



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

HEMERSON SILVA DA ROSA

CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Sida tuberculata* R.E. FRIES (MALVACEAE)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Uruguiana
2013**

HEMERSON SILVA DA ROSA

CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Sida tuberculata* R.E. FRIES (MALVACEAE)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

**Uruguiana
2013**

HEMERSON SILVA DA ROSA

CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Sida tuberculata* R.E. FRIES (MALVACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Química e Bioquímica de Produtos Naturais

Dissertação defendida e aprovada em: 24 de janeiro de 2013.
Banca examinadora:

Profa. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
(orientador)
(UNIPAMPA)

Prof. Dr^a Margareth Linde Athayde
(UFSM)

Prof. Dr^a Daiana Silva de Ávila
(UNIPAMPA)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a oportunidade de alcançar mais um objetivo em minha vida, e por conceder-me forças e saúde durante essa caminhada.

Também de maneira especial agradeço a meus familiares. Meu pai Airton Fagundes da Rosa e mãe Leda Clair da Rosa por todo amor, incentivo e suporte necessário. A minha esposa e companheira Liliane de Moura da Rosa, meu sincero agradecimento por estar do meu lado nos momentos que mais precisei. Aos meus filhos, Lucas da Rosa e Luan da Rosa, que são o motivo de todo meu esforço e dedicação, meu eterno agradecimento.

Agradeço, especialmente, aos meus professores que foram e são os responsáveis, juntamente conosco, por essa realização. Em destaque, ao meu orientador e amigo professor Andreas Sebastian L. Mendez, por toda dedicação, auxílio, companheirismo e tolerância concedida ao nosso crescimento pessoal e profissional, sem os quais jamais concluiríamos essa etapa. Também, ao professor Alexandre Fuentefria e suas alunas Graziela Camargo e Vanessa Bergamo, meu muito obrigado pela parceria e disposição em contribuir de maneira essencial nesse estudo. Agradeço aos professores Vanderlei Folmer e Robson Puntel pelas constantes ajudas e oportunidades de crescimento. A minha eterna professora e amiga Mariluci Souza Disconzi pelo seu carinho e incentivo no início dessa jornada. E a todos os outros professores que sempre estiveram dispostos a nos receber e auxiliar.

Meu sincero agradecimento aos colegas de laboratório, que são sem dúvida, fundamentais nesse processo. Gostaria de citar minhas amigas, Vanessa Brum de Camargo e Geovana da Cruz Pereira, que foram em muitos momentos nossas co-orientadoras. Aos demais colegas Lidiane Farias, Mariane Pires, Fábio Barbosa e o restante do pessoal do LDCQ e 403, e todos outros que estiveram conosco nesse período, meu muito obrigado.

Nesses dois anos tive o privilégio de ganhar quatro grandes amigas, Ana Colpo, Caroline Martinez, Maria Eduarda e Felipa Bassante, as quais, eu faço questão de agradecer por todos os momentos de ajuda e companheirismo. Valeu meninas, vocês são demais!

Agradeço a Unipampa e a CAPES por todo suporte técnico, estrutural e financeiro nesse período.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram nessa nossa conquista, deixo meu cordial obrigado!

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Sida tuberculata* R.E. FRIES (MALVACEAE)

Sida tuberculata (Malvaceae), conhecida popularmente como “guanxuma”, é uma espécie vegetal de porte herbáceo, bem representada na região sul do Brasil. Na cultura popular é utilizada para tratamento de diversas enfermidades, em especial àquelas relacionadas ao diabetes e ao colesterol elevado. Para algumas espécies, existem relatos de eventual potencial antimicrobiano. Considerando a ausência de estudos sobre esta planta, o presente trabalho investigou a composição química dos extratos brutos de *S. tuberculata* e avaliou seu potencial antifúngico *in vitro*. Após a coleta e identificação, o material vegetal foi submetido aos processos de secagem e trituração. Submeteu-se a extração a frio por percolação, utilizando-se como solvente solução hidroetanólica a 40% para folhas e 70% para raízes. Para fins de comparação foram feitas extrações aquosas por infusão. Na sequência, foram determinados os teores de fenólicos totais e flavonóides totais. Posteriormente, as amostras foram analisadas através de método por CLAE-UV, com seleção das condições cromatográficas de melhor eficiência de separação. Sendo estas estabelecidas, efetuou-se análise por LC-MS em modo ESI positivo. Para os ensaios da atividade antifúngica foram utilizados os protocolos de microdiluição em ágar para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Também foi aplicada a metodologia para avaliação do potencial de remoção de biofilme em Cateter Venoso Central (CVC). Os resultados obtidos demonstraram um maior teor de fenólicos e flavonóides totais nos extratos das folhas. As análises por LC-UV-MS permitiram a identificação e proposição de cinco compostos, entre ecdisteróides, flavonóides e alcalóides. Nos ensaios de atividade antifúngica os extratos aquosos apresentaram atividade contra linhagens de *Candida krusei*, com valores de CIM variando entre 3.9 - 62.5 µg/ml para folhas e 1.95 - 31.25 µg/ml para raízes. No teste de remoção de biofilme, os extratos aquosos das folhas demonstraram um maior potencial de remoção. Os dados de composição química obtidos, nas variantes de diferentes partes da planta, bem como a atividade antimicrobiana detectada, geram expectativas quanto a novos estudos de exploração do potencial biológico de *S. tuberculata*.

Palavras-chave: *Sida tuberculata*, LC-MS, extratos hidroetanólicos, atividade antifúngica *in vitro*

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF *IN VITRO* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Sida tuberculata*. R.E. FRIES (MALVACEAE) EXTRACTS

Sida tuberculata (Malvaceae), popularly known as "guanxuma", is an herbaceous plant species present in southern Brazil. In popular culture, it is used for the treatment of several diseases, such as those related to diabetes and high cholesterol level. For some species of *Sida*, there are also reports about the antimicrobial potential. Considering the lack of studies at this species, this study proposed an investigation about the chemical composition of *Sida tuberculata* extracts and their *in vitro* antifungal activity. After collection and identification, the plant material was submitted to dryness and powdered. Then, it was submitted to extraction by percolation using hydroethanolic solution at 40% and 70% as solvent, to leaves and roots respectively. For comparison, aqueous extracts were obtained by infusion. The total phenolic and flavonoid contents of extracts were determined. The samples were also evaluated by HPLC-UV, testing the chromatographic conditions that promote the better separation efficiency. After, for the identification procedure, the analysis by LC-ESI-MS in positive mode was conducted using previously established conditions. For the antifungal activity assay, the agar microdilution protocols were used for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). In addition, the extracts were tested for potential biofilm removal in Central Venous Catheter (CVC). The results demonstrated a higher concentration of total phenolic and flavonoids compounds in the leaves extracts. LC-MS analysis allowed the identification of five components, between ecdysteroids, flavonoids and alkaloids. In the assay of antifungal activity, the aqueous extract had activity against *Candida krusei* strains, with the MIC values varying between 3.9 - 62.5 µg/ml for leaves and 1.95 - 31.25 µg/ml for roots. In the CVC biofilm removal testing, the aqueous leaves extracts presented a greater potential. The chemical composition data obtained in this work, considering the different parts of plant, as well as the antimicrobial activity detected, bring perspectives of exploring this species concerning its biological potential.

Keywords: *Sida tuberculata*, hydroethanolic extracts, LC-ESI-MS, *in vitro* antifungal activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espécie <i>Sida tuberculata</i> fotografada na área de coleta	15
Figura 2 – Isolados de <i>Candida krusei</i> . A) <i>C. krusei</i> fotomicrografia de uma colônia. B) Fase de pseudohifa.....	21
CAPÍTULO I	25
Figura 1 - Curva analítica para determinação de ácido gálico por método espectrofotométrico, em comprimento de onda de 750 nm.....	32
Figura 2 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de <i>S. tuberculata</i> pelo método de De Souza et al. (2002); com detecção em 340 nm. A: análise de extratos de folhas obtidos por percolação. B: análise de extratos de raízes obtidos por percolação. C: análise de padrões de isoquercetina e quercetina, a 10 µg/ml	35
Figura 3 - Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de <i>S. tuberculata</i> pelo método de Costa et al. (2011); com detecção em 340 nm; com detecção em 340 nm. A: análise de extratos de folhas obtidos por percolação; B: análise de extratos de raízes obtidos por percolação; C: análise de padrão de isoquercetina a 10 µg/ml.	36
Figura 4 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de <i>S. tuberculata</i> pelo Método de Chandra e Mejia. (2004); com detecção em 340 nm. A: Análise de extratos de folhas obtidos por percolação; B: Análise de extratos de raízes obtidos por percolação; C: Análise de padrão de canferol a 10µg/ml.	37
Figura 5 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de <i>S. tuberculata</i> pelo método de Pinheiro et al. (2006); com detecção em 340 nm. A: análise de extratos de folhas obtidos por percolação; B: análise de extratos de raízes obtidos por percolação; C: análise de padrões de isoquercetina, quercetina e canferol a 10 µg/ml.....	38
Figura 6 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de <i>S. tuberculata</i> pelo método de Pinheiro et al. (2006); com detecção em 340 nm. A: extratos de folhas obtidos por infusão; B: extratos de raízes obtidos por infusão.....	39
CAPÍTULO II	42
Figure 1. Mass chromatogram and spectra of ion fragments obtained from analysis of <i>sida tuberculata</i> (malvaceae) leaves extract (hydroethanolic extract). Analysis performed by using LC/ESI/MS in positive ion mode. Peak numbers correspond to chemical compounds presented in table 3. (1) 20-hydroxyecdysone-3- <i>o</i> -β-d-glycopyranoside; (2) 20-hydroxyecdysone; (3) 20-hydroxyecdysone-dideoxihexose; (4) kaempferol-3- <i>o</i> -β-d-(6''- <i>e</i> -p-coumaroyl)-glucopyranoside.	70
Figure 2. Mass chromatogram and spectra of ion fragments obtained from analysis of <i>sida tuberculata</i> (malvaceae) roots extracts. Analysis performed by using LC/ESI/MS in positive ion mode. Peak numbers correspond to chemical compounds presented in Table 3. (a)	

hydroethanolic extract; (b) aqueous infusion; (1) 20-hydroxyecdysone-3-*o*- β -d-glycopyranoside; (2) 20-hydroxyecdysone; (5) *n*-feruloyltyramine. 70

Figure 3. Chemical structures of the constituents identified in *Sida tuberculata* (Malvaceae) extracts..... 70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	25
Tabela 1- Principais condições testadas para análise dos extratos de <i>S. tuberculata</i> por CLAE-UV.....	30
Tabela 2 - Resultados de determinação de resíduo seco para as extrações hidroetanólicas em diferentes proporções.....	31
Tabela 3 - Teor de Polifenóis totais de <i>S. tuberculata</i> em diferentes métodos extrativos com diferentes proporções de etanol.	33
Tabela 4 - Teor de flavonóides totais em extratos de <i>S. tuberculata</i> obtidos a partir de diferentes técnicas extrativas e solventes extratores.....	34
CAPÍTULO II	42
Table 1. Total phenolic and flavonoid content in <i>Sida tuberculata</i> (malvaceae), obtained from the analysis of leaves and roots hydroethanolic extracts.....	66
Table 2. Chemical constituents identified in <i>Sida tuberculata</i> (Malvaceae) with corresponding retention times, quasi-molecular ions in positive mode and key fragments by LC/ESI-MS.....	67
Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) for aqueous extracts (leaves and roots infusions) of <i>Sida tuberculata</i> (Malvaceae), determined against <i>Candida krusei</i> clinical strains.....	68
Table 4. Biofilm removal in central venous catheter (CVC) by <i>Sida tuberculata</i> (Malvaceae) aqueous extracts (leaves and roots infusions).....	69
Tabela 5 - Atividades biológicas associadas ao ecdisteróide 20-hidroxiecdisona, em mamíferos.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFM - Concentração fungicida mínima
CFU - *colony-forming unit*
CIM - Concentração inibitória mínima
CK – *Candida krusei*
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CV – Coeficiente de variação
CVC – *Central venous catheter*
DAD – Diode array detector
EAG – Equivalentes de ácido gálico
ER – Equivalentes de rutina
ESI – *Electro spray ionization*
HPLC – *High performance liquid chromatography*
LC – *Liquid chromatography*
MFC – *Minimal fungicidal concentrations*
mg – miligramas
µg – microgramas
µl - microlitros
MIC – *Minimal inhibitory concentrations*
ml – mililitros
MS – *Mass spectrometry*
nm - nanômetros
Tr – tempo de retenção
UV – Ultravioleta
v. - volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	GÊNERO SIDA - ASPECTOS BOTÂNICOS	15
2.2	GÊNERO SIDA – ASPECTOS FITOQUÍMICOS.....	16
2.2.1	Alcalóides em Sida	16
2.2.2	Flavonóides em Sida.....	16
2.2.3	Ecdisteróides em Sida	17
2.3	GÊNERO SIDA: USO TRADICIONAL E ESTUDOS FARMACOLÓGICOS	18
2.4	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	19
2.4.1	<i>Candida krusei</i>	20
2.4.2	Formação de Biofilme por <i>Candida sp</i>	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
CAPÍTULO I		25
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS		25
1	DESENVOLVIMENTO DOS EXTRATOS VEGETAIS	26
1.1	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	26
1.2	TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	26
1.2.1	Coleta e identificação botânica	26
1.2.2	Manuseio e secagem	26
1.2.3	Determinação da perda por dessecação	27
1.3	PREPARO E CARATERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	27
1.3.1	Extração por maceração.....	27
1.3.2	Extração por percolação.....	28
1.3.3	Extração por refluxo	28
1.3.4	Determinação de resíduo seco	28
1.3.5	Teor de fenólicos totais	28
1.3.6	Teor de flavonóides totais.....	29
1.3.7	Determinação cromatográfica por CLAE-UV	29
1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1.4.1	Perda por secagem e dessecação	30
1.4.2	Resíduo seco	31

1.4.3 Teor de fenólicos totais	32
1.4.4 Teor de flavonóides totais	33
1.4.5 Determinação cromatográfica por CLAE-UV	35
2 CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO II	42
MANUSCRIPT - Chemical composition and selective anti-<i>candida krusei</i> activity of <i>Sida tuberculata</i> R.E. Fries. (Malvadeae) extracts	42
ABSTRACT	44
INTRODUCTION	45
EXPERIMENTAL	47
Chemicals	47
Plant material	47
Extracts	47
Concentration of extracts, total phenolic content and total flavonoid content	48
LC-UV-MS	48
Antifungal activity	49
Antifungal screening	49
Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC)	50
Evaluation of biofilm removal of artificially contaminated Central Venous Catheter (CVC) coupons	50
RESULTS AND DISCUSSION	51
Preparation and characterization of extracts	51
LC-UV-MS	52
Antifungal activity	55
CONCLUSIONS	58
REFERENCES	58
DISCUSSÃO	74
PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

As considerações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, apesar de, muitas vezes, não terem estes efeitos devidamente comprovados (MOURA 2010). De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia, fitoquímica, bioquímica e toxicologia, que juntas proporcionam um maior conhecimento sobre possíveis atividades biológicas dessa flora (MACIEL et al., 2002).

Cabe destacar que o uso empírico e pouco cuidadoso das plantas, fora de um padrão de segurança e sem respaldo científico, se torna perigoso à população e inadequado para a implantação da fitoterapia como um recurso terapêutico no atendimento de algumas das necessidades básicas dos serviços de saúde, como tem sido recomendado por órgãos governamentais (SOUZA et al., 2003). A inexistência ou a falta de informação sobre a caracterização de espécies medicinais impossibilita o seu uso correto e com segurança. Por isso a comprovação científica torna-se essencial nesta área.

Nesse contexto, a espécie botânica *Sida tuberculata* R.E. FRIES, comumente conhecida como “guanxuma”, tem a infusão de suas raízes popularmente utilizada contra a hiperglicemia, hipercolesterolemia e também como agente antimicrobiano. Trata-se de uma planta herbácea ou subarbustiva amplamente distribuída no sul da Brasil, pertencente à família Malvaceae. Consideradas invasoras, as espécies do gênero, ocorrem preferencialmente em lugares ensolarados com vegetação alterada, raramente nos interiores das matas. No Brasil, ocorre em todo o território, desenvolvendo-se em diversos ambientes (BOVINI et al., 2001)

Recentemente, estudos envolvendo espécies do gênero *Sida* aumentaram significativamente em várias partes do mundo. Dois estudos subsequentes relataram os efeitos cardioprotetor e anti-aterosclerótico dos extratos de *S. rhomboidea* em camundongos (THOUNAOJAM et al., 2010, THOUNAOJAM et al., 2011). Assam et al. (2010) relataram uma atividade moderada contra *Salmonella dysenteriae* dos extratos metanólicos de *S. rhombifolia*. Em contrapartida Konaté et al (2012) demonstrou que *S. alba* possui um significativo efeito antibacteriano em linhagens gram-positivas e gram-negativas. Também, o conteúdo de polifenóis totais, atividade antioxidante e anti-inflamatória foram avaliadas por Konaté e Souza (2010) em cinco espécies de *Sida* (*S. acuta* Burm, *S. alba* L., *S. cordifolia* L., *S. rhombifolia* L., *S. urens* L) todas coletadas em um país africano, tendo a maioria sua ação

comprovada. E ainda, foi demonstrado que as frações extrativas orgânicas de *S. cordifolia* possuem uma pronunciada resposta antinociceptiva orofacial em camundongos (BONJARDIM et al., 2011)

Dentre as principais classes de componentes fitoquímicos já relatados e isolados para *Sida*, estão a presença de esteróides (DINAN et al., 2001a), flavonóides (SUTRADHAR et al., 2008) e compostos nitrogenados (KHATOON et al., 2005). Um estudo de isolamento e identificação realizado por Gomes et al. (2008) identificou a presença de um novo componente químico denominado feofitina derivada da clorofila, sendo esta substância inédita no gênero. Análises qualitativas em *S. rhombifolia* através screenings fitoquímicos detectaram a presença saponinas e flavonóides como também taninos e glicosídeos (THOUNAOJAM et al., 2009a; BUGRÉS e REZA, 2008)

Embora estes trabalhos tenham demonstrado a relevância das espécies de *Sida* em determinadas atividades biológicas, cabe destacar que pesquisas com espécies nativas do bioma Pampa e adaptadas às características singulares dessa região podem revelar componentes e efeitos exclusivos em exemplares existentes nessa área. De acordo com Kutchan (2001), os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais.

Com base no exposto acima, o presente trabalho realizou um estudo da composição química dos extratos obtidos de *Sida tuberculata* em exemplares coletados na região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, inserida no bioma Pampa. Foram aplicadas técnicas cromatográficas e espectrométricas, bem como, uma avaliação do potencial antifúngico *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GÊNERO SIDA - ASPECTOS BOTÂNICOS

Sida é um gênero botânico inserido na família Malvaceae, pertencente à ordem Malvales e está constituída por 243 gêneros e 4225 espécies aproximadamente (STEVENS, 2003). Normalmente se apresentam como ervas, subarbustos, arbustos e raramente árvores (BARACHO, 1998). No Brasil, essa expressividade se restringe a 35 gêneros e cerca de 400 espécies, com predominância nas regiões Nordeste e Sul e, em menor proporção, nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste (BARROSO et al. 1991; SILVA et al, 2006). Muitos representantes desse gênero são considerados plantas daninhas por serem espécies infestantes em diversas culturas, como pastagens e áreas desocupadas. Dificultam as colheitas mecânicas em culturas anuais, pelos caules muito resistentes (CARVALHO e PITELLI, 1992; KISSMANN e GROTH, 2000).

Sida tuberculata caracteriza-se por ser uma espécie perene ou anual, ereta, fibrosa, bastante ramificada, variando entre 40 a 80 cm de altura e multiplica-se por sementes (Figura 1). Este táxon possui como característica uma raiz pivotante que pode atingir 50 cm de profundidade com muitas raízes secundárias (KISSMANN e GROTH, 2000). Espécies dessa família são largamente disseminadas em quase todo o mundo, com exceção de regiões muito frias, ocorrendo predominantemente nas regiões tropicais, principalmente na América do Sul (HEYWOOD, 1993).



Figura 1 – Espécie *Sida tuberculata* fotografada na área de coleta.

Fonte: Autor (2012)

Assim, Sida é, sem dúvida, o gênero que possui as espécies mais polimórficas de toda a família e, por isso, torna-se difícil a sua delimitação taxonômica. Apesar do polimorfismo de suas espécies, apresentam algumas características importantes para sua identificação como folhas pubescentes, com tricomas estrelado em ambas as faces, e ainda, suas folhas são serrilhadas na porção distal e inteiras na porção proximal (BOVINI et al., 2001; RÓNDON, 2009).

2.2 GÊNERO SIDA – ASPECTOS FITOQUÍMICOS

2.2.1 Alcalóides em Sida

Trabalhos voltados à análise fitoquímica com espécies de Sida já relataram a presença de alguns compostos das principais classes de metabólitos secundários. Os alcalóides têm sido umas das classes mais representativas no gênero. Ghosal et al. (1975) e Gunatilaka et al. (1980) isolaram de *S. cordifolia* alguns alcalóides como efedrina, pseudoefedrina, vasicinona e vasicinol. Silveira et al. (2003a) encontraram vasicina nas folhas de *S. cordifolia*, a qual demonstrou possuir um efeito hipotensor por bradicardia. Das frações metanólicas de *S. veronicaefolia*, Lutterodt (1995) isolou o alcalóide sidaverina, o qual possui ação semelhante à oxitocina na contratilidade uterina de ratas. Outro alcalóide isolado no gênero foi a criptolepina de *S. acuta*, que por sua vez apresentou uma excelente atividade antimalárica (BANZOUZI et al., 2004).

