



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Júlio Gabriel Sanches de Camargo

**Desreplicação dos extratos ativos de *Cyrtocymura scorpioides* (Asteraceae)
contra *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis***

São José do Rio Preto
2020

Júlio Gabriel Sanches de Camargo

**Desreplicação dos extratos ativos de *Cyrtocymura scorpioides* (Asteraceae)
contra *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

São José do Rio Preto
2020

C172d

Camargo, Júlio Gabriel Sanches de

Desreplicação dos extratos ativos de *Cyrtocymura scorpioides* (Asteraceae) contra *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis* / Júlio Gabriel Sanches de Camargo. -- São José do Rio Preto, 2020
69 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientador: Luis Octávio Regasini

1. Química. 2. Química vegetal. 3. Compostas (Botânica). 4.
Cromatografia líquida. 5. Anti-infecciosos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Júlio Gabriel Sanches de Camargo

**Desreplicação dos extratos ativos de *Cyrtocymura scorpioides* (Asteraceae)
contra *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Warley de Souza Borges
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Luiz Leonardo Saldanha
UNESP - Câmpus de Rio Claro

São José do Rio Preto
22 de Setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe, Ana Iara Sanches e ao meu pai Antonio Ferreira Neto por sempre me incentivarem na carreira acadêmica e por cuidarem tão bem de mim. Sem seus esforços eu não conseguiria chegar aonde estou! Muito obrigado por todo amor e carinho que me foi dado. Agradeço imensamente a meus irmãos de sangue, Ana Isabel Sanches e Leonardo Sanches Ferreira por serem tão especiais na minha vida.

Agradeço ao meu orientador Dr. Luis Octavio Regasini por toda a parceria e confiança nesses anos de trabalho. Você me guiou e me acompanhou nessa trajetória com muita paciência e perseverança! Nunca me esquecerei de seu apoio!

Agradeço aos meus irmãos de vida Breno Barreto (Neix), Gustavo Sanches (Jassa), Iago Veludo (MC izinho), Luis Henrique (Passat), Gustavo Medri (Ge) e Luiz (Kuririn) da Republica Alquimia. Vocês foram uns dos meus maiores apoiadores em minha trajetória acadêmica e sou muito grato por todo apoio e companheirismo nesses anos!

Agradeço a minha amiga querida Isabela Maria Balão por todos os anos de companheirismo e amizade. Prezo muito pela sua amizade e quero que continuemos tendo esse bom relacionamento que temos por anos e anos! Você esteve presente nos momentos mais importantes da minha vida e agradeço demais por todo carinho e apoio, amo você!

Agradeço ao meu amigo Matheus Negrão pela amizade ao longo dos anos e pelo suporte dado na escrita do meu material, você é incrível. Agradeço ao meu amigo querido Octávio Capelleti (Macarrão) pela amizade e companheirismo, você me ensinou muitas coisas e sou muito grato pela sua amizade.

Agradeço aos meus amigos da Repintudo Miguel Fraile, Felipe Hans, Leonardo Moura, Ananda Teixeira e Kayo pela amizade desde o início da minha graduação. Vocês me apoiaram demais em minha trajetória!

Agradeço aos meus amigos de infância, Vitor Alcoléa (Virto), Willian Silveira (Carça) e Marcelle Conte pela amizade e pelo apoio em minha trajetória acadêmica!

Agradeço aos meus amigos Hugo Buainain e Alexandre (Veet) pela convivência ao longo da minha estadia em Rio Preto.

Agradeço ao Ibilce por toda a vivência que tive nessa universidade. Agradeço aos meus amigos queridos do LAQ, Julyanna Silva, Reinaldo Teodoro e Letícia Ribeiro pela amizade, conselhos e parceria dentro do laboratório. Vocês me ensinaram muito, tanto tecnicamente quanto com suas experiências de vida!

Agradeço a professora Dr^a. Margarete Gottardo e Veridianna Pattini pelos ensaios antifúngicos realizados na FAMERP.

Agradeço a professora Dr^a. Tiana Tasca pelos ensaios em *Trichomonas vaginalis*.

Agradeço ao Dr^o. Leonardo Saldanha pelo suporte dado com as análises por rede de moléculas e pela parceria firmada para que pudéssemos explorar os extratos de uma planta medicinal com uso popular tão importante, utilizando as técnicas analíticas mais avançados na área de produtos naturais.

Agradeço a Me. Patrícia de Oliveira pelo material botânico e pelos extratos fornecidos para esse estudo.

Agradeço a professora Dr^a. Andreia da Unesp de Ilha Solteira pela identificação do nosso material botânico.

RESUMO

Cyrtocymura scorpioides (Lam.) H. Rob., sinonímia *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers, é uma planta medicinal da América do Sul, sendo utilizada, popularmente, para o tratamento da leucorreia, principal sintoma associado a candidíase vulvovaginal e tricomoniase, que são as doenças causadas por espécies de *Candida* e *Trichomonas vaginalis*, respectivamente. *C. scorpioides* é conhecida popularmente como “piracá”, “erva-de-São-Simão”, “capixingui” e “enxuga” e pertence à família Asteraceae, uma das maiores famílias de angiospermas. Os metabólitos bioativos comumente encontrados em espécies do gênero *Cyrtocymura*, pertencem às classes das lactonas sesquiterpênicas, poliacetilenos, flavonoides, triterpenoides e esteroides. No presente estudo avaliou-se as atividades antifúngica e antiprotozoária de seis extratos a partir das folhas e caules de *C. scorpioides*, obtidos em diferentes solventes (hexano, acetona e etanol) contra cinco espécies de *Candida* (cepas da American Type Culture Collection e isolados clínicos) e uma cepa ATCC de *T. vaginalis*. Para verificação da atividade antifúngica dos extratos, foram determinados os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para a atividade contra *T. vaginalis* foi determinada a Concentração Inibitória para 50% dos trofozoítos (CI₅₀) dos extratos que apresentaram viabilidade inferior a 30%, ensaiados a 1000 µg/mL. Todos os extratos foram ativos contra pelo menos três espécies de *Candida* e seus isolados clínicos (CIM ≤ 1000 µg/mL). O extrato acetônico de caules foi o mais fungitóxico com valores de CIM e CFM entre 125 e 250 µg/mL contra *C. albicans* (ATCC 64548 e IC001), *C. krusei* (IC 5772) e *C. glabrata* (ATCC 2001 e IC 041). Contra *T. vaginalis* os extratos hexânico e acetônico de caules exibiram baixa viabilidade (< 5%) e valores de CI₅₀ de 0,09 e 0,50 µg/mL, respectivamente. A fim de estudar o perfil químico dos extratos acetônicos de caules e folhas de *C. scorpioides* e identificar as substâncias responsáveis pela bioatividade, foi criada uma rede de moléculas a partir de dados espectrais obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HR/MS). Essa rede de moléculas foi comparada com uma base de espectros de produtos naturais *in silico* com ponderações taxonômicas. Desta forma 2112 espectros de MS/MS foram organizados em 183 *clusters* em que foram identificados 1071 substâncias pertencentes a 38 classes químicas. Os *clusters* MN1 ao MN9 foram selecionados para estudo por conterem, em sua maioria, lactonas sesquiterpênicas e poliacetilênicas. A substância **2** (13-acetilsolstitialina A) identificada no MN1 foi previamente isolada de *Centaurea solstitialis* (Asteraceae), por outros autores, e apresentou atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* (CIM = 64 µg/mL). A atividade antifúngica de **2** sugere que essa substância pode ser responsável pela atividade antifúngica de *C. scorpioides*. Dessa forma, os resultados biológicos e químicos corroboram o uso popular de *C. scorpioides* contra patógenos causadores de leucorreia e outros sintomas relacionados a doenças ginecológicas.

Palavra-chave: Asteraceae. Antifúngica. *Cyrtocymura scorpioides*. Rede de moléculas. *Trichomonas vaginalis*. Lactonas sesquiterpênicas. *Candida* spp.

ABSTRACT

Cyrtocymura scorpioides (Lam.) H. Rob., synonym *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers., is a medicinal from South America, which has been popularly used to treat leukorrhea, the main symptom associated with vulvovaginal Candidiasis (CVV) and trichomoniasis, which are diseases caused by *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis*, respectively. *C. scorpioides* is popularly known as "piracá", "erva-de-São-Simão", "capixingui" and "enxuga" and belongs to the Asteraceae family, one of the largest families of angiosperms. The bioactive metabolites commonly found in species of the genus *Cyrtocymura* belong to sesquiterpene lactones, polyacetylenes, flavonoids, triterpenoids and steroids. In the current study, the antifungal and antiprotozoal activities of six extracts from *C. scorpioides* leaves and stems obtained in different solvents (hexane, acetone and ethanol). These extracts were evaluated against five species of *Candida* (strains from American Type Culture Collection and clinical isolates) and one ATCC strain of *T. vaginalis*. To verify the antifungal activity of the extracts, the values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were determined. For the activity against *T. vaginalis*, the Inhibitory Concentration was determined for 50% of the trophozoites (IC₅₀) of the extracts that showed viability <30%. All extracts were active against at least three species of *Candida* and their clinical isolates (MIC ≤ 1000 µg/mL). Acetonic extract of stems was the most active one with MIC and MFC values between 125 and 250 µg/mL against *C. albicans* (ATCC 64548 and CI 001), *C. krusei* (CI 5772) and *C. glabrata* (ATCC 2001 and CI 041). Against *T. vaginalis*, hexanic and acetonic extracts of stems presented low viability (<5%) and IC₅₀ values of 0.09 and 0.50 µg/mL, respectively. In order to study the chemical profile of acetonic extracts of *C. scorpioides* leaves and stems and to identify the compound that can be responsible for bioactivity, a molecular network was created from spectral data obtained by Ultra Performance Liquid Chromatography with high resolution Mass Spectrometer (UHPLC -HR/MS). The molecular network was compared to a in silico database of natural products with taxonomical annotation. In this way, 2112 mass spectra were organized in 183 clusters that can be identify 1071 compounds belonging to 38 chemical classes. Clusters MN1 to MN9 were selected for study because they contain, in their majority, sesquiterpene and polyacetylenic lactones. Compound **2** (13-acetylsolstitialin A) identified in MN1 was previously isolated from *Centaurea solstitialis* (Asteraceae) by other authors and showed antifungal activity against *C. albicans* and *C. parapsilosis* (MIC = 64 µg/mL). The antifungal activity of **2** suggests that this compound may be responsible for the antifungal activity of *C. scorpioides*. The biological and chemical results corroborate the popular use of *C. scorpioides* against pathogens that causes leukorrhea and other symptoms related to gynecological disorders.

Keywords: Asteraceae. Antifungal. *Cyrtocymura scorpioides*. Molecular network. *Trichomonas vaginalis*. Sesquiterpene lactones. *Candida* spp.

Lista de ilustrações

Figura 1. Estrutura da quinina	17
Figura 2. Estruturas da morfina e codeína.....	18
Figura 3. <i>Cyrtocymura scorpioides</i>	19
Figura 4. Estrutura do metronidazol (MTZ).....	26
Figura 5. Fluxo de trabalho para diferentes abordagens metabolômicas	27
Figura 6. Fluxo de trabalho proposto para a identificação de alterações metabólicas em extratos acetato de etila de <i>Macaranga</i> spp.	29
Figure 1. Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> viability of extracts. Data are presented as means $\pm$ standard deviation compared to negative control.	43
Figure 2. Molecular network of acetonic extracts of leaves and stems (AEL and AES)	46
Figure 3. Chemical classes identified in the acetonic extracts of leaves and stems	47
Figure 4. Selected clusters containing sesquiterpene lactones from acetonic extracts of leaves and stems annotated using the ISDB-DNP approach	48
Figure 5. Selected clusters containing polyacetylene compounds from cetonic extracts of leaves and stems annotated using the ISDB-DNP approach	49

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais trabalhos que relatam as bioatividades dos extratos e substâncias isoladas de <i>C. scorioides</i>	19
Tabela 2. Tratamentos recomendados pelo Ministério da Saúde apresentados no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) de 2018	24
Tabela 3. Linhas gerais do estudo metabólico com ponderações taxonômicas.....	30
 Table 1. Anti-Candida activity expressed as MIC and MFC values in µg/mL	42
Table 2. Identification data of compounds from the selected clusters using the ISDB-DNP annotation approach.....	50

Lista de abreviações

AEL	<i>Acetonic Extract of Leaves</i>
AES	<i>Acetonic Extract of Stems</i>
AAS	Ácido Acetil Salicílico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B16F10	Células de melanoma murino
CFU	<i>Colony-forming units</i>
CI	<i>Clinical Isolate</i>
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de Massas
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CVV	Candidíase Vulvovaginal
CVVR	Candidíase Vulvovaginal Recorrente
DMSO	Dinethylsulfoxide
EAT	Tumor de Ehrlich
EEL	<i>Ethanollic Extract of Leaves</i>
EES	<i>Ethanollic Extract of Stems</i>
FDA	Food and Drug Administration
FLU	<i>Fluconazole</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social MolecularNetwork</i>
HCT-8	Adenocarcinoma ileocecal
HEL	<i>Hexanic Extract of Leaves</i>
HeLa	Célula epitelial
HES	<i>Hexanic Extract of Stems</i>
HL-60	Leucemia promielocítica caucasiana
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IC	Isolado Clínico
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration for 50% of trophozoites</i>
ISDB	<i>In silico Data Base</i>
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
L929	Fibroblasto de Rato
MFC	<i>Minimum Fungicidal Concentration</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MN	<i>Molecular Network</i>

MN1 to MN9	<i>Selected Clusters</i>
MS	<i>Mass spectra</i>
MS/MS	<i>Tandem mass spectra</i>
MTZ	Metronidazole
NF	<i>Not found</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial least squares discriminant analysis</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PLS-DA	<i>Partial least squares discriminant analysis</i>
RT	<i>Retention time</i>
S180	Células de sarcoma murino
SBA	<i>Adult Bovine Serum</i>
SDA	Sabouraud dextrose agar
SF-295	Células de glioblastoma humano
TMY	<i>Trypcase-extract of maltose yeast</i>
UHPLC-HR/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography with High Resolution Mass Spectrometer</i>
VO	Via oral

Lista de símbolos

cm	Centímetro
μM	Micromolaridade
μg/mL	Microgramas por mililitro
%	Porcentagem
g	Gramas
h	Hora
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
CFU/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
mm	Milímetro
μm	Micrômetro
μL/min	Microlitro por min
kV	Quilovolt
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>
Da	Dalton
ppm	Partes por milhão
<i>m/z</i>	Relação massa carga
min	Minuto

Sumário

Capítulo I – Revisão bibliográfica	13
1. Introdução.....	14
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1. Plantas Medicinais e Produtos Naturais: Contexto e Utilização	17
2.2. <i>Candida</i> spp. e Candidíase Vulvovaginal (CVV)	23
2.3. <i>Trichomonas vaginalis</i> e Tricomoníase	24
2.4. Uso de ferramentas metabolômicas para o estudo de produtos naturais	26
3. Objetivos	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
A. Avaliar a atividade antifúngica dos extratos de folhas e caules de <i>C. scorpioides</i> contra cinco espécies de <i>Candida</i>	32
B. Avaliar a atividade contra <i>Trichomonas vaginalis</i>	32
C. Avaliar o perfil metabólico dos extratos acetônicos das folhas e caules de <i>C. scorpioides</i> ..	32
D. Identificar as substâncias antifúngicas e antiprotozoárias de <i>C. scorpioides</i>	32
Capítulo II - Anticandidal and trichomonocidal activities of <i>Cyrtocymura scorpioides</i> extracts and their molecular network prospection	33
1. Introduction	36
2. Experimental	38
2.1. Plant materials	38
2.2. Extraction	38
2.3. Anticandidal activity	38
2.4. Trichomonocidal activity	39
2.5. UHPLC-HRMS analysis	39
2.6. UHPLC-HRMS data treatment	40
2.7. Molecular Networking Analysis and computational annotation	41
3. Results and discussion.....	42
3.1. Anticandidal and trichomonocidal activities.....	42
3.2. Construction, analyses of molecular network and computational annotation of metabolites	44
4. Conclusions	56
References	57
Appendix A - Chromatogram of AEL.....	66
Appendix B - Chromatogram of AES	67
Appendix C - Mass spectra (MS2) of compound 2.....	68
Appendix D - Mass spectra (MS2) of compound 12.....	69

Capítulo I – Revisão bibliográfica

1. Introdução

Candidíase Vulvovaginal (CVV) e tricomoníase são as doenças causadas por *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*, respectivamente (PETRIN *et al.*, 1998; SARDI *et al.*, 2013). *Candida albicans* é a principal espécie encontrada nos diagnósticos de CVV (80 a 90%), porém outras espécies não-albicans vêm sendo relatadas incluindo, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (Sobel, 2016). A baixa imunidade, uso indiscriminado de fármacos antibacterianos e os tratamentos de câncer e AIDS são os principais fatores que podem desencadear infecções por *Candida*, levando em muitos casos a uma recorrência de infecções, chegando a quatro ou mais casos em um período de um ano (BHATTACHARYA; SOBEL; WHITE, 2016)

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) não-viral mais comum, afetando cerca de 143 milhões de pessoas em todo o mundo (NEWMAN, D. J.; CRAGG, 2020). Cerca de 75 % dos casos em homens e mulheres são assintomáticos, os quais iniciam o tratamento após meses do início da infecção (BRUNI *et al.*, 2019; PETRIN *et al.*, 1998). Allsworth e coautores indicaram uma correlação entre a tricomoníase e outras infecções vulvovaginais como uretrite, vaginose bacteriana, infecções pelos vírus da herpes 1 e 2, clamídia, gonorreia e sífilis devido as condições infecciosas produzidas e seu efeito assintomático, que leva a uma demora na procura por tratamento (ALLSWORTH; RATNER; PEIPERT, 2009).

