 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , deste modo é possível atestar a conformidade dos dados. Neste sentido, explicita que o valor máximo de inibição encontrado pela pesquisa foi o maior encontrado observando os dois artigos supracitados.

Para tanto, de acordo com (Esmaeili et al., 2015) existe uma relação direta do potencial antioxidante com a existência de conteúdos fitoquímicos nas flores e folhas da planta. A presença de flavonoides e compostos fenólicos em extratos de *L. camara* sugerem a alta capacidade de inibição de radicais livres sejam eles sintéticos ou naturais.

#### 4.3 Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase

Assim sendo, foram feitos ensaios com dois extratos da flor da *Lantana Camara*, que é nativa da região do Maciço de Baturité. Um dos extratos foi o etanólico que obteve resultado qualitativo de grau 3 para inibição, sendo que o padrão que é o máximo a ser atingido é igual a 9. Destaca-se que o extrato metanólico por sua vez apresentou resultado razoável com grau de 5 num padrão igual a 9. Salienta-se que estes ensaios foram realizados na Universidade Federal do Ceará no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica especificamente no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia.

#### 4.4 Determinação estrutural dos constituintes por LC-MS

Devido à alta atividade antioxidante dos extratos metanólico e etanólico das flores de *L. camara*, estes extratos foram submetidos à análise por LC-MS para identificar os principais componentes desses extratos. Foram realizadas análises, a fim de identificar os íons moleculares  $[M-H]^-$ , seguidos pelo experimento em modo de ionização negativa usando o método molecular desprotonado íon como um precursor para estudar a fragmentação dos compostos. A identificação de cada composto foi realizada com base em seus principais íons moleculares e fragmentos diferentes, todos estes abordados na literatura da família verbenaceae.

Assim sendo, exibe-se a figura 3 que exibe a numeração dos picos interpretados quanto a fragmentação e caracterização assim da molécula. Além disso, a tabela 3 apresenta os componentes do extrato de MeOH, mostrando os principais componentes desse extrato são polifenóis tais como derivados do ácido fenólico, glicosídeos feniletanóides e flavonoides.

No pico majoritário do espectro de massas, no tempo de 4,36 minutos, identificou-se o composto vulgarmente conhecido como Verbascoside, seu nome IUPAC é  $[6-[2-(3,4\text{-dihydroxyphenyl)ethoxy}]5\text{-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxyoxan-3-yl] (E)-3-(3,4\text{-dihydroxyphenyl})p\text{-}2\text{-enoate}$ . Assim sendo, este exibiu  $m/z = 623.2026 [M-H]^-$ , e suas referidas quebras foram identificadas em  $m/z = 461.1696$ ;  $315.0922$ ;  $179.0479$ ;  $161.0193$ . Destaca-se que os fragmentos em  $m/z 461 [M-H-162]^-$  e  $m/z 315 [M-H-162-146]^-$  correspondem liberação de metade cafeína e uma unidade de ramnose. Portanto este composto foi tentativamente identificado como Verbascoside, como relata (ABDEL-HADY et al., 2018).

Dando seguimento a análise, identificou-se um pico próximo ao supracitado no tempo de retenção de 4,49 minutos, com  $m/z 623.1965$  o qual se refere ao Isoverbascoside, relatado na literatura (ABDEL-HADY et al., 2018; GIBITZ-EISATHETAL et al., 2018). As fragmentações principais apresentaram  $m/z 461.1565$ ;  $315.0545$ ;  $161.0226$ . Assim sendo,  $m/z 461 [M-H-162]^-$  corresponde a perda de uma unidade de cafeína. Em seguida existe a fragmentação  $m/z 315$  que corresponde a saída do grupamento ramnose  $[M-H-162-146]^-$ .

Para determinar o composto referente ao pico na região do tempo de retenção de 2,01 minutos, identificou-se a razão massa carga equivalente a  $m/z$  389 [M-H]- condizente ao composto thesevide. O primeiro íon fragmento observado, apareceu em  $m/z$  345 [M-H-44]- corresponde à perda de molécula de CO<sub>2</sub>. Além destes fragmentos identificou-se outros dois picos bem intensos em  $m/z$  227 e 121. Destaca-se que baseando-se na literatura de (ABDEL-HADY et al., 2018; GONG et al. 2016; QUIRANTES-PINÉ et al. 2009), identificou-se que o fragmento a  $m/z$  121 correspondia à eliminação do ácido 3-oxopropanico.

