



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ANA LAURA DE CABRAL SOBREIRA

Definição do perfil fitoquímico por LC/MS e primeiros metabolitos isolados de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) e atividade antimicrobiana

JOÃO PESSOA - PB
2019

ANA LAURA DE CABRAL SOBREIRA

Definição do perfil fitoquímico por LC/MS e primeiros metabolitos isolados de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) e atividade antimicrobiana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

**JOÃO PESSOA – PB
2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S677d Sobreira, Ana Laura de Cabral.

Definição do perfil fitoquímico por LC/MS e primeiros
metabolitos isolados de *Sida planicaulis* Cav.
(Malvaceae) e atividade antimicrobiana / Ana Laura de
Cabral Sobreira. - João Pessoa, 2019.
119 f.

Orientação: Maria de Fátima Vanderlei de Souza.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Sida planicaulis*; Fitoquímica; FIA-ESI-IT-MS; Antimic.
I. de Souza, Maria de Fátima Vanderlei. II. Título.

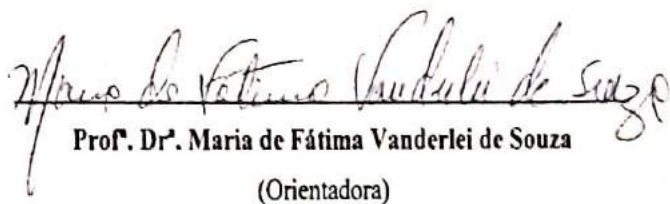
UFPB/BC

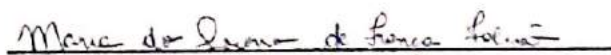
ANA LAURA DE CABRAL SOBREIRA

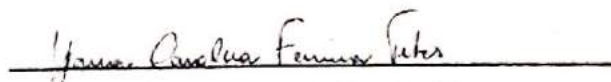
Definição do perfil fitoquímico por LC/MS e primeiros metabolitos isolados de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) e atividade antimicrobiana

Aprovada em: 22 / 03 / 2019

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Maria de Fátima Vanderlei de Souza
(Orientadora)


Dr. Maria do Socorro de França Falcão
(Examinador interno)


Dr. Yanna Carolina Ferreira Teles
(Examinador externo)

JOÃO PESSOA - PB
2019

*Dedico toda essa jornada a minha
mãe, Joana, meu pai, Geraldo, minha irmã,
Analídyá, que são os maiores responsáveis por
essa vitória, minha avó, Geralda (in
memoriam) por cada sorriso de luz, a Deus, e
a toda minha família e amigos que torceram
por mim ao longo dessa trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me fortalecido nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais, **Joana Dias Cabral Sobreira e Geraldo Sobreira de Lima**, pela confiança depositada em mim e pelo apoio incondicional mesmo frente às dificuldades.

A minha irmã, **Analídy de Cabral Sobreira**, que é o meu porto seguro e que sem ela com certeza a caminhada até aqui teria sido mais árdua.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: **Diegina Fernandes, Edileuza Bezerra, Janderson, Maria Denise, Micaelly Oliveira, Sallet Rocha e Fernando** que sempre me ajudaram nos momentos difíceis.

Aos meus amigos que conheci por meio do mestrado: **Pedro, Laisa, Anderson, Edvaldo, Luis André, Lucas, Bruno, Danillo, Luis Agra, Lyvia, Fiana, Jessyca, Hidna, Renata, Rafael, Geovana** pelas conversas de corredor, pelos estudos nos laboratórios, pelas risadas em meio a tanta coisa séria.

Aos meus amigos: **Jordy, Alaine, Layane, Guilherme, Jefferson, Paula** que mesmo distantes desta realidade sempre foram ouvintes e sempre me aconselharam a seguir nesse caminho e lutar pelos meus sonhos.

À **Thamires** por ter me apoiado, incentivado, tido paciência e fé em mim nos momentos que eu tava cansada, desanimada.

À minha psicóloga, **Socorro**, por ter me ajudado a deixar essa jornada menos complicada.

Ao meu querido amigo **Egberto Santos**, pelo acompanhamento desde a graduação com sua atenção, incentivo e amizade, sempre me estimulando a persistir nos meus sonhos.

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Vanderlei de Souza**, pela confiança depositada em mim e por ter se mostrado sempre solícito quando precisei. Pelos conhecimentos compartilhados e pelos “puxões” de orelha quando necessário.

À minha especial professora **Dr.^a Danielly Albuquerque da Costa**, por sempre apoiar, acreditar e se mostrar tão atenciosa e cuidadosa com todo esse meu caminho até aqui.

À **Prof.^a Dr.^a Edeltrudes** por sua contribuição na parte biológica deste trabalho e pela paciência em me passar um pouco dos seus conhecimentos.

À **Prof. Dr. Carlos Alberto Garcia Santos** por sua contribuição na identificação botânica da espécie estudada.

À **Dr^a. Maria do Socorro de França Falcão e Dr^a. Yanna Carolina Ferreira Teles** pela disponibilidade em avaliar o trabalho e pelas contribuições com o mesmo.

Aos demais professores desta pós-graduação pelos ensinamentos transmitidos.

A todas aquelas pessoas que me fizeram perceber que o caminho não é simples, que me deixaram triste, me dando a oportunidade de aprender com meus erros e com os seus erros.

Aos funcionários deste programa: **Glória, Raimundo Nonato, Carol Manguiera, Marcelo Ricardo, Evandro Ferreira, Seu Ivan**, e toda a equipe da limpeza (Rose, Lúcia, Seu Mané), que de forma direta ou indireta, me ajudaram nessa trajetória.

À CAPES por ter financiado a pesquisa.

E por fim, aos que mesmo distantes torcem pelo meu sucesso.

**A Todos Vocês,
Meu muito obrigada.**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Lhuter King

RESUMO

SOBREIRA, Ana Laura de Cabral. **Definição do perfil fitoquímico por LC/MS e primeiros metabolitos isolados de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) e atividade antimicrobiana.** 119 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

Considera-se que a utilização milenar das plantas medicinais com a finalidade de curar as enfermidades da humanidade, proporcionou um vasto conhecimento sobre as ações terapêuticas e a toxicidade de determinadas espécies. Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente. Buscando contribuir para esse enriquecimento científico, o presente estudo realizou um trabalho fitoquímico pioneiro da *Sida planicaulis* Cav., visando à descoberta de seus constituintes químicos e ação antimicrobiana, e assim colaborar com o enriquecimento quimiotaxônomico da família Malvaceae. Para atingir estes objetivos fez-se uso de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN), uni e bidimensionais, e Espectrometria de Massas. Com a metodologia utilizada foi possível isolar uma cumarina (Esculetina) e um alcaloide (Sal da criptolepina), e identificar por FIA-ESI-IT-MS oito metabólitos secundários, entre eles ácidos fenólicos e flavonoides glicosilados, por exemplo: tilirosídeo, rutina e astragalina. Entre as amostras que foram testadas sua atividade antimicrobiana, o sal da criptolepina foi o que apresentou uma CIM mais promissora frente as cepas *Candida albicans* LM-38, *Escherichia coli* LM-35, *Cryptococcus gatti* IHCQS-40113, *Cryptococcus neoformans* LM-49 e *Candida albicans* ATCC-60193, tendo uma atividade farmacológica considerada ótima a moderada, podendo assim ser alvo de futuros testes microbiológicos.

Palavras-chave: *Sida planicaulis*; Fitoquímica; FIA-ESI-IT-MS; Antimicrobiano.

ABSTRACT

SOBREIRA, Ana Laura de Cabral. **Definition of the phytochemical profile by LC/MS and the first metabolites isolated from *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) and antimicrobial activity.** 119 p. Master's Thesis (Graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive) – Center of Health Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2018.

It is considered that the millennial use of medicinal plants for the purpose of curing the diseases of mankind, has provided a vast knowledge on the therapeutic actions and the toxicity of certain species. In spite of the richness of the Brazilian flora, in the last 20 years, the number of information on medicinal plants has grown only 8% annually. Aiming to contribute with that scientific enrichment, the present study carried out a pioneering phytochemical work of *Sida planicaulis* Cav., aiming at the discovery its chemical constituents and antimicrobial action, and thus collaborate with the chemotaxonomic enrichment of the Malvaceae family. In order to reach these objectives, we used chromatographic and spectroscopic techniques, using Nuclear Magnetic Resonance (NMR), uni and bidimensional, and Mass Spectrometry. With the methodology used it was possible to isolate a coumarin (Esculetin) and an alkaloid (Salt of cryptolepin) and to identify by FIA-ESI-IT-MS eight secondary metabolites, among them phenolic acids and glycosylated flavonoids, for example: tiliroside, rutin and astragalin. Among the samples that tested its antimicrobial activity, the salt of cryptolepin was the most promising MIC against *Candida albicans* LM-38, *Escherichia coli* LM-35, *Cryptococcus gatti* IHCQS-40113, *Cryptococcus neoformans* LM-49 and *Candida albicans* ATCC-60193, having a pharmacological activity considered to be optimum to moderate, and may therefore be the target of future microbiological tests.

Keywords: *Sida planicaulis*; Phytochemical; FIA-ESI-IT-MS; Antimicrobial.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APG: Angiosperma Phylogeny Group

APT: Attached Proton Test

ASD: Agar Sabouraud Dextrose

ATCC: American Type Culture Collection

BB: Broad Band

BHI: Brain Heart Infusion

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CD₃OD: Metanol deuterado

CIM: Concentração inibitória mínima

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido deuterado

d: Dubleto

dd: Duplo dubleto

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EM: Espectrometria de massas

EtOH: Etanol

FeCl₃: Cloreto férrico

FIA-ESI-IT-MS: Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra).

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Spectroscopy

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy

Hz: Hertz

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

J: Constante de acoplamento

LM: Laboratório de Micologia

LMCA: Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise

m: *meta*

m: Multiplete

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

MS: Mass Spectrometry

[M-H]⁻: Molécula desprotonada

m/z: Relação Massa/Carga

OMS: Organização Mundial de Saúde

o: *orto*

p: *para*

ppm: Partes por Milhão

t: Tripleto

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

RP18: Reverse phase C18 (Fase reversa C18)

s: Singleto

SPE: Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)

δ: Deslocamento químico em ppm

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção do EEB de <i>Sida planicaulis</i> .	46
Esquema 2. Cromatografia líquido-líquido das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i> .	47
Esquema 3. Filtração à vácuo da fase clorofórmica obtida do EEB das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i> .	48
Esquema 4. Fracionamento cromatográfico das frações 1/10 e 4/9 da fase clorofórmica do EEB das partes aéreas de <i>S. planicaulis</i> .	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação filogenética das Angiospermas.	26
Figura 2. Distribuição geográfica da família Malvaceae no mundo.	27
Figura 3. Distribuição geográfica do gênero <i>Sida</i> no mundo.	30
Figura 4. <i>Sida planicaulis</i> Cav.	38
Figura 5. Local da coleta de <i>Sida planicalis</i> Cav.	44
Figura 6. Comparação do EEB antes e após a SPE C18.	51
Figura 7. Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de <i>Sp-1</i> .	60
Figura 8. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de <i>Sp-1</i> .	60
Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 MHz) de <i>Sp-1</i> .	61
Figura 10. Espectro de HMBC RMN ^1H E ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de <i>Sp-1</i> .	61
Figura 11. Expansão do Espectro de HMBC RMN ^1H E ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de <i>Sp-1</i>	62
Figura 12. Estrutura do Sal da Criptolepina e da Criptolepina.	63
Figura 13. Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de <i>Sp-2</i> .	66
Figura 14. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de <i>Sp-2</i> .	66
Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 100 MHz) de <i>Sp-2</i> .	67
Figura 16. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 100 MHz) de <i>Sp-2</i> .	67
Figura 17. Espectro de HMQC RMN ^1H E ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de <i>Sp-2</i> .	68
Figura 18. Expansão do espectro HMQC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) <i>Sp-2</i> .	68
Figura 19. Espectro de HMBC RMN ^1H E ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de <i>Sp-2</i> .	69
Figura 20. Expansão 1 do espectro HMBC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) <i>Sp-2</i>	69
Figura 21. Expansão 2 do espectro HMBC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) <i>Sp-2</i> .	70
Figura 22. Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS do EEB de <i>S. planicaulis</i> analisado em modo negativo.	71
Figura 23. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursorde m/z 193 em modo negativo com fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$.	73
Figura 24. Fragmentação proposta para o íon m/z 193 com fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	74
Figura 25. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447 em modo negativo com fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$.	75
Figura 26. Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447 em modo negativo com fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$.	75

Figura 27. Fragmentação proposta para o íon m/z 447 com fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_{11}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	76
Figura 28. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 593 em modo negativo com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{15}$.	77
Figura 29. Fragmentação proposta para o íon m/z 593 com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{15}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	78
Figura 30. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 609 em modo negativo com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{16}$.	79
Figura 31. Fragmentação proposta para o íon m/z 609 com fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	80
Figura 32. Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS da F. HA de <i>S. planicaulis</i> analisado em modo negativo.	81
Figura 33. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 337 em modo negativo com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_8$.	83
Figura 34. Fragmentação proposta para o íon m/z 337 com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_8$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	84
Figura 35. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 353 em modo negativo com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$.	85
Figura 36. Fragmentação proposta para o íon m/z 353 com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	86
Figura 37. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 493 em modo negativo com fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{13}$.	85
Figura 38. Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 493 em modo negativo com fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{13}$.	88
Figura 39. Fragmentação proposta para o íon m/z 493 com fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{13}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	88
Figura 40. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 593 em modo negativo com fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{13}$.	89
Figura 41. Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 593 em modo negativo com fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{13}$.	90
Figura 42. Fragmentação proposta para o íon m/z 593 com fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{13}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Alguns constituintes químicos isolados do gênero <i>Sida</i> e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas relatadas na literatura.	32
Quadro 2. Alguns constituintes químicos isolados do gênero <i>Sida</i> citados no Quadro 1.	35
Quadro 3. Frações obtidas e reunidas após fracionamento cromatográfico da fração 1/10 da fração CHCl ₃ :MeOH 95:05.	50
Quadro 4. Frações obtidas e reunidas após fracionamento cromatográfico da fração 4/9 da fração 1/10 oriunda da fração CHCl ₃ :MeOH 95:05.	50
Quadro 5. Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	56
Quadro 6. Compostos químicos identificados por FIA-ESI-IT-MS no EEB e nas fases de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	71
Quadro 7. Substâncias identificadas do EEB das partes aéreas de <i>S. planicaulis</i> por ESI-IT-MS ⁿ .	72
Quadro 8. Substâncias identificadas na F. HA do EEB de <i>Sida planicaulis</i> por FIA-ESI-IT-MS.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos sensíveis a espécies do gênero <i>Sida</i> .	41
Tabela 2. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Sp-1</i> (δ , 400 e 100 MHz) com os modelos da literatura <i>Mo-1</i> (δ , DMSO- $\text{d}_6\text{:H}_2\text{O}$ 2:1) (GRIFFITI e MOSTAFA, 1992).	56
Tabela 3. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Sp-2</i> (δ , 400 e 100 MHz) com os modelos da literatura <i>Mo-1</i> (δ , DMSO, 500 e 125 MHz) (TOUSEK et al., 2008) e <i>Mo-2</i> (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) (CHAVES et al., 2017).	65
Tabela 4. Substâncias com identificação sugerida pela análise dos espectros do EEB e das fases de <i>Sida planicaulis</i> Cav. obtidas pela técnica ESI-IT-MS.	93
Tabela 5. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ($\mu\text{g/mL}$) do EEB, das fases e de substância isolada contra cepas bacterianas e fúngicas.	95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
3.1. Considerações gerais sobre a família Malvaceae	26
3.2. Considerações quimiotaxonômicos da família Malvaceae	28
3.3. Considerações gerais do gênero <i>Sida</i>	30
3.4. Considerações gerais sobre espécie <i>Sida planicaulis</i>	37
3.5. Considerações gerais sobre Espectrometria de Massas (EM)	38
3.6. Considerações gerais sobre atividade antimicrobiana	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Levantamento bibliográfico.....	44
4.2. Coleta do material botânico.....	44
4.3. Identificação botânica do material.....	44
4.4. Estudo fitoquímico.....	45
4.4.1. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Sida planicaulis</i>	45
4.4.2. Caracterização estrutural das substâncias isoladas.....	45
4.4.3. Processamento da planta.....	46
4.4.4. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i> ...	46
4.4.5. Cromatografia Líquido-Líquido do Bruto das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i>	46
4.4.6. Triagem fitoquímica do EEB de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	47
4.5. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica do EEB das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i>	47
4.6. Extração em fase sólida (SPE) e obtenção dos espectros de massa	50
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	52
4.7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do EEB, suas fases e alcaloide isolado de <i>Sida planicaulis</i>	52

4.7.2 Produtos testados	52
4.7.3 Preparação das amostras	52
4.7.4 Obtenção dos microorganismos	52
4.7.5 Meios de cultura	53
4.7.6 Preparação do inóculo	53
4.7.7 Determinação da concentração inibitória mínima	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Triagem fitoquímica do EEB e suas fases de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	56
5.2. Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	56
5.3. Caracterização estrutural das substâncias isoladas de <i>Sida planicaulis</i>	56
5.3.1. Caracterização estrutural de <i>Sp</i> -1	56
5.3.2. Caracterização estrutural de <i>Sp</i> -2	62
5.4. Substâncias identificadas por FIA-ESI-IT-MSⁿ no EEB e fases das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i>	70
5.4.1 Análise por espectrometria de massas do EEB das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i>	71
5.4.1.1 Identificação de <i>Sp</i> -3	73
5.4.1.2 Identificação de <i>Sp</i> -6	74
5.4.1.3 Identificação de <i>Sp</i> -9	77
5.4.1.4 Identificação de <i>Sp</i> -10	79
5.4.2 Análise por espectrometria de massas da fase hidroalcoólica do EEB das partes aéreas de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	81
5.4.2.1 Identificação de <i>Sp</i> -4	83
5.4.2.2 Identificação de <i>Sp</i> -5	85
5.4.2.3 Identificação de <i>Sp</i> -7	87
5.4.2.4 Identificação de <i>Sp</i> -8	89
5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana do EEB, das fases e de substâncias isoladas de <i>Sida planicaulis</i> Cav.	94
6. CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS.....	100

1.Introdução



1- INTRODUÇÃO

Considera-se que a utilização milenar das plantas medicinais com a finalidade de curar as enfermidades da humanidade, proporcionou um vasto conhecimento sobre as ações terapêuticas e a toxicidade de determinados espécies. Apesar do uso tradicional das plantas, apenas um número relativamente pequeno da biodiversidade das espécies presentes no planeta possui estudos que comprovam sua aplicação terapêutica, eficácia e segurança (FIRMINO et al., 2011).

O uso é das plantas medicinais é uma prática milenar, sendo ainda hoje um dos principais recursos terapêuticos utilizados por comunidades e grupos étnicos. Apesar disso, essas preparações não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa (SIMÕES; ALMEIDA, 2015). Em países considerados em desenvolvimento, este tipo de terapia é utilizado na atenção primária por cerca de 70% a 90% da população. Da mesma forma ocorre, com os países industrializados como Alemanha e Canadá, onde aproximadamente 70 a 90% de sua população fazem uso de produtos da medicina tradicional (BRASIL, 2012).

Para OMS planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na formulação específica da planta, que caracteriza um fitoterápico. Os fitoterápicos se destacam por representarem uma parcela significativa no mercado de medicamentos. Globalmente, o setor movimenta US\$ 21,7 bilhões por ano. No entanto, não existem no Brasil dados oficiais atualizados, embora, estima-se que esse mercado movimente cerca de US\$ 160 milhões por ano. As vendas de fitoterápicos tem crescido 15% anuais, contra 4% das vendas dos medicamentos sintéticos. Em toda a cadeia produtiva, o setor de medicamentos fitoterápicos movimenta anualmente em torno de R\$ 1 bilhão (CARVALHO et al., 2008) e segundo a Associação Brasileira das empresas do setor fitoterápico, suplemento alimentar e promoção de saúde (ABIFISA), as indústrias farmacêuticas iriam investir pelo menos R\$ 332 milhões em pesquisa e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos até 2016 (FOLHA DE SÃO PAULO, 2015).

O Brasil é detentor da maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e apresenta enorme tradição no uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações

(FONSECA, 2012). Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (FONSECA, 2012).

Atualmente as plantas medicinais constituem uma das principais fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico para uma variedade de patologias, no entanto, seu uso indiscriminado pela população é preocupante e em função disto, as diversas formas de utilização das espécies vegetais tem sido alvo de inúmeros estudos científicos no intuito de investigar sua composição química, farmacológica e toxicológica (GRÜNER et al, 2012).

Na busca por substâncias ativas responsáveis pelas atividades de algumas plantas medicinais, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular. O conhecimento etnofarmacológico de algumas espécies despertam o interesse em pesquisas na área da fitoquímica e farmacologia, tendo a primeira por objetivo conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais ou avaliar sua presença nos mesmos. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES, 2010).

Espécies pertencentes a família Malvaceae tem despertado nos pesquisadores o interesse em estudá-las devido a grande variedade das suas classes de constituintes químicos.

A composição química da família Malvaceae é bastante diversificada, permitindo a identificação de flavonoides, com destaque para os glicosilados e sulfatados, triterpenos, ácidos graxos, alcaloides, cumarinas, entre outros (TELES et al, 2015; SILVA et al, 2009; CHAVES et al, 2013 e 2017). Estes metabólitos presentes na família Malvaceae são responsáveis por suas atividades farmacológicas, entre elas: antimicrobiana, vasorelaxante, antiasmática, anticonvulsivante (CHATTERJEE, 2003; SILVA et al, 2005; SOUSA et al, 2006; TELES et al., 2014; GAO et al, 2015; GOMES et al., 2015; CHAVES et al., 2017).

Dentre os constituintes presentes no gênero *Sida* podemos destacar a presença de alcaloides indólicos e quinazolinícos, β -feniletilaminas (PRAKASH et al., 1981), alcaloides indoquinolínícos, lignídeos, alcanídeos (KAROU et al., 2007), esterídeos, flavonídeos, ácidos fenólicos, compostos porfirínícos (SILVA et al., 2006; CHAVES et al., 2013), ecdiesterídeos (WANG, et al., 2008). Na medicina tradicional, espécies de *Sida* são utilizadas contra disenteria, asma e gonorreia (CHOPRA et al., 1958), dor e inflamação (FRANZOTTI et al., 2000), febre, dor de cabeça, constipações, insuficiência renal (COEE E ANDERSON, 1996).

A importância do estudo com plantas medicinais e a riqueza de constituintes químicos com atividade biológica presentes em espécies do gênero *Sida*, juntamente com a necessidade de fortalecer o uso tradicional e evidenciar de forma científica os achados deste gênero, despertou o nosso interesse em realizar o estudo fitoquímico pioneiro da *Sida planicaulis* Cav.,

visando à descoberta de seus constituintes químicos e assim colaborar com o conhecimento quimiotaxônomico da família Malvaceae.

2. Objetivos



2.1. Objetivo Geral

Realizar um estudo fitoquímico com a espécie *Sida planicaulis* vislumbrando encontrar compostos que apresentem atividades farmacológicas e contribuindo, portanto, de forma direta para o conhecimento quimiotaxonômico da família Malvaceae.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar substâncias do extrato e fases obtido das partes aéreas de *Sida planicaulis* utilizando métodos cromatográficos;
- Identificar metabólitos de *Sida planicaulis* por métodos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e bidimensionais;
- Identificar metabólitos de *Sida planicaulis* por Espectrometria de massas usando a técnica hifenada LC-MS (FIA-ESI-IT-MS).
- Avaliar a atividade antimicrobiana de *Sida planicaulis* utilizando para tanto o Extrato Etanólico Bruto das suas partes aéreas, as fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica e também das substâncias isoladas, determinando sua concentração inibitória mínima (CIM).

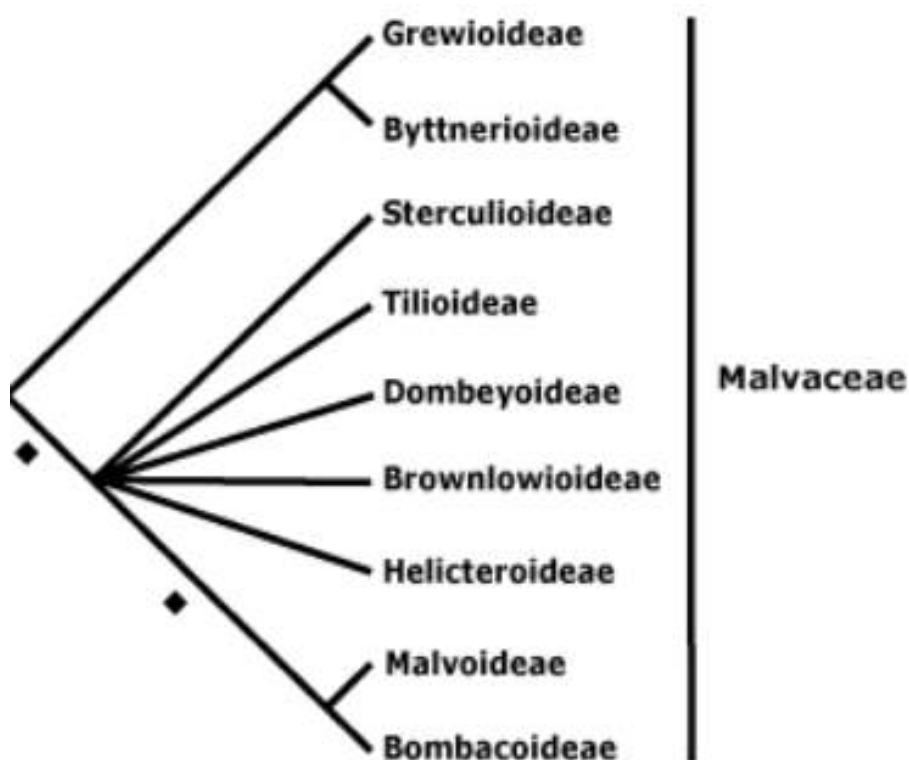
3. Fundamentação teórica



3.1 Considerações gerais sobre a família Malvaceae

Para o Sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group) (2016) a família Malvaceae *sensu lato* (*s.l.*) inclui nove subfamílias (Bombacoideae, Brownlowioideae, Byttnerioideae, Dombeyoideae, Grewioideae, Helicteroideae, Malvoideae, Sterculioideae e Tilioideae) (Figura 1, pág. 26).

Figura 1. Classificação filogenética das Angiospermas



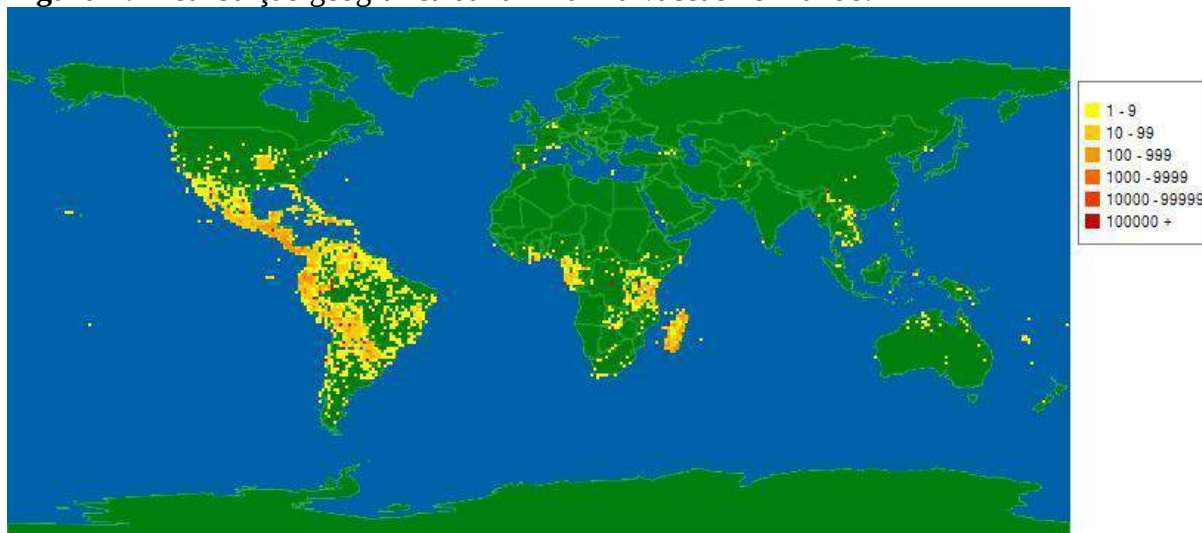
Fonte: Angiosperm Phylogeny Website, 2018.

A família Malvaceae é constituída por 250 gêneros e mais de 4230 espécies (CARVALHO e GAIAD, 2015). Membros desta família ocorrem por quase todas as partes do mundo, com exceção de regiões muito frias, possuindo distribuição predominantemente pantropical (Figura 2, pág. 27).

Estima-se que no Brasil a família Malvaceae esteja representada por cerca de 80 gêneros e 765 espécies, disseminadas por todas as regiões do país, principalmente Nordeste e Sul, apresentando 9 gêneros e 406 espécies endêmicas (BOVINI et al., 2010; BOVINI et al., 2015A). Dentre os seus gêneros mais numerosos estão *Hibiscus* (300 espécies), *Sida* (200

espécies), *Pavonia* (150 espécies), *Abutilon* (100 espécies), *Nototriche* (100 espécies), *Cristaria* (75 espécies) e *Gossypium* (40 espécies) (STEVENS, 2003).

Figura 2: Distribuição geográfica da família Malvaceae no mundo.



Fonte: www.tropicos.org, 2018.

Os representantes desta família se apresentam na forma de ervas, lianas, arbustos e árvores de pequeno e grande porte (GRINGS e BOLDRINI, 2013).

A família Malvaceae é constituída de gêneros que possuem considerável valor econômico, e tem importância na indústria têxtil (*Gossypium*, *Sterculia*, *Guazuma* e *Pterygota*), na ornamentação (*Ceiba* e *Hibiscus*), além de algumas espécies com valor medicinal, como *Malva sylvestris*, expectorante e anti-inflamatório, *Verbena officinalis*, laxante e *Ecballium elaterium*, anticancerígena (BOVINI, 2010).

Os dois gêneros mais representativos desta família, *Hibiscus* e *Sida*, apresentam atividade farmacológica comprovada com estudos científicos crescentes ao longo dos anos, o que corrobora com o uso da medicina tradicional. O gênero *Hibiscus* possuem ação antitumoral, anticonvulsivante, antitussígeno, laxante, hipolipemiante, hipotensor e o gênero *Sida* antiinflamatória, hepatoprotetora, antimicrobiana, vasorelaxante e analgésica, por exemplo (SREEDEVI et al. 2009; TERNIKAR et al., 2010; HERNANDEZ; HERRERA, 2011; KUMAR; SINGH, 2012; REDDY et al., 2012; CHAVES et al., 2013; MOMIN et. al., 2014; CHAVES et al., 2017).

Dentre as espécies brasileiras de valor econômico expressivo, destacam-se *Theobroma cacao* L. e *Theobroma grandiflorum* L. (cacau e cupuaçu, respectivamente), que ocorrem principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde seus produtos e derivados são

encontrados em grande abundância e apresentam grande importância na indústria alimentícia (SILVA, LIMA, LANDA, 2007).

3.2 Considerações Quimiotaxonômicos da família Malvaceae

A família Malvaceae apresenta uma grande diversidade de metabolitos secundários descritos na literatura, que se distribui de forma não uniforme pelos seus gêneros e apresentam adaptações e mudanças de constituintes de acordo com cada espécie. Alguns constituintes são encontrados com mais frequência nas espécies da família, podendo dar destaque para os ácidos graxos, terpenos e principalmente os flavonoides simples, glicosilados e sulfatados, sendo também identificados nos gêneros cumarinas, alcaloides, feofitinas e amidas, por exemplo (SILVA et al., 2009; CAVALCANTE et al., 2010; GOMES et al., 2011; CHAVES et al., 2013; TELES et al., 2015).

Os ácidos graxos constituem importantes marcadores quimiotaxonômicos para suas espécies, entre estes estão: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico (SILVA et al., 2010), os ácidos ciclopropenoicos: malválico e estercúlico, dihidrosterculico e dihidromalválico (DOWDA; FARVE, 2013).

Em espécies da família Malvaceae foram encontrados diferentes esqueletos de terpenos, como os sesquiterpenoides do tipo cadineno (STIPANOVIC et al., 1980), lactonas sesquiterpênicas de espécies de *Abutilon* spp (SHARMA; AHMAD, 1989) e triterpenos isolados de gêneros diversos, como *Wissadula* (TELES et al., 2014) e *Sidastrum* (TELES et al., 2015).

Os compostos fenólicos apresentam uma ampla distribuição no reino vegetal e a existência de grupos hidroxilas em seu esqueleto químico os tornam propensos a doar um radical hidrogênio ou um elétron para um radical livre e um sistema aromático conjugado que permite a deslocalização de um elétron não emparelhado, e esta característica garante aos compostos fenólicos uma atividade redutora de radicais livres (DAI; MUMPER, 2010), apresentando assim uma atividade antioxidante.

Os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico podendo citar entre estes as antocianinas e os flavonóis, são importantes compostos fenólicos. Os flavonóides são capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de reduzirem significativamente as doenças trombóticas, sendo assim reconhecidamente agentes com poder antioxidante (WANG et al., 2016).

Entre os principais metabolitos secundários isolados de espécies da família Malvaceae estão os flavonoides, que se apresentam na forma de aglicona, como canferol, luteolina e

quercetina (COSTA et al., 2009; VADIVEL, 2016) ou glicosilados, com um ou mais unidades de açúcar no seu esqueleto, por exemplo, o canferol 3-O- β -D-(6''-E-p-cumaroil) glicosídeo (tilirosídeo) e o canferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo (astragalina) (COSTA et al., 2009; CASEMIRO-JUNIOR et al., 2013; MAZZOTTI et al., 2015, ROLIM, 2015). Os flavonoides sulfatados geralmente se apresentam com uma ou mais unidade de sulfato, onde cita-se como exemplo a 5-hidroxi-4'-metoxi-7-O-sulfato-flavona (acacetina-7-O-sulfato) (Wissadulina) e 5,7-di-hidroxi-4' metoxi-8-O-sulfato flavona (Caicoína) isolados pela primeira vez na literatura de *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl, que exibiram atividade inibitória contra células tumorais (TELES, et al 2015b), considerados um grupo de substâncias incomuns e pouco relatado em espécies da família Malvaceae.

Os flavonoides possuem um padrão de fragmentação C-glicosil e O-glicosil. Os flavonoides C-glicosídeos são estáveis à hidrólise ácida, devido à ligação C-C glicosídica, e as principais fragmentações acontecem no açúcar, que possui as ligações mais fracas (ABAD-GARCÍA et al., 2009); (FERRERES et al., 2012). Flavonoides O-glicosídeos se ligam a um açúcar com formação de uma ligação glicosídica O-C ácido lábil. A fragmentação desses flavonoides envolve clivagem na ligação O-glicosídica, com um concomitante rearranjo-H, que leva à eliminação do resíduo de sacarídeo (GOUVEIA; CASTILHO, 2010; GOUVEIA; CASTILHO, 2011; ORHAN et al., 2013). Para os flavonóis, as posições 3-OH e 7-OH são locais de glicosilação regular (ABAD-GARCÍA et al., 2012).

Por apresentarem uma grande diversidade estrutural os flavonoides apresentam também atividade farmacológica diversificada e se destacam como alvos de estudos científicos que procuram aprofundar o seu emprego terapêutico: vasorelaxante (CHAVES et al., 2013; CHAVES et al., 2017), espasmolítica, leishmanicida (TELES et al., 2015b), antioxidante (SILVA et al., 2006; PUGLIESE, 2010), antifúngico (MING, D. S. et al., 2005), anticancerígeno (WANG et al., 2004; TELES et al., 2015), antiinflamatória (TELES et al., 2016), hepatoprotetor (GONZALEZ et al., 2017), entre outras funções (MATSUDA et al., 2002; TOKER et al., 2004; BOURICHE et al., 2005; GOMES et al., 2005; SILVA et al. 2005).