Na medicina tradicional, algumas plantas são utilizadas para o tratamento de sintomas associados a doenças ginecológicas, porém, pouco vem sendo explorado acerca de suas eficácias e segurança, bem como de suas composições químicas, principalmente das substâncias que são os responsáveis pela atividade terapêutica (ZIDA *et al.*, 2017). Dentre essas, destaca-se *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob uma planta utilizada na medicina tradicional devido aos seus efeitos antiinflamatórios e anti-infeccioso (DREUX *et al.*, 2005; TOIGO; OLIVEIRA; MARQUES, 2004).

Cyrtocymura scorpioides é popularmente conhecida como “erva-de-São-Simão”, “capixingui”, “piracá” e “enxuga”, sendo encontrada principalmente no Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e com menor frequência no Norte e Nordeste (LORENZI; MATOS, 2002; ZAPPI *et al.*, 2015). Suas partes aéreas são comumente utilizadas em “banhos de assento” para o tratamento da leucorreia (popularmente conhecida como corrimento vaginal anormal), sendo um importante sintoma associado às infecções vulvovaginais (RAUH, Laryssa K. *et al.*, 2011). Poucos estudos exploraram as bioatividades de *C. scorpioides*, porém alguns trabalhos

descrevem o efeito antimicrobiano de seus extratos e óleos essenciais contra *Aspergillus alutaceus*, *Penicillium citrinum*, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* (FREIRE *et al.*, 1996; KREUGER, Maria Regina Orofino *et al.*, 2011; TOIGO; OLIVEIRA; MARQUES, 2004). Além da atividade antimicrobiana de *C. scorpioides*, se destaca seu efeito antineoplásico *in vivo* contra o tumor de Ehrlich (ALEXANDRE SCHEFER *et al.*, 2017). A presença de substâncias altamente oxidadas é um marcador dessa espécie, previamente descrita como pertencente ao gênero *Vernonia*. Uma dessas classes são os sesquiterpenos, como os germacranolídeos, hirsutinolídeos e guaianolídeos. A classe mais estudada em *C. scorpioides* são as lactonas sesquiterpênicas, devido a sua citotoxicidade, efeito antibacteriano, antiinflamatório e citotóxico (ALEXANDRE SCHEFER *et al.*, 2017; BUSKUHL *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; POLLO *et al.*, 2013, 2018). Dos autores supracitados, diversos descreveram o isolamento de lactonas sesquiterpênicas em *C. scorpioides*, porém nenhum estudo buscou investigar suas substâncias antifúngicas e tricomonicidas.

Devido a alta complexidade do metabolismo das plantas, problemas no isolamento e a desreplicação de substâncias já detectadas ou isoladas, as análises metabolômicas por rede de moléculas vêm sendo largamente utilizadas com alternativas nesses estudos fitoquímicos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). Essa técnica consiste em uma análise de *High Throughput Screening* (HTS) de extratos obtidos a partir de diferentes fontes naturais. Os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM), são organizados em redes moleculares com a ajuda de softwares bioestatísticos. As redes moleculares são organizadas utilizando a plataforma GNPS (*Global Natural Products Social*) de acordo com a semelhança espectral entre as amostras analisadas, seguindo diversos critérios estatísticos para garantir a confiabilidade na predição (Allard *et al.*, 2016; Olivon *et al.*, 2017). A rede de moléculas e os espectros organizados em *clusters* são submetidos a uma comparação com um banco de dados *in silico* com mais de 200.000 produtos naturais oriundos de diferentes táxons. Essa ferramenta vêm apresentando grande eficiência na identificação de classes de substâncias, desreplicação de substâncias, busca por marcadores biológicos, podendo identificar análogos estruturais (RUTZ *et al.*, 2019).

Nesse trabalho será descrita uma forma eficiente de identificar metabólitos secundários a partir de base de dados sobre produtos naturais com ponderações taxonômicas importantes, os quais irão guiar a identificação dos metabólitos de interesse. A partir das folhas e caules de *C. scorpioides*, foram obtidos seis extratos, que foram testados contra cinco espécies de *Candida*, incluindo cepas da American Type Culture Collection (ATCC) e isolados clínicos, e

uma cepa ATCC de *T. vaginalis*. Com a criação de uma rede de moléculas dos espectros de massas obtidos a partir de análises por UHPLC-HR/MS e sua posterior desreplicação com uma base de dados *in silico*, com ponderações taxonômicas, foram identificadas 1071 substâncias, pertencentes a 38 classes químicas.

2. Revisão Bibliográfica

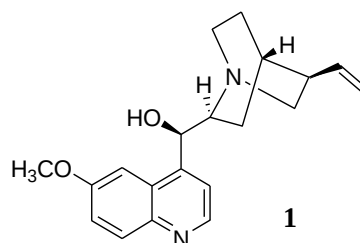
2.1. Plantas Medicinais e Produtos Naturais: Contexto e Utilização

O uso de plantas com efeitos medicamentosos acompanhou o desenvolvimento de diversas civilizações antigas, que por meio da observação e das experimentações concluíram que algumas delas poderiam ser utilizadas além da alimentação. Xamãs, curandeiros, feiticeiros e outros responsáveis pela saúde de suas comunidades obtinham seu conhecimento por meio de observações dos comportamentos animal e humano sob a ação de plantas que poderiam ou não ser empregadas para cada tipo específico de enfermidade (BUSSMANN; SHARON, 2006; YUAN *et al.*, 2016)

Esse conhecimento complexo sobre as formas de utilização, rituais e especificidades foi transmitido por gerações, mas com o passar dos tempos, houve a necessidade de eternizar esses métodos. As primeiras civilizações não dominavam a escrita, mas de sua maneira, começaram a gravar seus conhecimentos nas paredes das cavernas, que ao longo do tempo, com o advento das formas de escrita modernas, começaram a ser compilados e documentados de uma maneira universal (BUSSMANN; SHARON, 2006).

Com o intercâmbio cultural produzido pelas grandes navegações vindas da Europa no século XVI, as plantas medicinais e alimentícias foram incorporadas e exportadas para diversas partes do mundo como África, América do Sul, Ásia e por toda a Europa. As cascas de *Cinchona* sp. (Rubiaceae), por exemplo, fazem parte da biodiversidade peruana e foram vastamente difundidas pela Europa, sendo utilizadas contra febres. Mas somente no século XIX teve seu princípio ativo isolado (quinina, **1**) (figura 1). Até esse momento, praticamente todo o uso de plantas medicinais era baseado em conhecimento popular, sem o conhecimento dos princípios ativos (AGOSTA, 1997; BUSS; COX; WAIGH, 2003).

Figura 1. Estrutura da quinina



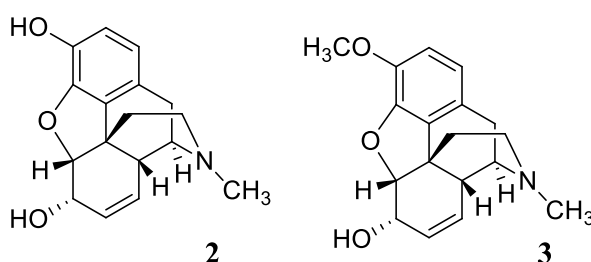
Fonte: Elaborado pelo autor

Com o desenvolvimento da química orgânica, a partir do século XIX, tornou-se possível separar e identificar os princípios ativos responsáveis pela bioatividade de diversas plantas

medicinais. Deste modo, foi possível a padronização de procedimentos de utilização para diversas substâncias sendo um marco histórico para o início do desenvolvimento das indústrias farmacêuticas (BEUTLER, 2009).

No século XIX, os produtos naturais se consolidaram como a principal fonte de estruturas bioativas para a produção de fármacos. Entre os anos de 1800 a 1820 foram isolados os primeiros produtos naturais. A morfina (2) e a codeína (3) (Figura 2) foram os dois primeiros produtos naturais comercializados em sua forma pura a partir das cápsulas de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), conhecida popularmente como “papoula” (Hamilton and Baskett, 2000). Entretanto, nessa mesma época a empresa alemã Bayer lançou o primeiro fármaco semi-sintético obtido a partir de saligenina, o ácido acetisalicílico (AAS®), revolucionando a forma como eram produzidos os fármacos e seus medicamentos.

Figura 2. Estruturas da morfina e codeína



Fonte: Elaborado pelo autor

O século XX foi marcado pelo rápido crescimento da indústria farmacêutica, possibilitando assim um maior acesso a fármacos que foram estudados e descobertos estruturalmente com base na atividade biológica de determinados produtos naturais. De 1981 até 2014, cerca de 33% dos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) foram oriundos de plantas, derivados semi-sintéticos e produtos naturais obtidos via síntese total (NEWMAN, D. J.; CRAGG, 2020)

Cyrtocymura scorpioides (sinonímia *Vernonia scorpioides*) é uma planta empregada na medicina tradicional da América do Sul, sendo conhecida popularmente como “piracá”, “erva-de-São-Simão”, “capixingui” e “enxuga”. *Cyrtocymura scorpioides* pertence à família Asteraceae, uma das maiores famílias de angiospermas (LORENZI; MATOS, 2002; ZAPPI *et al.*, 2015). A espécie em estudo tem seus dados botânicos bem determinados, sendo caracterizada como um subarbusto, com comprimento médio entre 1 a 2 metros de altura, e aproximadamente 60 cm de diâmetro. Suas folhas se distribuem ao longo de seus ramos de forma alternada e medem de 6 a 15 cm de comprimento por 3 a 6 cm de largura. Seus capítulos

florais são hermafroditas e se reúnem lado a lado formando uma espécie de cauda, se assemelhando a um escorpião (TOIGO; OLIVEIRA; MARQUES, 2004) (Figura 3).

As descrições botânicas são essenciais para uma correta autenticação do material vegetal, pois na medicina tradicional as plantas são conhecidas pelo seu nome popular e não pelo nome científico, bem como recebem a atribuição de um mesmo nome popular são dados a espécies diferentes, por exemplo: *C. scorpioides* é conhecida em algumas regiões por “capixingui”, mas em outras, *Croton floribundus* Spreng (Euphorbiaceae) é conhecida também por “capixingui”, mesmo apresentando perfis morfológicos distintos (MACHADO *et al.*, 2013; PAOLI; FREITAS; BARBOSA, 1995).

Figura 3. *Cyrtocymura scorpioides*



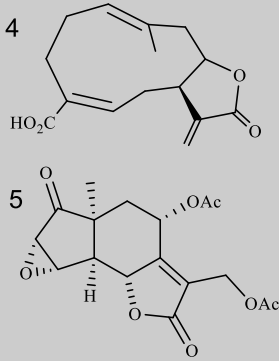
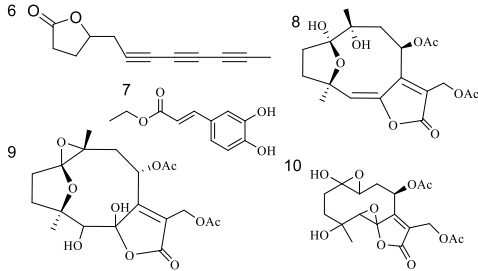
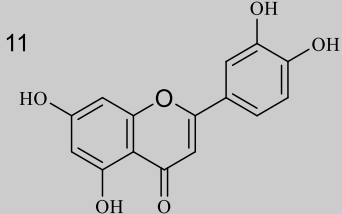
Fonte: Patrícia O. L., 2018.

Os metabólitos bioativos comumente encontrados em espécies do gênero *Cyrtocymura*, são em sua maioria lactonas sesquiterpênicas, poliacetilenos, flavonoides, triterpenoides e esteroides (ALEXANDRE SCHEFER *et al.*, 2017; BUSKUHL, 2007; BUSKUHL *et al.*, 2009, 2010; DREW *et al.*, 1980; JAKUPOVIC *et al.*, 1985; MACHADO *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2016; POLLO *et al.*, 2013, 2018).

Na tabela 1 encontram-se as principais bioatividades identificadas para estruturas isoladas e diferentes extratos de *C. scorpioides*.

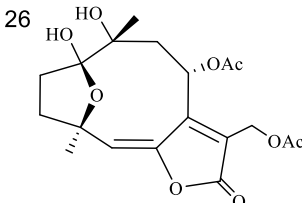
Tabela 1. Principais trabalhos que relatam as bioatividades dos extratos e substâncias isoladas de *C. scorpioides*

Referência	Extratos testados e/ou substâncias isoladas	Estrutura	Bioatividades
------------	---	-----------	---------------

(WARNING <i>et al.</i> , 1987)	4 α ,5 β -Epoxy-4,5-dihidroversonina (4) (germacranolídeo) e um glaucolídeo (5) (Partes aéreas)		-	
(FREIRE <i>et al.</i> , 1996)	Extrato hexânico e clorofórmico em Soxhlet (Caules)	-		Efeito antibacteriano contra <i>S. aureus</i>
(LEITE <i>et al.</i> , 2002)	Extrato etanólico (Folhas)	-		Efeito antiinflamatório <i>in vivo</i>
(TOIGO; OLIVEIRA; MARQUES, 2004)	Óleo essencial (Partes aéreas)	-		Antimicrobiana (<i>S. aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>C. albicans</i>)
(DREUX <i>et al.</i> , 2005)	Extrato hidroalcólico (Folhas)			Efeito antiinflamatório <i>in vivo</i>
(DALAZEN <i>et al.</i> , 2005)	Extrato etanólico (Folhas)	-		Efeito antiinflamatório <i>in vivo</i>
(PAGNO <i>et al.</i> , 2006)	Extrato diclorometânico (Folhas e Caules)	-		Efeito antineoplásico contra tumor de Ehrlich (EAT)
(BUSKUHL, 2007)	Poliacetilenos (6), cafeato de etila (7), Hirsutinolídeo (8 e 9) e glaucolídeo (10) (Folhas e Flores)			Citotoxicidade em células cancerígenas (B16F10, HeLa e L929), genotoxicidade e mecanismo de ação
(RAUH, Laryssa Kathlin, 2008)	Extrato etanólico e luteolina (11) (Folhas e Flores)			Efeito antiinflamatório <i>in vivo</i>
(KREUGER, Maria Regina O <i>et al.</i> , 2009)	Sub fração 2125 do extrato etanólico (Folhas e Flores)	-		Inibição do crescimento de células tumorais S180

Continua

(BUSKUHL <i>et al.</i> , 2009)	Lactona poliacetilênica (12) (Folhas e Flores)	12	Citotoxicidade contra células cancerígenas (B16F10 e HeLa)
(CARRENH O, 2009)	Subfração do extrato acetato de etila (Folhas e Flores)	-	Citotoxicidade contra células cancerígenas (B16F10)
(BUSKUHL <i>et al.</i> , 2010)	Glaucolídeos (13–15) e hirsutinolídeo (16) (Folhas e Flores)	13, 14, 15, 16	Citotoxicidade contra células tumorais (HeLa) e normais (L929) e genotoxicidade
(RAUH, Laryssa K. <i>et al.</i> , 2011)	Extrato etanólico (Folhas e Flores)	-	Efeito antiinflamatório <i>in vivo</i>
(KREUGER, Maria Regina Orofino <i>et al.</i> , 2011)	Subfração III do extrato acetato de etila (Folhas e Flores)	-	Efeito antibacteriano contra <i>S. aureus</i>
(PEREIRA; COGO; ZAMUNER, 2012)	Extrato hidroalcolólico (Folhas)	-	Efeito antiofídico contra o veneno de <i>Bothrops fonsecai</i>
(KLEIN <i>et al.</i> , 2013)	Lactonas poliacetilênicas 17 e 18 (Folhas)	17, 18	Citotoxicidade contra células tumorais
(MACHAD O <i>et al.</i> , 2013)	Triterpenos 19 e 20 e lactona poliacetilênica 21 (Partes aéreas)	19, 20, 21	Lactona poliacetilênica: não citotóxica contra células tumorais (SF-295, MDAMB-435, HCT-8 e HL-60)
(POLLO <i>et al.</i> , 2013)	Lactonas poliacetilênica 22 e glicosiladas 23–25 (Folhas)	22, 23, 24, 25	Continua Efeito antiherpes, citotoxicidade e efeito antiproliferativo dos poliacetilenos isolados

(ALEXANDRE SCHEFER <i>et al.</i> , 2017)	Hirsutinolídeo diacetilpiptocarpo 1 (26) (Folhas e Flores)		Efeito antineoplásico contra tumor de Ehrlich (EAT)
--	---	--	---

Fonte: Elaborado pelo autor

Segundo levantamentos etnofarmacológicos, constatou-se que *C. scorpioides* vem sendo utilizada para o tratamento da leucorreia (corrimento vaginal), sendo as partes aéreas da planta empregadas em banhos de assento. O extrato etanólico das folhas frescas de *C. scorpioides* é utilizado no tratamento de enfermidades cutâneas, feridas crônicas e úlceras, sendo que estudos prévios deste extrato indicaram atividades antitumorais e antimicrobianas (ALEXANDRE SCHEFER *et al.*, 2017; BUSKUHL *et al.*, 2010; DREUX *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2013). Toigo e colaboradores verificaram a sensibilidade de *S. aureus* (ATCC 5039) e de *C. albicans* (LITCC 4161) ao óleo essencial de *C. scorpioides*, observando-se halos de inibição de 16–22 mm e 15–21 mm, respectivamente.