Também, Shutrathar et al. (2007) isolaram um novo alcalóide, 1,2,3,9-tetrahidropirrolo [2,1-b] quinazolina-3-ilamina, de *S. cordifolia* o qual apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória em animais. Outros alcalóides obtidos para este gênero foram quindolinona, criptolepinona, 11-methoxiquindolina e N-trans-feruloiltiramina, isolados de *S. acuta*. (JANG et al., 2003), os quais revelaram atividade anti-neoplásica em células mamárias de camundongo. Em outro trabalho recente, sawainsonina um alcalóide presente em *S. carpinifolia*, tem sido isolado e investigado por se tratar um de um potente agente tóxico, causa de envenenamentos em ovelhas, cavalos e cervídeos entre outros (BEDIN et al., 2010).

2.2.2 Flavonóides em Sida

Os flavonóides são compostos formados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, e também a partir do malonato. Sua estrutura básica é constituída pelo

núcleo flavan, que consiste em 15 átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), denominados A, B e C (PIETTA, 2000). Sua presença em espécies vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, fungos, e bactérias), e seus pigmentos servem de atração a agentes polinizadores (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Estudos envolvendo flavonóides não são comuns para o gênero, uma vez que não são compostos predominantemente encontrados em espécies de *Sida*. Shutrathar et al. (2008) isolaram dois novos flavonóides dos extratos clorofórmicos de *S. cordifolia*, 5,7-dihidroxi-3-isoprenil-flavona e 5-hidroxi-3-isoprenil-flavona, os quais demonstraram possuir efeitos analgésicos e anti-inflamatórios em ratos. Também, Silva et al. (2006) identificaram em *S. galheirensis* cinco compostos flavônicos, a saber, o 5,4'-dihidroxi-3,7,3'-trimetoxiflavona, 5,7,4'-trihidroxiflavona, 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, canferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaroil) glicopiranosídeo e luteolina 7-O- β -D-glicopiranosídeo. Outro estudo realizado por Das et al. (2011) em extratos de *S. glutinosa*, levou ao isolamento de sete compostos já descritos na literatura e dois novos flavonóides glicosídicos e glutinosídeos.

2.2.3 Ecdisteróides em *Sida*

Ecdisteróides foram descobertos como hormônios reguladores do crescimento em insetos. Entretanto, eles existem em quase todas as outras classes de artrópodes e também em outros filos de invertebrados. Análogos dos ecdisteróides, os fitoecdisteróides são amplamente distribuídos como metabólitos secundários nas plantas (DINAN, 2001a).

Pesquisas instrumentais mais aprofundadas com o gênero *Sida* concentram suas atenções nesta classe de metabólito. Jadhav et al. (2007) isolaram e identificaram sete substâncias em *S. rhombifolia* desta classe, incluindo três novos componentes (25-acetoxi-hidroxiectidisona-3-O- β -glicopiranosídeo, pterosterona-3-O- β -glicopiranosídeo, ecdisona-3-O- β -glicopiranosídeo). Também, Darwish e Reinecke (2003) isolaram das partes aéreas de *S. spinosa* quatorze ecdisteróides, sendo dois novos, derivados da ecdisona. Wang et al. (2008) realizaram um estudo de comprovação, isolamento e identificação dos ecdisteróides utilizando técnicas de Espectrometria de Massas com ionização de electro-spray e identificaram sete destes compostos nos extratos de *S. rhombifolia*. Já Dinan et al. (2001b) analisaram onze espécies de *Sida*, e encontraram quantidades significativas de ecdisteróides em três delas, *S. acuta*, *S. filicaulis* e *S. rhombifolia*.

2.3 GÊNERO SIDA: USO TRADICIONAL E ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

A literatura relata o uso das espécies do gênero *Sida* na medicina popular para uma variedade de enfermidades. Destaca-se que, em países africanos, determinadas espécies de *Sida* são utilizadas como antisséptico em ferimentos, e também para o tratamento de diarreia, úlcera, abscessos e furúnculos (ECHOU et al., 1996; NOUMI e YOMI, 2000). Também, na Índia existem as mais variadas indicações dessas plantas devido a um sistema tradicional de medicina natural denominado Ayurveda. Segundo Thounaojam et al. (2009a), em várias partes do norte da Índia elas são ministradas para diabetes e obesidade. Também lá, as infusões das raízes são consumidas por possuírem efeitos diuréticos e afrodisíacos, e os ramos junto com as raízes são usados para febre, doenças do coração e inflamações (VENKATESH et al., 1999).

Ainda, em trabalho específico com *S. cordifolia*, relatou-se o uso popular de raízes, folhas e sementes no tratamento da disenteria crônica e da asma, sendo o extrato aquoso da planta inteira consumido para tratar o reumatismo (YUSUF e KABIR, 1999). No Brasil a *S. cordifolia*, conhecida como malva-branca ou guanxuma-branca, é utilizada na medicina popular para tratamento de estomatites, bronquite asmática e congestão nasal. Os efeitos anti-inflamatório e analgésico foram investigados para os extratos aquosos desta planta, mostrando-se bastante significativos, comprovando sua utilização popular (FRANZOTTI et al., 2000). Verifica-se também a utilização de *S. acuta*, para neutralizar o veneno da serpente *Bothrops atrox*, tendo esse efeito comprovado por investigação laboratorial (OTERO et al., 2000).

Rao e Mishra (1997) atribuíram à espécie *S. rhombifolia* atividades anti-inflamatórias e hepatoprotetoras em ratos albinos. Também, Venkatesh et al. (1999) relatam que *S. rhomboidea* Roxb. é uma erva muito comum em pântanos da Índia, cujas raízes e folhas são usadas como tônico, para cura de febres, doenças do coração e diversos tipos de inflamação. No mesmo trabalho citado acima, realizou-se um estudo farmacológico utilizando extratos desta planta, que por sua vez indicaram sua atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Outro estudo demonstrou a atividade antioxidante de *S. galheirensis* ULBR. (SILVA et al., 2006). A mesma atividade antioxidante já foi verificada para *S. rhombifolia* por Dhalwal et al. (2007), que constataram um maior efeito antioxidante nas raízes desta planta.

Outra característica já investigada para os extratos de *S. rhombifolia* trata-se da atividade antibacteriana. Os autores relatam que os extratos e frações possuem atividade bactericida a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (BUGRÉS E REZA,

2008). Entretanto, demais trabalhos relatam uma atividade antibacteriana baixa quando comparado com os padrões testados (ISLAM et al., 2003; ASSAM et al., 2010).

De acordo com Thounaojam et al. (2009a; 2009b; 2010) *S. rhombifolia* apresenta capacidade de reduzir a absorção lipídica no intestino, alterando positivamente os valores de colesterol e triglicerídeos no plasma sanguíneo. Soma-se também uma atividade cardioprotetora dos extratos em ratos tratados por 30 dias consecutivos, diminuindo os efeitos de uma necrose no miocárdio destes animais.

Assim, demonstrado o interesse amplo tanto pela composição química quanto pelas atividades biológicas, torna-se de interesse científico conhecer exemplares de *Sida* que ainda encontram-se raramente descritos na literatura.

2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Alguns dos fármacos usados no tratamento de processos infecciosos são denominados agentes antimicrobianos. Esse termo entrou em voga com a descoberta da penicilina por Fleming em 1929, o qual se tornaria o primeiro “antibiótico” produzido em escala industrial (PELLISSARI, 2008). De acordo com Lima (2001) as substâncias antimicrobianas ou antibióticas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progressos sem limites dentro da terapêutica medicamentosa.

O referido grupo de medicamentos apresenta, de forma acentuada, efeitos sobre espécies microbianas patogênicas e oportunistas, responsáveis pelas mais variadas doenças com os mais variados quadros sintomáticos nos humanos. Estes medicamentos devem ser substâncias que, em pequenas concentrações, apresentem atividade letal ou inibitória contra determinadas ou amplas espécies microbianas, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos resistentes, com mínimos efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, dentre outros.

As maneiras de atuação dos agentes antimicrobianos incluem ações como inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular microbiana; lesão da membrana citoplasmática, interferindo nas funções desta; interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas, quer seja na interferência da síntese e replicação de DNA ou na inibição da RNA-polimerase dependente de DNA; e inibição competitiva da síntese de metabólitos essenciais (PELCZAR et al., 1996; SILVA, 1998).

Dentre os microrganismos com potencial patológico estão os fungos, os quais se diferenciam das células humanas pela presença de parede celular. Esta que serve como

proteção, evita a ruptura osmótica e confere forma à célula fúngica (ZACCHINO, 2003). Os principais fungos responsáveis pela instalação de uma infecção são os patógenos (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*) ou fungos patógenos oportunistas (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*) (FENNER et al., 2006).

Conforme alguns estudos já apontavam, o crescente número das infecções fúngicas sistêmicas por fungos até então considerados inócuos, está se tornando um agravo da saúde humana (RANG e DALE, 1993) Nesse sentido, dependendo das condições, alguns fungos presentes no ambiente ou na microbiota humana podem desenvolver quadros clínicos, que vão desde uma simples febre até infecções agudas graves (LACAZ et al., 2002).

O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes. Além das infecções em humanos, os animais também podem ser atacados esporadicamente por fungos muito difíceis de serem combatidos (ZACCHINO, 2003).

Neste contexto, embora a maioria dos antifúngicos existentes no mercado seja de origem sintética, o estudo de produtos naturais voltou a receber a atenção dos pesquisadores (YUNES E FILHO, 2001). Entre as principais ferramentas na busca de novos modelos moleculares estão a informação de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e o estudo farmacológico das preparações utilizadas, abordadas, respectivamente no âmbito da etnobotânica e da etnofarmacologia (RATES, 2001).

2.4.1 *Candida krusei*

O gênero *Candida* é atualmente classificado como pertencente à família *Cryptococcaceae*, sendo constituído por leveduras que têm reprodução assexuada por blastoconídios, pseudohifas e hifas verdadeiras. Também, algumas espécies já possuem a forma sexuada ou teleomorfa, como no caso de *Candida krusei* (CLEFF, 2008) Mais de duzentas (200) espécies de *Candida* tem sido descritas, algumas dessas espécies fazem parte de nossa flora microbiana e apenas 10% são conhecidas como responsáveis por infecções em humanos.

Em contraste com a maioria das outras espécies de *Candida*, as quais têm um formato ovóide, as células de *C. krusei* são geralmente alongadas e tem a aparência de um “grão de

arroz” (SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 1994) Figura 2. Esta levedura geralmente é encontrada em duas formas morfológicas básicas, como leveduras e pseudohifas. Essa última ajuda na invasão das defesas imunes do hospedeiro, sendo assim um fator de virulência. *C. krusei* tem sido isolada de uma variedade de habitats, tais como frutas, comidas (inclui alimentos de laticínios e derivados de carnes), solo, vinhos e cervejas. Por isso, está amplamente distribuído na natureza.

Geralmente, *C. krusei* é considerada um transiente comensal em humanos, e tem sido isolada das superfícies mucosas de vários grupos imunodeprimidos e em indivíduos saudáveis. Na sua revisão exaustiva da literatura sobre o transporte por via oral de *Candida* spp. Odds (1988) concluiu que *C. krusei* é a quinta espécie mais dominante em mucosas, juntamente com *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* que a precedem (SAMARANAYAKE et al., 1987)

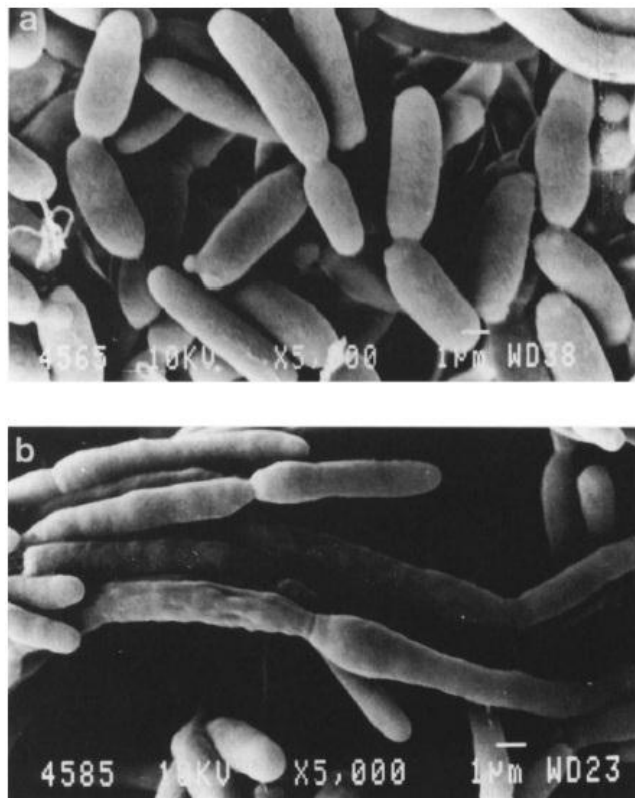


Figura 2 – Isolados de *Candida krusei*. A) *C. krusei* fotomicrografia de uma colônia. B) fase de pseudohifa.
Fonte: Samaranayake & Samaranayake (1994)

Todavia, quando há um desequilíbrio no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas. Quanto à origem, pode ser endógena,

quando oriunda da microbiota; ou exógena, como doenças sexualmente transmissíveis (NAGLIK, et al., 2003; CHAVES et al., 2003)

C. krusei tem sido reconhecido como um patógeno resistente a um amplo repertório de antifúngicos, principalmente devido a sua resistência intrínseca ao fluconazol, combinada com a baixa sensibilidade para anfotericina B e 5-fluorocitosina (BARBEDO E SGARBI, 2010). Assim, infecções por *C. krusei* tipicamente surgem em doentes nos quais o tratamento profilático foi realizado com agentes antifúngicos derivados dos triazólicos. Os mesmos autores afirmam que o fenótipo de resistência a múltiplas drogas exibido por *C. krusei* é um problema para o tratamento de doentes em geral, especialmente os grupos imunocomprometidos (neutropenia, hanseníase, leucemia, HIV positivo, entre outros) e aqueles acometidos por fungemias.

Por fim, cabe destacar que *C. krusei* apresenta uma plasticidade com relação a desenvolver resistência a drogas antifúngicas e é considerada uma espécie importante a ser monitorada com relação à resistência antifúngica.

2.4.2 Formação de biofilme por *Candida* sp

De acordo com Heyder e Silva (2004), dentre os principais fatores que podem ocasionar o desenvolvimento de infecções fúngicas, inclusive candidíase, está o uso de cateteres intravenosos e outras condições que comprometam o sistema imunológico. Isso ocorre pelo fato de que comunidades de microorganismos (bactérias gram positivas e gram negativas, e fungos) possuem a capacidade de gerar estruturas conhecidas como “biofilmes”.

Segundo Pinheiro (2006), os biofilmes microbianos se desenvolvem na superfície de diferentes artigos médicos-hospitalares, tais como, lentes de contato, cateteres vasculares, agulhas, conexões, tubos endotraqueais, cateteres vesicais, cateteres de diálise peritoneal e em diferentes próteses. Tratam-se de estruturas onde as células de microorganismos atacam a superfície externa ou interna de dispositivos hospitalares, tornando-se embebidas em uma matriz extracelular de uma substância polimérica produzida pelos próprios indivíduos da colônia (ANDES et al., 2004). Assim, *C. krusei* possui essa capacidade de aderir à superfície destes dispositivos ou prótese, levando à formação de biofilmes que podem facilitar ainda mais a adesão e a infecção (PARAHITIYAWA et al., 2006).

Quase invariavelmente um dispositivo implantado, tal como um cateter intravascular ou urinário, ou ainda um tubo endotraqueal, está associado com infecções de *Candida* spp.,

geralmente pode ser detectado um biofilme na superfície desse dispositivo (CRUMP & COLLIGNON, 2000; MAKI & TAMBYAH, 2001)

Conforme Douglas (2003), o dispositivo cirurgicamente implantado e mais comumente infectado é o cateter venoso central, o qual é usado para administrar fluídos e nutrientes, bem como drogas citotóxicas. O fluido de perfusão em si, ou o tubo do cateter, pode ser contaminado, porém, mais frequentemente, os organismos são introduzidos a partir da pele do paciente ou das mãos de enfermeiros e técnicos. Algumas vezes a ponta distal do cateter está contaminada no momento da inserção, e em alternativa, os organismos podem migrar pela ferida ocasionada pelo cateter (SHERERTZ et al., 2000; GOLDMANN & PIER, 1993).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar aspectos da composição química de extratos hidroetanólicos e aquosos obtidos de *Sida tuberculata*, bem como avaliar seu potencial antifúngico *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar o material vegetal quanto aos parâmetros perda por secagem e perda por dessecação;
- ✓ Caracterizar o extrato vegetal quanto à composição fenólica: teor de flavonóides totais e teor de fenólicos totais;
- ✓ Determinar a melhor condição extrativa utilizando as técnicas de maceração, percolação e refluxo;
- ✓ Estudar a composição química dos extratos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).
- ✓ Identificar os componentes majoritários presentes nos extratos através de análise por LC-ESI-MS
- ✓ Investigar o potencial antifúngico dos extratos de *S. tuberculata* frente a linhagens patogênicas e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM);
- ✓ Verificar o potencial dos extratos em remover biofilme fúngico formado em cateter venoso central.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

1 DESENVOLVIMENTO DOS EXTRATOS VEGETAIS

1.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Balança analítica modelo AY220 (Shimadzu); Banho de aquecimento (Nova Ética[®]); Bomba de vácuo (Exipump[®]); Coluna cromatográfica Hypersil RP-C18 Thermo-Scientific[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 µm); Cromatógrafo a líquido Prominence (Shimadzu), equipado com bomba LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, detector PDA SPD-20AT, forno de coluna CTO-20A e software LC Solution V. 1.24 SP1; Espectrofotômetro UV-VIS modelo Lambda 35 (Perkin Elmer); Estufa de ar circulante (Nova ética[®]); Lavadora Ultra-Sônica (Unique[®]); pHmetro modelo PG1800 (Gehaka); Membrana filtrante de nylon, 25 mm x 0,45 µm (Sartorius[®]); Sistema Milli-Q para obtenção de água purificada (Millipore[®]); Unidade filtrante de nylon, 13 mm x 0,45 µm (Millipore[®]).

1.2 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

1.2.1 Coleta e identificação botânica

O material vegetal foi coletado entre os meses de agosto e outubro de 2011, em área de entorno da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. Um exemplar foi enviado ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo identificado pelo Botânico Martin Grings e depositado no herbário da mesma instituição sob o número ICN 167493.

1.2.2 Manuseio e secagem

O material vegetal coletado foi submetido a uma seleção das partes aéreas e subterrâneas (folhas e raízes). Após, foi estabilizado através de secagem em estufa a 40°C durante quatro dias. As partes foram então pesadas, separadamente, antes e após a secagem, para determinação do rendimento de massa fresca e seca.

1.2.3 Determinação da perda por dessecação

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (2010). Em balança analítica pesou-se 1,0g do material vegetal (folhas e raízes) em pesa-filtro, previamente dessecado. Estes ficaram em estufa a 105 °C por 3h e, após resfriamento em dessecador, foram pesados, repetindo-se a operação até peso constante. O teor de umidade foi obtido em triplicata.

1.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais de *S. tuberculata* foram desenvolvidos com base em monitoramento da composição em termos de teor de polifenóis e flavonóides totais. Dessa forma, foram testadas as técnicas de maceração, percolação e refluxo. Para os referidos métodos, foram testadas as concentrações de solvente hidroetanólico a seguir descritas, mantida sempre a relação droga:solvente de 1:10. Como segue:

- Folhas – solução hidroetanólica 20, 40 e 70%
- Raízes – solução hidroetanólica 50, 70 e 90%

Para os extratos em teste, foram determinados os parâmetros de resíduo seco, teor de polifenóis totais e teor de flavonóides totais de acordo com técnicas a seguir descritas. Além destes ensaios, os extratos foram analisados por CLAE-UV, em testes de sistemas eluentes diversos, conforme descritos mais adiante.

1.3.1 Extração por maceração

O material vegetal (folhas e raízes secas e moídas) em quantidade de aproximadamente 50g, foram acondicionados em fracos de vidro âmbar com 500 mL de solução hidroetanólica (diferentes proporções de etanol, conforme descrito em 1.3) por 5 dias ao abrigo de luz. Após o período específico, o material foi filtrado e armazenado em freezer para análises posteriores.

1.3.2 Extração por percolação

O material vegetal (10g) foi depositado em coluna de vidro dotada com torneira para controle de vazão. O solvente extrator foi adicionado à coluna, em quantidade necessária para cobrir o material vegetal ali disposto. Após 1 h em contato, o solvente foi recolhido, com adição contínua de novas quantidades até que se esgotasse o volume total de 100 mL. Ao se adicionar novas quantidades de solvente, deixava-se novamente em contato por 1 h.