Em pesquisa de química de produtos naturais desenvolvidos sob orientação da Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza/UFPB com 17 espécies da família Malvaceae foram isolados diversas classes de constituintes químicos, sendo o tilirosídeo identificado em 14 espécies dessa família, levando a sugerir que essa substância pode ser considerado o marcador químico de Malvaceae: *Herissantia tiubae* (SILVA et al., 2005), *Sida galheirensis* (SILVA et al., 2006), *Bakeridesia pickelii* (COSTA et al., 2007), *Herissantia crispa* (COSTA et al., 2009);

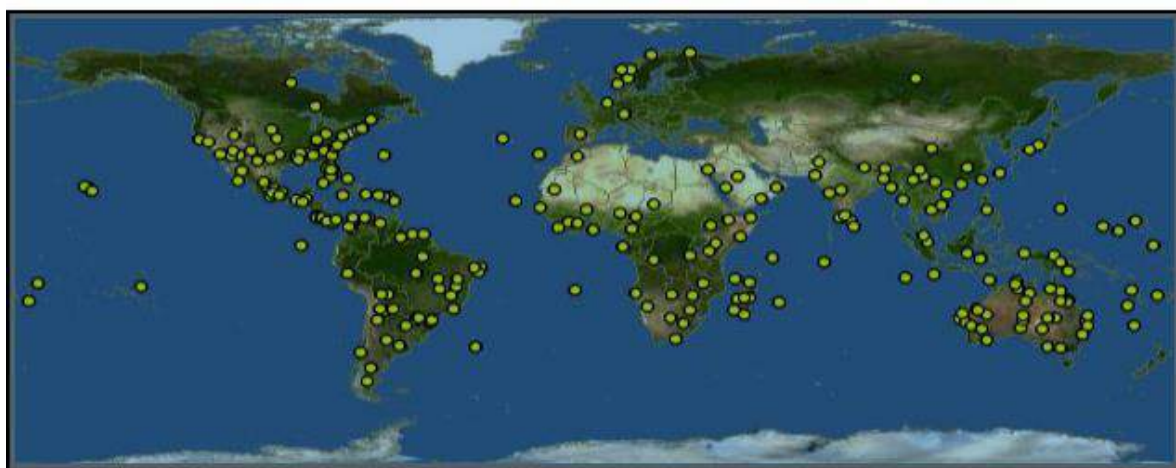
Sidastrum paniculatum (CAVALCANTI et al., 2010), *Sidastrum micranthum* (GOMES et al., 2011), *Pavonia cancellata* (CASIMIRO Jr. et al., 2013); *Pavonia malacophylla* (GUALBERTO, 2013), *Sida rhombifolia* (CHAVES et al., 2013), *Pavonia glazioviana* (MAZZOTI et al., 2015), *Wissadula peripetifolia* (TELES et al., 2014), *Whalteria viscosíssima* (ROLIM et al., 2016), *Helicteris velutina* (FERNANDES et al., 2018).

3.3 Considerações gerais do gênero *Sida*

O gênero *Sida* apresenta ampla distribuição neotropical por todo o mundo, compreende aproximadamente 250 espécies distribuídas nas Américas, África, Ásia, Austrália e Ilhas do Pacífico, tendo 2/3 descritas na América (Figura 3, pág. 30) (STEVENS, 2003; SILVA et al., 2006). No Brasil, foram identificadas cerca de 95 espécies, destas 57 são endêmicas, encontradas mais facilmente nas regiões Nordeste e Sul e, em menor proporção, nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste (BOVINI, 2018).

As plantas deste gênero são ervas anuais ou perenes, na forma de arbustos, com 0,5 - 2,0 m de altura, com pêlos estrelados, simples e/ou granulares. Suas folhas são simples, com aspecto de ovado a lanceolado, lâmina foliar inteira e sem nectarinas foliares. As flores são solitárias ou emparelhadas, axilares ou subterminais com cálice campanulado ou em forma de taça (TANG et al., 2007; KRAPOVICKAS, 2006; FRYXELL, 1992; FRYXELL, 2009).

Figura 3: Distribuição geográfica do gênero *Sida* no mundo.



Fonte: Discover Life, 2018.

Na medicina tradicional as espécies de *Sida* são utilizadas contra disenteria, asma e gonorreia (CHOPRA et al., 1958), analgésica e anti-inflamatória (FRANZOTTI et al., 2000),

inflamação, febre, dor de cabeça, constipações, insuficiência renal (COEE e ANDERSON, 1996), anti-hipertensiva (CHAVES et al., 2017).

Cientificamente, algumas espécies de *Sida* (Quadro 1, pág. 32) têm comprovações bem significativas, por exemplo, *Sida cordifolia* atuando como diurética, laxativa e hipoglicemiante (KANTH e DIWAN, 1999) e contra lesão no miocárdio (KUBAVAT e ASDAQ, 2009), *Sida galheirensis* com atividade antioxidante (SILVA et al., 2006), *Sida acuta* como antibacteriana, antiplasmodial, antioxidante e citotóxica (KAROU et al. 2007) e *Sida rhombifolia* com atividade vasorelaxante (CHAVES et al., 2013 e 2017).

Aproximadamente 142 constituintes químicos foram identificados a partir de diferentes espécies de *Sida* (Quadro 2, pág. 35), com predominância das classes: alcaloides, flavonoides e ecdisteroides (DINDA et al., 2015). É relatado na literatura a presença de alcaloides indólicos e quinazolínicos, β -feniletilaminas (PRAKASH et al., 1981), alcaloides indoquinolínicos (CHAVES et al., 2013 e 2017), lignoides, alcanidas (KAROU et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2010; TELES et al., 2016), esteroides, flavonoides, ácidos fenólicos, triterpenos, compostos porfirínicos (SILVA et al., 2006, CHAVES et al., 2013; TELES et al., 2014, 2015 e 2016) e ecdiesteroides (WANG et al., 2008).

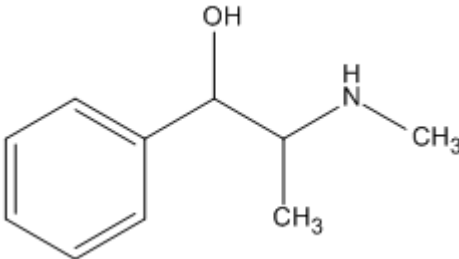
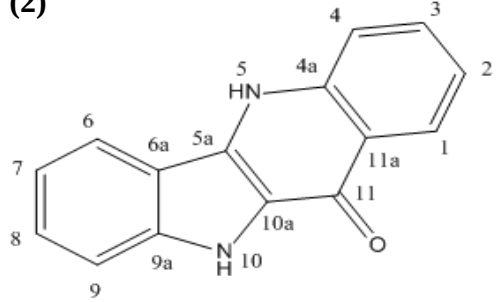
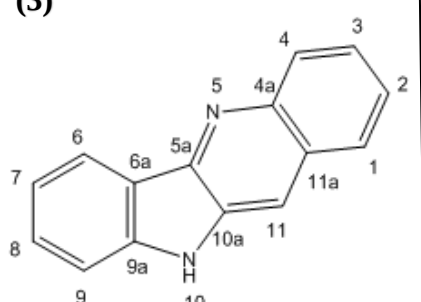
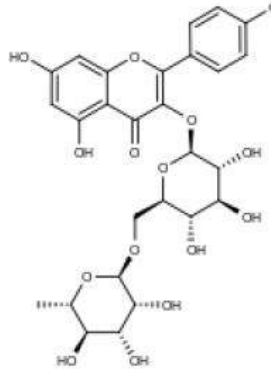
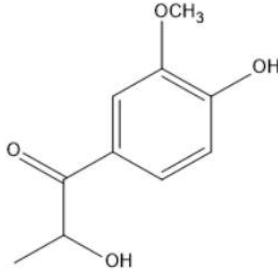
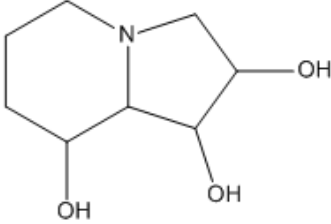
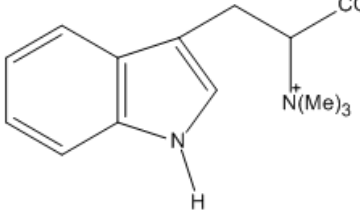
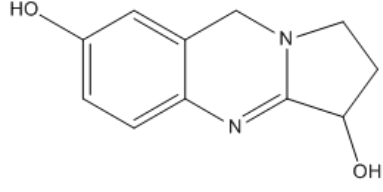
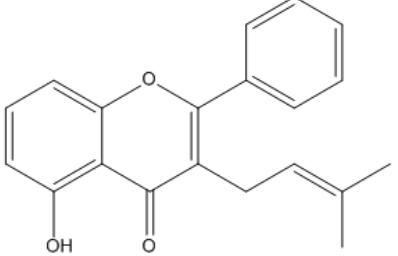
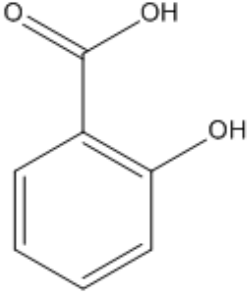
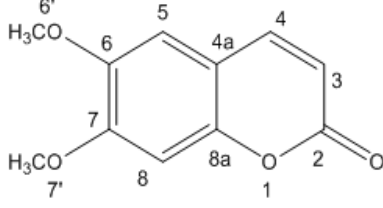
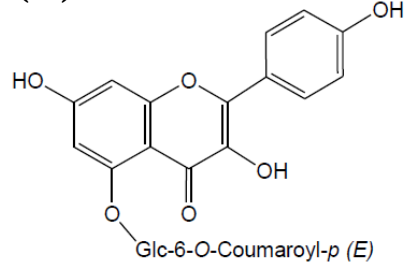
Quadro 1. Alguns constituintes químicos isolados do gênero *Sida* e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas relatadas na literatura.

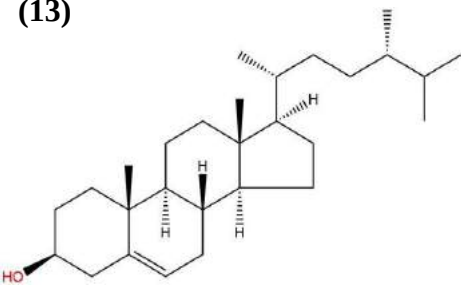
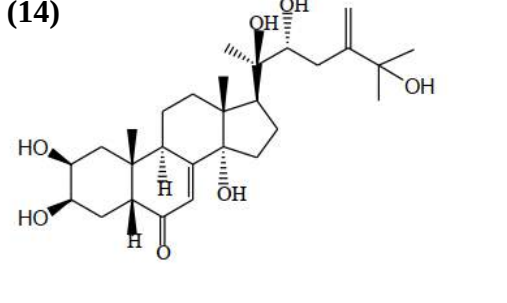
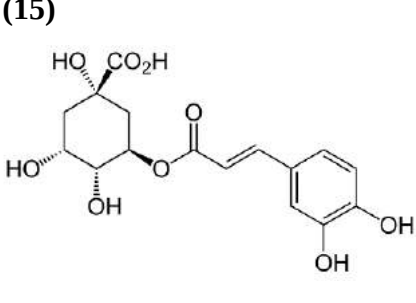
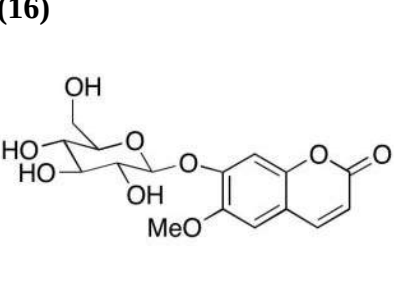
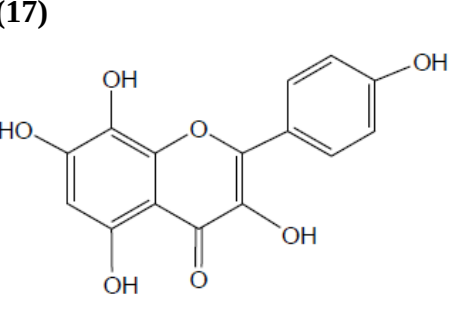
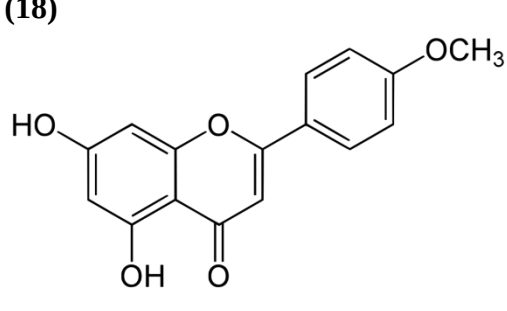
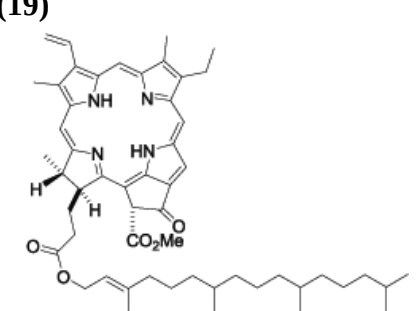
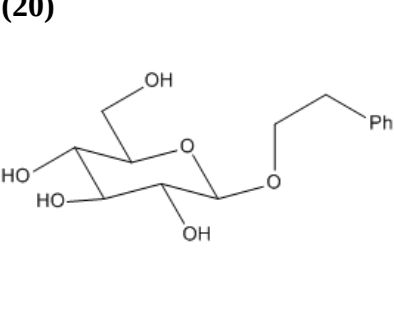
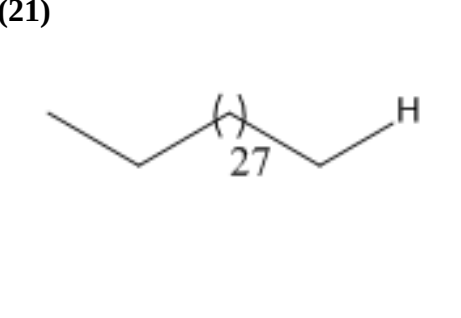
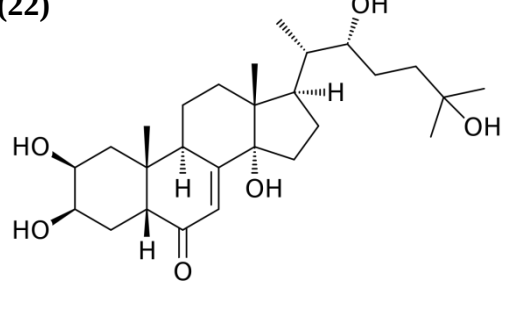
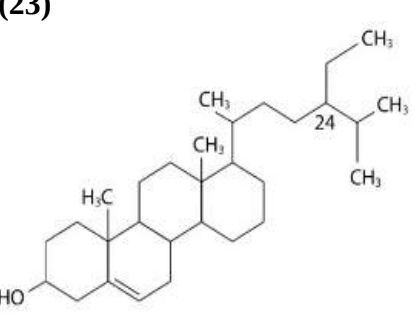
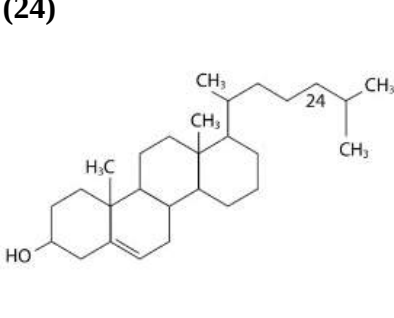
NOME CIENTÍFICO	CONSTITUINTE QUÍMICO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<i>Sida acuta</i>	Efedrina (1)		Gunatilaka et al., (1980)
	Criptolepina	Antimalárica	Banzouzi et al., (2004)
	Quindolinona (2)		Jang et al., (2003)
	Criptolepinona		Jang et al., (2003)
	Quindolina (3)		Jang et al., (2003)
	Canferol-3-O- β -D glucopyranoside		Ahmed et al., (2011)
	Canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil- β -D-glicopiranosideo (4)		Ahmed et al., (2011)
	20-Hidroxiecdisona		Dinan et al., (2001)
	Evofolino - A (5)	Citotóxico	Jang et al., (2003)
<i>Sida carpinifolia</i>	Ecdisterone		Pandit et al., (1976)
	Swainsonina (6)		Bedin et al., (2009)
<i>Sida cordifolia</i>	β – Fenetilamina		Ghosal et al., (1975)
	Hipaforina (7)		Ghosal et al., (1975)
	Vasicina		Ghosal et al., (1975)
	Vasicinol (8)		Ghosal et al., (1975)
	5,7-Diidroxi-3-isoprenil flavona	Analgésica e Antiinflamatória	Sutradhar et al., (2008)
	5-Hidroxi-3-isoprenil flavona (9)	Analgésica e Antiinflamatória	Sutradhar et al., (2008)
<i>Sida filicaulis</i>	Ecdisona		Dinan et al., (2001)
<i>Sida galheirensis</i>	Ácido salicílico (10)		Silva et al., (2006)
	Stigmasterol-3-O- β -D glucopiranosideo		Chaves et al., (2013)
	6,7-Dimethoxi cumarina (11)		Silva et al., (2006)

	5,4'-Diidroxí-3,7,3'-trimetoxi flavona		Silva et al., (2006)
<i>Sida glutinosa</i>	Glutinosídeo (12)	Antioxidante	Das et al., (2011)
	Crisina	Antioxidante	Das et al., (2012)
	Campesterol (13)		Das et al., (2011)
	β -Sitosterol		Das et al., (2011)
	24(28)- Diidromaquiisterona A (14)	Antioxidante	Das et al., (2011)
<i>Sida hermaphrodita</i>	Ácido glutâmico		Ligai e Bandyukova (1990)
	Ácido clorogênico (15)		Ligai e Bandyukova (1990)
	Escopoletina-7-O- β -D glicosídeo (16)		Ligai e Bandyukova (1990)
	Rutina		Ligai e Bandyukova (1990)
	Herbacetina (17)		Ligai e Bandyukova (1990)
<i>Sida rhombifolia</i>	Criptolepinona	Vasorelaxante	Chaves et al., (2013)
	Acacetina (18)		Chaves et al., (2013)
	20-Hidroxiecdisone		Jadhav et al., (2007)
	Feofitina A (19)		Chaves et al., (2013)
	β -Sitosterol	Antibacteriana	Woldeyes et al., (2012)
	Fenileti- β -D-glicopiranosídeo (20)	Larvicida	Ekramul et al., (2003)
<i>Sida spinosa</i>	β -Sitosterol-3-O- β -D glicopiranosídeo		Darwish e Reinecke (2003)
	Triacontane (21)		Darwish e Reinecke (2003)
	Turkesterone		Darwish e Reinecke (2003)

<i>Sida szechuensis</i>	Ecdisona (22)		Yao e Xu (2000)
<i>Sida veronicaefolia</i>	Estigmasterol		Goyal e Rani (1988)
	β -Sitosterol (23)		Goyal e Rani (1988)
	Campesterol		Goyal e Rani (1988)
	Colesterol (24)		Goyal e Rani (1988)

Quadro 2: Alguns Constituintes químicos isolados do gênero *Sida* citados no Quadro 1.

(1) 	(2) 	(3) 	(4) 
(5) 	(6) 	(7) 	(8) 
(9) 	(10) 	(11) 	(12) 

(13) 	(14) 	(15) 	(16) 
(17) 	(18) 	(19) 	(20) 
(21) 	(22) 	(23) 	(24) 

3.4 Considerações sobre a espécie *Sida planicaulis* Cav.

Sida planicaulis Cav. é uma espécie com distribuição pantropical, estendendo-se pela América, principalmente no Brasil, com poucos registros pela Ásia (KRAPOVICKAS, 2003). No Brasil, é encontrada em todas as regiões, exceto no Norte, sendo mais comum nas regiões Sul e Sudeste do país (BOVINI, 2013). É conhecida popularmente como vassoura/guanxuma ou mata-pasto e utilizada na medicina tradicional para tratar dor no corpo (BRITO e SENNA-VALLE, 2012; COSTA, 2002).

Possui aspecto de arbusto ou subarbusto ereto de 0,5–1,8 m, com folhas dísticas, lâmina foliar 2,5–9 × 1–4,5 cm, verde concolor, membranácea e lanceolada, apresentando base aguda a obtusa, com ápice agudo, margem serreada, ciliada e tricomas simples (BOVINI, 2010).

Sobreira et al., (2018) relataram a presença de alguns metabólitos secundários presentes na espécie, como por exemplo flavonoides, alcaloides, esteroides e triterpenos, onde o estudo também mostra que a espécie não teve atividade antifúngica sobre as cepas testadas de fungos leveduriformes e filamentosos.

A diversidade de constituintes químicos isolados do gênero *Sida*, suas inúmeras atividades farmacológicas e apenas a existência de uma citação científica (SOBREIRA et al., 2018) sobre a espécie *Sida planicaulis* (Figura 4, pág. 38) despertaram a nossa curiosidade por pesquisa-la. Para obter os conhecimentos químicos desta espécie foram utilizadas fitoquímica clássica como cromatografia em coluna e técnicas avançadas como a espectrometria de massas (EM).

No que tange a sua ação biológica foram avaliados sua atividade antimicrobiana frente as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853), *Escherichia coli* (ATCC-18739), *Escherichia coli* (LM-35), *Candida albicans* (ATCC-60193), *Candida albicans* (LM-38), *Candida tropicalis* (ATCC-13803), *Cryptococcus gatti* (INCQS-40113), *Cryptococcus neoformans* (FCF-119-38), *Cryptococcus neoformans* (LM-49), *Aspergillus flavus* (ATCC-1303), *Aspergillus niger* (LM-23).

Figura 4: *Sida planicaulis* Cav.



Fonte: REFLORA, 2018.

3.5 Considerações gerais sobre Espectrometria de Massas (EM)

Nas últimas décadas houve rápido avanço no desenvolvimento de técnicas espectrométricas de massa permitindo a análise de produtos naturais de baixo peso molecular com propriedades físico-químicas diferenciadas (GROSS, 2011).

A espectrometria de massa apresenta uma versatilidade para diferentes áreas de utilidades baseada na possibilidade de aplicação de diferentes fenômenos físicos para a ionização de moléculas analisadas, geração de seus fragmentos e separação dos íons criados (GROSS, 2011). O que torna simples a realização de análises de compostos presentes em misturas complicadas obtidas após extração de produtos naturais é a sua facilidade de hifenização de espectrômetros de massa com diferentes instrumentos.

Durantes os últimos anos a espectrometria de massa teve uma grande quantidade de métodos empregados em diferentes áreas das ciências biológicas relacionadas à biomedicina, agricultura, problemas ambientais e ecológicos (STOBIECKI; KACHLICKI e JELEŃ, 2012).

A Espectrometria de massas é uma técnica analítica de grande valor em que moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que em seguida são separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z (WILSON e WALKER, 2010).

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador e um detector. Ao chegar à fonte de ionização as moléculas da amostra são transformadas em íons em fase gasosa, desta forma as partículas se tornam carregadas, positivo ou negativamente, os quais são acelerados por um campo eletromagnético para alcançar o analisador de massa. Neste compartimento, os íons da amostra são separados levando em consideração sua razão massa/carga (m/z), processo que ocorre em alto vácuo. O detector é o último módulo de um

espectrômetro de massas, ele registra a carga ou a corrente que é produzida quando o íon atinge ou atravessa a sua superfície, de acordo com a separação realizada pelo analisador, obtendo-se desta forma o espectro de massas (PAVIA et al., 2010; LANÇAS, 2009).

Entre os tipos de ionização que podem ser utilizadas na EM, a Ionização por eletrospray (ESI) é a forma mais empregada no acoplamento LC-MS e que possibilita a formação de íons na pressão atmosférica ao invés de vácuo. Durante este processo, a amostra é dissolvida em um solvente e pressurizada em um tubo capilar, que recebe uma voltagem entre 3.000 e 5.000 V. O líquido que emerge do capilar na forma de aerossol tem suas gotículas dessolvatadas (perdem incessantemente o solvente) e assim os íons formados, pelo efeito da atração eletrostática e pelo vácuo, avançam para o espectrômetro de massas. A ESI é uma técnica que permite a geração de íons protonados $[M+H]^+$ e íons desprotonados $[M-H]^-$ no modo positivo e negativo respectivamente (LANÇAS, 2009).

O *Ion Trap* é um analisador sensível de massas que usa um campo elétrico oscilatório para armazenar íons. O princípio de operação do Ion Trap se dá pelo uso de campo quadrupolar de rádio frequência que aprisiona íons em duas ou três dimensões (GROSS, 2011). Este analisador possui uma configuração chamada por “*tandem-in-time*”, que se refere à seleção de íons pais e sua subsequente fragmentação dentro do mesmo analisador (MONTORO et al., 2010). Essa análise seriada permite que seja obtido informações estruturais fundamentais para que assim a identificação dos constituintes químicos analisados seja realizada com mais facilidade.

O modo negativo foi escolhido devido ao conhecimento prévio da presença de flavonoides na família e no gênero ao qual *Sida planicaulis* pertence e que essa classe de metabólitos ioniza facilmente pela desprotonação das hidroxilas fenólicas.

Quando comparado com outros métodos de detecção, a EM não apenas permite a determinação da estrutura química de compostos naturais com estruturas conhecidas e desconhecidas, mas também oferece excelente sensibilidade à baixa quantidade de amostras em um tempo de análise relativamente curto, além de desempenhar um papel importante na triagem de flavonóides e outros compostos fenólicos (TIBERTI et al., 2007; HUANG et al., 2009; RAUTER et al., 2009; GOUVEIA e CASTILHO, 2010).

Esta técnica de identificação empregada em produtos naturais foi utilizada na análise de espécies da família Malvaceae, em *Sida tuberculata*, sugerindo a presença de ecdisteróides, flavonoides e alcaloides (ROSA, 2013). *Adansonia digitata*, evidencia a presença de ácido cumárico e do edoindole-3-carbinol (CASTRO, 2008). *Pavonia cancellata* teve a identificação

de compostos fenólicos derivados do ácido caféico, flavonoides glicosilados e *Sida galheirensis* de flavonoides glicosilados (ASSIS et al., 2017).

3.6 Considerações gerais sobre atividade antimicrobiana

A abundante variedade de compostos orgânicos isolados de espécies vegetais da flora brasileira, o potencial destes para o desenvolvimento social e econômico e a sua contribuição para o avanço científico e tecnológico nos levam a compreender e buscar o valor real da pesquisa dos produtos naturais (BRAZ-FILHO, 1994).

O caminho do desenvolvimento e planejamento de antimicrobianos oriundos de fontes naturais vem sendo estimulada devido ao aumento da resistência dos microrganismos nocivos à saúde frente à maioria dos antimicrobianos já utilizados no mercado. Linhas de pesquisas têm sido aperfeiçoadas por vários pesquisadores, fundamentadas nas propriedades anti-infecciosas de muitas plantas utilizadas na medicina popular (DUARTE, 2006).

Considerando as limitações dos antimicrobianos alopáticos existentes atualmente e a resistência apresentada pelos micro-organismos, a busca por novas fontes terapêuticas para o tratamento dessas infecções tem sido constante, buscando fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o paciente (OLIVEIRA; MACHADO; FREITAS, 2014). Considerando estes fatos, as pesquisas que envolvem plantas medicinais e seus fitoconstituintes podem levar à descoberta de componentes que sirvam como fármacos ou como protótipos de fármacos (XU et al., 2011; HADI; DURU; MARTIN-DIANA, 2013).

As doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos como vírus, fungos, parasitas e bactérias que, ao invadirem o organismo do hospedeiro, se reproduzem e causam danos aos tecidos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) as infecções são responsáveis por um terço das causas de mortalidade no mundo em desenvolvimento, em virtude do impacto socioeconômico que geram a sociedade (WHO, 2015).

Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento drástico na incidência de micoses, se tornado um sério problema de saúde pública, o que se deve ao crescente número de pacientes com imunodeficiências inatas ou adquiridas (REX; WALSH; ANAISSIE, 1997; MENCACCI et al., 2000), se tornando um desafio para os profissionais da saúde.

Segundo Fenner et al., (2006) *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* ou os fungos patógenos oportunistas *Candida albicans*, *C.*

krusei, *Cryptococcus neoformans* são os principais fungos responsáveis pelo estabelecimento de uma infecção fúngica.

Desta forma, a busca por novos medicamentos mais potentes e eficazes é constante, e diante disso, destaca-se a utilização dos produtos naturais como fonte de substâncias potencialmente ativas.

Vários metabólitos secundários são investigados em relação as suas propriedades antimicrobianas (COWAN, 1999; MAHADY, 2005; TELES et al., 2014), dentre estes, destacam-se os flavonoides (SILVA et al., 2009; GOMES et al, 2011), taninos (SCALBERT, 1991; SOUZA et al., 2007), alcaloides (O'DONNELL; GIBBONS, 2007), saponinas (BAHRAMINEJAD et al., 2008), composto porfirínico (GOMES et al., 2015) e terpenoides (SHAI et al., 2008), são largamente investigados e que possuem potencial atividade antimicrobiana.

É possível acompanhar na tabela 1 alguns dos microorganismos que são sensíveis a espécies pertencentes ao gênero *Sida*. Com base na literatura analisada é que se escolheu quais as cepas utilizadas para realização deste estudo antimicrobiano.

Tabela 1: Microorganismos sensíveis a espécies do gênero *Sida*.

Espécie	Microrganismo	Referência
<i>Sida acuta</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ANANI et al., 2000; KAROU et al., 2006; EKPO e ETIM, 2009; IROHA et al., 2009; AKILANDESWARI et al., 2010; JINDAL e KUMAR 2012;
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Streptococcus faecalis</i>	
	<i>Shigella dysenteriae</i>	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	<i>Streptococcus aureus</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Aspergillus fumigates</i>	
<i>Sida cordifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	PRABHKAR et al., 2007a; MAHESH e SATISH, 2008; TERNIKAR et al., 2010; REDDY et al., 2012; OUEDRAOGO et al., 2012
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Aspergillus flavus</i>	
	<i>Streptococcus faecalis</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Candida albicans</i>	
	<i>Cryptocococcus neoformans</i>	

	<i>Candida tropicalis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus fumigates</i>	
<i>Sida rhombifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella shiga</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	EKRAMUL et al., 2003; ASSAM et al., 2010; WOLDEYES et al., 2013; BIFTU et al., 2014
<i>Sida rhombifolia</i>	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> <i>Microsporum gypseum</i>	
<i>Sida spinosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Aspergillus niger</i>	NAVANEETHAKRISHNAN et al., 2011; SELVADURAI et al., 2011
<i>Sida alba</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterobacter aerogenosa</i> <i>Proteus mirabilis</i>	PRABHAKAR, 2007; KONATE et al., 2012
<i>Sida galheirensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Microsporum canis</i>	FERNANDES, 2017

4. Materiais e Métodos



Durante o desenvolvimento da nossa pesquisa foram adotadas as seguintes metodologias.

4.1. Levantamento bibliográfico

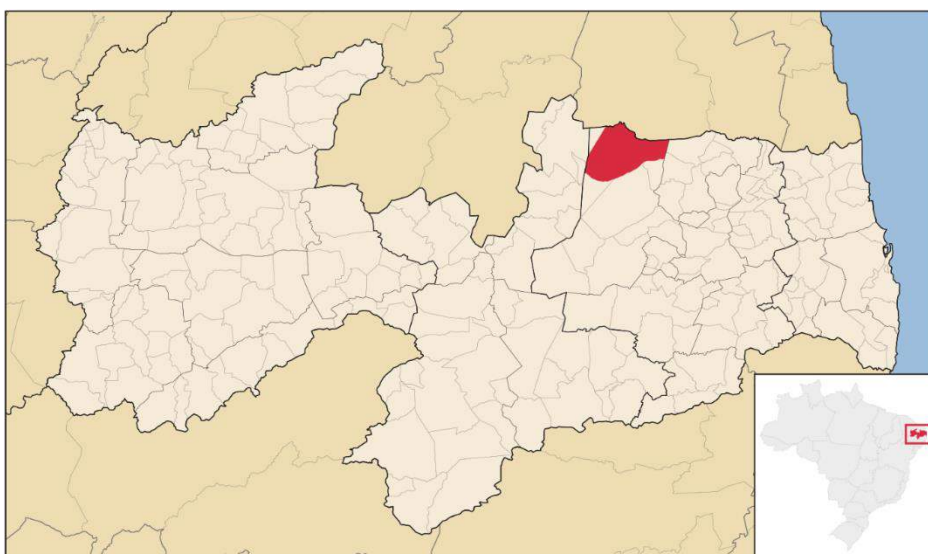
O levantamento bibliográfico do gênero *Sida* foi realizado no SciFinder, Google Scholar, PubMed, Scielo, Chemical Abstracts, Biological Abstracts, NAPRALERT, além de pesquisas na Internet e em anais de eventos nacionais e internacionais.

4.2. Coleta do material botânico

As partes aéreas (ramos, folhas e flores) de *Sida planicaulis* Cav. foram coletadas em abril de 2014 no bairro Eucalipto, município de Cuité, Curimataú Ocidental Paraibano, que apresentam as coordenadas 06° 29' 01" S a 36° 09' 13" W (Figura 5, pág. 44).

Durante o processo de coleta, foram preparadas exsicatas para identificação do material coletado.

Figura 5: Local da coleta de *Sida planicalis* Cav.



Fonte: Prefeitura municipal de Cuité- PB.

4.3. Identificação botânica do material

A espécie vegetal foi identificada pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Garcia Santos/UFCG, e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do Centro de Educação e Saúde, na UFCG - Campus Cuité, sob o código 201.

4.4. Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico foi realizado nas dependências do Laboratório de Fitoquímica Prof. Dr. Raimundo Braz Filho; LMCA, pertencentes ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB e no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais – LBPN/Campus do Litoral Paulista – UNESP.

4.4.1. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Sida planicaulis*

O isolamento dos constituintes químicos foi realizado no Laboratório de Fitoquímica Prof. Dr. Raimundo Braz Filho através de métodos cromatográficos, como: Cromatografia em Coluna tendo como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh), Sephadex LH-20 (Merck) e para desenvolvê-las foram utilizadas colunas de vidro cilíndricas com dimensões que variam de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Os solventes utilizados como fase móvel foram P.A e cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi empregada para a análise e reunião das frações obtidas por cromatografia em coluna.

As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e reveladas por meio de impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo, além dos reveladores NP (difênilboriloxietilamina) para compostos fenólicos e anisaldeído, para terpenos e esteroides.

4.4.2. Caracterização estrutural das substâncias isoladas

A elucidação estrutural das substâncias isoladas das partes aéreas de *Sida planicaulis* Cav. (*Sp*-1 e *Sp*-2) foram feitas por meio de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais (RMN ^1H e RMN ^{13}C – APT e BB) e bidimensionais (HMQC e HMBC), com comparações com modelos da literatura.

- *Ressonância Magnética Nuclear*

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear das substâncias isoladas foram obtidos utilizando o espectrômetro BRUKER a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C) do LMCA-UFPB. Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram metanol deuterado (CD_3OD). Os

deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e a constante de acoplamento (J) em Hz.

