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

AntÔnio Luthierre Gama Cavalcante [1], Brunna Angélica Evarista da Silva [2], Lutuima Ambrósio Capangue Neto [3], Ícaro Bezerra de Freitas [4], Regilany Paulo Colares [5], Aluísio Marques da Fonseca [6]

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 artermia salina e a concentração mínima que iniba metade dos radicais livre presentes no ensaio, respectivamente.

Palavras-chave:

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

[1] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afr-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: luthi2011@gmail.com
[2] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Discente, e-mail: brunna.angelica2@gmail.com
[3] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: mawynetho24@gmail.com
[4] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: bezerraicaro@ymail.com
[5] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Docente, e-mail: regilany@unilab.edu.br
[6] 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 cambará-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 espécime, 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 espectométricos por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrômetro de Massas. Estas análises foi efetuadas 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-1; 0,5 mg.mL-1; 0,25 mg.mL-1; 0,125 mg.mL-1; 0,0625 mg.mL-1; 0,03125 mg.mL-1) 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 cincos 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 cromatoplaca (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 inoculo 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 inoculo 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 Analisys 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 = y = 253,24x + 43,986), com R^2 = 0,7031, forneceu um IC50 de 23,748µg.mL-1, que é a concentração de extrato metanólico da Lantana camara necessária para causar 50% de atividade antioxidante. Estudos realizados por (Pramod, 2017, p. 694) mostram que o IC50 dos extratos das flores da Lantana Camara coletadas na região da Índia é aproximadamente 13µg.mL-1 e além disso seu maior valor de percentual de inibição do DPPH foi de 93,67% na concentração de 40µg/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 µg.mL-1, e o seu potencial máximo de inibição foi de aproximadamente 83,03% na concentração de 100 µg.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 µg.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-dihydroxyphenyl)ethoxy]-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxyoxan-3-yl] (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-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 CO2. 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 H2O [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-H2O] – refere-se a perda de uma molécula de H2O já justificada anteriormente no fragmento m/z 461. No fragmento a m/z 135 [ácido cafeico-CO2] exibe-se a perda do grupamento ácido cafeico juntamente com uma molécula de CO2 (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 H2O.

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 o a capacidade antioxidade 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 Aluísio Marques da Fonseca e ao CNPq pelo incentivo a pesquisa e pela confiança depositada em nosso trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Abdel-Hady H, El-Sayed M, Abdel-hady AA, Hashash MM, Abdel-Hady AM, Aboushousha T, Abdel-Hameed ES, Abdel-Lateef EE, Morsi EA. Nephroprotective Activity of Methanolic Extract of Lantana camara and Squash (Cucurbita pepo) on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats and Identification of Certain Chemical Constituents of Lantana camara by HPLC-ESIMS. Pharmacog J. 2018;10(1):136-47.
2. ADO MA, Abas F, Leong SW, Shaari K, Ismail IS, Ghazali HM, Lajis NH. Chemical constituents and biological activities of Callicarpa maingayi leaves. South African J Bot. 2016;104:98-104.
3. ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. JR., AND FEATHERSTONE R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88Ð95; 1961.
4. Esmaeili AK, Taha RM, Mohajer S, Banisalam B. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown Trifolium pretense L. (Red Clover). Biomed Res Int 2015; 2015:11
5. MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; DE MATTOS, M. C.; SAKATA, S. K.; CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G., Bioreduction of Aldehydes and Ketones Using Manihot species. Phytochemistry, v. 67, 1637, 2006.
6. Marchettieta, L. et al. Identification and determination of bioactive phenylpropanoid glycosides of Aloysia polystachya (Griseb. Et Moldenke) by HPLC-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 166 (2019) 364–370.
7. Mohammad-Beigi, H. Oleuropein derivatives from olive fruit extracts reduce α-synuclein fibrillation and oligomer toxicity. Journal of Biological Chemistry 294, (2019) 4215-4232.
8. Pramod PS, Trimbakrao KS, Vanita A. Evaluation of Unsaponified Petroleum Ether Extract of Lantana camara L. leaves for Antioxidant Activity and Oxidative Stability. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2017;51(4):692-9.
9. Satyal, P. et al. The Chemical Diversity of Lantanacamara: Analyses of Essential Oil Samples fromCuba, Nepal, and Yemen. Chem. Biodiversity. Department of Chemistry, University of Alabama in Huntsville, Huntsville, AL 35899, USA, 2016, v.3, p. 336 – 342
10. 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.