1.3.3 Extração por refluxo

Para o refluxo, utilizou-se sistema apropriado composto por manta de aquecimento e sistema de refluxo. O material vegetal (20g) foi adicionado ao balão, junto ao solvente extrator (200 mL). Iniciada a extração, a 70°C, o sistema se manteve em funcionamento pelo tempo de 20 min. Após, o material foi filtrado e armazenado em freezer.

1.3.4 Determinação de resíduo seco

A determinação de resíduo seco efetuado conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (2010). Foram transferidos 2,0 mL de cada extrato para vidros de relógio, previamente tarados e dessecados, os quais foram levados ao banho de aquecimento até evaporação do solvente. Os vidros contendo os resíduos secos foram então levados à estufa a 100 ± 5 °C e, depois, resfriados em dessecador. A secagem e resfriamento foram repetidos até peso constante. Os resultados foram expressos utilizando-se a média de três determinações.

1.3.5 Teor de Fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi efetuada de acordo com técnica descrita por Nurmi et al.(1996). Uma alíquota de 50 µL do extrato foi transferida para tubo de ensaio, no qual foram adicionados 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteau e 3 mL de água, seguido de homogeneização. Adicionou-se 1 mL da solução de carbonato de sódio a 15%. Após 30 segundos, completou-se o volume com água q.s.p 5mL. Paralelamente, foi preparada uma solução comparativa (branco) substituindo-se a adição da amostra por etanol. Após 30 minutos, realizou-se a medida de sua absorvância a 750 nm.

Para a curva padrão de ácido gálico, foram feitas diluições a partir de solução padrão a 1,0 mg/mL, resultando em concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg/mL. Destas, alíquotas de 50 uL foram submetidas ao protocolo descrito acima.

Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/mL de extrato, em média de três determinações.

1.3.6 Teor de flavonóides totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada por meio do método colorimétrico descrito por Chang et al. (2002). Para esta determinação, em balão volumétrico de 25 mL foram colocados 500 µL da amostra e adicionados 500 µL do reagente cloreto de alumínio 0,5% , completando-se a seguir o volume do balão com o solvente correspondente (etanol). Posteriormente, as amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e logo após leitura em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 420 nm. A concentração de flavonóides totais foi determinada de acordo com a equação que segue:

$$\text{Teor de flavonóides} = \frac{C \text{ (mg/mL)} \times \text{FD}}{m - (\text{ppd} \times m / 100)}$$

Onde: Teor de flavonóides expressos em mg/g de droga vegetal seca; C = concentração em rutina na solução amostra (mg/mL), calculada em comparação com solução padrão de rutina de 25 µg/ml; FD = fator de diluição (25); m = massa da droga vegetal (g); ppd = perda por dessecação da droga vegetal (%).

1.3.7 Determinação cromatográfica por CLAE-UV

A partir dos extratos desenvolvidos, partiu-se para definição das condições cromatográficas a serem utilizadas nas análises por CLAE-UV. Foram testados diferentes sistemas de eluição a fim de determinar o método mais eficiente na separação dos compostos. A seguir, na Tabela 1, encontram-se as principais condições testadas.

Tabela 1- Principais condições testadas para análise dos extratos de *S. tuberculata* por CLAE-UV.

Modo de eluição	Fase móvel	Fluxo mL/min.	Deteção (nm)	Referência
Isocrático	Metanol e Ác. Fosfórico (0,16M) (53:47, v:v)	0,6	340	De Souza et al. (2002)
Gradiente	Acetonitrila e Ac. Acético 1%	1	340	Costa et al. (2011)
Gradiente	H ₂ O, Metanol e Ac. Fórmico	1	340	Chandra e Mejia (2004)
Gradiente	Acetonitrila e Ác. Fosfórico 0,05%	0,8	340	Pinheiro et al (2006)

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista a ausência de estudos farmacognósticos e biológicos para a espécie *S. tuberculata*, buscou-se através deste trabalho fornecer dados sobre a fonte e a qualidade da matéria-prima utilizada, uma vez que esta tem um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000).

Para isso, foram realizados vários ensaios com o objetivo de estabelecer parâmetros de qualidade do material botânico. As análises físico-químicas envolveram a perda por secagem (utilizando-se do material fresco), a determinação da perda por dessecação, determinação do teor de polifenóis e flavonóides totais e a determinação cromatográfica (CLAE/UV).

1.4.1 Perda por secagem e dessecação

Os ensaios aplicados ao estudo do material vegetal mostraram-se exequíveis na prática, permitindo a caracterização inicial da planta em estudo. Para a perda por secagem, os resultados apresentaram valores de 57,09% para folhas e 38,84% para raízes. A escolha da secagem em estufa foi determinada a partir do conhecimento que a secagem em temperatura ambiente não permite o controle de parâmetros como umidade ambiente e a contaminação microbológica que pode ocorrer em função desta. Entretanto, um estudo conduzido por Pelissari (2008) não encontrou diferenças significativas no teor de umidade perdido em secagens em estufa e ao ar ambiente, embora esta última tenha levado mais tempo para estabilizar o material.

A determinação da perda por dessecação das folhas e raízes moídas de *S. tuberculata* apresentou valores de $7,035 \pm 0,74\%$ para folhas: e $8,63 \pm 0,09\%$ para raiz após a

estabilização do processo. Foi observado que os teores de umidade encontrados para todas as amostras são inferiores ao limite máximo de 14% estabelecido pela Farmacopéia Brasileira (2010). Por outro lado, em relação ao limite mínimo, pôde-se observar que as amostras de folhas analisadas apresentaram valores abaixo de 8%.

1.4.2 Resíduo seco

O teor de resíduo seco foi calculado como descrito no item 1.3.4 e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2.

Constatou-se que o maior rendimento de extrato em massa se deu pela extração em percolação. Para os extratos obtidos de folhas, o solvente que propiciou um maior rendimento em resíduo seco foi a solução hidroetanólica a 40%. No caso de raízes, solução hidroetanólica a 50% apresentou maior eficiência de extração para o parâmetro em estudo.

Tabela 2 - Resultados de determinação de resíduo seco para as extrações hidroetanólicas em diferentes proporções.

Resíduo seco expresso em % (CV%)*				
	Solvente extrator	Maceração	Percolação	Refluxo
Folhas	Etanol 20%	1,42 (1,51%)	1,84 (0,49%)	1,92 (2,05%)
	Etanol 40%	1,44 (4,48%)	2,88 (0,32%)	2,17 (1,08%)
	Etanol 70%	1,20 (2,92%)	1,75 (14,73%)	1,79 (2,41%)
Raízes	Etanol 50%	1,21 (1,42%)	2,00 (1,59%)	1,24 (4,91%)
	Etanol 70%	1,34 (0,05%)	1,93 (14,32%)	1,26 (2,17%)
	Etanol 90%	1,03 (0,11%)	0,91 (3,05%)	1,26 (9,93%)

*Coeficiente de variação. Cada valor é média de três análises

O teor de resíduo seco é um parâmetro farmacognóstico que indica o rendimento da extração em massa através da relação droga vegetal x resíduo seco (m/m) (SANCHES, 2004).

Observando-se os resultados obtidos para este parâmetro, uma primeira definição encaminhou o uso dos solventes em proporção a 40% para extração em folhas e a 70% para

extração em raízes. Experimentos adicionais em determinação de fenólicos e flavonóides totais complementaram a avaliação preliminar de definição do solvente extrator.

1.4.3 Teor de fenólicos totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais na droga vegetal foi construída uma curva analítica, a partir da solução aquosa/etanólica de ácido gálico a 1,0 mg/mL, em concentrações variando de 0,05 a 0,8 mg/mL, com a qual se obteve a equação da reta $y = 0,1187x + 0,0111$ e coeficiente de correlação $r^2 = 0,9984$ (Figura 1).

Comparando-se as técnicas extrativas utilizadas, os resultados obtidos (Tabela 3) permitiram uma análise de performance indicativa de eficiência de extração. Os extratos obtidos por maceração apresentaram resultados de teor de fenólicos totais com máximos de 0,438 e 0,296 mg EAG/mL de extrato, para folhas e raízes respectivamente.

Para os extratos obtidos por percolação, foram observados máximos em teor de polifenóis totais de 2,131 mg EAG/mL (folhas) e 0,487 mg EAG/mL (raízes). Para a extração por refluxo, os máximos foram 3,127 mg EAG/mL (folhas) e 0,422 mg EAG/mL (raízes).

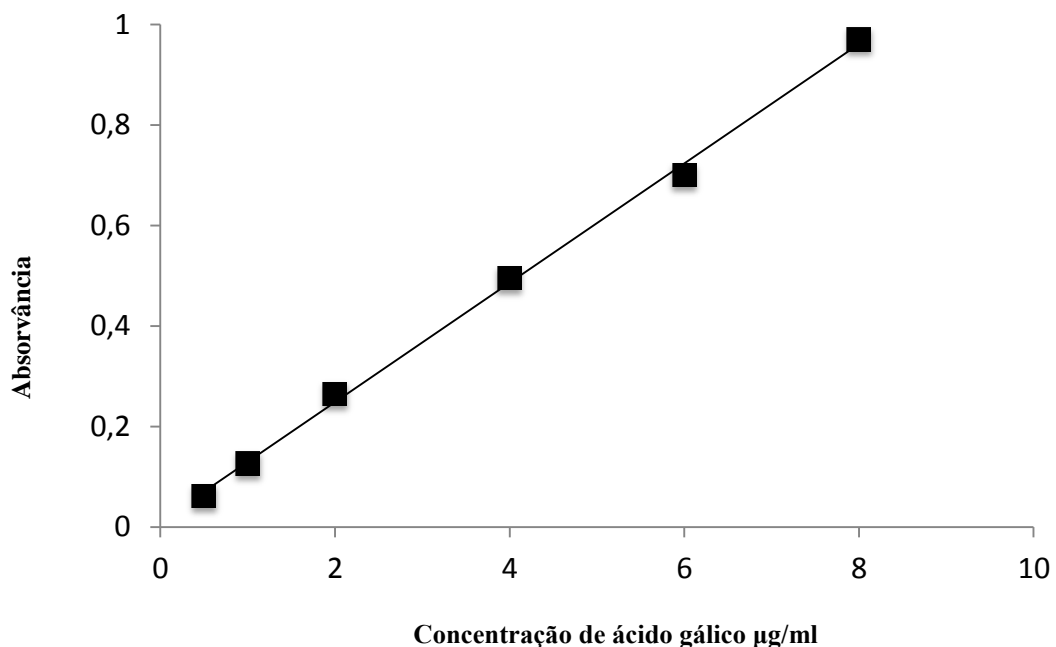


Figura 1 - Curva analítica para determinação de ácido gálico por método espectrofotométrico, em comprimento de onda de 750 nm.

Tabela 3 - Teor de fenólicos totais de *S. tuberculata* em diferentes métodos extrativos com diferentes proporções de etanol.

Teor de fenólicos totais* expressos em mg EAG/ml extrato (CV%)*				
	Solvente extrator	Maceração	Percolação	Refluxo
Folhas	Etanol 20%	0,438 (3,14%)	0,152 (4,33%)	0,620 (3,57%)
	Etanol 40%	0,359 (3,42%)	2,131 (3,04%)	3,127 (1,68%)
	Etanol 70%	0,399 (0,90%)	0,778 (3,31%)	1,083 (4,59%)
Raízes	Etanol 50%	0,258 (4,87%)	0,442 (2,46%)	0,415 (2,59%)
	Etanol 70%	0,296 (1,01%)	0,487 (2,03%)	0,422 (4,40%)
	Etanol 90%	0,198 (1,51%)	0,196 (3,36%)	0,292 (1,64%)

*Coeficiente de variação. Os dados quantitativos se basearam em comparativo com dados de absorvância de padrão de ácido gálico, em medidas no mesmo dia de análise.

De acordo com os resultados observados, as técnicas mais eficientes na extração de compostos fenólicos nas condições aplicadas neste trabalho foram percolação e refluxo. Optou-se nesse trabalho utilizar como extração padrão a técnica de percolação. Embora, o método de refluxo tenha extraído uma concentração maior de compostos fenólicos nas folhas, a escolha da percolação se deu levando em consideração a característica termolábil dessas substâncias (TOSS, 2010).

1.4.4 Teor de flavonóides totais

Na determinação dos flavonóides totais foi empregada a metodologia de Chang et al. (2002) que utiliza o cloreto de alumínio (AlCl_3) para avaliar a presença de grupamentos químicos de flavonóides. O AlCl_3 é um composto utilizado como um reagente de deslocamento em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural dos compostos flavonoídicos. A leitura é realizada em espectrofotômetro a 420 nm. A formação do complexo flavonóide-Al absorve mais intensamente e em comprimento de onda maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante, tecnicamente determinados de efeitos hiperacrômico e batocrômico (LIANDA, 2009).

Para esta determinação analítica, utilizou-se solução padrão de rutina como referência de comparação, de modo que os resultados foram expressos em equivalentes de rutina (ER). Os resultados para este parâmetro estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de flavonóides totais em extratos de *S. tuberculata* obtidos a partir de diferentes técnicas extrativas e solventes extratores.

Teor de flavonóides totais expressos em ER* mg/g de droga vegetal seca				
	Solvente extrator	Maceração	Percolação	Refluxo
Folhas	Etanol 20%	0,810	0,735	1,010
	Etanol 40%	0,765	2,025	2,405
	Etanol 70%	1,745	1,955	2,630
Raízes	Etanol 50%	1,215	3,030	1,815
	Etanol 70%	0,430	1,900	1,435
	Etanol 90%	0,680	0,073	0,260

*ER = Equivalentes de rutina. Os dados quantitativos se basearam em comparativo com dados de absorvância de padrão de rutina (25µg/ml), em medidas no mesmo dia de análise.

Os dados analíticos demonstram uma maior concentração de flavonóides nas folhas em relação às raízes. Isto pode estar relacionado a vários fatores ambientais que influenciam a produção de flavonóides nas plantas, como, por exemplo, temperatura, nutrição, injúria, metabolismo do açúcar e do nitrogênio e qualidade de radiação (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). A radiação solar é um dos fatores que, normalmente, está relacionada à variação quantitativa. Alguns trabalhos demonstraram que há um aumento quantitativo de flavonóides em órgãos expostos à luz, em comparação com aqueles que estão à sombra (OLIVEIRA, 2011).

Os resultados também demonstraram que o método extrativo mais eficiente para este parâmetro foi o refluxo, porém, pela característica termolábel destes constituintes descrita anteriormente, optou-se pela percolação, por se tratar de um método de extração a frio que permite resultados semelhantes ao refluxo. O emprego do calor na técnica de refluxo, com temperaturas que chegam a 80 °C, podem alterar a composição primária destas estruturas.

1.4.5 Determinação cromatográfica por CLAE-UV

Os resultados discutidos a seguir são apresentados para proporcionar uma visão geral das metodologias empregadas na busca da melhor condição cromatográfica. Assim, buscou-se uma separação e detecção eficientes dos componentes majoritários presentes nos extratos de *S. tuberculata*. Estes dados foram fundamentais na escolha do método a ser utilizado no decorrer do trabalho.

Primeiramente, a metodologia de determinação de compostos fenólicos descrita por De Souza et al. (2002) foi testada (Metanol e Ác. Fosfórico., ver Tabela 1). A Figura 2 ilustra os resultados obtidos.

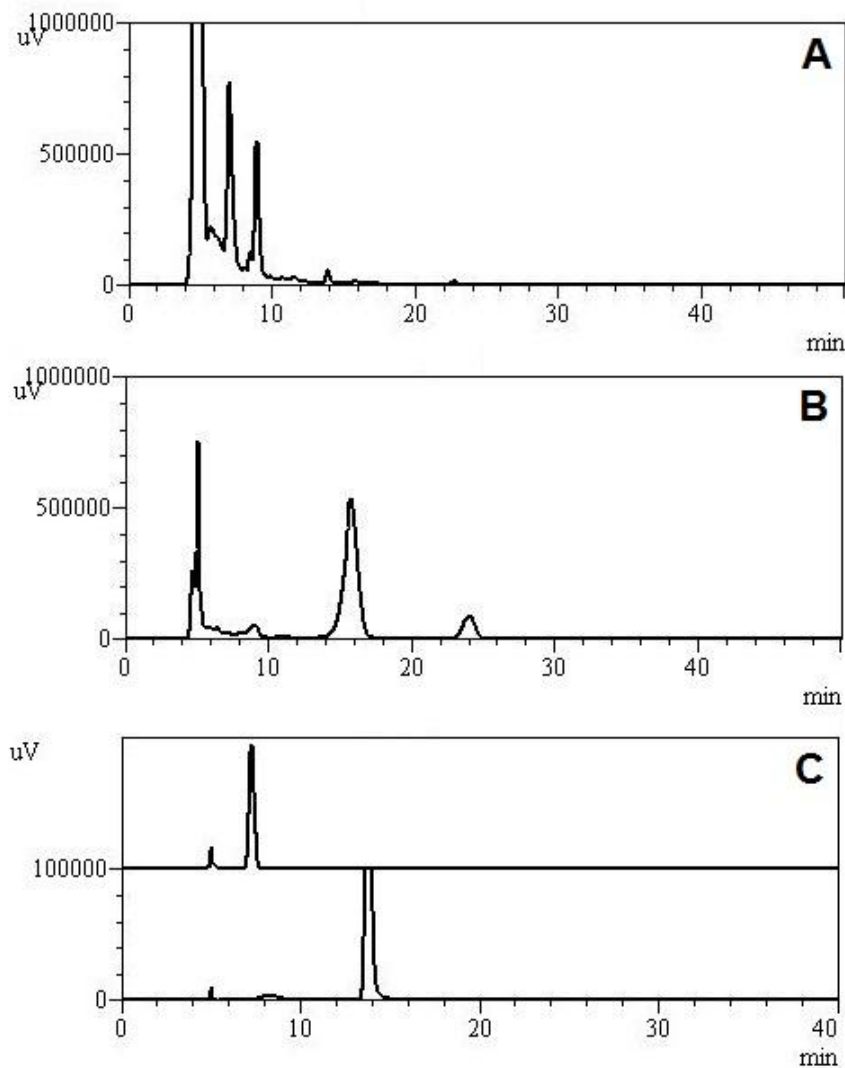


Figura 2 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de *S. Tuberculata* pelo método de De Souza et al. (2002); com detecção em 340 nm. A: análise de extratos de folhas obtidos por percolação. B: análise de extratos de raízes obtidos por percolação. C: análise de padrões de isoquercetina e quercetina, a 10 µg/ml

Como se pode observar, o método empregado não apresentou uma boa separação para os extratos das folhas, embora tenham sido detectados dois componentes majoritários na raiz, em tempos de aproximadamente 16,0 e 24,0 minutos. Também, os padrões testados não coincidiram com os tempos detectados, não permitindo a certeza destes componentes.

A próxima condição cromatográfica utilizada foi a proposta de Costa et al. (2011) a figura 3 ilustra o resultado obtido a partir desta condição de análise.

O resultado verificado da análise pelo método em destaque demonstrou a presença de dois componentes majoritários nas folhas nos tempos aproximados de 31,0 e 36,0 min (Tr – figura 3). Também, permitiu a suposição de pelo menos um componente em comum nas folhas e raízes. Entretanto, o padrão testado não foi encontrado em nenhum dos extratos.

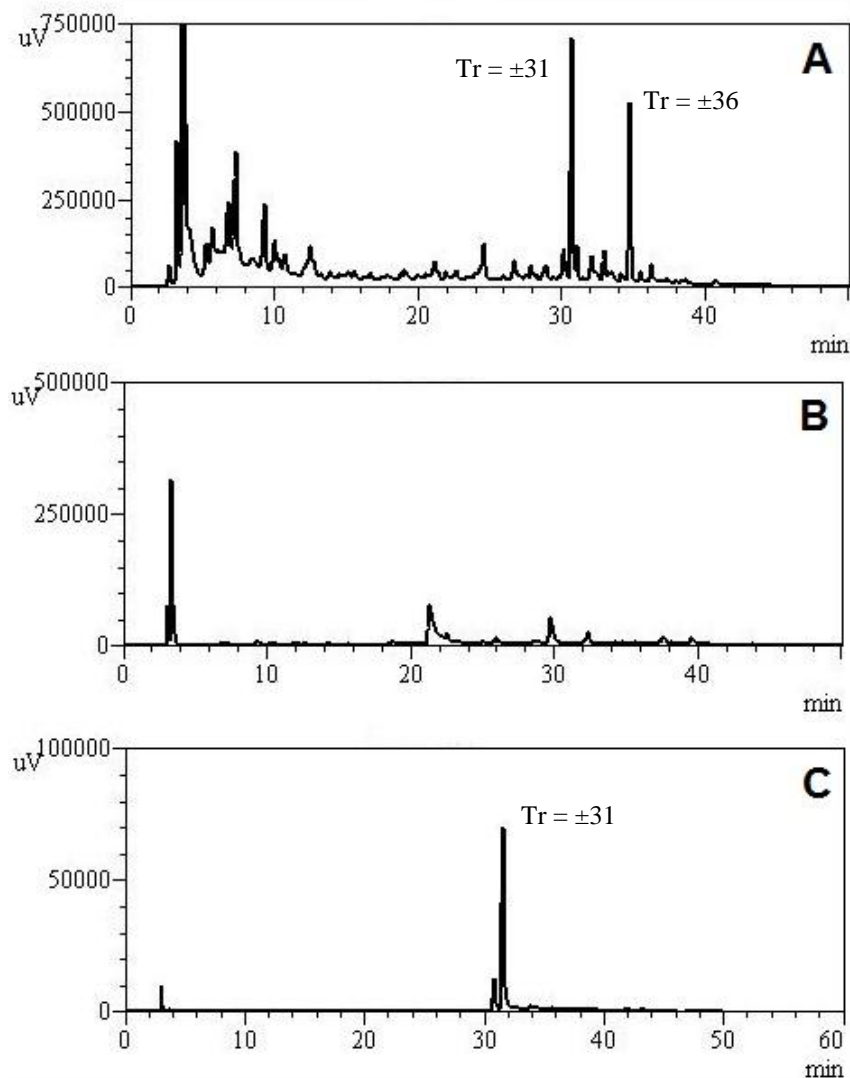


Figura 3 - Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de *S. tuberculata* pelo método de Costa et al. (2011); com detecção em 340 nm; com detecção em 340 nm. A: análise de extratos de folhas obtidos por percolação; B: análise de extratos de raízes obtidos por percolação; C: análise de padrão de isoquercetina a 10 µg/ml.