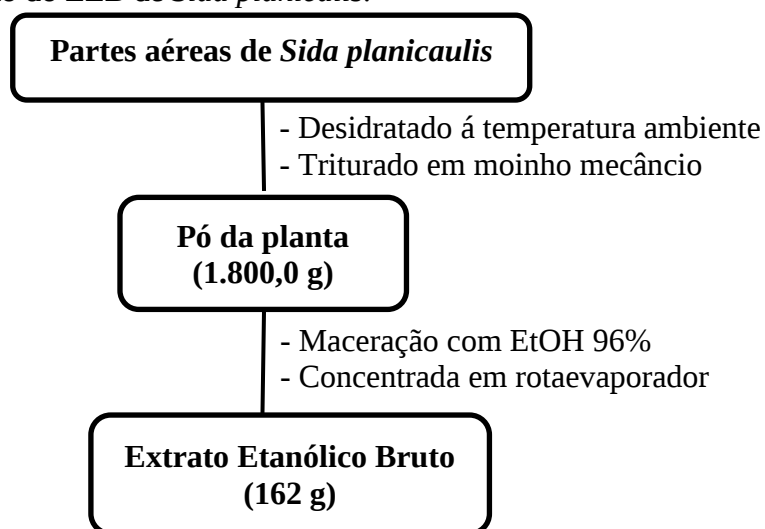
4.4.3. Processamento da planta

O material botânico da espécie *Sida planicaulis* foi desidratado em temperatura ambiente. Em seguida, o material seco foi triturado com auxílio de moinho mecânico, fornecendo 1.800 g do pó.

4.4.4. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto das partes aéreas de *Sida planicaulis*

O pó da planta (1.800,0 g) foi submetido à maceração durante 48 horas, utilizando-se como líquido extrator etanol a 96%, sendo tal processo repetido até extração dos seus constituintes químicos. A solução extrativa resultante foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se 162 g do extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1, pág. 46).

Esquema 1: Obtenção do EEB de *Sida planicalis*.

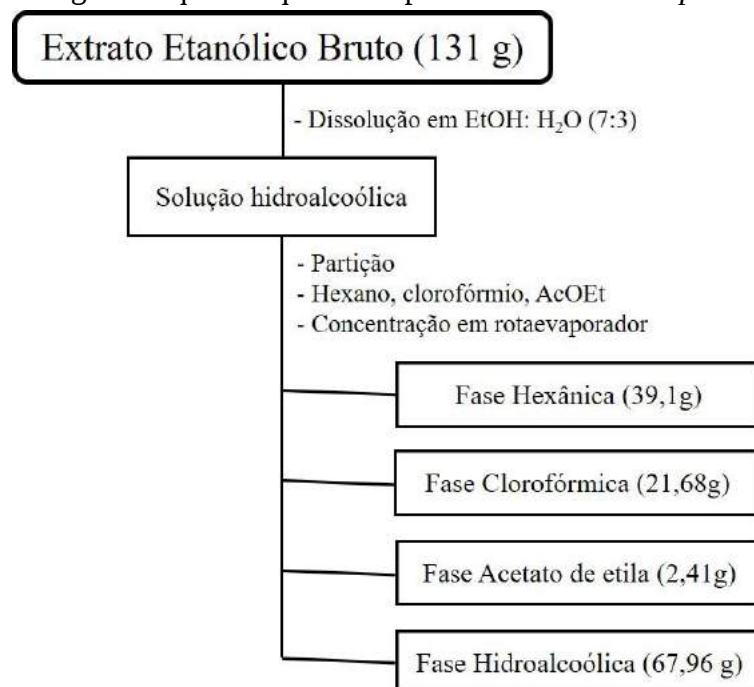


4.4.5. Cromatografia Líquido-Líquido do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis*

O extrato etanólico bruto das partes aéreas de *S. planicaulis* teve 80% (131 g) solubilizado em uma solução de EtOH: H₂O (7:3), obtendo-se uma solução hidroalcoólica que foi submetida a uma cromatografia líquido-líquido com hexano, clorofórmio, acetato de etila. As respectivas soluções foram concentradas sob pressão reduzida, fornecendo 39,1 g da fase

hexânica; 21,68 g da fase clorofórmica; 2,41 g da fase acetato de etila e 67,96 g da fase hidroalcoólica (Esquema 2, pág. 47).

Esquema 2: Cromatografia líquido-líquido das partes aéreas de *Sida planicaulis*.



4.4.6. Triagem fitoquímica do EEB de *Sida planicaulis* Cav.

O EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis* Cav. e respectivas fases (Esquema 2, pág. 45) foram submetidas à triagem fitoquímica preliminar empregando-se reagentes específicos para classe de esteroides e triterpenos (Lieberman-Burchard), flavonoides (Shinoda), taninos (Gelatina e FeCl_3), alcaloides (Dragendorff) e saponinas (Índice de espuma) seguindo a metodologia descrita por Matos (2009) ou Biavati et al. (2007).

4.5. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica do EEB das partes aéreas de *S. planicaulis*

Uma amostra de 7,0 g da fase clorofórmica das partes aéreas de *Sida planicaulis* foi submetida a uma filtração rápida (Esquema 3, pag. 48) utilizando uma coluna de vidro aberta, tendo como fase estacionária sílica gel e como fase móvel CHCl_3 e $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ até uma proporção $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 85:15, obtendo-se frações de 5 ml. Em seguida, as frações foram concentradas em rotaevaporador. Com realização de CCDA e análise de espectros de RMN ^1H

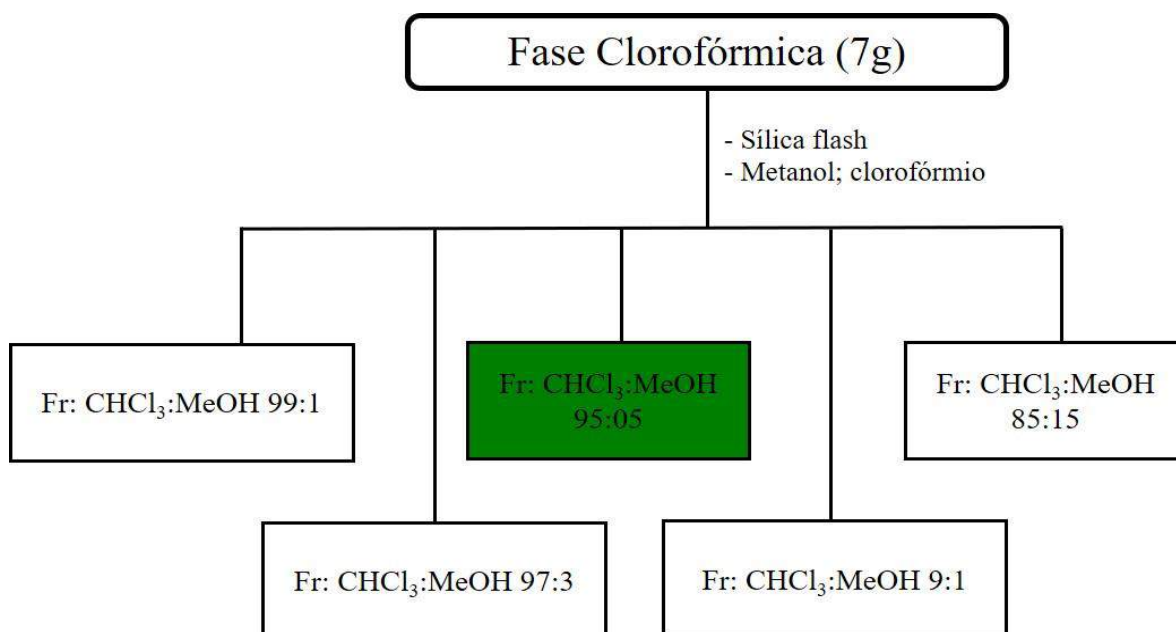
se decidiu desenvolver a pesquisa com a fração $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 95:05, pois se mostrou promissora para o isolamento de metabólitos secundários.

A fração $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 95:05 (930 mg) foi submetida ao processo cromatográfico em coluna com Sephadex LH-20, cujo sistema de eluição foi metanol 100% e MeOH:CHCl_3 (Esquema 4, pág. 49) de onde foram coletadas 66 frações de 15 mL cada, que foram concentradas em rotaevaporador e reunidas através de análise em CCDA, segundo semelhança do perfil cromatográfico (Esquema 4, pág. 49).

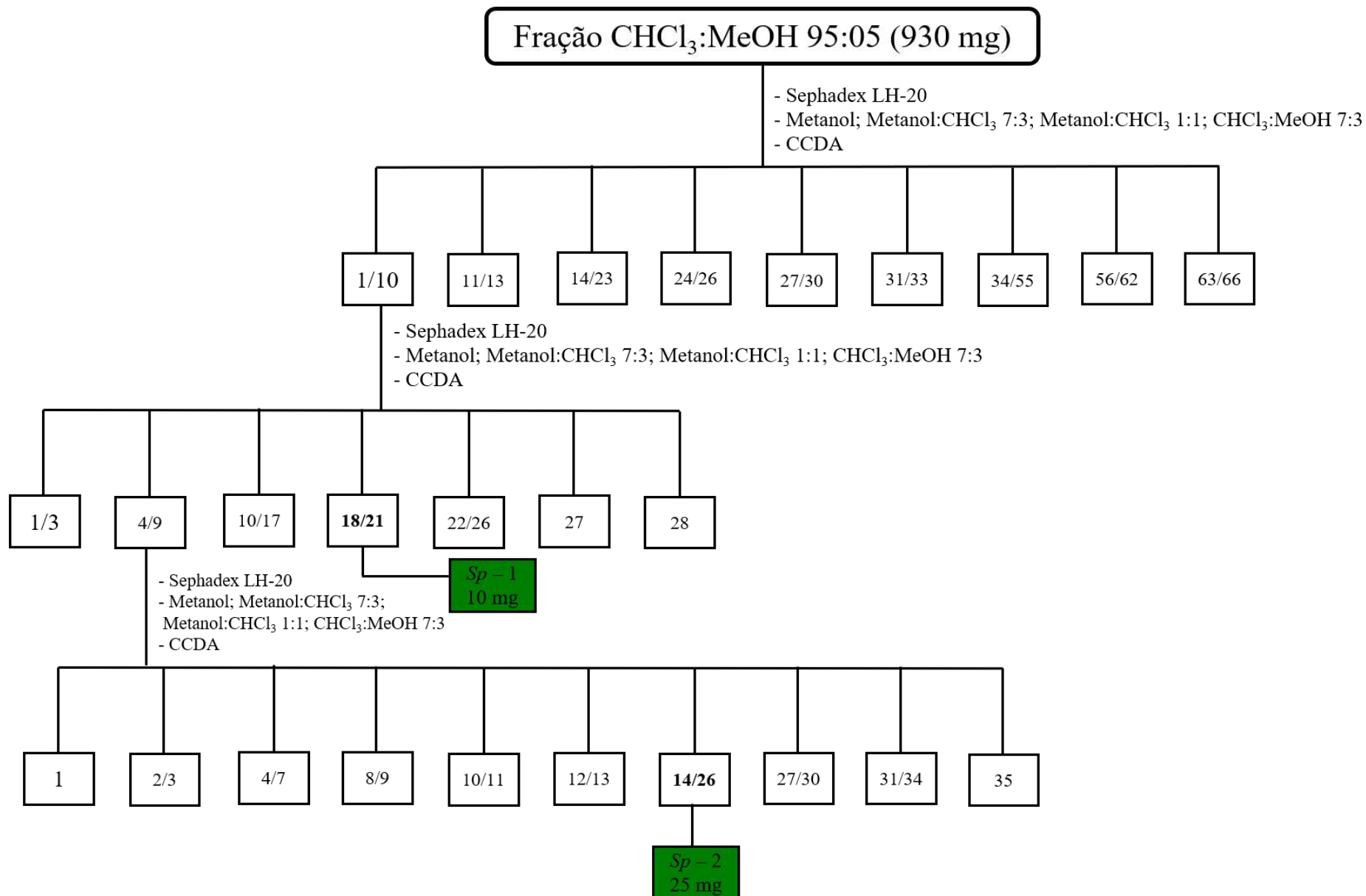
A fração 1/10 (630 mg), foi analisada em CCDA e submetida à processo cromatográfico utilizando a metodologia anterior que resultou em 28 frações de 15 ml cada. Estas foram concentradas em rotaevaporador, analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico em 7 sub-frações (Quadro 4, pág. 49). A sub-fração 18/21 (10,0 mg), apresentou-se em forma de cristais brancos, recebendo a codificação de **Sp-1**.

A fração 4/9 oriunda do fracionamento cromatográfico da fração 1/10, foi aplicada em uma coluna cromatográfica seguindo a mesma metodologia e resultou em 35 frações, as quais foram analisadas por CCDA e agrupadas, levando-se em consideração a semelhança do deslocamento na placa cromatográfica (Esquema 4, pág. 49). Destas a sub-fração 14/26 (25 mg) apresentou-se como cristais amarelo tijolo e foi codificada como **Sp-2**.

Esquema 3: Filtração à vácuo da fase clorofórmica obtida do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis*.



Esquema 4: Fracionamento cromatográfico das frações 1/10 e 4/9 da fase clorofórmica do EEB das partes aéreas de *S. planicaulis*.



Quadro 3: Frações obtidas e reunidas após fracionamento cromatográfico da fração 1/10 oriunda da fração CHCl₃:MeOH 95:05 (Esquema 4, pág. 48).

ELUENTE	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	
Metanol	1-5	1-3	22-26
MeOH: CHCl ₃ 7:3	6-13	4-9	27
MeOH: CHCl ₃ 1:1	14-21	10-17	28
CHCl ₃ :MeOH 7:3	22-28	18-21	

Quadro 4: Frações obtidas e reunidas após cromatografia em coluna da fração 4/9 da fração 1/10 oriunda da fração CHCl₃:MeOH 95:05 (Esquema 4, pág. 48).

ELUENTE	FRAÇÕES OBTIDAS	FRAÇÕES REUNIDAS	
Metanol	1-13	1	12-13
MeOH: CHCl ₃ 7:3	14-20	2-3	14-26
MeOH: CHCl ₃ 1:1	21-25	4-7	27-30
CHCl ₃ :MeOH 7:3	26-35	8-9	31-34
		10-11	35

4.6. Extração em fase sólida (SPE) e obtenção dos espectros de massa

Os experimentos para identificação por Espectrometria de massas dos metabólitos secundários no EEB e suas fases foram realizados sob supervisão da Prof. Dr. Wagner Vilegas no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais – LBPN/UNESP – Campus do Litoral Paulista/São Vicente- SP.

Para analisar o EEB e as fases foi realizada uma CCDA usando como fase móvel uma mistura de Ac. fórmico:Ac. acético:Acetato de etila:Água (5:6:1:4 (v/v) e como padrão rotina. Utilizou-se como reveladores, luz UV (254 e 365 nm), anisaldeído/H₂SO₄ e NP/PEG (WAGNER et al., 2009 e SILVA, 2016).

Inicialmente o EEB e suas fases foram submetidos a etapa de Clean-up em cartucho SPE C18, objetivando eliminar compostos indesejáveis como clorofila e proteínas que podem interferir no método (Figura 6, pág. 51).

Figura 6: Comparação do EEB antes (1) e após a SPE C18 (2).



O cartucho SPE (Vac C18) Sep-Pak® foi ativado com MeOH e equilibrado com MeOH:H₂O (9:1). 20 mg do EEB e das suas fases foram solubilizadas em MeOH:H₂O (9:1) e submetida à extração em fase sólida utilizando como eluentes MeOH:H₂O (9:1) e MeOH para limpeza do cartucho. As frações obtidas após o processo de clean-up tiveram o solvente eliminado por evaporação à temperatura ambiente. Em seguida, foram pesadas em balança analítica e solubilizadas em MeOH grau analítico obtendo-se solução na concentração de 1 mg/mL, 20 µL desta solução foi transferida para vial completando-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se amostras em solução a 20 ppm. Este procedimento foi realizado com todas as amostras.

As condições utilizadas para a realização da técnica de espectrometria de massas foram: voltagem do capilar de -35v, temperatura do spray 165 °C, temperatura do capilar 280 °C e hélio como gás de arraste.

O Espectrômetro de massas utilizado foi o LTQ XL (ESI-IT-MSⁿ, Thermo Scientific®), equipado com dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção de fluxo contínuo (FIA), no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo *íon-trap* (IT).

Os espectros foram obtidos em modo negativo, a faixa de íons com m/z de 85 a 1000 Da. Este modo foi escolhido devido ao conhecimento prévio da presença de flavonóides nas espécies em estudo e que essa classe de metabolitos ioniza facilmente pela desprotonação das hidroxilas fenólicas.

A primeira etapa executada foi uma varredura completa (full scan) para a obtenção dos íons na faixa escolhida e em seguida aconteceu as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2 , MS^n) obtidas de íons pré-selecionados no full scan. O software utilizado para realizar aquisição e o processamento dos dados espectrométricos foi o Xcalibur versão 2.2 (Thermo Finigan®).

4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana de *Sida planicaulis* Cav.

4.7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do EEB, suas fases e alcaloide isolado de *Sida planicaulis*

O EEB, suas fases e a substância *Sp-1* (sal da criptolepina) tiveram o seu poder antimicrobiano avaliado frente as cepas potencialmente patogênicas. Os ensaios foram realizados em parceria com a Professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB.

4.7.2 Produtos testados

Este estudo foi realizado com a fase hexânica (1), extrato etanólico bruto (2), fase hidroalcoólica (3), fase acetato de etila (4), fase clorofórmica (5) e o sal da criptolepina (6) de *Sida planicaulis* Cav.

4.7.3 Preparação das amostras

As amostras foram pesadas e devidamente solubilizadas em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter uma emulsão dos produtos na concentração inicial de 1024 $\mu\text{g/mL}$ (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

4.7.4 Obtenção dos microorganismos

Para realizar a avaliação antimicrobiana das amostras foram selecionadas 12 cepas de microorganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de fungos leveduriformes e filamentosos. As cepas utilizadas pertencem ao Laboratório de Micologia

(LM), onde 1 cepa é oriunda do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ INCQS-40113, 1 cepa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF-119-38 e outras 6 cepas padrão da “American Type Culture Collection” (ATCC).

As cepas testes foram *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853), *Escherichia coli* (ATCC-18739), *Escherichia coli* (LM-35), *Candida albicans* (ATCC-60193), *Candida albicans* (LM-38), *Candida tropicalis* (ATCC-13803), *Cryptococcus gatti* (INCQS-40113), *Cryptococcus neoformans* (FCF-119-38), *Cryptococcus neoformans* (LM-49), *Aspergillus flavus* (ATCC-1303), *Aspergillus niger* (LM-23). Foi realizado testes com 2 cepas da mesma espécie pois estas apresentavam origem diferente, como por exemplo, *Candida albicans* (LM-38) oriunda do Laboratório de Micologia e *Candida albicans* (ATCC-60193) que é uma cepa padrão utilizada no laboratório.

As cepas bacterianas foram mantidas em BHI (Brain Heart Infusion) e os fungos em ASD (Agar Sabouraud Dextrose) a temperatura de 4°C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24-48 horas em BHI/ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e para os funos filamentosos repiques de 7-14 dias em ASD, incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.7.5 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para manutenção foram BHI e ASD adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France, respectivamente para as cepas de bactérias e fungos. E para os ensaios de atividade biológica, foram usados meio nutriente líquido Brain Heart Infusion (BHI) para as bactérias e RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato para os fungos (Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

4.7.6 Preparação do inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias foram obtidas de culturas das cepas de bactérias em meio BHI e fungos em meio ASD, foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril. As suspensões tiveram sua turbidez comparadas e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2015; CLSI^a, 2008; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991; ANTUNES et al., 2006; FREIRE et al., 2014).

4.7.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland & Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das amostras sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em meio líquido em placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 μL de caldo RPMI/BHI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μL das substâncias foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 $\mu\text{g/mL}$ até 64 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, foi adicionado 10 μL das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (CBHI + bactérias e RPMI + leveduras ou fungos filamentosos) e meio de cultura (RPMI/CBHI), para comprovação da viabilidade das cepas e esterilidade do meio e controle negativo com antibióticos: Gentamicina (64 $\mu\text{g/mL}$) para inibição das bactérias e Anfotericina B (32 $\mu\text{g/mL}$) para inibição dos fungos.

As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras, já os fungos filamentosos foram incubados a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias.

No caso do ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 μL de solução do corante resazurina a 0,01% (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). O ensaio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 h. Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano.

A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador.

A atividade antimicrobiana das amostras foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, levando em consideração os seguintes critérios: concentração até 600 $\mu\text{g/mL}$ = forte atividade; 600-1500 $\mu\text{g/mL}$ = moderada atividade; acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ = fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

5. Resultados e Discussão



5.1 Triagem Fitoquímica do EEB e suas fases de *Sida planicaulis* Cav.

Os testes de caracterização de metabólitos secundários sugeriram a presença no material analisado de esteroides, triterpenos, alcalóides, flavonoides, saponinas e taninos (SOBREIRA, et al., 2018).

5.2. Substâncias isoladas do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae)

O estudo fitoquímico realizado da fase clorofórmica do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis* levou ao isolamento de dois constituintes químicos: 6,7-Diidroxi-2H-cromon-2-ona (Esculetina – *Sp-1*) e Sal da criptolepina – *Sp-2* (Quadro 5, pág. 56).

Quadro 5: Substâncias isoladas das partes aéreas de *Sida planicaulis* Cav.

Constituintes	Estrutura química
6,7-Diidroxi-cumarina Esculetina (<i>Sp-1</i>) $C_9H_6O_4$	
Sal da criptolepina (<i>Sp-2</i>) $C_{16}H_{17}^+N_2$	

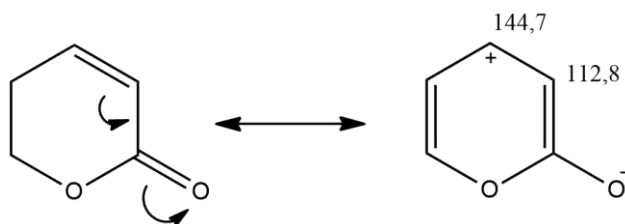
5.3. Caracterização estrutural das substâncias isoladas do EEB de *Sida planicaulis*

5.3.1 Caracterização estrutural de *Sp-1*

A substância codificada como *Sp-1* teve sua estrutura identificada pelo uso de Ressonância magnética Nuclear Uni e Bidimensional de 1H e ^{13}C .

No espectro de RMN ^1H (Fig. 8 e 9, pág. 58, Tabela 2, p. 57) observaram-se deslocamentos químicos para hidrogênios vinílicos em δ 6,20 (d, $J=9,4$ Hz, 1H) e δ 7,80 (d, $J=9,4$ Hz), cujo valor de J revela acoplamento *cis* entre ambos, sinais estes que ao comparações com dados da literatura (Tabela 2, pág. 57) tem podemos propor que tratar-se-ia dos hidrogênios H-3 e H-4 respectivamente, de núcleo cumarínico. Estes sinais, juntamente com dois simpletos observados em δ 6,96 (1H) e δ 6,77 (1H), referentes aos hidrogênios H-5 e H-8 de anel aromático tetrasubstituído e com padrão de oxigenação nos carbonos C-6 e C-7 (Tabela 2, pág. 57) fortalecem a proposta de que Sp-1 possui um núcleo cumarínico.

Pela análise do espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 10, pág. 59, Tabela 2, pág. 57) distinguiram-se absorções para nove átomos de carbono. Os sinais intensos de substâncias da classe das cumarinas em δ 112,8 e δ 144,7 foram atribuídos aos carbonos C-3 e C-4 respectivamente (STEIN, 2005), que se referem aos carbonos sp^2 de lactona α , β -insaturada (PAVIA, 2010). Os deslocamentos químicos destes carbonos, um estando mais desprotegido (δ 144,7) e outro mais protegido (δ 112,8) são devidos ao efeito de ressonância existentes entre a dupla ligação e a carbonila do anel lactônico (PAVIA, 2010), conforme ilustração:



Os sinais de deslocamentos dos grupamentos -CH observados em δ 113,04 e δ 103,6 correspondem aos carbonos C-5 e C-8. Além destes sinais foi possível identificar ainda a presença de mais 4 sinais de carbono aromático em δ 146,1 (C-6), 150,4 (C-7), 150,0 (C-9) e 112,4 (C-10) (Figura 10, pág. 59).

Quanto ao anel aromático da cumarina, sugeriu-se que este estaria substituído nas posições 6 e 7 por grupos hidroxilas, visto que não existem sinais referentes a outros grupos e não se observou acoplamentos entre os hidrogênios em H-5 δ 6,96 e H-8 δ 6,77. Com isto, os dados de RMN ^1H e ^{13}C permitiram sugerir que Sp-1 tratava-se da diidroxycumarina. Esta sugestão foi fortalecida após comparações com dados descritos na literatura (Tabela 2, pág. 57) (GRIFFITI e MOSTAFA, 1992; KIM et al., 2000; WU et al., 2007).

A análise dos espectros de RMN ^1H - ^{13}C obtidos pela técnica HMBC (Figura 11 e 12, pág. 59 e 60) fortaleceram a proposta de que Sp-1 tratava-se de uma diidroxycumarina ao exibir

correlações a J^2 entre H-3/C-2; H-4/C-3 e C-10; H-5 com C-6 e C-10 e H-8 com C-7 e C-9, como também correlações a J^3 entre H-3 com C-10; H-4 com os C-5 e C-9; H-5 com C-7 e C-9, além de H-8 com C-6 e C-10.

Após análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparações com dados da literatura (Tabela 2, pág. 59) composto *Sp-1* foi identificado como 6,7-diidroxycumarina, esculetina. Substância esta isolada pela primeira vez na espécie *Sida planicaulis*.

Tabela 2: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Sp-1* (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) com os modelos da literatura *Mo-1* (δ , $\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O}$ 2:1) (GRIFFITI e MOSTAFA, 1992).

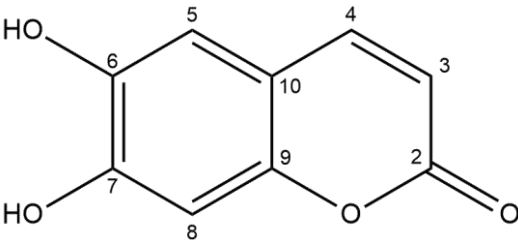
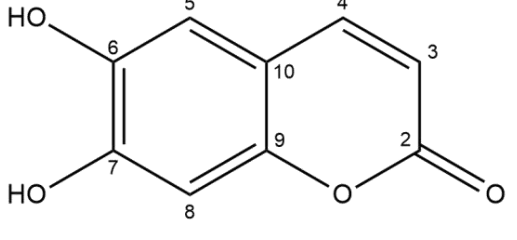
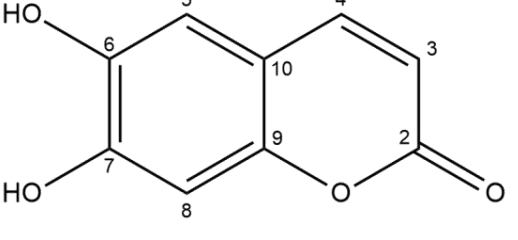
<i>Mo-1</i>			<i>Sp-1</i>		HMBC de <i>Sp-1</i>		
							
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	^2J	^3J	^4J
2	-	163,4	-	164,3	-	-	-
3	6,15 (d, J= 9,4 Hz, 1H)	112,4	6,20 (d, J=9,4 Hz, 1H)	112,8	C-2	C-10	-
4	7,85 (d, J=9,4 Hz, 1H)	145,9	7,80 (d, J=9,4, 1H)	146,1	C-3	C-2/C-9	C-8
5	6,96 (s, 1H)	113,5	6,96 (s,1H)	113,0	C-6	C-4/C-7	C-8
6	-	143,4	-	144,4	-	-	-
7	-	150,8	-	150,4	-	-	-
8	6,73 (s,1H)	103,7	6,77 (s,1H)	103,6	C-7	C-9/C-10	C-4
9	-	149,5	-	150,0	-	-	-
10	-	112,2	-	112,4	-	-	-

Figura 7: Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de *Sp-1*.

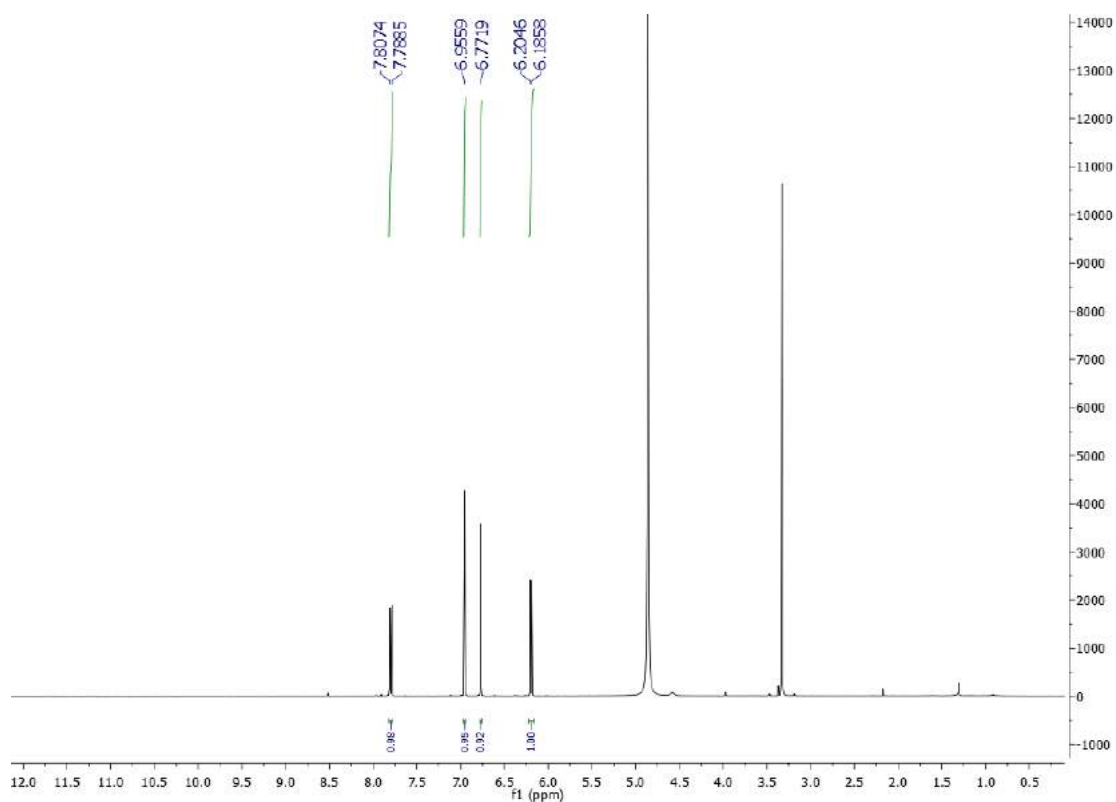


Figura 8: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de *Sp-1*.

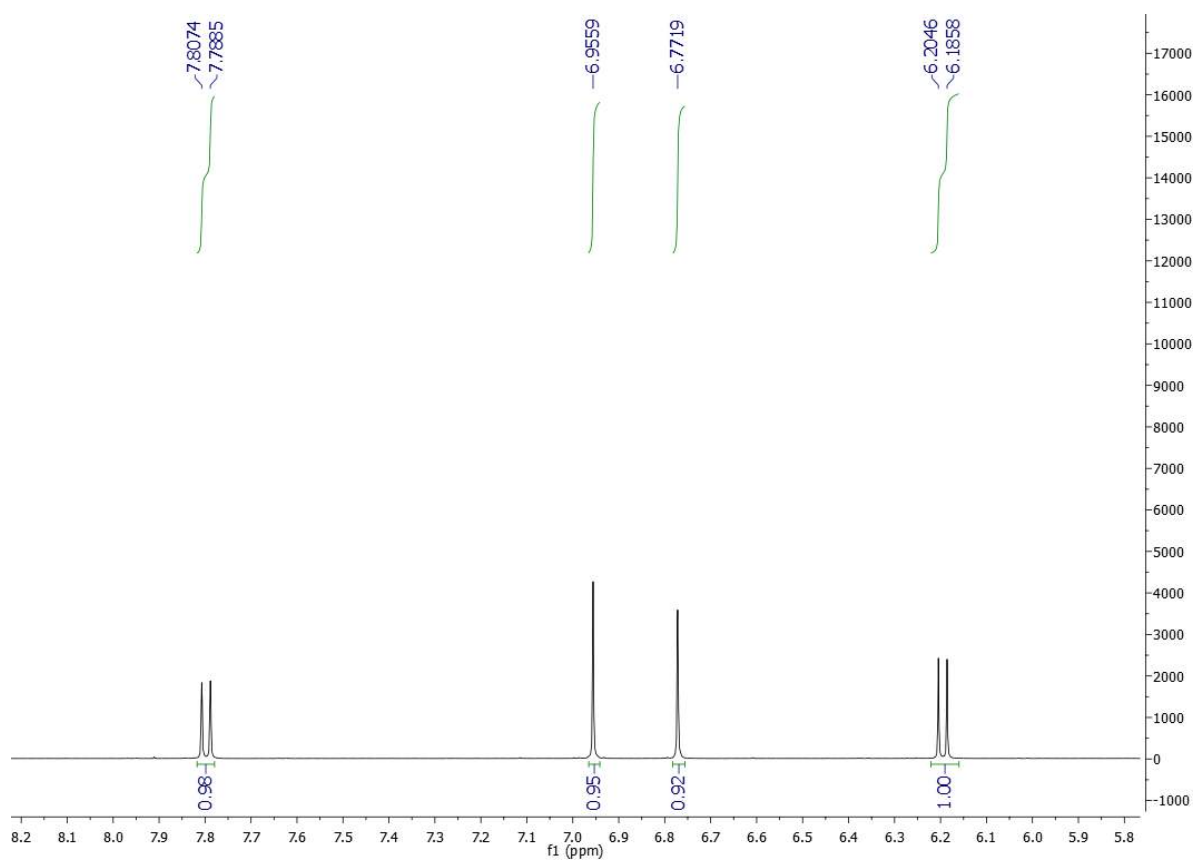


Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 MHz) de *Sp-1*.

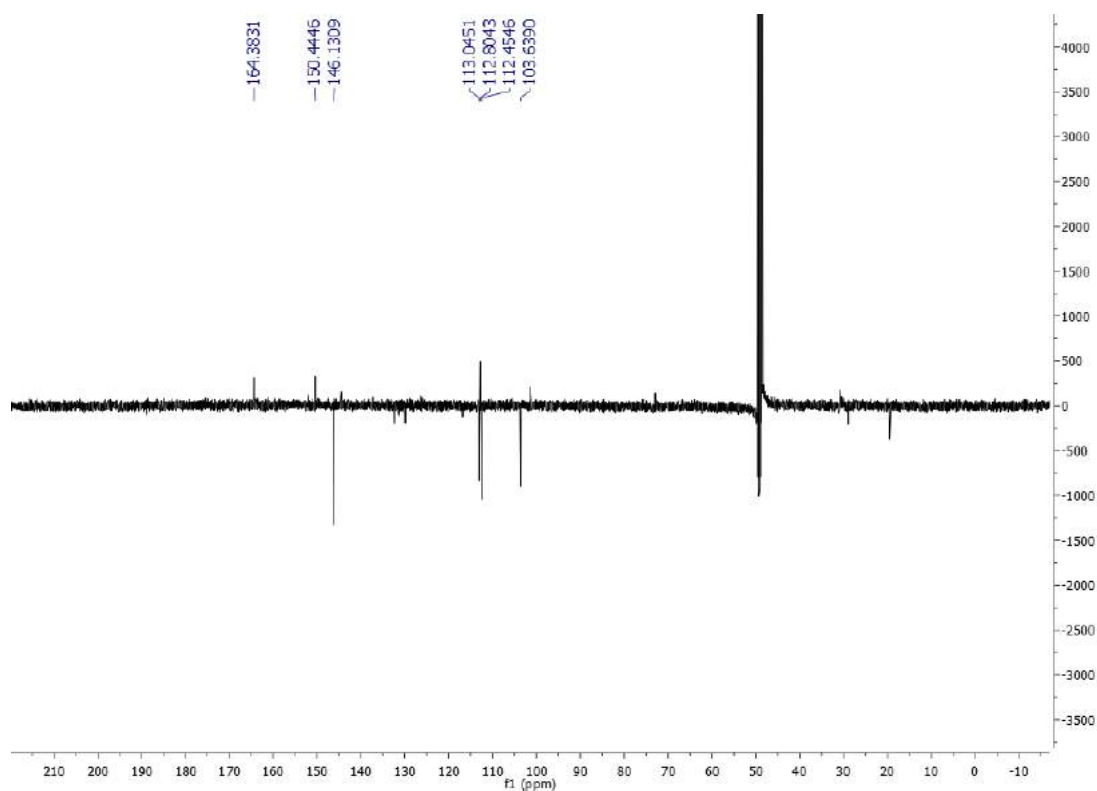


Figura 10: Espectro de HMBC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de *Sp-1*.

