

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARÍ CASTRO SANTOS

**ESTUDO DE DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTI-HIPERTENSIVA DE EXTRATOS OBTIDOS
DE *Cuphea glutinosa* CHAM. & SCHLTDL (LYTHRACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Uruguaiana
2014**

MARÍ CASTRO SANTOS

**ESTUDO DE DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTI-HIPERTENSIVA DE EXTRATOS OBTIDOS
DE *Cuphea glutinosa* CHAM. & SCHLTDL (LYTHRACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

**Uruguaiiana
2014**

MARÍ CASTRO SANTOS

**ESTUDO DE DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTI-HIPERTENSIVA DE EXTRATOS OBTIDOS
DE *Cuphea glutinosa* CHAM. & SCHLTDL (LYTHRACEAE)**

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

Área de concentração: Química e Bioquímica de Produtos Naturais

Dissertação defendida e aprovada em 17 de julho de 2014
Banca examinadora

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

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
(UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Angélica Garcia Couto
(UNIVALI)

Agradecimentos

Agradeço:

A Deus, pois nossa fé sempre nos faz ir mais longe.

Minha mãe Nelma Castro pelo apoio, incentivo, paciência e amor.

Ao meu anjo o qual eu chamava de PAI.

Ao meu orientador Andreas Mendez por sua disponibilidade, dedicação e ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento profissional.

Aos professores que tiveram participação neste trabalho, pela parceria e contribuição.

As minhas queridas colegas de curso que se tornaram grandes amigas.

Aos colegas de laboratório que muitas vezes estiveram presente e me ajudaram de alguma forma no decorrer do trabalho, principalmente Lidiane Farias, Liara Merlugo, Luiz Batista, Everson Fialho e Hemerson Rosa.

Aos colegas do grupo GPFisCar Alyne Escobar, João Guilherme Dini, Liane Sant'Anna e Karolina Torres pela parceria e colaboração.

A Unipampa e FAPERGS pelo suporte técnico, estrutural e financeiro nesse período.

Enfim, obrigada a todos que de alguma maneira estiveram presentes e/ou me apoiaram no decorrer desses dois anos. Obrigada!

RESUMO

ESTUDO DE DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E ANTI-HIPERTENSIVA DE EXTRATOS OBTIDOS DE *Cuphea glutinosa* CHAM. & SCHLTDL (LYTHRACEAE)

O gênero *Cuphea*, popularmente conhecido no Brasil por “sete-sangrias”, tem seu uso medicinal reconhecido devido aos efeitos diurético, hipotensor e cardioprotetor. No sul do Brasil, em região característica do bioma Pampa, foi encontrada a espécie *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltdl. Embora o uso popular, esta espécie é pouco descrita na literatura. O presente trabalho tem como objetivos o estudo da composição química dos extratos de *C. glutinosa* e a avaliação das atividades antifúngica e anti-hipertensiva. O material vegetal foi coletado na cidade de Uruguaiana (RS, Brasil), identificado e depositado em herbário. Após secagem e trituração do material vegetal, foram obtidos os extratos hidroetanólicos através de maceração exaustiva com etanol 40% (v/v) para folhas e etanol 70% (v/v) para raízes. Para a infusão, utilizou-se água a 80°C. As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento cromatógrafo a líquido Prominence Shimadzu, em técnica por CLAE e CLUE. Utilizou-se sistema de fase reversa, eluição por gradiente com fase móvel composta por acetonitrila:metanol (4:1) e ácido fórmico 0,1% pH 3,0, coluna C18 analítica e *fast*, e detecção por UV-DAD e ESI-MS. Os teores de polifenóis totais e de flavonóides foram determinados por método colorimétrico, seguindo metodologia padronizada. A atividade antifúngica *in vitro* foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo, determinando-se a CIM, *in-vitro*, contra diferentes isolados clínicos. Para avaliação do potencial anti-hipertensivo *in vivo*, foram realizadas medições da pressão sanguínea pelo método de monitoramento hemodinâmico invasivo, através da inserção de cateter na artéria carótida. Os resultados de teor de fenólicos totais indicaram predominância destes componentes em extratos obtidos de folhas e por maceração, conforme os valores obtidos: 1,8501 mg EAG/mL (folhas) e 0,8467 mg EAG/mL (raízes) para infusão, e 3,7284 mgEAG/mL (folhas) e 2,6266 mg EAG/mL (raízes) para maceração. Quanto ao teor de flavonóides, os resultados quantitativos foram: 7,0959 mg/g (folhas) e 0,5664 mg/g (raízes) para a infusão, e 7,9511 mg/g (folhas) e 0,5994 mg/g (raízes) para maceração. Na análise cromatográfica, os extratos obtidos das folhas de *C. glutinosa* apresentaram picos cromatográficos bem separados, em perfil reproduzível. Na determinação por CLUE-MS, os dados de íon molecular e fragmentos de massa indicaram a composição predominante em flavonóides, sugerindo-se os componentes quercetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-arabinosídeo, quercetina-3-glicuronídeo, isoramnetina e quercetina-5-O-β-glicopiranosídeo. Para o potencial antifúngico, os extratos das folhas e raízes apresentaram atividade *in vitro* contra *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Trichosporon asahii*, com CIM variando na faixa de 1,9-62,5 µg/mL. Nos testes hemodinâmicos realizados, os extratos das folhas não apresentaram efeito significativo sobre a pressão arterial. A identificação dos componentes em *C. glutinosa*, derivados de quercetina, torna promissora novas investigações a fim de aprofundar o conhecimento a respeito desta espécie, em especial na busca de respostas para a relatada ação anti-hipertensiva.

Palavras-chave: Atividade antifúngica, atividade anti-hipertensiva, CLAE, CLUE-MS, *Cuphea glutinosa*, flavonóides.

ABSTRACT

STUDY OF CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION AND EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL AND ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITIES OF EXTRACTS OBTAINED FROM *Cuphea glutinosa* CHAM. & SCHLTDL (LYTHRACEAE)

The *Cuphea* genus, popularly known in Brazil as "sete-sangrias", is used traditionally due the diuretic, hypotensive and cardioprotective effects. In southern Brazil, in characteristic region of Pampa biome, it was found the species *Cuphea glutinosa* Cham. & Schldtl. Although used popularly, this species is few reported in the literature. The present work aimed to study the chemical composition of extracts from *C. glutinosa* and to evaluate the antifungal and anti-hypertensive activities. The plant material was collected in the city of Uruguaiana (RS, Brazil), identified and deposited in a herbarium. After dryness and milling, the hydroethanolic extracts were obtained through exhaustive maceration using ethanol 40% (v/v) for leaves and ethanol 70% (v/v) for roots. The infusions were prepared using water at 80 °C. The chromatographic analyses were performed in liquid chromatography Prominence Shimadzu, for HPLC and UPLC assays. The method was conducted using reverse phase system, gradient elution with mobile phase composed by acetonitrile:methanol (4:1) and formic acid 0.1% pH 3.0, C18 analytical and fast column, and detection by UV-DAD and MS. The polyphenols and flavonoids contents were determined by colorimetric method. The *in vitro* antifungal activity was conducted by using the broth microdilution method, determining the MIC against different clinical isolates. For evaluation of *in vivo* anti-hypertensive potential, the blood pressure was measured by the method of invasive hemodynamic monitoring, through of insertion the catheter into the carotid artery. The results of phenolic content indicated the high concentration of these compounds in leaves extracts obtained by maceration: 1.8501 mgEAG/mL (leaves) and 0.8467 mgEAG/mL (roots) for infusion, and 3.7284 mgEAG/mL (leaves) and 2.6266 mgEAG/mL (roots) for maceration. For flavonoids, the contents were: 7.0959 mg/g (leaves) and 0.5664 mg/g (roots) for infusion, and 7.9511 mg/g (leaves) and 0.5994mg/g (roots) for maceration. In the chromatographic analyses, the leaf extracts from *C. glutinosa* presented chromatographic peaks well separated and reproducible. In the determination by UPLC-MS, the molecular ion and mass fragments indicated the predominant composition in flavonoids, suggesting the compounds quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-arabinoside, quercetin-3-glucuronide, isorhamnetin and quercetin-5-O-β-glucopiranoside. For the antifungal potential, the leaf and roots extracts presented activity against *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Trichosporon asahii*, with MIC values ranging 1,9-62,5 µg/mL. In the hemodynamic tests performed, the leaves extracts did not present significant effect in the arterial pressure, although a tendency in pressure reduction could be observed. The identification of quercetin derivatives in *C. glutinosa* becomes promisor further investigations about this species, mainly in respect to the anti-hypertensive action.

Keywords: Antifungal activity, anti-hypertensive action, *Cuphea glutinosa*, flavonoids, HPLC, UPLC-MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ramos da espécie <i>C. glutinosa</i>	17
Figura 2- Flor da espécie <i>C. glutinosa</i> , pétalas violáceas	18
CAPÍTULO I.....	25
Figura 1- – Cromatogramas obtidos por CLUE para extratos hidroetanólicos (40% de etanol) de <i>C. glutinosa</i> . Detecção em 340 nm. A: extrato das folhas obtido por maceração. B: resíduo etanólico a partir do extrato macerado das folhas	31
Figura 2- Curva analítica para determinação de ácido gálico por método espectrofotométrico, em comprimento de onda de 750 nm.....	32
CAPÍTULO II.....	36
Figura 1- Cromatogramas obtidos em análise por CLAE para extratos de <i>C. glutinosa</i> utilizando o método descrito por Evaristo e Leitão (2001) com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por infusão. B: análise do extrato das folhas obtido por maceração. C: análise do extrato das raízes obtido por maceração. D: análise dos padrões ácido clorogênico (1), ácido cafeico (2), rutina (3), quercetina (4) e canferol (5)	39
Figura 2- Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de <i>C. glutinosa</i> pelo método de De Souza et al. (2002) com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por infusão. B: análise do extrato das folhas obtido por maceração. C: análise do padrão de quercetina a 100 µg/ml (1)	40
Figura 3- Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de <i>C. glutinosa</i> , utilizando metodologia proposta por Yang et al. (2012), com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por infusão. B: análise do extrato das folhas obtido por maceração. C: análise do extrato das raízes obtido por maceração. D: análise dos padrões ácido clorogênico (1), ácido cafeico (2), rutina (3), quercetina (4) e canferol (5)	42
Figura 4- Cromatograma obtido por CLUE na determinação do extrato das folhas de <i>C. glutinosa</i> obtido por maceração, utilizando condições descritas por Dan et al. (2008) com detecção em 340 nm.....	43
Figura 5- Cromatogramas obtidos por CLUE na determinação de extratos de <i>C. glutinosa</i> pelo método de Tan et al. (2011) com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por maceração. B: análise do extrato das raízes obtido por maceração.....	44
Figura 6- Cromatogramas obtidos por CLUE na análise de <i>C. glutinosa</i> . Detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por maceração. B: análise do extrato das raízes obtido	

por maceração. C: análise dos padrões ácido cafeico (1), rutina (2), quercetina (3) e canferol (4).....	45
CAPÍTULO III	47
Figure 1- Chromatographic profile of extracts obtained from leaves of <i>C. glutinosa</i> . (A) Crude hydroethanolic extract at 40%; (B) ethanolic (1) and methanolic (2) residual fractions obtained from liquid-liquid separation. The analysis was performed by UPLC with detection at 340 nm.	58
Figure 2 – Dose-response of the effect of aqueous extract leaves of <i>Cuphea glutinosa</i> (10-20-50mg/kg, i.p.) on mean arterial pressure systolic (A), diastolic (B) and heart rate (C) of rats. Data represent the mean \pm SEM of eight animals per group.....	64
Figure 3 – Dose-response of the effect of hydroethanolic extract leaves of <i>Cuphea glutinosa</i> (2.5-5-10-20 mg/kg, i.p.) on mean arterial pressure systolic (A), diastolic (B) and heart rate (C) of rats. Data represent the mean \pm SEM of eight animals per group.	64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	25
Tabela 1. Resultados de determinação de resíduo seco para as extrações hidroetanólicas em diferentes proporções.	30
Tabela 2. Resultado do teor de fenólicos totais de <i>C. glutinosa</i> pelos métodos extrativos maceração e infusão.....	32
Tabela 3. Resultado do teor de flavonóides totais de <i>C. glutinosa</i> pelos métodos extrativos maceração e infusão.....	33
CAPÍTULO II	36
Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas em testes para a análise por CLAE-UV dos extratos obtidos de <i>C. glutinosa</i>	37
Tabela 2. Condições cromatográficas testadas para análise por CLUE-UV dos extratos de <i>C. glutinosa</i>	38
CAPÍTULO III	47
Table 1. Gradient elution system used for chromatographic analyses of extracts obtained from <i>C. glutinosa</i> . (A) acetonitrile:methanol, 4:1 (v/v); (B) water containing 0.1% formic acid (pH 3.0).	53
Table 2. Results of dry residue, total phenolic and flavonoids concentration in leaves and roots extracts obtained from <i>C. glutinosa</i>	56
Table 3. Chemical constituents of <i>C. glutinosa</i> identified by UPLC-MS, with corresponding retention times, quasi-molecular ions in positive mode and key fragments.	59
Table 4. Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) observed for <i>C. glutinosa</i> extracts against emerging yeast isolated..	61
Table 5. Flavonóides isolados das folhas de diferentes espécies do gênero <i>Cuphea</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD1 – Cuphiin D1
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CIM - Concentração inibitória mínima
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE – Cromatografia líquida de ultra eficiência
cm – centímetros
CV – Coeficiente de variação
Da - Dalton
DAD – *Diode array detector*
DNA - *Deoxyribonucleic acid*
EAG – Equivalentes de ácido gálico
ECA – Enzima conversora de angiotensina
ER – Equivalentes de rutina
ESI – *Electro spray ionization*
g – gramas
GAE – *Gallic acid equivalents*
HPLC – *High performance liquid chromatography*
i.p. – Intraperitoneal
Kg – quilogramas
LC – *Liquid chromatography*
L-NAME - *L-nitro-arginine methyl ester*
mg – miligramas
µg – microgramas
µl - microlitros
MIC – *Minimal inhibitory concentrations*
min – minutos
mL – mililitros
mm – milímetros
MS – *Mass spectrometry*
nm – nanômetros
QE - *quercetin equivalents*
RNA – *Ribonucleic acid*

SEM – *Standard error of mean*

UPLC – *Ultra performance liquid chromatography*

UV – *Ultravioleta*

v - volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA ESPÉCIE <i>Cuphea glutinosa</i> Cham & Schltldl.....	17
3.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS.....	19
3.2.1 Triterpenos	19
3.2.2 Esteróides.....	19
3.2.3 Ácidos graxos.....	19
3.2.4 Taninos	20
3.2.5 Flavonóides	20
3.3 USO TRADICIONAL E ESTUDOS FITOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DO GÊNERO	21
3.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	22
3.5 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA	23
CAPÍTULO I	25
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	25
1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	26
1.1 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	26
1.1.1 Coleta e identificação botânica	26
1.1.2 Manuseio e Secagem.....	26
1.1.3 Determinação da perda por dessecação.....	26
1.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	27
1.2.1 Extração por maceração exaustiva	27
1.2.2 Extração por infusão	27
1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	28
1.3.1 Determinação de Resíduo Seco	28
1.3.2 Método extrativo líquido-líquido	28
1.3.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais	28

1.3.4 Determinação de Flavonóides Totais	29
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
2.1 PERDA POR SECAGEM E DESSECAÇÃO	29
2.2 RESÍDUO SECO	30
2.3 METODOLOGIA EXTRATIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO	30
2.4 FENÓLICOS TOTAIS	31
2.5 FLAVONÓIDES TOTAIS	33
3 CONCLUSÕES	35
CAPÍTULO II	36
ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS EXTRATOS VEGETAIS	36
1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	37
1.1 ANÁLISES EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	37
1.2 ANÁLISES EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE) ..	37
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES	38
2.1 Análises por CLAE	38
2.2 Análises por CLUE	43
3 CONCLUSÕES	46
CAPÍTULO III	47
MANUSCRIPT - Chemical composition of extracts from <i>Cuphea glutinosa</i> Cham. & Schltldl (Lythraceae) by UPLC-MS and the evaluation of antifungal and antihypertensive activities.....	47
ABSTRACT	48
1. INTRODUCTION	49
2 MATERIALS AND METHODS	51
2.1 PLANT MATERIAL... ..	51
2.2 PREPARATION OF EXTRACTS	51
2.3 TOTAL PHENOLIC CONTENT	51
2.4 TOTAL FLAVONOID CONTENT.....	52
2.5 UPLC-MS	52
2.6 ANTIFUNGAL ACTIVITY.....	53
2.6.1 Antifungal screening	53
2.6.2 Minimal inhibitory concentration (MIC)	54
2.7 HEMODYNAMIC PARAMETERS	54
2.8 STATISTICAL ANALYSIS	55

3. RESULTS AND DISCUSSION	56
3.1 CHARACTERIZATION OF PLANT AND EXTRACTS.....	56
3.2 UPLC-MS.....	57
3.3 ANTIFUNGAL ACTIVITY.....	60
3.4 HEMODYNAMIC PARAMETERS.....	62
4. CONCLUSIONS	65
ACKNOWLEDGEMENTS	65
REFERENCES	66
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO A	85

1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos as plantas medicinais são utilizadas como uma alternativa para o tratamento de várias doenças. As civilizações antigas já tinham conhecimento do poder medicinal de algumas plantas e repassavam às novas gerações seus saberes para que estas fossem cultivadas. Ao passar dos anos, e com as descobertas da medicina, este conhecimento começou a ser desvalorizado por profissionais de saúde, que focaram apenas no tratamento alopático (FEIJÓ et al. 2012; OLIVEIRA et al. 2007; MACIEL et al., 2002). Entretanto, a prática do uso de plantas medicinais é comum entre as populações e o conhecimento popular pode oferecer dados importantes para descobertas científicas inovadoras, cenário onde as pesquisas acadêmicas podem levar a novos conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas das plantas (VENDRUSCOLO e MENTZ, 2006).

Além disso, a etnofarmacologia vem despertando interesse em várias áreas da pesquisa ao redor do mundo. Neste contexto, o uso popular de plantas medicinais em diversas culturas vem validando as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos, ratificando o conhecimento popular para a terapêutica, representando uma alternativa para muitas comunidades e grupos étnicos que não dispõem de acesso aos tratamentos disponibilizados pela medicina (LUBIAN et al., 2010).

Na América do Sul, o uso de plantas medicinais contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde. Comumente, para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (PESSINI et al., 2003). O uso de plantas como uma fonte terapêutica é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde (DUARTE, 2006).

Com o propósito de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, foi criado em 2006 o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O Brasil é o país com a maior parcela da biodiversidade, de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores. As plantas são utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional, além de seu uso para a fabricação de medicamentos (BRASIL, 2006).

Segundo Haining; Graham e Gilbert (1983), a família Lythraceae possui em torno de 31 gêneros. Pertencente à ordem Myrtales, esta família apresenta cerca de 600 espécies, amplamente encontrada em regiões tropicais, apresentando poucas espécies nas regiões

temperadas (MELAZZO; OLIVEIRA, 2012; LITTLE, STOCKEY; KEATING, 2004; BOOI, PUNT; HOEN, 2003). A maioria dos gêneros são arbustos lenhosos ou pequenas árvores, mas alguns são herbáceas. Os quatro maiores gêneros são *Cuphea*, *Diplusodon*, *Lagerstroemia*, e *Nesaea*, responsáveis por três quartos de todas as espécies (GRAHAM et al., 2005).