Na sequência, testou-se o sistema cromatográfico proposto por Chandra e Mejia (2004), aplicado à determinação de compostos fenólicos. Os resultados que se referem a este método estão apresentados na Figura 4

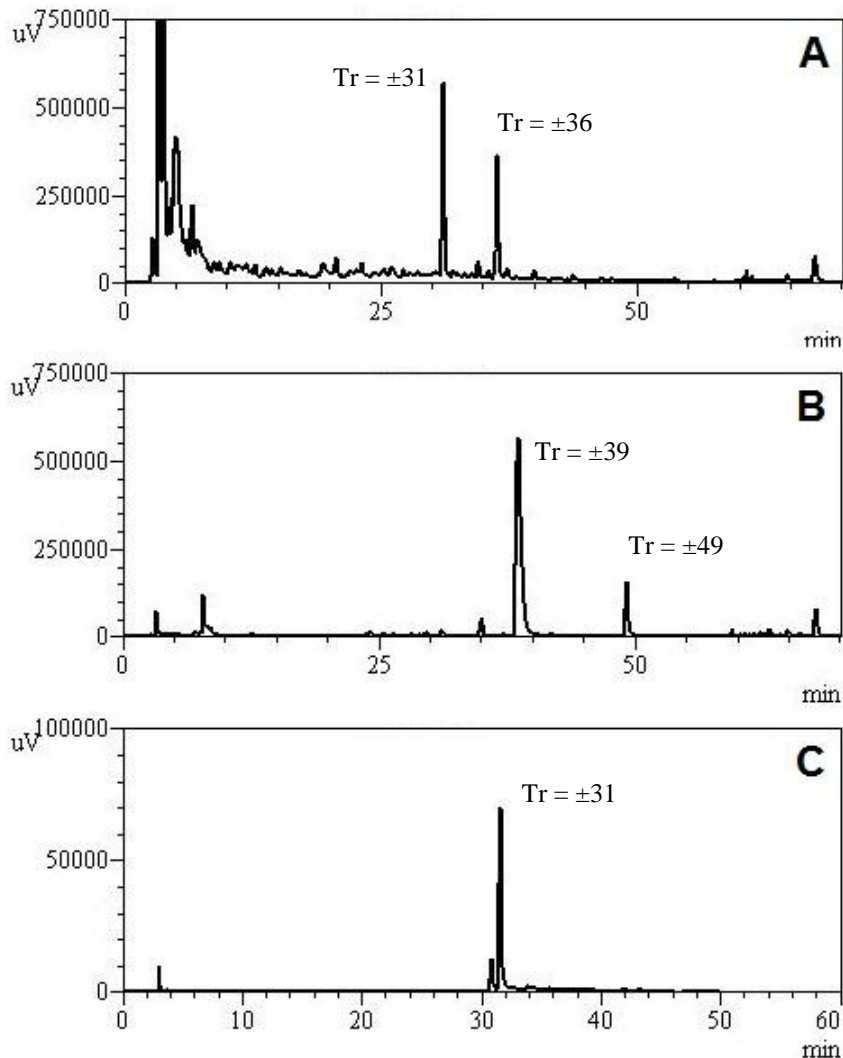


Figura 4 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de *S. tuberculata* pelo Método De Chandra e Mejia. (2004); Com Detecção Em 340 nm. A: Análise de extratos de folhas obtidos por percolação; B: Análise de extratos de raízes obtidos por percolação; C: Análise de padrão de Canferol a $10\mu\text{g/ml}$.

Os resultados para o método de Chandra e Mejia (2004) permitiram uma boa separação dos compostos. A presença de duas substâncias majoritárias no extrato obtido de folhas foi novamente observada, como no método anterior. Também, os extratos obtidos das raízes apresentaram dois componentes principais, nos tempos aproximados de 39,0 e 49,0 minutos. O padrão testado foi o canferol, o qual teve seu tempo de retenção muito próximo a um dos principais componentes da folha no tempo de aproximadamente 31,0 minutos. Porém, as análises dos espectros de absorção no ultravioleta não revelaram semelhanças de absorção.

Baseados em trabalhos desenvolvidos pelo grupo, com o objetivo de identificar flavonóides em outra espécie vegetal, nos quais foram obtidos resultados satisfatórios, optou-se pela condição empregada por Pinheiro et al. (2006). As corridas cromatográficas para esse método estão ilustradas na Figura 5.

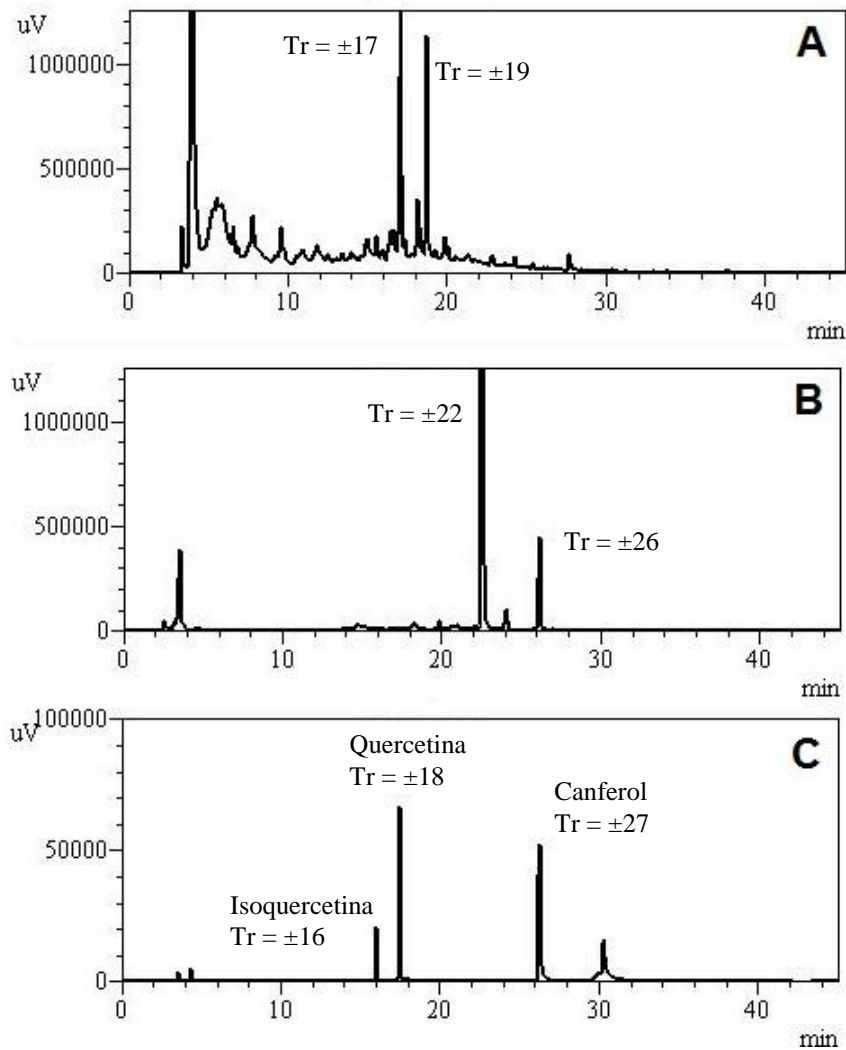


Figura 5 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de *S. tuberculata* pelo método de Pinheiro et al. (2006); com detecção em 340 nm. A: análise de extratos de folhas obtidos por percolação; B: análise de extratos de raízes obtidos por percolação; C: análise de padrões de isoquercetina, quercetina e canferol a 10 µg/ml.

Como se pode observar, as análises com a condição acima descrita permitiram uma melhor separação dos compostos presentes em ambos os extratos hidroetanólicos de *S. tuberculata*. Ao todo, podem-se detectar, pelo menos, seis componentes majoritários entre os dois extratos (folhas e raízes). Porém, novamente os padrões testados não foram encontrados em nenhuma das amostras.

Entretanto, baseado na resolução e intensidade dos picos, a metodologia descrita por Pinheiro et al. (2006) foi escolhida como mais eficiente e utilizada até a finalização das análises fitoquímicas deste estudo.

Embora o foco inicial do presente trabalho tenha sido a identificação dos flavonóides e seus derivados, a literatura relata que dentre as principais classes de metabólitos presentes no gênero *Sida* encontram-se as substâncias conhecidas como ecdisteróides (DINAN et al., 2001; DARWISH e REINECKE, 2003; JADHAV et al., 2007; WANG et al., 2008). Somado a isso, a inexistência de estudos com *S. tuberculata* tornou difícil a tarefa de identificação de compostos flavônicos em análises somente por CLAE. Partindo dessa premissa, buscou-se ampliar a investigação analítica com auxílio da espectrometria de massas. Esta abordagem está destacada no capítulo posterior. Cabe destacar, que juntamente com esses dados de espectrometria de massas e os existentes na literatura científica ampliou-se as possibilidades de identificação de alguns dos principais constituintes encontrados nas folhas e raízes das amostras.

Em proposta adicional ao estudo, também com foco na determinação analítica por CLAE, foram investigadas as amostras de extrato aquoso das folhas e raízes de *S. tuberculata*.

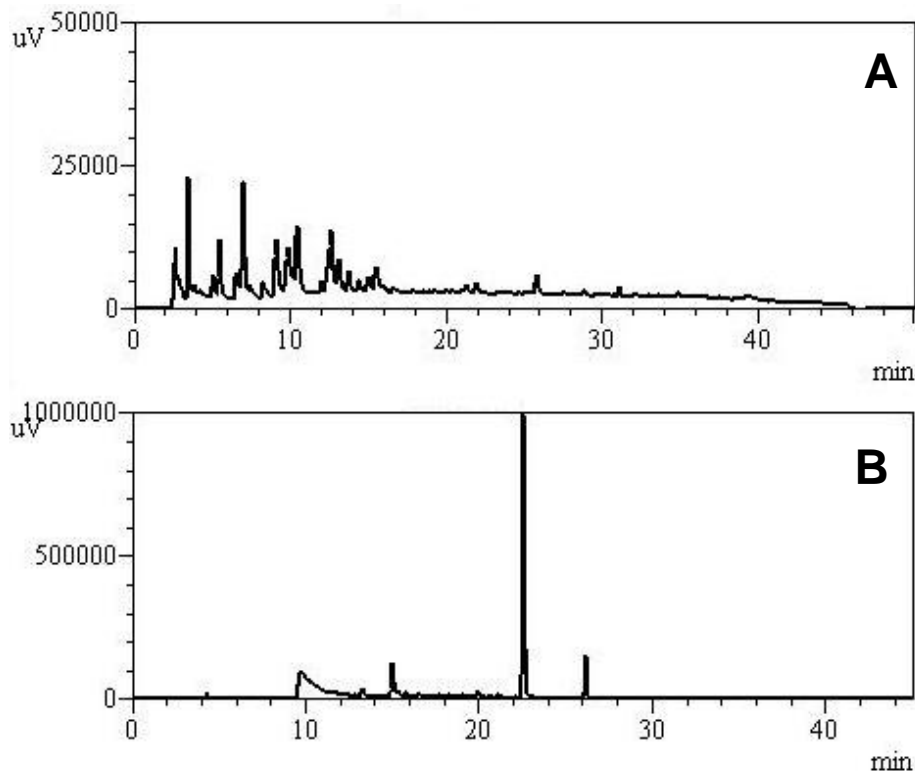


Figura 6 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de *S. tuberculata* pelo método de Pinheiro et al. (2006); com detecção em 340 nm. A: extratos de folhas obtidos por infusão; B: extratos de raízes obtidos por infusão.

As extrações foram feitas por infusão, com relação droga solvente de 1:10. Na figura 6 encontra-se o perfil de separação dos extratos aquosos de *S. tuberculata* baseado na metodologia de Pinheiro et al. (2006).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que o método não foi eficiente para a separação dos componentes presentes no extrato aquoso das folhas, o que foi observado em todas as condições testadas (dados não mostrados). Porém, o perfil cromatográfico do extrato aquoso obtido das raízes demonstrou uma boa resolução, com detecção de pelo menos dois dos mesmos componentes do extrato hidroetanólico.

2 CONCLUSÕES

- ✓ A secagem em estufa a 40°C mostrou-se eficiente na estabilização do material vegetal em 96 h;
- ✓ As extrações por percolação e refluxo, nas condições utilizadas neste estudo, mostraram-se mais eficazes que a extração por maceração nos parâmetros de resíduo seco, fenólicos totais e flavonóides totais;
- ✓ As análises de resíduo seco demonstraram que a extração por percolação possui um rendimento em massa de vegetal superior as extrações por maceração e refluxo;
- ✓ As extrações por percolação e refluxo, juntamente com os solventes extratores em solução hidroetanólica a 40 e a 70%, são mais eficazes na obtenção de compostos fenólicos quando comparadas com a extração por maceração;
- ✓ Extrações por percolação e refluxo podem ser empregadas na rotina laboratorial como alternativa à extração por maceração;
- ✓ A presença de compostos fenólicos é maior nas folhas de *S. tuberculata* em relação às raízes da mesma espécie;
- ✓ O sistema cromatográfico proposto para determinação por CLAE, com fase móvel composta por acetonitrila e ácido fosfórico a 0,05% em sistema gradiente, foi eficiente na separação dos componentes de *S. tuberculata*, sendo selecionado para a continuidade de determinação da composição química dos extratos.

CAPÍTULO II

MANUSCRIPT - Chemical composition and selective anti-*candida krusei* activity of *Sida tuberculata* R.E. Fries. (Malvaceae) extracts

MANUSCRIPT

Chemical composition and selective anti-*Candida krusei* activity of *Sida tuberculata* R.E.

Fries. (Malvaceae) extracts

Hemerson Silva da Rosa^{1,2*}, Vanessa Brum de Camargo¹, Graziela Camargo³, Alexandre M. Fuentefria³, Andreas S. L. Mendez^{1,2}

¹Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Medicamentos, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana-RS, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana-RS, Brazil.

³Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil.

***Corresponding author:** Hemerson Silva da Rosa

Postal address: Universidade Federal do Pampa, BR 472 Km 585, Prédio Administrativo, CEP 97500-970, Uruguaiana-RS, Brazil.

E-mail: hemersonrosa@ibest.com.br Phone: +55 55 34134321 Fax: +55 55 34134321

ABSTRACT

Introduction -*Sida tuberculata* R.E. Fries is popularly known as “guanxuma”. It is found in a characteristic region on South America (Pampa biome), where it is used by local population as antimicrobial and hypoglycemic. The chemical composition and its pharmacology potential were not explored yet studies are needed to better know this specie.

Objective - To study the extractive solutions performing the analysis by LC-UV-MS and testing the antifungal and antibiofilm activity *in vitro*.

Material and Methods - Hydroethanolic and aqueous extracts were prepared from leaves and roots. Total phenolic and flavonoids compounds were estimated by spectrophotometric methods. LC-UV-MS was performed using reversed-phase technique and mobile phase was composed by 0.05% phosphoric acid and acetonitrile. Ion mass and key fragments obtained in ESI⁺ were worked and constituents were identified. The antifungal activity *in vitro* was conducted by using the broth microdilution method. MIC and MFC were established against *Candida krusei* clinical isolate. The antibiofilm activity was evaluated by determination of biofilm removal efficiency in artificially contaminated central venous catheter coupons.

Results - Five compounds were tentatively identified, comprising ecdysteroids, flavonoids and alkaloids: 20-Hydroxyecdysone-3-*O*- β -D-glycopyranoside (1), 20-Hydroxyecdysone (2), 20-Hydroxyecdysone-dideoxihexose (3), kaempferol-3-*O*- β -D-(6''-*E*-p-coumaroyl)-glucopyranoside (4) and *N*-Feruloyltyramine (5). The aqueous extracts (infusion) presented antifungal activity against the opportunistic species tested (*C. krusei*), with MIC range of 3.9 – 62.5 μ g/ml and 1.95 – 31.25 μ g/ml to leaves and roots, respectively. The leaves extract was able to completely remove the *C. krusei* biofilm on catheters after 90 minutes of exposition.

Conclusion - The results showed that extracts from *S. tuberculata* exhibit antifungal activity and efficiency in the biofilm removal of *C. krusei* clinical strains. Observing the chemical composition with the presence of ecdysteroids, and considering the literature reports, it is possible to establish a relation between these compounds and the observed *in vitro* potential.

Keywords: *Sida tuberculata*; LC-UV-MS; *in vitro* antifungal activity; ecdysteroids.

INTRODUCTION

The genus *Sida* (Malvaceae) consists of a group of approximately 200 species, in general distributed in tropical and subtropical areas (Mabberley, 1997). In Brazil, 85 species are described (Bovini, 2011), being present along the different regions, each one with their characteristic biodiversity. The recognized use in folk medicine provides rich information about them; many works treat about species from Africa and South America, as well as other present in countries as India and Australia (Dhalwal *et al.*, 2007; Brugés and Reza, 2008; Rondón, 2009). Frequently mentioned and described, *Sida* are present in the composition of a traditional preparation known as “Ayurveda”, or “Mahabala”, more common for *Sida rhombifolia*, in which roots and leaves compose the tonic, used for inflammation, fever and heart disease, besides the use as aphrodisiac (Rao and Mishra 1997; Venkatesh *et al.*, 1999).

Observing the recent literature, different works have related the therapeutic potential of extractive preparations from *Sida* sp., with emphasis on *S. rhombifolia* L. (*S. rhomboidea* Roxb), *S. cordifolia*, *S. acuta* and *S. spinosa*. *S. rhombifolia* is much explored, having citations about the antinociceptive and anti-inflammatory activity of leaf extracts. Also, hepatoprotective action and effects against dysregulation of lipid and cholesterol metabolism are cited, regulating the induced experimental hyperlipidemia (Alan *et al.*, 1991; Rao and Mishra, 1997; Venkatesh *et al.*, 1999; Thounaojam *et al.*, 2009). In the same focus, some activities are also verified for *S. cordifolia*, with special attention for cardiovascular effects that are described (Santos *et al.*, 2005; Bonjardim *et al.*, 2011). In a complementary investigation, some works have described the antimicrobial activity of *Sida* species, mainly due the presence of ecdysteroids in their composition and the activity referred to these compounds (Lafont and Dinan, 2003; Assam *et al.*, 2010).

In terms of composition, *Sida* have been described by different constituents; flavonoids, alkaloids and steroids (Matlawska 1990; Dinan *et al.*, 2001; Darwish and Reinecke, 2003; Da Silva *et al.*, 2010). Quinazoline alkaloids (vasicine and vasicinine) and ephedrine are described to be present in *S. cordifolia*, being attributed to them the cardiovascular effects observed for this species (Ghosal *et al.*, 1981; Silveira *et al.*, 2003). Also important and characteristic, the steroids or ecdysteroids have been studied and detected in the aerial parts of different species, such as *S. spinosa* and *S. rhombifolia* (Dinan *et al.* 2001; Darwish and Reinecke, 2003). Searching the complete description of these steroids, some works have focused their identification in extractive preparations, with detection of ecdysone, 20-hydroxyecdysone and glycosyl derivatives (Wang *et al.*, 2008). In terms of phenolic compounds and flavonoids in *Sida*, these classes are explored in investigations involving the phytochemical screening, the quantitative estimation in total content of extracts and the isolation of new substances (Bortoluzzi *et al.*, 1994; Sutradhar *et al.*, 2008; Thounaojam *et al.*, 2011).

In the present work, it was investigated *Sida* species that is found in characteristic region or biome in South America, Brazil. *Sida tuberculata* is related to constitute the Brazilian flora, but it is very few explored and studied. In south of Brazil, in a region that extends along the Rolling Pampa, inserted on Pampa biome region, this plant is known as “guanxuma” and it is used by population as medicinal plant, being indicated as diuretic and hypoglycemiant. Considering the absence of scientific studies about this local species and the importance to know their potential, the present study aimed to determine the chemical composition of *S. tuberculata*, applying LC-MS analysis, and to investigate the *in vitro* antifungal effect, in special with focus on anti-*Candida* activity.