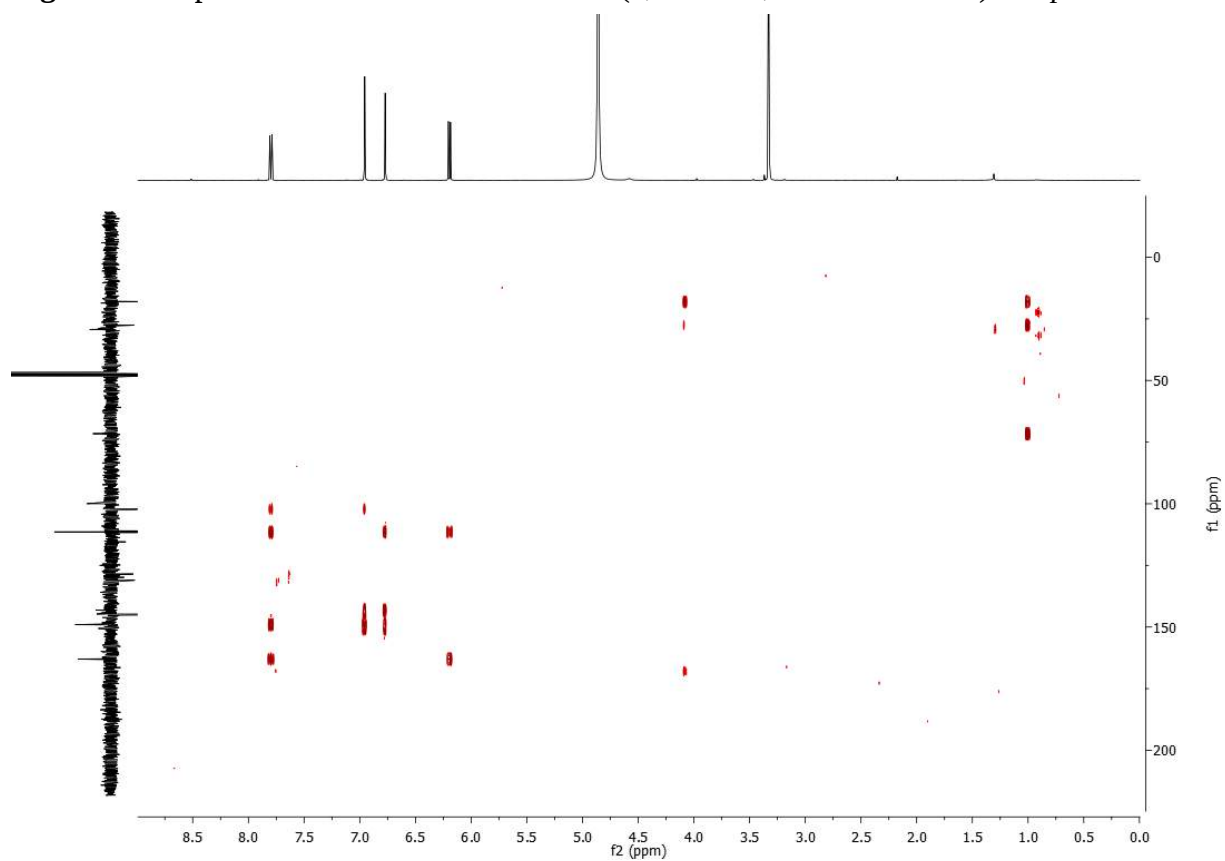
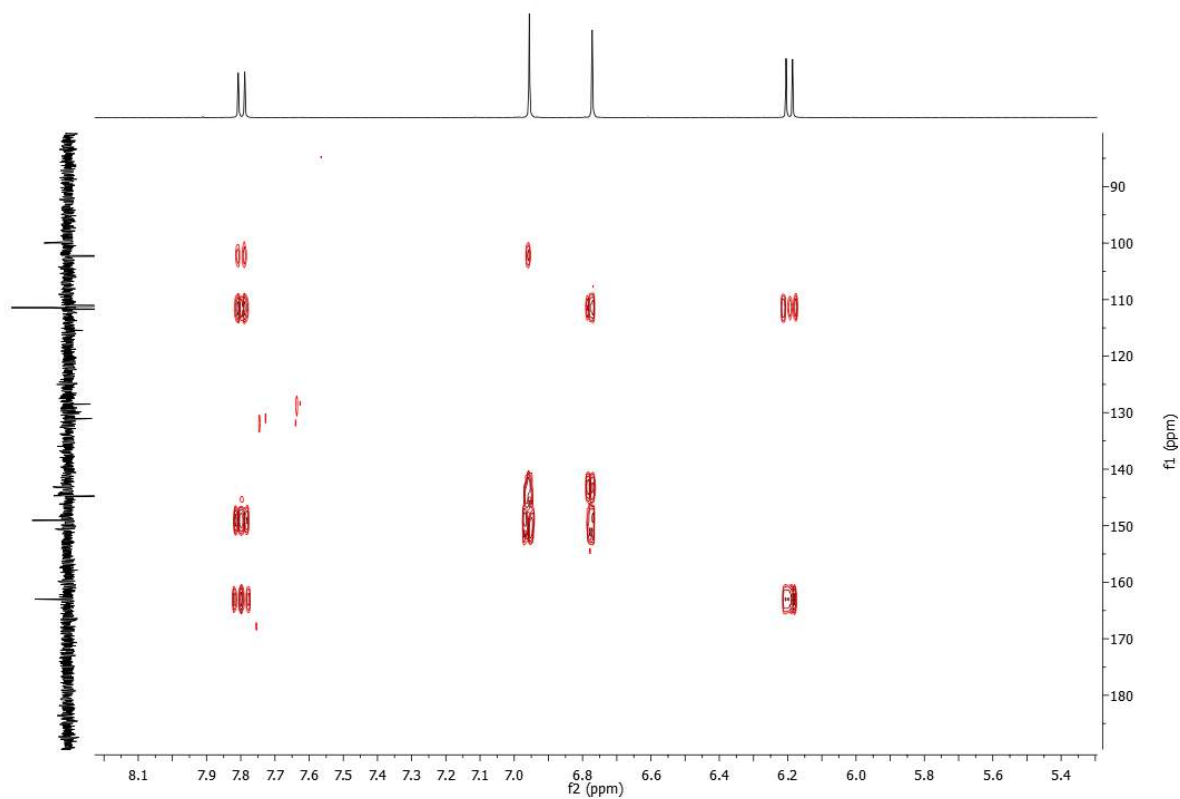


Figura 11: Expansão do Espectro de HMBC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de *Sp-1*.



5.3.2. Caracterização estrutural de *Sp-2*

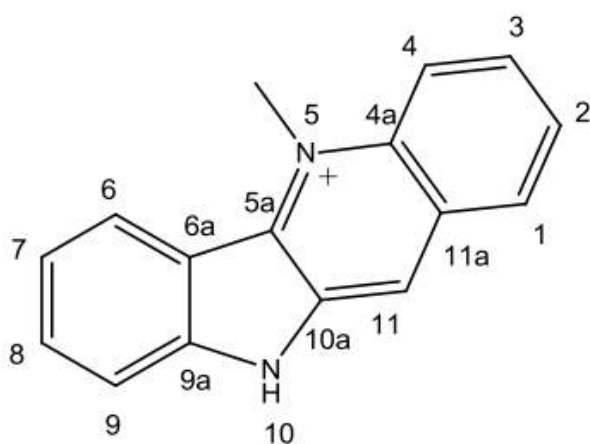
A substância codificada como *Sp-2*, apresentou-se na forma de cristais amarelo tijolo, com Ponto de Fusão acima de 300°C.

A análise do espectro de RMN ^1H (δ , 400 MHz, CD_3OD) e suas expansões (Figuras 13 e 14, pág. 64) apresentaram absorções para hidrogênios na região de aromáticos com padrão de alcaloides indoquinolínicos não substituídos entre as posições 1-4, 6-9 entre δ_{H} 7,54 e δ_{H} 8,76 (Mo-1 e Mo-2, pág. 62) (Tabela 3, pág. 63) (TOUSEK et al., 2008; CHAVES et al., 2013). Um simpleto em δ_{H} 9,14 (Figura 14, pág. 64) nos levou a entender que a posição 11, de *Sp-2*, estava livre (TOUSEK et al., 2008; CHAVES et al., 2013). O espectro de RMN ^1H mostrou também um simpleto em δ_{H} 5,10 com integral para 3 hidrogênios (Figura 13, pág. 64), condizente com um grupo metila ligado ao N do anel quinolínico (CHAVES et al., 2017), levando assim a propor a estrutura da criptolepina (Mo-1, pág. 62) para a molécula em análise.

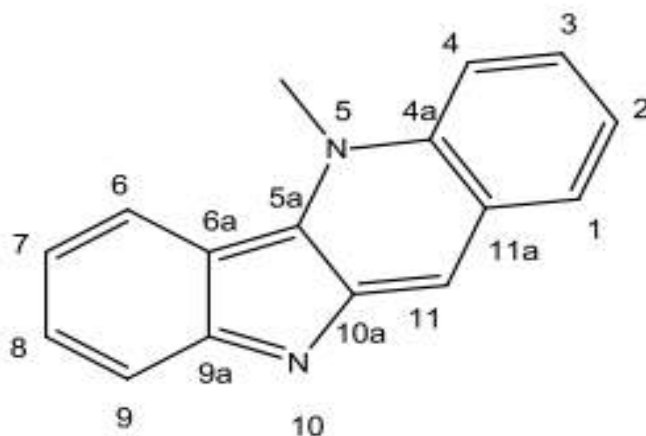
Ao compararmos os dados dos deslocamentos de ^1H e ^{13}C da substância *Sp-2* (tabela 6, pág. 77) com os dados do alcaloide criptolepina (Figura 12, pág. 63), que apresenta um núcleo indoquinolínico, foram encontrados valores com diferenças superior a 0,1 ppm para alguns

hidrogênios. Desta forma, foi sugerido que o composto em estudo poderia ser a criptolepina na sua forma protonada, observando o N do anel quinolínico é metilado a molécula torna-se mais básica, e apresenta-se na forma de sal (CHAVES et al., 2017).

Figura 12: Estrutura do Sal da Criptolepina e da Criptolepina.



Sp-2 = Mo – 2
Sal da criptolepina



Mo – 1
Criptolepina

O espectro de RMN ^{13}C de *Sp-2*, utilizando a técnica APT (Figura 15 e 16, pág. 65) exibiu 16 sinais, sendo 15C atribuídos ao núcleo indoquinolínico e 1C referente ao grupo metila ligada ao N-5 (Tabela 3, pág. 63). Os carbonos monohidrogenados foram definidos pelas correlações bidimensional $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ e análise do espectro HMQC (Figura 17, pág. 66) e suas expansões (Figura 18, pág. 66).

A proposta de que *Sp-2* trata-se da criptolepina na forma de sal (Pág. 63), foi consolidada após comparações com dados de RMN de ^1H e ^{13}C encontrados na literatura (CHAVES et al., 2017). A diferença mais óbvia entre os espectros de RMN ^{13}C da criptolepina e o seu sal é o deslocamento de C-9a de δ_{C} 160,0 para δ_{C} 148,0 ppm, confirmando que o padrão típico de conjugação da criptolepina não está mais presente na molécula protonada (TOUSEK et al., 2007).

O espectro de mapa de contorno bidimensional HMBC de *Sp-2* e suas expansões (Figuras 19 e 20, pág. 67), mostraram as correlações de diferentes H a duas (^2J) e três ligações (^3J) com diversos carbonos, possibilitando fortalecer os deslocamentos químicos atribuídos.

Após comparações dos dados obtidos por RMN ^1H , ^{13}C e do HMBC de *Sp-2* com informações encontradas na literatura (Tabela 3, pág. 65) concluiu-se que a substância tratava-se da 5-N-metil-6,9,10,10a-tetraidro-4aH-indol[3,2-b]quinolin-5-a (Sal da criptolepina- $\text{C}_{16}\text{H}_{17}^+\text{N}_2$), substância isolada anteriormente do gênero *Sida*, nas espécies *Sida acuta* (AHMED et al., 2011), *Sida rhombifolia* (CHAVES et al., 2016) e relatada pela primeira vez na espécie *Sida planicaulis* Cav.

Tabela 3: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Sp*-2 (δ , 400 e 100 MHz) com os modelos da literatura Mo-1 (δ , DMSO - d_6 , 500 e 125 MHz) (TOUSEK et al., 2008) e Mo-2 (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) (CHAVES et al., 2017).

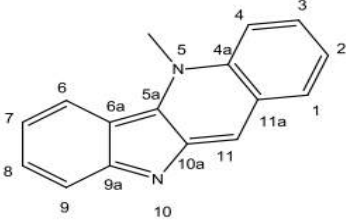
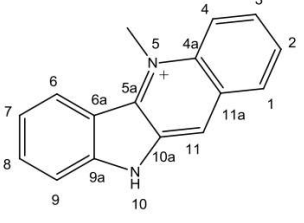
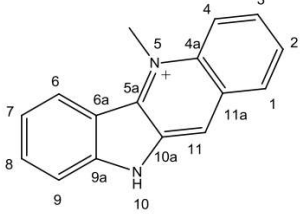
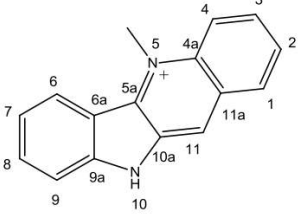
Mo-1 (Criptolepina)			Mo-2 (Sal da criptolepina)		<i>Sp</i> -2		HMBC de <i>Sp</i> -2	
								
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	^2J	^3J
1	8,38 (dd, $J = 8,2; 1,5$ Hz)	129,6	8,40 (dl, $J = 8,0$ Hz, 1H)	131,0	8,48 (dl, $J = 9,0$ Hz, 1H)	131,1	C-11a /C2	-
2	7,69 (ddd, $J = 8,2; 6,8; 0,8$ Hz)	123,9	7,90 – 7,81 (7,86 m, 2H)	128,2	7,94 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H)	128,0	-	C4/C11a
3	7,90 (ddd, $J = 8,4; 6,8; 1,5$ Hz)	128,9	8,12 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H)	133,8	8,20 – 8,16 (8,19 m, 1H)	133,9	-	C1/ C4a
4	-	116,6	8,57 (dl, $J = 8,9$ Hz, 1H)	118,1	8,66 (dl, $J = 9,1$ Hz, 1H)	118,3	-	C2/C11a
4a	-	132,8	-	137,0	-	137,2	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
5a	-	139,0	-	139,7	-	139,8	-	-
6a	-	113,8	-	115,2	-	115,3	-	-
6	8,49 (dd, $J = 8,5; 1,2$ Hz)	125,1	8,64 (dl, $J = 8,4$ Hz, 1H)	126,6	8,75 (dl, $J = 8,5$ Hz, 1H)	126,8	C6a	C5a/C8/C9
7	7,05 (ddd, $J = 8,5; 6,6; 1,1$ Hz)	116,6	7,47 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H)	122,8	7,56 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H)	123,0	-	C9/C6a
8	7,54 (ddd, $J = 8,5; 6,6; 1,1$ Hz)	130,4	7,90 – 7,81 (7,86 m, 2H)	135,2	7,94 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H)	135,1	-	C9a
9	7,66 (dd, $J = 8,5; 1,1$ Hz)	119,5	7,75 (dl, $J = 8,2$ Hz, 1H)	114,4	7,83 (dl, $J = 8,4$ Hz, 1H)	114,3	-	C6a/C7
9a	-	160,0	-	148,2	-	147,8	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
10a	-	144,4	-	135,3	-	135,4	-	-
11	8,93 (s)	126,2	9,03 (s)	126,1	9,14 (s)	126,1	-	C1/C4a/C5a
11a	-	124,4	-	127,9	-	128,4	-	-
N-CH ₃	4,91 (s)	38,9	5,02 (s)	40,5	5,10 (s)	40,7	-	C4a/C5a

Figura 13: Espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de *Sp-2*.

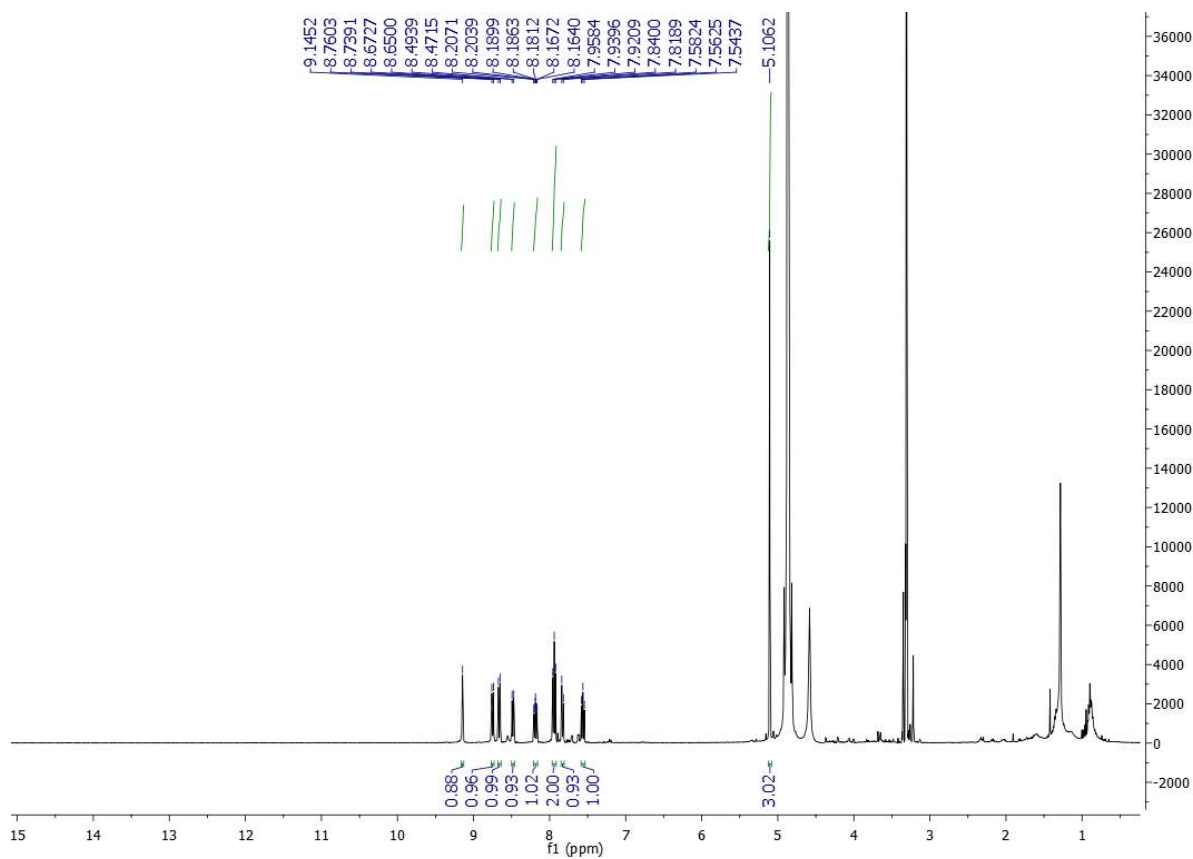


Figura 14: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CD_3OD , 400 MHz) de *Sp-2*.

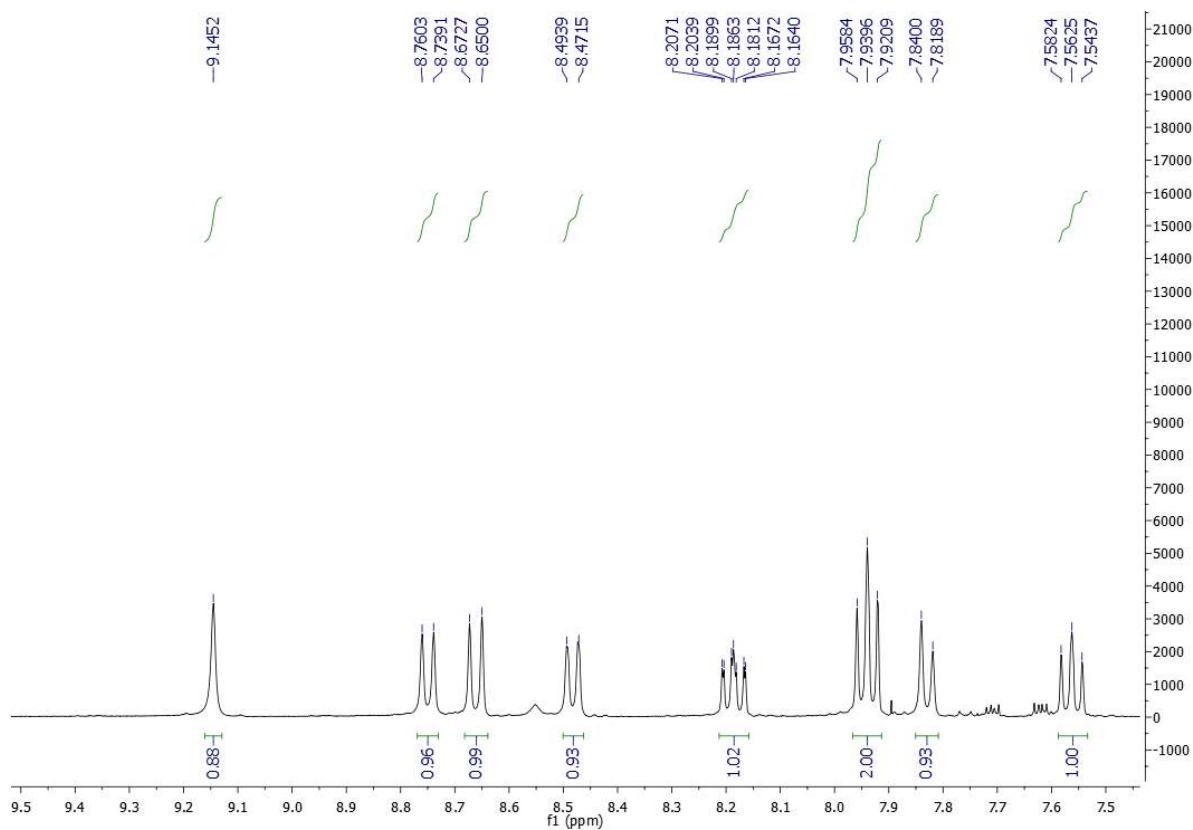


Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 100 MHz) de *Sp-2*.

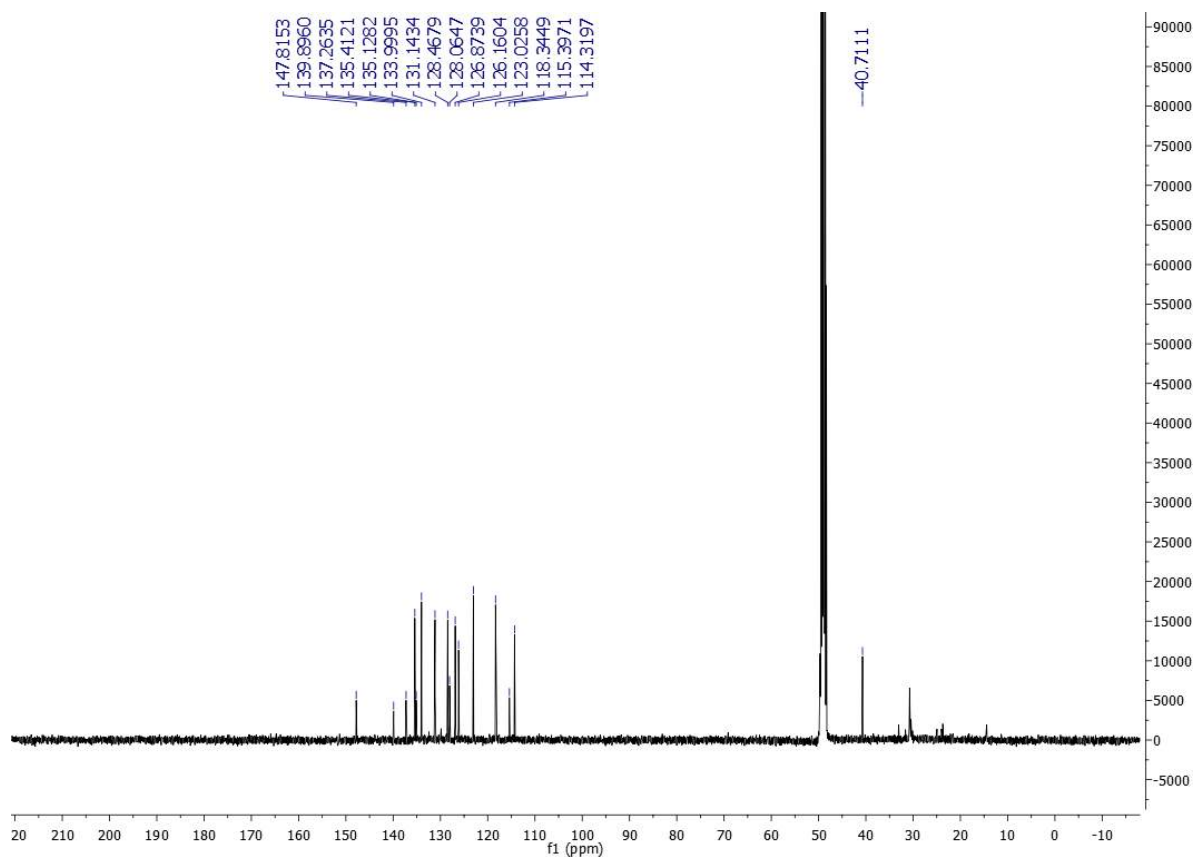


Figura 16: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , CD_3OD , 100 MHz) de *Sp-2*.

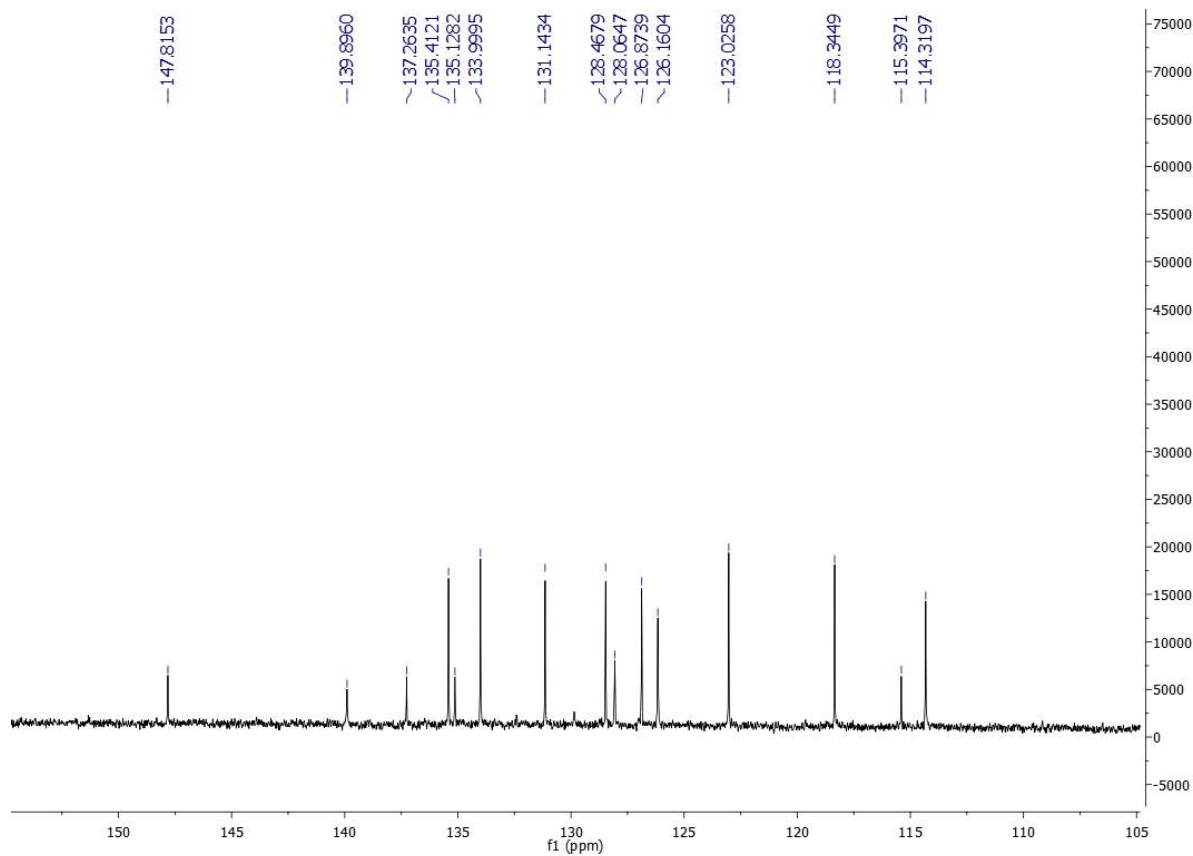


Figura 17: Espectro de HMQC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de *Sp*-2.

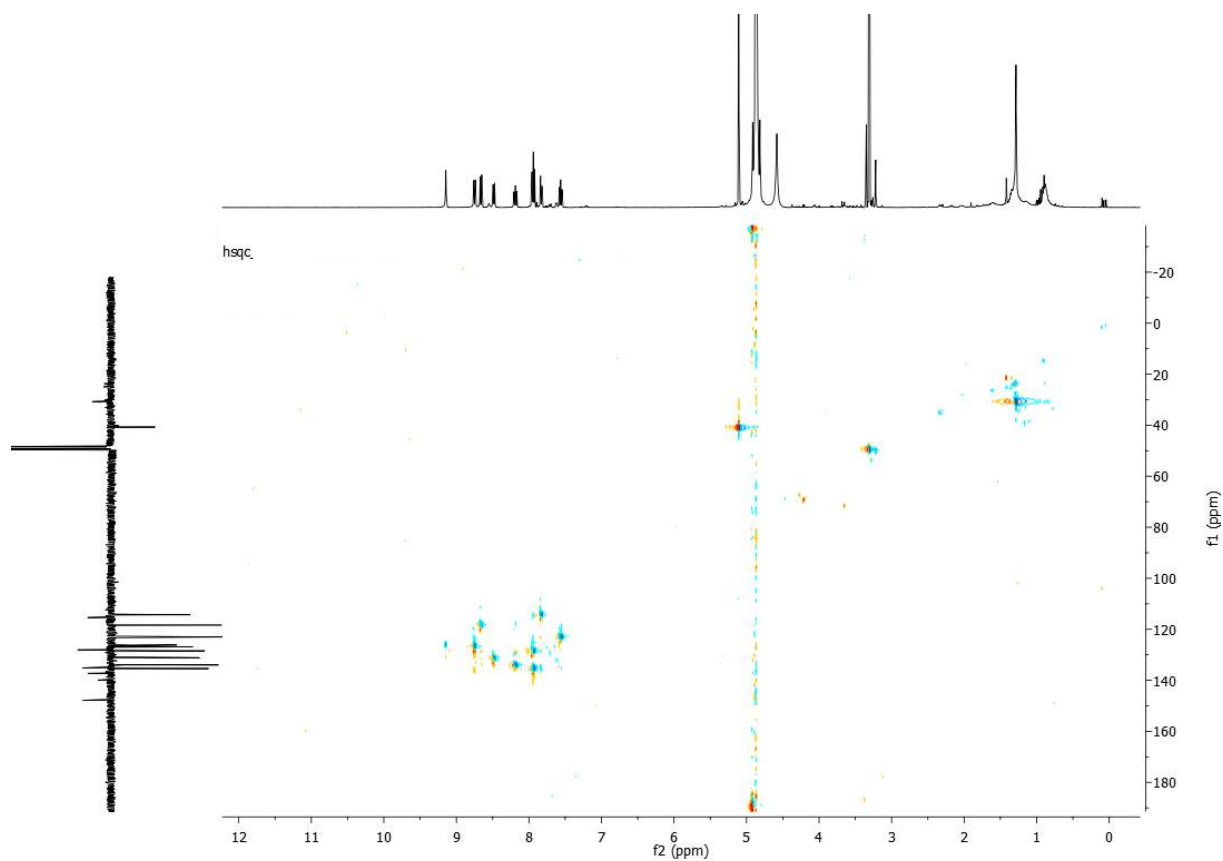


Figura 18: Expansão do espectro HMQC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) *Sp*-2.

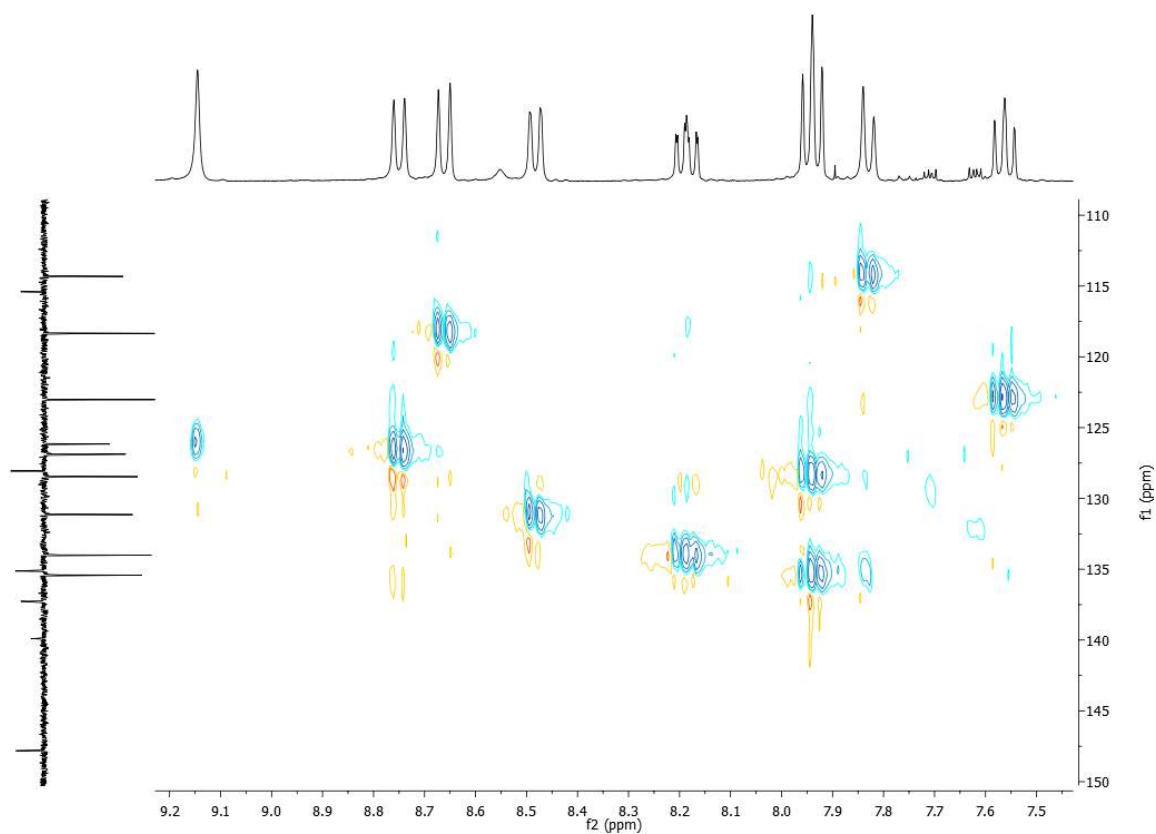


Figura 19: Espectro de HMBC RMN ^1H E ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) de *Sp*-2.