Cuphea é o gênero mais representativo desta família em relação ao número de espécies, além de geograficamente ter uma distribuição abundante. Este gênero é descrito por plantas herbáceas, perenes e comuns à flora Neotropical, prioritariamente no México e America do Sul. Vale ressaltar que é distinto dos outros gêneros por apresentar flor zigomorfa e modo único de dispersão de sementes. Porém, este gênero reúne espécies que apresentam características morfológicas e estruturais amplamente diversificadas (MELAZZO e OLIVEIRA, 2012). No Brasil, o gênero é conhecido popularmente como “sete-sangrias” e tem sido utilizado na medicina popular brasileira como diurético, antipirético, anti-inflamatório e laxativo, sendo a atividade hipotensora já estudada em diferentes espécies (FERNANDES, et al., 2002; LUSA e BONA 2011).

O gênero *Cuphea* apresenta predominantemente flavonóides em sua composição, na maior parte compostos 3-*O*-glicosídeos e flavonas, além de alguns derivados de glicosídeos e galactose. Desta forma, a química do gênero *Cuphea* é amplamente variável, sendo que o padrão geral de flavonóides das sementes serve como uma proposta fundamentada de segregação, bem como, na diferenciação entre espécies da família Lythraceae. Além disso, foi determinado para o gênero a presença de flavonóides, triterpenóides, ácidos graxos de cadeia curta e média, e taninos hidrolisáveis, incluindo elagitaninos dímeros com estruturas macrocíclicas (SANTOS et al., 1995; CHEN et al., 1999; ZAGO et al., 2009).

Espécies como *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. vêm sendo estudada em relação aos seus benefícios referentes à atividade hipotensora e cardioprotetora (LUSA e BONA, 2011). Neste contexto, a espécie em estudo, *C. glutinosa*, é relatada como uma espécie usada na medicina popular (ZAGO et al., 2009) e, de acordo com Yagueddú et al. (2006), *C. glutinosa* é usada na medicina tradicional por apresentar efeitos diuréticos e hipotensores. Segundo Simões et al. (2003), a necessidade de mais estudos quanto ao perfil químico e ao potencial biológico das espécies vegetais brasileiras são necessários para comprovar, assegurar e, até mesmo, indicar ações terapêuticas eficientes em prol da população. Neste contexto, acreditando-se na preservação do local de coleta do material vegetal e sabendo da inexistência de estudos quanto às propriedades medicinais da espécie *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltldl., análises do seu perfil serão de grande relevância científica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química de extratos vegetais obtidos de *Cuphea glutinosa* Cham & Schlttdl (Lythraceae) e avaliar seus potenciais antifúngico e anti-hipertensivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a droga vegetal (folhas e raízes) quanto à perda por secagem e perda por dessecação;
- ✓ Caracterizar o extrato vegetal obtido de *C. glutinosa* quanto à composição fenólica através da determinação do teor de flavonóides totais e polifenóis totais;
- ✓ Separar os componentes presentes nos extratos vegetais de *C. glutinosa* através do método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector UV-DAD;
- ✓ Analisar os extratos vegetais obtidos de *C. glutinosa* através de ensaio por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplada a detector por espectrometria de massas;
- ✓ Avaliar o potencial antifúngico dos extratos vegetais obtidos das folhas e raízes de *C. glutinosa*;
- ✓ Avaliar o potencial anti-hipertensivo dos extratos vegetais obtidos das folhas de *C. glutinosa*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA ESPÉCIE *Cuphea glutinosa* Cham & Schltldl.

Cuphea é um dos maiores gêneros da família Lythraceae, contemplando em torno de 260 espécies de plantas herbáceas perenes e pequenos arbustos. A abrangente quantidade de espécies que constituem este gênero é dividida em dois principais centros geográficos: um na América do Norte e outro na América do Sul. Em cada localização, um pequeno número de espécies apresentam distribuições extensas e são frequentemente encontradas em terras degradadas (GRAHAM, FREUDENSTEIN e LUKER, 2006; ZAGO et al., 2009).

Segundo Zago et al. (2010), características como forma, textura, consistência, base e ápice da lâmina foliar são relevantes na diferenciação das espécies no gênero *Cuphea*. A análise macroscópica do caule de *C. glutinosa*, coincide com os descritos para a família Lythraceae, apresentando uma coloração verde-avermelhada e medidas de 15-40 cm de comprimento e 2-4 mm de diâmetro; contém abundante pilosidade de base avermelhada e ápice esbranquiçado, além de ter a base lenhificada e mais esparsa (ZAGO et al., 2009). Os ramos (Figura 1) são eretos ou decumbentes e dispõem de diâmetro em torno de 1 mm, atingindo 2 mm na base, e até 10 cm de comprimento.

Figura 1 – Ramos da espécie *C. glutinosa*



Fonte: Zago et al., 2009, p. 721

Dentre as características macroscópicas, *C. glutinosa* sobressalta-se pelas pétalas violáceas (Figura 2) sem a presença de vesículas infra-estaminais. Outra característica relevante é quanto às sementes, pois nesta espécie elas não são aladas, diferenciando-a da espécie *C. carthagenensis*. Além destas, não menos importante na determinação da autenticidade desta espécie, soma-se a presença de 10 a 15 (até 20) óvulos e o tamanho das sementes em torno de 2 mm (ZAGO et al., 2009).

Figura 2 – Flor da espécie *C. glutinosa*, pétalas violáceas



Fonte: Fotos do arquivo pessoal

As variações morfológicas da espécie *C. glutinosa* estão associadas às condições ambientais presentes no local cultivado. Dependendo do solo e iluminação solar, pode ocorrer alongamentos do caule e aumento no tamanho das folhas, sendo melhor cultivada em regiões abertas com vegetação rasteira (YAGUEDDÚ, et al. 2006).

Microscopicamente, de acordo com Zago et al. (2009), o caule de *C. glutinosa*, exibe seção circular, epiderme uniestratificada persistente composta por células ovóides e por raros estômatos. A cutícula é plicada e persistente, mostrando formações epicuticulares lenticulares. Comumente observa-se a presença de tricomas glandulares de pedicelo unicelular e glândula captada. Abaixo da epiderme, a região cortical contém células parenquimáticas de formas e tamanhos variados, onde as camadas mais internas apresentam células mais circulares, enquanto as camadas externas células achatadas. Desta forma, depois da primeira camada de células de parênquima, tem de uma a três camadas de células mucilaginosas. O sistema

vascular contém um xilema espesso e ininterrupto, rodeado por um floema com reduzidas camadas. Os espaços intercelulares na região cortical são normalmente do tipo meato.

3.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

3.2.1 Triterpenos

Vários estudos voltados à fitoquímica de espécies do gênero *Cuphea* relatam a presença de metabólitos secundários presentes nas diversas espécies. A análise fitoquímica de frações obtidas por partição do extrato bruto das folhas de *C. carthagenensis* revelou a presença de triterpenos na fração diclorometânica (SCHULDT et al., 2000, KREPSKY, 2011). Outro estudo fitoquímico de partes aéreas de *C. carthagenensis* resultou no isolamento de triterpenos derivados do oleanano, beta-amirina e ácido ursólico, derivados do ursano, friedelan-3 β -ol e ácido betulínico, cartagenol (GONZALEZ et al., 1994). Do extrato de *C. wrightii* foram isolados os triterpenos friedelan-3 β -ol, germanicol, ácido ursólico e fernenol (CHEN et al., 1999; PEREZ-CASTORENA; MALDONADO, 2003).

3.2.2 Esteróides

Duarte et al. (2002) descreveram para as partes aéreas floridas de *C. carthagenensis* a presença de esteróides. Na fração diclorometano de *C. carthagenensis*, obteve-se reação positiva para esteróis (SCHULDT et al., 2004). Um estudo fitoquímico das partes aéreas de *C. carthagenensis* resultou no isolamento dos esteróides ergosterol, beta-sitosterol e estigmasterol (GONZALEZ et al., 1994; SCHULDT et al., 2000; FRÖHNER et al., 2005).

3.2.3 Ácidos graxos

Segundo Chen et al. (1999), o gênero *Cuphea* apresenta ácidos graxos de cadeia curta e média. Uma análise fitoquímica das partes superiores de *C. carthagenensis* resultou no isolamento de ácidos graxos saturados (ácidos láurico e mirístico) e insaturados (ácido linolênico) (GONZALEZ et al., 1994; BRAGA et al., 2000).

3.2.4 Taninos

Em frações butanólicas e de acetato de etila, a partir do extrato bruto de *C. carthagenensis*, as reações foram positivas para compostos polifenólicos (taninos e flavonóides) (SCHULDT et al., 2004). Além destes compostos encontrados na espécie citada anteriormente, estudos fitoquímicos com a espécie *C. hyssopifolia* identificaram a presença de taninos hidrolisáveis, incluindo elagitaninos (BRAGA et al., 2000; CHEN et al., 1999; KREPSKY et al., 2010). Neste contexto, Chen et al. (1999) relatam o isolamento de quatro dímeros macrocíclicos de taninos hidrolisáveis. De acordo com Lusa e Biasi (2011), as partes floridas de *C. carthagenensis* apresentam taninos condensados. Outros estudos fitoquímicos de *Cuphea hyssopifolia* levaram ao isolamento de quatro dímeros de taninos hidrolizáveis macrocíclicos: Cuphiin D1, Cuphiin D2, Oenothin B e Woodfordin C (WANG, CHEN, YANG et al., 1999).

3.2.5 Flavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários presentes em plantas e medicamentos, tendo papel na regulação gênica e no metabolismo de crescimento vegetal. Muitas propriedades farmacológicas têm sido atribuídas aos flavonóides, dentre elas antioxidante, imunomodulação, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, anti-viral e anti-alérgica (DEZANET et al., 2007). Vários flavonóis, flavonas e flavanonas juntamente com os seus glicosídeos e conjugados de ácido glicorônico foram isolados a partir de outras espécies de *Cuphea* (SANTOS et al., 1995; CALZADA, 2005).

Perez-Castorena e Maldonado (2003) descrevem a presença de flavonóides para *C. wrightii*. Do extrato de *C. wrightii*, obtido da planta inteira, foram isolados os flavonóides luteolina-7-*O*-glicosídeo e hiperina (quercetina-3-*O*-galactosídeo). Em estudo fitoquímico de frações obtidas por partição do extrato bruto das folhas de *C. carthagenensis*, observou-se a presença de flavonóides nas frações acetato de etila, *n*-butanólica e fração aquosa (SCHULDT et al., 2000). O flavonóide quercetina-3-sulfato foi isolado como principal componente das folhas da espécie (FARIAS et al., 1998). De acordo com Lusa e Biasi (2011), a espécie *C. wrightii* também apresenta flavonóides glicosilados em sua composição. Para *C. hyssopifolia*, detectou-se a presença de flavonóides isolados a partir de extrato metanólico e frações de acetato de etila (SERNA et al., 2011).

A química da espécie *C. carthagenensis* é pouco conhecida, mas em análise fitoquímica de frações ricas em flavonóides foi possível isolar os componentes quercetina-5-O- β -glicopiranosídeo e quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, tendo como partida as frações butanólica e acetato de etila (KREPSKY et al., 2012).

3.3 USO TRADICIONAL E ESTUDOS FITOQUÍMICOS FARMACOLÓGICOS DO GÊNERO

Alguns fitoconstituintes de *C. carthagenensis* podem ser relacionados com os efeitos observados, uma vez que a presença de esteróides e triterpenos pode inibir a HMG-CoA redutase, limitando a biossíntese de colesterol e elevando a captura celular de LDL (BIAVATTI et al., 2004).

Segundo Schuldt et al. (2004), as atividades antioxidantes do extrato bruto e frações acetato de etila e butanólica de *C. carthagenensis* foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica induzida por t-butil-peróxido. Neste estudo, os resultados revelaram que o mais elevado potencial antioxidante da fração acetato de etila, rica em compostos fenólicos, inibiu a peroxidação de lipídeos em homogenatos de fígado de ratos. Alguns estudos têm demonstrado que, flavonóides como quercetina e miricetina, podem atuar como doadores de hidrogênio, o que indica que o seu mecanismo antioxidante inclui eliminação de radicais livres (SCHULDT et al. 2004).

Em estudos realizados por Wang, Chen e Yang (1999), foi demonstrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que um novo tanino hidrolisável macrocíclico, originalmente isolado a partir de *C. hyssopifolia*, denominado Cuphiin D1 (CD1), exibiu efeito antitumoral. Os efeitos de CD1 sobre o crescimento e diferenciação de células variam dependendo dos tipos e diferenciação celulares. CD1 inibiu o crescimento das linhagens de células de carcinoma humanas, incluindo KB, HeLa, DU-145, Hep 3B, S-189 e linhagem de células de leucemia HL-60.

As partes aéreas de *C. carthagenensis* são empregadas na medicina popular para tratamento de doenças circulatórias e do coração. Extratos brutos das folhas foram descritos como inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ACE-I), além de apresentarem atividade vasorrelaxante e atividade antioxidante *in vitro* (BRAGA et al., 2000; SCHULDT et al., 2000; SCHULDT et al., 2004). Ademais, Biavatti et al. (2004) relataram que infusões das folhas tiveram efeito hipocolesterolêmico em ratos sem afetar o nível de triglicérides e o peso corporal dos animais. A atividade hipotensora foi confirmada em estudos que demonstram a redução na pressão sanguínea induzida pelo extrato aquoso de diferentes

espécies como *Cuphea aperta*, *Cuphea balsamona* e *C. carthagenensis*, em ratos anestesiados e não anestesiados.

Também em estudo com o extrato aquoso de *C. carthagenensis* e frações isoladas pôde-se observar que podem estar presentes constituintes antinociceptivos aparentemente agindo por mecanismos não opióides e não relacionadas a uma atividade anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2002).

3.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Nas últimas décadas, substâncias antimicrobianas representam o maior avanço da farmacoterapia, apresentando de forma acentuada efeitos sobre espécies microbianas patogênicas e oportunistas, responsáveis pelas mais variadas doenças com os mais variados quadros sintomáticos. Os antimicrobianos devem ser substâncias que, em baixas concentrações, apresentem letalidade ou inibição contra espécies microbianas, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos resistentes, com mínimos efeitos indesejáveis, estabilidade químicas (PELLISSARI, 2008).

A atuação dos agentes antimicrobianos incluem diversas ações como lesão da membrana citoplasmática, interferindo nas funções desta; inibição da síntese do peptideoglicano da parede celular microbiana; interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas, quer seja na interferência da síntese e replicação de DNA ou na inibição da RNA-polimerase dependente de DNA; e inibição competitiva da síntese de metabólitos essenciais (PELCZAR et al., 1996; SILVA, 1998). Dentre os microrganismos com potencial patológico estão os fungos, os quais se diferenciam das células humanas pela presença de parede celular. Esta serve como proteção, evita a ruptura osmótica e confere forma à célula fúngica (ZACCHINO, 2003).

A micologia, ao longo dos anos, vem apresentando mudanças significativas em relação ao crescente número de novas espécies de fungos e aos recursos diagnósticos e terapêuticos utilizados como tratamento. Assim, os antifúngicos devem apresentar baixa toxicidade, amplo espectro de ação, boa biodisponibilidade para tratamento sequencial, além de terem custos acessíveis. Diante desses fatos, o estudo farmacológico dos princípios ativos vegetais, além de constituir um campo inesgotável de novos conhecimentos científicos e geradores de riquezas, pode contribuir notavelmente para o aprimoramento da medicina tradicional (RODRIGUES et al., 2009).

Em estudo realizado por Silva et al. (2010), espécies da família Lythraceae apresentam taninos como o ácido elágico em sua composição, o qual foi testado *in vitro* quanto ao seu potencial antifúngico e demonstrou atividade contra *Candida spp.* e *Saccharomyces cerevisiae*, com valores significativos de concentração inibitória mínima (CIM). Segundo Sangita et al. (2010), a espécie *Lagerstroemia parviflora* (Roxb), pertencente à família Lythraceae foi testada em relação à sua CIM, e seu extrato bruto apresentou elevada inibição para *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus thiogentalis* MTCC 804, *Penicillium notatum* ATCC 6275, *Penicillium funiculosum* NCTC 287, e *Penicillium citrinum* MTCC 1256. Além disso, espécies do gênero *Cuphea* que contêm taninos em sua composição são relatadas como possíveis fontes de substâncias antimicrobianas (LUSA e BIASI, 2011).

3.5 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Cerca de 50% da população idosa apresenta hipertensão arterial, chegando a 20% dos adultos, estando entre as principais causas de morbidade e mortalidade em vários países (SOUZA, 2010). Para que ocorra mudança nesse quadro, medidas farmacológicas e não-farmacológicas devem ser aplicadas, bem como modificações no estilo de vida de pessoas acometidas com esta doença (VIECILI et al., 2009).

Como a pressão arterial elevada é a principal causa de acidente vascular cerebral, e também é um importante fator de risco para doença isquêmica do coração, o efeito de redução da pressão arterial com uso de quercetina pode ser um fator importante que contribui para a redução do risco de infarto do miocárdio e AVC, observadas as dietas ricas em flavonóides. A quercetina tem demonstrado induzir uma progressiva e permanente redução da pressão sanguínea quando administrado cronicamente em modelos de roedores mais comuns com hipertensão, independentemente do estado do sistema de renina-angiotensina, o estresse oxidativo ou de óxido nítrico. Além disso, este flavonóide também impediu as alterações morfológicas e funcionais no coração, vasos e rins, e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio associados à hipertensão em modelos de ratos. A redução da pressão arterial sistólica, diastólica e média foi observada em pacientes hipertensos estágio 1 após um tratamento com grupo usando alta dose de quercetina e grupo controle com placebo (VIZCAINO et al., 2009).

Espécies do gênero *Cuphea*, além da importância taxonômica, apresentam derivados de quercetina, aos quais se atribui o uso tradicional no tratamento de doenças cardíacas e

circulatórias (KREPSKY et al., 2010). Relatos referentes a espécies deste gênero com ação na prevenção contra doenças cardiovasculares são citados por Lusa e Biasi (2011). Além disso, estudos com as folhas de *C. carthagenensis*, apresentaram atividade antioxidante, indicando que pode estar relacionada com o controle da hipertensão arterial (LUSA e BONA 2011).

CAPÍTULO I

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

1.1 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

1.1.1 Coleta e identificação botânica

No município de Uruguaiana, localizado no extremo oeste do Estado do Rio Grande do Sul, na fronteira com a Argentina, foram coletados os exemplares de *C. glutinosa*. Em setembro de 2012 e agosto de 2013 foram realizadas as coletas, em região do bioma Pampa, em propriedade rural na divisa entre os municípios de Uruguaiana e Itaqui. Um exemplar foi enviado para o Departamento de Botânica da Universidade Federal do Pampa –Campus de São Gabriel, identificado pelos botânicos Ângelo Schneider e Patrícia Neves e depositado em herbário (HBEI 168).

1.1.2 Manuseio e secagem

Após a identificação botânica, o material vegetal coletado foi submetido a uma seleção das partes aéreas e subterrâneas (folhas e raízes). Depois da separação, foi levado à estabilização através de secagem em estufa a 40°C durante 5 dias. As partes foram pesadas separadamente, antes e após a secagem, para determinação do rendimento de massa fresca e seca das folhas e raízes, com determinação do conteúdo de água do material vegetal.