As informações sobre as substâncias de *C. scorpioides* e sua ação antifúngica são escassas, principalmente quando se trata da ação contra *Candida* spp.. Também não há registros de sua atividade contra *T. vaginalis*, o principal agente causador da tricomoníase, a doença sexualmente transmissível não-viral de maior incidência global (NEWMAN, L. *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2018).

O poliacetileno **12** (Tabela 1) apresenta uma cadeia carbônica com três ligações triplas conjugadas ligadas a um anel γ -lactônico, o qual demonstrou atividade citotóxica (BUSKUHL *et al.*, 2009). Um recente estudo conduzido por Pollo *et al.* (2018) descreveu o isolamento e a identificação de um glicosídeo poliacetilênico **25** presente nas partes aéreas de *C. scorpioides* e seu efeito anti-hiperglicêmico *in vivo* (POLLO *et al.*, 2018).

As lactonas sesquiterpênicas de *C. scorpioides* são terpenoides poli-oxigenados contendo quinze átomos de carbono exibindo um anel γ -lactônico insaturado. Buskhul *et al.* (2010) descreveram as lactonas sesquiterpênicas **9** e **16** e sua toxicidade contra três linhagens celulares: HeLa (adenocarcinoma humano), B16F10 (melanoma de rato) e L929 (não tumorigênicas de ratos). O sesquiterpeno **16** apresentou $CI_{50} > 100 \mu M$, indicando baixa citotoxicidade contra todas as células. O sesquiterpeno **12** apresentou valores de CI_{50} de $3,3 \mu M$ e $>100 \mu M$ contra HeLa e L929, respectivamente, demonstrando seletividade para as células tumorigênicas e pouca ação contra as células não-tumorigênicas.

2.2. *Candida* spp. e Candidíase Vulvovaginal (CVV)

O gênero *Candida* é constituído por aproximadamente 200 espécies, que apresentam características dimórficas (leveduriforme e filamentosa). São organismos com reprodução assexuada com o desenvolvimento de hifas, que são responsáveis pelo aumento da virulência e intensificação do processo infeccioso (HENRIQUE *et al.*, 2010).

Dentre as principais espécies de *Candida*, *C. albicans* é a principal causadora de infecções vulvovaginais em mulheres as quais apresentam sintomas de CVV. Dentre esses sintomas, a leucorreia é a principal razão de procura por atendimento ginecológico, porém, nesse estado de infecção a candidíase se torna muitas vezes um problema crônico e recorrente (FERREIRA *et al.*, 2015). A CVV é uma das principais doenças oportunistas, pois muitas vezes se manifesta devido a baixa imunidade da hospedeira, uso indiscriminado de fármacos antibacterianos, antineoplásicos, imunossupressores e anti-HIV, apresentando severas complicações principalmente em gestantes, imunossuprimidas, diabéticas e mulheres transplantadas (NUNES *et al.*, 2011).

A forma leveduriforme de *Candida* integra a microbiota vaginal, mas devido há alguns fatores externos, incluindo maus hábitos de higiene, uso de anticoncepcionais e uso de vestuário sintético, pode se tornar infecciosa e filamentosa, produzindo toxinas e enzimas extracelulares que acabam desencadeando a CVV (HOLANDA *et al.*, 2007). Dentre os principais agentes causadores da CVV, 80 a 90% dos casos relatados são causados por *C. albicans* e 10 a 20% por outras espécies não-*albicans*, como: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (BERALDO *et al.*, 2016; BHATTACHARYA; SOBEL; WHITE, 2016). Os principais sintomas associados a CVV dependem do grau de infecção, podendo se manifestar de maneira isolada ou associada, e dentre eles estão: comichão na vulva e vagina, disúria (sensação de ardor ao urinar), dispareunia (dor na relação sexual, corrimento vaginal grumoso, inodoro e com aspecto caseoso (“leite coalhado”), hiperemia vulvar (fissuras, edemas na vulva e sinais claros de escarificação ou esfoliação do tecido), vagina e colo uterino recoberto por placas brancas aderidas a mucosa (COL; SAVI; ONOFRE, 2009).

A Candidíase Vulvovaginal Recorrente (CVVR) é definida como a ocorrência de quatro ou mais casos de candidíase em um período de um ano, afetando mulheres na idade reprodutiva (10 a 20% dos casos de CVV se tornam recorrentes), na menopausa (6 a 7% dos casos) e pré-púberes (3 a 6%) (DONDEERS; SOBEL, 2017). A reincidência da candidíase tem correlação com a ineficácia dos tratamentos com fármacos azólicos de primeira linha, apresentando elevados índices de resistência (BHATTACHARYA; SOBEL; WHITE, 2016).

Diversos tratamentos são utilizados e recomendados para o tratamento da CVV e CVVR. Os principais fármacos utilizados por via oral são fluconazol (imidazólico) e itraconazol (triazólico), e para uso tópico são utilizados cremes a base de miconazol e outros azóis. Dependendo do estado da infecção ou da imunidade do hospedeiro, os tratamentos podem ser exclusivos por via oral ou com combinações das vias de administração. Apesar de ser uma doença recorrente e muito comum, apenas quatro fármacos de amplo espectro (fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina) são recomendados pelo Ministério da Saúde para o tratamento da CVV que por se tornar em muitos casos recorrente, há uma alta incidência de resistência por espécies de *Candida* spp. (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014; MOREIRA, 2010).

Tabela 2. Tratamentos recomendados pelo Ministério da Saúde apresentados no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) de 2018

Primeira opção	Miconazol creme a 2% ou outros derivados imidazólicos, via vaginal, um aplicador cheio, à noite ao deitar-se, por 7 dias ou nistatina, uma aplicação, via vaginal, à noite ao deitar-se, por 14 dias.
Segunda opção	Fluconazol 150 mg, VO, dose única ou itraconazol 100 mg, 2 comprimidos, VO, 2×/dia, por 1 dia.
Tratamento em gestantes e lactantes CVV complicada e CVV recorrentes	Miconazol, somente por via vaginal. O tratamento VO está contraindicado.
CVV complicada e CVV recorrentes	Indução: fluconazol 150 mg, VO, 1×/dia, dias 1, 4 e 7 ou itraconazol 100 mg, 2 comprimidos, VO, 2×/dia, por 1 dia ou miconazol creme vaginal tópico diário por 10-14 dias. Manutenção: fluconazol 150 mg, VO, 1×/semana, por 6 meses ou miconazol creme vaginal tópico, 2×/semana ou óvulo vaginal, 1×/semana, durante 6 meses.

Fonte: DIAHV/SVS/MS 2018. CVV: Candidíase Vulvovaginal; VO: Via Oral

Entretanto, o tratamento com fluconazol é contra-indicado para pacientes com doenças renais e hepáticas ou com alta sensibilidade ao mesmo e tem seu uso contra-indicado em casos de gestação, pois foram relatados casos isolados de teratogenicidade em animais e em seres humanos quando ministrado por longos períodos (ALECK; BARTLEY, 1997; BERALDO *et al.*, 2016).

2.3. *Trichomonas vaginalis* e Tricomoníase

A tricomoníase é considerada a infecção sexualmente transmissível (IST) não-viral mais comum, afetando cerca de 143 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo causada pelo protozoário *T. vaginalis*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência dos casos é maior em regiões mais carentes de atenção básica a saúde, como países da África e outros países em desenvolvimento (NEWMAN, L. *et al.*, 2015).

Um estudo em 2015 descreveu sobre a porcentagem de tricomoníase em mulheres, comparando os resultados entre continentes. Os pesquisadores constataram que nos países localizados no continente africano, a tricomoníase pode apresentar em média até 7% mais casos em mulheres do que nos Estados Unidos (América do Norte) e em outros países do hemisfério norte. De acordo com esses autores, apesar da prevalência de casos estar no continente africano, em Papua Nova Guiné na Oceania, o número de casos pode chegar a 21% das gestantes do país. A epidemiologia de tricomoníase é desconhecida em diversos desses países devido aos baixos programas de vigilância e cuidados com a saúde nessas regiões (KISSINGER, 2015).

O grande problema envolvido em infecções causadas por *T. vaginalis* é que ela permanece assintomática por até 6 meses. Entre as mulheres, os principais sintomas incluem infecções na vagina, uretra e no cólo do uterino, com corrimento vaginal e prurido malcheiroso. Além desses efeitos, o pH vaginal, que normalmente se encontra em 4,5, atinge valores acima de 5, podendo desencadear outras infecções causadas por outros microorganismos (BRUNI *et al.*, 2019; PETRIN *et al.*, 1998).

Estudos conduzidos por Allsworth *et al.* (2009) mostraram que existe uma associação entre a tricomoníase e diversas doenças, como uretrite, vaginose bacteriana, vírus da Herpes tipos 1 e 2, clamídia, gonorréia e sífilis. Levando em consideração que a tricomoníase muitas vezes se apresenta como uma infecção assintomática, o risco de contração dessas doenças se torna mais elevado, causando uma piora no quadro clínico e maiores dificuldades de cura (ALLSWORTH; RATNER; PEIPERT, 2009).

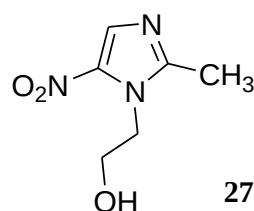
Por ser uma IST, as infecções causadas por *T. vaginalis* têm aumentado a incidência de contaminação pelo vírus HIV. Estudos estimam que em comunidades com altos índices de tricomoníase recorrente, cerca 20% dos casos de HIV podem ser facilitados por infecções causadas por *T. vaginalis* (BRUNI *et al.*, 2019; GUENTHNER; SECOR; DEZZUTTI, 2005; MOODLEY; CONNOLLY; STURM, 2002; SARDANA *et al.*, 1994).

A OMS estima que metade dos casos de infecções associados a *T. vaginalis* ocorram em homens, porém, 89% dos casos de prevalência da *T. vaginalis* ocorram em mulheres (WHO, 2014). Esse fato se deve a diferenças biológicas características de cada gênero, como por

exemplo o ciclo menstrual feminino, que eleva os níveis de ferro na região vaginal criando condições favoráveis a reincidência da tricomoníase (MARTIN et al., 1997).

Por muito tempo o metronidazol (MTZ, 27) (Figura 4) foi o único fármaco utilizado para o tratamento da tricomoníase, porém, devido aos crescentes casos de problemas no uso por mulheres grávidas e/ou alérgicas ao MTZ, a Food and Drug Administration (FDA) em 2004 aprovou o uso do tinidazol como fármaco antiprotozoário. Apesar da grande eficácia no tratamento com esses fármacos, muitas cepas de *T. vaginalis* começaram a apresentar resistência e os tratamentos começaram a se tornar ineficazes. Um trabalho conduzido por Lossick e colaboradores em 1991 já demonstrava a alta resistência de algumas cepas de *T. vaginalis* ao MTZ, em que 1 em cada 400 casos apresentava baixa resistência e 1 em cada 3000 casos de tricomoníase apresentavam alta resistência, além da contra-indicação por apresentar potencial mutagênico (LOSSICK; KENT, 1991)

Figura 4. Estrutura do metronidazol (MTZ)



Fonte: Elaborado pelo autor

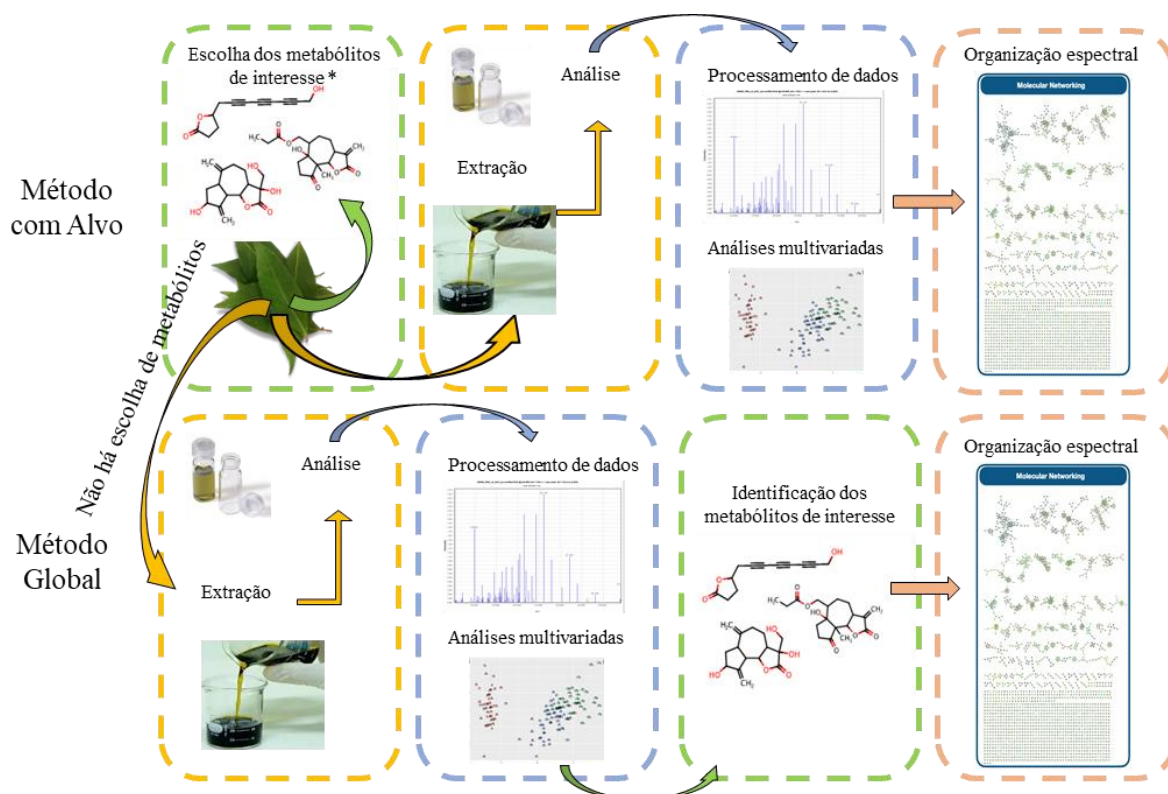
2.4. Uso de ferramentas metabolômicas para o estudo de produtos naturais

O emprego de análises metabolômicas vêm sendo uma ferramenta eficiente para o estudo de metabólitos secundários, principalmente de plantas medicinais (CANUTO *et al.*, 2018). Um determinado conjunto de metabólitos pode ser analisado de modo versátil e várias informações podem ser obtidas dos estudos de seu metabolismo, como variações fenotípicas e regionais de uma determinada espécie (FIEHN, 2001). Análises estatísticas multivariadas e univariadas são a base dessa abordagem. Exemplos dessas ferramentas são as análises de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *Orthogonal Partial Least Squares discriminant Analysis*) e a análise por *clusters* espectrais (SUGIMOTO *et al.*, 2012). Cada tipo de análise é indicada para um tipo de matriz de estudo levando em consideração a complexidade da amostra, informações

a serem buscadas e como é a matriz de dados (espectros MS, MS/MS, FT-IR) (BOCCARD; VEUTHEY; RUDAZ, 2010; OLIVON *et al.*, 2017; SUGIMOTO *et al.*, 2012)