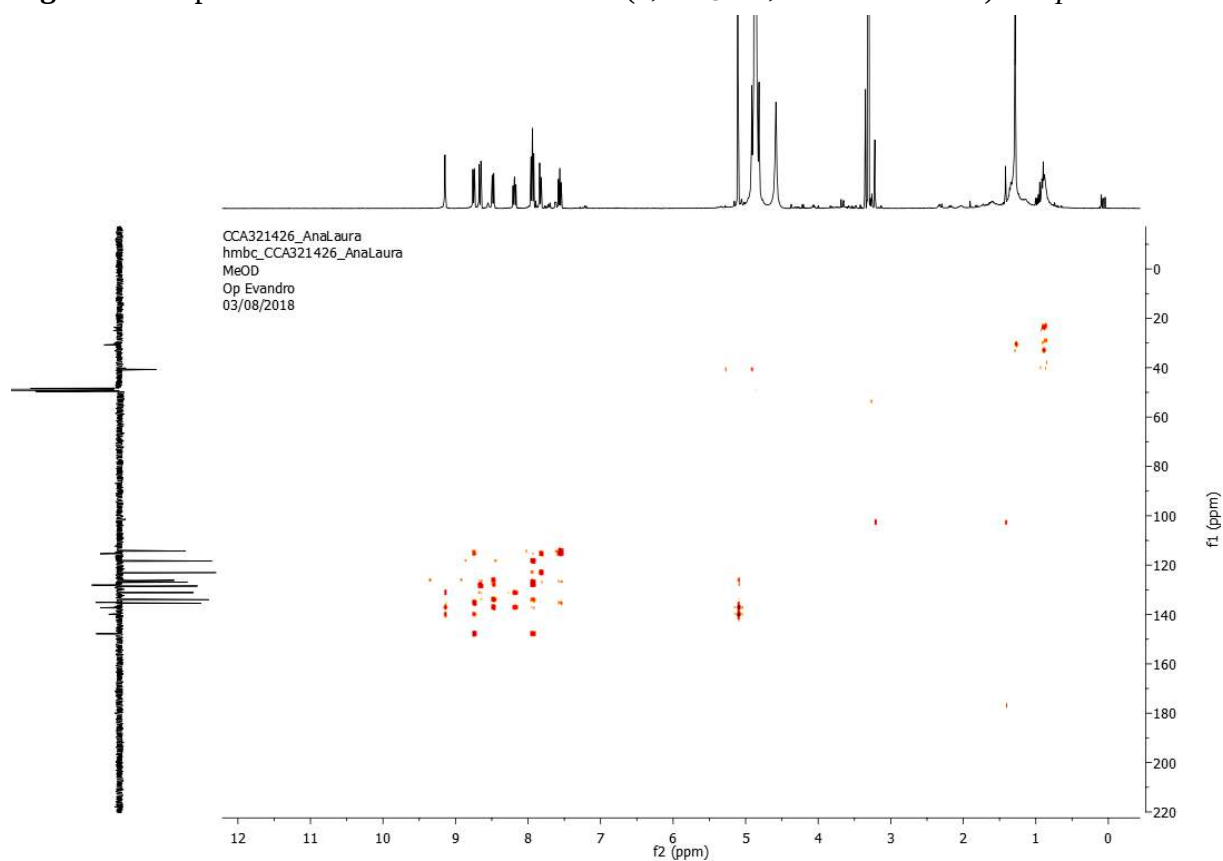


Figura 20: Expansão 1 do espectro HMBC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) *Sp*-2.

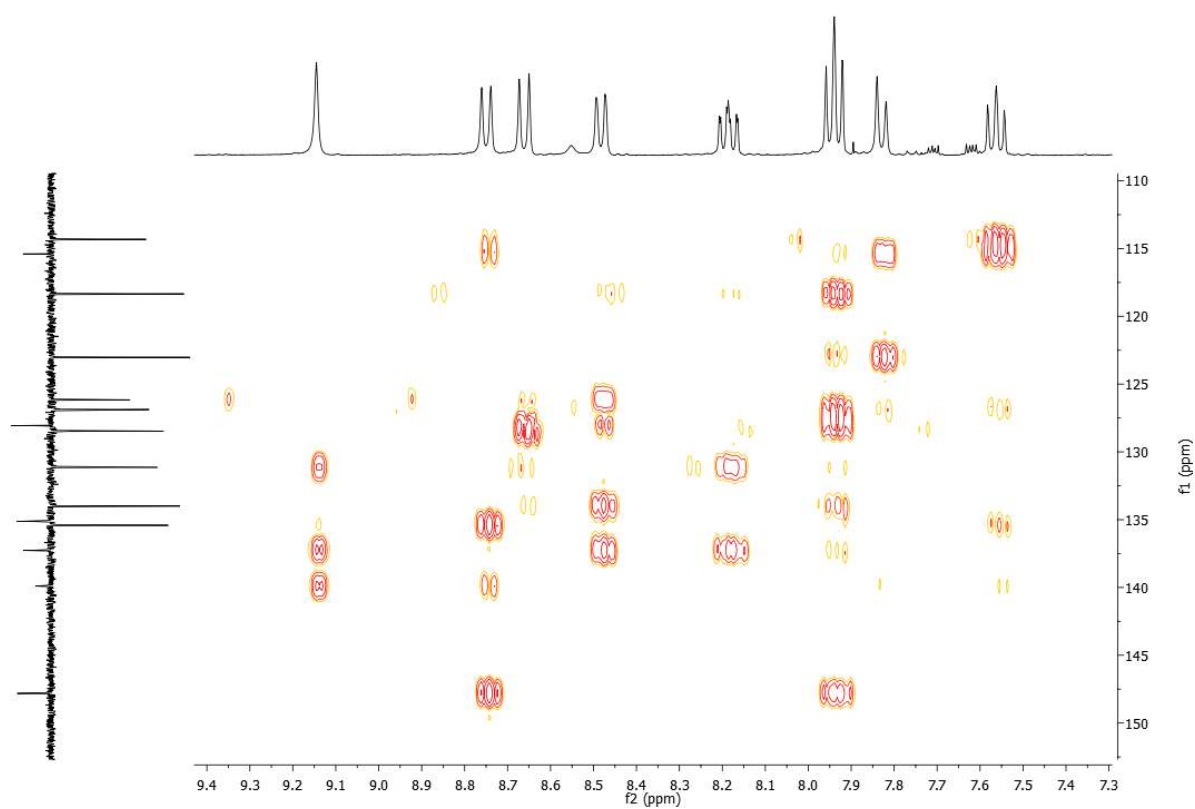
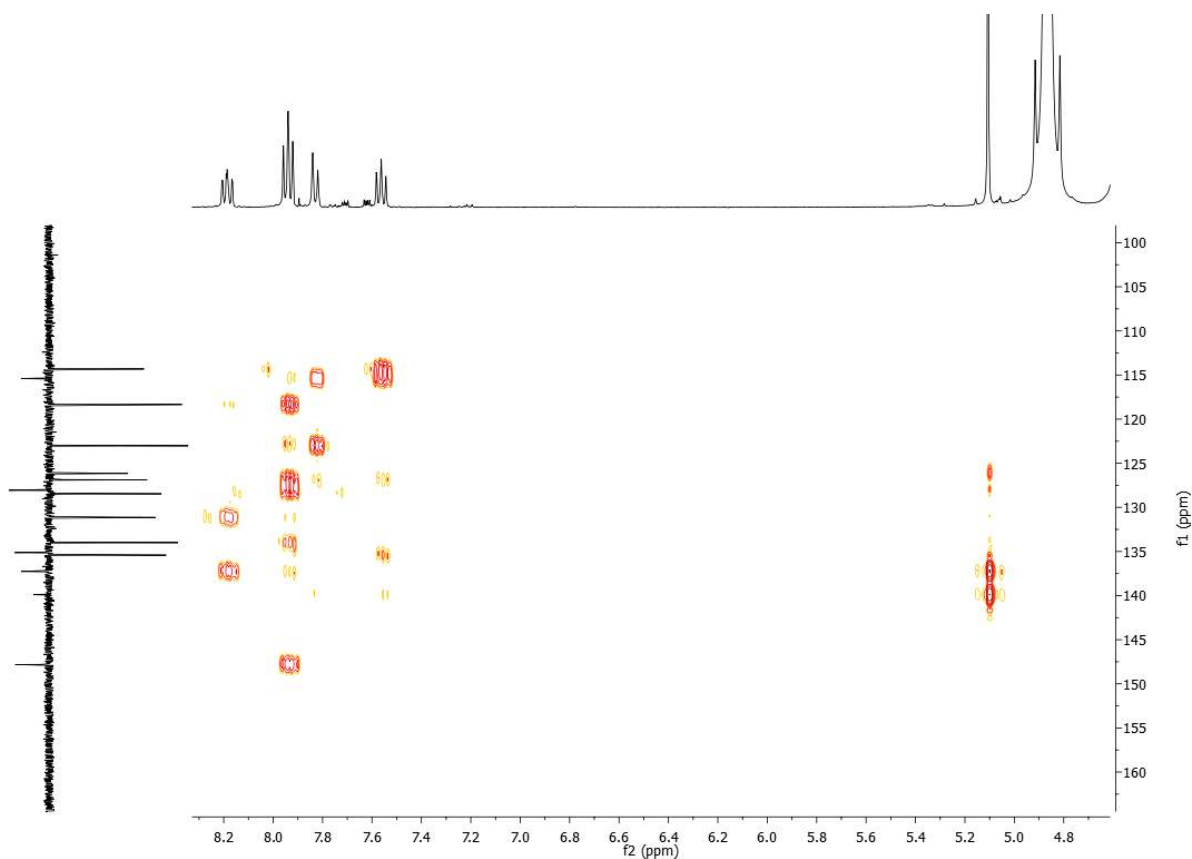


Figura 21: Expansão 2 do espectro HMBC RMN ^1H e ^{13}C (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) *Sp*-2.



5.4 Substâncias identificadas por FIA-ESI-IT-MSⁿ no EEB e fases das partes aéreas de *Sida planicaulis*

Os espectros de massas do EEB e das fases das partes aéreas de *S. planicaulis* foram obtidas empregando-se a técnica ESI-IT-MS. Os compostos foram caracterizados com base em seus espectros de massa, usando o íon precursor, íons fragmento e comparação das fragmentações com moléculas descritas na literatura (Tabela 4, pág. 91). Assim, foi possível sugerir a composição química presente nas amostras analisadas.

Após análise dos espectros foi observado que a mesma substância era encontrada em diferentes fases (Quadro 6, pág. 71), e foram discutidas apenas uma vez. Os espectros do EEB e fase hidroalcoolica apresentaram uma maior quantidade de substâncias.

Quadro 6: Compostos químicos identificados por FIA-ESI-IT-MS no EEB e nas fases de *Sida planicaulis* Cav.

	EEB	Fase Hexânica	Fase Clorofórmica	Fase acetoetilica	Fase Hidroalcoólica
Sp-3	X		X	X	X
Sp-4					X
Sp-5					X
Sp-6	X		X	X	X
Sp-7					X
Sp-8					X
Sp-9	X		X	X	
Sp-10	X				

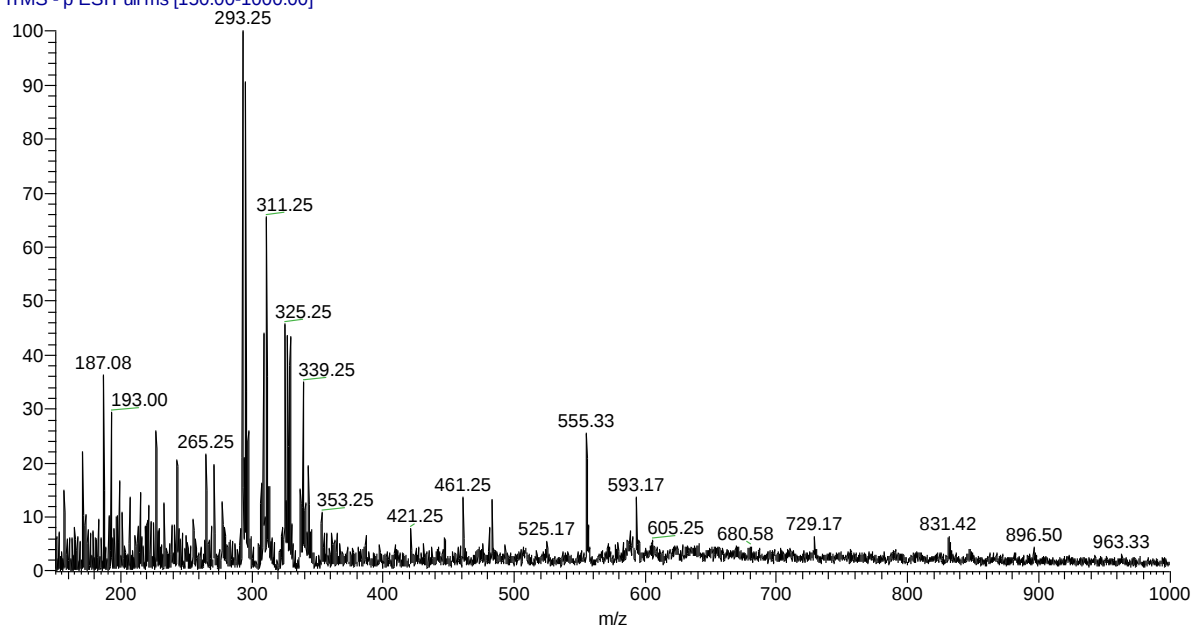
5.4.1 Análise por espectrometria de massas do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis*

A amostra do EEB foi analisada pela técnica ESI-IT-MSⁿ em modo negativo.

A figura 22 exibe uma leitura geral dos íons existentes na amostra (espectro full scan de caráter exploratório) apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ([M-H]⁻) do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis*.

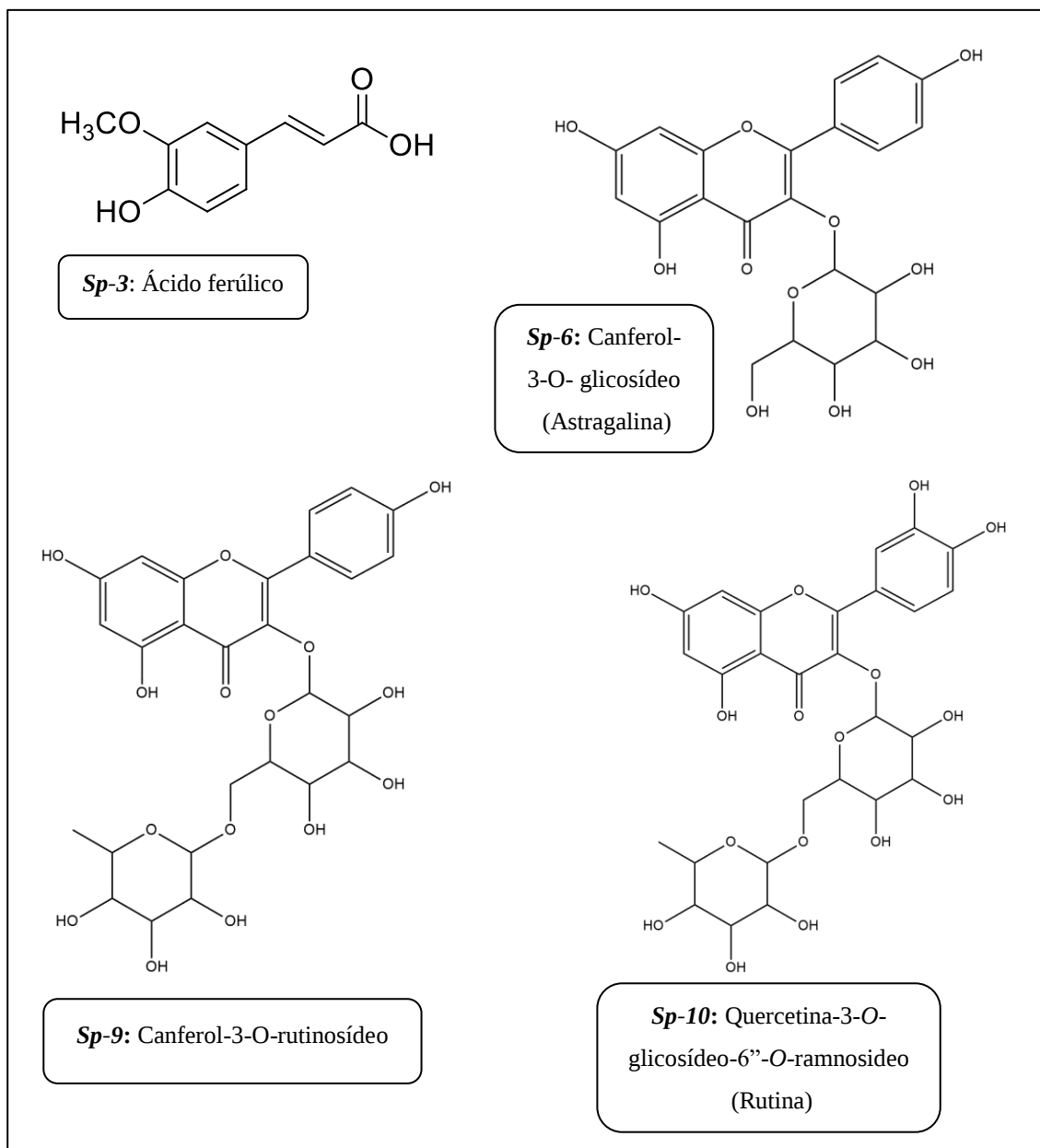
Figura 22: Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS do EEB de *S. planicaulis* analisado em modo negativo.

EEB_Injecao direta #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.51E4
T: ITMS - p ESI Full ms [150.00-1000.00]



As fragmentações de segunda e terceira ordem (MS² e MS³) para cada íon precursor selecionado do EEB levou a identificação de quatro substâncias (Quadro 7, pág. 72).

Quadro 7: Substâncias identificadas do EEB das partes aéreas de *S. planicaulis* por ESI-IT-MSⁿ.



A família Malvaceae apresentam uma riqueza expressiva de compostos fenólicos, flavonoides e flavonoides glicosilados sendo isto relatado nos estudos com *Sida galheirensis* (SILVA et al., 2006; ASSIS et al., 2017); *Sidastrum micranthum* (GOMES et al., 2011); *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (TELES et al., 2015; TELES et al., 2016); *Sida rhombifolia* L (CHAVES et al., 2017); *Sida cordifolia* (SUTRADHAR et al., 2008); *Sida glutinosa* (DAS et al., 2012); *Sida acuta* (AHMED et al., 2011), entre outros.

As identificações sugeridas para os compostos presentes no EEB e fases das partes aéreas de *Sida planicaulis* a seguir foram definidas após análise dos espectros de massas obtidos por FIA-ESI-IT-MS.

5.4.1.1 Identificação de Sp-3

O composto codificado como Sp-3 apresentou íon molecular m/z 193 $[M-H]^-$ (Figura 23, pág. 71) que após análise das suas fragmentações e comparações com dados da literatura (ZHANG et al., 2013; SOUZA, 2018) foi possível identifica-lo como ácido ferúlico. A decomposição desta estrutura gera principalmente três íons de fragmento em m/z 178, 149 e 134. O fragmento básico m/z 178 é identificado como o radical 3-(3,4-dihidroxifenil) que resultou da eliminação do grupo metila (CH_3) do íon precursor m/z 193 e esta perda é uma característica compartilhada de compostos aromáticos metoxilosubstituídos. O íon fragmento m/z 149 é atribuído ao ânion 2-metoxi-5-vinilfenolato, originado da eliminação de CO_2 do íon precursor. O íon fragmento m/z 134 também é um ânion radical, o radical 4-vinilbenzeno-1,2-diol, resultando da eliminação do CO_2 do íon fragmento m/z 178 ou da eliminação do grupo metil do íon m/z 149 (SILVA, 2016). Na figura 24 é possível observar a proposta de fragmentação para o íon molecular m/z 193.

Figura 23: Espectro de massa de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 193 em modo negativo com fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$.

EEB_...o #13382-13729 RT: 67.45-68.75 AV: 348 NL: 3.95E4
T: ITMS - p ESI Full ms2 193.00@cid0.00 [50.00-:

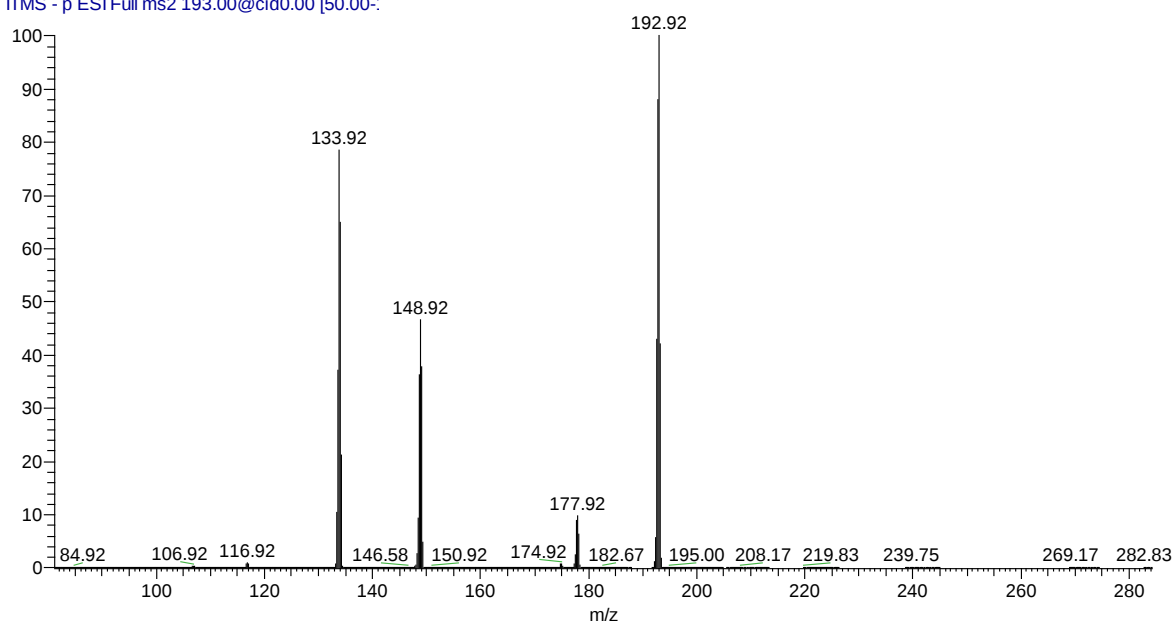
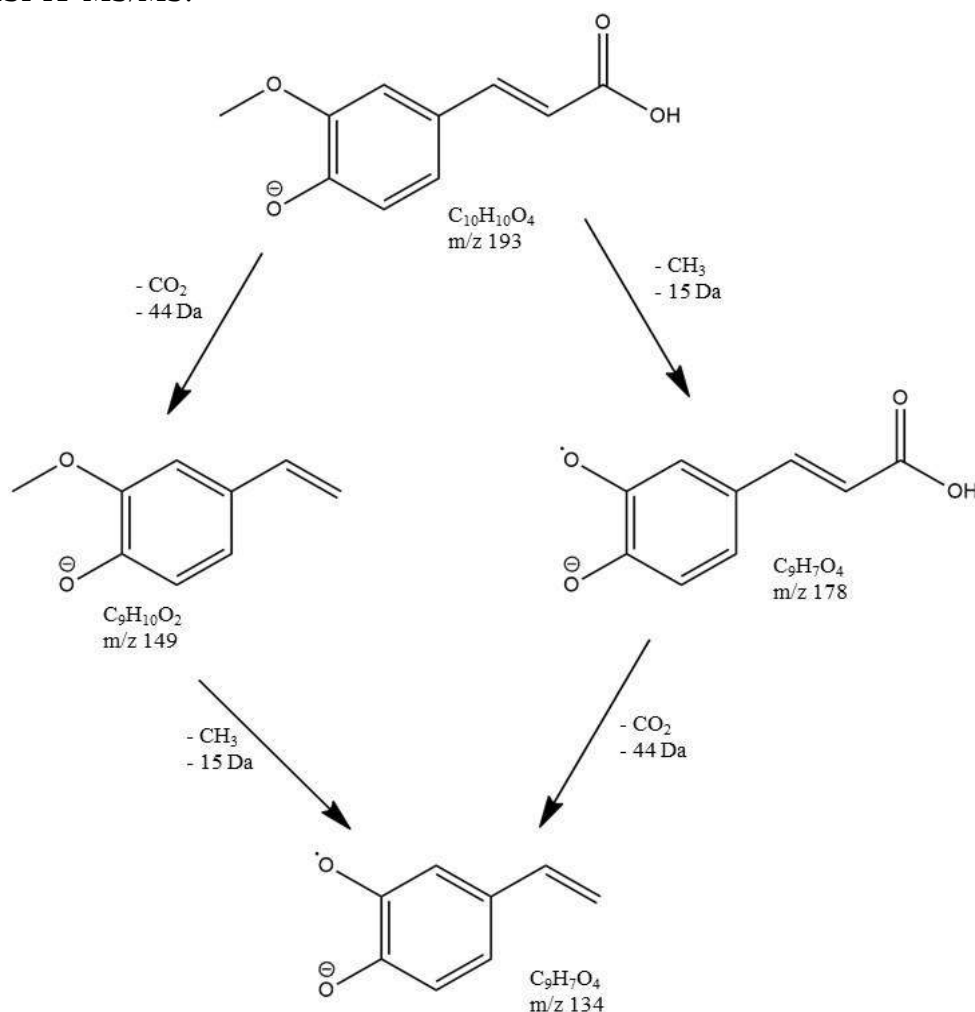


Figura 24: Fragmentação proposta para o íon m/z 193 com fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$ obtido por ESI-IT-MS/MS.



O ácido ferúlico é um derivado da fenilalanina encontrado em plantas e atua nestas como defesa contra vírus, insetos e patógenos, além de garantir rigidez e proteger contra hidrólise enzimática. Devido à sua reatividade em relação aos radicais livres, o ácido ferúlico é um antioxidante e apresenta pelo seu grau de insaturação uma forte capacidade de absorção UV (CASOLARO et al., 2005; MAURYA e DEVASAGAYAM, 2010). Além das suas ações protetoras para o vegetal, o ácido ferúlico atua como antialérgico, antitumoral, hepatoprotetor, antiviral, entre outras (KUMAR; PRUTHI, 2014).

5.4.1.2 Identificação de Sp-6

O íon precursor m/z 447 $[M-H]^-$ que foi codificado como o composto Sp-6 (Figura 25, pág. 73) e após fragmentação produziu o íon produto m/z 285 pela perda de 162 Da $[M-162-H]^-$. Este tipo de fragmentação se refere a perda da unidade de glicose (162 Da) preferencialmente em ligações do tipo O-glicosídicas. É possível observar na figura 26 o

espectro de terceira ordem que apresenta os picos referentes a perda sucessivas de CO (-28 Da) resultando nos íons com m/z 257 e m/z 229. Na figura 27 é possível observar o mecanismo proposto para o íon característico da fragmentação, $m/z=285$.

Figura 25: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447 em modo negativo com fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_{11}$.

EEB_Injecao_direta #8010-8229 RT: 32.22-33.09 AV: 220 NL: 6.83E2
T: Average spectrum MS2 447.00 (8010-8229)

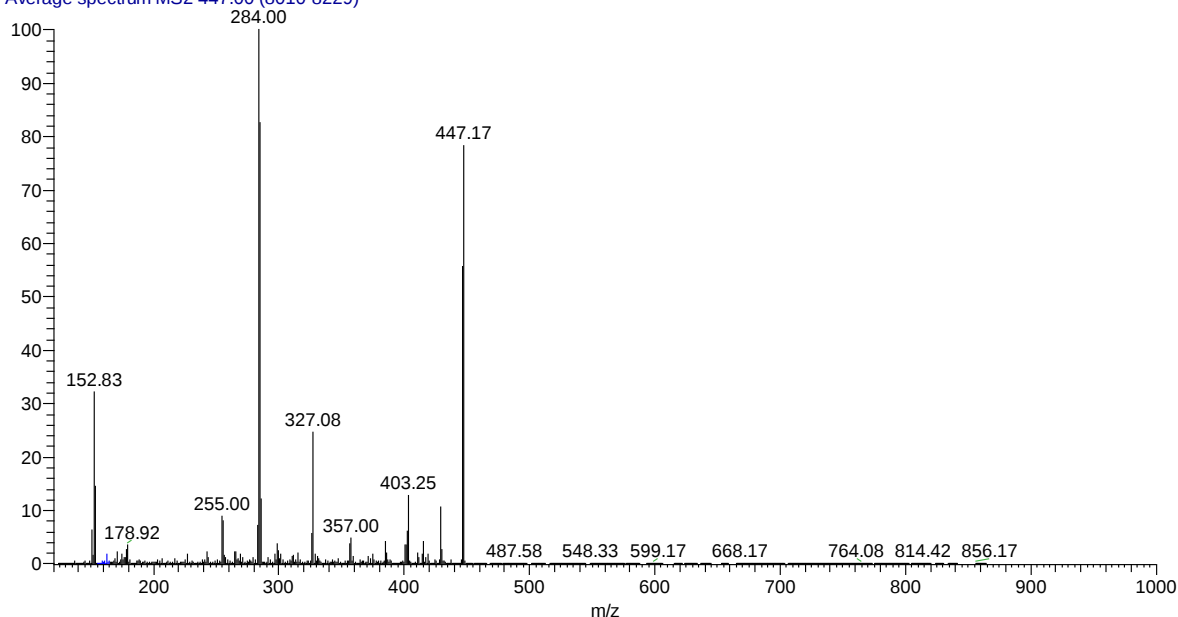


Figura 26: Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447 em modo negativo com fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_{11}$.

EEB_Injecao_direta #8230-8364 RT: 33.10-33.78 AV: 135 NL: 3.26E2
T: Average spectrum MS3 447.00,285.00 (8230-8364)

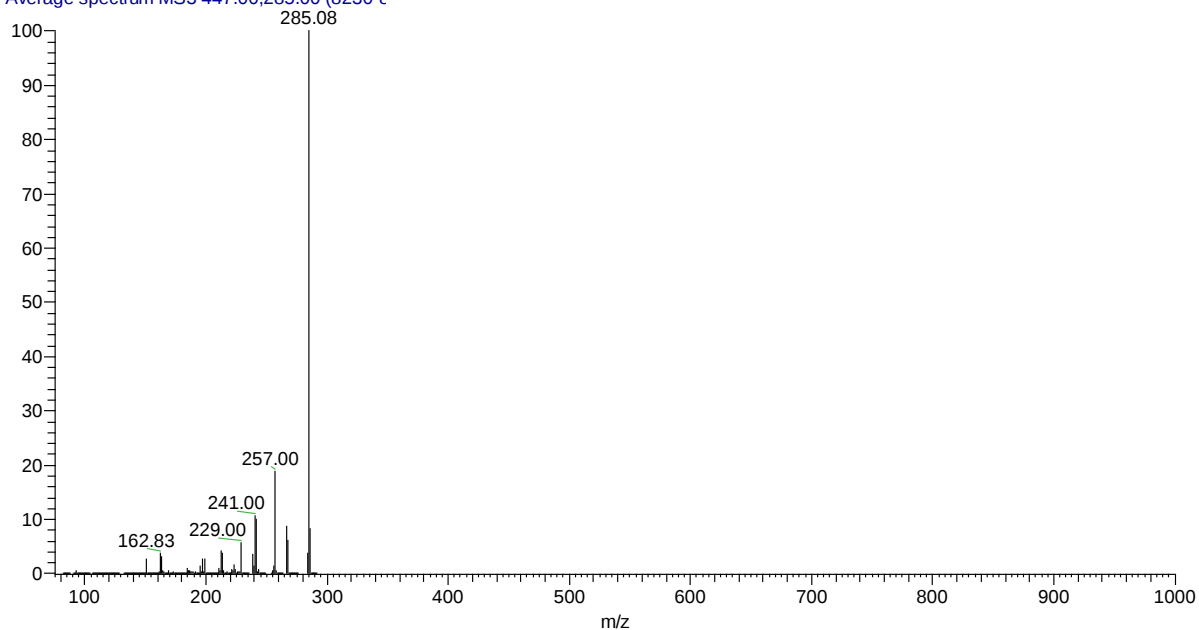
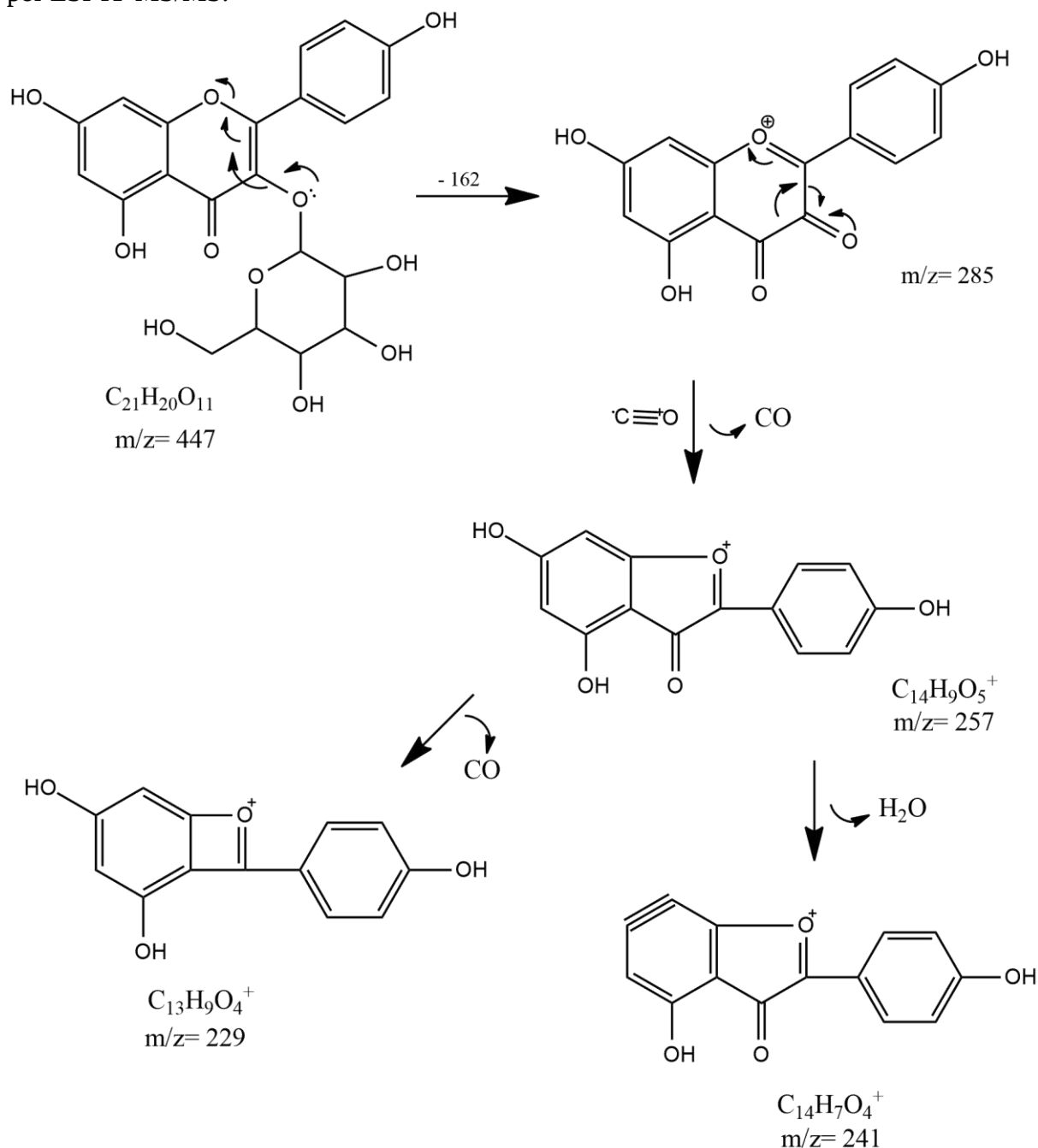


Figura 27: Fragmentação proposta para o íon m/z 447 com fórmula molecular $C_{21}H_{19}O_{11}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.