1.1.3 Determinação da perda por dessecação

Pelo método gravimétrico conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (2010), foi determinado o teor de umidade. Em balança analítica foi pesado 1,0 g do material vegetal (folhas e raízes) em pesa-filtro, previamente dessecado. Estes ficaram em estufa a 100 ± 5 °C por 2h e, após resfriamento em dessecador, foram pesados, repetindo-se a operação até peso constante. O teor de umidade foi obtido em triplicata.

Na determinação da perda por dessecação, o cálculo foi feito conforme a equação que segue:

Equação da porcentagem da perda por dessecação: $\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$ em que:

Pa

Pa = peso da amostra,

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação,

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

1.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O material seco foi triturado em moinho de facas e submetido à extração com etanol 40% (v/v) e etanol 70% (v/v), respectivamente para folhas e raízes. As relações droga:solvente foram testadas, variando de 1:10 e 1:20. As técnicas extrativas que foram testadas incluíram a maceração e a extração aquosa por infusão.

1.2.1 Extração por maceração exaustiva

O material vegetal após seco e moído (folhas e raízes) em quantidade de aproximadamente 30 g, foram acondicionados em frascos de vidro âmbar com 300 mL de solução hidroetanólica (diferentes proporções de etanol, conforme descrito em 1.2) por 5 dias ao abrigo de luz. Após o período de 5 dias, o material foi filtrado e armazenado em freezer, e foram adicionados mais 300 mL ao frasco contendo o material vegetal, mantendo-se em contato com o solvente por mais 5 dias. Após, filtrou-se e adicionou-se ao frasco com o extrato anterior. Parte do extrato das folhas (50 mL) foi armazenado em freezer para análises posteriores e o restante, considerando-se a perda pela filtração, aproximadamente 300 mL, foi concentrado em evaporador rotatório para retirada do solvente alcoólico e depois uma parte foi submetida à secagem em estufa a 40°C por 2 dias e outra à liofilização a -60°C por aproximadamente 36h. O extrato seco apresentou-se como um pó de coloração marrom escuro.

1.2.2 Extração por infusão

As partes aéreas da planta (folhas) em quantidade aproximada de 20 g foi colocada em contato com 400 mL de água em temperatura de 80°C e mantida em repouso por 60 minutos. Posteriormente o material foi filtrado. A filtração da infusão foi bastante crítica pois o extrato apresentou-se viscoso com aparência gelatinosa, de difícil filtração, fato que levou a um baixo rendimento (<50%) do extrato. Cerca de 30 mL foram armazenados em frasco âmbar em

freezer para depois ser analisado, e 150mL foram submetidos a secagens, uma parte em estufa por 3 dias à 40°C, e outra por liofilização por 2 dias à -60°C, tornando-se um pó marrom.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

1.3.1 Determinação de resíduo seco

A determinação de resíduo seco seguiu a técnica da Farmacopéia Brasileira (2010). Para isto, foram transferidos 2,0 mL de cada extrato (maceração e infusão das folhas e raízes) para cadinhos, previamente tarados e dessecados, os quais foram levados ao banho de aquecimento até evaporação do solvente. Os cadinhos contendo os resíduos secos foram então levados à estufa a 100 ± 5 °C por 3h. Posteriormente, foram imediatamente resfriados em dessecador. Os resultados foram expressos utilizando-se da média de três determinações.

1.3.2 Método extrativo líquido-líquido

Em funil de separação foram colocados 50 mL do extrato das folhas de *C. glutinosa* obtido por maceração e foram adicionados solventes em ordem crescente de polaridade (SNYDER et al., 1997). Foram adicionados 25 mL de hexano ao extrato, seguindo-se de mistura e separação de fases. Posteriormente, separou-se a fração hexânica e adicionou-se mais 25 mL, repetindo a operação. A metodologia de separação foi repetida para os reagentes diclorometano, acetato de etila e metanol. Em todas as etapas foi utilizada a mesma quantidade de solvente em relação ao extrato inicial (50 mL), dividida em duas vezes. Depois da etapa de separação das frações por afinidade ao solvente (frações hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), elas foram concentradas em evaporador rotatório, filtradas e analisadas por CLUE, em sistema de fase reversa e eluição por gradiente em fase móvel composta por acetonitrila e metanol (4:1) e ácido fórmico 0,1% pH 3,0 ajustado com trietilamina.

1.3.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de polifenóis nos extratos hidroetanólicos de *C. glutinosa* foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Para esta análise, em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL da amostra, misturados a 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e

adicionados 6 mL de água, agitando-se e mantendo-se em repouso por 1 minuto. Após, foram adicionados 500 µL de carbonato de sódio 15%. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz por 30 minutos. Então, foram feitas as leituras em Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 35 (Perkin Elmer) no comprimento de onda de 750 nm.

Para a curva padrão de ácido gálico, foram feitas diluições a partir de solução padrão a 1,0 mg/mL, resultando em concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 µg/mL. Destas, alíquotas de 50 µL foram submetidas ao protocolo descrito acima. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/mL de extrato, em média de três determinações.

1.3.4 Determinação de Flavonóides Totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada por meio do método colorimétrico descrito por Chang et al. (2002). Para esta determinação, em balão volumétrico de 25 mL foram colocados 500 µL da amostra, completando-se o balão com o solvente correspondente. Posteriormente, foram adicionados 500 µL do reagente cloreto de alumínio 0,5% e estas amostras foram deixadas por 30 minutos em temperatura ambiente, com posterior leitura em Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 35 (Perkin Elmer) em comprimento de onda de 415 nm.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 PERDA POR SECAGEM E DESSECAÇÃO

Os resultados para a perda por secagem da espécie *C. glutinosa* apresentaram valores de 57,16% para folhas e 66,07% para raízes. Na perda por secagem escolheu-se a secagem em estufa, tendo em vista que a secagem em temperatura ambiente não permite o controle de parâmetros como umidade do ambiente e a contaminação microbológica que pode ocorrer em função desta. Mesmo havendo uma maior segurança na secagem em estufa, por ter um maior controle da temperatura e do material vegetal, segundo estudo realizado por Pelissari (2008) não foram encontrado diferenças significativas no teor de umidade perdido em secagens em estufa e ao ar ambiente, embora esta última tenha levado mais tempo para estabilizar o material.

Nas folhas e raízes moídas de *C. glutinosa* os resultados para perda por dessecação foram de $8,556 \pm 0,29\%$ para folhas e $9,369 \pm 0,40\%$ para raízes. Segundo a Farmacopéia

Brasileira (2010), o teor recomendado de uma amostra de planta é de 8 a 14%. Desta forma, foi observado que os teores de umidade encontrados para todas as amostras estão de acordo com a literatura.

2.2 RESÍDUO SECO

O maior rendimento de extrato em massa foi observado na extração por maceração. Para os extratos obtidos de folhas, o maior rendimento em resíduo seco foi em solução hidroetanólica a 40%. No caso das raízes, a solução hidroetanólica a 70% apresentou maior eficiência de extração para o parâmetro em estudo. Os resultados do teor de resíduo seco podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados de determinação de resíduo seco para as extrações hidroetanólicas em diferentes proporções.

Resíduo seco expresso em % (CV%)*		
	Maceração	Infusão
Folhas	1,3198	0,3987
	1,3148	0,4763
	1,3441	0,4485
	1,3262 (1,18%)	0,4412 (8,91%)
Raízes	0,6375	0,1494
	0,6660	0,2043
	0,6483	0,1844
	0,6506 (2,21%)	0,1794 (15,49%)

*Coeficiente de variação. Cada valor equivale à média de três análises

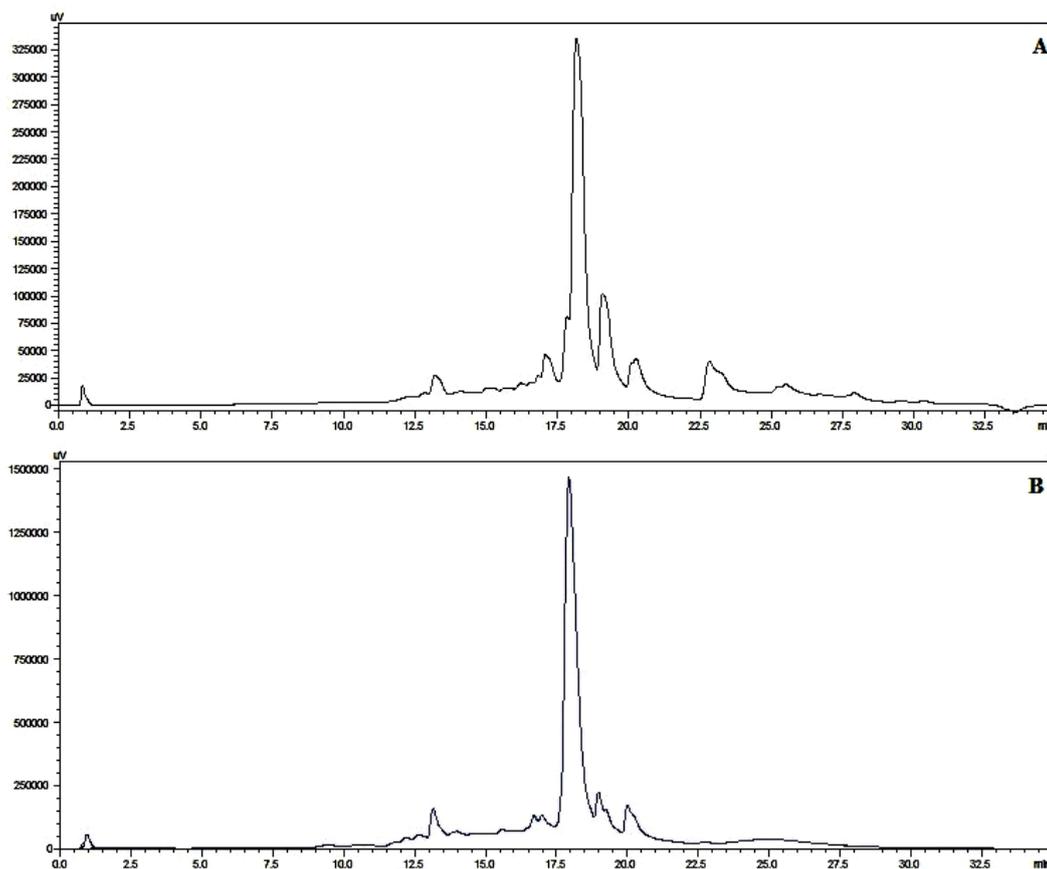
2.3 METODOLOGIA EXTRATIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO

Esta metodologia tem importância na purificação dos extratos vegetais, utilizando a afinidade dos componentes por solventes de diferente polaridade como técnica prévia para análises mais aprofundadas. Desta forma, selecionou-se o extrato da maceração das folhas, pois em análises preliminares o mesmo apresentou os melhores perfis cromatográficos, com visualização de componentes majoritários. A Figura 1 ilustra um cromatograma obtido em análise por CLUE de extrato de folhas de *C. glutinosa*, com comparação de perfil cromatográfico obtido do extrato bruto e da fração etanólica residual, após passagem dos

solventes utilizados no processo de purificação. O perfil cromatográfico parece ser semelhante, porém é possível visualizar a maior concentração do componente majoritário, em 18,5 minutos.

Segundo Rockenbach (2008) os compostos de origem fenólica têm maior afinidade por solventes polares. Portanto, acredita-se que a maior concentração dos compostos na fração etanólica residual seja pela purificação após a passagem por reagentes de ordem crescente de polaridade.

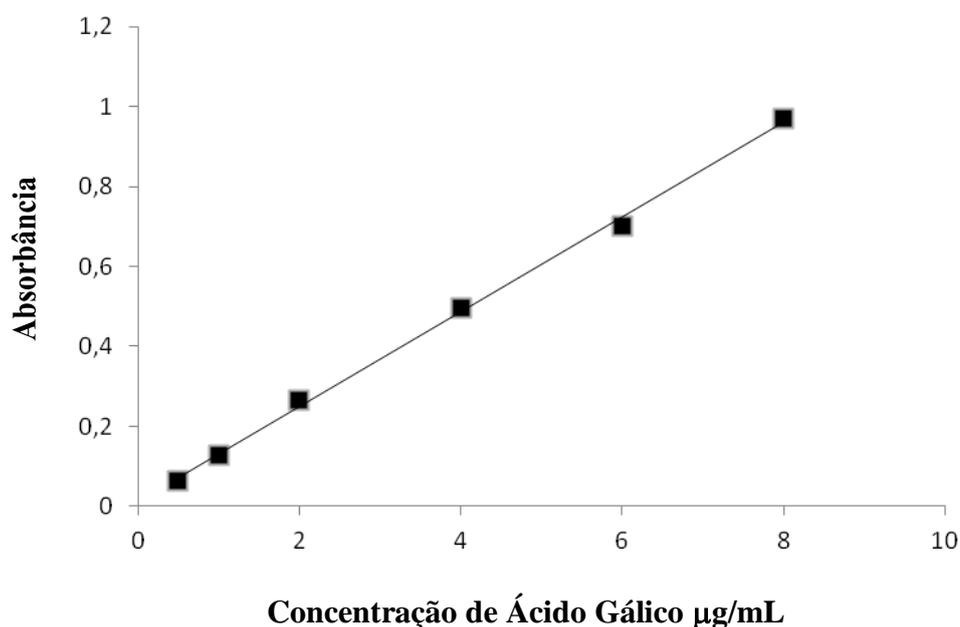
Figura 1 – Cromatogramas obtidos por CLUE para extratos hidroetanólicos (40% de etanol) de *C. glutinosa*. Detecção em 340 nm. A: extrato das folhas obtido por maceração. B: resíduo etanólico a partir do extrato macerado das folhas.



2.4 FENÓLICOS TOTAIS

No ensaio de determinação de fenólicos totais nos extratos vegetais, construiu-se uma curva analítica a partir uma solução hidroetanólica de ácido gálico a 1,0 mg/mL, em concentrações variando de 0,5 a 8 µg/mL, com a qual se obteve a equação da reta $y = 0,1187x + 0,0111$ e coeficiente de correlação (r) de 0,9984 (Figura 2).

Figura 2 – Curva analítica para determinação de ácido gálico por método espectrofotométrico, em comprimento de onda de 750 nm.



Conforme podemos observar na Tabela 2, os extratos obtidos por maceração apresentaram resultados de teor de fenólicos totais com máximos de 3,7284 mgEAG/mL e 2,6266 mg EAG/mL de extrato para folhas e raízes, respectivamente. Para o extrato obtido por infusão, o teor de fenólicos totais foi de 1,8501 mgEAG/mL e 0,8467 mgEAG/mL para folhas e raízes, respectivamente.

Tabela 2 – Resultado do teor de fenólicos totais em extratos obtidos de *C. glutinosa* utilizando métodos extrativos por maceração e infusão.

Teor de fenólicos totais expressos em mg EAG/mL de extrato (CV%)		
	Maceração	Infusão
Folhas	3,75653	1,94145
	3,68913	1,81087
	3,73968	1,79823
	3,7284 (0,94%)	1,8501 (4,28%)
Raízes	2,65754	0,87599
	2,63648	0,85409
	2,58593	0,81028
	2,6266 (1,40%)	0,8467 (3,95%)

*Coeficiente de variação. Cada valor equivale à média de três análises

Através dos resultados, podemos observar que a técnica extrativa de compostos fenólicos mais eficiente nas condições aplicadas neste trabalho foi a maceração, utilizando etanol 40% para folhas e etanol 70% para raízes.

2.5 FLAVONÓIDES TOTAIS

Na realização do teor de flavonóides totais empregou-se a metodologia de Chang et al. (2002), na qual é utilizado o reagente cloreto de alumínio (AlCl_3), conhecido como um agente de deslocamento em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural dos compostos flavonoídicos. A formação do complexo flavonóide-Al absorve mais intensamente e em comprimento de onda maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante, tecnicamente determinados de efeitos hipercrômico e batocrômico (LIANDA, 2009).

Os resultados para este parâmetro estão descritos na Tabela 3. Cabe ressaltar que para a determinação analítica, utilizou-se solução padrão de rutina como referência de comparação, de modo que os resultados foram expressos em equivalentes de rutina (ER).

Tabela 3 – Resultado do teor de flavonóides totais em extratos obtidos de *C. glutinosa* utilizando a técnica de maceração e infusão.

Teor de flavonóides totais expressos em ER mg/g de droga vegetal seca (CV%)		
	Maceração	Infusão
Folhas	8,3819	7,0110
	8,0489	7,1872
	7,4223	7,0893
	7,9511 (6,12%)	7,0959 (1,24%)
Raízes	0,5730	0,4544
	0,6323	0,6125
	0,5927	0,6323
	0,5994 (5,03%)	0,5664 (17,20%)

*Coeficiente de variação. Cada valor equivale à média de três análises

A maior concentração de flavonóides foi encontrada nas folhas de *C. glutinosa*, com valores muito mais elevados que a concentração obtida nas raízes da espécie. Acredita-se que esta diferença possa estar relacionada com vários fatores ambientais que influenciam a produção de flavonóides nas plantas, como por exemplo, temperatura, nutrição, injúria,

metabolismo do açúcar e do nitrogênio e qualidade de radiação (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

3 CONCLUSÕES

- ✓ A secagem em estufa a 40°C por 120 horas mostrou-se eficiente na estabilização do material vegetal;
- ✓ O método extrativo de melhor rendimento em relação às análises de resíduo seco foi a maceração;
- ✓ O método de extração líquido-líquido por afinidade apresentou-se adequado para a proposta de eliminação de compostos lipofílicos e concentração dos compostos majoritários nos extratos em estudo;
- ✓ Os teores de fenólicos e flavonóides totais, nas condições utilizadas neste estudo, apresentaram-se mais concentrados nos extratos obtidos por maceração;
- ✓ As folhas de *C. glutinosa* apresentaram maior concentração de compostos fenólicos em relação às raízes da mesma espécie.

CAPÍTULO II

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS VEGETAIS

1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

1.1 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises foram efetuadas em equipamento Cromatógrafo a Líquido Prominence Shimadzu (Kioto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, detector SPD-20AT, forno de coluna CTO-20A e software LC Solution V. 1.24 SP1. A separação cromatográfica foi efetuada em coluna C18, de fase reversa, Hypersil C18 Thermo-Scientific (250 x 4.0 mm, 5 µm). As amostras foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm. A fase móvel foi também filtrada em membrana de nylon de 25 mm x 0,45 µm e sonicada em ultrassom, por 20 minutos.

A partir dos extratos obtidos, partiu-se para definição das condições cromatográficas a serem utilizadas nas análises por CLAE-UV. Inicialmente foram testados diferentes sistemas de eluição a fim de determinar o método mais eficiente na separação dos compostos. Cabe salientar que alguns trabalhos de abordagem fitoquímica e análises cromatográficas foram estudados, de modo a permitir melhor embasamento na seleção das condições de ensaio. A seguir, na Tabela 1, encontram-se as principais condições testadas.

Tabela 1 – Condições cromatográficas utilizadas em testes para a análise por CLAE-UV dos extratos obtidos de *C. glutinosa*.

Modo de eluição	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Detecção (nm)	Referência
Isocrático	Metanol e Ácido Fosfórico (0,16M) (53:47)	0,6	340	De Souza et al. (2002)
Gradiente	Metanol e Ácido Acético 2%	0,8	340	Evaristo e Leitão (2001)
Gradiente	Acetonitrila:Metanol (4:1) e Ácido Fórmico 0,1% pH 3,0*	1,0	340	Yang et al. (2012)

*pH ajustado com Trietilamina.