Existem duas formas principais de se investigar produtos naturais por uma abordagem metabolômica, a análise do metabolismo da planta de uma forma global (*untargeted metabolomics*) e focado em um alvo (*targeted metabolomics*) (CANUTO *et al.*, 2018). Cada abordagem tem suas especificidades e trará impacto direto no resultado da análise, por atuarem diretamente no planejamento do experimento, coleta e análise dos dados. *Untargeted metabolomics* é mais utilizada para avaliações de perfil metabólico de uma mesma espécie em diferentes condições ambientais. Cada planta terá uma influência de sua região de crescimento, e a análise multivariada de dados espectroscópicos e espectrométricos dessas plantas permite a identificação de padrões para cada grupo. *Targeted metabolomics* é mais específica e busca avaliação do comportamento metabólico com alterações controladas e uso de biomarcadores para identificação em rotas metabólicas (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013; NICHOLSON; LINDON, 2008). Para que uma análise dessas seja realizada, deve haver sempre uma comparação entre dois grupos, um grupo marcado taxonomicamente ou com amostras de uma mesma espécie, mas de cultivares diferentes ou até mesmo bancos de dados *in silico*. Para cada análise que será efetuada, um planejamento detalhado do experimento deve ser elaborado seguindo o seguinte fluxo de trabalho genérico (Figura 5) para cada método selecionado (Global ou Focado):

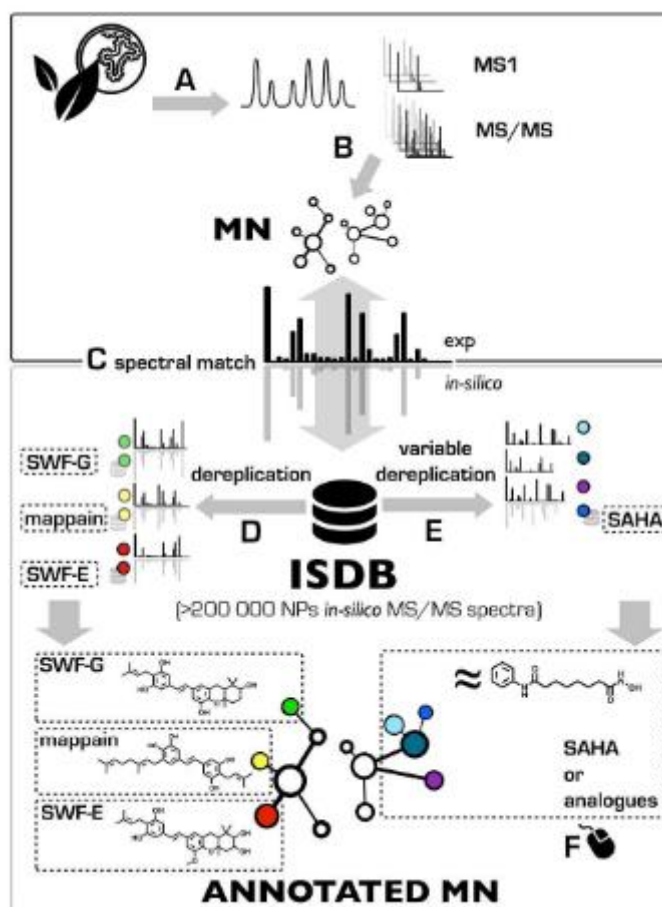
Figura 5. Fluxo de trabalho para diferentes abordagens metabolômicas



Fonte: Elaborado pelo autor *: Podem ser utilizados biomarcadores, avaliações de alteração na rota de determinados metabólitos, respostas a fatores fenotípicos, por exemplo.

Recentes estudos conduzidos por Allard et al., 2016 revelaram uma interessante forma de avaliar e descobrir perfis metabólicos de plantas bioativas, por meio da comparação de dados espectrais obtidos por CLAE-EM, utilizando análises multivariadas e comparação com um banco de dados *in silico* de mais de 200.000 produtos naturais. A utilização de bancos de espectros gerados *in silico* de produtos naturais tem tido resultados promissores na identificação de metabólitos conhecidos e desconhecidos e dando ferramentas para a avaliação pelos métodos com alvo e global (figura 6).

Figura 6. Fluxo de trabalho proposto para a identificação de alterações metabólicas em extratos acetato de etila de *Macaranga* spp.



Fonte: ALLARD *et al.*, 2016.

Conceptual scheme of Molecular Network (MN)-based dereplication using the In-Silico MS/MS Database (ISDB). Crude extracts are profiled and untargeted MS/MS data are acquired (A). Parent ions are organized as MN according to their MS/MS data (B). The spectral library search (C) can be made in two different modes. Individual nodes are dereplicated against the ISDB using the parent ion mass as pre-filter and the MS/MS data (D). Alternatively, individual nodes can be dereplicated against the ISDB in a modification tolerant spectral library search called variable dereplication (E). By a simple right click, dereplication results are directly visualized as chemical structures on top of dereplicated nodes in the MN (F.) ALLARD *et al.*, 2016.

A cada ano novas formas de comparar e analisar dados químicos e biológicos surgem e trazem grandes contribuições para a área de produtos naturais. Avanços recentes nos estudos conduzidos por esses pesquisadores têm mostrado grande eficiência na identificação de metabólitos secundários em plantas medicinais, por meio de ponderações taxonômicas para o refino dos dados e maior robustez das informações atribuídas (RUTZ *et al.*, 2019). Seguindo uma das duas vias de análise supracitadas, uma pontuação é gerada para cada espectro *in silico* que apresentou alguma semelhança espectral, variando de 0 a 1, sendo 0 nenhuma e 1 total semelhança. Assim, todo conjunto de espectros atribuídos a uma substância é classificado de acordo com essa pontuação. Ao final da análise, toda rede de moléculas é reorganizada de acordo com uma ponderação de proximidade taxonômica. Ou seja, à sua pontuação inicial é somado um determinado valor de acordo com a matriz ao qual o espectro é originário. Uma nova pontuação é então atribuída sendo ela inversamente proporcional a sua distância taxonômica (família < gênero < espécie) (ALLARD *et al.*, 2016b; RUTZ *et al.*, 2019).

Tabela 3. Linhas gerais do estudo metabólico com ponderações taxonômicas

Espectro	Matriz	Estrutura candidata	Pontuação inicial	Classificação Inicial	Matriz da estrutura	Pontuação taxonômica	Pontuação Final	Classificação Final
1	Vegetal A	A	0,55	1	Vegetal B	2	2,55	2
		B	0,53	2	Animal	0	0,53	5
		C	0,50	3	Indefinido	0	0,50	6
		D	0,45	4	Vegetal C	1	1,45	3
		E	0,42	5	Vegetal C	1	1,42	4
		F	0,41	6	Vegetal A	3	3,41	1

Fonte: (RUTZ *et al.*, 2019) com adaptações.

Espectros derivados de uma mesma matriz, em nível de espécie, recebem pontuações taxonômicas maiores que a semelhança por gênero, por exemplo. Um espectro pode então receber uma alta pontuação por sua semelhança espectral, mas pode ser rebaixado de prioridade se sua matriz biológica for diferente da fonte biológica do material de estudo. É o caso da estrutura candidata A (Tabela 3.) que apresentou a maior pontuação espectral, porém, quando a ponderação taxonômica foi aplicada, a estrutura F passou a ter maior pontuação devido ter a mesma matriz (Vegetal A) da amostra. Como a maioria dos bancos de dados abrangem diferentes origens de produtos naturais (bactérias, fungos, animais, plantas, algas e etc.) esse tipo de filtro permite uma maior confiança na atribuição de uma estrutura (RUTZ *et al.*, 2019).

Em linhas gerais, os trabalhos apresentados por Allard e Rutz fazem uma análise multivariada de dados espectrais, porém, somente o uso dessa técnica não é capaz de realizar a elucidação estrutural das substâncias e principalmente de suas configurações absolutas. Os dados gerados possuem grande relevância estatística, possuem alta confiabilidade e adquirem mais robustez quando uma abordagem taxonômica é utilizada para selecionar entre estruturas candidatas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica e antiprotozoária de *Cyrtocymura scorpioides* e analisar seu perfil metabólico a fim de identificar a(s) substância(s) bioativa(s) contra *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*.

3.2. Objetivos específicos

A. Avaliar a atividade antifúngica dos extratos de folhas e caules de *C. scorpioides* contra cinco espécies de *Candida*: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* utilizando cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos;

B. Avaliar a atividade contra *Trichomonas vaginalis* empregando cepa ATCC sensível ao metronidazol;

C. Avaliar o perfil metabólico dos extratos acetônicos das folhas e caules de *C. scorpioides* obtidos por análises cromatográficas de ultra eficiência acoplado com espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HR/MS);

D. Identificar as substâncias antifúngicas e antiprotozoárias de *C. scorpioides* por meio do cruzamento de informações químicas e biológicas das substâncias identificadas e avaliar as bioatividades associadas às estruturas em literatura científica.

Capítulo II - Anticandidal and trichomonocidal activities of *Cyrtocymura scorpioides* extracts and their molecular network prospection

Anticandidal and trichomonocidal activities of *Cyrtocymura scorpioides* extracts and their molecular network prospection

Júlio G. S. Camargo ^a; Veridianna C. Pattini ^{a,b}; Patrícia O. Leite ^a; Leonardo Saldanha ^{c,d}; Tiana Tasca^d; Margarete T. G. Almeida^b; Jean-Luc Wolfender^d; Luis O. Regasini ^{a*}

^a São Paulo State University, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b São José do Rio Preto Medical School, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^c School of Pharmaceutical Sciences, Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland, University of Geneva, Switzerland

^d Federal University of Rio Grande do Sul, Faculty of Pharmacy, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: L.O. Regasini

Telephone: +55 (17) 32212362

Email address: luisregasini@unesp.br

Cyrtocymura scorpioides (Lam.) H. Rob., synonymy *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers., is a traditional medicinal plant widely used in sitz baths for the treatment of leukorrhea, a common symptom of vulvovaginal infections. The focus of our study was to evaluate the effects of *C. scorpioides* extracts against *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis*, two main etiological agents of vulvovaginal infections. Molecular network was used to evaluate the compounds in extracts by mass spectrometry and investigate the compounds responsible for bioactivity. MS data was acquired using a Thermo Dionex Ultimate 3000 UHPLC system combined with a Q-Exactive Plus mass spectrometer and a molecular network was created using the online workflow at GNPS. The ISDB-DNP with a taxonomical approach was used to identify the metabolites of the active extracts. All extracts presented fungal growth inhibition ($MIC \leq 1000 \mu\text{g/mL}$) at least against three *Candida* species, including reference strains and clinical isolates. **Acetonic extract of leaves** and stems demonstrated the higher antifungal potency, with MIC and MFC values ranging from 125 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ against some species of *Candida*. **Acetonic extract of stems** exhibited the lowest viability percentages to *T. vaginalis* (< 5%) screened at 100 $\mu\text{g/mL}$ and an Inhibitory Concentration to 50% of trophozoites (IC_{50}) value of 0.50 $\mu\text{g/mL}$. Using a metabolomic approach to evaluate acetonic extract of leaves and stems, 1071 compounds (57,6%) were annotated in the molecular network (MN) belonging to 38 chemical classes. Among these compounds, we identified 13-acetyl-solstitialin A, a compound with antifungal activity previously reported by other authors, corroborating the antifungal effect of extracts. The stems are the principal source of bioactive compounds in *C. scorpioides* and acetone is the best solvent to extract these compounds. The biological results and the chemical analyses presented in this work support the popular use of *C. scorpioides* in the leukorrhea treatments and related gynecological disorders

Keywords: *Cyrtocymura scorpioides*. *Candida*. *Trichomonas vaginalis*. Molecular network. Sesquiterpene lactones. Antifungal.

1. Introduction

Vulvovaginal candidiasis and trichomoniasis are diseases caused by *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis*, respectively (PETRIN *et al.*, 1998; SARDI *et al.*, 2013). *Candida albicans* is the most frequent specie in the vulvovaginal candidiasis diagnosis, ranging from 80 to 90%, but other non-*albicans* species are emerging such as *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis* (Sobel, 2016). Low immunity, indiscriminate use of antibacterial drugs and AIDS-treatment are related to severity of *Candida* infections, which can be considered as recurrent, when the number of infections are more than four in one year (DONDEERS; SOBEL, 2017). Moreover, the recurrence is directly related to the high levels of the fungal resistance, especially to fluconazole and itraconazole, two main azole antifungal drugs (BHATTACHARYA; SOBEL; WHITE, 2016). Trichomoniasis is the most common non-viral sexual transmitted infection, affecting about 143 million people around the world (NEWMAN, L. *et al.*, 2015). The most cases of trichomoniasis are asymptomatic and their treatment begins after six months of infection (BRUNI *et al.*, 2019; PETRIN *et al.*, 1998). Several studies has shown a relation between trichomoniasis and other infections such as: urethritis, bacterial vaginosis, candidiasis, herpes virus type 1 and 2, chlamydia, gonorrhea and syphilis (ALLSWORTH; RATNER; PEIPERT, 2009; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

In the traditional medicine some medicinal plants has been used to treat similar gynecological symptoms of vulvovaginal candidiasis and trichomoniasis. However, few studies explore their efficacy, safety and their compounds responsible for the therapeutics effects (ZIDA *et al.*, 2017). *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob. (Asteraceae), syn. *Vernonia scorpioides*, is a traditional medicinal plant widely known for its anti-inflammatory and antimicrobial effects (DREUX *et al.*, 2005; TOIGO; OLIVEIRA; MARQUES, 2004). *C. scorpioides* is popularly named as “erva-de-São-Simão”, “piracá” and “enxuga”, being commonly found in deforested and poor soils in Brazil (LORENZI; MATOS, 2002; ZAPPI *et al.*, 2015). Its aerial parts has been used in sitz baths for the treatment of leukorrhea, the main symptom of vulvovaginal infections (RAUH, Laryssa K. *et al.*, 2011). Few studies have explored its bioactivity, including antimicrobial effect of its extracts and essential oil against *Aspergillus alutaceus*, *Penicillium citrinum*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* as well as its antineoplastic effect against Ehrlich tumor cells in mice (ALEXANDRE SCHEFER *et al.*, 2017; FREIRE *et al.*, 1996; KREUGER, Maria Regina Orofino *et al.*, 2011; TOIGO; OLIVEIRA; MARQUES, 2004). Most of *C. scorpioides* compounds belong to sesquiterpenoid

class (germacranolides, hirsutinolides and glaucolides) and polyacetilenes. Sesquiterpene lactones of *C. scorpioides* is the most studied subclass due to potent cytotoxicity, antibacterial, anti-inflammatory and cytotoxic activities (ALEXANDRE SCHEFER *et al.*, 2017; BUSKUHL *et al.*, 2009, 2010; KLEIN *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; POLLO *et al.*, 2013, 2018; WARNING *et al.*, 1987).

Metabolomics analysis has been widely used in phytochemical studies because it overcomes the difficulties related to by high complexity plant metabolism, dealing with the isolation and dereplication of known compounds as well as using the least amount of time and resources (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). This technique consists of a High Throughput Screening (HTS) of the plant extracts and a spectral organization with biostatics software, generating a molecular network from a set of mass spectra (MS and MS/MS) in GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking (ALLARD *et al.*, 2016a; OLIVON *et al.*, 2017). The spectra are clustered by the spectral similarity with tolerance of 0.001 Da m/z , which are compared to an *in silico* spectra database of natural products. This approach has demonstrated great efficiency and is able to identify and dereplicate classes of compounds (RUTZ *et al.*, 2019).

In this study we describe an emergent way to research compounds using dereplication of molecular network, with an *in silico* approach to evaluate possible bioactive compounds of *C. scorpioides*. Six extracts were obtained from stems and leaves of *C. scorpioides* and tested against five *Candida* species and *T. vaginalis*. We generated a molecular network by the evaluation of bioactive extracts on UHPLC-HRMS and dereplicated with an *in silico* database from the Dictionary of Natural Products (DNP) with additional taxonomical annotation.

2. Experimental

2.1. Plant materials

Leaves and stems of *C. scorpioides* were collected at Estância Menininha, Neves Paulista, São Paulo state, Brazil, (20°51'18,6"S 49°38'33"W - 20.855168, -49.642586), in March 2017. A voucher specimen (HISA10318) was deposited in Herbarium of Ilha Solteira (HISA) at the Faculty of Engineering, Unesp, Ilha Solteira, São Paulo state, Brazil. Brazilian biodiversity access number AABD49D was registered on National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge.