No tempo de retenção de 2,70 minutos foi identificado um pico pouco intenso e fino com razão massa/carga 487 [M-H]- identificado como Cistanoside F de acordo com (QUIRANTES-PINÉ et al. 2009). Identificaram-se 4 fragmentos de íons apareciam a  $m/z$  461.1635; 179.0329; 161.0227; 135.0461; 93.0830. O  $m/z$  461 refere-se a eliminação de H<sub>2</sub>O [M-H-18]-. A fragmentação mais intensa foi o  $m/z$  179 (100%) [M-H-cafeoil-ramnosil] - que significou a perda do grupos cafeoil e ramnosil. Além disso, o  $m/z$  161 [M-H-cafeoil-rhamnosil-H<sub>2</sub>O] - refere-se a perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O já justificada anteriormente no fragmento  $m/z$  461. No fragmento a  $m/z$  135 [ácido cafeico-CO<sub>2</sub>] exhibe-se a perda do grupamento ácido cafeico juntamente com uma molécula de CO<sub>2</sub> (HAN et al. 2012).

Por conseguinte, o pico no tempo de retenção 4,04 minutos foi identificado, acordando com a literatura (GUO et al, 2007; ADO MA et al., 2016), como Forsythoside B. o íon molecular desprotonado a  $m/z$  755 [MH]-. As fragmentações identificadas foram as  $m/z$  593 [M-H-cafeoil]-, a qual observa-se a saída do grupo cafeoil e a fragmentação  $m/z$  461 [M-H-cafeoilpentoses]-, que verifica a saída do dos grupos cafeoil e pentose.

O pico no tempo de retenção de aproximadamente 5,92 minutos, possui  $m/z$  621 [M-H]-, a qual apresentou as seguintes fragmentações  $m/z$  179 e 161. De acordo com (ABDEL-HADY et al., 2018; HAN et al., 2007; QUIRANTES-PINÉ et al. 2009), as fragmentações supracitadas são características do composto suspenside A de seu isômero. Sendo que a quebra de 179 para 161 é a eliminação de uma molécula de H<sub>2</sub>O.

#### **4.5 Testes antibacteriano.**

Assim sendo, a partir das análises, verificou-se que o extrato metanólico das flores da Lantana câmara, não inibiram o crescimento bacteriano indicando assim nenhuma sensibilidade as bactérias Staphylococcus aureus ATCC25923 Escherichia coli ATCC 25922. Este resultado é explicitado nas figuras 5 (Extrato frente E. coli) e 6 (Extrato frente S. aureus), as quais apresentam os ensaios realizados, para verificar a atividade antibacteriana do extrato frente as bactérias supracitadas.

Em contraposição, de acordo com diversos autores da literatura (MOHAMED et al. 2019, p. 1-10) (SHARMILA et al. p. 259-270) (Jhariya & Kakkar 2016, p. 534-536), mostram que a Concentração Mínima Inibitória (MIC) do extrato é em torno de 31,25 µg/mL. Salienta-se que alguns fatores influenciaram nesta divergência de resultados. O fator climático é extremamente determinante nesta característica identificada. Salienta-se ainda que é recomendado refazer os testes para propiciar maior confiabilidade ao método executado e dentre outros fatores como estação de coleta, tempo de extração, isolamento de compostos para verificação específica.

#### **CONCLUSÕES**

A partir da análise e discussão dos resultados, foi possível atestar que os principais componentes presentes no extrato metanólico das flores da Lantana câmara são ácido fenólico, glicosídeos feniletanóides e flavonoides como a literatura aborda. Os componentes Verbascoside, Isoverbascoside e Thesevide, são os componentes encontrados nos picos majoritários do espectro de massas. Assim sendo, percebeu-se que todos os resultados obtidos são similares a literatura, porém alguns deles apresentam-se em espécies diferentes da planta, pertencendo ainda a mesma família. Salienta-se que o teor de toxicidade medido pelo LD50 e o IC50 que mede a capacidade antioxidante do extrato mostraram-se verossímeis com os resultados obtidos na literatura porém em regiões diferentes do mundo como por exemplo na Índia, Japão e dentre outros países pertencentes a Ásia, Europa ou África.

Portanto, verificou-se a necessidade da continuidade da pesquisa para avaliar alguns pontos de discussão para verticalizar ainda mais o estudo acerca da contribuição desta planta para a química medicinal ou para a

área de produtos naturais. Além disso, percebe-se a necessidade de verificar seu potencial biotecnológico e sua aplicabilidade médica, visto que existe uma diversidade de componentes em sua composição.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus. Ao meu orientador Alúcio Marques da Fonseca e ao CNPq pelo incentivo a pesquisa e pela confiança depositada em nosso trabalho.

Quirantes-Piné R, Funes L, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *J Chromatography A*. 2009;1216(28):5391-7.