1.2 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)

Com o propósito de realizar análises em espectrômetro de massas, foram desenvolvidos experimentos através de metodologia por CLUE. As análises foram efetuadas em equipamento cromatógrafo a líquido Prominence Shimadzu (Kioto, Japão), equipado com

bomba LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC HT, detector SPD-M20A e software LC Solution V. 1.24 SP1. A separação cromatográfica foi efetuada em coluna analítica *fast* C18 Shim-Pack XR-ODS (50 x 2 mm, 2.1 µm). A Tabela 2 demonstra alguns dos sistemas que foram adaptados para serem testados nas análises por CLUE.

Tabela 2- Condições cromatográficas testadas para análise por CLUE-UV dos extratos de *C. glutinosa*.

Modo de eluição	Fase móvel	Fluxo mL/min.	Deteção (nm)	Referência
Gradiente	Acetonitrila:Ácido Fórmico 0,01%	0,35	340	Dan et al. (2008)
Gradiente	Acetonitrila:Ácido Fórmico 0,1%	0,2	340	Tan et al. (2011)
Gradiente	Acetonitrila:Metanol (4:1) e Ácido Fórmico 0,1% pH 3,0	0,2	340	Yang et al. (2012)*

*Metodologia adaptada.

Nas análises por cromatografia, tanto por CLAE quanto por CLUE, os extratos obtidos de *C. glutinosa* foram comparados a padrões conhecidos de quercetina, rutina, canferol, ácido cafeico e ácido clorogênico, todos na concentração de 125 µg/ mL.

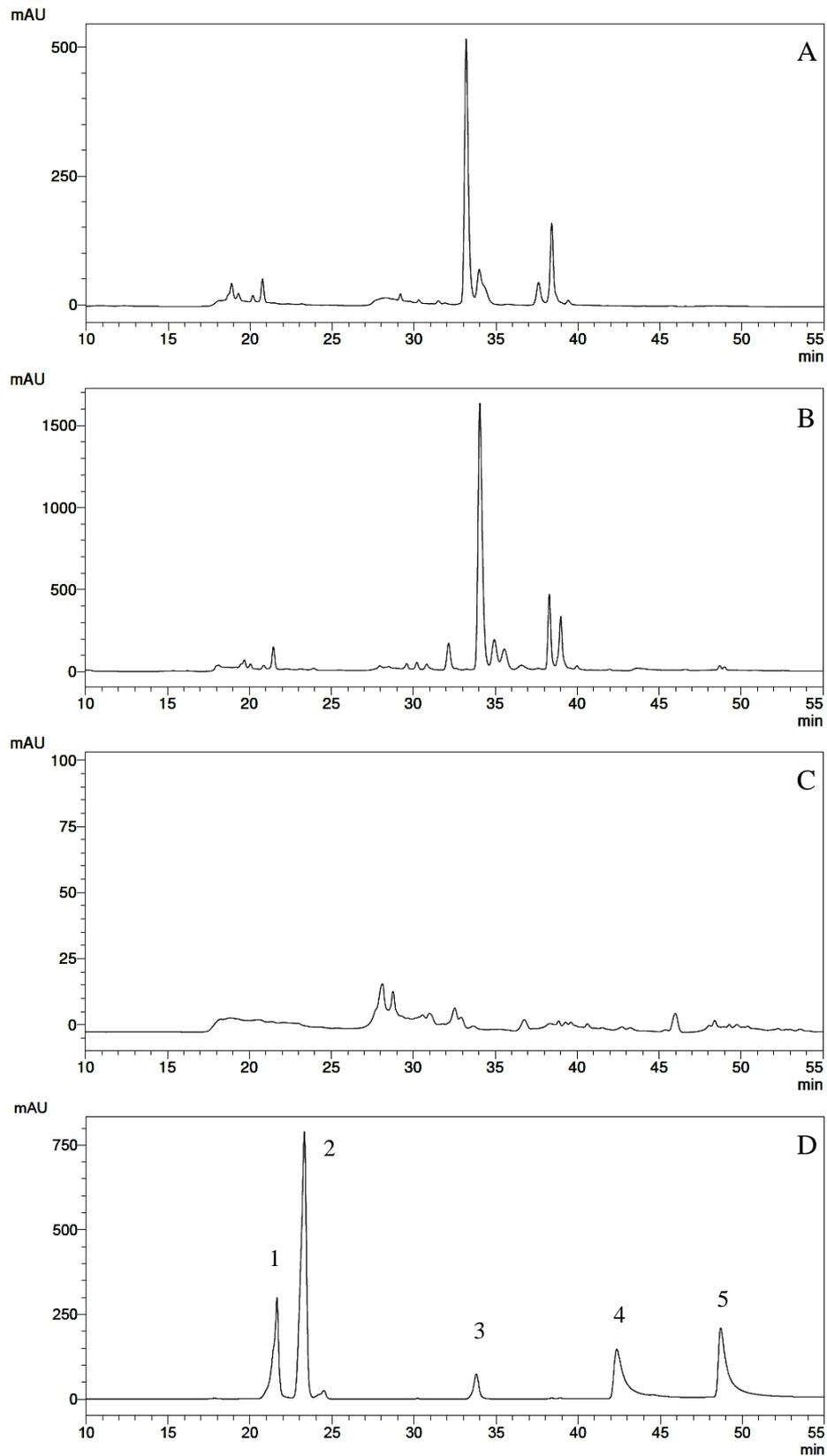
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados apresentados a seguir é possível ter uma visão geral das metodologias empregadas com a finalidade de buscar a melhor condição cromatográfica, tendo em vista que os componentes nos extratos vegetais de *C. glutinosa* apresentaram-se com perfil de difícil separação. Desta forma, buscou-se o método que propiciou a melhor separação dos componentes majoritários da espécie estudada.

2.1 ANÁLISES POR CLAE

Inicialmente, testaram-se condições descritas por Evaristo e Leitão (2001), os quais empregaram esta técnica para determinação cromatográfica de compostos fenólicos. Na Figura 1 são ilustrados os resultados do presente estudo.

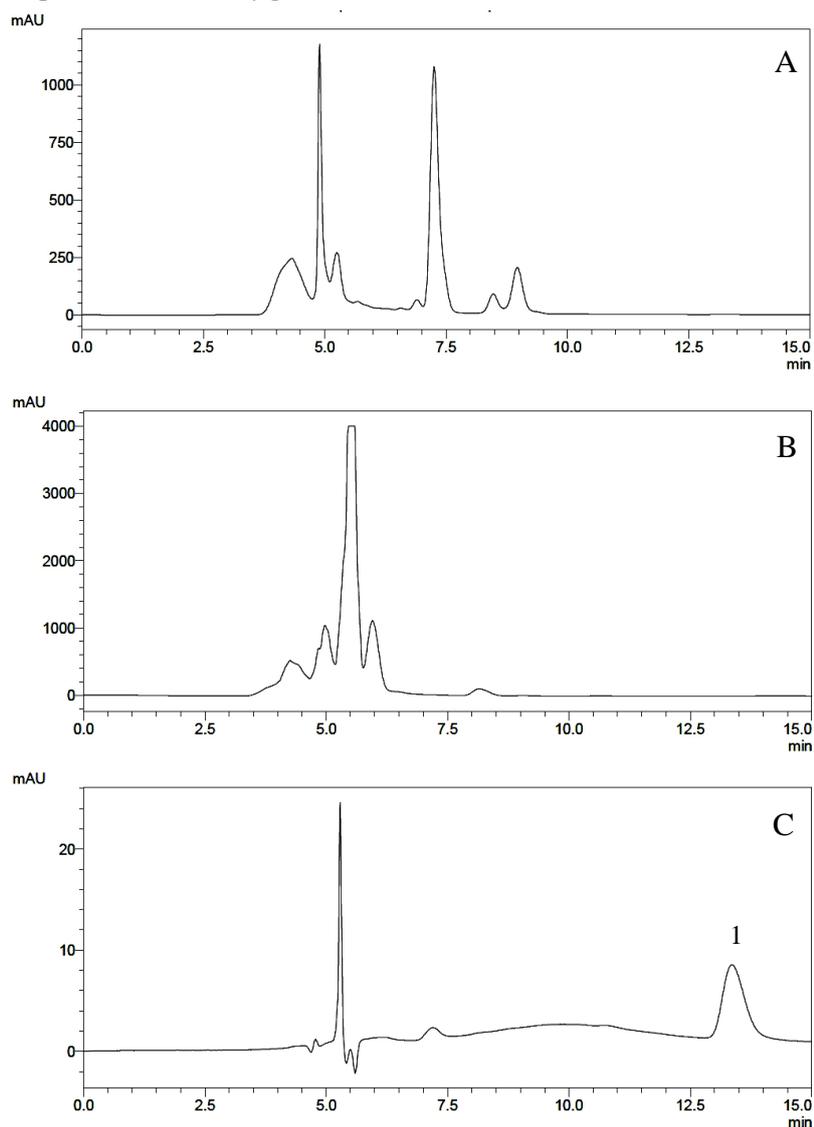
Figura 1 – Cromatogramas obtidos em análise por CLAE para extratos de *C. glutinosa* utilizando o método descrito por Evaristo e Leitão (2001) com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por infusão. B: análise do extrato das folhas obtido por maceração. C: análise do extrato das raízes obtido por maceração. D: análise dos padrões ácido clorogênico (1), ácido cafeico (2), rutina (3), quercetina (4) e canferol (5).



Pode-se observar que o método empregado apresentou uma boa separação para os extratos das folhas, sendo possível detectar dois componentes majoritários em tempos aproximados de 34,0 e 39,0 minutos. Já para o extrato obtido das raízes não houve boa separação e não foram observados picos majoritários. Além disso, os padrões testados de ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, quercetina e canferol não apresentaram tempo de retenção compatíveis com aqueles observados para os extratos.

Pensando em melhoria de perfil cromatográfico, incluindo detecção de componentes nas raízes, testaram-se outras condições. Na Figura 2, são ilustrados os cromatogramas obtidos a partir de análise utilizando as condições descritas por De Souza et al. (2002).

Figura 2 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de *C. glutinosa* pelo método de De Souza et al. (2002), com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por infusão. B: análise do extrato das folhas obtido por maceração. C: padrão de quercetina a 100 µg/ml (1).



A partir da observação dos cromatogramas pode-se verificar a presença de dois componentes majoritários na infusão das folhas (Figura 2, A), em 5,0 e 7,45 minutos, embora em geral não tenha ocorrido uma separação eficiente. Para a maceração das folhas, pôde-se observar a presença de um componente majoritário em tempo de retenção aproximado de 5,5 minutos. Neste momento, testou-se apenas o padrão de quercetina, pois era o composto de interesse.

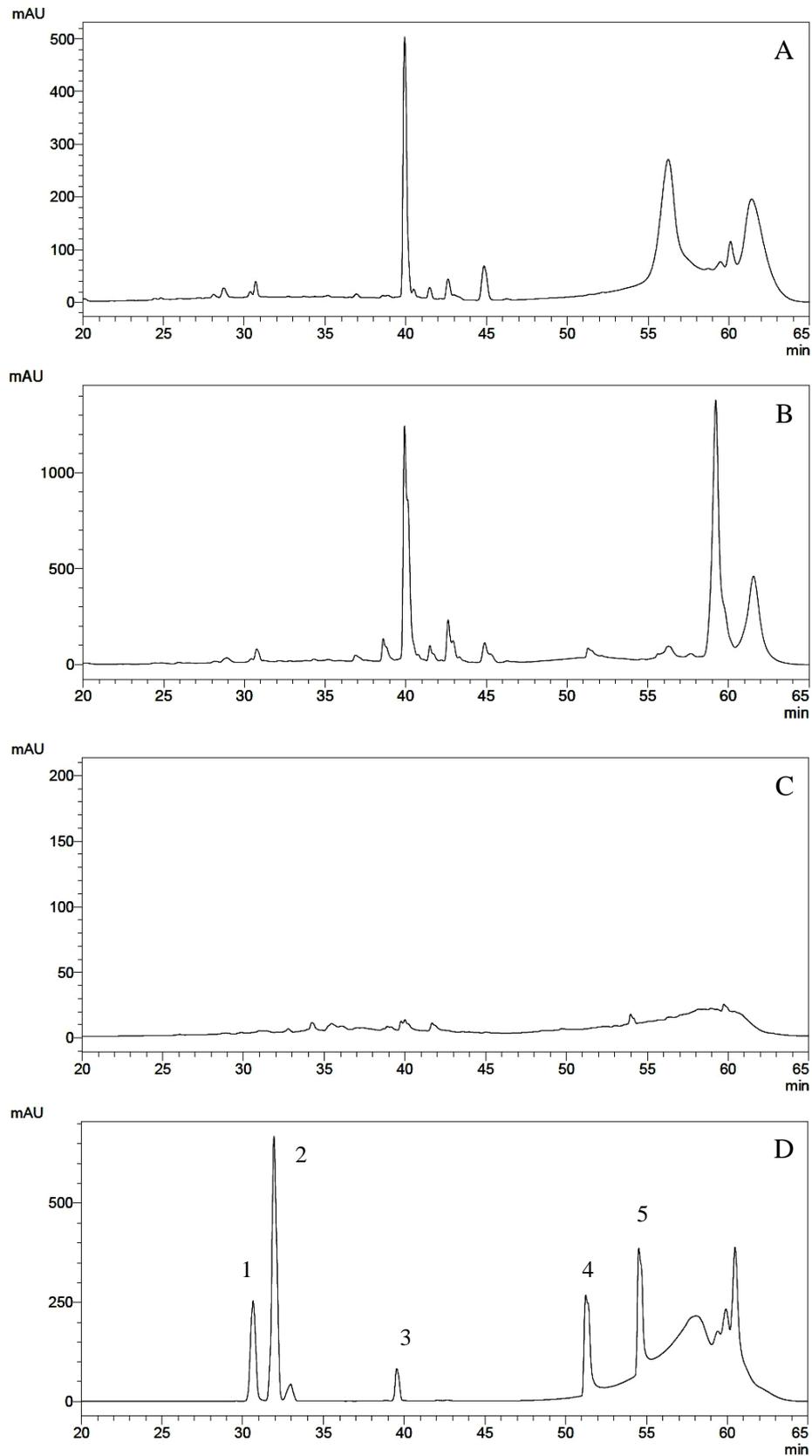
Pensando em complexidade de composição fitoquímica, partiu-se para teste de condições de eluição em gradiente e com tempo de retenção maior. Para tal, testou-se o sistema cromatográfico proposto por Yang et al. (2012), aplicado à determinação de compostos fenólicos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.

Observando os resultados, verifica-se uma boa separação, em especial comparando-se com a condição anterior. Há a presença de um pico majoritário nos extratos das folhas, tanto para maceração quanto para infusão em tempo de retenção aproximado de 40,0 minutos. No extrato por infusão das folhas, observou-se a presença de dois picos em 56,0 e 62 minutos (Figura 3,A), e para a maceração das folhas, observou-se também a presença de dois picos cromatográficos com retenção em 59,0 e 61,0 minutos (Figura 3, B). Observando o cromatograma dos padrões, observa-se pico referente à rutina em 39,6 minutos (Figura 3, D).

Com base nos resultados encontrados, selecionou-se as condições de eluição por gradiente, que propiciou melhor separação dos picos cromatográficos, para ambos extratos (maceração e infusão) de *C. glutinosa*. No comparativo das análises das partes da planta, os resultados referentes à composição dos extratos de raízes não se apresentaram adequados, podendo se relacionar à composição distinta das folhas, e portanto não detectada pela condição utilizada, ou à extração ineficiente no sentido de baixa concentração dos compostos. Assim, o trabalho focou a identificação química dos componentes das folhas de *C. glutinosa*, com a maior concentração de componentes fenólicos.

Em estudo realizado por Santos et al. (1995), no qual foram pesquisadas 16 espécies do gênero *Cuphea*, foram identificados 35 flavonóides, a maioria compostos 3-O-glicosídeos de flavonóis e flavonas. Foram também observados derivados de miricetina e glicosídeos contendo ácido glucurônico. Além disso, nestas espécies do gênero *Cuphea* estavam presentes derivados de ramnetina, isoramnetina e canferol.

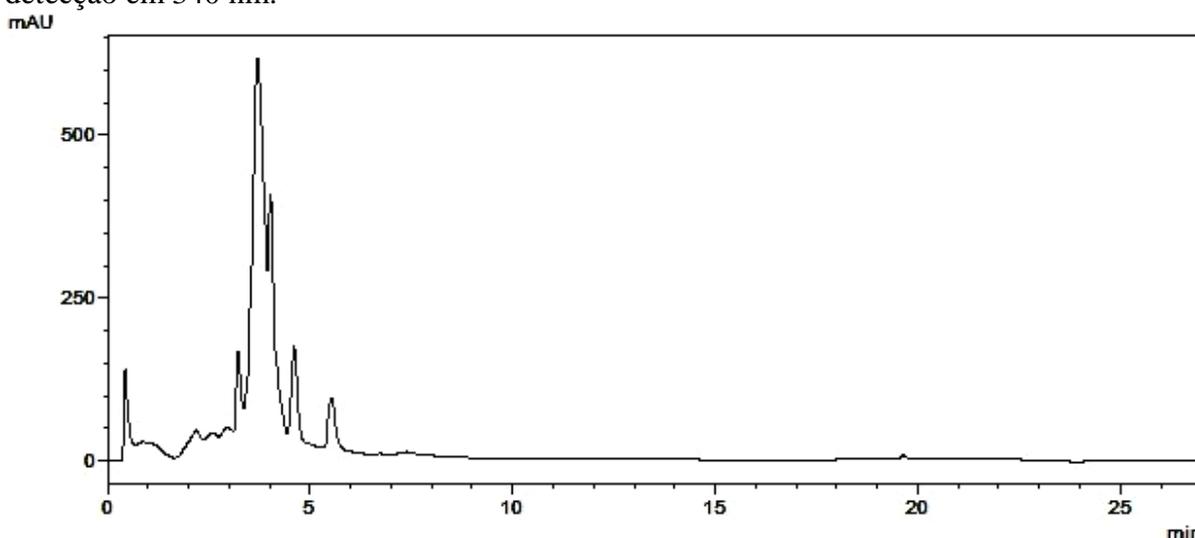
Figura 3 – Cromatogramas obtidos por CLAE na determinação de extratos de *C. glutinosa*, utilizando metodologia proposta por Yang et al. (2012), com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por infusão. B: análise do extrato das folhas obtido por maceração. C: análise do extrato das raízes obtido por maceração. D: análise dos padrões ácido clorogênico (1), ácido cafeico (2), rutina (3), quercetina (4) e canferol (5).