2.2. Extraction

Leaves (600 g) and stems (775 g) were dried at 45 °C for 48 hours and ground in a domestic blender. The powder was successively submitted to maceration with hexane (3.0 L), acetone (3.0 L) and ethanol (3.0 L). Each extraction was repeated four times for 48 h at room temperature. The extractive solutions were concentrated under reduced pressure, furnishing six extracts: hexanic extract of stems (**HES**; 0.89%), hexanic extract of leaves (**HEL**; 4.5%), acetonic extract of stems (**AES**; 1.13%), acetonic extract of leaves (**AEL**; 5.01%), ethanolic extract of stems (**EES**; 1.76%) and ethanolic extract of leaves (**EEL**; 1.61%).

2.3. Anticandidal activity

Candida strains were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and *Candida* clinical isolates (CI) were obtained from patients at São José do Rio Preto Base Hospital: *Candida albicans* (ATCC 64548 and CI 001), *Candida krusei* (ATCC 62058 and CI 5772), *Candida glabrata* (ATCC 2001 and CI 041), *Candida tropicalis* (ATCC 1803 and CI 080) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019 and CI 224).

Yeasts were grown on Sabouraud dextrose agar (Sigma-Aldrich®, SDA) for six days before the test. Antifungal susceptibility assays were determined by the broth microdilution method in 96-well microtiter plates, following the protocol of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines M27-A3 (2008) (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts) with minor modifications. Extracts were tested in serial concentrations ranging from 1000 to 7.8 µg/mL. Each well containing 100 µL of the *C. scorpioides* extract was inoculated with 100 µL of the fungal suspensions adjusted with a spectrophotometer at 530 nm to transmittance of 85 to 95%, furnishing a final inoculum of 0.5

to 2.5×10^6 colony-forming units (CFU) mL⁻¹. Growth and sterility controls were included for each assay and all tests were performed in triplicate in two independent experiments. DMSO (2.5%) was used as vehicle. Fluconazole (Sigma-Aldrich®, FLU) was used as a reference antifungal drug at 0.125 – 64 µg/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by visual inspection, following incubation for 24 h at 30 °C. MIC values were defined as the lowest concentration of extracts that inhibited the visible fungal growth in the microdilution wells. After the MIC values determination, aliquots (100 µL) from each well which did not demonstrate visible fungal growth were subcultured on SDA plates and incubated at 30 °C for 24 h. The minimum fungicidal concentration (MFC) was established as the lowest extract concentration showed no visible fungal growth.

2.4. Trichomonocidal activity

To the biological assays against *T. vaginalis* was used a reference trophozoite strain (ATCC 30236) sensitive to metronidazole (MTZ), which was used as a reference antiprotozoal drug. The parasites were conserved in low temperatures between -80 and -196 °C and were defrosted just for the moment of the assay and cultivated for a maximum of a one week. The cultivation was done in trypticase-extract of maltose yeast (Sigma-Aldrich®, TMY) at pH 6.0 supplemented with 10% sterile bovine adult serum (Sigma-Aldrich®, SBA) and inactivated at 37° C, following the Diamond methodology (1957). The trophozoites suspension at concentration of 1.0×10^5 parasites/mL was incubated at a 96-well plate in the presence of *C. scorpioides* extracts (100 µg/L) at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere for 24 h. The parasite viability was determined by counting of hemocytometers in Neubauer's camera using trypan blue as dye of exclusion. (INNOCENTE *et al.*, 2014). Extracts showed cellular viability lower than 30% were submitted to a serial dilution and determination of the Inhibitory Concentration of 50% of trophozoites (IC₅₀). Three controls were used: a) Negative control - Growth of trophozoites in medium culture; b) Vehicle control – Growth of trophozoites in medium culture and DMSO 0.6%; c) Positive control – Growth of trophozoites in medium culture with MTZ in DMSO 0.6%.

2.5. UHPLC-HRMS analysis

MS data was acquired using a Thermo Dionex Ultimate 3000 UHPLC system combined with a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany), using a heated electrospray ionization (HESI-II) source. Chromatographic conditions were as follows:

column: Waters BEH C18 100 × 2.1 mm i.e., 1.7 μm; mobile phase: (A) water with 0.1% formic acid; (B) acetonitrile with 0.1% formic acid; flow rate: 600 μL/min; injection volume: 1 μL; gradient: linear gradient of 2%–98% B over 5 min. In positive ion mode, the diisooctyl phthalate $[M+H]^+$ ion (m/z 391.28429) was used as an internal lock mass. The optimized HESI-II parameters were the following: source voltage: 4.0 kV (pos), sheath gas flow rate (N₂): 50 units; auxiliary gas flow rate: 12 units; spare gas low rate: 2.5; capillary temperature: 266.25 °C (pos), S-Lens RF Level: 50. Mass analyzer was calibrated using a mixture of caffeine, methionine-arginine-phenylalanine-alanine-acetate (MRFA), sodium dodecyl sulfate, sodium taurocholate and Ultramark 1621 in an acetonitrile/methanol/water solution containing 1% formic acid added by direct injection. Data-dependent MS/MS events were performed on the three most intense ions detected in full scan MS (Top3 experiment). MS/MS isolation window width was 1 m/z , and the stepped normalized collision energy (NCE) was set to 20 – 35 – 50 units. In data-dependent MS/MS experiments, full scans were acquired at a resolution of 35 000 FWHM (at m/z 200) and MS/MS scans at 17 500 FWHM both with a maximum injection time of 50 ms. After being acquired in MS/MS scan, parent ions were placed in a dynamic exclusion list for 2.0 seconds (Allard, et al., 2016).

2.6. UHPLC-HRMS data treatment

UHPLC-HRMS data were converted to mzXML using the MS converter platform tool (ProteoWizard) and processed using MZmine 2.10 for peak detection, peak filtering, chromatogram construction, chromatogram deconvolution, isotopic peak grouping, chromatogram alignment and gap filling. The following parameters were used for data processing: noise level at 5×10^5 for MS¹ and 0 for MS². The ADAP chromatogram builder was selected with the following parameter: minimum group size of five in number of scans, minimum height of 1×10^{65} , and 0.001 Da m/z tolerance (or 10 ppm). Chromatogram deconvolution was set as follows: wavelets (ADAP) was used as the algorithm for peak recognition, m/z and retention time (RT) range for MS² scan pairing were 0.3 Da and 0.1 min, S/N threshold was 50, minimum feature height was 5×10^5 , coefficient/area threshold was 90, peak duration range was 0.02–1.5 min, and the RT wavelets range was 0.02–0.05. Chromatograms were deisotoped by isotopic peaks; a grouper algorithm with an m/z tolerance of 0.001 Da and an RT tolerance of 0.05 min. Peak alignment was carried out using a join aligner, with m/z tolerance set at 0.001 Da, absolute RT tolerance at 0.05 min, and weight for m/z and RT at 30. The missing peak list after alignment was filled by gap filling of same RT

and m/z range gap filler module with an m/z tolerance of 0.001 Da. After gap filling, all peak lists were done with identification of adduct search, complex search, and molecular formula prediction. This resulted in a peak list of 2112 features having an associated data dependent MS² spectrum.

2.7. Molecular Networking Analysis and computational annotation

Molecular network was created using the online workflow at GNPS. Network was created and its matches edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than six matched peaks. Further edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 10 most similar nodes. Spectra in the network were searched against data bases where the acquired MS² spectra of each node from the whole MN were matched automatically against an *in silico* spectral database (ISDB) build from the Dictionary of Natural Products (DNP) as previously described (ALLARD *et al.*, 2016a; SALDANHA *et al.*, 2020). Taxonomically informed scoring script was used to re-rank the annotations returned by ISDB-DNP (Rutz *et al.*, 2019). The top 50 candidates were re-ranked based on taxonomic data associated with the queried spectra (Asteraceae<*Cyrtocymura*<*Cyrtocymura scorpioides*) and the biological source of the candidate structures.

3. Results and discussion

3.1. Anticandidal and trichomonocidal activities

Anticandidal activity of six extracts was expressed as MIC and MFC values, which were summarized in Table 1. All extracts presented fungal growth inhibition ($\text{MIC} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$) at least against three *Candida* species, including reference strains and clinical isolates. **AEL** demonstrated the higher antifungal potency, with MIC and MFC values of $125 \mu\text{g/mL}$ and $250 \mu\text{g/mL}$ against *C. albicans* (ATCC 64548 and CI 001), *C. krusei* (CI 5772) and *C. glabrata* (ATCC 2001 and CI 041). **AES** was the second most fungitoxic extract, displaying MIC and MFC values ranging from $125 \mu\text{g/mL}$ to $1000 \mu\text{g/mL}$ against *C. albicans* (ATCC 64548 and CI 001), *C. krusei* (CI 5772) and *C. glabrata* (ATCC 2001 and CI 041). These two sets of MIC values indicated acetone was the suitable solvent to extract antifungal compounds. **EEL** exhibited weak antifungal activity, with MIC and MFC values $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$. In brief, the comparison of antifungal effect of six extracts suggested aerial parts of *C. scorpioides* accumulated fungitoxic compounds, which were not compartmentalized in leaves or stems. Moreover, fungitoxic compounds exhibit medium polarity due to their higher levels in the acetonic extracts than hexanic and ethanolic extracts. Nevertheless, *C. scorpioides* extracts (**AEL** and **AES**) were not more active than **FLU** (reference antifungal drug), which display MIC and MFC values ranging from 0.1 to $16 \mu\text{g/mL}$. *Candida* species demonstrated a broad susceptibility range to *C. scorpioides* extracts. Reference strain and clinical isolate of *C. glabrata* were the most susceptible and had their fungal growth inhibited by extracts in concentrations ranging from 125 to $1000 \mu\text{g/mL}$. On the other hand, reference strains and clinical isolates of *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* did not present susceptibility to *C. scorpioides* extracts and did not inhibit fungal growth at maximum concentration ($1000 \mu\text{g/mL}$).

Table 1. Anti-*Candida* activity expressed as MIC and MFC values in $\mu\text{g/mL}$

Espécies testadas	HES	AES	EES	HEL	AEL	EEL	FLU
<i>C. tropicalis</i> ATCC 1803	CIM	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
	CFM	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
<i>C. tropicalis</i> IC 080	CIM	>1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
	CFM	>1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	CIM	1000	250	>1000	1000	125	1000
	CFM	1000	250	>1000	1000	125	1000

Continued

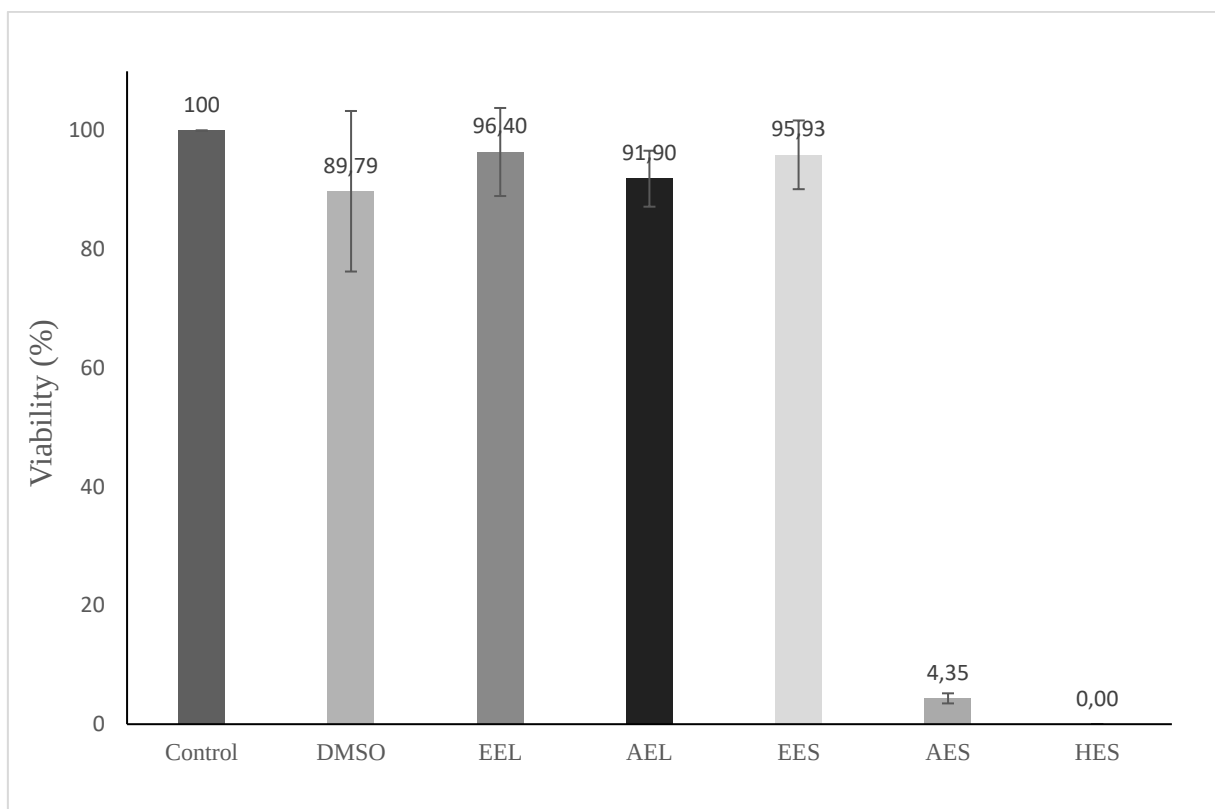
<i>C. albicans</i> IC 001	CIM	1000	1000	1000	1000	250	1000	-
	CFM	1000	1000	1000	1000	250	1000	
<i>C. krusei</i> ATCC 62058	CIM	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	16.0
	CFM	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	
<i>C. krusei</i> IC 5772	CIM	1000	250	1000	>1000	250	1000	-
	CFM	1000	250	1000	>1000	250	1000	
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	CIM	125	125	1000	250	125	250	8.0
	CFM	125	125	1000	250	125	250	
<i>C. glabrata</i> IC 041	CIM	500	250	1000	250	250	250	-
	CFM	500	250	1000	250	250	250	
<i>C. parapsilosis</i> IC 224	CIM	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	-
	CFM	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	

HES: Hexanic extract of stems; **HEL**: Hexanic extract of leaves; **AES**: Acetonic extract of stems; **AEL**: Acetonic extract of leaves; **EES**: Ethanolic extract of stems; **EEL**: Ethanolic extract of leaves; **FLU**: Fluconazole; MIC: Minimum inhibitory concentration; MFC: Minimum fungicidal concentration.

Source: Elaborated by the author

Firstly, extracts had their anti-*Trichomonas vaginalis* activity screened at 1000 µg/mL (Figure 1). **HEL** was not soluble in medium culture and its effect cannot be measured. **EES**, **AEL** and **EEL** were weakly active, demonstrating viability percentage > 90%. Trophozoites treated with **HES** and **AES** exhibited the lowest viability percentages (< 5%), which were similar to MTZ (reference trichomonocidal drug) at 1.14 µM (IC₅₀). Thus, we selected **HES** and **AES** to determine IC₅₀ values. **HES** and **AES** presented IC₅₀ values of 0.09 and 0.50 µg/mL. In contrast to anti-*Candida* activity, anti-*Trichomonas vaginalis* activity of extracts is compartmentalized in *C. scorpioides* stems, as well as potent antiprotozoal compounds in hexanic and acetonic extracts.

Figure 1. Anti-*Trichomonas vaginalis* viability of extracts. Data are presented as means ± standard deviation compared to negative control.



