



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO

EDJA ELIZA DE SOUZA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*
DE *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE (Amaranthaceae)

Petrolina-PE

2013

EDJA ELIZA DE SOUZA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
ALTERNANTHERA BRASILIANA (L.) KUNTZE (Amaranthaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais.

Orientadora: Prof. Dra. Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo

Petrolina-PE

2013

EDJA ELIZA DE SOUZA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
ALTERNANTHERA BRASILIANA (L.) KUNTZE**

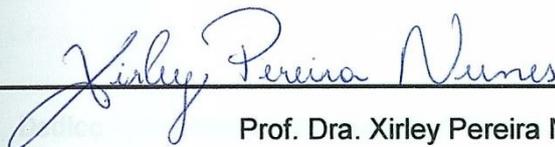
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais.

Aprovada: 02 de Dezembro de 2013.



Prof. Dra. Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo

(Orientadora – UNIVASF)



Prof. Dra. Xirley Pereira Nunes

(1º Examinadora – UNIVASF)



Prof. Dra. Gizelle Ângela Barroso Vieira

(2º Examinadora - IF Sertão Pernambuco)

**Dedico este trabalho ao meu Avô Pedro, aos meus pais, filhos, esposo,
familiares, minha orientadora
e a todas as pessoas que de alguma forma
colaboraram e incentivaram para que
eu alcançasse o tão sonhado objetivo.**

Agradecimento

Em primeiro lugar a Deus por me dar mais uma oportunidade, saúde, força e sabedoria para chegar até aqui e confiar a mim esta grande missão. Sem sua presença nada disso seria possível, principalmente nos maiores obstáculos pude perceber que a fé me fez forte para superá-los.

A toda minha família, em especial ao meu Avô Pedro Ricardo, que sempre me mostrou o melhor lado da vida, obrigada pelos ensinamentos. Aos meus pais, Francisco de Assis (*in memoriam*) e Minha Mãe Maria das Dores, a quem sempre serei grata por ter chegado até aqui e meu irmão Pedro, que sempre estiveram juntos comigo nos momentos bons e ruins.

Ao meu filho Mateus, que me acompanhou nesta caminhada com muita paciência e carinho. E a Júlia, que são meus maiores inspiradores nessa tão sonhada jornada.

Ao meu esposo Gleison que esteve sempre ao meu lado me dando muito apoio e incentivo para eu construir meu sonho.

À prof^a. Dr^a Edigênia Cavalcante, meu agradecimento e admiração por ter me proporcionado, desde o início de minha formação, uma atenção especial sendo muitas vezes mais que orientadora, se tornando uma amiga e, em diversas situações, representando uma segunda mãe, dando-me a força e estímulo necessários para que prosseguisse em busca do meu ideal.

Ao Prof^o Dr^o Jackson Roberto por ter colaborado para realização desta dissertação em seu laboratório de Bioquímica e as técnicas do laboratório Amanda e Ana Paula com o auxílio nos testes das atividades.

Aos professores do curso de Pós-graduação pelos conhecimentos compartilhados durante minha formação, disponibilidade e atenção.

Ao HVASF, em especial ao Duílio Paulino de Souza, pela identificação botânica, pela preparação da exsicata e pelo apoio.

À “coração”, aluna, colega e principalmente, amiga Camila Araújo pelos inúmeros gestos e palavras de carinho e preocupação.

Aos colegas da pós-graduação pelo tempo que deixaram de realizar seus trabalhos para me dar alguns minutos de atenção, e dividiram comigo conhecimento e amizade, Anilson, Camila, Fernanda, Juliane, Jusciene, Keidy, Raquel, Tâmara e Maria de Fátima.

Em especial aos amigos Amanda, Ana Paula, Camila, Grasielly, Júnior, Larissa e Suzana, que conviveram comigo no laboratório de Bioquímica tornando as horas de trabalho momentos de descontração e demonstração de companheirismo, amizade, incentivo quando, por muitas vezes, todo o conhecimento e empenho pareciam lutar contra nossos ideais, muito obrigada a todos vocês por ter me ajudado muito, principalmente pela amizade demonstrada e ser meu ombro nos momentos em que mais precisei de ajuda.

Ao Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME), em especial a Amanda Leite, Ana Paula, Alessandra Marques, Grasielly Rocha, Larissa Macedo, Raimundo Júnior, pelo auxílio nos experimentos realizados e amizade.