2.2 ANÁLISES POR CLUE

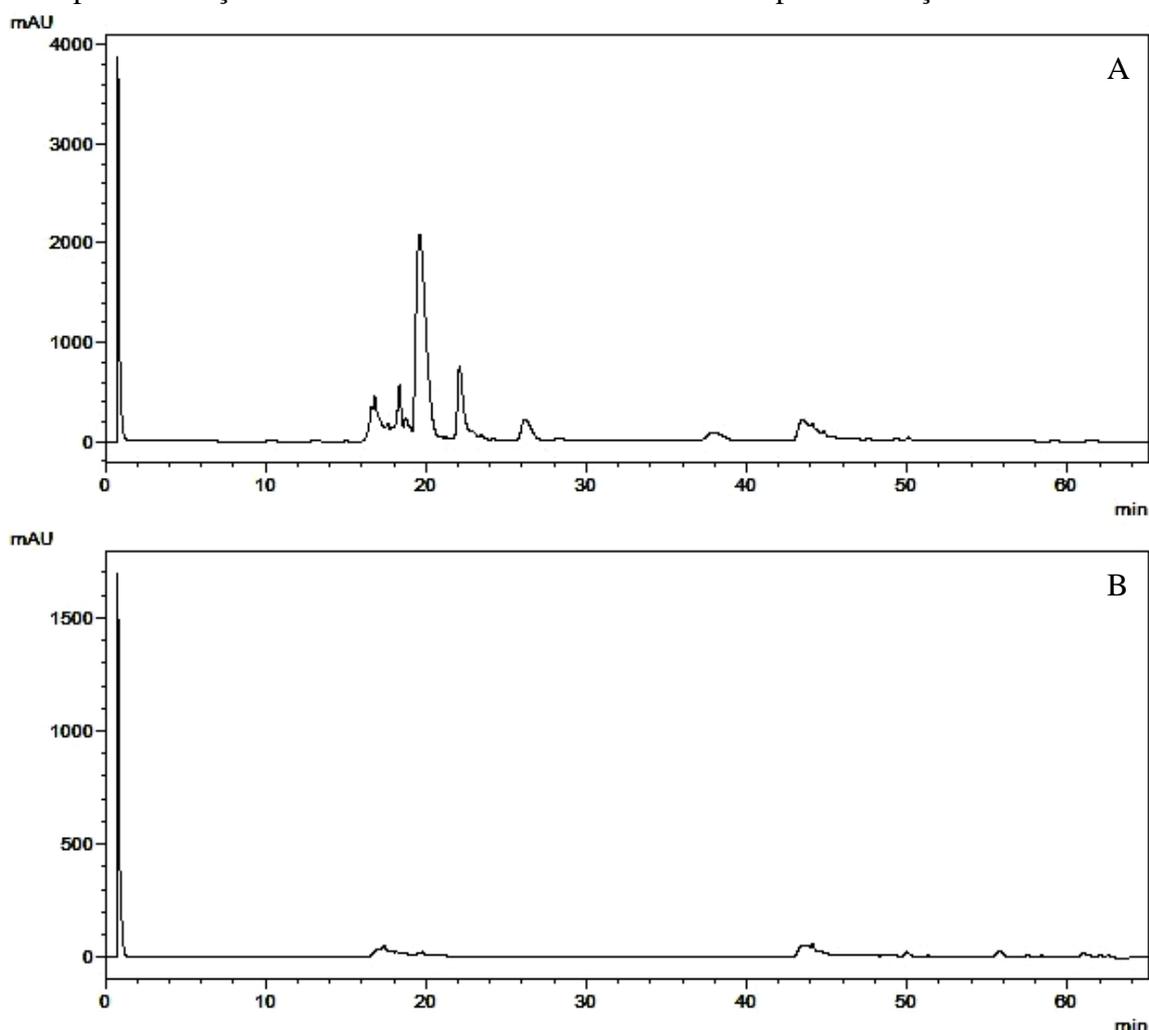
Nos experimentos realizados por CLUE optou-se em estudar apenas os extratos obtidos pela extração por maceração, pois foi a condição extrativa que apresentou maior concentração de compostos fenólicos e flavonóides. Inicialmente, analisou-se apenas os extratos obtidos por maceração das folhas, aplicando-se a metodologia proposta por Dan et al. (2008), para separação de componentes presentes em *Panax ginseng* em análises por CLUE. A Figura 4 ilustra o cromatograma obtido na análise de *C. glutinosa* através das condições propostas. O perfil cromatográfico obtido não se apresentou adequado, já que os componentes visualizados não tiveram boa resolução de separação, apesar de promissora indicar a presença de componentes majoritários.

Figura 4 – Cromatograma obtido por CLUE na determinação do extrato das folhas de *C. glutinosa* obtido por maceração, utilizando condições descritas por Dan et al. (2008), com detecção em 340 nm.



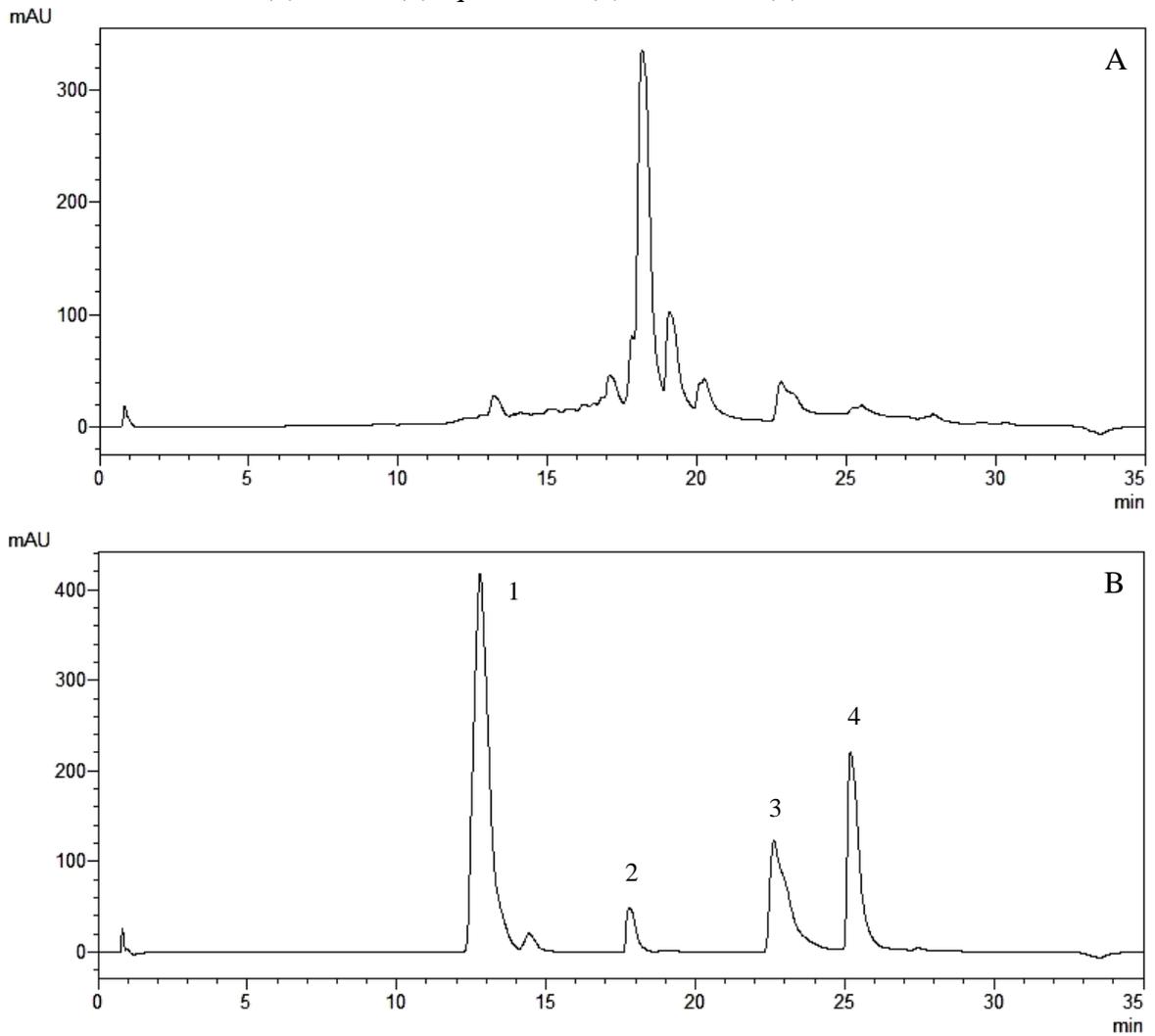
Com o propósito de melhor resolução na análise do material em estudo, utilizou-se condição cromatográfica descrita por Tan et al. (2011), em trabalho focado na determinação de compostos fenólicos tânicos, em ensaio por CLUE. Os resultados obtidos na análise de *C. glutinosa* podem ser observados na Figura 5. Num comparativo com os resultados anteriores, obtidos por CLUE, os cromatogramas obtidos neste momento se apresentaram melhores, com melhor resolução de análise, permitindo a visualização dos componentes presentes, em especial para os extratos de folhas, com detecção de pico majoritário em retenção aproximada de 20,0 minutos. Para os extratos de raízes, as mesmas observações já dispostas para a análise por CLAE se repetem.

Figura 5 – Cromatogramas obtidos por CLUE na determinação de extratos de *C. glutinosa* pelo método de Tan et al. (2011), com detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por maceração. B: análise do extrato das raízes obtido por maceração.



Objetivando mais testes em condições cromatográficas para análise por CLUE dos extratos de *C. glutinosa*, procurou-se adaptar a metodologia utilizada na análise por CLAE, mantendo o perfil já estudado e reconhecido como característica para os extratos trabalhados. Deste modo, efetuou-se a transferência de método, com adaptação para o fluxo de eluição (0,2mL/min) e volume de injeção de amostra (5 μ L). Observou-se uma redução do tempo de análise, como esperado. Da mesma forma, visualizou-se um perfil cromatográfico para os extratos obtidos de folhas, semelhante ao obtido para as análises por CLAE, permitindo a padronização de um perfil qualitativo de identificação por cromatograma analítico. Na Figura 6 é possível observar a separação dos componentes, bem como os compostos majoritários presentes na espécie. Para os extratos de raízes de *C. glutinosa*, o perfil cromatográfico se repetiu, com ausência de picos em detecção significativa.

Figura 6 – Cromatogramas obtidos por CLUE na análise de extratos de *C. glutinosa*. Detecção em 340 nm. A: análise do extrato das folhas obtido por maceração. B: análise dos padrões ácido cafeico (1), rutina (2), quercetina (3) e canferol (4).



3 CONCLUSÕES

- ✓ A metodologia para determinação por CLAE, com fase móvel composta por acetonitrila:metanol (4:1) e ácido fórmico a 0,1% (pH 3,0) em sistema gradiente, mostrou-se adequada para a separação de compostos presentes em extratos de *C. glutinosa*, sendo selecionada para a continuidade de determinação da composição química dos extratos;
- ✓ A metodologia de Yang et al. (2012), por CLUE foi padronizada em condições semelhantes às utilizadas em análise por CLAE, com pequenas modificações para o sistema de ultra-eficiência;
- ✓ Os extratos obtidos de folhas de *C. glutinosa* apresentaram picos cromatográficos em perfil semelhante para ambas as metodologias utilizadas, ao contrário dos extratos obtidos de raízes, nos quais não foram detectados picos cromatográficos, ou os mesmos se apresentaram em concentração reduzida para o comprimento de onda de detecção utilizado.

CAPÍTULO III

MANUSCRIPT - Chemical composition of extracts from *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltdl (Lythraceae) by UPLC-MS and the evaluation of antifungal and antihypertensive activities

ABSTRACT

Cuphea glutinosa is a species extensively distributed in South of Brazil, being known in the folk medicine as diuretic, anti-inflammatory, laxative and anti-hypertensive. In the present work we investigated the chemical composition and the antifungal and anti-hypertensive activities of extracts obtained from *C. glutinosa*. Leaves and roots were used to prepare the infusions and macerations. The total phenolic and flavonoids compounds were estimated by spectrophotometric methods. The chromatographic analyses were performed by UPLC-MS, using the conditions as follows: gradient elution using acetonitrile:methanol (4:1, v/v) and formic acid 0.1% pH 3.0; C18 fast column Shim-Pack XR-ODS (50 x 2 mm, 2.1 μm); detection by UV-DAD and ESI-MS; injection volume 5.0 μL . The *in vitro* antifungal activity was conducted by using the broth microdilution method, and the MIC and MFC were established against clinical isolates. For evaluation of *in vivo* anti-hypertensive potential, the blood pressure was measured by the method of invasive hemodynamic monitoring, through of insertion the catheter into the carotid artery. The results indicated a high concentration of phenolic and flavonoids, predominantly in the leaves. The infusion and maceration presented values of 1.8501 and 3.7284 mg GAE/mL of extract, respectively. The molecular ions and mass fragments obtained from MS analyses indicated a composition based on flavonoids, whose compounds were suggested as quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-arabinoside, quercetin-3-glucuronide, isorhamnetin and quercetin-5-O- β -glucopyranoside. The extracts of the leaves and roots tested presented antifungal activity against *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Trichosporon asahii*, with MIC ranging 1.9 – 62.5 $\mu\text{g/mL}$. In the hemodynamic tests performed, the extracts of the aerial parts showed no significant results to report the antihypertensive activity. Scientific findings show novel compounds for this species, as well as its potential against pathogenic fungi and yeasts, requiring further studies for testing the anti-hypertensive potential.

Keywords: *Cuphea glutinosa*, quercetin derivatives, UPLC-MS, antifungal activity, anti-hypertensive activity.

1 INTRODUCTION

Belonging family Lythraceae, *Cuphea* is the largest of genus, covering around 260 species of perennial herbaceous plants and small shrubs. A comprehensive number of species constituting this genus is divided into two main geographic centers: North America and South America. In each location, a small number of species have large distributions and are often found in degraded lands (Graham, Freudenstein e Luker, 2006; Zago et al., 2009). Popularly known in Brazil as "sete-sangrias", *Cuphea* genus is used in Brazilian folk medicine as diuretic, antipyretic, anti-inflammatory, laxative and anti-hypertensive (Fernandes, et al., 2002; Lusa & Bona 2011).

The chemical composition of some *Cuphea* species has been reported. In *C. carthagenensis*, triterpenes, steroids, fatty acids, carbohydrates and quercetin-*O*-sulfate were found in the aerial parts. In addition to these compounds, studies involving the species *C. hyssopifolia* identified the presence of hydrolysable tannins, including ellagitannins (Braga et al., 2000; Chen et al., 1999; Krepsky et al., 2010). Flowering parts of *C. carthagenensis* have condensed tannins, proanthocyanidins, flavonoids and steroids and for *C. wrightii* it is described the presence of triterpene glycosides and flavonoids (Lusa & Biasi, 2011). In a recent study about *C. hyssopifolia*, it was detected the presence of diterpenoids and flavonoids, which are isolated from methanolic extract and ethyl acetate fractions (Serna et al., 2011).

Over the years mycology has been showing significant changes in relation to the growing number of new species of fungi and to diagnostic and therapeutic resources used as treatment (Rodrigues et al., 2009). *Candida* species are the most important cause of opportunistic fungal infections worldwide. *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei* account for 95-97% of all invasive fungal infections of this kind, where the main source of infection by *Candida species* is endogenous. The most frequently isolated species is *C. albicans*, followed by *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. krusei* (Pemán & Salavert, 2012). Recently, species of the family Lythraceae were tested *in vitro* for evaluation of antifungal potential, being verified activity against *Candida* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*, with significant values of minimum inhibitory concentration (MIC) (Silva et al., 2010).

Hypertension affects about 50% of the elderly population, reaches 20% of adults and it is among the leading causes of morbidity and mortality in several countries. For to have a change, pharmacological and non-pharmacological measures should be implemented as well

as changes in lifestyle of people afflicted with this disease (Viecili et al., 2009). Some works have reported the biologic potential of *Cuphea* genus in the treatment of heart and circulatory diseases. The presence of tannins and flavonoids are linked to anti-hypertensive activity observed for inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) (Braga et al., 2000). It is important to mention some reports about the flavonoid quercetin and their influence on the reduction in the levels of systolic, diastolic and mean pressure after *in vivo* administration (Egert et al., 2010; Krepsky et al., 2010; Larson et al., 2012).

In the present study, we investigated the species *Cuphea glutinosa* Cham & Schltdl, extensively found in South of Brazil, in a characteristic region. The local population mentions the use in the form of infusion to many health benefits as diuretic, antihypertensive, cardioprotective, among others. Here, we proposed to determine the chemical composition using LC-ESI-MS and to evaluate the *in vitro* antifungal activity and the *in vivo* anti-hypertensive potential.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL

The plant material was collected between September 2012 and August 2013 in Uruguaiana (Rio Grande do Sul, Brazil), at 29 ° 39'3, 0" latitude and 56 ° 48'24, 3" longitude, in region of the Pampa biome, located at South of Brazil. The species was identified by Neves, P.O. and Schneider, A. and voucher specimens (*Cuphea glutinosa* Cham & Schlttdl; HBEI 168) were placed at HBEI Herbarium.

2.2 PREPARATION OF EXTRACTS

The plant was submitted to drying at 40°C for 5 days. After, the leaves and roots were reduced to powder in knives mill and extracted (1:1, drug:solvent) by the methods of infusion and maceration (British pharmacopoeia, 2009). For infusion, it was used distilled water at a temperature of 80°C. The exhaustive maceration was performed using hydroethanolic solution at 70% and 40% for roots and leaves, respectively.

For chromatographic assay, the extracts were filtered through filters with membrane 0.45 µm before injection. As for biological analyses the extracts were evaporated to dryness and then diluted again in water for antifungal activity tests and in 0.9% saline solution for hemodynamic testing.

For an improvement in the sample purity, for analysis in UPLC, it was performed a liquid-liquid extraction, by using the solvents affinity. To perform the extraction, we used growing order of solvents polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol).

2.3 TOTAL PHENOLIC CONTENT

The polyphenol content of the hydroethanolic extracts of *C. glutinosa* was determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method, with some modifications (Nurmi, Ossipov, Haukioja & Pihlaja, 1996). For this analysis, in a test tube were added 100 µL of sample, mixed with 500 µL of Folin-Ciocalteu reagent and added 6 mL water, stirring and leaving to stand for 1 min. After, it was added 2 mL of 15% sodium carbonate and 10 mL to complete the volume. The samples were kept at room temperature and protected from light for 30 min.

and readings were done in a Perkin Elmer UV-VIS spectrophotometer Lambda 35[®] (Norwalk, CT, USA) at a wavelength of 750 nm. The total phenolic content was expressed as milligram gallic acid equivalent per milliliter (mg GAE/mL) of each solution.

2.4 TOTAL FLAVONOID CONTENT

The total flavonoid concentration was determined by the colorimetric method described by Chang et al. (2002) with some modifications. For this determination, 500 μ L of sample was added to 25 mL volumetric flask, which was completed with the corresponding solvent. Subsequently, 500 μ L of 0.5% aluminum chloride reagent were added to flask. After maintained for 30 min. at room temperature, the samples were analyzed in a UV-VIS spectrophotometer Lambda 35[®] Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA) at a wavelength of 415nm. The rutin flavonoid was used as reference.

2.5 UPLC-MS

The chromatographic analyses were performed on an Acquity[®] UPLC system (Waters Co., MA, USA) equipped with binary solvent delivery system and autosampler. The detectors were DAD-UV and mass spectrometer EM Q-TOF Micro-Micromass (Waters Co., MA, USA). The data acquisition software employed was MassLynx v. 4.1. The assay was conducted using a reverse-phase system, employing the conditions as follow: fast C18 analytical column Shim-pack XR-ODS column (50 x 2 mm, 2.1 μ m); mobile phase consisted of mixture of acetonitrile:methanol 4:1 (v/v) and water containing 0.1% formic acid (pH 3.0 adjusted with triethylamine); DAD detection at 340 nm; injection volume of 5.0 μ L. The gradient elution employed is described in Table 1, considering a running time of 35 min.

The mass spectrometry analyses were conducted in positive-ion mode and operated according to defined conditions: collision energy 4.0 eV; temperature of electrospray source and desolvation gas 100°C and 120°C, respectively; capillary voltage 3000 V; sample cone 40 V; extraction cone 3.0 V; N₂ was used as the nebulizing. Mass spectra were recorded by using full scan mode in the range of m/z 200-800.