Source: Elaborated by the author

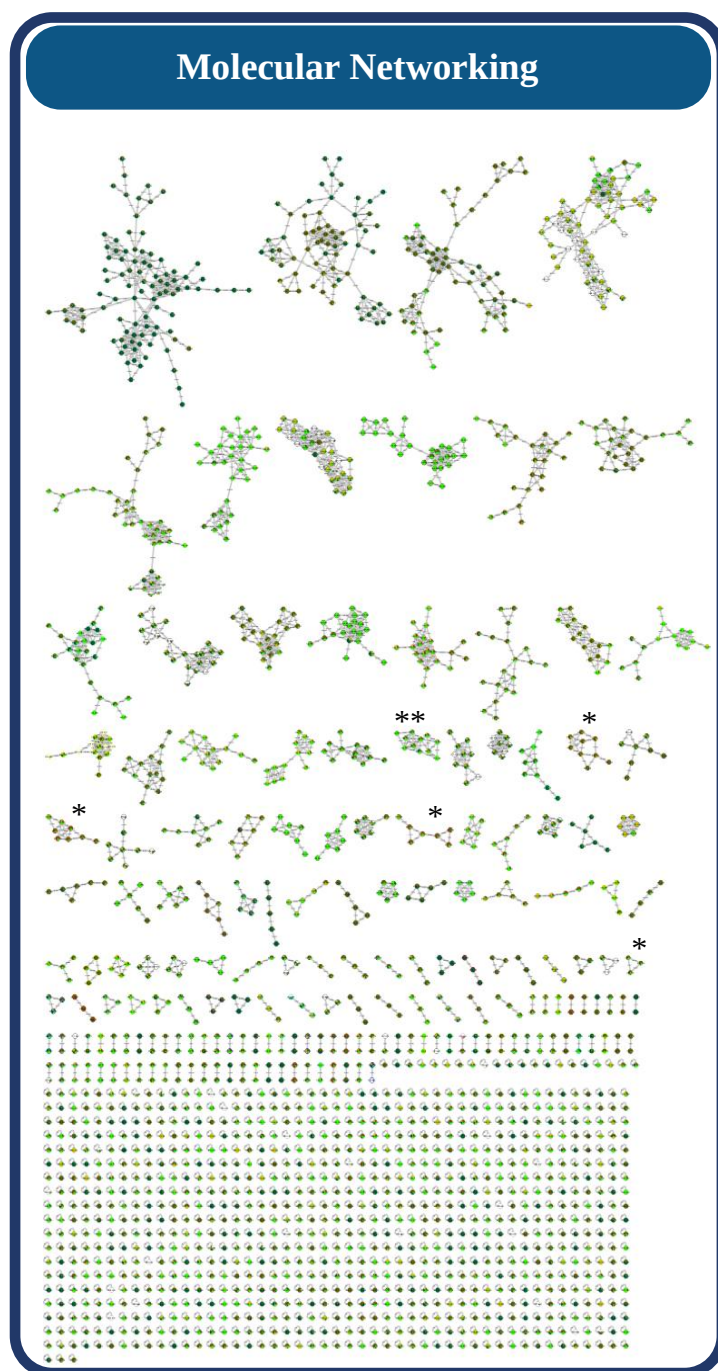
Holetz and co-workers screened Brazilian medicinal plants used for the treatment of infectious diseases, and recommended criteria for relevant bioactivity. It was considered if the extracts displayed $\text{MIC} \leq 100 \mu\text{g/mL}$, the antimicrobial activity was strong. $100 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 500 \mu\text{g/mL}$ the antimicrobial was moderate; and $500 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ the antimicrobial was weak; and $\text{MIC} > 1000 \mu\text{g/mL}$ the extract was considered inactive. We concluded the *C. scorioides* extracts exhibited moderate anticandidal activity and strong trichomonocidal activity. Out of six extracts, **AES** has the greatest potential to combat pathogenic species related to leukorrhea symptoms. Furthermore, the investigation of compounds alone or in mixture can explain the popular use of *C. scorioides* in the treatment of gynecological problems using sitz baths.

3.2. Construction, analyses of molecular network and computational annotation of metabolites

We selected **AEL** and **AES** to chemical composition studies due to their bioactivities. The screening of these extracts was performed by UHPLC-HRMS² in positive mode. After appropriate treatment, the Global Natural Products Social (GNPS) was used to submit the set of spectra and perform a molecular network (MN). The organization of 2,112 MS/MS spectra

was carried out by the GNPS platform to generate a single MN. In this MN, the nodes representing each feature, which were grouped into 183 clusters by spectral similarity (Figure 2). Chromatogram of **AES** and **AEL** are presented in the supplementary material (Appendix **A** and **B**).

Figure 2. Molecular network of acetonic extracts of leaves and stems (**AEL** and **AES**)



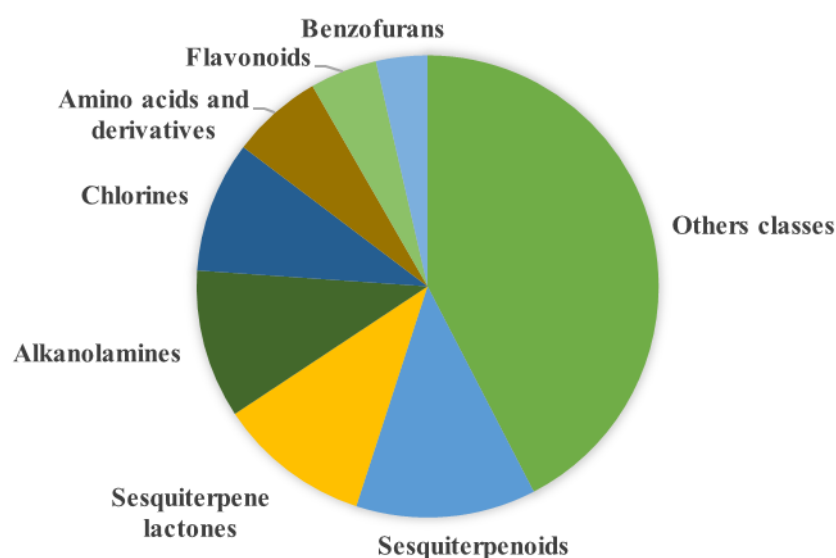
*Sesquiterpene lactone clusters; **Polyacetylene lactone cluster. We showed clusters > 3 nodes.

Source: Elaborated by the author

Additionally, the annotation of compounds in the MN was carried out by the analysis acquired MS² spectra of each node off the whole MN. Nodes were automatically matched against an *in silico* fragmented spectral database (ISDB) build from the Dictionary of Natural Products (DNP) as previously described (Allard, et al., 2016). Subsequently, the ISDB-DNP

output annotations based on spectral similarity (cosine score) were re-ranked based on a final score attributed to candidates for which the biological source was found to be Asteraceae at the family level, *Cyrtocymura* to genus level and *Cyrocymura scorpioides* at species level (Rutz et al., 2019). Using this approach, 1071 compounds (57.6%) were annotated in the MN belonging to 38 chemical classes such as: sesquiterpenoids (234, 12.6%), sesquiterpene lactones (199, 10.7%), alkanolamines (193, 10.4%), chlorines (171, 9.2%), pyrrolidines (119, 6.4%), flavonoids (87, 4.7%) and benzofurans (67, 3.6%); which were the most representative classes (Figure 3).

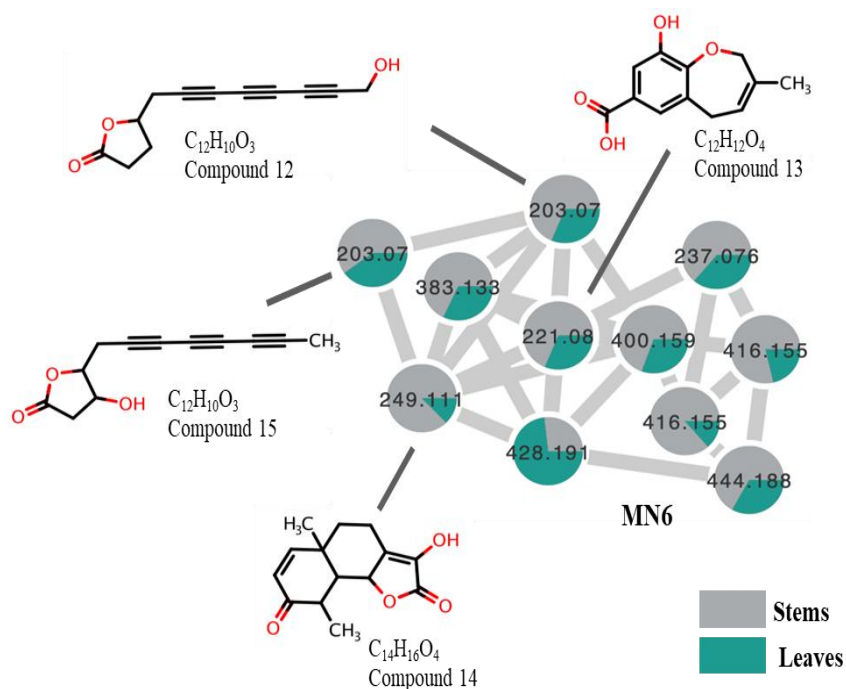
Figure 3. Chemical classes identified in the acetonic extracts of leaves and stems



Source: Elaborated by the author

In order to explore the generated MN, we further selected nine clusters (MN₁-MN₉), which clustered the sesquiterpene lactones and polyacetylene compounds. These classes of compounds are of particular interest due to their broad distribution in Asteraceae species, as well as their bioactivities, including antifungal, anti-inflammatory, antitumor and antibacterial (SHEETAL; K, 2019). Using this approach, the investigation of 46 nodes required the identification of 23 sesquiterpene lactones and two polyacetylene compounds (Figures 4 and 5).

Figure 5. Selected clusters containing polyacetylene compounds from cetonic extracts of leaves and stems annotated using the ISDB-DNP approach



Source: Elaborated by the author

The databases Sci-finder, Pubchem, Scopus and Web of Science were used to compile bioactivity data reported by identified compounds using the information about its smile code, partial Inchi key and botanical name and family. The terms “Sesquiterpene lactones, bioactivity, *Candida* and *Trichomonas*” were used to refine the results. Two compounds demonstrated related bioactivity, including antimicrobial and antineoplastic. The main information’s about the identified compounds was described in Table 2.

Table 2. Identification data of compounds from the selected clusters using the ISDB-DNP annotation approach

Compound ID	MN ID	Class of compounds	Molecule Formula	m/z (M+H) ⁺	Retention time (min)	Smiles	Partial InChI Key	Botanical Family	Specie	Subclass of compounds
1	MN 1	Sesquiterpene lactones	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	339.1438	0.67	<chem>CC1C(O)C(O)C2=C(COC(C)=O)C(=O)OC2\\C=C(C)/CCC1=O</chem>	PIUROFZV UKIBMU	Asteraceae	<i>Polydora chloropappa</i>	Germacranolide
2	MN 1	Sesquiterpene lactones	C ₁₇ H ₂₂ O ₆	323.1488	0.94	<chem>CC(=O)OCC1(O)C2CCC(=C)C3CC(O)C(=C)C3C2OC1=O</chem>	XIVYFPUT CCJWCJ	Asteraceae	<i>Centaurea solstitialis</i>	Guaianolide
3	MN 1	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	299.1487	0.70	<chem>CC1C(O)CC2C1C1OC(=O)C(O)(CO)C1C(O)CC2=C</chem>	QBZWJWW BGFVUJI	Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	Guaianolide
4	MN 1	Sesquiterpene lactones	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	339.1439	0.97	<chem>CC1C(O)C(O)C2=C(COC(C)=O)C(=O)OC2\\C=C(C)/CCC1=O</chem>	PIUROFZV UKIBMU	Asteraceae	<i>Polydora chloropappa</i>	Germacranolide
5	MN 2	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	281.1378	1.11	<chem>OCC1(O)C2CCC(=C)C3CC(O)C(=C)C3C2OC1=O </chem>	LWOZDCFS MDBOSA	Asteraceae	<i>Cynara cornigera</i>	Guaianolide
6	MN 3	Sesquiterpene lactones	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₀	477.1728	2.53	<chem>C\\C=C(/COC(C)=O)C(=O)OC1CC2(C)OC2C2OC2\\C(COC(C)=O)=C/C2OC(=O)C(=C)C12</chem>	SYPUFQXZ NLVREH	Asteraceae	<i>Liatris ohlingerae</i>	Hirsutinolideo

Continued

7	MN 3	Sesquiterpene lactones	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₀	475.1568	2.45	<chem>CC1CC(OC(=O)\C=C(/C)COC(C)=O)C2=C(COC(C)=O)C(=O)O\C2=C\C2(C)OC1=CC2=O</chem>	HDIOUNGY JGHESU	Asteraceae	<i>Polydora poskeana</i>	Glaucolide
8	MN 4	Sesquiterpene lactones	C ₁₈ H ₂₂ O ₆	335.1515	5.58	<chem>CCC(=O)OC1CC2C3(CO3)CC3OC(=O)C(=C)C3CC2(O)C1=C</chem>	YQKMSHP WAFJUCP	Asteraceae	<i>Arctotis stoechadifolia</i>	Guaianolide
9	MN 4	Sesquiterpene lactones	C ₁₈ H ₂₄ O ₆	337.1670	5.95	<chem>CC(=O)C1=CC2=C(OC(=C2)C(C)(C)O)C(=C1)C(O)C(O)C(C)(C)O</chem>	QUZPTVPA UHASLU	Asteraceae	<i>Ophryosporus macrodon</i>	Guaianolide
10	MN 5	Sesquiterpene lactones	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	305.1382	3.11	<chem>CC1C2C(CC(C)=C3C(C2OC(C)=O)C(C)=CC3=O)OC1=O</chem>	UFFSPDVS ESTXSX	Asteraceae	<i>Artemisia campestris</i>	Guaianolide
11	MN 5	Sesquiterpene lactones	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	365.1591	3.11	<chem>CC(O)(CO)C(=O)OC1CC(=C)C2CC(O)C(=C)C2C2OC(=O)C(=C)C12</chem>	NPBDPFOG SVKPOK	Asteraceae	<i>Centaurea kotschyi</i>	Guaianolide
12	MN 6	Polyacetylene lactone	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	203.0701	2.35	<chem>CC#CC#CC#CCC1OC(=O)C1O OCC#CC#CC#CCC1CC C(=O)O1</chem>	PZYXCPSF RPAORV	Asteraceae	<i>Cyrtocymura scorpioides</i>	Polyacetylene lactone
13	MN 6	Benzoxepines	C ₁₂ H ₁₂ O ₄	221.0802	1.05	<chem>CC1=CCC2=CC(=CC(O)=C2OC1)C(O)=O </chem>	XKYLCMPT BATNMO	Asteraceae	<i>Deinandra lobbii</i>	NF
14	MN 6	Cinnamic acids and derivatives	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	249.1115	2.35	<chem> CC(C)=CCOC(=O)\C=C\C1=CC(O)=C(O)C=C1</chem>	APTHUAW PFCCWSS	Asteraceae	<i>Baccharis serrulate</i>	NF

Continued

15	MN 6	Polyacetylene lactone	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	203.0696	1.75	<chem>CC#CC#CC#CCC1OC(=O)C C1O OCC#CC#CC#CCC1CC C(=O)O1</chem>	PZYXCPSF RPAORV	Asteraceae	<i>Cyrtocymura scorpioides</i>	Polyacetylene lactone
16	MN 7	Sesquiterpene lactones	C ₁₇ H ₂₄ O ₈	357.1541	1.00	<chem>CC(=O)OC1C(O)C2(O)C(C3O C(=O)C(=C)C3CCC2(C)O)C1(C)O</chem>	HSZFOPSF GLCWLP	Asteraceae	<i>Artemisia xerophytica</i>	Guaianolide
17	MN 7	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₂ O ₇	315.1436	0.48	<chem>CC1(O)C(O)C(O)C2(O)C1C1 OC(=O)C(=C)C1CCC2(C)O</chem>	FTHQHWN KKLTVLA	Asteraceae	<i>Artemisia rutifolia</i>	Guaianolide
18	MN 7	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₂ O ₇	315.1436	0.58	<chem>CC1(O)C(O)C(O)C2(O)C1C1 OC(=O)C(=C)C1CCC2(C)O</chem>	FTHQHWN KKLTVLA	Asteraceae	<i>Artemisia rutifolia</i>	Guaianolide
19	MN 7	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	297.1332	0.55	<chem>CC1C2C3OC(=O)C(O)(CO)C3 C(O)CC(=C)C2CC1=O</chem>	PJJGBCYNF ZEDCI	Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	Guaianolide
20	MN 7	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	297.1.332	0.99	<chem>CC1C2C3OC(=O)C(O)(CO)C3 C(O)CC(=C)C2CC1=O</chem>	PJJGBCYNF ZEDCI	Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	Guaianolide
21	MN 8	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	245.1169	1.09	<chem>CC12CC3OC(=O)C(=C)C3CC1 1C=CC(=O)C21C</chem>	HNZWFZXL CGRGDK	Asteraceae	<i>Ferreyranthus fruticosus</i>	NF
22	MN 8	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	245.1173	1.23	<chem>CC12CC3OC(=O)C(=C)C3CC1 1C=CC(=O)C21C</chem>	HNZWFZXL CGRGDK	Asteraceae	<i>Ferreyranthus fruticosus</i>	NF

Continued

23	MN 8	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₃ N O ₄	282.1696	1.23	<chem>CC1CC(C)C(=O)C(C1)C1CC(C C(O)=N)CC(=O)O1</chem>	SAVFIMRL AWCZGX	Streptomy cetaceae	NF	NF
24	MN 8	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₃ N O ₄	282.1693	1.73	<chem>CC(CCCC(C)(O)C1=C(O)C=C(CO)C=C1)C(O)=N</chem>	FSQZZIXN QGKNPV	NF	NF	NF
25	MN 8	Sesquiterpene lactones	C ₁₅ H ₂₁ N O ₄	280.1539	1.23	<chem>CC1=CC2=C(CC(C)(C)C2O)C(C)=C1CCON(=O)=O</chem>	QCCAHYCT JMRAJO	Alcyoniida e	<i>Alcyonium antarcticum</i>	NF
26	MN 9	Sesquiterpene lactones	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₀	441.1744	2.06	<chem>C\\C1=C\\CC2C(C\\C(=C/CC1 O)C(=O)OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O)OC(=O)C2=C</chem>	MUYHZEO CHWIVHX	Asteraceae	<i>Pertya glabrescens</i>	NF
27	MN 9	Sesquiterpene lactones	C ₂₁ H ₃₁ N O ₁₀	458.2027	2.04	<chem>CC(C)C(O)(C(C)OC1OC(CO)C (O)C(O)C1O)C(=O)OCC1=C2 N(CCC2=O)C=C1</chem>	MHEDGRK RCACOGP	Boraginac eae	<i>Cynoglossum gansuense</i>	Germacranolideo

NF: Not found

Source: Elaborated by the author

In this study, we identify 27 compounds in **AEL** and **AES**. Among these compounds, one structure was previously described as part of *C. scorpioides* metabolism. Compound **12** (8'-hydroxy 3-4 dihydrovernoniynes) was isolated from the dichloromethane extract of *C. scorpioides* leaves (KLEIN *et al.*, 2013). Its IC₅₀ was established to thirteen different tumor cell lines including, the murine melanoma (B16F10), human prostate cancer (PC3), human prostate cancer (LCCaP), human non-small cell lung carcinoma (H1299), human ovarian adenocarcinoma (OVCAR), non-small cell lung cancer (NCI), human breast adenocarcinoma (MCF7), human neuronal glioblastoma (U138MG), human medulloblastoma (VW473), human cervical adenocarcinoma (HeLa). Compound **12** demonstrated a moderate cytotoxicity against seven tumor cell lines, with IC₅₀ values from 18.0 μ M to 29.0 μ M, when compared to the doxorubicin (IC₅₀ values from 0.8 μ M to 12.6 μ M (KLEIN *et al.*, 2013). This study corroborates our results since the “*de novo*” and nontarget dereplication confirmed the presence of polyacetilene lactone previously isolated from *C. scorpioides*.