Após análise das fragmentações (Figura 27, pág. 74) e comparação com dados da literatura foi possível sugerir a identificação do composto *Sp*-7 como sendo o Canferol-3-O-glicopiranosídeo (astragalina) (YE et al., 2005; XIAO, et al., 2017). Há relatos na literatura do isolamento deste composto em espécies da família Malvaceae, como por exemplo em *Wissadula periplocifolia* (TELES et al., 2015c), *Sida galheirensis* (ASSIS et al., 2017), sendo identificado pela primeira vez na espécie *Sida planicaulis*.

5.4.1.3 Identificação de Sp-9

O íon precursor de m/z 593 $[M - H]^-$ codificado como Sp-9 e seu espectro MS² (Figura 28, pág. 75) confirma a presença do composto identificado como Canferol-3-O-rutinosideo, um flavonoide diglicosilado. Este composto químico sofre uma quebra dando origem ao íon $m/z=285$ (aglicona do canferol), essa perda de massa (308 u) está relacionada com a saída do açúcar rutinosideo (unidade ramnose-glicose). A substância Sp-9 teve a sua identidade confirmada após comparações com dados da literatura e análises das fragmentações do espectro de massa (Figura 29, pág. 76) (SANCHEZ-RABANEDA et al., 2002; MEDINA et al., 2009; FERNANDES, 2017). Foi também confirmada por já ter sido identificada em espécies do gênero *Sida*, como por exemplo em *Sida rhombifolia* (CHAVES et al., 2017) e *Sida galheirensis* (FERNANDES, 2017), fortalecendo assim a proposta para canferol-3-O-rutinosideo, identificada pela primeira vez em *Sida planicaulis*.

Figura 28: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 593 em modo negativo com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{15}$.

EEB_Injecao_direta #822-944 RT: 3.22-3.67 AV: 123 NL: 4.98E3
T: Average spectrum MS2 593.00 (822-944)

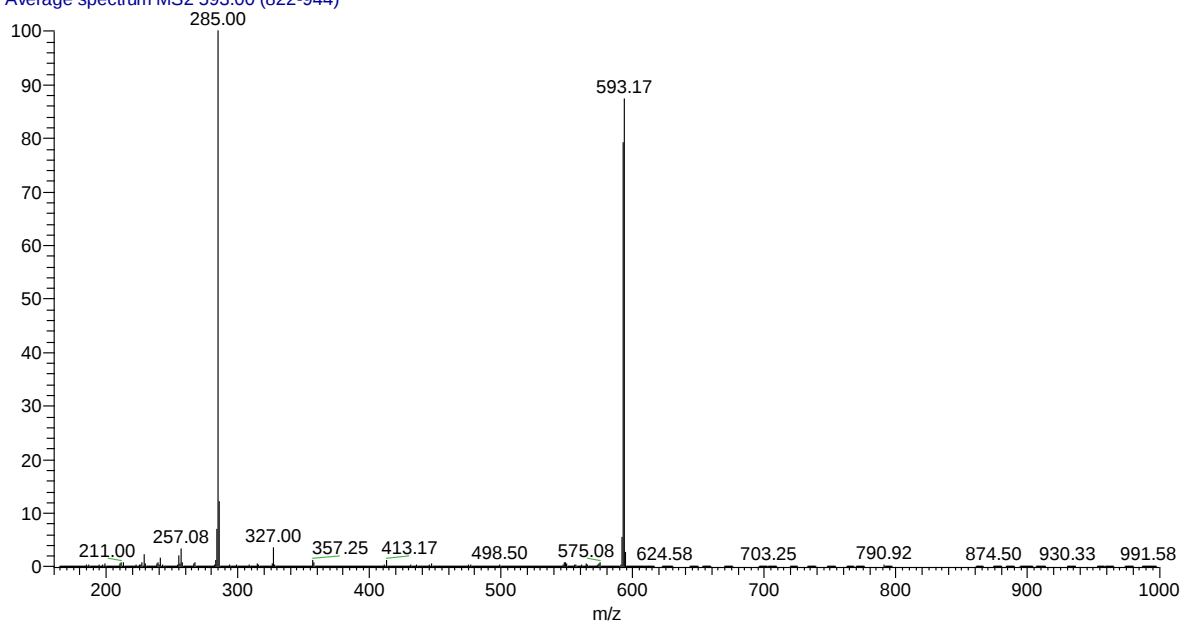
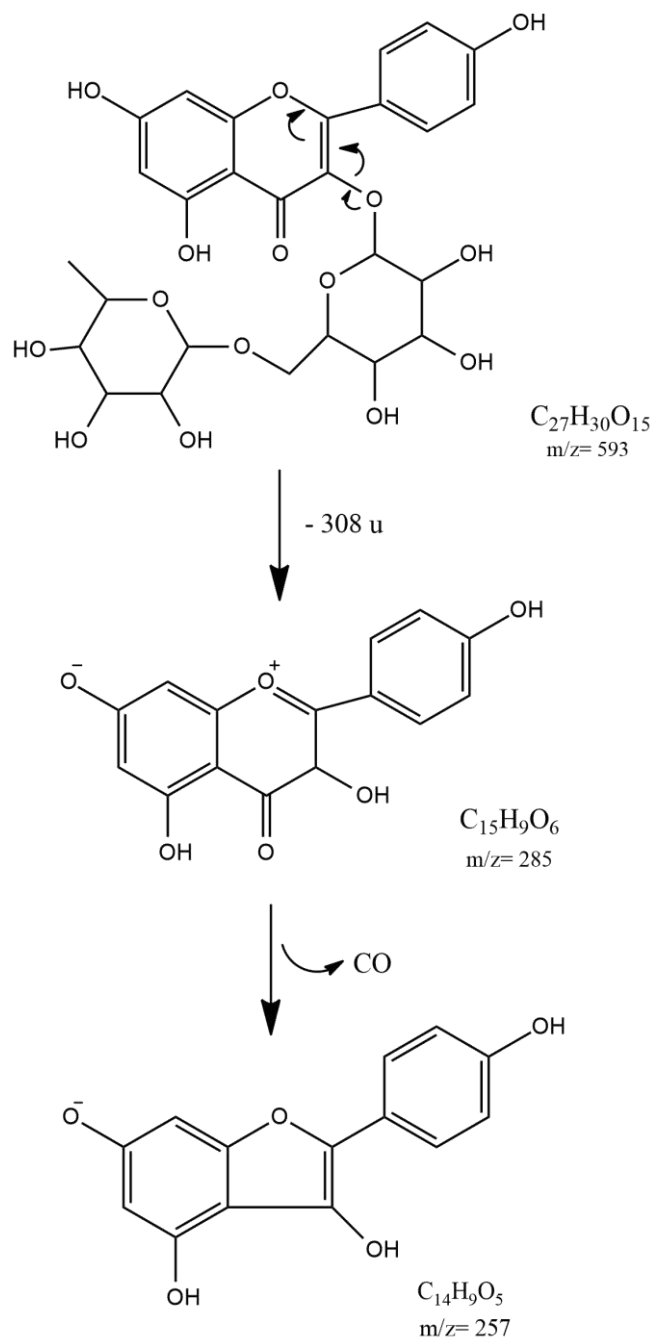


Figura 29: Fragmentação proposta para o íon m/z 593 com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{15}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.



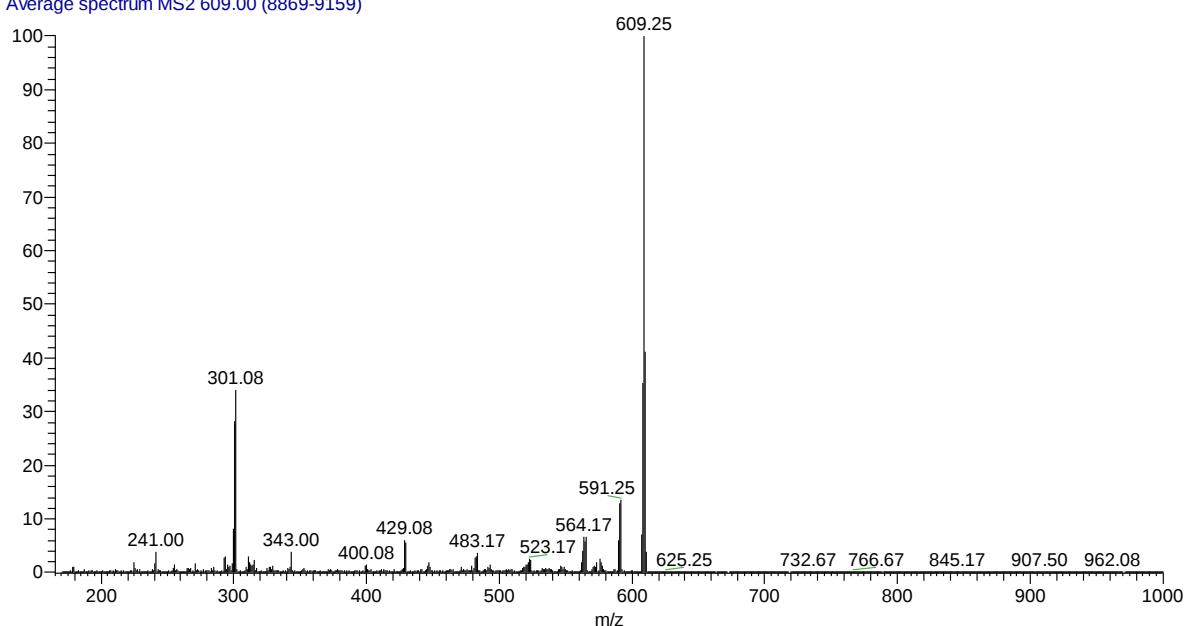
Li et al., 2006 relata que o canferol 3-O-rutinosídeo é capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, além disso é conhecido os seus efeitos farmacêuticos como antioxidantes, antiinflamtório, neuroprotetor e como agente protetor contra lesão hepática aguda (LI et al., 2006a; LI et al., 2006b; HUANG et al., 2007; HABTEMARIAM, 2011; ZHAO et al., 2017).

5.4.1.4 Identificação de Sp-10

Para finalizar o full scan do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis* foi observado íon precursor desprotonado de m/z 609 (Figura 30, pág. 79), sendo codificado como Sp-10. Uma análise comparativa entre o íon molecular desprotonado de Sp-9 ($m/z=593$) e o íon atribuído a Sp-10 ($m/z=609$) pôde-se detectar que a diferença de 16 unidades para Sp-10 permitiu detectar que essa molécula é ascrescida de um oxigênio, levando a propor que ela trata-se da quercetina-3-O-glicosideo-6''-O-ramnosideo (rutina), um flavonoide O-diglicosídeo. Esta sugestão foi fortalecida pela perda de uma molécula de água ($m/z=591$) e perdas das unidades de glicose e raminose, gerando o íon $m/z=301$ (Figura 31, pág. 80) (DUBBER et al., 2004).

Figura 30: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 609 em modo negativo com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{16}$.

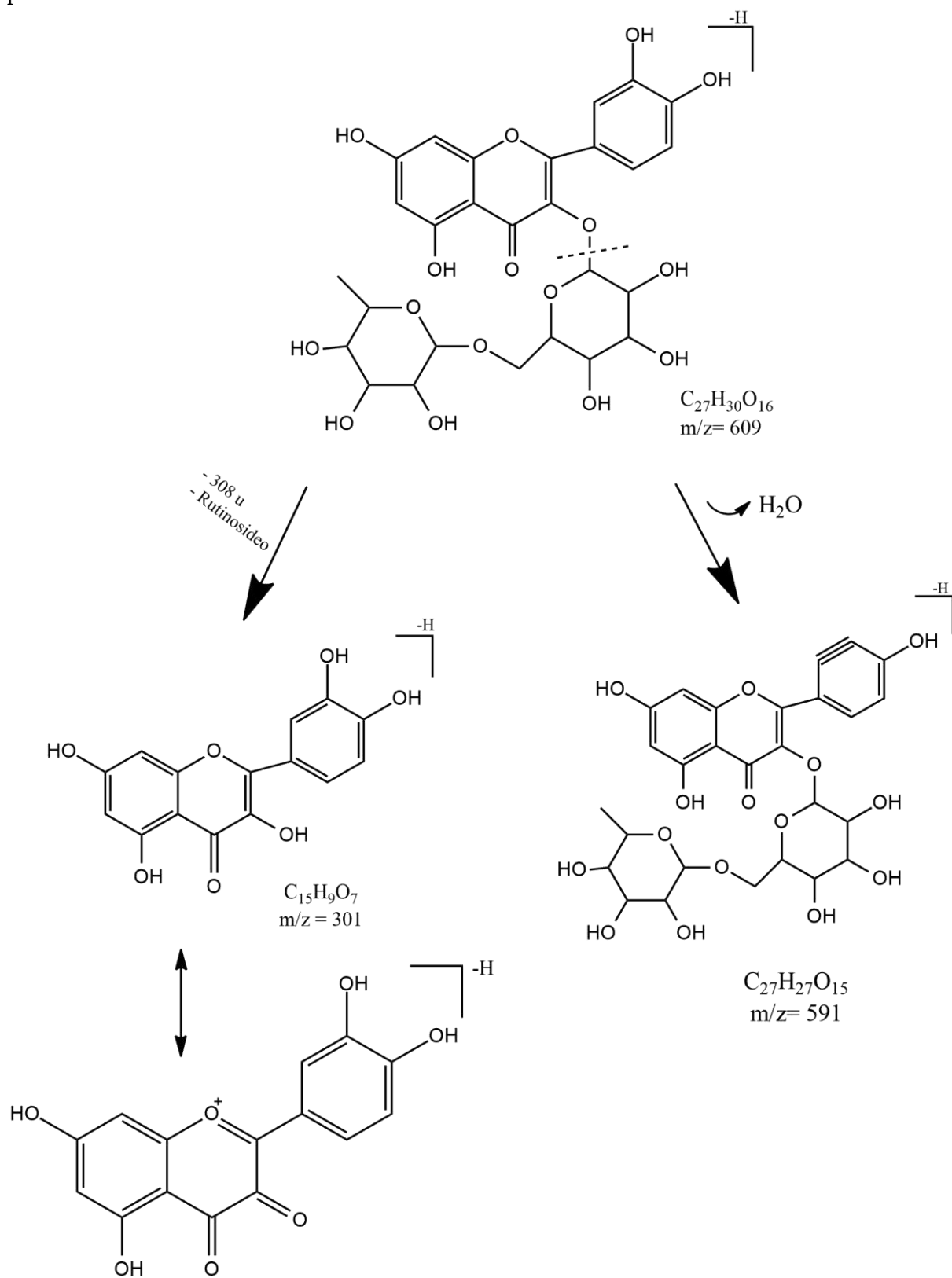
EEB_injecao_direta #8869-9159 RT: 35.27-36.42 AV: 291 NL: 6.71E2
T: Average spectrum MS2 609.00 (8869-9159)



A rutina pode ser encontrada em diferentes gêneros da família Malvaceae, como os gêneros *Abroma*, *Sida* e *Thespesia*. No gênero *Sida* podemos citar a *Sida hermafrodita*. (BANDYUKOVA e LIGAI, 1987; SARMA e BABU et al., 2011; KHANRA et al., 2015). Desta forma, a substância codificada com Sp-10 foi isolada pela primeira vez na espécie *Sida planicaulis* Cav.

É considerada um potente flavonoide que pode ser utilizado no tratamento de algumas doenças, este apresenta ação protetora sobre lesões cardíacas, cerebrais e renais após reperfusão isquêmica e lesão da mucosa gástrica, além de ser hepatoprotetora e antidiabético (LONG e YANG, 2002; HOSSEINZADEH e NASSIRI-ASL, 2014).

Figura 31: Fragmentação proposta para o íon m/z 609 com fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.

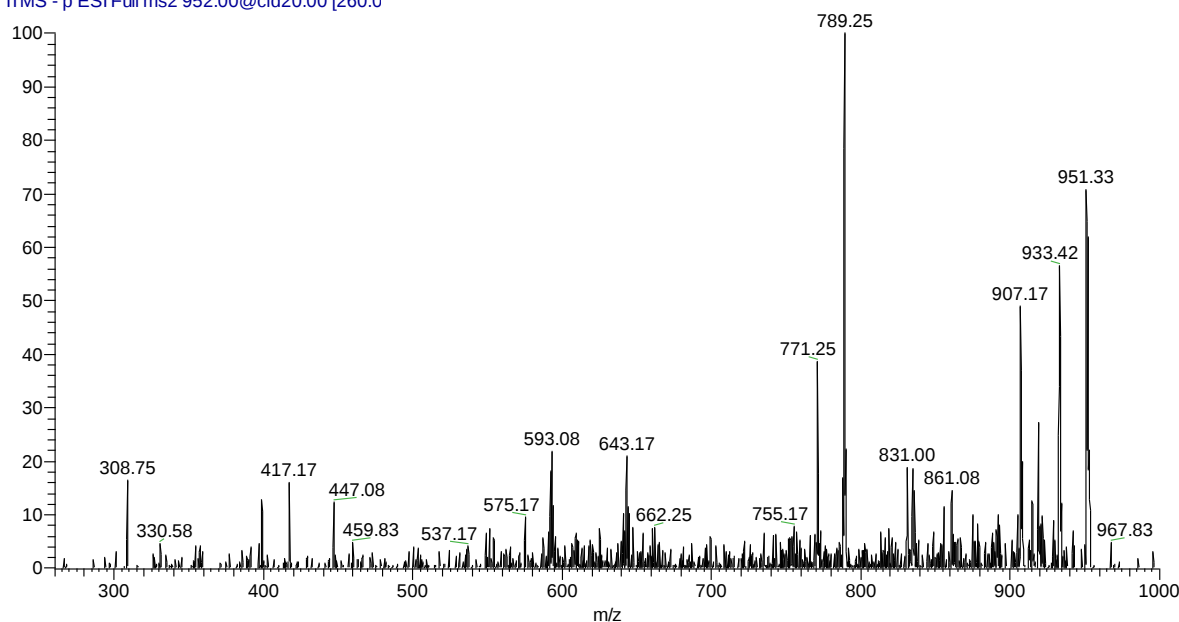


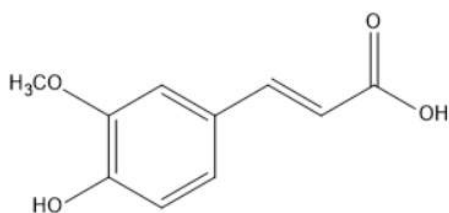
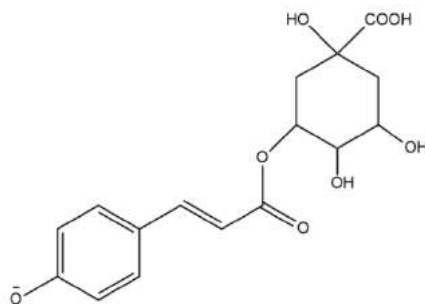
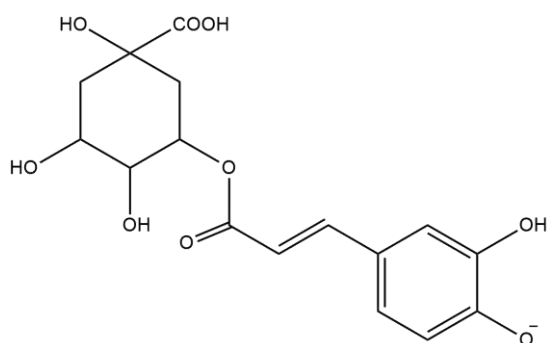
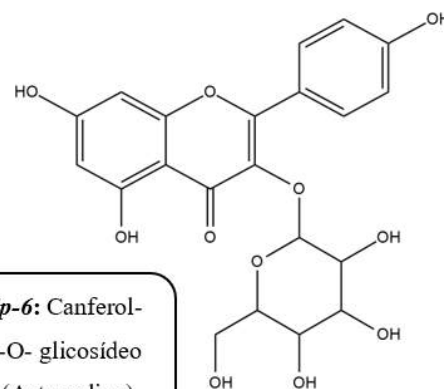
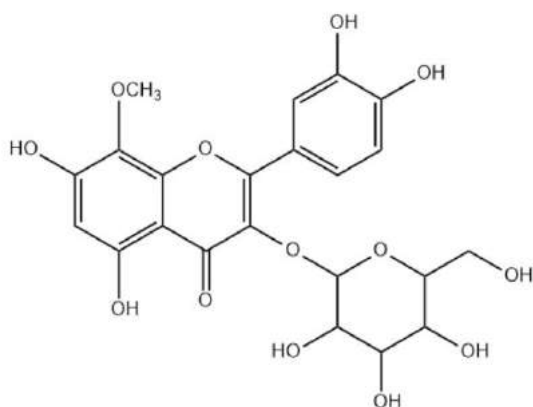
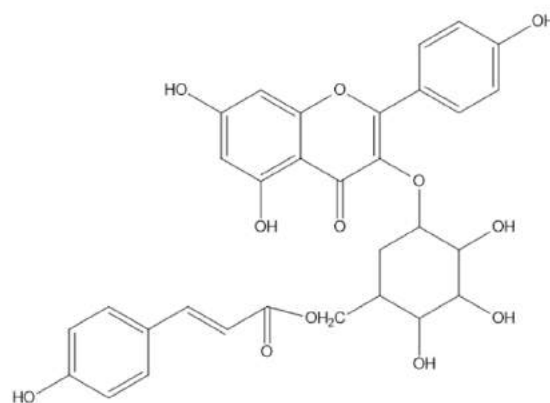
5.4.2 Análise por espectrometria de massas da fase hidroalcoólica do EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis* Cav.

A fase hidroalcoólica (F. HA) obtida após cromatografia líquido-líquido do EEB foi analisada por EM adotando-se a técnica ESI-IT-MSⁿ em modo negativo, obtendo-se seus íons precursores e fragmentos (Figura 32, pág. 81). Os espectros de massa e comparações com dados da literatura permitiram a identificação de seis substâncias (Quadro 8, pág. 82), duas destas *Sp*-3 [M-H]⁻ *m/z* 193 (Ácido ferúlico) e *Sp*-6 [M-H]⁻ *m/z*=447 (Astragalina) foram identificadas anteriormente no EEB das partes aéreas de *Sida planicaulis*.

Figura 32: Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS da F. HA de *S. planicaulis* analisado em modo negativo.

EEB_hidroalcoólico #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.96E1
T: ITMS - p ESI Full ms2 952.00@cid20.00 [260.0



Quadro 8: Substâncias identificadas na F. HA do EEB de *Sida planicaulis* por FIA-ESI-IT-MS.**Sp-3:** Ácido ferúlico**Sp-4:** Ácido 3-*p*-cumaroilquinico**Sp-5:** Ácido 3-cafeoilquinico**Sp-6:** Canferol-3-O- glicosídeo (Astragalina)**Sp-7:** 8-metoxiquercetina-3-O-glicosídeo**Sp-8:** Canferol-3-O-β-D-(6''-E-*p*-cumaroyl) glicosídeo (Tilirosídeo)

5.4.2.1 Identificação de *Sp-4*

Na fase hidroalcoólica do EEB observou-se a presença do íon precursor $m/z=337$, sendo este identificado e codificado como *Sp-4*. A partir da análise realizada no espectro de massas (Figura 33, pág. 83) foi possível notar dois íons filhos, os íons $m/z=293$, $m/z=191$ e $m/z=163$. O primeiro é oriundo do íon molecular $m/z=337$ e está relacionado com a perda de 146 u, valor que se refere a perda do ácido *p*-cumarico. Em seguida, o ácido quínico restante, íon $m/z=191$, sofre a perda de CO (28 u), resultando no fragmento $m/z=163$. Após avaliação dos fragmentos e comparações com dados da literatura (CLIFFORD et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; PLAZONIC et al., 2009), é sugerido que o composto *Sp-4* seja um derivado do ácido cinamico (pico base $m/z=163$), o ácido 3-*p*-cumaroilquínico, sendo possível observar a fragmentação proposta na figura 34.

Figura 33: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 337 em modo negativo com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_8$.

EEB_hidroalcoólico #11900-12040 RT: 61.64-62.16 AV: 141 NL: 2.98E4
T: Average spectrum MS2 337.00 (11900-12040)

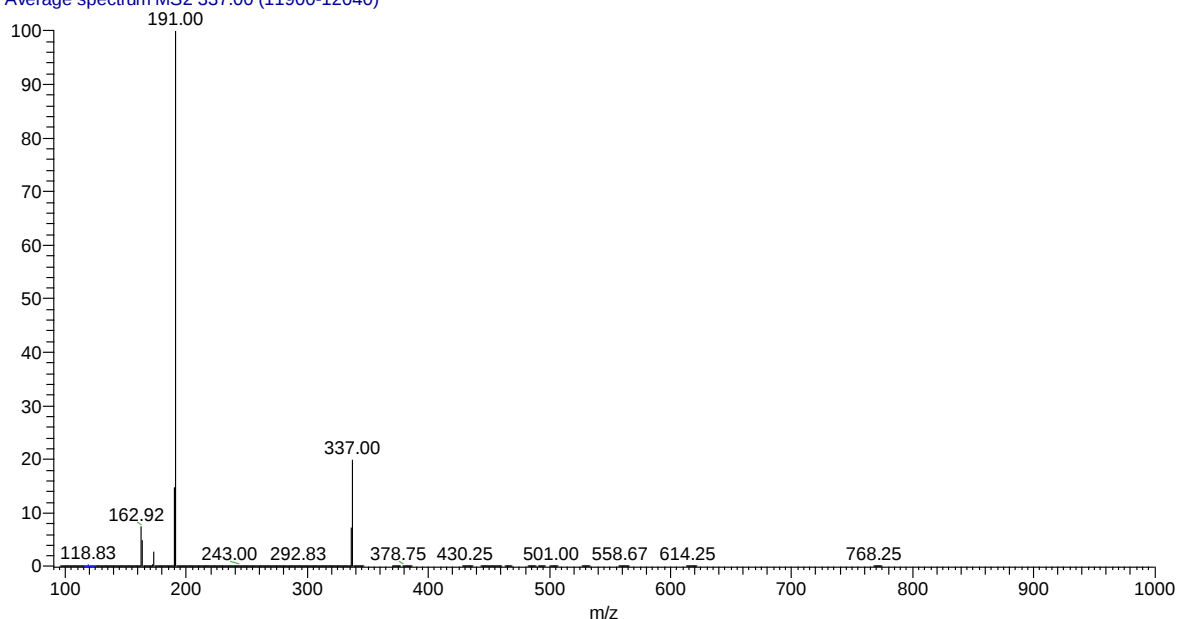
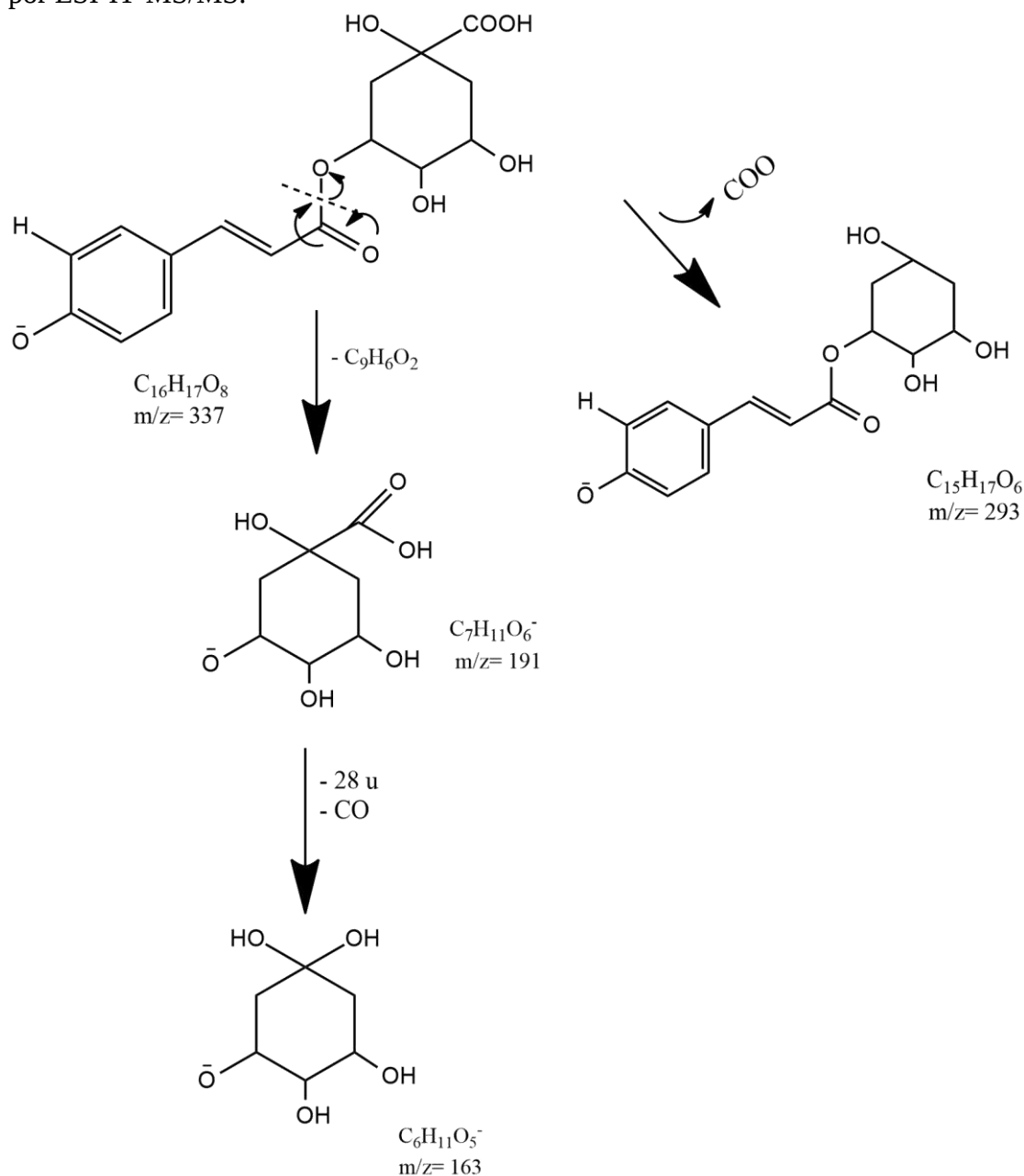


Figura 34: Fragmentação proposta para o íon m/z 337 com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_8$ obtido por ESI-IT-MS/MS.



Os ésteres de hidroxicinamato, comumente conhecidos como ácidos hidroxicinâmicos ou ácidos clorogênicos, são família de ésteres em que uma porção do ácido hidroxicinâmico (ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, dimetoxicinâmico e trimetoxicinâmico) está ligada ao ácido quínico (CLINFFORD, 2000). Entre as atividades farmacológicas relatadas para *Sp*-4 está a capacidade antioxidante (BARONI et al., 2018; PIOVESANA et al., 2018). E é relatado na família Malvaceae, como por exemplo na espécie *Hibiscus sabdariffa* L. (PIOVESANA et al., 2018) e isolado pela primeira vez na espécie *Sida planicaulis* Cav.

5.4.2.2 Identificação de *Sp*-5

Seguindo a análise das fragmentações exibidas no espectro da F. HA observou-se um pico em m/z 353. O experimento MS^2 mostra uma fragmentação, cujo resultado após a perda de 162 unidades de massa é m/z 191 (Figura 35, pág. 85), pico este relacionado ao ácido quínico desprotonado. A próxima fragmentação ocorre com a perda de 174 u, relacionada ao ácido quínico, resultando no ácido caféico desprotonado, em seguida acontece uma descarboxilação do ácido caféico, originando o íon $m/z=135$, com uma perda de 44 u (Figura 36, pág. 86). Desta forma, foi sugerido que a substância química *Sp*-5 se tratava do ácido 3-*p*-cafeoilquínico, após comparação com dados da literatura (CLIFFORD et al., 2003; DUGO et al., 2009).

Figura 35: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 353 em modo negativo com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$.

EEB_hidroalcoólico #11525-11691 RT: 60.52-61.15 AV: 167 NL: 2.46E4
T: Average spectrum MS2 353.00 (11525-11691)

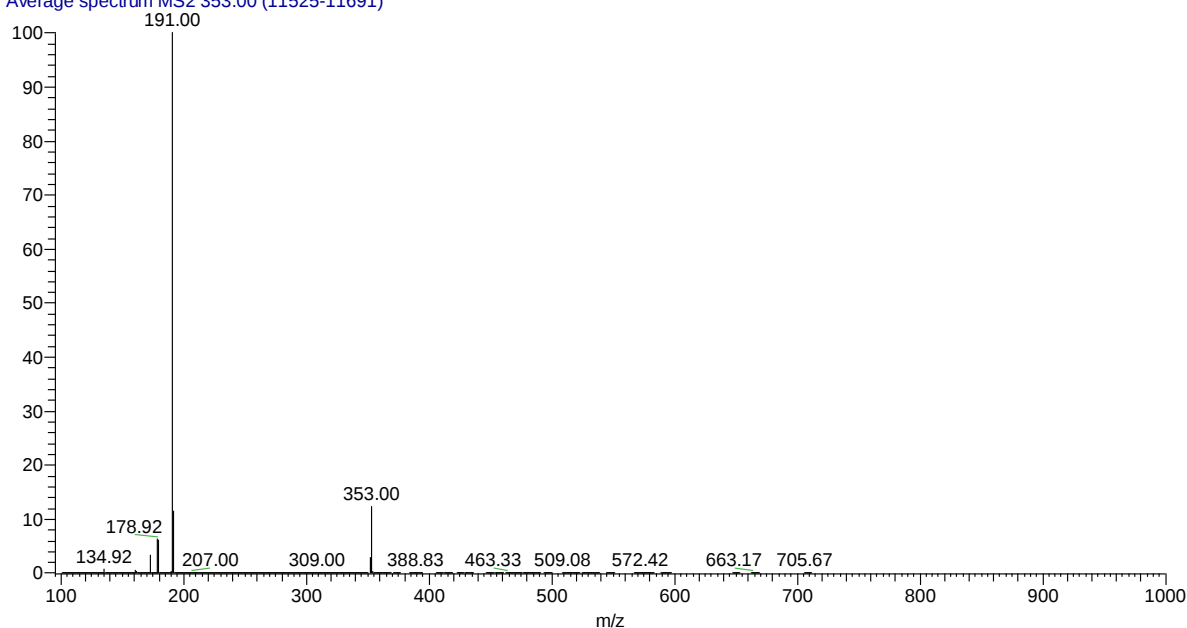
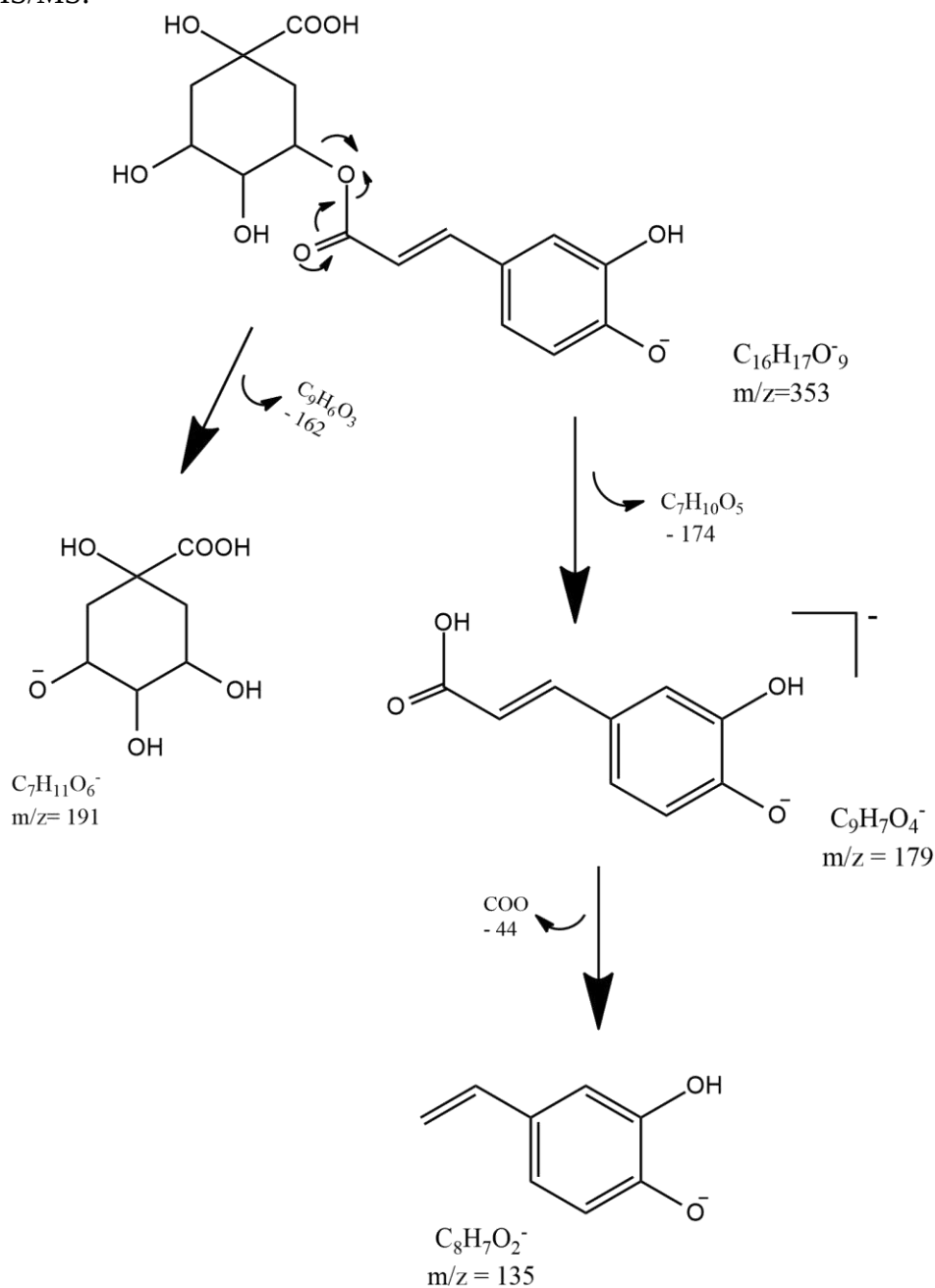


Figura 36: Fragmentação proposta para o íon m/z 353 com fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$ obtido por ESI-IT-MS/MS.