EXPERIMENTAL

Chemicals

The chemical standards rutin and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA). Phosphoric acid and aluminum chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Synth (São Paulo, Brazil), respectively. Purified water was obtained using the Milli-Q Plus® system from Millipore (Milford, MA, USA). All other reagents used in this study were of analytical or HPLC grade.

Plant material

The plant was collected in August 2011 in Uruguaiana (Rio Grande do Sul, Brazil), city located in the western border, near to Argentina. The material, an herbaceous type, was identified by M. Grings & O. Bueno, and voucher specimens (*Sida tuberculata* R.E.Fries; ICN 167493) were deposited at the ICN Herbarium (Instituto de Biociências, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43433, CEP 91501-970, Porto Alegre-RS, Brazil).

Extracts

Air-dried (at 40 °C) roots and leaves of *S. tuberculata* were reduced to a powder and submitted to extraction (drug:solvent 1:10, w/v) by percolation and infusion (Brazilian Pharmacopoeia, 2010). Percolation was applied to roots and leaves using hydroethanolic solution at 70% and 40%, respectively. Infusion using water was also prepared for both materials. These extracts were then filtered and stored in a refrigerator until the analysis.

For the chromatographic assay, extractive preparations were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore) and injected directly, without dilution.

Concentration of extracts, total phenolic content and total flavonoid content

The percentage of dried extractives (dry residue) in extracts was determined according to the Brazilian Pharmacopoeia (2010). Samples of 2.0 mL of each extract were used, and each analysis was done in triplicate.

The total phenolic content was measured by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method, with modifications (Nurmi *et al.*, 1996). Briefly, 0,25 ml of 1N Folin-Ciocalteu reagent was added to a 0,05 ml of sample, and this mixture was allowed to stand for 2-5 min before the addition of 1 ml of 15% Na₂CO₃. The solution was then allowed to stand for 30 minutes before reading at 750 nm in spectrophotometer using 1 cm quartz cells. The total polyphenol content was expressed as milligram gallic acid equivalent per milliliter (mg GAE/ml) of each extract.

The determination of the total flavonoid content was performed based on a previously reported methodology, which uses AlCl₃ (Chang *et al.*, 2002). The dilution factor used was 1:50 and the results were expressed as as mg per g dried material (mg/g). The extracts were assayed in triplicate, and the rutin flavonoid was used as a reference. UV-Vis absorbance was measured in a Perkin Elmer[®] Lambda 35 UV/Vis Double array Spectrophotometer (Norwalk, CT, USA) with 1 cm quartz cells.

LC-UV-MS

The LC analyses were conducted using a Prominence Liquid Chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with SLC-10A controller, LC-20AD pump, SIL-10AF auto sampler and SPD-M10A PDA detector. A Phenomenex Luna C-18(2) column (250 x 4.6 mm, 5 µm) was used. The mobile phase consisted of a water containing 0.05% phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹ using the gradient as follows: 0.1-

23 min, 10-40% solvent B in A; 23.01-40 min, a fixe proportion of 10% solvent B and 90% solvent A. The detection was done on DAD detector, set at 340 nm. The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore) and sonicated before use.

The MS analysis were performed on an Esquire plus 3000 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) ion trap mass spectrometer with an electrospray interface (ESI). The data acquisition software employed was esquire CONTROL 5.2. The LC/ESI/MS was conducted in positive-ion mode and operated according to defined conditions: nitrogen gas temperature 320°C; drying gas flow rate 7 l min⁻¹; capillary voltage 4000V; nebulizing pressure 27 psi. Mass spectra were recorded by using full scan mode in the range of *m/z* 200-800.

Antifungal activity

Antifungal screening

The assay applied to evaluate the *in vitro* antifungal activity was conducted testing the extracts prepared in water: leaves and roots infusions. A total of 11 clinical isolates of opportunistic yeasts were tested for the antifungal susceptibility test. The yeasts tested were *Candida albicans* (CA 02), *C. dubliniensis* (CD 24A), *C. glabrata* (CG 01), *C. guilhermondii* (CG 40039), *C. krusei* (CK 6258), *C. parapsilosis* (CPA 01), *C. tropicalis* (CT 08), *Cryptococcus neoformans* (CRY 14), *Geotrichum candidum* (GC 09), *Rhodotorula mucilaginosa* (ROH 01) and *Trichosporon asahii* (TA 01).

Screening for antifungal activity of the extracts was determined by the broth microdilution method. In order to obtain stock solutions (1000 µg/ml), the *S. tuberculata* extracts were solubilized with 0.9% NaCl solution and dimethyl sulphoxide (DMSO). In 96-well microtiter plates, the stock solutions were diluted with Sabouraud dextrose broth (SDB) at 500 µg/mL to the screening test.

Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC)

Minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined by the broth microdilution method according to M27-A3 documents determined by the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2008), with RPMI-MOPS (RPMI 1640 medium containing L-glutamine, without sodium bicarbonate - Sigma-Aldrich Co., St Louis, USA - buffered to pH 7.0 with 0.165 mol/L MOPS buffer–Sigma). The concentrations of extracts tested ranged from 1.9 to 500 µg/ml and 100 µl-aliquots were inoculated of a flat-bottom 96-well microtiter. The MIC was defined as the lowest concentration of compounds at which the microorganism tested did not demonstrate visible growth. Amphotericin B kindly supplied by Cristália (Itapira, SP, Brazil) was used as positive control. The experiments were carried out in triplicate.

The minimal fungicidal concentration (MFC) was determined by sub-culturing volumes of 10 µl from wells without visible grown in Sabouraud dextrose agar (SDA) with Cloranfenicol (Difco, Detroit, USA) and incubated at 35 °C for 48 h. Minimum fungicidal concentration (MFC) was defined as the lowest concentration yielding negative subcultures.

Evaluation of biofilm removal of artificially contaminated Central Venous Catheter

(CVC) coupons

CVC (Silcath, São Paulo, Brazil) coupons of 1 x 1 cm were prepared. The coupons were washed in potable water and neutral detergent. Subsequently were rinsed with distilled water and disinfected with 70% (v/v) ethyl alcohol. The coupons were dried at 600°C for 2 h and autoclaved at 1210°C, for 15 min.

The CVC coupons were previously contaminated with 6 log CFU/ml of *C. krusei* CK66A. The contaminated coupons were transferred to a container containing 15 ml of each

extract of *S. tuberculata* (500 µg/ml) and placed in the solution for 45, 60 and 90 seconds. Subsequently, the coupons were immersed in a neutralizing solution (Tween 80, 0.5%) for 30s, transferred to 25 ml of 0.1% peptone water, and immediately sonicated for 10 min. The samples obtained were decimally diluted, and 20 µl were plated on Sabouraud dextrose agar (SDA) with chloramphenicol for determination of viable cell counts, according to the procedure of Milles and Misra (1938). The control coupons were treated with distilled water instead of disinfectant.

The counts of *C. krusei* were converted to log CFU, with the growth in the CVC expressed in log CFU/cm² of catheter. The number of cells removed by each extract was expressed in log CFU/cm² of surface. In all cases, samples were tested in triplicate, and the experiment was repeated at least three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and characterization of extracts

Initially, the experiments were focused on evaluation of plant material and K_d determination of water content. After collecting, the plant length was measured, being observed 30-40 cm of height and 0.7 cm for leaf diameter. The dryness indicated a water content of 38.84% and 57.09% for roots and leaves, respectively.

Focusing the parameters that characterize the extracts, some of them were determined in hydroethanolic preparations obtained by percolation; dry residue, total phenolic content and total flavonoids were studied. Table 1 illustrates the mean values obtained. The total phenolic amounts were in the range of 0.442 - 2.131 mg GAE/ml of extract, and the total flavonoids in 1.955 - 2.240 mg/g of dried material range. In preliminary tests, different extraction techniques were assayed, such as reflux and maceration. The choice of percolation was based on the results obtained in parameters cited above. These measurements are important as

preliminary reference during development of extracts; besides, the phenolic compounds are involved on essential functions and interfere in several biological systems, mainly due their known antioxidant potential with hydrogen-donating radical scavenger properties (Rice-Evans *et al.*, 1996; Urquiaga and Leighton, 2000). Some recent works have describing the presence of phenolic compounds in *Sida*. Studying extracts from *S. rhomboidea* Roxb. collected at India, the developed decoctions showed a content ranging 3.0 mg GAE/100mg of extract and 4.3 mg/100mg of extract for phenolics and flavonoids, respectively (Thounaojam *et al.*, 2011). Also, hydroethanolic extracts at 90%, obtained by maceration from root, stem and leaves, presented mean contents of 3.8, 1.8 and 2.13% (w/w) respectively, expressing as GAE (Dhalwal *et al.*, 2007).

LC-UV-MS

In terms of investigation about phytochemical profile, the extracts of *S. tuberculata* were continuously assayed. Analyses by HPLC-UV were performed in a search to know the composition in flavonoids and ecdysteroids, since they were reported on literature. For *Sida*, the reports about alkaloids are also common; It is reported the existence of a relation between these compounds to some know activities. In *S. cordifolia*, the observed effects on cardiovascular and central nervous system have relation to the quinazoline alkaloids vasicinone, vasicine and vasicinol, found on leaves and roots (Ghosal *et al.*, 1975; Silveira *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2005). Ephedrine is another alkaloid common to be found in species from *Sida* (Khatoon *et al.*, 2005).

As mentioned, other class studied in *Sida* refers to ecdysteroids, already detected and identified. They interfere in the biological system, having pharmacological effects on mammals or human system, acting in growth, cell proliferation and another system (Lafont and Dinan, 2003). Besides, the antiviral, antibacterial and antifungal activities also were

related by these authors. Specifically, *Sida* extracts show effect in cases of dysregulation of lipid and cholesterol metabolism, activities that were attributed to the presence of some components, as phytosterols and saponins (Ikeda and Sugano, 1998; Taleb-Contini *et al.*, 2003; Thounaojam *et al.*, 2009a; Thounaojam *et al.*, 2009b).

To obtain more specific and reliable results, the analytical experiments were focused on LC-MS analyses, in which the mass and respective fragments were determinant to suggest the sample composition. The chromatographic runs and the full-scan ESI⁺ mass spectra for the detected peaks are illustrated on Figure 1 and 2, comprising three samples: leaves and roots hydroethanolic extracts, and roots aqueous infusion. Intense peaks were detected at 13.0 – 20.0 min range during analyses. Performing a detailed evaluation it was possible identify three ecdysteroids retained at 13.2 (compound 1) (leaves and roots), 14.6 (compound 2) (leaves and roots) and 15.0 min (compound 3) (leaves). Also, at 16.7 (compound 4) (leaves) and 23.0 min (compound 5) (roots), flavonoid and alkaloid derivatives were suggested. The complete data of these substances, *m/z* of ions, molecular formula and respective identities are described on Table 3. The chemical structures proposed for them are illustrated on Figure 3.

In the case of steroidal compounds, the fragmentation pattern observed were in accordance to key fragmentation described in the literature for ecdysteroids (Li *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). The use of ESI⁺ provide an intense loss of H₂O molecules from polihydroxylated molecular ions, a feature present in the hydroxylated steroids (ecdysones) that we are treating in this work. Fragmentation associated to loss of water molecules [M+H]⁺, [M+H-H₂O]⁺ and [M+H-2H₂O]⁺; and to loss of glucoside [M+H-glu]⁺ and [M+H-glu-H₂O]⁺ can be proposed. In fact, the ESI⁺ spectra of ecdysteroids can be used as fingerprints for the identification of these compounds in extracts of plants (Stevens *et al.*, 2008). A specific evaluation of each chromatographic peak and fragmentation pattern was done comparing to the literature reports. The compound retained at 13.2 min presented a UV

spectrum similar to ecdysteroids, with UV_{\max} at 248 nm. It displayed quasi-molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 643; and fragment MS ions at m/z 625 (M+H-H₂O), 607(M+H-H₂O), 481(M+H-2H₂O), 463 (M+H-3H₂O), 445 (M+H-4H₂O) and 427(M+H-5H₂O). These fragments are in accordance to the same profile described by Wang *et al.* (2008), in a study applied to *S. rhombifolia* that identified the compound 20-hydroxyecdysone-3-O-β-D-glycopyranoside. In respect to the peak at 14.6 min, the same fragmentation related to loss of water was observed. Previous studies have related this fragmentation pattern when submitted to MS analysis (Kumpun *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2008, Stevens *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2006). We proposed the substance 20-hydroxyecdysone. The constituents ecdysone and 20-hydroxyecdysone, among other derivatives, were found in *S. rhombifolia* L. and *S. spinosa* (Darwish and Reinecke, 2003; Jadhav *et al.*, 2007). The same compounds were mentioned composing the chemical profile of seeds from *Sida* sp. (Dinan *et al.*, 2001). For the compound retained at 15.0 min, the profile visualized for loss of water was also detected. However, considering the quasi-molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 611 and the loss of 130 Da observed during fragmentation, we suggest the presence of the compound 20-hydroxyecdysone-dideoxihexose. This purpose considered the studies described by Cabrera (2006) and Grosa *et al.* (2005), in which it is mentioned the fragment dideoxihexose.

When other peaks were evaluated, some differences in MS spectra and UV_{\max} were detected, modifying the focus of investigation and improving the perspective to explore another chemical class. The chromatographic peak at 16.7 min showed fragments that probably belongs to another compounds class: flavonoids. Studying the molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 595 and the fragments, it is suggested the flavonoid kaempferol-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside (Tiliroside). This identity was established based on observations around the fragments that were lost, 146 and 162 Da. The former may be attributed to coumaroyl or deoxyhexose group, as cited in recent revision about MS of

flavonoids (Cuyckens and Claeys, 2004). In sequence, from m/z 449 the loss of hexoside residue (162 Da) gives the aglycone ion at m/z 286.9. According to literature, the fragments cited above and their respective weights are characteristic of *O*-flavonoids (Cuyckens and Claeys, 2004; Vukics and Guttman, 2010). In the present work, we proposed a structure containing the group coumaroyl, mainly because it already has been detected and isolated from other Malvaceae species, including *Sida*, such as *Sida galheirensis* (Silva *et al.*, 2006), *Abutilon grandiflorum* (Sikorska and Matlawska, 2008), *Hibiscus sabdariffa* (Rodríguez-Medina *et al.*, 2009; Fernández-Arroyo *et al.*, 2011), *Sidastrum paniculatum* (Cavalcante *et al.*, 2010) and *Herissantia tiubae* (Silva *et al.*, 2005). Exploring other substances, the peak at 23.0 min was also investigated. MS analysis displayed a fragment at m/z 177, already related as feruloyl moiety (Dong *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2012). Considering this fragment and the quasi-molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 314, we suggest as being the compound *N*-feruloyltyramine. It is important to mention that this substance was isolated from other Malvaceae species like *Sidastrum paniculatum* (Cavalcante *et al.*, 2010), and also identified by ESI-MS in *Hibiscus sabdariffa* (Beltrán-Debón *et al.*, 2010; Fernández-Arroyo *et al.*, 2011).

Antifungal activity

Here, in the present work, the antifungal activity of *S. tuberculata* was investigated. This aim was established due the reports about existence of ecdysteroids in the genus and possible antimicrobial activity (Brugés and Reza, 2008; Assam *et al.*, 2010). In fact, phytoecdysteroids, or steroids in general, are mentioned as substances whose presence can result on antimicrobial activity (Chattopadhyay *et al.*, 2001; Mamadalieva *et al.*, 2013). In a recent publication, extracts of *A. turkestanica*, presented activity against Gram-negative bacteria, that was attributed to the presence of phytoecdysteroids, as oxo sterols and sterols (Mamadalieva *et al.*, 2013). Also, when evaluated in the presence of 20-hydroxyecdysone,

turkesterone and cyasterone, the antimicrobial potential was confirmed. Besides, 20-hydroxyecdysone was found to be active also against *C. albicans* strain.

For *Sida*, hydroethanolic extracts from *S. rhombifolia* and their respective fractions presented activity against Gram-positive and Gram-negative organisms (Islam *et al.*, 2003). *S. alba*, through polyphenol-rich fractions, was assayed against several clinical isolates for the evaluation of bactericidal and bacteriostatic capacity and the determination of MIC (Konaté *et al.*, 2012). The results indicated that the fractions possess promising activity alone or in combination with conventional drugs. According to literature, polyphenols are also considered when antimicrobial activity is present in medicinal plants; different classes are mentioned, such as tannins and flavonoids (Cowan, 1999; Machado *et al.*, 2002). These compounds act due to their ability to complex and inactivate proteins in bacterial cell, and interfere in cell envelop proteins (Cowan, 1999). Another work, now applied to essential oils extracted from leaves of *S. cordifolia* reported the existence of activity against bacteria and fungi; *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis* were sensitive to the oil (Nunes *et al.*, 2006).

In our study, the *S.tuberculata* extracts (infusions) were assayed against 9 opportunistic species of emergent yeasts tested, whereas *Candida krusei* clinical isolates were specifically susceptible (Table 2). The results indicate that leaves and roots extracts are especially active against *C. krusei* with minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.9 - 62.5 µg/ml to leave extract and MIC range of 1.95 - 31.25 µg/ml to root extract. It is known that the clinical isolates of the genus *Candida*, particularly non-*albicans* *Candida* (NAC), are opportunistic pathogens associated with nosocomial infections in patients with dysfunction of the immune system (Chong *et al.*, 2007). Among the emerging species of the genus, *C. krusei* is significantly different from other medically important *Candida* spp. in its pathogenesis and antifungal resistance (Pfaller *et al.*, 2008). The incidence of *C. krusei* infections has increased in the last three decades and has become a significant opportunistic agent, especially when

they evolve recurrent vulvovaginal candidiasis, fungaemia, septic arthritis, endophthalmitis and endocarditis (Samaranayake and Samaranayake, 1994). According to Barbedo and Sgarbi (2010) the multidrug resistance phenotype exhibited by *C. krusei* is an important problem for the treatment of patients in general, especially in immunocompromised patients. The development of fungal drug resistance, drug-related toxicity, significant drug interactions and insufficient bioavailability of the conventional antifungal drugs against NAC has encouraged the search for new alternatives among natural products (Cavaleiro *et al.*, 2006). Thus, our results suggest that *S. tuberculata* extracts can be used as source of a new antifungal agent or adjuvant with antifungal agents in anti-*Candida* treatment, even if others *Candida* spp. tested were not susceptible.

The adhesion of *C. krusei* CK66A to CVC and their biofilm removal by roots and leaves extracts of *S. tuberculata* was also investigated. Biofilm formation is largely associated with infections due to contamination medical devices, such as CVC. In these cases, eradication of the infection is tough because the antimicrobial agents may not penetrate inside the biofilm (Stewart, 2002). In our study, coupons of CVC was immersed in cellular suspension of *C. krusei* CK66A during 45 minutes and submitted to *S. tuberculata* extracts (infusions) in concentration of 500 μ g/mL with the objective of evaluated their capacity to remove the biofilm formation in this prosthetic material. Results indicated that the isolate *C. krusei* CK66A presented strong adhesion to the CVC (7 log CFU cm⁻²) (Table 4). The extracts were not able to inactivate all the microorganisms adhered on both surfaces. However, the leaves extract was able to completely remove the *C. krusei* biofilm on catheters after 90 minutes of exposition, although root extract reduced biofilm counts in approximately 1.0 log cm⁻². According to the results presented in this work, extract of leaves of *S. tuberculata* could inactivate *C. krusei* biofilm formed in CVC after 90 seconds of contact.

CONCLUSIONS

The present study focused the investigation of *S. tuberculata*, collected in a characteristic region of Brazil. The chemical composition in ecdysteroids, flavonoids and alkaloids was explored, comprising different parts of the plant. The antimicrobial and antibiofilmactivities could be evaluated by *in vitro* antifungal assay performed against *C. krusei* strains, confirming the potential referred to ecdysones. Based on the descriptive data presented, the potential of *S. tuberculata* could be verified, getting perspectives to explore additional information that improve the knowledge about the composition and the biological effects *in vitro* and *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CAPES and PBDA-UNIPAMPA (Brazil) for financial support.

REFERENCES

- Assam JP, Dzoyem JP, Pieme CA, Penlap VB. 2010. In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). *BMC Complement Altern Med* **10**: 1-7.
- Barbedo LS, Sgarbi DBG. 2010. Candidíase. *DST - J Bras Doenças Sex Transm* **22**: 22-38.
- Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Rodríguez-Medina I, Rull A, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Camps J, Joven J. 2010. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine* **17**: 186-191.
- Bonjardim, LR, Silva AM, Oliveira MGB, Guimarães AG, Antonioli AR, Santana MF, Serafini MR, Santos RC, Araújo AAS, Estevam CS, Santos MRV, Lyra A, Carvalho R,

- Quintans-Júnior LJ, Azevedo EG, Botelho MA. 2011. *Sida cordifolia* leaf extract reduces theofacial nociceptive response in mice. *Phytother Res* **25**: 1236-1241.
- Bortoluzzi M, Siqueira VL, Lopes AMV, Paim AC. 1994. Estudo fitoquímico de *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) e aspectos anatômicos da raiz. *Lecta-USF* **12**: 81–97.
- Bovini MG. 2012. *Sida* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. URL [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB009242>]; accessed July 2012.
- Brazilian Pharmacopoeia. 2010. *Métodos Gerais* (4th Edn.). Anvisa: Brasília.
- Brugés K, Reza MTR. 2008. Evaluación preliminar de toxicidade, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Rev Colomb Biotecnol* **9**: 5-13.
- Cabrera GM. 2006. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides. In *Phytochemistry: Advances in Research*. Imperato F. (Ed.). Trivandrum: Research Signpost; 1-22.
- Cavalcante JMS, Nogueira TBS, Tomaz ACA, Silva DA, Agra MF, Souza MFV, Carvalho PRC, Ramos SR, Nascimento SC, Gonçalves-Silva T. 2010. Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* (L.)Fryxell and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Quim Nova* **33**: 846-849.
- Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves MJ, Salgueiro L. 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J Appl Microbiol* **100**: 1333-1338.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**: 178-182.
- Chattopadhyay D, Maiti K, Kundu AP, Chakraborty MS, Bhadra R, Mandal SC, Mandal, AB. 2001. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. *J Ethnopharmacol* **77**: 49-55.