13-Acetyl solstitialin A (**2**) was previously isolated from *Centaurea solstitialis* (Asteraceae) and showed effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *C. albicans* and *C. parapsilosis*. These microorganisms were affected by **2** with different MIC values; fungi (MIC = 64 μ g/mL), Gram-negative species (MIC = 64–256 μ g/mL), Gram-positive species (MIC = 64–128 μ g/mL) (ÖZÇELİK *et al.*, 2009).

Twelve compounds identified in MN1 to MN8 clusters are guaianolides. Guaianolides are known by their antimicrobial bioactivity. A guaianolide from *Carpesium macrocephalum* (Asteraceae) showed inhibitory effects against biofilm formation of *C. albicans* (CS5314) (IC₅₀ 38.0 μ g/mL) and inhibitory effects to the yeast-to-hyphae transition (IC₅₀ 106.5 μ g/mL) (XIE *et al.*, 2015). Perveen *et al.*, 2019 reported an antifungal and antibacterial activity of two guaianolides (garcinamine E and 4 α -(β -glucopyranosyl)-oxy-9 α -hydroxyguaia-10(14)en-12,6 α -olide) from *Anvillea garcinii* (Asteraceae). Against *C. albicans* gercinamine E and its analogue demonstrated MIC values of 32.3 μ g/mL and 41.6 μ g/mL, respectively. Against *S. aureus* and *Escherichia fergusonii*, these two compounds displayed strong effect with MIC values of 0.32 and 1.4 μ g/mL, and 1.7 and 3.5 μ g/mL, respectively.

In studies of bioactive natural products, a compound or a class of compounds are expected to be responsible for the bioactivity. In this context, molecular network with taxonomical annotation can be useful identify these responsible compounds. Besides the

limitation of botanical annotation, it can be complemented by a manual search in databases, including bioactivity search. The antifungal activity of **2** against *C. albicans* and *C. parapsilosis* suggests it as candidate for bioactivity.

4. Conclusions

The biological results and the chemical analyses presented in this work support the popular use of *C. scorpioides* in the leukorrhea treatments and related gynecological disorders.

References

- AGOSTA, W. C. Medicines and drugs from plants. **Journal of Chemical Education**, Tucson, v. 74, n. 7, p. 857, jul. 1997. DOI: 10.1021/ed074p857. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed074p857>. Acesso em: 22 maio 2019.
- ALECK, K. A.; BARTLEY, D. L. Multiple malformation syndrome following fluconazole use in pregnancy: report of an additional patient. **American Journal of Medical Genetics**, New York, v. 72, n. 3, p. 253-256, 31 out. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332650>. Acesso em: 22 jul. 2019.
- FRONZA, A. S. *et al.* Antitumoral activity of sesquiterpene lactone diacetylpiptocarphol in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 198, p. 262-267, 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2017.01.022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874116309199>. Acesso em: 22 jul. 2019.
- ALLARD, P. M. *et al.* Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 88, n. 6, p. 3317-3323, 15 mar. 2016. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04804. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b04804>. Acesso em: 30 mar. 2020.
- ALLSWORTH, J. E.; RATNER, J. A.; PEIPERT, J. F. Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 national health and nutrition examination surveys. **Sexually Transmitted Diseases**, Philadelphia, v. 36, n. 12, p. 738-744, dez. 2009. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e3181b38a4b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734826>. Acesso em: 23 jul. 2019.
- BERALDO, M.; APARECIDA, O.; CARON, F.; MARCUCCI, R. M. B. (org.). **Manual de assistência de enfermagem a saúde da pessoa idosa**: elaboração. 4. ed. São Paulo: SMS, 2016. (Série Enfermagem SMS-SP). Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/arquivos/ManualSaudeMulherv302012017.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2019.
- BEUTLER, J. A. Natural products as a foundation for drug discovery. **Current Protocols in Pharmacology**, Hoboken, v. 46, n. 1, p. 9.11.1-9.11.21, 2009. DOI: 10.1002/0471141755.ph0911s46. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471141755.ph0911s46>. Acesso em: 22 maio 2019.
- BHATTACHARYA, S.; SOBEL, J. D.; WHITE, T. C. A combination fluorescence assay demonstrates increased efflux pump activity as a resistance mechanism in Azole-resistant vaginal *Candida albicans* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 60, n. 10, p. 5858-5866, out. 2016. DOI: 10.1128/AAC.01252-16. Disponível em: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01252-16>. Acesso em: 2 dez. 2018.
- BOCCARD, J.; VEUTHEY, J. L.; RUDAZ, S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 33, n. 3, p. 290-304. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200900609>. Acesso em: 19 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis**. Brasília, D.F.: Ministério da Saúde, 2018.

BRUNI, M. P. *et al.* *Trichomonas vaginalis* and HIV infection: relation and prevalence among women in southern Brazil. **Journal of Tropical Pathology**, Goiânia, v. 48, n. 1, p. 15-24, 15 abr. 2019. DOI: 10.5216/rpt.v48i1.55324. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/55324>. Acesso em: 8 ago. 2019.

BUSKUHL, H. **Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides* (LAM) PERS.** 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007. Disponível em: [https://siaiap39.univali.br/repositorio/bitstream/repositorio/1453/1/Humberto Buskuhl pt 1.pdf](https://siaiap39.univali.br/repositorio/bitstream/repositorio/1453/1/Humberto%20Buskuhl%20pt%201.pdf). Acesso em: 21 jul. 2019.

BUSKUHL, H. *et al.* Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry**, London, v. 71, n. 13, p. 1539-1544, 2010. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.06.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.007>. Acesso em: 21 jul. 2019.

BUSKUHL, H. *et al.* A new polyacetylene from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) and its in vitro antitumoral activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 7, p. 1327-1333, 2009. DOI: 10.1590/S0103-50532009000700018. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532009000700018&script=sci_arttext. Acesso em: 14 jul. 2019.

BUSS, A. D.; COX, B.; WAIGH, R. D. Natural products as leads for new pharmaceuticals. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, Hoboken, 2003. p. 847-900. DOI: 10.1002/0471266949.bmc018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471266949.bmc018>. Acesso em: 22 maio 2019.

BUSSMANN, R. W.; SHARON, D. Traditional medicinal plant use in northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 2, n. 1, p. 47, 7 dez. 2006. DOI: 10.1186/1746-4269-2-47. Disponível em: <https://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4269-2-47>. Acesso em: 22 maio 2019.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>. Acesso em: 19 jul. 2020.

CARRENHO, L. Z. B. **Avaliação dos efeitos da subfração acetato de etila III de *Vernonia scorpioides* em modelo de melanoma murino in vivo e in vitro avaliação dos efeitos da subfração acetato de etila III de *Vernonia scorpioides* em modelo de melanoma murino in vivo e in vitro.** 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

COL, A. P.; SAVI, D. C.; ONOFRE, S. B. Identificação das leveduras do gênero *Candida* pelo método cromógeno CHROMagar® *Candida* obtidas de pacientes com infecção das vias urinárias*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 279-281, 2009. DOI: 10.13140/RG.2.1.1714.4163. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/280569355_Identificacao_das_leveduras_do_genero_Candida_pelo_metodo_cromogeno_CHROMagarR_Candida_obtidas_de_pacientes_com_infeccao_das_vias_urinarias. Acesso em: 22 jul. 2019.

DALAZEN, P.; MOLON, A.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. O. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 82-87, 2005. DOI: 10.1590/S0102-695X2005000200002. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000200002. Acesso em: 22 jul. 2019.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 299-315, 3 abr. 2015. DOI: 10.1007/s11101-014-9367-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-014-9367-z>. Acesso em: 23 maio 2019.

DONDERS, G. G. G.; SOBEL, J. D. *Candida* vulvovaginitis: a store with a butterfly and a show window. **Mycoses**, Berlin, v. 60, n. 2, p. 70-72, fev. 2017. DOI: 10.1111/myc.12572. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27687503>. Acesso em: 22 jul. 2019.

DREUX, E. C.; PRIANTI JUNIOR, A. C.; MARTINS, R. A. B. L.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C. Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides* (lam) Pers. em edema de pata em ratos. In: VII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7.; ENCONTRO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 4., São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2005. p. 1208-1211.

DREW, M. G. B.; HITCHMAN, S. P.; MANN, J.; LOPES, J. L. C. X-Ray crystal structure of the sesquiterpene lactone scorpioidine. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, London, n. 17, p. 802, 1980. DOI: 10.1039/c39800000802. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1980/c3/c39800000802/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 22 jul. 2019.

FERREIRA, D. *et al.* Outcomes associated with routine systemic antifungal therapy in critically ill patients with *Candida* colonization. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 41, n. 6, p. 1077-1088, 18 jun. 2015. DOI: 10.1007/s00134-015-3791-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25894623>. Acesso em: 22 jul. 2019.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. Comparative and functional genomics. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 2, n. 3, p. 155-168. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC2447208/?report=abstract>. Acesso em: 19 jul. 2020. , 2001

FREIRE, M. F. I.; ABREU, H. S.; FREIRE, R. B. *et al.* Antibiose e toxidez de extratos de caule de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Forestry and Environment**, Rio de Janeiro, v. 3, n. único, p. 67-73, 1996.

GUENTHNER, P. C.; SECOR, W. E.; DEZZUTTI, C. S. *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 7, p. 4155-4160, 1 jul. 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.7.4155-4160.2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972505>. Acesso em: 23 jul. 2019.

HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F. In the arms of morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. **Canadian Journal of Anesthesia**, Toronto, v. 47, n. 4, p. 367-374, abr. 2000. DOI: 10.1007/BF03020955. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF03020955>. Acesso em: 21 maio 2019.

HENRIQUE, O. *et al.* Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **Femina**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 31-36, 2010. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2010/v38n1/a005.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2019.

HOLANDA, A. A. R. *et al.* Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 3-9, jan. 2007. DOI: 10.1590/S0100-72032007000100002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032007000100002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 2 dez. 2018.

INNOCENTE, A. M. *et al.* Anti-*Trichomonas vaginalis* activity from triterpenoid derivatives. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 8, p. 2933-2940, 1 ago. 2014. DOI: 10.1007/s00436-014-3955-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880238>. Acesso em: 29 jul. 2019.

JAKUPOVIC, J. *et al.* New vernolepin derivatives from *vernonia glabra* and *glaucolides* from *Vernonia scorpioides*. **Planta Medica**, Stuttgart v. 51, n. 5, p. 378-380, 1985. DOI: 10.1055/s-2007-969524. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17342587>. Acesso em: 29 jul. 2019.

KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 15, n. 1, p. 307, 5 dez. 2015. DOI: 10.1186/s12879-015-1055-0. Disponível em: <http://bmcinfectedis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1055-0>. Acesso em: 23 jul. 2019.

KLEIN, J. B. *et al.* Cytotoxic, antitumour and antimetastatic activity of two new polyacetylenes isolated from *Vernonia scorpioides* (lam.) pers. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Copenhagen, v. 113, n. 5, p. 307-315, 2013. DOI: 10.1111/bcpt.12098. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12098>. Acesso em: 22 jul. 2019.

KREUGER, M. R. O. *et al.* Cytotoxic activity of the sub-fraction 2125 from *Vernonia scorpioides* against Sarcoma 180 tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, n. 2 A, p. 353-357, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000300003. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 22 jul. 2019.

KREUGER, M. R. O. *et al.* Effects of the topical application of an ethylacetate fraction from *Vernonia scorpioides* on excisional wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 123-130, 2011. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000192. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-695X2012000100018&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 jul. 2019.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical Reviews**, Easton, v. 113, n. 4, p. 2437-2468, 2013. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr300484s>. Acesso em: 19 jul. 2020.

LEITE, S. N.; PALHANO, G.; ALMEIDA, S. *et al.* Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. **Fitoterapia**, São Paulo, v. 73, n. 6, p. 496-500, 2002. DOI: 10.1016/S0367-326X(02)00169-7. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X02001697>. Acesso em: 10 jul. 2019.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Viçosa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LOSSICK, J. G.; KENT, H. L. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 165, n. 4. pt 2, p. 1217-1222, out. 1991. DOI: 10.1016/s0002-9378(12)90730-9. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1951578>. Acesso em: 23 jul. 2019.

M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Disponível em: www.clsi.org. Acesso em: 2 dez. 2018.

MACHADO, A. L. *et al.* Constituintes químicos de *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers. (Asteraceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 540-543, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400010>. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013000400010&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 23 jul. 2019.

MENEZES, C. B.; FRASSON, A. P.; TASCA, T. Trichomoniasis: are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? **Microbial Cell**, Graz, v. 3, n. 9, p. 404-419. DOI

10.15698/mic2016.09.526. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354568/>. Acesso em: 2 ago. 2020.

MOODLEY, P.; CONNOLLY, C.; STURM, A. W. Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, n. 1, p. 69-73, 1 jan. 2002. DOI: 10.1086/338027. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756983>. Acesso em: 23 jul. 2019.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 254-259. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716514001015>. Acesso em: 26 jul. 2020.

MOREIRA, M. I. D. M. C. G. **Azóis: farmacologia e interações medicamentosas**. 2010. 65 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/3250>. Acesso em: 26 jul. 2020.

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**, Cincinnati, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32162523/>. Acesso em: 12 out. 2020.

NEWMAN, L.; ROWLEY, J.; HOORN, S. V. *et al.* Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. (Z. Meng, Org.). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0143304. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26646541>. Acesso em: 23 jul. 2019.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: metabonomics. **Nature**, Paris, v. 455, p. 1054-1056, 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/4551054a>. Acesso em: 19 jul. 2020.

NUNES, E. B.; NUNES, N. B.; MONTEIRO, J. C. M. S. *et al.* Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da região norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 2, n. 4, p. 23-30, dez. 2011. DOI: 10.5123/S2176-62232011000400004. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 22 jul. 2019.

OLIVON, F. *et al.* Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 12, n. 10, p. 2644-2651, 2017. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00413. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.7b00413>. Acesso em: 22 jul. 2019.

ÖZÇELİK, B.; GÜRBÜZ, I.; KARAOĞLU, T.; YESİLADA, E. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 5, p. 545-552, 29 set. 2009. DOI: 10.1016/j.micres.2007.05.006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501307000717?via%3Dihub>. Acesso em: 22 jul. 2019.

PAGNO, T.; BLIND, L. Z.; BIAVATTI, M. W. *et al.* Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 39, n. 11, p. 1483-1491, 2006. DOI: 10.1590/S0100-879X2006001100012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0100-879x2006001100012&script=sci_arttext. Acesso em: 22 jul. 2019.

PAOLI, A. A. S.; FREITAS, L.; BARBOSA, J. M. Caracterização morfológica dos frutos, sementes e plântulas de *Croton floribundus* Spreng. e de *Croton urucurana* Baill. (euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 57-68, 1995.

PATEL, E. U.; GAYDOS, C. A.; PACKMAN, Z. R.; QUINN, T. C.; TOBIAN, A. A. R. *et al.* Prevalence and correlates of *Trichomonas vaginalis* infection among men and women in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 211-217, 2 jul. 2018. DOI: 10.1093/cid/ciy079. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/67/2/211/4935626>. Acesso em: 20 ago. 2019.