Table 1. Gradient elution system used for chromatographic analyses of extracts obtained from *C. glutinosa*. (A) acetonitrile:methanol, 4:1 (v/v); (B) water containing 0.1% formic acid (pH 3.0).

Time (min.) - UPLC	A (%)	B (%)
0.00 – 2.50	0	100
2.51 – 7.50	0 – 5	100 - 95
7.51 – 10.00	5 - 10	95 - 90
10.01 – 12.50	10 -15	90 - 85
12.51 – 15.00	15 - 20	85 - 80
15.01 – 17.50	20 - 25	80 -75
17.51 – 20.00	25	75
20.01 – 27.50	25 - 60	75 - 40
27.51 – 30.00	60	40
31.01 – 35.00	60 - 0	40 -100

2.6 ANTIFUNGAL ACTIVITY

2.6.1 Antifungal screening

The antifungal assay was conducted testing the infusion and maceration of leaves and roots of *C. glutinosa*. The isolates testing were *Candida glabrata* (CG 08 and CG 10), *Candida parapsilosis* (RL 36 and RL 07), *Candida tropicalis* (102 A and 72 A) and *Trichosporon asahii* (TBE 23 and TAH 09). All isolates are deposited in the Mycology Collection of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil). The isolates yeasts were grown in Sabouraud agar with chloramphenicol for 48 h at 32°C, and the filamentous isolates were incubated under the same conditions, but with the incubation period of 7 days.

The screening for antifungal activity was carried out using the broth microdilution method, according to M27-A3 and M38-A2 documents of Clinical Laboratory Standard

Institute (CLSI, 2008a,b) for yeasts and filamentous fungi, respectively. In order to obtain stock solutions (1000 µg/mL), the *Cuphea* extracts were solubilized with water. In 96-well microtiter plates, the stock solutions were diluted with Sabouraud dextrose broth (SDB) at 500 µg/mL to the screening test.

2.6.2 Minimal inhibitory concentration (MIC)

For determining the Minimal inhibitory concentration (MIC), the infusions and macerations were determined by the broth microdilution method, according to the same protocol used in filamentous fungi screening, with RPMI-MOPS (RPMI1640 medium containing l-glutamine, without sodium bicarbonate, buffered to pH 7.0 with 0.165 mol/L MOPS). The concentrations of extracts tested ranged from 1.9 to 500 µg/mL and 100 µL-aliquots were inoculated of a flat-bottom 96-well microtiter. The lowest concentration of compounds at which the microorganism tested did not demonstrate visible growth was defined as MIC. Amphotericin B kindly supplied by Cristália[®] (Brazil) was used as positive control. The experiments were carried out in triplicate.

2.7 HEMODYNAMIC PARAMETERS

The animals used were male Wistar rats (n=8) with 4 months, weighing 400g on average, descendant the Universidade Federal de Santa Maria. All animals had free access to water and food. In the experiments with animals, the study followed the legislation and ethics of animal experimentation for biomedical research in accordance with the principles recommended by CEUA (006/2013).

The Wistar rats were anesthetized with urethane (1.2 mg/kg body weight, i.p.) and underwent surgery for carotid artery catheterization. The catheters were filled heparinized solution and inserted in the carotid artery that was connected to a blood pressure transducer (Biopac Systems MP150, Inc., CA, USA). After 30 min. equipment stabilization, measurements were made recordings hemodynamic (blood pressure systolic, diastolic and mean; and heart rate).

Urethane was chosen to be used as anesthetic due to less interference in the proposed experiment. In a study by Li et al. (2014), aiming to evaluate hypotensive effects, urethane anesthesia was used. Fiorese et al. (2014), also used urethane as the anesthetic of choice, to assess hemodynamic parameters in rats after exposure to lead.

After stabilization, L-NAME 30 mg/kg body weight was administered intravenously penile injection and in intervals of 30 min the hydroethanolic extracts of the leaves of *C. glutinosa* were administered in increasing doses of 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mg/kg body weight *i.p.*. For aqueous extracts of the leaves, the doses were 10.0, 20.0 and 50.0 mg/kg of body weight rats. The leaves were utilized because they are the parts used in folk medicine and to select the dose, which was established based on a preliminary curve with doses ranging from 1 mg to 100 mg. Before administration, both extracts were diluted in 0.9% saline solution and inserted intraperitoneally in the animals.

2.8 STATISTICAL ANALYSIS

All values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The statistical parameter applied was analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey post-test (GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 CHARACTERIZATION OF PLANT AND EXTRACTS

Initially it was determined the water content in the material plant, which presented a content of 57.16% and 66.07% for leaves and roots, respectively. The hydroethanolic extracts and infusions were characterized by dry residue, total phenolic content and total flavonoids content. The results are illustrated in Table 2. As expected, the aerial parts presented the higher values in all parameters studied.

Table 2. Results of dry residue, total phenolic and flavonoids concentration in leaves and roots extracts obtained from *C. glutinosa*.

Infusion	Dry residue* (RSD%)	Total phenolic* (RSD%)	Total flavonoids* (RSD%)
Leaves	0.4412 % (8,91%)	1.8501 mg GAE/mL (4,28%)	7.0959 mg/g (1,24%)
Roots	0.1794 % (15,49%)	0.8467 mg GAE/mL (3,95%)	0.5664 mg/g (17,20%)
Hydroethanolic solutions	Dry residue	Total phenolic	Total flavonoids
Leaves	1.3262 % (1,18%)	3.7284 mg GAE/mL (0,94%)	7.9511 mg/g (6,12%)
Roots	0.6506 % (2,21%)	2.6266 mg GAE/mL (1,40%)	0.5994 mg/g (5,03%)

*The extracts were analyzed in triplicate

The phenolic compounds include a class of compounds with broad diversity in their structures, simple or complex, which contains a series of aromatic rings and hydroxyl groups (Carvalho; Gosmann; Schenkel, 2007; Coelho, 2006; Silva, 2004). These compounds are widely found in plants and their antioxidant capacity has been recognized, leading to studies on its health benefits (Schuldt, et al., 2004). According to some reports, the aerial parts of *Cuphea* have a high amount of phenolics and flavonoids (Calzada, 2005; Krepsky et al., 2012; Schuldt, et al., 2004). Recently, in a study about the species *C. carthagenensis*, Krepsky et al.

(2012) reported the presence of flavonoids, tannins and phenolic in aqueous extracts, in concentrations of 1.04%, 11.80% and 17.80%, respectively.

In a recent study by Cardenas-Sandoval et al. (2012), it was found a high concentration of total phenolic compounds and flavonoids in extracts obtained from *C. aequipetala* and *C. aequipetala* var. *hispida*, . The content of total phenolic compounds found in the leaves was 55.62 ± 0.50 and 60.74 ± 0.23 mg gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight, for *C. aequipetala* and *C. aequipetala* var. *hispida*, respectively. Similarly, flavonoids were more abundant in the leaves of *C. aequipetala* and *C. aequipetala* var. *hispida*, with values of 196.83 ± 2.94 and 124.74 ± 1.28 mg quercetin equivalents (QE)/g dry weight, respectively. They related also that the differences between flavonoids and phenolic contents in species of *Cuphea* may be due the processes of plant adaptation to environmental conditions.

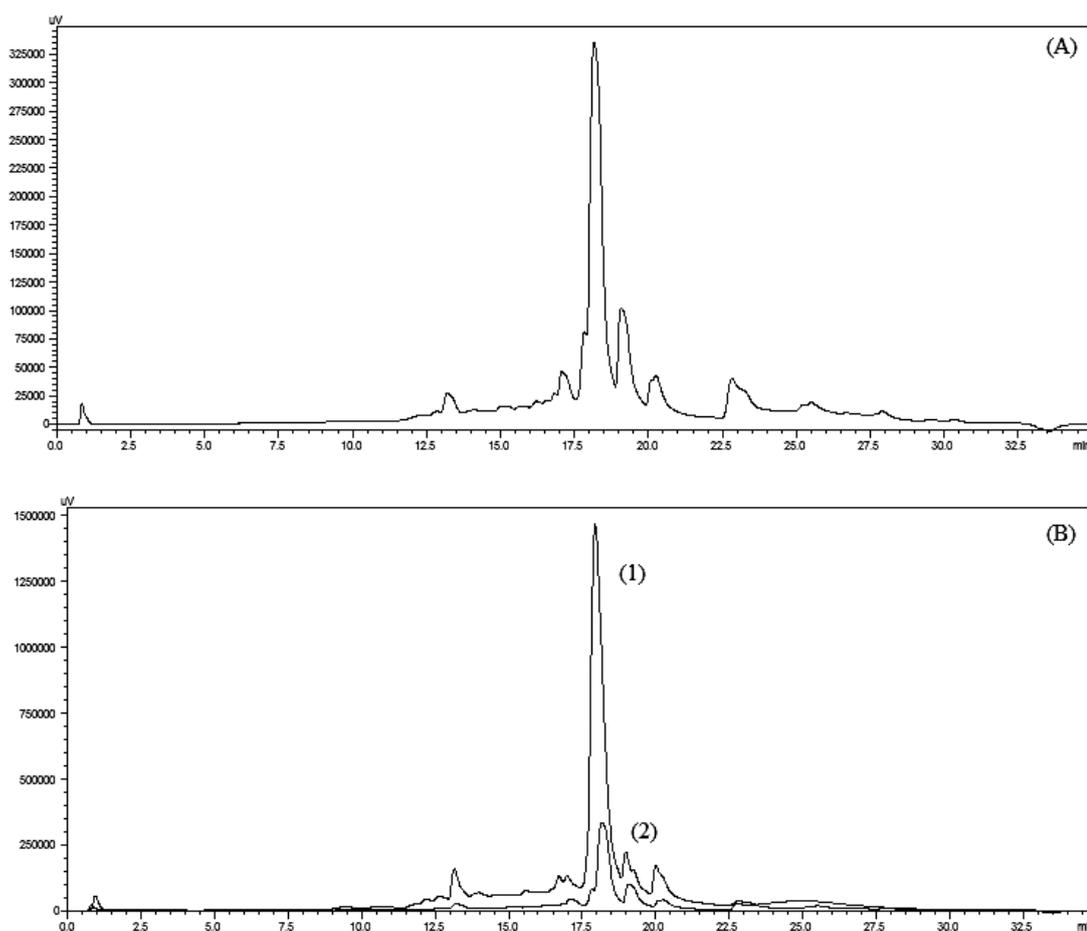
3.2 UPLC-MS

In the present work, the initial experiments were performed in order to establish the more adequate condition for detection of chemical compounds with good resolution. The chromatographic runs were monitored at 340 nm, as a reference for phenolic compounds. Different mobile phases were tested due the complexity of chemical profile and the difficulty to obtaining a great separation. The diversity of the material tested, leaves and roots, also contributed to the difficulty in establishing reproducible conditions with good separation of the compounds. Moreover, the chemical composition of *C. glutinosa* is few reported, with absence of detailed studies identifying compounds present in this species. Recently, Krepsky et al. (2012) evaluated the chemical composition of *C. carthagenensis*, being described the presence of flavonoids derivatives, in special quercetin compounds.

According to the first results, the constituents of leaf extracts were well separated, reproducing a characteristic chromatographic profile in all analyses (Figure 1). In contrast, the roots extracts could not be well determined, being excluded further chemical analysis. In order to improve the concentration of majority peaks in chromatographic profile, the hydroethanolic extracts of leaves were submitted to a purification process by liquid-liquid separation, involving affinity solvents of different polarities (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol). As seen in the Figure 1, the methanolic and ethanolic residual fractions showed higher peaks ranging 16-21 min., well separated and adequate for further

identification. Based on these results, these two fractions were submitted to analysis by mass spectrometry, with focus in flavonoids derivatives.

Figure 1. Chromatographic profile of extracts obtained from leaves of *C. glutinosa*. (A) Crude hydroethanolic extract at 40%; (B) ethanolic (1) and methanolic (2) residual fractions obtained from liquid-liquid separation. The analysis was performed by UPLC with detection at 340 nm.



The UPLC-MS analysis was focused only in the samples obtained from purification of leaves hydroethanolic extracts, considering the previous results described above. Through a detailed evaluation of the mass spectra and the respective fragments supplementary material, five different compounds could be suggested, all quercetin derivatives: quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-arabinoside, quercetin-3-glucuronide, isorhamnetin and quercetin-5-O- β -glucopiranoside. A undefined compound, containing a quercetin nucleus, was also suggested. The chemical data obtained in the MS analyses of *C. glutinosa*, retention times, quasi-molecular ions and key fragments are described in the Table 3.

Table 3. Chemical constituents of *C. glutinosa* identified by UPLC-MS, with corresponding retention times, quasi-molecular ions in positive mode and key fragments.

<i>Rt</i> (min.)	Molecular formula	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	MS fragmentation [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	Compound
16.17	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465	465, 303	Quercetin-3-O-glucoside or Quercetin-5-O-B-glucopyranoside
17.3	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	435	435, 303	Quercetin-3-Arabinoside
18	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	479	479, 303	Quercetin-3-Glucuronide
18.2	-	521	521, 303	Quercetin derivate
31.23	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317	317, 303	Isorhamnetin

The presence of phenolic compounds and flavonoids in *Cuphea* is reported in some works, with emphasis in the chemical derivatives of quercetin, kaempferol and myricetin (Santos, et al. 1995; Krepsky, 2011; Serna, et al. 2011). In the study published by Santos et al. (1995), it was verified the presence of quercetin derivatives in *Cuphea* species, such as quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-Arabinoside and isorhamnetin. Also, Santos et al. (1995) reported the presence of glucuronic acid and quercetin in this genus, being in accordance to the high abundance of the constituent quercetin-3-glucuronide found in *C. glutinosa*.

In plants, flavonoids are mostly present as glycosides, having sugar substituents bound to a hydroxyl group of the aglycone. Frequently, the most found monosaccharides in glycosidic combinations are glucose and rhamnose, however are found arabinose, xylose and glucuronic acid (Jay, Viricel, & Gonnet, 2006; Williams, 2006). Studying the molecular ion [M+H]⁺ at *m/z* 465 and the respective fragments, it is suggested the flavonoid quercetin-3-O-glucoside. This identity was established based on observations around the fragments that were lost, 162 Da, possibly representing a hexose (Cabrera, 2006; Vukics and Guttman, 2010). The same happens with the loss of 132 Da, observed in the flavonoid quercetin-3-Arabinoside, whose molecular ion [M+H]⁺ is *m/z* 435. According to Cabrera (2006), this loss is characteristic for a pentose sugar.

The molecular ion [M+H]⁺ at *m/z* 465 and the respective fragments are suggested for the flavonoid quercetin-5-O-B-glucopyranoside. With the fragments that were lost, 162 Da

that represent an hexose (Cabrera, 2006; Vukics and Guttman, 2010). For this compound the literature reports their presence in *C. carthagenensis* (Krepsky, 2011). In this case the identification was done by previous isolation and NMR characterization.

In another study with samples of raspberry, ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin were identified by LC-MS with ionization in negative ion mode. Eighteen compounds were identified, among them quercetin-3-glucoside and quercetin glucuronide. The fragment $[M-H]^-$ at m/z 301, corresponding to quercetin nucleus, was predominant (Mullen, et al. 2003).

The selectivity of the MS detection allows the resolution of multicomponent peaks. Flavonol glycosides which were observed as a single peak had isolated components in the same species of *Epilobium*, having overlapping of these two compounds. Their presence was demonstrated by the pairs of peaks $[M+H]^+$ at m/z 465, 303 and $[M+H]^+$ at m/z 479, 303 in the mass spectrum (Ducrey et al.,1995). These fragments represent the breakdown of sugars linked quercetin, forming quercetin derivatives.

As mentioned above, there are reports of glycuronic acid in the *Cuphea* genus. Here we can verify the molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 479, and the respective fragments that can suggest the presence of the flavonoid quercetin-3-glucuronide. This identity was established based on observations around the fragment that was lost, 176 Da, representing the loss an glycuronic acid (Cabrera, 2006).

3.3 ANTIFUNGAL ACTIVITY

The leaf extracts were those with a better profile antifungal activity. For most microorganisms tested, these extracts also presented the better values of minimum inhibitory concentration. For the species tested, the best MIC were: *Trichosporon asahii*, 1.9 $\mu\text{g/mL}$ for leaf maceration and infusion (TBE 23) and 1.9 $\mu\text{g/mL}$ for leaf and roots infusion (TAH 09); *Candida parapsilosis*, 7.8 $\mu\text{g/mL}$ for leaf infusion (RL 36) and 31.25 $\mu\text{g/mL}$ for leaf maceration and infusion (RL07); *Candida glabrata*, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ only for maceration the leaves (CG 08); and *Candida tropicalis*, 15.6 $\mu\text{g/mL}$ leaf maceration (102 A and 72 A). In some cases, the infusions had a better MIC values. These results can be observed in the Table 4.

Table 4. Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) observed for *C. glutinosa* extracts against emerging yeast isolated.

Isolated	MIC ($\mu\text{g/mL}$) roots infusion	MIC ($\mu\text{g/mL}$) leaf infusion	MIC ($\mu\text{g/mL}$) root maceration	MIC ($\mu\text{g/mL}$) leaf maceracion
<i>Trichosporon asahii</i>				
TBE 23	7.8	1.9	3.9	1.9
TAH 09	1.9	1.9	15.6	500
<i>Candida parapsilosis</i>				
RL 36	15.6	7.8	62.5	31.25
RL 07	62.5	31.25	62.5	31.25
<i>Candida glabrata</i>				
CG 08	> 500	> 500	> 500	62.5
CG 10	> 500	> 500	> 500	> 500
<i>Candida tropicalis</i>				
102 A	62.5	62.5	62.5	15.6
72 A	62.5	62.5	62.5	15.6

Recently, Barros et al. (2013) characterized the phenolic compounds of *Castanea sativa*, *Filipendula ulmaria* and *Rosa micrantha* flowers and also, it was performed a screening of their antifungal potential against *Candida* species. In *C. sativa* and *F. ulmaria*, hydrolysable tannins were the main group of phenolic compounds, while flavonoids were the most abundant group in *R. micrantha*. The stronger effect was by this latter against all the *Candida* species and mainly its fungicide effects in *C. glabrata*, related to the flavonoids that are present only in this species.

Due to their low susceptibility to the available antifungal therapies, it is importance to identify new compounds, especially natural ones, that are active against the most broaden spectrum of *Candida* species. Herein, *Cistus ladanifer* was explored as a source of antifungal agents, through its phenolic compounds, as phenolic acids and derivatives, ellagic acid derivatives and flavonoids. Considering flavonoids, quercetin derivatives as quercetin-3-O-glucoside were identified by comparison with a commercial standard. The extract mostly constituted by phenolic compounds explain its antifungal activity caused by *C. ladanifer*

extract against the *Candida* species. The highest antifungal activity was against *C. glabrata*, followed by *C. albicans* and *C. tropicalis*, none of the extract concentrations tested was able to reduce completely the *C. parapsilosis* growth (Barros et al., 2013). Thus, the presence of phenolic compounds may be related to the antifungal activity found in extracts of *C. glutinosa*, beyond of presence of the flavonoid quercetin-3-O-glucoside.

3.4 HEMODYNAMIC PARAMETERS

The hypertension is one critical factor of metabolic syndromes. Therapeutic control of blood pressure carries out a fundamental role in cardiovascular prevention (Collins et al., 1990). Therefore, was continued the study metabolites and antihypertensive activity in plants, searching for new treatment alternatives. To verify the antihypertensive potential, leaf extracts of *C. glutinosa* were studied. The Figures 3 and 4 show the effects of extracts in systolic blood pressure, diastolic and heart rate of animals tested.