O ácido cafeoilquínico pertence ao grupo de polifenóis formados por meio da esterificação de ácidos cinâmicos, reconhecidos como antioxidantes com crescente interesse em aplicações farmacológicas, cosméticas e alimentares (FARAH e DUARTE 2015; KOMES e BUŠIĆ 2014), atividade antidiabética (XU et al., 2017). É comprovado na literatura a presença de 3-*p*-cafeoilquínico na família Malvaceae e do ácido caféico em espécies do gênero *Sida*, como *Sida cordifolia* (MEINHART et al., 2017). Sendo identificado pela primeira vez na espécie *Sida planicaulis* Cav.

5.4.2.3 Identificação de Sp-7

O espectro de massas obtido por ESI-IT-MS referente ao íon de m/z 493 $[M-H]^-$ (Figura 37, pág 87) evidenciou a fragmentação em segunda ordem MS/MS resultante da perda de 162 Da (uma unidade de hexose, $C_6H_{10}O_5$) formando um íon filho de m/z 331 $[M-162-H]^-$. A partir do íon filho $m/z=331$ uma segunda fragmentação (Figura 38, pág. 88), resultou no íon $m/z=287$, referido a saída do grupo CO_2 . Tendo como precursor o íon $m/z=331$, é notado uma terceira fragmentação gerando um íon neutro de $[M-15]^-$ este referente a um radical metila, que originou o íon fragmento $m/z=316$ u (Figura 38). Baseando-se nestas fragmentações (Figura 39, pág. 88) e comparações com dados da literatura, foi possível sugerir que Sp-7 se tratava da 8-metoxiquercetina-3-O-glicosídeo (WANG et al., 2015), relatada pela primeira vez na espécie em estudo.

Figura 37: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 493 em modo negativo com fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{13}$.

EEB_hidroalcoólico #9812-10452 RT: 54.05-56.77 AV: 641 NL: 1.13E2
T: Average spectrum MS2 493.00 (9812-10452)

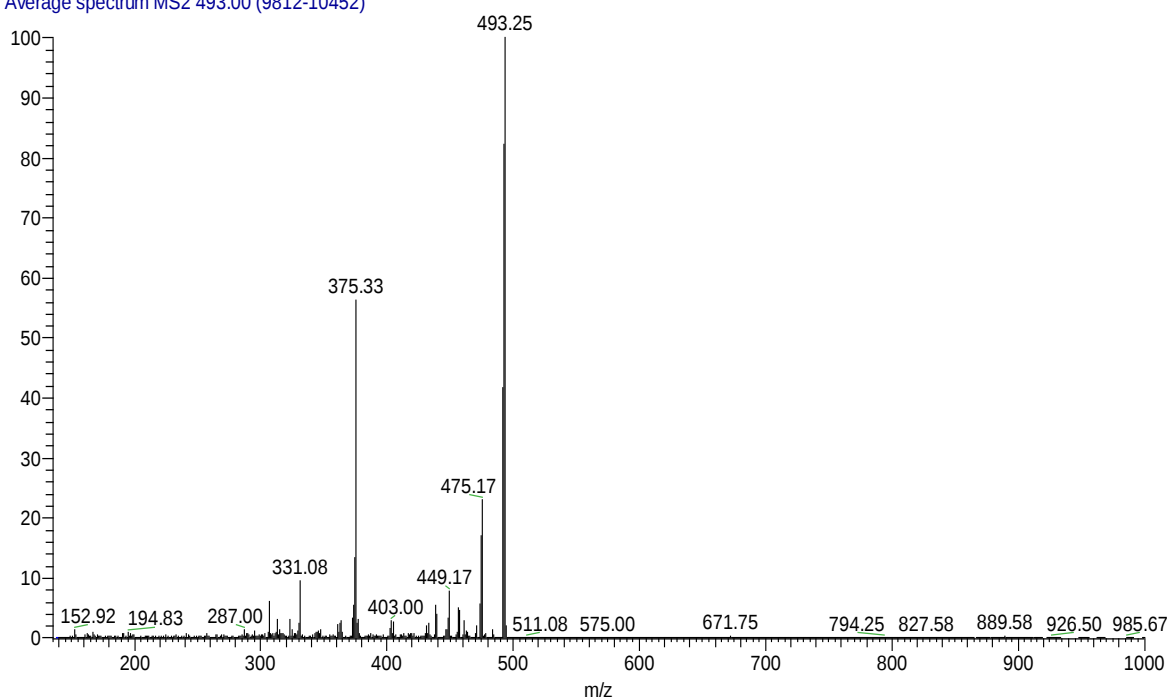


Figura 38: Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 493 em modo negativo com fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{13}$.

EEB_hidroalcoólico #10453-10645 RT: 56.77-57.79 AV: 193 NL: 8.11

T: Average spectrum MS3 493.00,331.00 (10453-10645)

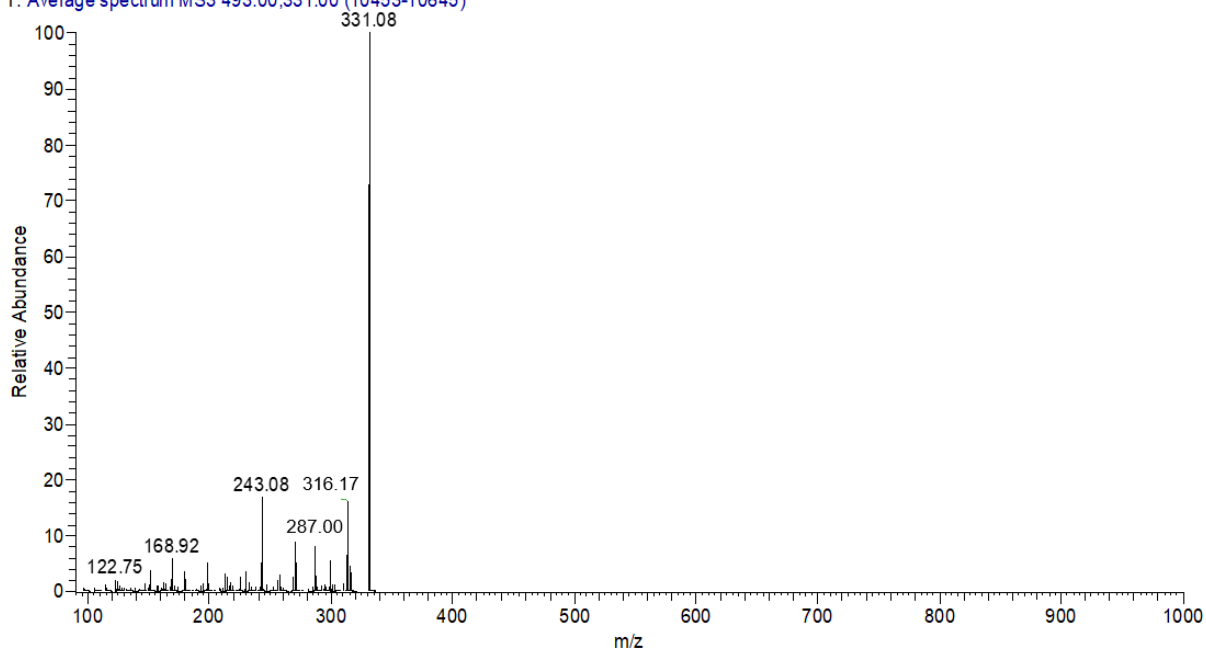
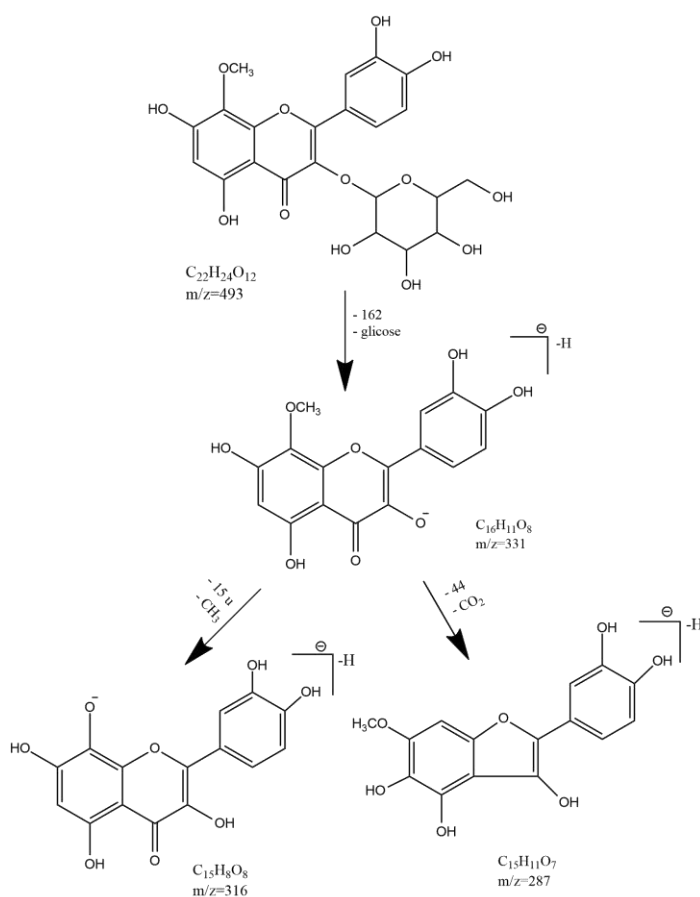


Figura 39: Fragmentação proposta para o íon m/z 493 com fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{13}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.



5.4.2.4 Identificação de *Sp*-8

O último espectro de massas analisado por FIA-ESI-IT-MS apresentou como íon precursor uma $m/z=593$ (Figura 40, pág. 89), havendo uma perda de 146 unidades de massas, resultando no fragmento de segunda ordem 447 u, esta perda está relacionada com saída do grupo cumaroil do esqueleto do flavonoide. No espectro de MS^3 (Figura 41, pág. 90) é notável este fragmento perdendo 162 u, relacionado a saída de uma unidade de glicose resultando no íon filho $m/z=285$, que é condizente com aglicona do canferol (KACHLICKI et al., 2008; NEGRI; SANTI; TABACH, 2013; FELIPE et al., 2014) (Figura 42, pág. 91). Após esta comparação com a literatura é sugerido que *Sp*-8 seja o composto canferol 3-*O*- β -D-(6''-E-*p*coumaroil) glicosídeo, conhecido comumente como tilirosídeo.

Figura 40: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 593 em modo negativo com fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{13}$.

EEB hidroalcoólico #8790-9671 RT: 50.48-53.62 AV: 882 NL: 4.66E4

T: ITMS - p ESI Full ms2 593.00@cid25.00 [160.0

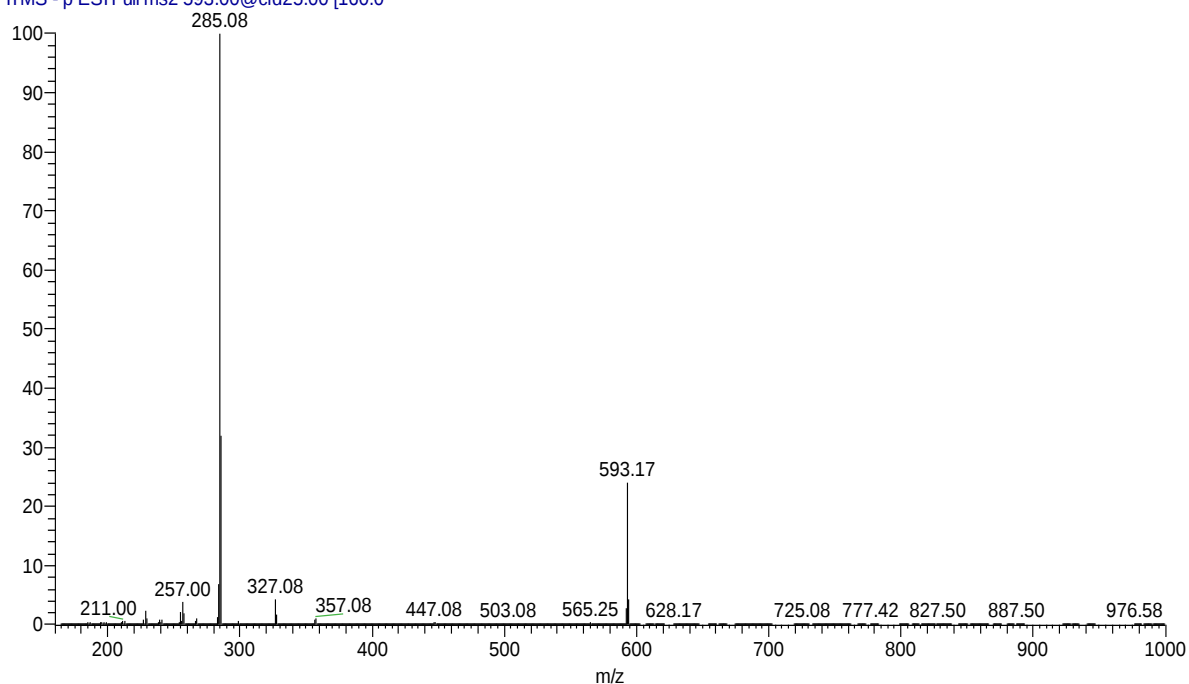


Figura 41: Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 593 em modo negativo com fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{13}$.

EEB_hidroalcoólico #9672-9715 RT: 53.63-53.83 AV: 44 NL: 2.86E2
T: Average spectrum MS3 593.00,447.00 (9672-9)

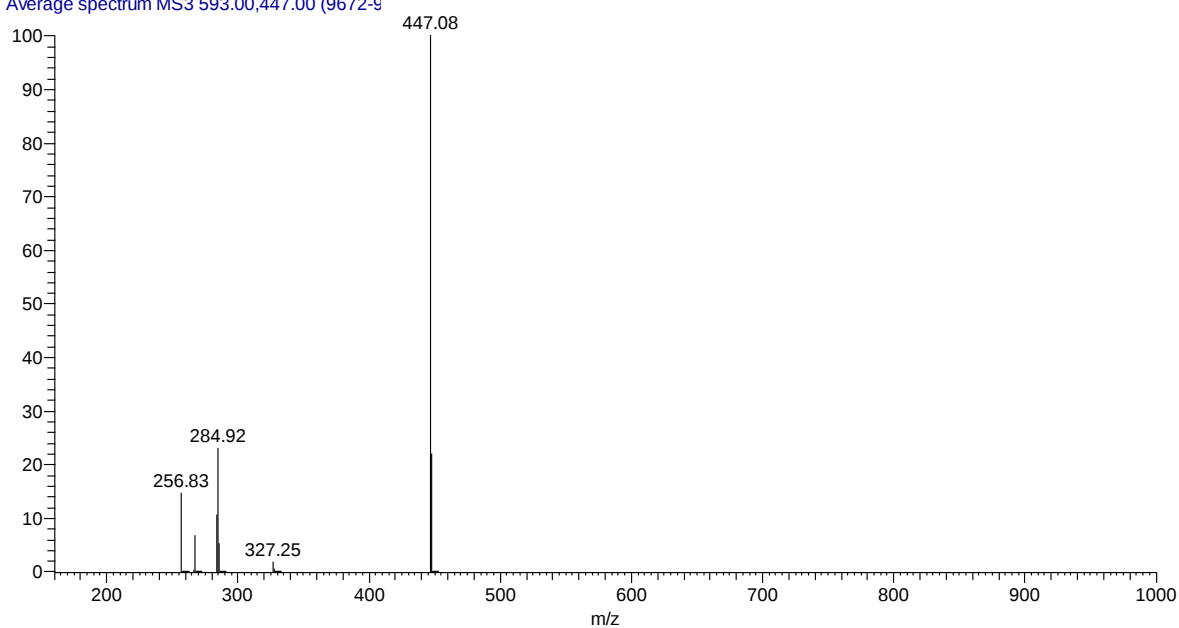
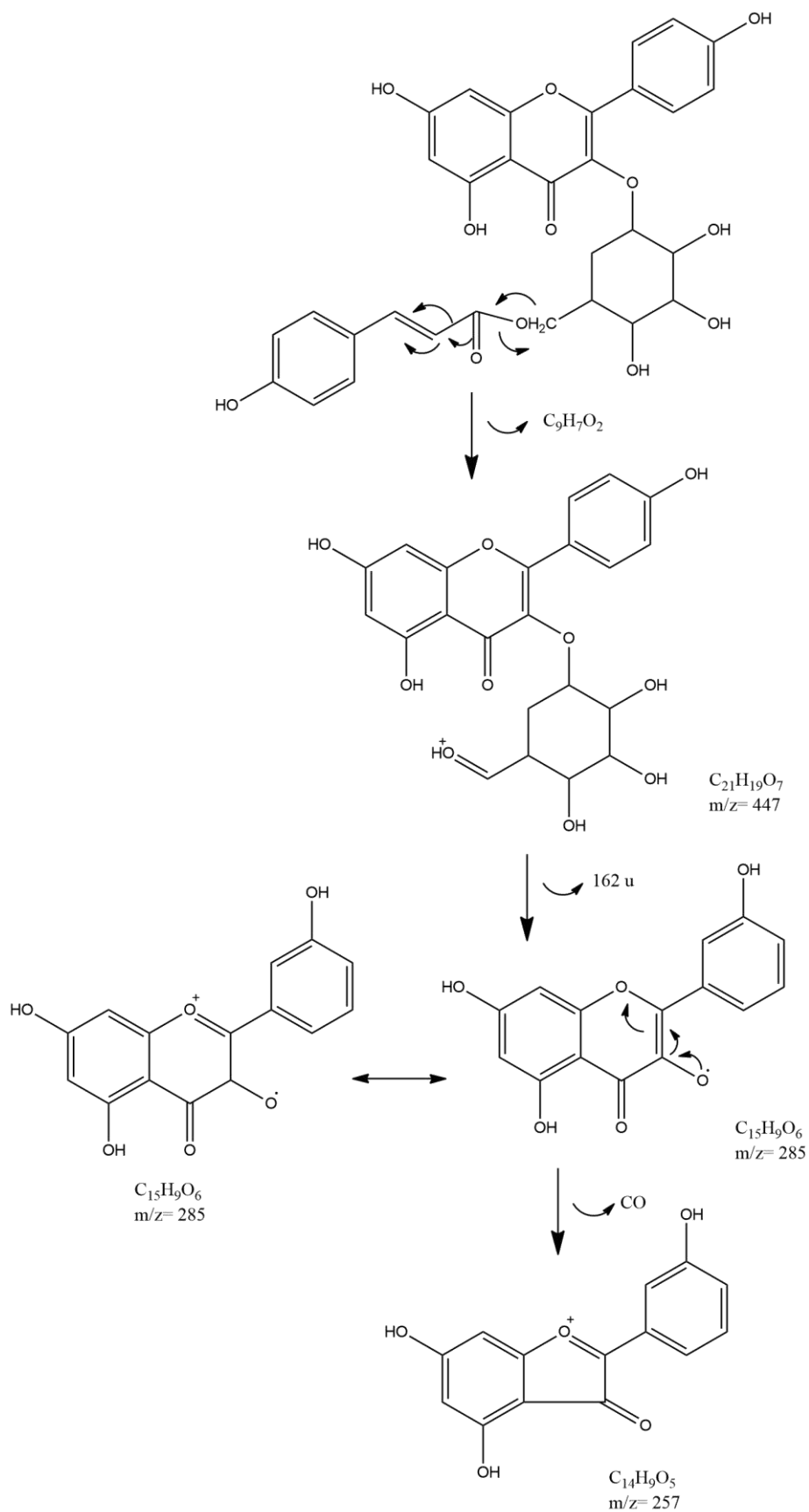


Figura 42: Fragmentação proposta para o íon m/z 593 com fórmula molecular $C_{30}H_{25}O_{13}$ obtido por ESI-IT-MS/MS.



O tilirosideo é uma substância que tem uma caracterização já bem definida na literatura, sendo isolado e identificado por membros da equipe da Prof. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza (SILVA et al., 2005; COSTA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2009; CAVALCANTE et al., 2010; GOMES et al., 2011; TELES et al., 2015; FERNANDES, 2017), incluindo espécies vegetais pertencentes a família Malvaceae, como também do gênero *Sida*, como *Sida galheirensis*. Isto reforçou a proposta sugerida de *Sp-8* ser o tilirosideo, isolado pela primeira vez em *Sida planicaulis*. É um composto que possui entre as atividades farmacológicas como: ação antiprotozoário, anti-inflamatória, anti-neuroinflamatório, neuroprotetora (JIN et al., 2016; CALZADA et al., 2017; VELAGAPUDI; EL-BAKOUSH; OLAJIDE, 2018).

Tabela 4: Substâncias com identificação sugerida pela análise dos espectros do EEB e das fases de *Sida planicaulis* Cav. obtidas pela técnica ESI-IT-MS.

	Fórmula Molecular	[M-H]⁻	Íon fragmentado	Identificação proposta	Referências
Sp-3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193	149 134	(Ácido ferúlico) 3-metoxi,4-hidroxicinamoil	PLAZONIC, 2009; ZHANG et al., 2013; SOUZA, 2018
Sp-4	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	337	191 163	Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico	CLIFFORD et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; PLAZONIC et al., 2009
Sp-5	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353	191 179	Ácido 3- <i>p</i> -cafeoilquínico	CLIFFORD et al., 2003; DUGO et al., 2009
Sp-6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447	285	(Astragalina) Canferol-3- <i>O</i> -glicopiranosídeo	YE et al., 2005
Sp-7	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₃	493	375 331 151	8-metoxiquercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo	WANG et al., 2015
Sp-8	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593	447 285	(Tilirosídeo) Canferol 3- <i>O</i> -(6''- <i>E</i> -pcoumaroil) glicosídeo	KACHLICKI et al., 2008; NEGRI; SANTI; TABACH, 2013; FELIPE et al., 2014
Sp-9	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593	285 257 229	Canferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	SANCHEZ-RABANEDA et al., 2002; MEDINA et al., 2009; FERNANDES, 2017
Sp-10	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609	301	(Rutina) Quercetina-3- <i>O</i> -7- <i>O</i> -ramnosídeo	DUBBER et al., 2004; MEDINA et al., 2009

5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana do EEB, das fases e substâncias isoladas de *Sida planicaulis* Cav.

Neste trabalho, o EEB, as fases obtidas após o particionamento do EEB e substância isolada da fase clorofórmica oriundos das partes aéreas de *Sida planicaulis* foram testadas frente à cepas de bactérias gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC-25923), gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *Escherichia coli* ATCC-18739, *Escherichia coli* LM-35), fungos leveduriformes (*Candida albicans* ATCC-60193, *Candida albicans* LM-38, *Candida albicans* LM-38, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *Cryptococcus gatti* INCQS-40113, LM-38, *Cryptococcus neoformans* FCF-119-38, *Cryptococcus neoformans* LM-49) e fungos filamentosos (*Aspergillus flavus* ATCC-1303, *Aspergillus niger* LM-23).

O controle negativo utilizado foram os antibióticos gentamicina (64 µg/mL) para inibição das bactérias e para inibição dos fungos.

Após realização da CIM e incubação em estufa a 35°C ± 2°C por 24 ou 48 horas para as bactérias e os fungos leveduriformes e incubação em estufa com temperatura de 28°C ± 2°C por 7 dias para os fungos filamentosos, os resultados antimicrobianos foram expressos na tabela 5 (pág. 95).

Tabela 5: Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM (µg/mL) do EEB, das fases e de substância isolada contra cepas bacterianas e fúngicas.

PRODUTOS	MICRORGANISMOS											
	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>E. coli</i> LM-35	<i>C. albicans</i> ATCC-60193	<i>C. albicans</i> LM-38	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. gatti</i> IHCQS-40113	<i>C. neoformans</i> FCF-119	<i>C. neoformans</i> LM-49	<i>A. flavus</i> ATCC-13013	<i>A. niger</i> LM-23
Fase Hexânica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EEB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fase Hidroalcoólica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fase Acetato de Etila	+	+	+	+	+	128	+	1024	1024	512	+	+
Fase Clorofórmica	+	+	1024	1024	1024	256	+	1024	1024	512	+	+
Sal da Criptolepina	+	+	1024	256	512	128	+	512	1024	512	+	+
Controle: Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle: Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle: Anfotericina B	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle: Gentamicina	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x

Nesta técnica podemos avaliar de forma quantitativa a concentração que é capaz de inibir o crescimento livre do fungo. Os resultados da determinação da CIM nos mostram que os produtos 1 (fase hexânica), 2 (EEB) e 3 (fase hidroalcoólica) não apresentaram atividade antimicrobiana. Em contrapartida, o produto 4 (fase acetato de etila) inibiu quatro cepas fúngicas: *C. albicans* LM-38 com CIM de 128 µg/mL; *C. neoformans* LM-49 com CIM de 512 µg/mL; *C. neoformans* FCF-119 e *C. gatti* INCQS-40113 com CIM de 1024 µg/mL. Já o produto 5 (fase clorofórmica) inibiu as cepas: *C. albicans* LM-38 com CIM de 256 µg/mL; *C. neoformans* LM-49 com CIM de 512 µg/mL; *E. coli* ATCC-18739, *E. coli* LM-35, *C. albicans* ATCC-60193, *C. neoformans* FCF-119 e *C. gatti* INCQS-40113 com CIM de 1024 µg/mL. O produto 6 (sal da criptolepina) apresentou perfil de inibição semelhante ao produto 5, porém, com maior eficácia contra determinadas cepas: *C. albicans* LM-38 com CIM de 128 µg/mL; *E. coli* LM-35 e *C. gatti* INCQS-40113 com CIM de 512 µg/mL, *C. neoformans* LM-49 e *C. albicans* ATCC-60193 com CIM de 512 µg/mL; *E. coli* ATCC-18739 e *C. neoformans* FCF-119 com CIM de 1024 µg/mL. Assim, a fase clorofórmica e o composto químico isolado, sal da criptolepina, foram os que tiveram a capacidade de inibir a maior quantidade de microorganismo.

As cepas *S. aureus* ATCC-25923, *P. aeruginosa* ATCC-25853, *C. tropicalis* ATCC-13803, *A. flavus* ATCC-13013 e *A. niger* LM-23 se mostram resistentes a todos os produtos testados.

Levando em consideração os microorganismos utilizados, os fungos *C. albicans* e *C. neoformans* foram aqueles que apresentaram maior sensibilidade aos produtos (4, 5 e 6), apresentando uma CIM que variou de 128 µg/ml a 512 µg/ml. Segundo Sartoratto e colaboradores (2004), produtos com CIM até 600 µg/mL apresentam forte atividade antimicrobiana, entre 600 e 1500 µg/mL moderada atividade antimicrobiana, e acima de 1500 µg/mL fraca atividade antimicrobiana. De acordo com esta classificação, os produtos testados frente a estes dois fungos leveduriformes apresentaram forte atividade antimicrobiana.

Estudo realizado por Chaves et al., (2016) com a espécie *Sida rhombifolia*, pertencente ao mesmo gênero da espécie em estudo, corrobora com os resultados encontrados neste presente trabalho, onde o produto sal da criptolepina apresenta em ambos estudos uma forte atividade antifúngica sob diferentes cepas de *Candida albicans*. Este alcaloide foi o que apresentou resultados mais promissores no presente trabalho, isto pode estar relacionado com o fato de ser uma substância já isolada, não sofrendo assim interferência de outros constituintes e também por se apresentar na forma protonada.

Sailaja et. al., (2015) relata que os extratos aquoso, de acetona, clorofórmico e éter de petróleo das folhas de *Sida cordifolia* apresentam atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, resultado este que não foi obtido neste trabalho com a espécie *Sida planicaulis*.

O resultado aqui encontrado fortalece a importância na busca por medicamentos a partir de fontes naturais, uma vez que estas apresentam atividade bacteriana comprovada cientificamente. As espécies de *Candida* são responsáveis por 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas (SOYER et al., 2017) e uma busca constante para o seu tratamento acontece para que haja um controle. O sal da criptolepina aqui isolado e com atividade fúngica considerada forte pode se tornar uma alternativa no tratamento de *Candida albicans*.

6. Conclusões



- O estudo fitoquímico da fase clorofórmica do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae), realizado através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparações com os dados da literatura, permitiram isolar e caracterizar as estruturas de duas substâncias, sendo uma curmarina (6,7- dihidroxicurmarina – Esculetina) e um alcaloide (5-N-metil-6,9,10,10a-tetraidro-4aH-indol[3,2-b]quinolin-5-a – Sal da criptolepina), sendo estas inéditas na espécie *Sida planicaulis* Cav., contribuindo assim com o perfil fitoquímico do gênero *Sida*.
- Por meio da técnica utilizando espectrometria de massas (FIA-ESI-IT-MS) propomos a identificação de 8 substâncias, a maioria flavonoides O-glicosídeos, sendo os constituintes químicos inéditos na espécie *Sida planicaulis*.
- Uma avaliação da atividade antimicrobiana do EEB e fases de *Sida planicaulis* como também do alcaloide (sal da criptolepina) isolado da fase clorofórmica, evidenciou que o sal da criptolepina apresentou frente as cepas *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, a melhor atividade com CIM variando entre moderada e ótima.

Referências



ABAD-GARCÍA B.; BERRUETA L. A.; GARMÓN-LOBATO S.; GALLO B.; VICENTE F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 5398-415, 2009.

ABAD-GARCÍA B.; GARMÓN-LOBATO S.; BERRUETA L. A.; GALLO B.; VICENTE F. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 213-24, 2012.

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proc. Nutr Soc**, v. 64, p. 403–412, 2005.

AHMED, F.; TOUME, K.; OHTSUKI, T.; RAHMAN, M.; SADHU, S. K.; ISHIBASHI, M. Cryptolepine, isolated from *Sida acuta*, sensitizes human gastric adenocarcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 147-150, 2011.

AKILANDESWARI, S. et al. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Sida acuta* Burm. International **Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)**, v.1, p. 248-250, 2010.

ALASALVAR, C. et al. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **J. Agric. Food Chem**, v. 49, p. 1410–1416, 2001.

ALMEIDA, M.R. et al. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, p. 942-952, 2009.

ANANI, K.; HUDSON, J. B.; SOUZA, C.; AKPAGANA, K.; TOWER, G. H. N.; ARNASON, J. T.; GBEASSOR, M. Investigation of medicinal plants of Togo for antiviral and antimicrobial activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 40-45, 2000.

ANTÃO, A. M. R. **Estudo de compostos bioactivos e atividades biológicas de *Plectranthus ecklonii* Benth.** Lisboa – Portugal, 2015.

ARIZA, S. Y.; RUEDA, D. C.; Rincón, J.; LINARES, E. L.; Guerrero, M. F. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de *Hygrophila tythta* Leonard. **Vitae**, v.14, n. 2, 2007.

ASSAM, J. P.; DZOYEM, J. P.; PIEME, C. A.; PENLAP, V. B. *In vitro* antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 40, 2010.

ASSIS, E. B.; FERNANDES, M. M. M.S.; SOUZA, M. S. R.; SOBREIRA, A. L. C.; FERNANDES, D. A.; TELES, Y. C. F.; AGRA, M. F.; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W.; SOUZA, M. F. V. S. **Identification of phenolic compounds of the n-butanolic phase of *Sida galheirensis* (Ulbr.) Malvaceae by FIA-ESI-IT/MS.** In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, Vitória-ES, 2017.

BANDYUKOVA, V.A.; LIGAI, L. V. Study of the kinetics of the extraction of flavonoids from plant raw material I. Extraction of rutin from *Sida hermaphrodita*. **Chem Nat Comp**, v. 23, p. 551-3, 1987.

BANZOUZI, J. T.; PRADO, R.; MENAN, H.; VALENTIN, A.; ROUMESTAN, C.; MALLIE, M.; PELISSIER, Y.; BLACHE, Y. Studies on medicinal plants of Ivory Coast: Investigation of *Sida acuta* for *in vitro* antiparasmodial activities and identification of an active constituent. **Phytomedicine**, v. 11, p. 338-341, 2004.

BARONI, M. V.; GASTAMINZA, J.; PODIO, N. S.; LINGUA, M. S.; WUNDERLIN, D. A.; ROVASIO, J. L.; RIBOTTA, P. D. Changes in the Antioxidant Properties of Quince Fruit (*Cydonia oblonga* Miller) during Jam Production at Industrial Scale. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

BEDIN, M.; COLODEL, E. M.; GIUGLIANI, R.; ZLOTWSKI, P.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Urinary oligosaccharides: A peripheral marker for *Sida carpinifolia* exposure or poisoning, **Toxicon**, v. 53, p. 591-594, 2009.

BIFTU, A.; ADANE, L.; TARIKU, Y. 2014. Evaluation of antibacterial activities of compounds isolated from fruits of *Sida rhombifolia* Linn. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 22, p. 681-689, 2014.

BOVINI, M.G.; OKANO, R.M.C.; VIEIRA, M.F. Malvaceae A. Juss. no parque estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, p. 289-301, 2010.

BOVINI, M.G. Malvaceae s. str. na Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, p. 289-301, 2010.

BOVINI, M.G. *Sida* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9203>>. Acesso em: Fev. 2019.

BOVINI, M.G. *Sida* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9227>>. Acesso em: Ago. 2018.

BOURICHE, H.; MILES, E. A.; SELLOUM, L.; CALDER, P. C. Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, n.3, p. 195-201, 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria de Políticas Agrícolas. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Política Nacional de medicina e Prática complementares. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica/Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica** – Brasília: Ministério da Saúde, Caderno de Atenção Básica; n. 31, 156 p, 2012.