- Chong PP, Abdul Hadi SR, Lee YL, Phan CL, Tan BC, Ng KP, Seow HF. 2007. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with nonpregnant status. *Infect Genet Evol* **7**:449-456.
- Cowan MM. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* **12**: 564-582.
- Cuyckens F, Claeys M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* **39**: 1-15.
- Da Silva ACO, Oliveira AFM, Santos DYAC, Silva SI. 2010. An approach to chemotaxonomy to the fatty acid content of some Malvaceae species. *Biochem System Ecol* **38**: 1035-1038.
- Darwish FMM, Reinecke MG. 2003. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. *Phytochemistry* **62**: 1179-1184.
- Dinan L, Bourne P, Whiting P. 2001. Phytoecdysteroid profiles in seeds of *Sida* spp. (Malvaceae). *Phytochem Anal* **12**: 110-119.
- Dhalwal K, Deshpande YS, Purohit AP. 2007. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of *Sida rhombifolia* (L.) Ssp. *retusa* (L.). *J Med Food* **10**: 683-688.
- Dong SW, Shang M, Wang X, Zhang S, Li C, Cai S. 2009. Chemical constituents isolated from *Saruma henryi*. *J Chin Pharm Sci* **18**: 146-150.
- Fernández-Arroyo S, Rodríguez-Medina IC, Beltrán-Debón R, Pasini F, Joven J, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2011. Quantification of the polyphenolic fraction and *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Res Int* **44**: 1490-1495.
- Franco CIF, Morais LCSL, Quintans-Júnior LJ, Almeida RN, Antonioli AR. 2005. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sida cordifolia* L. leaves. *J Ethnopharmacol* **98**: 275-279.

- Ghosal S, Chauhan RBPS, Mehta R. 1975. Alkaloids of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry* **14**: 830-832.
- Ghosal S, Prakash A, Varma RK. 1981. Alkaloidal constituents of *Sida acuta*, *S. humilis*, *S. rhombifolia* and *S. spinosa*. *Phytochemistry* **43**: 384-388.
- Grosa G, Allegrone G, Del Grosso E. 2005. LC-ESI-MS/MS characterization of strophanthin-K. *J Pharm Biomed Anal* **38**: 79-86.
- Ikeda I, Sugano M. 1998. Inhibition of cholesterol absorption by plant sterols for mass intervention. *Curr Opin Lipidol* **9**: 527-531.
- Islam ME, Haque ME, Mosaddik MA. 2003. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Sida rhombifolia* (Malvaceae) grown in Bangladesh. *Phytother Res* **17**: 973-975.
- Jadhav AN, Pawar RS, Avula B, Khan IA. 2007. Ecdysteroid glycosides from *Sida rhombifolia* L. *Chem Biodivers* **4**: 2225-2230.
- Khatoon S, Srivastava M, Rawat AKS, Mehrotra S. 2005. HPTLC method for chemical standardization of *Sida* species and estimation of the alkaloid ephedrine. *J Planar Chromatogr* **18**: 364-367.
- Konaté K, Hilou A, Mavoungou JF, Lepengué AN, Souza A, Barro N, Datté JY, M'Batchi B, Nacoulma OG. 2012. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against cotrimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals Clin Microbiol Antimicrob* **11**: 1-6.
- Kumpun S, Maria A, Crouzet S, Evrard-Todeschi N, Girault J, Lafont R. 2011. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chem* **125**: 1226-1234.
- Lafont R, Dinan L. 2003. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* **3**: 1-29.

- Li Y, Warren JT, Boysen G, Gilbert LI, Gold A, Sangaiah R, Ball LM, Swenberg JA. 2006. Profiling of ecdysteroids in complex biological samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom***20**: 185-192.
- Mabberley DJ. 1997. *The Plant Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants* (2nd Edn.). Cambridge University Press: Cambridge; 858p.
- Machado TD, Leal ICR, Amaral ACF, Dos Santos KRN, Da Silva MG, Kuster RM. 2002. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Braz Chem Soc***13**: 606-610.
- Mamadalieva NZ, El-Readi MZ, Ovidi E, Ashour ML, Hamoud R, Sagdullaev SS, Azimova SS, Tiezzi A, Wink M. 2013. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. *Phytopharmacology***4**: 1-18.
- Matlawska I. 1990. Investigation of flavonoid compounds from the selected species of Malvaceae family (flowers and leaves). *Herba Pol***36**: 65-69.
- Milles AA, Misra SS. 1938. Estimation of the bactericide power of the bloods. *J Hyg***38**: 732-749.
- Nunes XP, Maia GLA, Almeida JRGS, Pereira FO, Lima EO. 2006. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Rev Bras Farmacogn***16**: 642-644.
- Nurmi K, Ossipov V, Haukioja E, Pihlaja K. 1996. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *J Chem Ecol***22**: 2023-2040.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, Rinaldi M, Barton R, Veselov A. 2008. Global Antifungal Surveillance Group. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol***46**: 515-521.

- Rao KS, Mishra SH. 1997. Anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Sida rhombifolia* Linn. *Indian J Pharmacol***29**: 110-116.
- Ren Q, Wu C, Ren Y, Zhang J. 2012. Characterization and identification of the chemical constituents from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) by high performance liquid chromatography/photodiode array detector/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry. *Food Chem*, accepted manuscript. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.052>.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**: 933-956.
- Rodríguez-Medina IC, Beltrán-Debón R, Molina VM, Alonso-Villaverde C, Joven J, Menéndez JÁ, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2009. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *J Sep Sci***32**: 3441-3448.
- Rondón JB. 2009. La subfamilia Malvoideae (Malvaceae *s.l.*) en el occidente del estado Sucre, Venezuela. *Rev UDO Agríc***9**: 599-621.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP. 1994. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol***41**: 295-310.
- Santos MRV, Marchioro M, Silveira AL, Barbosa, Filho JM, Medeiros IA. 2005. Cardiovascular effects on rats induced by the total alkaloid fraction of *Sida cordifolia*. *Biol Geral Exper***5**: 5-9.
- Sikorska M, Matlawska I. 2008. Polyphenolic compounds from *Abutilon grandiflorum* leaves. *Acta Pol Pharm***65**: 467-471.
- Silva DA, Costa DA, Silva DF, Souza MFV, Agra MF, Medeiros IA, Barbosa-Filho JM, Braz-Filho R. 2005. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum)

- Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-*O*- α -L-ramnopiranosídeo. *Rev Bras Farmacogn***15**: 23-29.
- Silva DA, Silva TMS, Lins ACS, Costa DA, Cavalcante JMS, Matias WN, Souza MFV, Filho RB. 2006. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (Malvaceae). *Quim Nova* **29**: 1250-1254.
- Silveira AL, Gomes MAS, Silva Filho RN, Santos MRV, Medeiros IA, Barbosa Filho JM. 2003. Evaluation of the cardiovascular effects of vasicine, an alkaloid isolated from the leaves of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). *Rev Bras Farmacogn***13**: 37-39.
- Stevens JF, Reed RL, Morré JT. 2008. Characterization of phytoecdysteroid glycosides in meadowfoam (*Limnanthes alba*) seed meal by positive and negative ion LC-MS/MS. *J Agric Food Chem* **56**:3945-3952.
- Stewart PS. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**: 107-113.
- Sutradhar RK, Rahman AKM, Ahmad MU, Bachar SU. 2008. Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochem Lett***1**: 179-182.
- Taleb-Contini SH, Salvador MJ, Watanabe E, Ito IY, Oliveira DCR. 2003. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Braz J Pharm Sci***39**: 403-408.
- Thounaojam M, Jadeja R, Devkar R, Ramachandran AV. 2009a. Dysregulation of lipid and cholesterol metabolism in high fat diet fed hyperlipidemic rats: protective effect of *Sida rhomboidea* Roxb. leaf extract. *J Health Sci***55**: 413-420.
- Thounaojam MC, Jadeja RN, Ansarullah, Patel VB, Devkar RV, Ramachandran AV. 2009b. Potential of *Sida rhomboidea* Roxb leaf extract in controlling hypertriglyceridemia in experimental models. *Pharmacognosy Res* **1**: 208-212.

- Thounaojam MC, Jadeja RN, Devkar RV, Ramachandran AV. 2011. In Vitro evidence for the protective role of *Sida rhomboidea* Roxb extract against LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Cardiovasc Toxicol***11**:168-179.
- Urquiaga I, Leighton F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res***33**: 55-64.
- Venkatesh S, Reddy YSR, Suresh B, Reddy BM, Ramesh M. 1999. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sida rhomboidea* leaves. *J Ethnopharmacol***67**: 229-232.
- Vukics V, Guttman A. 2010. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev***29**: 1-16.
- Wang Y, Avula B, Jadhav AN, Smillie TJ, Khan IA. 2008. Structural characterization and identification of ecdysteroids from *Sida rhombifolia* L. in positive electrospray ionization by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom***22**: 2413-2422.
- Zhang Y, Shi Q, Shi P, Zhang W, Cheng Y. 2006. Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb Jin-Guo-Lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom***20**: 2328-2342.

Table 1. Total phenolic and flavonoid content in *Sida tuberculata* (Malvaceae), obtained from the analysis of leaves and roots hydroethanolic extracts.

Material	Total flavonoids ^{a,b}		Total phenolics ^{a,b}	
	(mg/g dried material)	RSD (%)	(mg GAE/mL extract)	RSD (%)
Roots	1.955	1.80	0.442	1.91
Leaves	2.240	1.89	2.131	8.06

^aassayed in triplicate; ^bdensity and dilution factor were considered.

Table 2. Chemical constituents identified in *Sida tuberculata* (Malvaceae) with corresponding retention times, quasi-molecular ions in positive mode and key fragments by HPLC/ESI-MS.

Peak	<i>Rt</i> (min)	UV _{max} (nm)	Molecular formula	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	MS fragmentation [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	Compound	Plant part
1	13.2	248	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₂	643	625,607,481,463,445,427	20-Hydroxyecdysone-3- <i>O</i> - β-D-glycopyranoside	leaves and roots
2	14.6	248	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	481	463,445,427	20-Hydroxyecdysone	leaves and roots
3	15.0	250	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₀	611	481,463,445,427	20-Hydroxyecdysone- dideoxihexose	Leaves
4	16.7	312	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595	449,286	kaempferol-3- <i>O</i> -β-D-(6''- <i>E</i> - p-coumaroyl)- glucopyranoside	Leaves
5	23.0	317	C ₁₈ H ₁₉ O ₄ N	314	177	<i>N</i> -Feruloyltyramine	Roots

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) for aqueous extracts (leaves and roots infusions) of *Sida tuberculata* (Malvaceae), determined against *Candida krusei* clinical strains.

<i>Candida krusei</i> clinical strains	Leaves			Roots		
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	MFC ($\mu\text{g/mL}$)
CK6258	62.5		>500	3,9		250
CK02	7.8		250	1,95		250
CK07	15.6		250	31.25		500
CK04	7.8		125	3.9		250
CK05	31.25	3.9 – 62.5	250	15.6	1.95 – 31.25	250
CK06	62.5		>500	31.25		250
CKVB42	3.9		125	7.8		250
CK101A	15.6		250	31.25		>500
CK104P	7.8		125	15.6		250

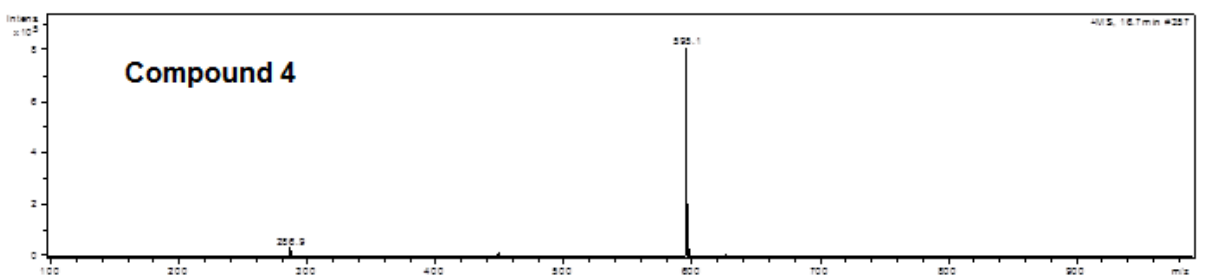
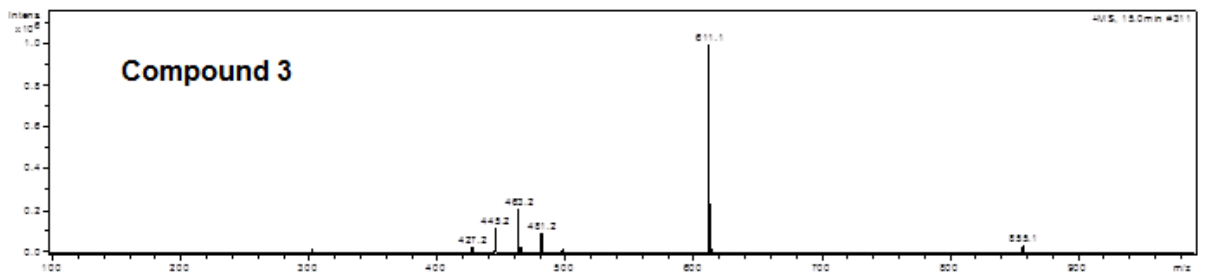
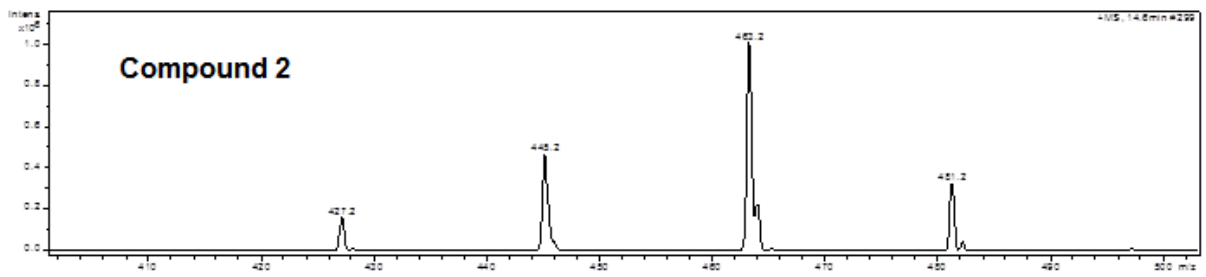
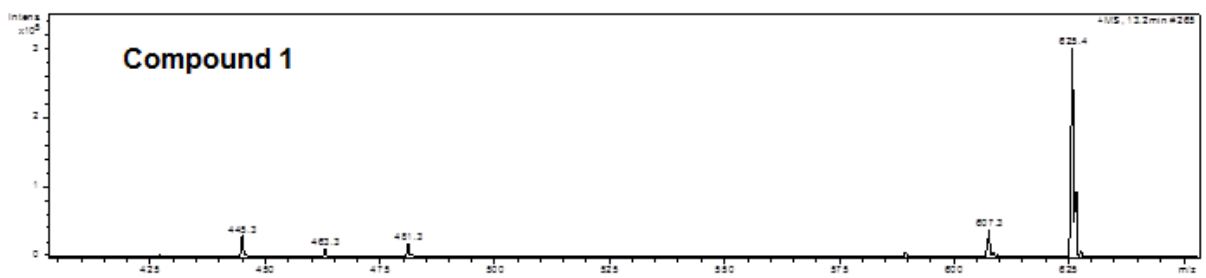
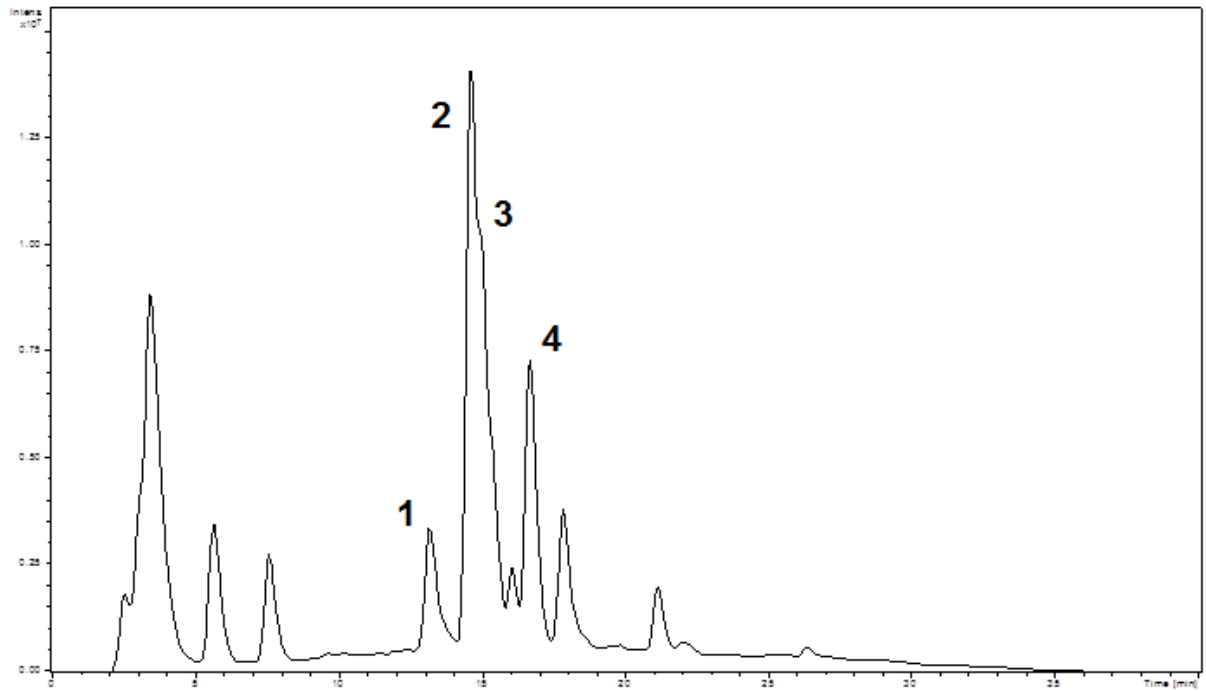
Table 4. Biofilm removal in central venous catheter (CVC) by *Sida tuberculata* (Malvaceae) aqueous extracts (leaves and roots infusions).