First it was tested the aqueous extract of leaves of *C. glutinosa* (infusion), in cumulative doses 10, 20, 50 mg/kg body weight, *i.p.* In Figure 2 A and B it is possible to observe the performance of the aqueous extract of leaves regarding the dosages and time for systolic and diastolic blood pressure respectively. In Figure 2 C, we observe the heart rate of the animals in relation to dose and time. Even at the highest dose it was not observed a significant decrease in blood pressure. According to Krepsky et al. (2012) the crude extracts obtained from *C. carthagenenses* showed effects in arterial pressure of mice. However, these results were observed after seven days of treatment in normotensive animals. Here, we tested the antihypertensive effect of *C. glutinosa* applying protocols of acute assay.

Also, it was tested hydroethanolic extract of the species (maceration) in cumulative dose 2.5, 5, 10, 20 mg/kg body weight, *i.p.* In Figure 3 A and B is possible to observe the performance of the hydroethanolic extract of leaves of *C. glutinosa* regarding the dosages and time for systolic and diastolic blood pressure respectively. In Figure 3 C, we observe the heart rate of the animals in relation to dose and time.

Some studies have shown that in experiments whose treatment involves the compound quercetin exist an improvement in the cardiovascular protection, decreasing cholesterol levels and blood pressure. Also, recent studies performed on cardiac patients or populations with cardiovascular risk indicated a protective effect with quercetin supplementation. For hypertensive patients, in treatment of 28 days, it was verified a reduction in systolic, diastolic and mean arterial pressures (Edwards et al., 2007). Similarly, in other study supplementation

with 150 mg quercetin/day for 6 weeks, in an at-risk population overweight or obese subjects with metabolic syndrome traits and compared to placebo, quercetin decreased systolic blood pressure (Egert et al., 2009; Egert et al., 2010). According to Santos et al. (1995), the *Cuphea* genus presents of various flavonoids in different species of genus as derived compounds quercetin. Even with the presence of quercetin derivatives, the study species *C. glutinosa*, showed no significant decrease in blood pressure.

In a study by Larson et al. (2012), testing the acute effect of quercetin in normotensive and hypertensive adults, it was observed a reduction in systolic blood pressure, diastolic and mean. In an analysis to verify the acute effect were administered high doses of quercetin (1095 mg) because the acute administration limits metabolite accumulation, thereby necessitating a higher dose, to see the effect. The pressure measurement was performed after 10 hours of administration of quercetin. It was observed that the ingestion of quercetin aglycone reduces systolic (142 ± 9 vs 135 ± 6 mmHg), diastolic (91 ± 7 vs 88 ± 8 mmHg), and mean (108 ± 7 vs 103 ± 7 mmHg) blood pressure in hypertensive patients. Considering the reported data, we believe that quercetin doses could not be present in the extracts in the minimal quantity necessary to cause blood pressure effects.

According to Duarte et al. (2002), the effects of quercetin were also analyzed in a rat model of hypertension induced by inhibition of NO synthase with L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester). L-NAME is a non-selective inhibitor of NO synthase, i.e. it inhibits the endothelial, the inducible and the neuronal NO synthase isoforms and induces a progressive increase in arterial blood pressure. When administered simultaneously with L-NAME, 10 mg/kg quercetin fully prevented an increase in blood pressure. At 5 mg/kg p.o., it was also highly effective, though the effect developed more slowly and was only significant after four weeks of treatment.

Although the traditional use of specie *C. glutinosa* is mentioned for treatment of hypertension, and several studies have demonstrated beneficial activity compared to quercetin, the acute assay applied here did not provide significant difference in the decrease of blood pressure.

Figure 2. Dose–response of the effect of aqueous extract leaves of *Cuphea glutinosa* (10-20-50 mg/kg, i.p.) on mean arterial pressure systolic (A), diastolic (B) and heart rate (C) of rats. Data represent the mean \pm SEM of eight animals per group.

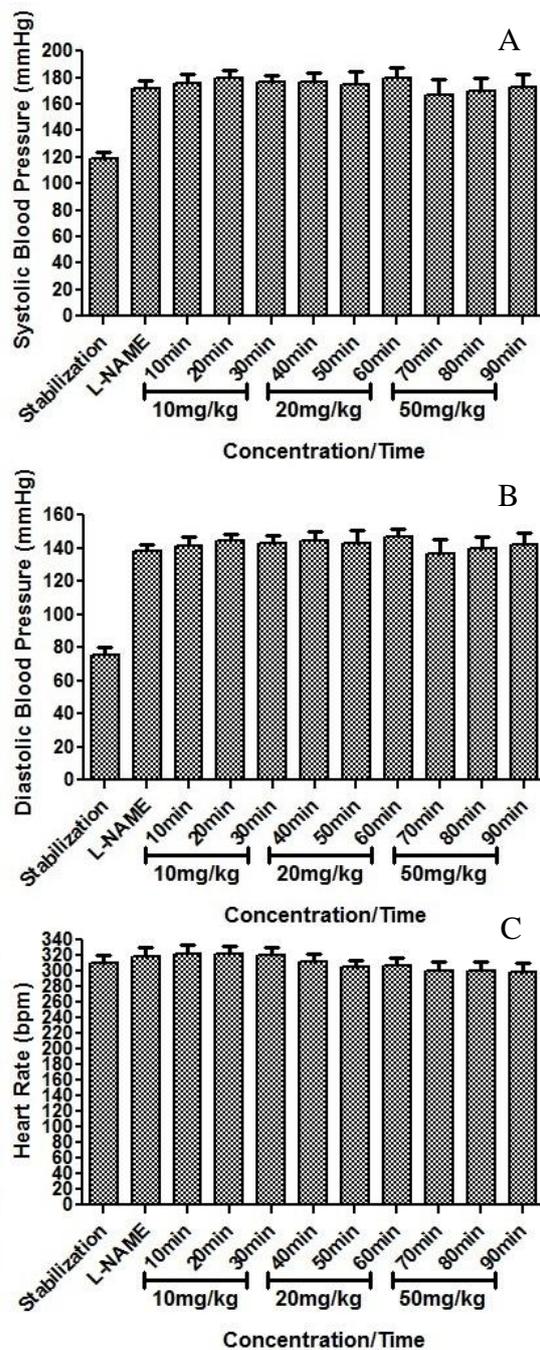
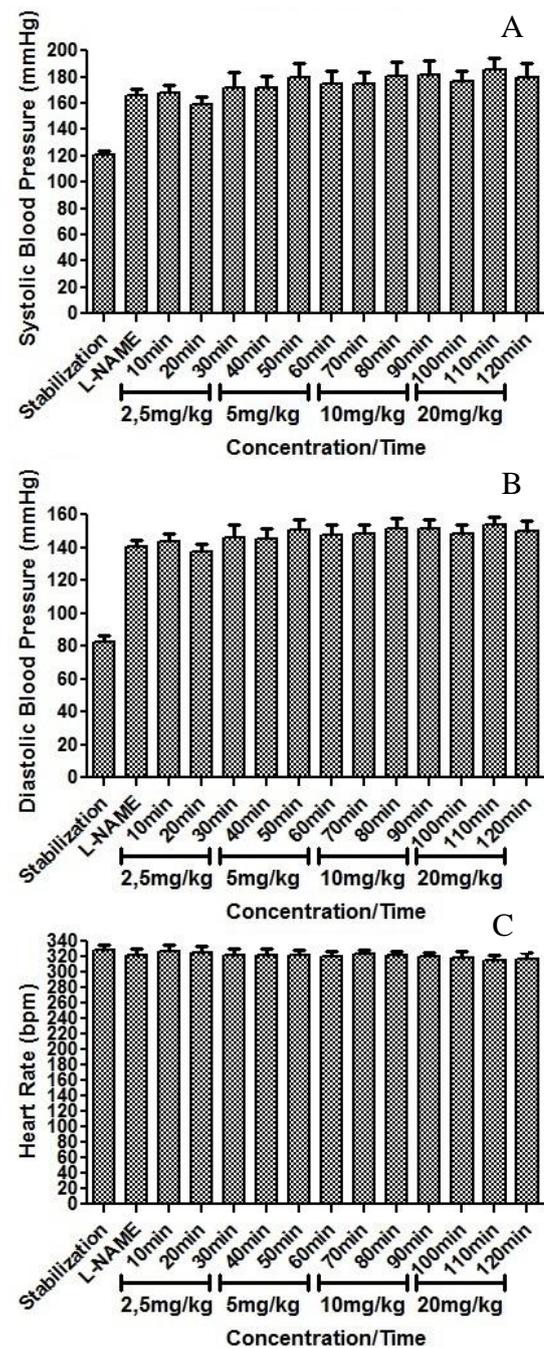


Figure 3. Dose–response of the effect of hydroethanolic extract leaves of *Cuphea glutinosa* (2.5-5-10-20 mg/kg, i.p.) on mean arterial pressure systolic (A), diastolic (B) and heart rate (C) of rats. Data represent the mean \pm SEM of eight animals per group.



4 CONCLUSIONS

The chemical composition of *C. glutinosa* is predominant in flavonoids, being identified five quercetin derivatives: quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-arabinoside, quercetin-3-glucuronide, isorhamnetin and quercetin-5-O- β -glucopiranoside. The leaves and roots extract presented *in vitro* antifungal activity against opportunistic strains, mainly *Trichosporon asahii*. The expected *in vivo* hypotensive effect was not observed in the acute models employed, showing that further studies must be done, since quercetin is known due the anti-hypertensive potential as well as other species of the genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

Barros, L.; Alves, C.T.; Dueñas, M.; Silva, S.; Oliveira, R.; Carvalho, A.M.; Henriques, M.; Buelga, C.S.; Ferreira, I.C.F.R. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Industrial Crops and Products*, 44, 104-110.

Barros, L.; Dueñas, M.; Alves, C.T.; Silva, S.; Henriques, M.; Buelga, C.S.; Ferreira, I.C.F.R. (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41, 41-45.

British Pharmacopeia. London: Stationery Office, 2009.

Braga, F.C.; Wagner, H.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. (2000). Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, 7, 245-250.

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

Calzada, F. (2005). Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research* 19, 725-727.

Cardenas-Sandoval, B.A.; López-Laredo, A.R.; Martínez-Bonfil, B.P.; Bermúdez-Torres, K.; Trejo-Tapia, G. (2012). Advances in the phytochemistry of *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* and *C. lanceolata*: Extraction and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11, 401-413.

Carvalho, J.C.T.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídeos. IN: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Eds.). (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.

Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* **10**: 178-182.

Chen, L.G.; Yen, K.Y.; Yang, L.L.; Hatano, T.; Okuda, T.; Yoshida, T. (1999). Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphiins D1 and D2, and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Phytochemistry*, 50, 307-312.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

Coelho, D.S.C. (2006). Estudo sistemático da composição química das fibras de Arundo donax e a sua evolução durante a produção de pasta de papel através do processo organosolv. Thesis of Doctorate. Universidade de Aveiro, Santiago-Portugal, 102 p.

Collins, R.; Peto, R.; MacMahon, S.; Hebert, P.; Fiebach, N. H.; Eberlein, K. A.; Godwin, J.; Qizilbash, N.; Tatlor, J. O.; Hennekens, C. H. (1990). Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Shortterm reductions in blood pressure: Overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet*, 335, 827–838.

Duarte, J.; Jimenez, R.; O’Valle, F.; Galisteo, M.; Perez-Palencia, R.; Vargas, F.; Perez-Vizcaino, F. (2002). Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens*, 20, 1843–1854.

Ducrey, B.; Wolfender, J. L.B.; Marston, A.; Hostettmann, K. (1995). Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (onagraceae) by lc-uv and thermospray LC-MS. *Phytochemistry*, 38, 129-137.

Edwards, R.L.; Lyon, T.; Litwin, S.E.; Rabovsky, A.; Symons, J.D.; Jalili, T. (2007). Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *The Journal of Nutrition*, 137, 2405-2411.

Egert, S.; Boesch-Saadatmandi, C.; Wolffram, S.; Rimbach, G.; Müller, M.J. (2010). Serum Lipid and Blood Pressure Responses to Quercetin Vary in Overweight Patients by Apolipoprotein E Genotype. *The Journal of Nutrition*, 140, 278-284.

Egert, S.; Bosy-Westphal, A.; Seiberl, J.; Kurbitz, C.; Settler, U.; plachta-danielzik, S.; Wagner, A.E.; Frank, J.; Schrezenmeir, J.; Rimbach, G.; Wolffram, S.; Müller, M.J. (2009). Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised lowdensity lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition*, 102, 1065-1074.

Fernandes, F.R.; Santos, L.A.; Arruda, A.M.S.; Pinto, L.M.C.V.; Godinho, R.O.; Torres, L.M.B.; Lapa, A.J. Souccar, C. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract and isolated *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 55-56.

Fioresi, M.; Simões, M.R.; Furieri, L.B.; Broseguini-Filho, G.B.; Vescovi, M.V.A.; Stefanon, I.; Vassallo, D.V. (2014). Chronic lead exposure increases blood pressure na myocardial contractility in rats. *Plos One*, 9, 1-9.

Graham, S.A.; Freudenstein, J.V.; Luker, M. (2006). Phylogenetic Study of *Cuphea* (Lythraceae) Based on Morphology and Nuclear rDNA ITS Sequences. *Systematic Botany*, 31, 764-778.

Jay, M.; Viricel, M.R.; Gonnet, J.F. (2006). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. *In: C-Glicosylflavonoids*. Taylor & Francis Group. London.

Krepsky, P.B.; Farias, M.R.; Côrtes, S.F.; Braga, F.C. (2010). Quercetin-3-sulfate: A chemical marker for *Cuphea carthagenensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 125-127.

Krepsky, P.B.; Isidório, R.G.; Souza Filho, J.D.; Côrtes, S.F.; Braga, F.C. (2012). Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine*, 19, 953– 957.

Krepsky, P.B. (2011). Composição química quantitativa e avaliação da potencial atividade vasodilatadora de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride. Thesis of Doctorate. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG., 211p.

Larson, A.; Witmana, M.A.H.; Guoc, Y.; Ives, S.; Richardson, R.S.; Brunoc, R.S.; Jalili, T.; Symons, J.D. (2012). Acute, quercetin-induced reductions in blood pressure in hypertensive individuals are not secondary to lower plasma angiotensin-converting enzyme activity or endothelin-1:nitric oxide. *Nutrition Research*, 32, 557-564.

Li, X.; Li, N.; Wang, Z.; Pan, J.; Han, Z.; Chang, X. (2014). The hypotensive effect of intrathecally injected (m) VD-hemopressin (α) in urethane-anesthetized rats. *Peptides*, 56, 45-51.

Lusa, M.G.; Biasi, L.A. (2011). Estaquia de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig (Lythraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13, 52-57.

Lusa, M.G.; Bona, C. (2011). Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.f. Macbr. (Lythraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 25, 517-527.

Mullen, W.; Yokota, T.; Lean, M.E.J.; Crozier, A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSn. *Phytochemistry*, 64, 617-624.

Nurmi, K.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. (1996). Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *Journal of Chemical Ecology*, 22, 2023-2040.

Pemán, J.; Salavert, M. (2012). Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30, 90-98.

Rodrigues M.M.; Santos, S.S.F.; Claro, C.A.S.; Scherma, A.P. (2009). Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do *Allium sativum* sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de cavidade bucal. *Revista Periodontia*, 19, 124-132.

Santos, D.Y.A.C.; Salatino, M.L.F.; Salatino, A. (1995). Flavonoids of Species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 99-103.

Schuldt, E.Z.; Farias, M.R.; Ribeiro-do-Valle; R.M.; Ckless, K. (2004). Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. *Phytomedicine* 11, 523-529.

Serna, J.A.M; Ríos, E.G.; Madrigal, D.; Cárdenas, J.; Salmón, M. (2011). Constituents of Organic Extracts of *Cuphea hyssopifolia*. *Sociedad Química de México*, 55, 62-64.

Silva, I.F.J.; Raimondi, M.; Zacchino, S.; Cechinel, V.F.; Noldin, V.F.; Rao, V.S.; Lima, J.C.S.; Martins, D.T.O. (2010). Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 422-428.

Silva, F.M. (2004). Verificação da eficiência dos bioensaios com extratos aquosos no diagnóstico de potencial alelopático: contribuição ao estudo de espécies nativas brasileiras. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS. 96 p.

Viecili, P.R.N.; Bündchen, D.C.; Richter, C.M.; Dipp, T.; Lamberti, D.B.; Pereira, A.M.R.; Barbosa, L.C.; Rubin, A.C.; Barbosa, E.G.; Panigas, T.F. (2009). Curva Dose-resposta do exercício em hipertensos: Análise do número de sessões para efeito hipotensor. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 92, 393-399.

Vukics, V.; Guttman, A. (2010). Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 29, 1-16.

Williams, C.A. (2006). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. *In: Flavone and Flavonol O-Glycosides*. Taylor & Francis Group. London.

Yang, B; Kortensniemi, M.; Liu, P.; Karonen, M.; Juha, P.S. (2012). Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8672-8683.

Zago, A.M.; Manfron, M.P.; Morel, A.F.; Zanetti, G.D. (2009). Morfonatomia do caule de *Cuphea glutinosa* Cham. & Schldl. (Lythraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 720-726.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou a espécie *Cuphea glutinosa*, que apresenta literatura escassa e levou a necessidade de utilizar como referencial base espécies do mesmo gênero. Foram estudados aspectos quanto à caracterização dos extratos vegetais e avaliação do seu potencial antifúngico *in vitro* e atividade anti-hipertensiva *in vivo*.

Inicialmente, foram testadas as técnicas extrativas por maceração e infusão. A extração por maceração, usando solução hidroetanólica a 40 e 70% para folhas e raízes respectivamente, apresentou resultados mais promissores em termo de conteúdo fenólico, podendo ser utilizada em trabalhos futuros. Além disso, é uma extração segura, onde não há emprego de calor, e forneceu dados de elevada concentração de compostos nos extratos obtidos (3,7284 e 2,6266 em EAG/mL de extrato para folhas e raízes, respectivamente).

Tanto o teor de fenólicos totais quanto o teor de flavonóides totais encontrados nos extratos de *C. glutinosa* apresentaram maior quantidade nas folhas. Em relação aos flavonóides, estes são acumulados principalmente em tecidos superficiais, como por exemplo, epiderme, subepiderme, pêlos, cutícula e material epicuticular, além de serem utilizados pela planta como filtros UV, pois absorvem radiação UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (BIEZA E LOUIS, 2001). Além do mais, estes dados podem estar relacionados com a relação positiva entre a radiação solar e a produção de compostos fenólicos. Tais aspectos podem ser explicados pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao dissipar e/ou absorver a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Em relação aos resultados encontrados nas análises cromatográficas e espectrométricas, a classe de compostos mais observadas na espécie *C. glutinosa* foram os flavonóides. Segundo Santos et al (1995), há uma gama enorme de flavonóides obtidos a partir das amostras de *Cuphea* (Tabela 5). Neste contexto, existe uma grande diversidade de estruturas de flavonóides, com predomínio de glicosídeos de quercetina (13 compostos). Derivados de miricetina também são comuns (oito compostos). Flavonóides como as flavonas são aparentemente raros na espécie de *Cuphea*. Além disso, é importante relatar a presença de glicosídeos de ramnetina e isoramnetina entre flavonóides neste gênero.