BRITO, M.R.; SENNA-VALLE, L. Diversity of plant knowledge in a “Caiçara” community from the Brazilian Atlantic Forest coast. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p.735-747, 2012.

CALZADA, F.; BASURTO, J. C.; BARBOSA, E.; VELÁZQUEZ, C.; HERNÁNDEZ, N. G.; RAZO, R. O.; MULIA, L. Y. Antiprotozoal activities of tiliroside and other compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. don. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 2, p. 133, 2017.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do Registro de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. **Revista Bras. Farmacognosia**, v. 18, 2008.

CASOLARO, M.; ANSELMi, C.; PICCIOCCHI, G. The protonation thermodynamics of ferulic acid/[γ]-cyclodextrin inclusion compounds. **Thermochim. Acta**, v. 425, p. 143–147, 2005.

CASEMIRO-JUNIOR, F.; CHAVES, O. S.; FERNANDES, M. M. M. S.; AGRA, M. F.; TELES, Y. C. F.; SOUZA, M. F. V. Substâncias isoladas de *Pavonia cancellata* (L.) (MALVACEAE). 36° Reuni. Na. Da Socied. Bras. De Quím. (SBQ), Águas de Lindoia-SP, 2013.

CASTRO, N. M. N. **Estudo e caracterização química dos compostos extractáveis em metanol da polpa de baobá (*Adansonia digitata*)**. Dissertação (Mestrado). Departamento de química, Universidade de Aveiro, Aveiro/Portugal, 2008.

CAVALCANTE, J. M. S.; NOGUEIRA, T. B. D. S. D.; TOMAZ, A. C. D. A.; ANTAS E SILVA, D.; AGRA, M. D. F.; SOUZA, M. D. F. V. D.; GONÇALVES, S.T. Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* (L.) Fryxell and evaluation of cytotoxic and antiinflammatory activities. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 846-849, 2010.

CHAKTHONG, S.; WEAARYEE, P.; PUANGPHET, P.; MAHABUSARAKAM, W.; PLODPAI, P.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; KANJANA, O. A. Alkaloid and coumarins from the green fruits of *Aegle marmelos*. **Phytochemistry**, vol. 75, p. 108–113, 2012.

CHATTERJEE, T.K. New anti-asthmatic drug (Asmakure) from indigenous herbs to cure the disease asthma. CA 2503669 A1, 2003.

CHAVES, O.S. GOMES, R. A.; TOMAZ, A. C. D. A.; FERNANDES, M. G.; JUNIOR, L. G. M.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. Secondary Metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of Cryptolepinone. **Molecules**, v.18, n. 3, p.2769-2777, 2013.

CHAVES, O. S. **Estudo fitoquímico e antimicrobiano de duas espécies de Malvaceae: *Pavonia malacophylla* (Link & Otto) Garcke e *Sida rhombifolia* L.** Tese apresentada ao PgPNSB/UFPB, 2016.

CHAVES, O. S.; TELES, Y. C. F.; MONTEIRO, M. M. D. O.; MENDES JUNIOR, L. D. G.; AGRA, M. D. F.; BRAGA, V. D. A.; SOUZA, M. D. F. V. D. Alkaloids and Phenolic Compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and Vasorelaxant Activity of Two Indoquinoline Alkaloids. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 94, 2017.

CHOPRA, R.N.; HANDA, K.L.; KAPUR, L.D. **Chopra's Indigenous drugs of India**. Meerut, India: Academic Publishers, 2 ed. 1958.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.80, p.1033–1043, 2000.

CLIFFORD, M. N.; CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n. 10, p.2900–2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; KUHNERT, N. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC–MSⁿ. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 17, p. 384-393, 2006.

COEE, F.G.; ANDERSON, G.J. Ethnobotany of the *Garifuna* of the eastern Nicaragua. **Economic Botany**, v. 50, p. 71-107, 1996.

COSTA, D. A.; MATIAS, W. N.; LIMA, I. O.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. B. M.; DINIZ, M. D. F. F. M.; SOUZA, M. F. V. First secondary metabolites from *Herissantia crispa* L (Brizicky) and the toxicity activity against *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v.32, p. 48-50, 2009.

COSTA, D. A.; CAVALCANTI, A. C.; MEDEIROS, M. A. A. D.; LIMA, J. T. D.; CAVALCANTE, J. M. S.; SILVA, B. A. D.; SOUZA, M. D. F. V. D. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* (H. Monteiro) (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, v.30, n. 4, p. 901-903, 2007.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p. 7313–7352, 2010.

DARWISH, F. M. M.; REINECKE, M. G. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1179-1184, 2003.

DAS, N.; ACHARI, B.; HARIGAYA, Y.; DINDA, B. A new flavonol glucoside from the aerial parts of *Sida glutinosa*. **Journal of Asian Natural Product Research**, v.13, n. 10, p. 965-971, 2011.

DAS, N.; NATH, J.; DINDA, B. Antioxidant phytochemicals from *Sida glutinosa*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, p. 4845-4848, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. Ottawa: J. Willey, 2009.

DINDA, B.; DAS, N.; DINDA, S.; DINDA, M.; Silsarma, I. The genus *Sida* L.—a traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry. **Journal of ethnopharmacology**, v. 176, p. 135-176, 2015.

DINAN, L.; BOURNE, P.; WHITING, P. Phytoecdysteroid profiles in seeds of *Sida* spp. (Malvaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 110-119, 2001.

DOWDA, M.K.; FARVE, M.C. Fatty acid composition of *Tilia* spp. seed oils. **Grasas y Aceites**, v. 64, p. 243-249, 2013.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, v. 7, 2006.

DUBBER, M. J.; SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G. S.; KANFER, I. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 37, n.4, p. 723-731, 2005.

DUGO, P.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B.; MONDELLO, L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n. 43, p.7213–7221, 2009.

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T.; DAGNON, S.; GÜREL, A.; AKTAŞ, L.; ESHEVA, E. Stress-protective role of secondary metabolites: Diversity of functions and mechanisms. **Gen. Appl. Plant. Physiol**, v. 34, p. 67–78, 2008.

EKRAMUL, I. M. Larvicidal activity of a new glycoside, phenylethyl β -D-glucopyranoside from stem bark of the plant *Sida rhombifolia*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 73-75, 2003.

FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual review of plant biology**, v. 52, p. 29-66, 2001.

FARAH, A.; DUARTE, G. Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids from coffee. In *Coffee in Health and Disease Prevention*, p. 789–801, 2015.

FELIPE, D. F.; BRAMBILLA, L. Z.; PORTO, C.; PILAU, E. J.; CORTEZ, D. A. Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/MS. **Molecules** v, 19, n. 10, p.15720-15734, 2014.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n.3, p. 369-394, 2006.

FERNANDES, M. M. M. S. **Identificação dos constituintes químicos de *Pavonia cancellata* (L.) E *Sida galheirensis* (ULBR) - Malvaceae através de métodos cromatográficos e espectroscópicos e avaliação antimicrobiana do 5,3',4'-trihidroxi-7-o- β -D-glicopiranosideoflavona (cinarosídeo)**. Tese apresentada ao PgPNSB/UFPB, 193 pág., 2017.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties. **Food Chem**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012.

FIRMINO, W. C.A.; MENEZES, V. J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L. P.L.; NETO-SANTOS, M.; OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. Caderno de Pesquisa. São Luís, v. 18, 2011.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C. V. F.; RODRIGUES, H. M. S. L.; MOURAO, R. H. V.; ANDRADE, M. R.; ANTONIOLLI, A. R. Anti-inflammatory, Analgesic Activity and Acute Toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 273-278, 2000.

FRYXELL, P. A. In: **Flora of Ecuador: Malvaceae**. Publishing House of the Swedish Research Councils, Sweden, v. 44, p 1-142, 1992.

FRYXELL, P. A. A new South American subsection of *Sida* sect. *Nelavaga* (Malvaceae) with two new species. **Lundellia**, v. 12, p. 15-27, 2009.

GAO, X. L.; LIAO, Y.; WANG, J.; LIU, X. Y.; ZHONG, K.; HUANG, Y. N.; XU, Z. J. Discovery of a potent anti-yeast triterpenoid saponin, clematoside-S from *Ureta lobate* L. **International Journal os Melecular Sciences**, v. 16, p. 4731-4743, 2015.

GEORGE, V. C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H. P V. Plant flavonoids in câncer chemoprevention: role in genome stability. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 45, p. 1-14, 2017.

GOMES, R. A.; RAMIREZ, R. R.; MACIEL, J. K. D. S.; AGRA, M. D. F.; SOUZA, M. D. F. V. D.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) fryxell and evaluation of acacetin and 7,4'-Di-O-methylisoscutearein as motulator of bacterial drug resistance. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1385-1388, 2011.

GONZÁLEZ, J.; CUÉLLAR, A.; ABREU, P.; MONAN, M.; NOSSIN, E.; FRANÇOIS-HAUGRIN, F. Antioxidant Activity of gossypitrin isolated from the petals of *Talipariti elatum* (Sw.) Fryxell (Malvaceae) in Cuba. **International Journal of Engineering Research & Science (IJOER)**, v. 3, p. 17-22, 2017.

GONZÁLEZ, G. J.; GARCÍA, M. M. V.; SÁNCHEZ, C., S.; TUÑÓN, M. J. Anti-inflammatory, Immunomodulatory, and Prebiotic Properties of Dietary Flavonoids. In: **Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease**. Academic Press, p. 327-345, 2018.

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO P. C. Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high-performance liquid chromatography with on-line ultraviolet and mass spectrometry detection. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 24, p.1851-68, 2010.

GOUVEIA, S.; CASTILHO P. C. Characterization of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC-DAD-(-)-ESI-MS⁽ⁿ⁾ method. **Food Chem**, v. 129, p. 333-44, 2011.

GHOSAL, S.; CHAUHAN, R. B. P. S.; MEHTA, R. Alkaloids of *Sida cordifolia*, *Phytochemistry*, v. 14, p. 830-832, 1975.

GOYAL, M. M.; RANI, K. K. Effect of Natural products isolated from three species of *Sida* on some Gram positive and Gram negative bacteria. **Journal of Indian Chemical Society**, v. 65, p. 74-76, 1988.

GRIFFITH, W. P.; MOSTAFA, S. I. Complexes of esculetin with second and third row transition elements. **Polyhedron**, v. 11, p. 871-877, 1992.

GRINGS, M. BOLDRINI, I.I. O gênero *Pavonia* Cav. (Malvaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 352-380, 2013.

GROSS, J.H. **Principles of Ionization and Ion Dissociation**. In *Mass Spectrometry*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, p. 21–66, 2011.

GRÜNER, J. M.; SOUZA, T. K.; BENITEZ, L. B.; SILVA, C. D. M. Análise do perfil fitoquímico de *Tripodanthus acutifolius* (ruiz & pavón) tieghem, Loranthaceae. **Revista Jovens Pesquisadores**, n. 1, 2012.

GUIDO, R. C; ANDRICOPULO, A. D; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUNATILAKA, A. A. L.; SOTHEESWARAN, S.; BALASUBRAMANIAM, S.; CHANDRASEKARA, A. I.; BADRASRIYANI, H. T. Studies on medicinal plants of Sri Lanka- III: Pharmacologically important alkaloids of some *Sida* species. **Planta Medica**, v. 39, p. 66-72, 1980.

HABTEMARIAM, S. A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. **Nat. Prod. Commun.**, v. 6, p. 201–203, 2011.

HADI, A. H. A.; DURU, M. E.; MARTIN-DIANA, A. B. Bioactive natural products. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1 –, 2013.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. London: Taylor & Francis, 2 ed, 1999.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p.572–584, 2002.

HERNANDEZ, F. P.; HERRERA, A. A. Therapeutic use *Hibiscus sabadariffa* extract in the treatment of hypercholesterolemia. A randomized clinical trial. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 49, p. 469-480, 2001.

HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of endocrinological investigation**, v. 37, p. 783-788, 2014.

HUANG, J. L.; FU, S. T.; JIANG, Y. Y.; CAO, Y. B.; Guo, M. L.; WANG, Y.; XU, Z. Protective effects of nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 86, n.4, p. 741–748, 2007.

HUANG, X.; LIU, Y.; SONG, F.; LIU, Z.; LIU, S. Studies on principal components and antioxidant activity of different *Radix astragali* samples using high performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry. **Talanta**, v.78, n.3, p. 1090–1101, 2009.

HUSEIN, C. C. Alcaloides das raízes de *Xylopia langsdorffiana* ST-HIL & TUL. (Annonaceae). Dissertação apresentada ao PgPNSB-UFPB, 2016.

IRANSHAHI, M. ASKARI, M.; SAHEBKAR, A.; ADJIPAVLOU-LITINA, D. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. **DARU**, v. 17, n.2, p. 99–103, 2009.

IROHA, I. R. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of *S. acuta* against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from immunodeficiency virus/acquired immune-deficiency syndrome patients. **Research Journal of Pharmacology**, v. 3, p. 22-25, 2009.

JADHAV, A. N.; PAWAR, R. S.; AVULA, B.; KHAN, I. A. Ecdysteroid glycosides from *Sida rhombifolia* L. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 2225-2230, 2007.

JAMEEL, E.; UMAR, T.; KUMAR, J.; HODA, N. Coumarin: a privileged scaffold for the design and development of antineurodegenerative agents. **Chemical biology & drug design**, v. 87, n.1, p. 21-38, 2016.

JANG, D. S. 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. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, p. 585-590, 2003.

JIN, X.; SONG, S.; WANG, J.; ZHANG, Q.; QIU, F.; Zhao, F. Tiliroside, the major component of *Agrimonia pilosa* Ledeb ethanol extract, inhibits MAPK/JNK/p38-mediated inflammation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 12, n. 1, p. 499-505, 2016.

JINDAL, A.; KUMAR, P. Antibacterial activity of *Sida acuta* Burm. F. against human pathogens. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 33-38, 2012.

KACHLICKI, P.; KACHLICKI, P.; EINHORN, J.; MUTH, D.; KERHOAS, L. STOBIECKI, M. Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 5, p. 572-586, 2008.

KAROU, D.; SAVADOGO, A.; CANINI, A.; YAMEOGO, S.; MONTESANO, C.; SIMPORE, J.; TRAORE, A. S. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 1452-1457, 2006.

KAROU, S.D.; NADEMBEGA, W. M.; ILBOUDO, D. P.; OUERMI, D.; GBEASSOR, M.; SOUZA, C.; SIMPORE, J. Review: *Sida acuta* Burm. f.: a medicinal plant with numerous potencies. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, p. 2953-2959, 2007.

KIM, N. M.; KIM, J.; CHUNG, H. Y.; CHOI, J. S. Isolation of luteolin 7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *Artemisia montana*. **Archives of Pharmacal research**, v. 23, p. 237-239, 2000.

KHANRA, R.; DEWANJEE, S.; DUA, T. K.; SAHU, R.; GANGOPADHYAY, M.; FEO, V.; ZIA-UL-HAQ, M. *Abroma augusta* L. (Malvaceae) leaf extract attenuates diabetes induced nephropathy and cardiomyopathy via inhibition of oxidative stress and inflammatory response. **J Transl Med**, v. 13, n.1, p.13-16, 2015.

KOMES, D.; BUŠIĆ, A. Antioxidants in coffee. In Processing and Impact on Antioxidants in Beverages, v. 3, p. 25–32, 2014.

KONATE, K.; HILOU, A.; MAVOUNGOU, J. F.; LEPENGUÉ, A. N.; SOUZA, A.; BARRO, N.; NACOULMA, O. G. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, p. 5, 2012.

KRAPOVICKAS, A. Revisión de *Sida* sección Muticae C. Presl (Malvaceae, Malveae). *Bonplandia*, v. 12, p. 123-132, 2013.

KRAPOVICKAS, A. Las especies argentinas y de países vecinos de *Sida* sec. C Nelavaga (Malvaceae: Malveae). *Bonplandia*, Corrientes, v. 15, p. 5-45, 2006.

KUBAVAT, J.B.; ASDAQ, S.M.B. Role of *Sida cordifolia* L. leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 162–165, 2009.

KUMAR, A.; SINGH, A. Review on *Hibiscus rosa-sinensis*. **International Jpurnal of Research in Pramaceutical and Biomedical Sciences**, v. 3, p.534-538, 2012.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 86-93, 2014.

LANÇAS, F. M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compativeis?”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n.2, p. 35-61, 2009.

LEE, M. W.; LEE, Y. A.; PARK, H. M.; TOH, S. H.; LEE, E. J.; JANG, H. D.; KIM, Y. H. Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor, **Archives of Pharmacal Research**, v. 23, n.5, p. 455-8, 2000.

LI, R. P. LI, R.; GUO, M.; ZHANG, G.; XU, X.; LI, Q. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.107, n.1, p. 143–150, 2006a.

LI, R. P.; GUO, M.; ZHANG, G.; XU, X.; LI, Q. Neuroprotection of nicotiflorin in permanent focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 1868–1872, 2006b.

LIGAI, L. V.; BANDYUKOVA, V. A. Constituents of aerial parts of *Sida hermaphrodita*. **Khimija. Prirodnikh Soyedineniy**, v. 2, p. 269-270, 1990.

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; Chen, H. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374, 2016.

LONG, Q.; YANG, T. Summary and prospect of rutin. **Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine**, v. 9, p. 39–41, 2002.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T.; PINTO, A. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Flavonoides. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília. v. 17, p. 18-22, 2000.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plants against plant and human pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, p. 839- 843, 2008.

MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; SHIMODA, H.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): Structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 707-712, 2002.

MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and pro-oxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food Chem. Toxicol**, v. 48, p. 3369–3373, 2010.

MAZZOTTI, M. R. R. M.; LIMA, J. B.; ARAUJO, T. A.; TELES, Y. C. F.; CONCEIÇÃO, A. S.; SOUZA, M.F.V.S. Constituintes fenólicos de *Pavonia glazioviana* GÜRKE: estudo fitoquímico pioneiro. In: **X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, Juazeiro da Bahia-BA, 2015.

MEDINA, I. C.; BELTRÁN, D. R.; MOLINA, V. M.; ALONSO, V. C.; JOVEN, J.; MENÉNDEZ, J. A.; FERNÁNDEZ, G., A. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. **Journal of separation science**, v. 32, n. 20, p. 3441-3448, 2009.

MEINHART, A. D.; DAMIN, F. M.; CALDEIRÃO, L.; SILVEIRA, T. F. F.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil. **Food Research International**, v. 99, p. 522-530, 2017.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; BISTONI, F.; ROMANI, L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 1, n.3, p. 235-251, 2000.

MING, D. S.; HILLHOUSE, B. J.; GUNS, E. S.; EBERDING, A.; XIE, S.; VIMALANATHAN, S.; TOWERS, G. N. Bioactive compounds from *Rhodiola rosea* (Crassulaceae), **Phytotherapy Research**, v. 19, n.9, p. 740-743, 2005.

MOMIN, M. A.; BELLAH, S. F.; RAHMAN, S. M. R.; RAHMAN, A. A.; MURSHID, G. M. M.; EMRAN, T. B. Phytopharmacological evaluation of ethanol extract of *Sida cordifolia* L. roots. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v 4, n.1, p. 18-24, 2014.

MONTORO, P.; MALDINI, M.; PIACENTE, S.; MACCHIA, M.; PIZZA, C. Metabolite fingerprinting of *Camptotheca acuminata* and the HPLC–ESI-MS/MS analysis of camptothecin and related alkaloids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n.2, p. 405, 2010.

NAVANEETHAKRISHNAN, S.; KUMAR, P. S.; SATYANARAYANA, T.; MOHIDEEN, S.; KUMAR, G. K. Antimicrobial activity of ethanolic leaf extract of *Sida spinosa* Linn. (Malvaceae). **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 1, n.3, p. 65-67, 2011.

NEGRI, G., SANTI, D.; TABACH, R. Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, p.217-224, 2013.

NEWMAN, R. A.; CHEN, W.; MADDEN, T. L. Pharmaceutical properties of related calanolide compounds with activity against human immunodeficiency virus. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 87, p. 1077–1080, 1998.

OLIVEIRA, J.C.S. **Isolamento de constituintes e síntese de flavonoides encontrados em *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae) e análise fitoquímica de *Theobroma cacao* (Malvaceae)**. 2014. Tese da Universidade Federal da Bahia em Química, Salvador, BA, 2014.

OLIVEIRA, J. D. S.; MACHADO, K. D. C.; FREITAS, R. M. D. Produtos naturais aplicados a doenças negligenciadas: prospecção tecnológica. **Revista GEINTECGestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, p. 729 – 734, 2014.

ORHAN, I. E.; SENOL, F. S.; ERCETIN, T.; KAHRAMAN, A.; CELEP, F.; AKAYDIN, G.; DOGAN, M. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 21-30. 2013.

OUEDRAOGO, M.; ZERBO, P.; KONATÉ, K.; BARRO, N.; SAWADOOGO, L. L. Effect of long term use of *Sida rhombifolia* L. extract on haemato-biochemical parameters of experimental rats. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n.1, p. 18-24, 2013.

PANDIT, S. S.; NAIK, S. D.; JATHAR, V. S.; KULKARNI, A. B. Insect moulting hormone, ecdysterone from *S. carpinifolia* Linn. **Indian Journal of Chemistry**, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, v.14B, p. 907-908, 1976.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 29, n.3, p. 323-331, 2015.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A. **Introduction to spectroscopy**. Cengage Learning, 4 edição, 2010.

PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FERREIRA, I. C.; ESTEVINHO, L. *Walnut* (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n.11, p. 2287-2295, 2007.

PIOVESANA, A.; RODRIGUES, E.; NOREÑA, C. P. Z. Composition analysis of carotenoids and phenolic compounds and antioxidant activity from hibiscus calyces (*Hibiscus sabdariffa* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Phytochemical Analysis**, 2018.

PLAZONIĆ, A.; BUCAR, F.; MALEŠ, Ž.; MORNAR, A.; NIGOVIĆ, B.; KUJUNDŽIĆ, N. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 14, n.7, p. 2466-90, 2009.

PRABHAKAR, T.; RAO, T. S.; BABY, B.; RAMESH, K.; SURESH, B. Antibacterial and antifungal activity of *Sida cordifolia* Linn. **Asian Journal of Chemistry**, v. 19, n.6, p. 4649-4652, 2007.

PRAKASH, A.; VARMA, R. K.; GHOSAL, S. Chemical Constituents of the Malvaceae. Part III. Alkaloidal Constituents of *Sida acuta*, *Sida humilis*, *Sida rhombifolia* and *Sida spinosa*. **Plant Medicinal** v. 43, p. 384-388, 1981.

PREETHIDAN, D. S. Lipoxigenase inhibitory activity of some *Sida* species due to di (2-ethylhexyl) phthalate. **Current Science**, v. 105, p. 232-234, 2013.

PUGLIESE, A.G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: Composição e possíveis benefícios**. Dissertação da Universidade de São Paulo, em Ciências dos Alimentos, São Paulo, SP, 2010.

RANDHIR, R.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 13, p. 295–307, 2004.

RANGAPPA, S. K.; SASIDHAR, B. S.; NAGARAJA, B. M.; SANTOS, M. A. Recent progress in the drug development of coumarin derivatives as potent antituberculosis agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 100, p. 257-269, 2015.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam: v.56, n.1, p. 3-12, 2000.

REDDY, S. M.; KUMARI, C. K.; REDDY, C. S.; REDDY, Y. R. R.; REDDY, C. D. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Sida cordifolia*. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n.9, p. 309-311, 2012.

REFLORA. Herbário Virtual, Flora do Brasil – *Sida planicaulis*. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br> , acesso em 09 de dez 2018.

REX, J. H.; WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J. Fungal infections in iatrogenically compromised hosts. **Advances in internal medicine**, v. 43, p. 321-371, 1997.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, E. V. **Farmacognosia, Farmacobiotechnologia**. Editorial Premier, 1997.

ROBERTS, M. F. **Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications**. Springer Science & Business Media, 2013.

ROLIM, Y. M. Estudo fitoquímico de *Waltheria viscosíssima* (Malvaceae). Dissertação/PgPNSB/UFPB, 88 p., 2015.

ROSA, H. S. D. **Caracterização e determinação da atividade antifúngica in vitro de extratos obtidos de *Sida tuberculata* R.E. FRIES (Malvaceae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Pampa. Programa de Pósgraduação em Bioquímica. Uruguaiana-RS, 2013.

SAILAJA, V.; MADHU, M.; NEERAJA, V. Evaluation of Anti-microbial Activity of Indigenous Medicinal plants Seed extracts of India. **Der Pharmacia Sinica**, 7(4); p. 44-50, 2016.

SÁNCHEZ, R. F.; JÁUREGUI, O.; CASALS, I.; ANDRÉS, L. C.; IZQUIERDO, P., M.; LAMUELA, R., R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of mass spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.

SANDHAR, H.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p. 25-45, 2011.

SANDHU, S.; SANDHU, S.; BANSAL, Y.; SILAKARI, O.; BANSAL, G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 15, p. 3806-3814, 2014.

SARMA, S. K.; BABU A. V. Pharmacognostic and phytochemical studies of *Thespesia populnea* Linn. **J Chem Pharm Res**, v.3, p.237-44, 2011.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SELVADURAI, S.; SENTHAMARAI, R.; SRI, V. K., T.; VASUKI, K. Antimicrobial activity of ethanolic extract of the whole plant of *Sida spinosa* Linn (Malvaceae). **Journal of Natural Products and Plant Resources**, v. 1, n. 2, p. 36-40, 2011.

SHARMA, P.V.; AHMAD, Z.A. Two Sesquiterpene Lactones from *Abutilon indicum*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3525, 1989.

SHETTY, K.; WAHLQVIST, M.L. A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. **Asia Pac. J. Clin. Nutr**, v.13, p. 1–24, 2004.

SHUKITT-HALE, B.; LAU, F.C.; JOSEPH, J.A. Berry fruit supplementation and the aging brain. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, p. 636–641, 2008.

SILVA, D.A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonoides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K Schum) Brizick (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-de-O-a-Lramnopiranosídeo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p. 23-29, 2005.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M.S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F.V. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1250-1256, 2006.

SILVA, D. A.; Falcão, S. V. S.; SERRANO, G. A. Y. COSTA, D. A.; SOARES L., V., AGRA, M. F. D.; SOUZA, M. F.V. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,4,-dihydroxy-3,6,7,8,3-pentamethoxyavone as a modulator of bacterial drug resistance. **Pharmaceutical Biology**, v.47, p. 279-284, 2009.

SILVA, A. C. O.; SILVA, A. C. O.; OLIVEIRA, A. F. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; SILVA, S. I. An approach to chemotaxonomy to the fatty acid content of some Malvaceae species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n.5, p. 1035–1038, 2010.

SILVA, M. J. D. **Estudo fitoquímico e biológico dos extratos das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UNESP, Araraquara, 2016.

SILVA, G. E. A.; LIMA, R.N.; LANDA, G. G. Aspectos ecológicos de *Helicteres Sacarolha* ST.HIL. (Sterculiaceae) em um fragmento de mata urbana do município de Belo Horizonte, MG. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Anais eletrônicos. Caxambu, MG, 2007. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/949.pdf>>. Acesso em Ago. 2018.

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 6 edição, 2010.

SOBREIRA, A. L. C.; OLIVEIRA, N. R.; COSTA, D. A.; CARMO, E. S. Prospecção fitoquímica e avaliação antimicrobiana de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) sobre leveduras potencialmente patogênicas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.13, n.3, p. 356 – 360, 2018.

SOUZA, D.P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUINTANS, J., L.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 3, p. 231-235, 2006.

SOUZA, M. S. R. **Estudo fitoquímico de duas espécies de mimosa: *Mimosa ophthalmocentra* Mart ex Benth e *Mimosa tenuiflora* (will) Poir – Fabaceae**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB, João Pessoa, 2018.

SOYER, N.; ÜNAL, H. D. K.; VURAL, F.; ŞAHİN, F.; TÖBÜ, M.; DÖNMEZ, A.; SAYDAM, G. Epidemiology and analysis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a single-center real-life experience. **Turkish journal of medical sciences**, v. 47, n. 5, p.1535-1542, 2017.

SREEDEVI, C. D.; LATHA, P. G.; ANCY, P.; SUJA, S. R.; SHYAMAL, S.; SHINE, V. J.; RAJASEKHARAN, S. Hepatoprotective studies on *Sida acuta* Burm. f. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, n. 2, p. 171-175, 2009.

STEIN, A.C. **Análise química de *Pterocaulon* (asteraceae) e determinação da atividade antifúngica**. Dissertação de mestrado, apresentada Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - 2005.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 4, May 2003. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/> Acesso em: Nov. 2018.

STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A.; O'BRIEN, D. Raimondal, a New Sesquiterpenoid from Pigment Glands of *Gossypium raimondii*. **Phytochemistry**, v.19, p. 1735-1738, 1980.

STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P.; JELEŃ, H. **Mass Spectrometry in Agriculture, Food, and Flavors: Selected Applications**. In *Mass Spectrometry Handbook*. Inc.: Hoboken, NJ, USA, p. 529–558, 2012.

SUTRADHAR, R. K.; RAHMAN, A. K. M. M.; AHMAD, M.; BACHAR, S. C.; SAHA, A.; GUHA, S. K. Analgesic and anti-inflammatory principle from *Sida cordifolia* Linn. **Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 160-163, 2006.

SUTRADHAR, R. K.; RAHMAN, A. K. M. M.; AHMAD, M. U. Three new flavonol Cglycosides from *Sida cordifolia* Linn. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 4, p. 175-181, 2007a.

SUTRADHAR, R. K.; RAHMAN, A. K. M. M.; AHMAD, M. U.; SAHA, K. Alkaloids of *Sida cordifolia* L. **Indian Journal of chemistry**, v. 46B, p. 1896 – 1900, 2007b.

SUTRADHAR, R. K.; RAHMAN, A. M.; AHMAD, M. U.; BACHAR, S. C. Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 1, n.4, p.179-182, 2008.

TANG, Y.; MICHAEL, G. G.; LAURENCE, J. D. **Malvaceae**. In: Flora of China. Missouri Botanical Garden Press, US, v. 12, p. 170-275, 2007.

TELES, Y. C.; GOMES, R. A.; OLIVEIRA, M. S.; LUCENA, K. L.; NASCIMENTO, J. S.; AGRA, M. F.; IGOLI, J. O.; GRAY, A. I.; SOUZA, M. F. V. Phytochemical investigation of *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl and evaluation of its antibacterial activity. **Química Nova**, v. 37, n. 9, 2014.

TELES, Y. C. F.; HORTA, C. C.; AGRA, M. F.; SIHERI, W.; BOYD, M.; IGOLI, J. O.; GRAY, A. I.; SOUZA, M. F. V. New sulphated flavonoids from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae). **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20161-20172, 2015.

TELES, Y. C. F et al. Phenolic constituents from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl. and anti-inflammatory activity of 7, 4'-di-O-methylisoscuteallarein. **Natural product research**, v. 30, n. 16, p. 1880-1884, 2016.

TERNIKAR, S. G.; ALAGAWADI, K.R.; DWIVEDI, S.; ISMAIL, P. Evaluation of antimicrobial and acute anti-inflammatory activity of *Sida cordifolia* Linn seed oil. **Journal of Cell and Tissue**, v. 10, p. 2385-2388, 2010.

TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 846, p. 378–384, 2007.

TOKER, G.; Küpeli, E.; MEMISOĞLU, M.; YESILADA, E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from leaves of *Tilia argentea* (silver linden). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 393-397, 2004.

TOUŠEK, J.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; VAN BAELEN, G.; HOSTYN, S.; MAES, B. U.; MAREK, R. Structural and solvent effects on the ¹³C and ¹⁵N NMR chemical shifts of indoloquinoline alkaloids: experimental and DFT study. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 42-51, 2008.

VADIVEL, V. Distribution of flavonoids among Malvaceae family members –A review. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**, v. 10, 2016.

VALLEJO, S. B. **Identificación de cumarinas en especies autóctonas del género *Pterocaulon* ell.** Trabajo de conclusión de curso (Facultad de Ciencias Exacta Naturales Carrera de Farmacia). Universidad de Belgrano, Buenos Aires, Argentina, 2010.

VELAGAPUDI, R.; EL-BAKOUSH, A.; OLAJIDE, O. A. Activation of Nrf2 Pathway Contributes to Neuroprotection by the Dietary Flavonoid Tiliroside. **Molecular neurobiology**, p. 1-21, 2018.

VEIGA J. R.; V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & metabolism**, v. 12, p. 60, 2015.

XIAO, X.; XU, L.; HU, H.; YANG, Y.; ZHANG, X.; PENG, Y.; Xiao P. DPPH Radical Scavenging and Postprandial Hyperglycemia Inhibition Activities and Flavonoid Composition Analysis of Hawk Tea by UPLC-DAD and UPLC-Q/TOF MSE. **Molecules**, v. 22, p. 1622, 2017.

XU, W.; WEI, L.; QU, W.; LIANG, Z.; WANG, J.; PENG, X.; ZHANG, Y.; HUANG, K. A novel antifungal peptide from foxtail millet seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1630 – 1637, 2011.

XU, D.; WANG, Q.; ZHANG, W.; HU, B.; ZHOU, L.; ZENG, X.; SUN, Y. Inhibitory activities of caffeoylquinic acid derivatives from *Ilex kudingcha* CJ Tseng on α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 3694-3703, 2015.

WANG, W. E.; VANALSTYNE, P. C.; IRONS, K. A.; CHEN, S.; STEWART, J.W.; BIRT, D.F. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. **Nutrition and cancer**. v. 48, p. 106-114, 2004.

WANG, Y. H.; AVULA, B.; JADHAV, A. N.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. Structural characterization and identification of ecdysteroids from *Sida rhombifolia* L. in positive electrospray ionization by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 2413-2422, 2008.

WANG, M.; LI, R.; ZHOU, Y.; WU, Z.; DING, L. Rapid screening and identification of non-target flavonoid components in invasive weeds by LC/MS-IT-TOF. **Analytical Methods**, v. 7, n. 24, p. 10207-10216, 2015.

WANG, X.; CAO, J.; WU, Y.; WANG, Q.; XIAO, J. Flavonoids, Antioxidant Potential, and Acetylcholinesterase Inhibition Activity of the Extracts from the Gametophyte and Archegoniophore of *Marchantia polymorpha* L. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 360, 2016.

WHO, Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance, 2015.

WILSON, K. WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7 ed. São Paulo: Cambridge University Press, 2010.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-biological interactions**, v. 186, p. 211-218, 2010.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; SILVEIRA, C. A. L.; ALMEIDA, L. D Jr.; LUCHINI, A. C, RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S. H.; DI STASI, L. C. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, p. 240-246, 2014.

WOLDEYES, S.; ADANE, L.; TARIKU1, Y.; MULETA, D.; BEGASHAW, T. Evaluation of antibacterial activities of compounds isolated from *Sida rhombifolia* Linn (Malvaceae). **Natural Product Chemistry and Research**, v. 1, n.3, p. 101, 2012.

WU, H. K.; SU, Z.; YILI, A.; XIAO, Z. P.; HANG, B.; AISA, H. A. Isolation of esculetin from *Cichorium glandulosum* by high-speed countercurrent chromatography. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 1, p. 109-109, 2007.

YAO, C.; XU, Y. Phytoecdysone from *Sida szechuensis*. **Yunnan Zhiwu Yanjiu**, v. 22, p. 503-506, 2000.

YE, M.; YAN, Y.; GUO. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass

spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 11, p. 1469-1484, 2005.

ZHANG, X.; LI, F.; LV, H.; WU, Y.; BIAN, G.; JIANG, K. On the origin of the methyl radical loss from deprotonated ferulic and isoferulic acids: electronic excitation of a transient structure. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, n. 6, p. 941-948, 2013.

ZHAO, J.; ZHANG, S.; YOU, S.; LIU, T.; XU, F.; JI, T.; GU, Z. Hepatoprotective effects of nicotiflorin from *nymphaea candida* against concanavalin a-induced and d-galactosamine-induced liver injury in mice. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, pág. 587, 2017.