A Alessandra Marques pelo auxílio na atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho pelo auxílio na identificação do esteroide glicosilado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Certeza

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

Resumo

Silva, E.E.S. **ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DA ESPÉCIE *ALTERNANTHERA BRASILIANA* (L.) KUNTZE (Amaranthaceae)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido – Área de concentração: Farmácia), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2013.

Esta dissertação relata o estudo Fitoquímico das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amarantaceae) coletadas na cidade de Petrolina-Pernambuco-Brasil, onde é conhecida popularmente como Benzetacil e Terramicina. Este estudo visou à identificação de metabólitos secundários existentes em *A. brasiliana* e a aplicação de testes de atividade Antioxidante, Fotoprotetora e Antibacteriana, além da determinação de Fenóis Totais e Flavonoides Totais. Para o estudo fitoquímico fez-se uso de técnicas cromatográficas como Cromatografia em Coluna e Cromatografia em Camada Delgada. Análises de RMN-¹H e RMN-¹³C e LC-MS em modo ESI positivo, foram utilizadas na identificação dos compostos. Auxiliando esta investigação encontram-se relatos científicos os quais são fundamentais na identificação das substâncias isoladas. Os testes foram realizados *in vitro*, empregando espectrofotômetro para leitura e posterior interpretação dos resultados. O estudo Fitoquímico da fase Hexânica de *Alternanthera brasiliana* (L.) kuntze resultou no isolamento do esteroide (β -Sitosterol Glicosilado). O estudo metabolômico resultou na identificação de três flavonoides glicosilados presentes no Ab-EEB e na fase Ab-AcOEt. Os testes de atividade antioxidante usando dois modelos, o do DPPH e do β -Caroteno, revelou que a fase Ab-AcOEt apresentou excelente atividade captadora de radicais livres com um valor de IC₅₀ de 28,90 \pm 1,03 μ g/ml. Já no segundo modelo, o da inibição da co-oxidação do β -caroteno a amostra mais ativa foi Ab-Hex com a percentagem da atividade antioxidante de 81,82 \pm 15,91 %. A partir do ensaio de fenóis totais, verificou-se que Ab-AcEOt apresentou maior teor de fenóis totais (16,40 \pm 34,12), seguido do Ab-EEB (81,77 \pm 2,08) e em seguida por Ab-CHCl₃ (72,43 \pm 2,89). Através do experimento de flavonoides totais podemos conjecturar que aproximadamente 50% do conteúdo

fenólico deve corresponder a metabólitos secundários da classe dos flavonoides. Quanto a atividade antibacteriana, as amostras apresentaram efeito bastante significativo frente às bactérias *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*. Na determinação do CIM o extrato etanólico bruto (Ab-EEB) e a fase clorofórmica (Ab-CHCl₃) foram as que mostraram perfil antibacteriano mais satisfatório em relação a outras frações. Na avaliação da atividade fotoprotetora a fase Ab-AcEOt se destacou apresentando bandas de absorção características nas regiões de UVC, UVB e UVA e FPS em torno de 11, levando em consideração essa informação, o Ab-AcOEt pode ser considerado um fotoprotetor.

Palavras-Chave: *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, estudo fitoquímico, atividade biológica.

Abstract

Silva, E.E.S. **ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DA ESPÉCIE *ALTERNANTHERA BRASILIANA* (L.) KUNTZE (Amaranthaceae)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido – Área de concentração: Farmácia), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2013.