PEREIRA, D. M.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Efeito antiedematogênico da planta *Vernonia scorpioides* frente ao veneno de *Bothrops fonscolombei* e carragenina. **ConScientiae Saúde**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 46-52, 2012. DOI: 10.5585/conssaude.v11n1.2862. Disponível em: <https://periodicos.uninove.br/saude/article/view/2862>. Acesso em: 20 ago. 2019.

PERVEEN, S. *et al.* Antimicrobial guaianolide sesquiterpenoids from leaves of the Saudi Arabian plant *Anvillea garcinii*. **Fitoterapia**, v. 134, p. 129-134, 1 abr. 2019. DOI: 10.1016/j.fitote.2019.02.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X19302643>. Acesso em: 4 set. 2020.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 2, p. 300-317. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564565>. Acesso em: 23 jul. 2019.

PINTO, A. P. R. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from the leaves of *Cyrtocymura scorpioides*. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 52, n. 4, p. 740-742, 22 jul. 2016. DOI: 10.1007/s10600-016-1761-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10600-016-1761-x>. Acesso em: 2 dez. 2018.

POLLO, L. A. E. *et al.* Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, London, v. 95, p. 375-383, 2013. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.07.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.011>. Acesso em: 23 jul. 2019.

POLLO, L. A. E.; FREDERICO, M. J.; BORTOLUZZI, A. J.; SILVA, F. R. M. B.; BIAVATTI, M. W. A new polyacetylene glucoside from *Vernonia scorpioides* and its potential antihyperglycemic effect. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 279, p. 95-101, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.11.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.003>. Acesso em: 2 dez. 2018.

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica de *Vernonia scorpioides* (lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos.** 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RAUH, L. K. *et al.* Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 138, n. 2, p. 390-397, 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.012>. Acesso em: 2 dez. 2018.

RUTZ, A. *et al.* Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 10, p. 1-15, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.01329. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01329/full>. Acesso em: 19 jul. 2020.

SALDANHA, L. L. *et al.* Metabolomics of *Myrcia bella* populations in brazilian savanna reveals strong influence of environmental factors on its specialized metabolism. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 12, p. 2954, 26 jun. 2020. DOI: 10.3390/molecules25122954. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2954>. Acesso em: 6 jul. 2020.

SARDANA, S. *et al.* Epidemiologic analysis of *Trichomonas vaginalis* infection in inflammatory smears. **Acta Cytologica**, Chicago, v. 38, n. 5, p. 693-697, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8091899>. Acesso em: 23 jul. 2019.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 62, n. 1, p. 10-24. Disponível em: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.045054-0>. Acesso em: 2 dez. 2018.

SHEETAL, C. K. M. P. A review on pharmacognocny of bioactive sesquiterpene lactones. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, Sikar, v. 11, n. 3, p. 116-121, 2019. DOI: 10.25258/phyto.11.3.4. Disponível em: <http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/11/IJPPR,Vol11,Issue3,Article4.pdf>. Acesso em: 5 set. 2020.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 214, n. 1, p. 15-21, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.06.067. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26164695>. Acesso em: 2 dez. 2018.

SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; SOGA, T.; TOMITA, M. Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current Bioinformatics**, Sharjah, v. 7, n. 1, p. 96-108, 10 fev. 2012. DOI: 10.2174/157489312799304431. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-8936&volume=7&issue=1&spage=96>. Acesso em: 19 jul. 2020.

TOIGO, L.; OLIVEIRA, F.; MARQUES, M. O. M. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 2, p. 49-55, 2004.

WARNING, U.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; JONES, S. B. Scorpiolid, ein neuer Sesquiterpenlacton-Typ aus *Vernonia scorpioides*. **Liebigs Annalen der Chemie**, Weinheim, v. 1987, n. 5, p. 467-468, 1987. DOI: 10.1002/jlac.198719870356. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jlac.198719870356>. Acesso em: 19 jul. 2020.

WHO. **Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections**. WHO, 2014. Disponível em: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241502450/en/>. Acesso em: 23 jul. 2019.

XIE, C. *et al.* Sesquiterpenes from *carpesium macrocephalum* inhibit *Candida albicans* biofilm formation and dimorphism. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 25, n. 22, p. 5409-5411, 12 jun. 2015. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.09.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/bioorganic-and-medicinal-chemistry-letters/vol/25/issue/22>. Acesso em: 21 maio 2019.

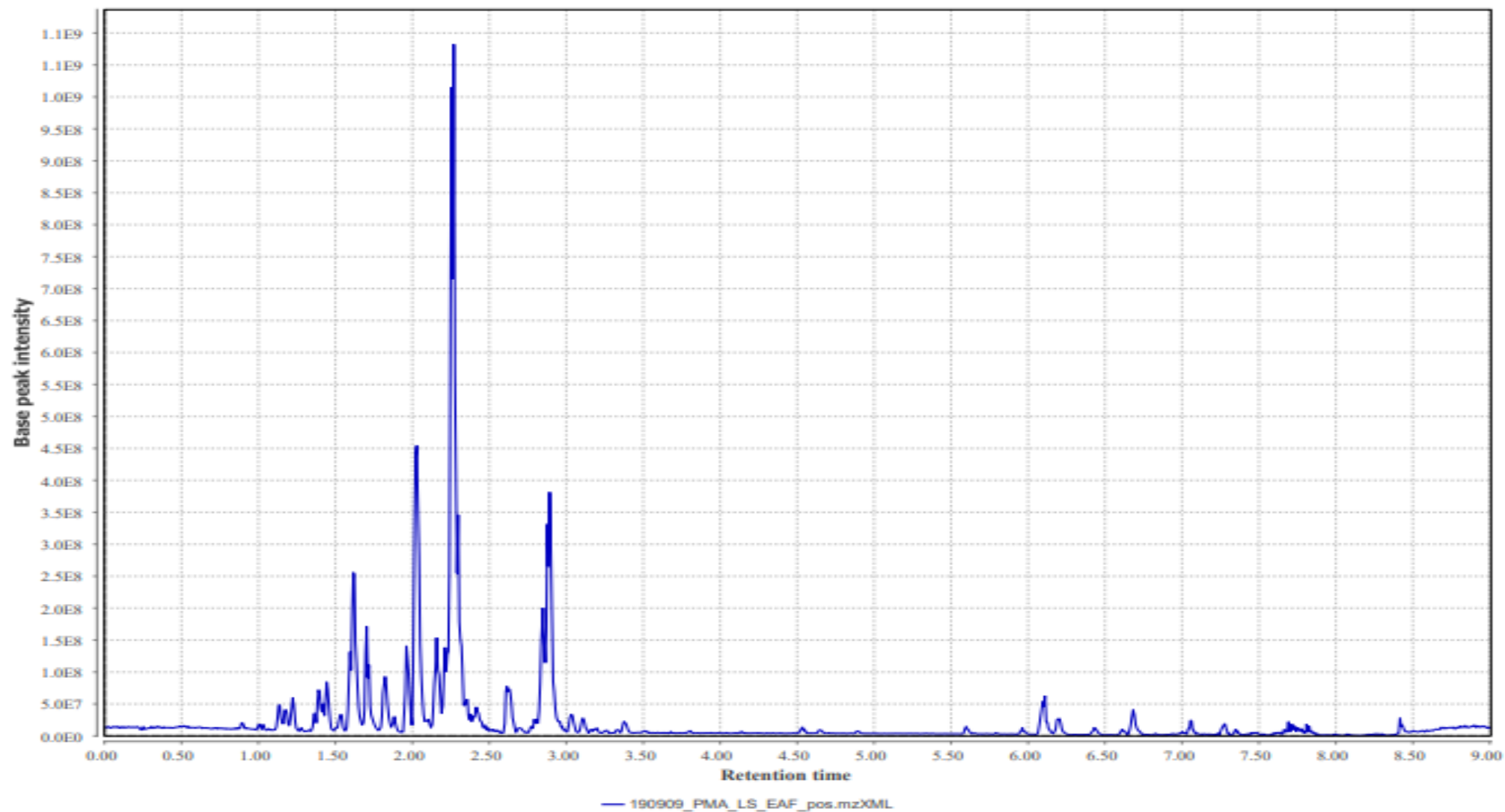
YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 5, p. 559, 29 abr. 2016. DOI: 10.3390/molecules21050559. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/559>. Acesso em: 21 maio 2019.

ZAPPI, D. C. *et al.* Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566411. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602015000401085&lng=en&tlng=en. Acesso em: 29 maio 2019.

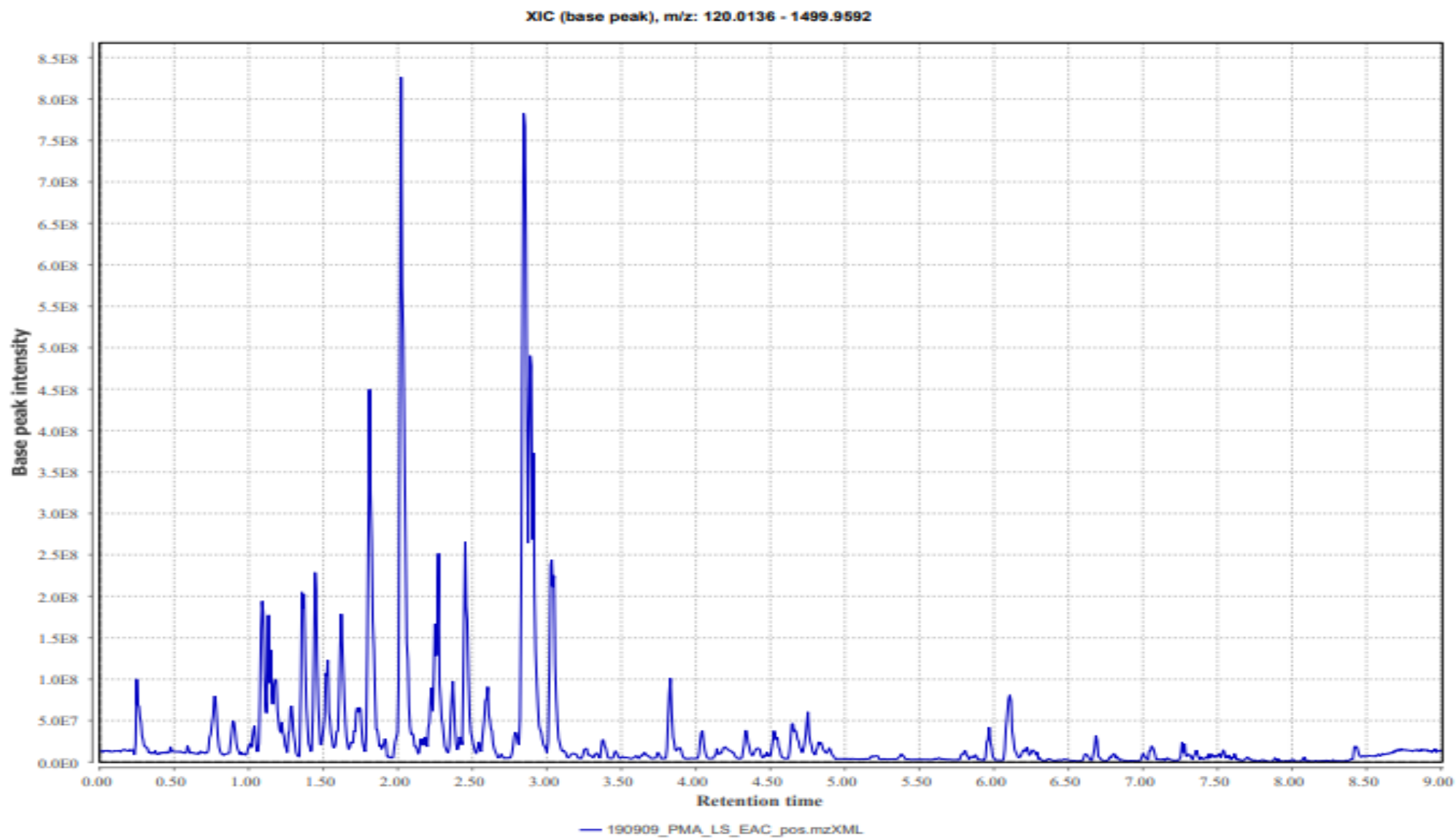
ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A. OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUENDÉ, R. T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: a review. Substances naturelles actives sur *Candida albicans*, sources de nouveaux médicaments antifongiques: revue de la littérature. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez87.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1156523316302220?via%3Dihub>. Acesso em: 1 dez. 2018.

Appendix A - Chromatogram of AEL

XIC (base peak), m/z: 120.0136 - 1499.9592



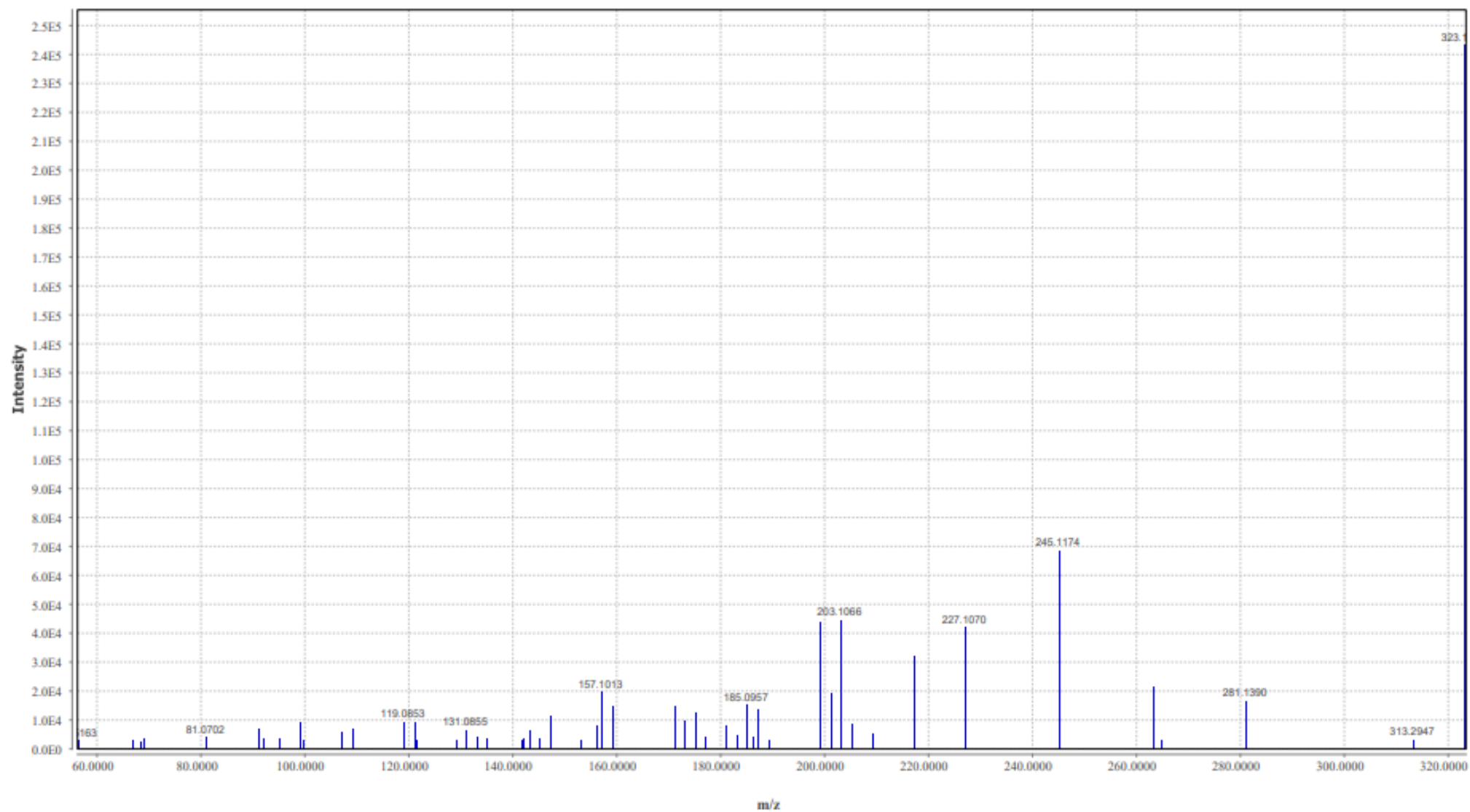
Appendix B - Chromatogram of AES



Appendix C - Mass spectra (MS2) of compound 2

190909_PMA_LS_EAC_pos.mzXML#481 @0.94 MS2 (323.1487) c +, base peak: 323.1489 m/z (2.4E5)

Scan definition: Full



Appendix D - Mass spectra (MS2) of compound 12