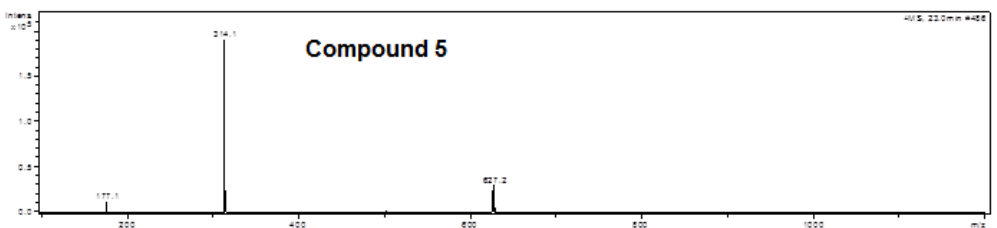
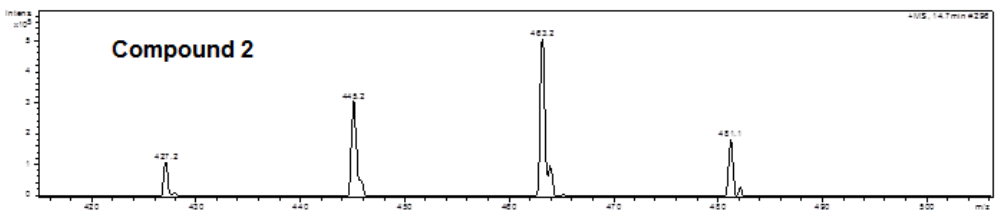
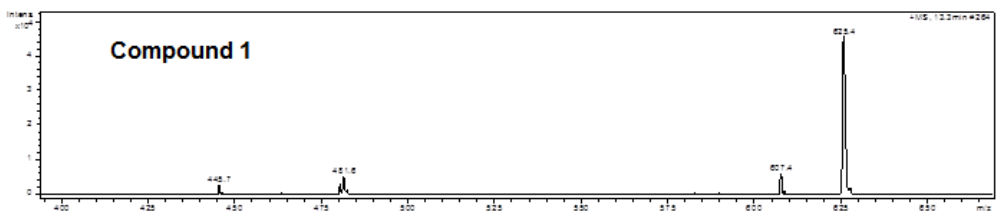
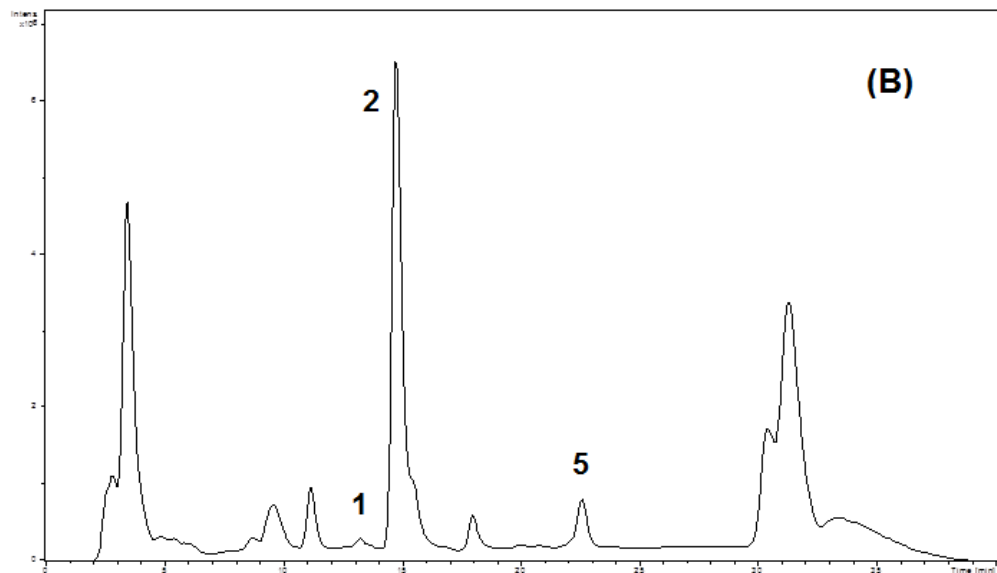
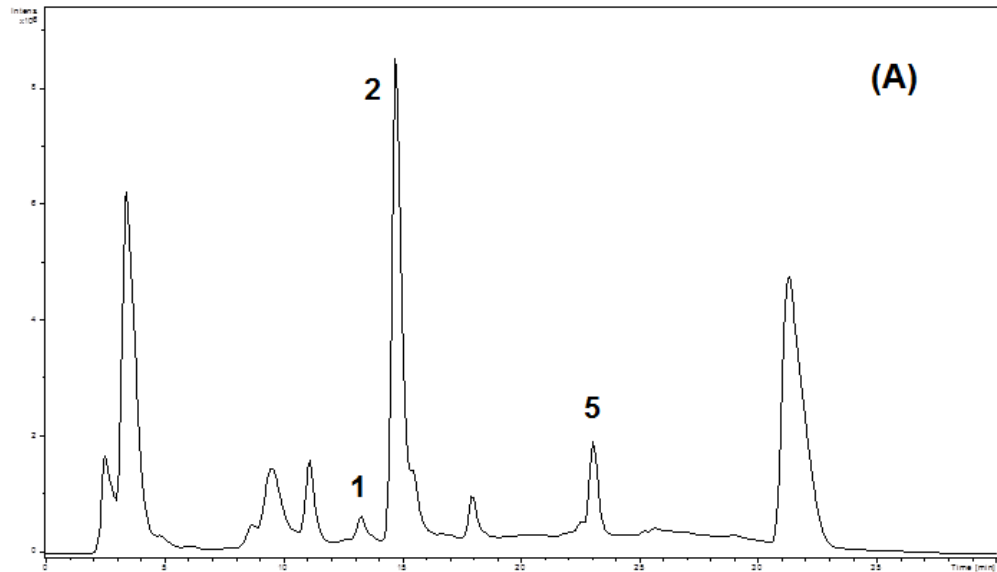
Contact time with extracts	Control	Leaves 500 µg/mL	Roots 500 µg/mL
	Log ufc.cm ⁻²	Log ufc.cm ⁻²	Log ufc.cm ⁻²
45 sec	7	7	7
60 sec	7	5,6	6,2
90 sec	7	0	6

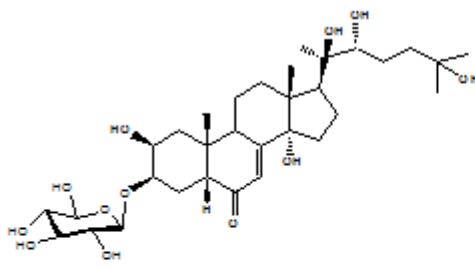
Figure 1. Mass chromatogram and spectra of ion fragments obtained from analysis of *sida tuberculata* (malvaceae) leaves extract (hydroethanolic extract). Analysis performed by using lc/esi/ms in positive ion mode. Peak numbers correspond to chemical compounds presented in table 3. (1) 20-hydroxyecdysone-3-*o*- β -d-glycopyranoside; (2) 20-hydroxyecdysone; (3) 20-hydroxyecdysone-dideoxihexose; (4) kaempferol-3-*o*- β -d-(6''-*e*-p-coumaroyl)-glucopyranoside.

Figure 2. Mass chromatogram and spectra of ion fragments obtained from analysis of *sida tuberculata* (malvaceae) roots extracts. Analysis performed by using lc/esi/ms in positive ion mode. Peak numbers correspond to chemical compounds presented in table 3. (a) hydroethanolic extract; (b) aqueous infusion; (1) 20-hydroxyecdysone-3-*o*- β -d-glycopyranoside; (2) 20-hydroxyecdysone; (5) *n*-feruloyltyramine.

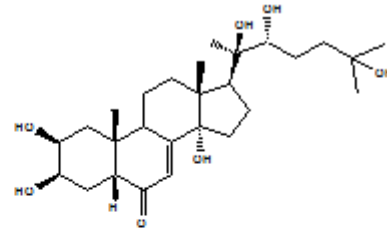
Figure 3. Chemical structures of the constituents identified in *Sida tuberculata* (Malvaceae) extracts.



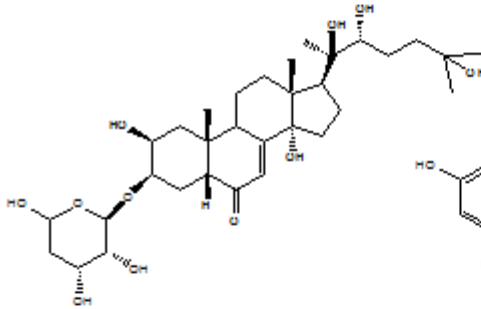




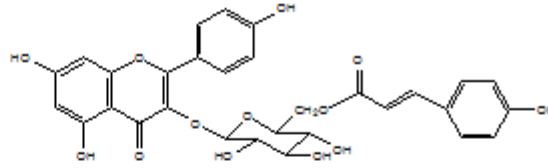
20-Hydroxyecdysone-3-O- β -D-glucopyranoside (1)



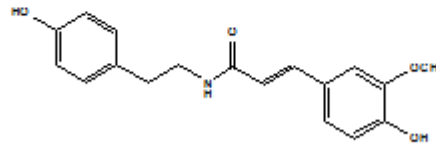
20-Hydroxyecdysone (2)



20-Hydroxyecdysone-dideoxihexose (3)



kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside (4)



N-Feruloyltyramine (5)

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a espécie *S. tuberculata* foi estudada em aspectos de desenvolvimento e caracterização de extratos vegetais e avaliação de seu potencial de atividade antifúngica *in vitro*.

Primeiramente, na tentativa de encontrar a melhor técnica de extração dos compostos fenólicos da espécie em questão, foram realizados ensaios utilizando métodos usuais de extração. Assim, foram testadas diferentes metodologias de extração (maceração, percolação e refluxo), com soluções hidroetanólicas em diferentes concentrações (20 a 90%). Paralelo ao estudo das técnicas extrativas, o material vegetal foi caracterizado quanto aos parâmetros físico-químicos (perda por secagem e perda por dessecação) e os extratos em relação ao rendimento através de resíduo seco.

Os resultados referentes a essas análises demonstraram que a extração por percolação, usando solução hidroetanólica a 40 e 70% para folhas e raízes respectivamente, apresentou-se suficientemente adequada quando comparada com as demais técnicas, podendo assim ser utilizada em trabalhos futuros. Também, além de ser um processo que despende pouco tempo, permite uma extração segura e com rendimento satisfatório em termos de resíduo seco (2,88% para folhas e 1,93% para raízes), além da concentração de compostos fenólicos nas preparações extrativas (2.131 e 0.487 em EAG/ml de extrato para folhas e raízes respectivamente). Soma-se a isso, o fato da técnica não empregar o calor.

Tais resultados demonstram que apesar da maceração ser a técnica extrativa mais frequentemente utilizada em laboratórios e em pesquisas da área fitoquímica, existe outros métodos, que com suas vantagens podem se tornar uma opção na rotina experimental para a análise de fitoconstituintes.

Tanto o teor de fenólicos totais como o teor de flavonóides totais encontrados nos extratos de *S. tuberculata* apresentaram-se em maior quantidade nas folhas. Este dado poderia estar relacionado com a relação positiva que existe entre a radiação solar e a produção de compostos fenólicos, principalmente flavonóides. Isso pode ser explicado pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). No caso específico dos flavonóides, estes são acumulados principalmente em tecidos superficiais (tais como epiderme, subepiderme, pêlos, cutícula e material epicuticular) e utilizados pela planta como filtros UV, pois absorvem radiação UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (BIEZA E LOUIS, 2001).

Os resultados, encontrados no presente trabalho, referentes às análises cromatográficas e espectrométricas, ilustram uma pequena parte da diversidade de compostos presentes na espécie *S. tuberculata*. No geral, para as condições usadas em determinação analítica, a classe de compostos com maior representatividade foram os metabólitos pertencentes à classe dos fitoecdisteróides.

Ecdisteróides foram primeiramente descobertos nos artrópodes e são hormônios responsáveis pelo crescimento, metamorfose, embriogênese, diapausa e reprodução destes animais (DINAN et al., 2001a). Em 1996, foram descobertos alguns ecdisteróides em plantas, abrindo-se então um campo para pesquisas destes compostos. Mais de 300 ecdisteróides têm sido isolados de fontes animais e vegetais (LAFONT e DINAN, 2003).

A partir da premissa, da ação hormonal desses compostos, surgiram vários estudos no intuito de avaliar os efeitos desta classe em mamíferos, bem como, em humanos. Um dos ecdisteróides considerado mais comum nas plantas também foi encontrado no presente trabalho, trata-se da 20-hidroxicdisona (20E) (DINAN et al., 2001a). Alguns dos efeitos já descritos e investigados para esse composto são descritos na Tabela 5.

Outro constituinte dos extratos de *S. tuberculata* proposto neste estudo foi o flavonóide canferol-3-*O*- β -D-(6''-E-p-coumaroil)-glicopiranosídeo (tilirosídeo). Esse composto já tem sido descrito para espécies de *Sida* (Silva et al., 2006; Cavalcante et al., 2010). Alguns estudos têm trabalhado com esse composto isoladamente, detectando seus mais variados efeitos. De acordo com Sala et al. (2003) o tilirosídeo demonstrou um significativo efeito contra a ação enzimática e não-enzimática da peroxidação lipídica, com atividade *scavenger* do radical DPPH nos valores entre 12-28 μ M, juntamente com uma atividade anti-inflamatória em edema de pata em camundongos. Outra atividade demonstrada por esse flavonóide é a ação hepatoprotetora descrita por Matsuda et al. (2002). Também, de acordo com Goto et al. (2011), o tilirosídeo apresentou uma redução na obesidade induzida por desordens metabólicas através da ativação da sinalização de adiponectina, seguido de aumento da oxidação dos ácidos graxos no fígado e no músculo esquelético de ratos obesos-diabéticos. Um outro estudo desenvolvido por pesquisadores no Brasil postulou que o tilirosídeo possui um efeito relaxante sobre íleo de cobaias através do bloqueio dos canais de Ca^{+} , impedindo seu influxo para a célula (Costa et al., 2007).

Outro resultado obtido neste trabalho foi a proposição de um componente fenilamida, a *N*-feruloiltiramina. Esse composto, segundo as análises deste trabalho, foi encontrado somente nas raízes dos extratos de *S. tuberculata*. De acordo com Bassard et al. (2010) esses compostos estão presentes em vários tipos de tecidos das plantas, incluindo raízes (HAGEL &

FACCHINI, 2005), podendo ser associados com o crescimento de determinados órgãos e tecidos meristemáticos.

Tabela 5 – Atividades biológicas associadas ao ecdisteróide 20-hidroxiecdisona, em mamíferos.

Área biológica	Efeito	Referência
Diferenciação e proliferação celular	20E pode induzir a diferenciação osteogênica em células tronco do ligamento peritoneal	Jian et al., 2012
	20E (100µg/ml) promove a diferenciação <i>in vitro</i> de queratinócitos	Detmar et al., 1994
Reprodução e desenvolvimento	Dieta de 20E (5-10mg/kg) aumenta a função sexual em ratos	Mirzaev e Syrov, 1992; Mirzaev et al., 2000
Metabolismo de proteína	20E estimula a síntese protéica em órgãos de camundongos	Todorov et al., 2000
Metabolismo de Carboidratos	Administração diária de 20E (5mg/kg) reduz a hiperglicemia induzida por aloxano em ratos	Syrov et al., 1997
Metabolismo de Lipídeos	Dieta de 20E (0,1mg/kg/dia) por 30 dias previne a peroxidação lipídica por radicais livres em membranas de tecidos de ratos deficientes de Vitamina D	Kuzmenko et al., 1997
	20E <i>in vitro</i> previne a peroxidação lipídica em micelas de lipossomos	Kuzmenko et al., 2001
Sistema nervosa	20E exerce função neuromoduladora em receptor GABA _A em neurônios corticais de ratos	Okada et al. , 1998
	20E tem efeito protetor em amnesia induzida por diazepam e álcool	Xu et al. , 1999

Fonte: Autor, 2012

Alguns estudos já demonstraram que fenilamidas são compostos bioativos. Por exemplo, N-feruloiltiramina foi isolada como o componente mais ativo do *Allium sativum*, suprimindo a expressão de P-selectina (PARK, 2009). Portanto, acredita-se que desempenhem um papel importante com efeito positivo do *A. sativum* sobre o sistema cardiovascular através

da inibição de ativação plaquetária. *N*-trans-feruloiltiramina também foi descrita como antitumoral, antimicobacteriana, como inibidora da melanogênese em células de melanoma de rato e inibidores da ciclo-oxigenase (PARK, 2007; PARK & SCHOENE, 2002; MATA et al., 2004; EFDI et al., 2007).

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antifúngica dizem respeito somente aos extratos aquosos de *S. tuberculata*. Tal opção se deve ao fato de ser uma preparação mais comum de uso popular desta planta. Além do que, a presença do etanol nos extratos hidroetanólicos poderia levar a resultados artefatos pela sua conhecida ação antimicrobiana.

Dessa forma, os dados obtidos do *screening* da atividade antifúngica frente a onze linhagens de fungos patogênicos revelaram que os extratos aquosos de *S. tuberculata* são ativos para *Candida krusei*. Segundo Hager et al. (2010) *C. krusei* é um fungo patógeno emergente, frequentemente encontrado em pacientes imunocomprometidos. Possui resistência intrínseca para fluconazol e diminuição da susceptibilidade para outros agentes antifúngicos. Cabe destacar que infecções por *C. krusei* tipicamente surgem em pacientes neutropênicos ou transplantados de medula que recebem tratamento profilático com fluconazol (WINGARD et al., 1991)

Os dados encontrados para CIM no presente estudo demonstram uma pronunciada atividade para os extratos obtidos das raízes. Os valores verificados para CIM das raízes variaram de 1,95 a 31,25 µg/ml. Sendo a *N*-feruloiltiramina um dos componentes encontrados nas raízes do extrato aquoso de *S. tuberculata*, uma atividade antifúngica poderia ser esperada. De acordo com Mata et al. (2004) esse composto isolado demonstrou uma CIM com valor de 32 µg/ml contra *Mycobacterium tuberculosis*. Nesse mesmo estudo, o composto não mostrou citotoxicidade na concentração da CIM. Entretanto, no presente trabalho não se pode sugerir que a ação contra *C. krusei* seja somente pela presença de *N*-feruloiltiramina. Assim, estabelecem-se expectativas para estudos futuros na avaliação dos mecanismos de ação de compostos isolados.

Estudos para determinação da CIM com extratos de *S. tuberculata* são inéditos na literatura. O óleo essencial de *S. cordifolia* demonstrou uma CIM a partir da diluição de 8% frente a *C. krusei* (NUNES et al., 2006). Outro estudo realizado por Karou et al. (2012) não encontrou atividade antifúngica nos extratos de *S. alba*, somente efeito antibacteriano. Demais estudos foram conduzidos contra linhagens bacterianas. Extratos das folhas e galhos de *S. alba* tiveram seu potencial antimicrobiano avaliado contra cepas bacterianas e mostrou uma CIM entre 25 e 100 µg/ml (KONATÉ, K. et al, 2012). Frações metanólicas das folhas de *S.*

rhombofolia também apresentaram uma CIM de 100 µg/ml frente a cepas *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (SARANGI et al., 2010).

Outro objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de remoção do biofilme de *C. krusei*, CK66A, em superfície de cateter venoso central. Pelos resultados obtidos constatou-se que os extratos aquosos das folhas, a 500 µg/mL, apresentaram um resultado eficiente em 60 minutos, com redução de 7 para 5,6 log.CFU cm⁻², e com capacidade de remover totalmente a colônia fúngica após 90 minutos. Vale destacar que esta metodologia é inédita para *S. tuberculata*. De acordo com Pinheiro (2006) os biofilmes são formados por polissacarídeos que se apresentam tanto como fibras finas que conectam as células às superfícies ou como placas de material amorfo sobre a superfície. A matriz do biofilme age como um filtro, que retém minerais ou outros componentes séricos produzidos pelo hospedeiro. Essa ação o torna firmemente aderido à superfície e altamente resistente ao tratamento antimicrobiano.

Destaca-se que no presente estudo, tanto folhas como raízes, demonstraram uma boa atividade frente às linhagens de *C. krusei* avaliadas. A presença de compostos da classe de ecdisteróides também pode ser um dos motivos responsáveis pela ação antifúngica. Existem poucos estudos em relação a atividade antimicrobiana de ecdisteróides, entretanto, Ahamad et al. (1996) reportou uma atividade antifúngica e antibacteriana de 20E entre 100 e 400 µg/ml. Este mesmo composto, também demonstrou ação contra *C. albicans* em concentração de 500 µg/ml (MAMADALIEVA et al.2012).

Além dos dados apresentados anteriormente e discutidos acima, o estudo com *S. tuberculata* desenvolveu análises da atividade antioxidante *in vitro*. Até o momento, foram desenvolvidos quatro protocolos, referentes ao potencial *scavenger* do radical *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH), óxido nítrico, inibição do radical hidroxil mediado pela degradação 2-deoxi-D-ribose e proteção contra peroxidação lipídica mediado pelo ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados obtidos para estas metodologias têm demonstrado uma pronunciada ação antioxidante de ambos os extratos, aquosos e hidroetanólicos (dados não mostrados). Contudo, estes dados, ainda em fase de complementação prática, servirão de embasamento para publicações futuras aliadas a ensaios *in vivo*.

Conseqüentemente, no que se refere aos dados aqui apresentados, pode se concluir que os extratos de *S. tuberculata* apresentam uma diversidade de fitoconstituintes. Os quais também revelaram uma significativa ação anti-*C. krusei*, com um excelente potencial de remoção de biofilme. No entanto, pesquisas futuras são necessárias para acréscimo de fitoconstituintes elucidados estruturalmente, bem como para investigar possíveis mecanismos de ação envolvidos.

CONCLUSÕES

- ✓ Pela caracterização de secagem do material vegetal utilizado no estudo da espécie *S. tuberculata*, a presença de água e compostos voláteis é superior nas folhas em relação às raízes;
- ✓ A extração por percolação, em uso de solventes hidroetanólicos a 40 e 70%, mostraram-se adequados e vantajosos em relação às demais técnicas de refluxo e maceração testadas;
- ✓ O teor de fenólicos totais apresenta maior concentração nos extratos de folhas, em comparação com os extratos obtidos de raízes;
- ✓ As análises cromatográficas por CLAE-UV e por LC-ESI-MS permitiram a proposição de cinco compostos, sendo três ecdisteróides, um flavonóide e um alcaloide, identificados como 20-hidroxiecdisona, 20-hidroxiecdisona-glicopiranosídeo, canferol- 3 - (E-p-coumaroil) glicopiranosídeo, N-ferolultiramina, respectivamente;
- ✓ A avaliação da atividade antifúngica, pelo método de Microdiluição, revelou uma promissora ação dos extratos aquosos frente a cepas de *C. krusei*;
- ✓ Os valores de CIM obtidos demonstraram um efeito fungistático significativo em baixas concentrações tanto para os extratos das folhas quanto para o das raízes de *S. tuberculata*;
- ✓ Os extratos aquosos obtidos das folhas revelaram uma capacidade de remoção de biofilme de *C. krusei* CK66A.