This paper reports the Phytochemical study of the aerial parts of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae) collected in the city of Petrolina, Pernambuco, Brazil, where it is popularly known as Benzetacil and Terramycin. This study aimed to identify existing secondary metabolites in *A. brasiliana* and application testing activity antioxidant, antibacterial and sunscreen, and the determination of Total Flavonoids and Total Phenols. For the phytochemical study made use of chromatographic techniques such as column chromatography and thin layer chromatography. ¹H-NMR analysis and ¹³C-NMR and LC-MS in positive ESI mode were used to enable the identification of individual compounds. Is helping research are scientific reports which are essential in identifying the substances isolated. The tests were performed in vitro, using a spectrophotometer for reading and subsequent interpretation of the results. Phytochemical study of the hexane phase of *Alternanthera brasiliana* (L.) kuntze resulted in the isolation of the steroid (β -glycosylated Sitosterol). The metabolomic study resulted in the identification of three flavonoid glycosides present in EEB and phase AcOEt. The antioxidant activity tests using two models, the DPPH and of β -carotene showed that the phase Ab-AcOEt showed excellent free-radical scavenging activity with an IC₅₀ value of 28.90 \pm 1.03 g/ml. In the second model, the inhibition of the co-oxidation of β -carotene sample was more active Ab-Hex with the percentage of antioxidant activity of 81.82 \pm 15.91 %. From the test Phenols Overall, we found that Ab-AcEOt showed higher total phenolic content (16.40 \pm 34.12), followed by Ab-EEB (81.77 \pm 2.08) followed by Ab-CHCl₃ (72.43 \pm 2.89). Through the experiment of total flavonoid may conjecture that approximately 50% of the phenolic content must match the class of secondary metabolites of flavonoids. In antibacterial activity, the samples showed very effect primarily on the bacteria *B. Cereus*, *E. coli* and *S. Aureus*. In determining the CIM crude ethanol extract (Ab-EEB) and the chloroform phase (Ab-CHCl₃) were those that showed antibacterial

profile more satisfactory compared to other fractions. In evaluating the photoprotective activity phase Ab-AcEOt stood presenting characteristic absorption bands in the regions of UVC, UVB and UVA and FPS around 11, taking into account this information, the Ab-AcOEt can be considered a sunscreen.

Keywords: *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, phytochemistry, biological activity.

Lista ilustração

Figura 1. Distribuição dos biomas.....	25
Figura 2. <i>Alternanthera brasiliana</i> Kuntze, planta conhecida comumente em Petrolina por “benzetacil e terramicina”	40
Figura 3. Canferol 3 – O – Rutinosídeo.....	41
Figura 4. Canferol 3 – O – Robinobiosídeo.....	42
Figura 5. Formação de triterpenos e esteroides em plantas.....	44
Figura 6. Esqueleto básico dos flavonoides.....	45
Figura 7. Representação dos núcleos fundamentais de algumas classes de flavonoides.....	46
Figura 8. Antioxidantes Sintéticos (1) BHA, (2) BHT, (3) TBHQ, (4) TBHQ e (5) GP.....	50
Figura 9. Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....	55
Figura 10. Exsicata de <i>Alternanthera brasiliana</i> kuntze.....	65
Figura 11. Estrutura do β -sitosterol glicosilado.....	80
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de Ab-1 (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	83
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C de Ab-1 (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	84
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H de Ab-1 (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	86
Figura 15. Espectro de expansão de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Ab-1, expansão da região 0,5 a 5,5 ^1H e 65 a 145 ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz).....	87
Figura 16. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Ab-1 (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	88
Figura 17. Expansões do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	89
Figura 18. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de Ab-1 (DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz).....	91

Figura 19. Cromatogramas de Ab-EEB (A) e Ab-AcOEt (B) obtidos após análise CLAE-DAD.....	94
Figura 20. Estrutura da 2''-O-ramnosil vitexina.....	95
Figura 21. Espectros de massas de Ab-2 obtidos através de CLAE-DAD-ESI-MS/MS.....	96
Figura 22. Possíveis caminhos de fragmentação para Ab-2.....	97
Figura 23. Estrutura da 4', 5, 7-trimetoxi-2''-O-ramnosil vitexina.....	98
Figura 24. Espectros de massas de Ab-3 obtidos através de CLAE-DAD-ESI-MS/MS.....	99
Figura 25. Possíveis caminhos de fragmentação para Ab-3.....	100
Figura 26. Estrutura da Ligustroflavona.....	101
Figura 27. Espectros de massas de Ab-4 obtidos através de CLAE-DAD-ESI-MS/MS.....	102
Figura 28. Possíveis caminhos de fragmentação para Ab-4.....	103
Figura 29. Absorção espectrofotométrica dos extratos secos das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze.(260 – 400 nm).....	109
Figura 30. Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> dos extratos secos das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze.....	110