Tabela 5 – Flavonóides isolados das folhas de diferentes espécies do gênero *Cuphea*

Flavonóide	Espécie
Apigenina-C-glicosídeo	<i>C. acinos</i> St.-Hill; <i>C. disperma</i> Koehne
Luteolina-7-O-galactosídeo	<i>C. sclerophylla</i> Koehne
Luteolina, glicose, ácido glicurônico*	<i>C. sclerophylla</i> Koehne
Canferol-3-O-galactosídeo	<i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i>
Canferol, galactose, glicose*	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill
Canferol, galactose, ramnose*	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill
Quercetina-3-O-arabinosídeo	<i>C. adenophylla</i> T. Cav.; <i>C. disperma</i> Koehne; <i>C. cruisiana</i> Koehne; <i>C. pulchra</i> Moric; <i>C. teleandra</i> Lourt.; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina-3-O-galactosídeo	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill; <i>C. disperma</i> Koehne; <i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill; <i>C. sclerophylla</i> Koehne; <i>C. rubrovirens</i> T. Cav.; <i>C. lutescens</i> Koehne; <i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i> ; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina-3-glicosídeo	<i>C. adenophylla</i> T. Cav.; <i>C. teleandra</i> Lourt.; <i>C. lutescens</i> Koehne
Quercetina-3-glicosídeo, arabinose, glicose*	<i>C. lutescens</i> Koehne
Quercetina-3-O-galactosilgalactosídeo	<i>C. adenophylla</i> T. Cav.; <i>C. pulchra</i> Moric;
Quercetina, galactose, glicose*	<i>C. rubrovirens</i> T. Cav.; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina, galactose, ácido glicurônico *	<i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina, galactose, ramnose*	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill
Quercetina, glicose, glicose*	<i>C. sessilifolia</i> Mart.; <i>C. adenophylla</i> T. Cav.;
Quercetina, glicose, ácido glicurônico *	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Quercetina, glicose, ramnose*	<i>C. cruisiana</i> Koehne; <i>C. teleandra</i> Lourt.
Quercetina-3-O-ramnosilglicosídeo	<i>C. sessilifolia</i> Mart.; <i>C. pulchra</i> Moric
Quercetina-3-di-O-glicosilglicosídeo	<i>C. disperma</i> Koehne
Ramnetina-3-O-galactosídeo	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. rubrovirens</i> T. Cav.
Ramnetina-3-O-glicosídeo	<i>C. cruisiana</i> Koehne; <i>C. pulchra</i> Moric
Isoramnetina-3-O-arabinosídeo	<i>C. cruisiana</i> Koehne
Isoramnetina-3-O-galactosídeo	<i>C. acinos</i> St.-Hill; <i>C. cipoensis</i> T. Cav.; <i>C. teleandra</i> Lourt.
Isoramnetina-3-O-xilosídeo	<i>C. pulchra</i> Moric
Isoramnetina, glicose, ramnose*	<i>C. lutescens</i> Koehne
Miricetina-3-O-arabinosídeo	<i>C. lutescens</i> Koehne
Miricetina-3-O-galactosídeo	<i>C. cipoensis</i> T. Cav.; <i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. sperguloides</i> St.-Hill.; <i>C. lutescens</i> Koehne; <i>C. sessilifolia</i> Mart.
Miricetina-3-O-glicosídeo	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. linarioides</i> Koehne; <i>C. sclerophylla</i> Koehne
Miricetina-3-ramnosídeo	<i>C. linarioides</i> Koehne
Miricetina-3-O-arabinosilarabinosídeo	<i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i>
Miricetina, arabinose, galactose*	<i>C. lutescens</i> Koehne
Miricetina, glicose, ramnose*	<i>C. linarioides</i> Koehne
Miricetina-3-O-glicosilgalactosilgalactosídeo	<i>C. ericoides</i> Cham. & Schlechd var <i>ericoides</i>
Quercetina	<i>C. diosmifolia</i> St.-Hill.; <i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill.; <i>C. sclerophylla</i> Koehne; <i>C. cruisiana</i> Koehne
Miricetina	<i>C. pseudovaccinium</i> St.-Hill.; <i>C. pulchra</i> Moric

*Posição de ligação e sequência dos açúcares não determinada

Fonte: Santos et al. (1995).

A composição química do gênero *Cuphea*, como já citado, é bastante variável. Por outro lado a espécie *C. glutinosa* possui poucos trabalhos descritos, não havendo relatos na

literatura sobre estudos de investigação da composição química. Desta forma, os compostos sugeridos estão de acordo com os já descritos para outras espécies do mesmo gênero, tendo em vista que estas podem ser semelhantes na sua composição.

Na avaliação da atividade antifúngica, os resultados encontrados se referem aos extratos obtidos por maceração e infusão das folhas e raízes de *C. glutinosa* que foram liofilizados e rediluídos em água para a realização da técnica de microdiluição. O preparo por liofilização ocorreu devido à presença de etanol nos extratos hidroetanólicos, os quais poderiam interferir nas análises pela relatada ação antimicrobiana deste reagente.

Segundo Fagundes et al. (2008), as infecções por *Trichosporon asahii* são bastante graves, podendo apresentar uma variedade de manifestações clínicas, desde acometimento cutâneo superficial até quadros sépticos, neste caso em pacientes imunodeprimidos. Neste contexto, os resultados encontrados em relação à CIM no presente estudo demonstram uma atividade elevada para os extratos obtidos das folhas principalmente frente à *Trichosporon asahii*.

Entre os estudos realizados com flavonóides contra fungos, um novo derivado de rutina foi sintetizado através da reação de substituição nucleofílica aromática entre rutina e 2-cloro-5-(trifluorometil)-1,3-dinitrobenzeno em meio básico. As condições de reação produziu a perda da estrutura de açúcar do flavonóide para obter o composto quercetina-CF₃ com um rendimento elevado. O potencial de atividade antifúngica de rutina e quercetina-CF₃ foram comparados com as cepas de *C. albicans*. A quercetina-CF₃ foi mais eficaz do que a rutina contra *C. albicans*, indicando que este é um agente antifúngico com atividade consideravelmente mais elevada do que a rutina (TEMPESTI et al., 2012). Desta forma, pela inexistência de estudos referentes ao gênero *Cuphea*, sugere-se que a atividade antifúngica esteja relacionada a algum dos derivados de quercetina presente na espécie estudada ou mesmo à ação sinérgica de diferentes componentes presentes na matriz vegetal.

Os resultados em relação aos experimentos realizados com os extratos das folhas de *C. glutinosa* frente à atividade anti-hipertensiva não foram promissores. Entretanto, no decorrer da metodologia, em alguns animais foram observadas quedas momentâneas da pressão arterial sistólica, diastólica e média sem alteração na frequência cardíaca.

Acredita-se que os resultados encontrados possam estar relacionados pela baixa concentração de quercetina nos extratos utilizados, pois em estudo realizado com a espécie *C. carthagenensis*, para obter-se melhor extração dos componentes, utilizou-se a fração butanólica, a qual apresentou efeito hipotensor (Krepesky, 2011). No presente estudo buscou-se utilizar etanol e metanol por causa da toxicidade do butanol.

Outro fator importante a ser mencionado se referente ao período de contato dos animais com os extratos, tendo como base o ensaio agudo. Assim, pelo fato do uso popular da sete-sangrias ocorrer devido aos efeitos hipotensores, traça-se a perspectiva de realização de estudos mais aprofundados com a espécie, numa abordagem de ensaio crônico.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O material vegetal de *Cuphea glutinosa* apresenta maior concentração de água e material volátil nas raízes em comparação às folhas;
- ✓ O método extrativo por maceração exaustiva mostrou-se mais eficaz na concentração de compostos fenólicos e nas análises cromatográficas quando comparados à técnica de infusão;
- ✓ O teor de flavonóides e fenólicos totais é maior nos extratos obtidos das folhas, em comparação com os extratos obtidos de raízes;
- ✓ As análises cromatográficas por CLAE-UV/CLUE-UV e LC-ESI-MS permitiram a proposição de cinco compostos derivados de quercetina quercetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-arabinosídeo, quercetina-3-glucuronídeo, isoramnetina e quercetina-5-O- β -glucopiranosídeo;
- ✓ Os extratos das folhas e raízes de *C. glutinosa* apresentaram ação antifúngica, *in vitro*, promissora contra isolados clínicos de *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Trichosporon asahii*;
- ✓ O menor valor de CIM para a atividade antifúngica *in vitro* foi observado para o extrato obtido das folhas, por maceração e por infusão, contra isolado de *Trichosporon*;
- ✓ Os resultados encontrados nas análises hemodinâmicas, testando-se os extratos das folhas de *C. glutinosa*, não demonstraram significância quanto à diminuição da pressão arterial no estudo agudo em ratos Wistar machos.

REFERÊNCIAS

- BLAVATTI, M.W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L.M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S.N.; PRADO, S.R.T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical traits. **Journal of ethnopharmacology**, v.93, p.385-389, 2004.
- BIEZA, K.; LOIS, R. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiol.** v. 126, p. 1105-15, 2001.
- BOOI, M.; PUNT, W.; HOEN, P.P. The Northwest European Pollen Flora, 68 LYTHRACEAE. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 123, p. 163-180, 2003.
- BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, v. 7, p. 245-250, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf Acesso em: 22 fev 2014.
- CALZADA, F. Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhoea. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 725-727, 2005.
- CHANG C, YANG M, WEN H, CHERN J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **J Food Drug Anal**, v. 10, p. 178-182, 2002.
- CHEN, L.G.; YEN, K.Y.; YANG, L.L.; HATANO, T.; OKUDA, T.; YOSHIDA, T. Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphiins D1 and D2, and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 307-312, 1999.

DAN, M.; SU, M.; GAO, X.; ZHAO, T.; ZHAO, A.; XIE, G.; QIU, Y. ZHOU, M.; LIU, Z.; JIA, W. Metabolite profiling of *Panax notoginseng* using UPLC–ESI-MS. **Phytochemistry**, v. 69 p. 2237–2244.

DEZANET, A.; KREPSKY, P.B.; MATHIONI, S.M.; FARIAS, M.; NODARI, R.O. Development, biomass production and flavonoid contents in plants of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) Macbride submitted to different substrates, irrigation systems and leaf pruning. **Latin american journal of pharmacy**, v. 26, p. 51-56, 2007.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência: Construindo a historia dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-16, 2006.

DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; O'VALLE, F.; GALISTEO, M.; PEREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F.; PEREZ-VIZCAINO, F. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. **J Hypertens**, v. 20, p. 1843–1854, 2002.

EVARISTO, I.M.; LEITÃO, M.C. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, v. 2, p. 135 - 141, 2001.

FAGUNDES, J.A.A.P.; CARVALHO, R.T.; FOCACCIA, R.; FERNANDEZ, J.G.; ARAÚJO, H.B.N.; STRABELLI, T.M.V.; KOPEL, L.; LAGE, S.G. Emergência de Infecção por *Trichosporon Asahii* em Pacientes Portadores de Insuficiência Cardíaca em Unidade de Terapia Intensiva Cardiológica. Relato de Caso e Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, p. 106-109, 2008

FARIAS, M.R.; DAROS, M.R.; SIMAS, M.E.; CKLESS, K.; SCHULDT, E.Z.; RIBEIRO-DO-VALE, R.M. Isolamento e identificação de quercetina-3-sulfato, constituinte antioxidante de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) McBride. In: XV SIMPOSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1998, Aguas de Lindoia. **Programa e Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p.125. 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA. 5ª ed. V. 1. Brasília, 2010.

FEIJÓ, A.M.; BUENO, M.E.N.; CEOLIN, T.; LINCK, C.L.; SCHWARTZ, E.; LANGE, C.; MEINCKE, S.M.K.; HECK, R.M.; BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.50-56, 2012.

FERNANDES, F.R.; SANTOS, L.A.; ARRUDA, A.M.S.; PINTO, L.M.C.V.; GODINHO, R.O.; TORRES, L.M.B.; LAPA, A.J. SOUCCAR, C. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract and isolated *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 55-56, 2002.

FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; SILVA, A.C. DA; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; ALMEIDA, M.T.R. DE; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMOES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 374-378, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabolitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

GONZALEZ, A.G.; VALENCIA, E.; EXPOSITO, T.S.; BARRERA, J.B.; GUPTA, P. Chemical components of *Cuphea* species: carthagenol: a new triterpene from *C. carthagenensis*. **Planta medica**, v. 60, p. 592-593, 1994.

GRAHAM, S.A.; HALL, J.; SYTSMA, K.; SHI, S.H. Phylogenetic analysis of the Lythraceae based on four gene regions and morphology. **International journal of plant sciences**, v. 166, n. 6, p. 995-1017, 2005.

GRAHAM, S.A.; FREUDENSTEIN, J.V.; LUKER, M. Phylogenetic Study of *Cuphea* (Lythraceae) Based on Morphology and Nuclear rDNA ITS Sequences. **Systematic Botany**, v. 31, p. 764-778, 2006.

HAINING, Q.; GRAHAM, S.; GILBERT, M.G. Lythraceae. Disponível em: <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume13/Lythraceae.pdf>. Acesso em 23 fev 2014.

KREPSKY, P.B.; FARIAS, M.R.; CÔRTEZ, S.F.; BRAGA, F.C. Quercetin-3-sulfate: A chemical marker for *Cuphea carthagenensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 125-127, 2010.

KREPSKY, P.B.; ISIDÓRIO, R.G.; SOUZA FILHO, J.D.; CÔRTEZ, S.F.; BRAGA, F.C. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. **Phytomedicine**, v. 19, p. 953– 957, 2012.

KREPSKY, P.B. Composição química quantitativa e avaliação da potencial atividade vasodilatadora de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG., 211p., 2011.

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

LITTLE, S.A.; STOCKEY, R.A.; KEATING, R.C. *Duabanga*-like leaves from the middle eocene princeton chert and comparative leaf histology of lythraceae sensu lato. **American Journal of Botany**, v. 91, p 1126-1139, 2004.

LUBIAN, C.T.; TEIXEIRA, J.M.; LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; DEL PINO, F.A.B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p. 157-162, 2010.

LUSA, M.G.; BIASI, L.A. Estaquia de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig (Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 52-57, 2011.

LUSA, M.G.; BONA, C. Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.f. Macbr. (Lythraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 517-527, 2011.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MELAZZO, A.F.O. & OLIVEIRA, P.E. *Cuphea melvilla* Lindlay (Lythraceae): uma espécie do Cerrado polinizada por beija-flores. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 281-289, 2012.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 466-476, 2007.

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

PELLISSARI, G. P. Estudo Farmacognóstico e Avaliação das Atividades Antibacteriana e Imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) Dc. (Asteraceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara/SP. 178 p., 2008.

PEREZ-CASTORENA, A.L.L.; MALDONADO, E. Triterpenes and flavonoids glycosides from *Cuphea wrightii*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 31, p. 331-334, 2003.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

RODRIGUES M.M.; SANTOS, S.S.F.; CLARO, C.A.S.; SCHERMA, A.P. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do *Allium sativum* sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de cavidade bucal. **Revista Periodontia**, v. 19, p. 124-132, 2009.

ROCKENBACH, I.I. Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).

Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis/SC. 112 p., 2008.

SANGITA, K.; AVIJIT, M.; RUPA, M.; SHILÁ, P. *In vitro* antifungal activity of the methanolic extract of the leaves *Lagerstroemia parviflora* (Roxb.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, p. 249-251, 2010.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATLNO, M.L.F.; SALATLNO, A. Flavonoids of Species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, p. 99-103, 1995.

SCHULDT, E.Z.; CKLESS, K.; SIMAS, M.E.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO, V.; ROSA, M. Butanolic Fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride Relaxes Rat Thoracic Aorta Through Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 35, p. 234-239, 2000.

SCHULDT, E.Z.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLEA; R.M.; CKLESS, K. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. **Phytomedicine**, v. 11, p. 523-529, 2004.

SERNA, J.A.M; RÍOS, E.G.; MADRIGAL, D.; CÁRDENAS, J.; SALMÓN, M. Constituents of Organic Extracts of *Cuphea hyssopifolia*. **Sociedad Química de México**, v. 55, p. 62-64, 2011.

SILVA, I.F.J.; RAIMONDI, M.; ZACCHINO, S.; CECHINEL, V.F.; NOLDIN, V.F.; RAO, V.S.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 422-428, 2010.

SILVA, P. Princípios farmacológicos da antibioticoterapia. In: SILVA, P. Farmacologia. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.931-948. 1998

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J., J.; GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC Method Development**, John Wiley and Sons, New York, 1997, p. 110.

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

SOUZA, P. Curva Dose-resposta do exercício em hipertensos: Análise do número de sessões para efeito hipotensor. Curitiba, 2010.

TAN, H.P.; LING., S.K.; CHUAHA, C.H. Characterisation of Galloylated Cyanogenic Glucosides and Hydrolysable Tannins from Leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. **Phytochemical Analystis**, 2010.

TEMPESTI, T.C.; ALVAREZ, M.G.; ARAÚJO, M.F., CATUNDA J, F.E.A.; CARVALHO , M.G. DURANTINI, E.N.. Antifungal activity of a novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group on *Candida albicans*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 2217–2222, 2012.

VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA, Série Botânica**, v. 61, p. 83-103, 2006.

VIECILI, P.R.N.; BÜNDCHEN, D.C.; RICHTER, C.M.; DIPP, T.; LAMBERTI, D.B.; PEREIRA, A.M.R.; BARBOSA, L.C.; RUBIN, A.C.; BARBOSA, E.G.; PANIGAS, T.F. Curva Dose-resposta do exercício em hipertensos: Análise do número de sessões para efeito hipotensor. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, p. 393-399, 2009.

VIZCAINO, F.P.; DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; BUELGA, C.S.; OSUNA A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 67–75, 2009.

WANG, C.-C.; CHEN, L.-G.; YANG, L.-L. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Cancer letters**, v. 140, n. 1-2, p. 195-200, 1999.

YAGUEDDÚ, C.; COMPARATORE, V.M.; CARDINALI, F.J.; TOSTO, A.C.M.; BEVACQUA, S.V. *Cuphea glutinosa* (Lythraceae) en sierras del sistema de Tandilia: Morfología y Ambiente. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 41, p. 285-292, 2006.

YANG, B; KORTESNIEMI, M.; LIU, P.; KARONEN, M.; JUHA, P.S. Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8672-8683, 2012.

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

ZAGO, A.M.; MANFRON, M.P.; MOREL, A.F.; ZANETTI, G.D. Morfonatomia do caule de *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltld. (Lythraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 720-726, 2009.

ZAGO, A.M.; MANFRON, M.P.; MOREL, A.F.; ZANETTI, G.D. Estudo morfoanatômico das folhas de *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltld., Lythraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 506-512, 2010.

ANEXO A – Certificado de aprovação de protocolo para uso de animais em pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RS, S.M.
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **006/2013**

Título: **ESTUDO DA ESPÉCIE VEGETAL CUPHEA GLUTINOSA: DESENVOLVIMENTO
DE PREPARAÇÕES EXTRATIVAS, DETERMINAÇÃO POR CLAE E AVALIAÇÃO
HEMODINÂMICA IN VIVO**

Data da aprovação: **09/05/2013**

Período de vigência do projeto: De: **05/2013** Até: **05/2016**

Pesquisador: **ANDREAS SEBASTIAN LOUREIRO MENDEZ**

Campus: **URUGUAIANA**

Telefone: **55 96011850**

E-mail: **andreaslmendez@yahoo.com.br**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luiz E. Henkes'.

Luiz E. Henkes
Professor Adjunto
Coordenador do CEUA/Unipampa