PERSPECTIVAS

- ✓ Obter extrações mais seletivas, e buscar análises espectrométricas em RMN para um maior embasamento fitoquímico;
- ✓ Estudar o isolamento dos fitoconstituintes majoritários;
- ✓ Investigar o potencial antifúngico a partir da análise de extratos semi-purificados e purificados;
- ✓ Identificar possíveis mecanismos de ação envolvidos com a atividade antifúngica dos extratos em estudo;
- ✓ Aplicar os extratos brutos e purificados em estudos farmacológicos *in vivo*;
- ✓ Investigar a toxicidade dos extratos e seus constituintes majoritários.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, V.U. et al. An antimicrobial ecdysone from *Asparagus dumosus*. *Fitoterapia* LXVII(1): 88-91. 1996.
- ANDES, D. et al. Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. *Infection and Immunity*, Vol. 72, No. 10. p. 6023–6031. Oct. 2004
- ASSAM, Assam J. P. et al. In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10:40. 2010,
- BANZOUZI, J. T. et al. Studies on medicinal plants of Ivory Coast: Investigation of *Sida acuta* for in vitro antiplasmodial activities and identification of an active constituent. *Phytomedicine*, 11: 338–341, 2004
- BARACHO, G. S. Taxonomia do gênero *Sida* L. seção *cordifoliae* (DC.) Fryxell (Malvaceae) no Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 1998.
- BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidiasis. Review. *DST - J bras Doenças Sex Transm*: 22(1): 22-38. 2010
- BARROSO, G. M. et al. Sistemática de Angiospermas no Brasil 2. Imprensa Universitária, 1991
- BASSARD, J.E. et al. Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*. 71:1808–1824. (2010)
- BEDIN, M. et al. Urinary oligosaccharides: a peripheral marker for *Sida carpinifolia* exposure or poisoning. *Toxicon*. 53 (5):591-4. 2009
- BELTRÁN-DEBÓN, R. et al. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine* 17: 186-191. 2010.
- BIEZA K, LOIS R. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiol.** 126 (3) : 1105-15. 2001
- BONJARDIM, L. R. et al. *Sida cordifolia* Leaf Extract Reduces the Orofacial Nociceptive Response in Mice. *Phytotherapy Research*. 25: 1236–1241 (2011)
- BORTOLUZZI, M. et al. Estudo fitoquímico de *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) e aspectos anatômicos da raiz. *Lecta-USF* 12: 81–97. 1994.
- BOVINI, M.G. et al. Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 52(81): 17-47. 2001
- BUGRÉS, Keile; REZA, Maria Teresa R. Evaluacion preliminar de Toxicidad, Genotoxicidad

y Atividade Antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. Revista Colombiana de Biotecnologia. July año/vol. IX número 001. Bogotá, 2008

CABRERA, G.M. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides. In Phytochemistry: Advances in Research. Imperato F. (Ed.). Trivandrum: Research Signpost; 1-22. 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicine (phytoterapeutic agents). Braz. J. Med. Biol. Res., v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, L. S.; PITELLI, R. A. Levantamento e análise fitossociológica das principais espécies de plantas daninhas de pastagens da região de Selvíria (MS). Plant. Daninha, v. 10, n 1,2, p. 25-32, 1992.

CAVALCANTE, J.M.S. et al. Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* (L.) Fryxell and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities. Quim Nova 33: 846-849. 2010

CAVALEIRO, C. et al. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. J Appl Microbiol 100: 1333-1338. 2006.

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant capacity, and Quinone reductase activity of aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) teas. Journal Agricultural and Food Chemistry. 52, 3583-3589. 2004

CHANG, C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal. 10: 178-182. 2002.

CHATTOPADHYAY, D. et al. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. J. Ethnopharmacology. 177: 49-55. 2001.

CHONG, P.P. et al. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with nonpregnant status. Infect Genet Evo. 17:449-456. 2007.

CHAVES, G.M., et al. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. Braz J Microbiol; 34: 197-202. 2003

CLEFF, M.B. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. Tese de Doutorado (Área – Ciências Veterinárias). UFRGS. Porto Alegre, 2008

COSTA, D.A. et al. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-o- β -d-(6''-e-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. Quim. Nova, Vol. 30, No. 4, 901-903, 2007

COSTA, G.M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolics compounds from leaves of *Cecropia* species. Journal Brazilian Chemistry Society. Vol. 22, No. 6, 1096-1102. 2011.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582. 1999.

CRUMP, J. & ACOLLIGNON, P.J. Intravascular catheter-associated infections *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 19 p. p. 1–8, (2000)

CUYCKENS F, CLAEYS M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39: 1-15. 2004.

DA SILVA, A.C.O. et al. An approach to chemotaxonomy to the fatty acid content of some Malvaceae species. *Biochem System Ecol.* 38: 1035-1038. 2010.

DE SOUZA, K.C.B. et al. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis.* 28: 771-777. 2002

DHALWAL, Kamlesh; DESHPANDE, Yogesh S.; PUROHIT, Ajit P. Evaluation of In Vitro Antioxidant Activity of *Sida rhombifolia* (L.) Ssp. *retusa* (L.). *Journal of Medicinal Food.* 10 (4), 683–688. 2007

DARWISH, F. M. & REINECKE, M.G. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. *Phytochemistry.* 62, 1179–1184. (2003)

DAS, N. et al. A new flavonol glucoside from the aerial parts of *Sida glutinosa*. *J Asian Nat Prod Res.* 13 (10):965-71. 2011

DETMAR, M. et al. Effects of ecdysterone on the differentiation of normal human keratinocytes in vitro. *European Journal of Dermatology* 4: 558-562. 1994

DINAN L. et al. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry*; 57(3): 3346–3351. 2001b

DINAN, L. et al. Phytoecdysteroid Profiles in Seeds of *Sida* spp. (Malvaceae). *Phytochemical Analysis.* 12, 110–119. 2001a

DONG, S.W. et al. Chemical constituents isolated from *Saruma henryi*. *J Chin Pharm Sci.* 18: 146-150. 2009.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology.* Volume 11, Issue 1, Pages 30–36. January 2003

ECHOU, A. J. et al. Traditional medicine and pharmacopoeia. Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. Organisation of African Unity Scientific and Research Commission. Centre national de production de manuels scolaire Benin Porto-novo 1 996.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5^a ed. volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. pag. 91 e 207.

- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 42, n. 3, jul./set., 2006
- FRANCO, C.I.F. et al. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sida cordifolia* L. leaves. *J Ethnopharmacol*. 198: 275-279. 2005.
- FRANZOTTI, E.M. et al. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *Journal of Ethnopharmacology*. V 72, p 273–278, 2000.
- GHOSAL, S. et al. Alkaloids of *Sida cordifolia*. *Phytother. Chem*. v 14, p 830-2, 1975
- GHOSAL, S. et al. Alkaloidal constituents of *Sida acuta*, *S. humilis*, *S. rhombifolia* and *S. spinosa*. *Phytochemistry* 43: 384-388. 1981.
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOLDMANN, D.A. & PIER, G.B. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6 pp. 176–192. (1993),
- GOMES, R.A. et al. Estudo fitoquímico de *Sida* sp. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2008.
- GOTO, T. et al. Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 23 :768–776. (2012)
- GROSA, G. et al. LC–ESI-MS/MS characterization of strophanthin-K. *J Pharm Biomed Anal*. 38: 79-86. 2005.
- GUNATILAKA, A.A.L. et al. Studies on medicinal plants of Sri Lanka. *Planta Med*. v 39, p 66 -72, 1980
- HAGEL, J.M. & FACCHINI, P.J. Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves. *Planta* 221, 904–914. 2005
- HAGER, J.L. et al. *Candida krusei* fungemia in an immunocompromised patient. *Dermatology Online Journal* 16 (4): 5 April 2010
- HEYDER, C. D. T.; SILVA, D. A. K. .Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 5, n. 2, dez. 04
- HEYWOOD, V. H. *Flowering Plants on the World*, Ed. B. T. Batsford Ltda., London, 1993
- IKEDA, I.; SUGANO, M. Inhibition of cholesterol absorption by plant sterols for mass intervention. *Curr Opin Lipidol*. 9: 527-531. 1998.

ISLAM, Ekramu M.; HAQUE, Ekramul M.; MOSADDIK, M. A. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of *Sida rhombifolia* (Malvaceae) Grown in Bangladesh. *Phytotherapy Research*. 17, 973–975 (2003)

JADHAV, A. N. et al. Ecdysteroid Glycosides from *Sida rhombifolia* L. *Chemistry e Biodiversity*–Vol. 4 (2007)

JANG, D.S. et al. Compounds obtained from *sida acuta* with the potential to induce quinone reductase and to inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced preneoplastic lesions in a mouse mammary organ culture model. *Arch Pharm Res*. 26(8):585-90. 2003

KAROU, S.D. et al. Screening Togolese medicinal plants for few pharmacological properties. *Pharmacognosy Res*. 4(2):116-22. 2012

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. 2.ed. São Paulo: BASF Brasileira, v. 3. p. 159-162. 2000

KHATOON, S. et al. HPTLC Method for chemical standardization of *Sida* species and estimation of the alkaloid Ephedrine. *Journal of Planar Chromatography*. Vol. 18. 2005

KONATÉ, K. et al. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against cotrimoxazol- resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11:5. 2012

KONATÉ, K. & SOUZA, A. Polyphenol Contents, Antioxidant and Anti- Inflammatory Activities of Six Malvaceae Species Traditionally used to treat Hepatitis B in Burkina Faso. *Eur J Sci Res*, 44:570–580. 2010

KUMPUN, S. et al. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chem*.125: 1226-1234. 2011.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol.*, v. 125, p. 58-60, 2001.

KUZMENKO, A.I. et al. Effects of vitamin D3 and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation. *Biochemistry (Moscow)* 62(6): 609-612. 1997

KUZMENKO, A.I. et al. New functions of 20- hydroxyecdysone in lipid peroxidation. *Journal of Oleo Science* 50: 497-506. 2001

LACAZ, C. S. et al. *Guia para identificação- fungos, actinomicetos, algas de interesse médico*. São Paulo. Sarvier, 2002.

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *Journal of Insect Science*, 3:7. 2003. Available online: insectscience.org/3.7

LIANDA, R.L.P. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por Cromatografia Líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. Tese de Doutorado (Doutorado em Química). UFRJ. Seropédica, Rio de Janeiro, 2009.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS. p. 483-501.2001

LI, Y. et al. Profiling of ecdysteroids in complex biological samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20: 185-192. 2006.

MABBERLEY, D.J. *The Plant Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants* (2nd Edn.). Cambridge University Press: Cambridge; 858p. 1997.

MACHADO, T.D. et al. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Braz Chem Soc.* 13: 606-610. 2002.

MACIEL, M. A. et al. Plantas Medicinais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. *Quím. Nova.* 25(3), p 429-438. 2002

MAMADALIEVA, Nilufar Z. et al. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. *Phytopharmacology*, 4(1), 1-18. 2012

MAKI, D.G. & TAMBYAH, P.A. Engineering out the risk of infection with urinary catheters *Emerg. Infect. Dis.* 7, pp. 1-6. (2001)

MATA, Rachel. et al. Antimycobacterial Compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural products.* Vol. 67, N. 12. Dec. 2004

MATLAWSKA, I. Investigation of flavonoid compounds from the selected species of Malvaceae family (flowers and leaves). *Herba Pol* 36: 65-69. 1990.

MATSUDA, H. et al. Hepatoprotective Principles from the Flowers of *Tilia argentea* (Linden): Structure Requirements of Tiliroside and Mechanisms of Action. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry.*** 10:707-712.(2002)

MOURA, W.R.A. Ensaio farmacológico das atividades antiinflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, *Harms* e *Sida santaremnensis*. Tese (doutorado) – Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí, 2010.

MILLES, A.A.; MISRA, S.S. Estimation of the bactericide power of the bloods. *J Hyg* 38: 732-749. 1938.

MIRZAEV, Y.U.R.; SYROV, V.N. Effect of phytoecdysteroids on the sexual activity of male rats. *Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistana.* (3) 47-49.1992

MIRZAEV, Y.U.R. et al. Study of the effects of ecdysten on the sexual function under experimental and clinical conditions. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya.* 63: 35-37.2000

NAGLIK, J.R., et al. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol R;* 67(3): 400-428. 2003

- NOUMI, E. ; YOMI, A. Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo region Central province, Cameroon. *Fitoterap*, 3:246-254. 2001
- NUNES, X.P. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.16 (Supl.): 642-644, Dez. 2006
- NURMI, K. et al. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *J Chem Ecol*. 22: 2023-2040. 1996.
- PFALLER, M.A. et al. Global Antifungal Surveillance Group. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol*46: 515-521. . 2008
- ODDS, F.C. *Candida and candidosis*, 2nd edn. London, Bailliere Tindall. 1988. *In*: YUTHIKA H. et al. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Med. Microbiol.* - Vol. 41 (1994), 295-310
- OKADA, M. et al. Enhancement of GABA-mediated inhibition of rat medial vestibular nucleus neurons by the neurosteroid 20- hydroxyecdysone. *Acta Otolaryngologia* 118: 11-16. 1998.
- OLIVEIRA, A.C.P. Desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de Zolpidem em plasma humano utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) / Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) Universidade São Francisco. Bragança Paulista, 2010.
- OLIVEIRA, A.P. Avaliação da atividade gastroprotetora do extrato metanólico e desenvolvimento tecnológico de preparações extrativas das partes aéreas da *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, 2011.
- OLIVEIRA, B.H. et al. HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium litorale*. *Jouranal of Brazilian Chemistry Society*. Vol. 12, No. 2, 243-246, 2001.
- OTERO, R. et al. Snakebites and Ethnobotany in the Nortwest Region of Colômbia. Part III: Neutralization of the Haemorrhagic Effect of *Brothops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, v.37, p. 233-241, 2000
- PARAHITIYAWA, N.B. et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *APMIS* 114: 298-306. 2006
- PARK, J. Caffedymine from cocoa has COX inhibitory activity suppressing the expression of a platelet activation marker, P-selection. *J. Agric. Food. Chem.* 55,2171–2175.2007.
- PARK, J.B. Isolation and characterization of N-feruloyltyramine as the Pselectin expression suppressor from garlic (*Allium sativum*). *J. Agric. Food. Chem.*57, 8868–8872.2009.

PARK, J.B.; SCHOENE, N. Synthesis and characterization of N-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 1104–1110. 2002.

PELLISSARI, G. P. Estudo Farmacognóstico e Avaliação das Atividades Antibacteriana e Imunomoduladora de *Melampodium Divaricatum* (Rich. In Pers.) Dc. (Asteraceae). 2008, 178 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2008.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p. 111-140.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, Cincinnati, v.63, p.1035 -1042. 2000.

PINHEIRO, S. Formação de biofilmes. **Intravenus**. Publicação Especializada em Terapia Intravenosa. ano VI, nº 16. Pag. 2-3. Janeiro – maio de 2006

RANG, H.P; DALE, M.M. Farmacologia. 2ed. Guanabara Koogan, 1993.

RAO, K. S.; MISHRA, S.H.. Anti-inflammatory and Hepatoprotective activities of *Sida Rhombifolia* LINN. *Indian Journal of Pharmacology*. 29: 110-116. 1997

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Oxford, v. 39, p. 603-613, 2001.

REN, Q. et al. Characterization and identification of the chemical constituents from tartarybuckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) by high performance liquidchromatography/photodiode array detector/linear ion trap FTICR hybrid massspectrometry. *Food Chem*, accepted manuscript. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.052>.

RICE-EVANS, C.A. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956. 1996.

RODRÍGUEZ-MEDINA, I.C. et al. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *J Sep Sci*32: 3441-3448. 2009.

RONDÓN, J.B. La subfamilia Malvoideae (Malvaceae s.l.) en el occidente del estado Sucre, Venezuela. *Revista UDO Agrícola*. 9 (3): 599-621. 2009

SALA, A. et al. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*.461:53– 61.(2003)

SAMARANAYAKE, L.P., et al. Comparison of Sabouraud dextrose and Pagano-Levin agar media for detection and isolation of yeasts from oral samples. *J Clin Microbiol*. 25: 162-164.1987

- SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Med. Microbiol.* - Vol. 41, 295-310. (1994),
- SANTOS, M.R.V. et al. Cardiovascular effects on rats induced by the total alkaloid fraction of *Sida cordifolia*. *Biol Geral Exper*5: 5-9. 2005.
- SARANGI, Rashmi Ranjan. et al. Comparative In vitro Antimicrobial Activity Studies of *Sida rhombifolia* Linn Fruit Extracts. *International Journal of PharmTech Research*. Vol.2, No.2, pp 1241-1245, 2010.
- SAWAYA, A.C.H.F. Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. Tese de Doutorado (Área- Química). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP, 2006.
- SHERERTZ, R.J. Pathogenesis of vascular catheter infection. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, 3rd edn, (Waldvogel, F.A., Bisno, A.L. eds), pp. 111–125, ASM Press. (2000)
- SIKORSKA, M.; MATLAWSKA, I. Polyphenolic compounds from *Abutilon grandiflorum* leaves. *Acta Pol Pharm.* 65: 467-471. 2008.
- SILVA, D.A. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (MALVACEAE). *Química Nova.* V. 29, N. 6, 1250-1254, 2006
- SILVA, D.A. et al. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo. *Rev Bras Farmacogn.*15: 23-29. 2005.
- SILVA, P. Princípios farmacológicos da antibioticoterapia. In: SILVA, P. *Farmacologia.* 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.931-948. 1998
- SILVA, S. et al. Biofilms of non- *Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology.*, 47, 681–689. November 2009
- SILVEIRA, A.L. et al. Evaluation of the cardiovascular effects of vasicine, an alkaloid isolated from the leaves of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy.*v 13, n 2, p 37-39, 2003a.
- SOUZA, M. M.; et al. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B. CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.* Itajaí: Univali, 2003.
- STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Versão 4, 2003. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/> Acesso em: 31 de Novembro de 2012.
- STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292: 107-113. 2002.

SUTRADHAR, R. K. et al. Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry Letters*. 1:179–182. 2008

SUTRADHAR, R.K. et al Anti-inflammatory and analgesic alkaloid from *Sida cordifolia* linn. *Pak J Pharm Sci*. 20(3):185-8. 2007

SYROV, V.N. et al. Hypoglycemic action of phytoecdysteroids and some aspects of its mechanism of realization in experimental animals. *Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistana* (4) 46-49. 1997

TALEB-CONTINI, S.H. et al. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Braz J Pharm Sci*. 39: 403-408. 2003.

THOUNAOJAM, Menaka C. et al. Cardioprotective effect of *Sida rhomboidea*. Roxb extract against isoproterenol Induced myocardial necrosis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* (2010),doi:10.1016/j.etp. 2010

THOUNAOJAM, Menaka C. et al. Dysregulation of Lipid and Cholesterol Metabolism in High Fat Diet Fed Hyperlipidemic Rats: Protective effect of *Sida rhomboidea*. Roxb Leaf extract. *Journal of Health Science*.55(3) 413-420. 2009a

THOUNAOJAM, Menaka C. et al. In Vitro Evidence for the Protective role of *Sida rhomboidea*. Roxb Extract Against LDL Oxidation and Oxidized LDL-Induced Apoptosis in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Cardiovasc.Toxicol*. 11:168–179. 2011

THOUNAOJAM, Menaka. C., et al. Potential of *Sida rhomboidea*. roxb Leaf Extract in Controlling Hypertriglyceridemia in Experimental Models. *Pharmacognosy Research*, 1, 208–212. (2009b).

TODOROV, I.N. et al. The influence of ecdysterone on the biosynthesis of proteins and nucleic acids in mouse organs. *Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal* 34: 3-5. 2000.

TOSS, Daniel. Extração de compostos fenólicos de *Butia capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico. Dissertação de Mestrado (área – Engenharia química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res*33: 55-64. 2000.

WANG, Yan-Hong. et al. Structural characterization and identification of Ecdysteroids from *Sida rhombifolia* L. in positive Electrospray ionization by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 22:2413–2422. 2008

WINGARD J. R., et al. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N. Engl. J. Med*. 325:1274-1277. 1991.

XU, N. et al. Protective effect of ecdysterone on amnesia induced by diazepam and alcohol. *Zhongguo Yaolixue Yu Dilixue Zazhi*.13: 119-122. 1999.

YUNES, R.A.; FILHO, V.C. Breve análise histórica da química da Plantas Mediciniais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. *In*: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. *Plantas Mediciniais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-44.

YUSUF, M., KABIR, M. Medicinal Plants of Bangladesh. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research, Dhaka, Bangladesh, p. 226.1999

VENKATESH, S. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sida rhomboidea* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 67, 229–232. (1999)

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 29: 1-16. 2010.

ZACCHINO, S. Estratégias para descobrir novos agentes antifúngicos. *IN*: CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. *Plantas Mediciniais sob a ótica da Moderna Química Medicinal*. (orgs)., 2003, p. 1-13

ZHANG, Y. et al. Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb Jin-Guo-Lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 20: 2328-2342. 2006.

ZUANAZZI, José A. S.; MONTANHA, Jarbas A. in: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2007