Lista de tabela

Tabela 1. Gradiente usado na CLAE.....	70
Tabela 2. Dados do fracionamento Cromatográfico de Ab-Hex.....	72
Tabela 3. Dados de RMN de ¹³ C (125 MHz) para Ab-1 em DMSO-d ₆ e comparação com os dados de RMN de ¹³ C da literatura (C ₅ D ₅ N) (KOJIMA et al., 1990).....	81 e 82
Tabela 4. Sinais de correlação observados no mapa de contorno HSQC obtidos para Ab-1.....	90
Tabela 5. Substâncias identificadas nas amostras analisadas por CLAE-DAD-ESI-MS e os respectivos tempos de retenção na coluna.....	93
Tabela 6. Dados comparativos dos picos de fragmentação observados nos espectros de massas com a literatura Colombo et al.,(2008).....	96
Tabela 7. Picos de fragmentação e possíveis íons observados nos espectros de massas de Ab-3.....	99
Tabela 8. Picos de fragmentação e possíveis íons observados nos espectros de massas (EM/EM2) de Ab-4.....	102
Tabela 9. Determinação de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FlaT) de Ab-EEB, fases (Ab-Hex, Ab-CHCl ₃ , Ab-AcOEt) <i>A. brasiliana</i>	104
Tabela 10. Determinação de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FlaT) e atividade antioxidante <i>in vitro</i> de Ab-EE, Ab-Hex, Ab-CHCl ₃ , Ab-AcOEt e dos padrões ácido ascórbico, BHA e BHT.....	105
Tabela 11. Atividade Antibacteriana de extratos e fases de <i>Alternanthera brasiliana</i>	107

Lista de Quadro

Quadro 1. Distribuição de gêneros da família Amaranthaceae que ocorrem no Brasil nas respectivas tribos Celosieae, Achyrantheae e Gomphereneae	30
Quadro 2. Espécies da família Amaranthaceae estudadas quanto à atividade antioxidante.....	31 e 32
Quadro 3. Principais classes de produtos naturais identificados em espécies do gênero <i>Alternanthera</i> (Gomphereneae, Amaranthaceae).....	33 e 34
Quadro 4. Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Alternanthera</i>	36 a 39
Quadro 5. Aplicações de técnicas hifenadas na área de plantas medicinais.....	58 e 59
Quadro 6. Interfaces para LC-MS.....	60 e 61

Lista de fluxograma

Fluxograma 1. Fluxograma de obtenção e fracionamento de Ab-EEB das partes aéreas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	68
Fluxograma 2. Fluxograma da obtenção de Ab-1.....	73

Lista de abreviaturas e/ou siglas

Ab- AcOEt: Fase Acetato de Etila

Ab-1: *Alternanthera brasiliana* amostra 1

Ab-2: *Alternanthera brasiliana* amostra 2

Ab-3: *Alternanthera brasiliana* amostra 3

Ab-4: *Alternanthera brasiliana* amostra 4

Ab-CHCl₃: Fase clorofórmica

Ab-Hex: Fase Hexânica

AcOEt: Acetato de Etila

AlCl₃: Cloreto de Alumínio

APT: Attached Proton Test

B. cereus: *Bacillus cereus*

BHA: Butil-hidroxi-anisol

BHT: Butil-hidroxi-tolueno

C5D5N:

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CC: Cromatografia em Coluna

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CE₅₀: Concentração Efetiva em Cinquenta por cento

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de Diodos

COSY: Correlation Spectroscopy

d: dubleto

dd: duplo dubleto

DMSO:

DPPH: 2,2- difenil-1-picril-hidrazila

E.coli: Escherichia coli

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EIMS: Electronic Impact Mass Spectroscopy

EM/EM2:

ESI- MS/MS: Ionização por Eletrospray acoplada à espectrometria de massa

EtOH: Etanol

FlaT: Flavonoides Totais

FPS: Fator de Proteção Solar

FT: Fenóis Totais

GP: Galato de propila

Hex.: Hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance

HSQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HZ: Hertz

J: constante de acoplamento

m: multiplete

MeOH: Metanol

MHz:

Na₂CO₃ : Carbonato de Sódio

NaNO₂ : Nitrito de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

OMS: Organização Mundial da Saúde

ppm: partes por milhão

R_f: Retention factor (Fator de retenção)

RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

S.aureus: Staphylococcus aureus

s: singleto

t: tripleto

TBHQ: Terc-butil-hidroxi-quinona

THBP: Tri-hidroxi-butil-fenona

TMS: Tetrametilsilano

δ : Deslocamento químico

Sumário

1.INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
3.1. Considerações sobre a família <i>Amaranthaceae</i>	29
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Alternanthera</i>	32
3.3. Considerações sobre a espécie <i>Alternanthera brasiliana</i>	39
3.4. Considerações gerais sobre terpenoides e esteroides.....	43
3.5. Considerações gerais sobre flavonoides.....	45
3.5.1 Aspectos químicos.....	45
3.5.2 Atividade biológica dos Flavonoides.....	47
3.6. Considerações sobre atividade antioxidante.....	48
3.7. Considerações sobre atividade antimicrobiana.....	51
3.8. Considerações sobre atividade fotoprotetora.....	52
3.9. Espectrometria de Massas.....	53
3.9.1 Fundamentos da Espectrometria de Massas.....	53
3.9.2. Métodos de Ionização.....	55
3.10. Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS).....	56
3.11. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais.....	57
3.11.1 LC-MS e LC-MS -MS.....	59
3.11.2 Algumas aplicações das técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais.....	62
4. PARTE EXPERIMENTAL	63

4.1. Coleta e Identificação do material vegetal.....	64
4.2. Processamento do material botânico para obtenção dos extrato etanólico bruto (Ab-EEB).....	66
4.3. Obtenção e fracionamento dos extrato etanólico bruto (Ab-EEB).....	66
4.4. Métodos de análise.....	69
4.4.1. Métodos cromatográficos.....	69
4.4.2. Métodos espectrofotométricos.....	69
4.4.3. Métodos espectrométricos.....	69
4.4.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos (CLAE-DAD) Acoplada a Espectrometria de Massas (IES-EM).....	70
4.5. Fracionamento cromatográfico de Ab-Hexano.....	71
4.6. Determinação do teor de fenóis totais.....	74
4.7. Determinação do teor de flavonoides totais.....	75
4.8. Avaliação da atividade antioxidante.....	75
4.8.1 Teste do sequestro do radical livre DPPH	75
4.8.2. Teste da inibição da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido Linoleico.....	76
4.9. Avaliação da atividade antibacteriana.....	77
4.10. Avaliação da atividade fotoprotetora.....	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1. Caracterização estrutural de Ab-1.....	80
5.2. Análise através das técnicas CLAE-DAD-IES-EM	93
5.2.1 Proposta estrutural para Ab-2.....	95
5.2.2 Proposta estrutural para Ab-3.....	98
5.2.3 Proposta estrutural para Ab-4.....	101

5.3. Fenóis totais e flavonoides totais.....	104
5.4. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	104
5.5. Atividade antibacteriana.....	106
5.6. Atividade fotoprotetora.....	108
6. CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	114
APÊNDICE.....	126

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

As plantas são utilizadas desde os primórdios da civilização para tratamento e cura de enfermidades, o que propiciou uma das bases mais importantes para o nascimento da medicina. Estas têm contribuído significativamente para o fortalecimento da indústria farmacêutica, através do isolamento de substâncias bioativas, cuja complexidade de muitas estruturas químicas inviabilizaria técnica e economicamente a síntese orgânica de tais substâncias (CECHINEL; YUNES 2001; NIERO et al, 2003).

Muitas das propriedades terapêuticas das plantas são relatadas pela população, as quais são confirmadas em sua maioria, nos estudos científicos, comprovando a importância da pesquisa etnofarmacológica. Tais propriedades propiciaram o desenvolvimento de vários medicamentos, sejam estes obtidos por síntese a partir de molécula protótipo ou através de isolamento, algumas vezes, biomonitorado (MACIEL et al, 2002; HOSTETTMANN et al, 2003).

Devido a todos estes aspectos, vê-se um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais, objetivando fins terapêuticos, aliadas à boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e as altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos, observada na última década (MACIEL et al, 2002; NIERO et al, 2003; HEINRICH, 2000; RATES, 2000).

O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em seis biomas distintos (NOLDIN et al., 2006).

A busca por substâncias químicas capazes de prevenir e curar enfermidades vem desde os primórdios da existência humana. O homem sempre buscou na natureza o uso de vegetais para o tratamento de muitas doenças. A cura através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de uso dos produtos naturais (JUNIOR; BOLZANI, 2006).

De acordo com Lorenzi e Matos (2002), para as plantas serem utilizadas com fins terapêuticos, devem ser selecionadas de acordo com a sua eficácia e segurança de uso, ou seja, cientificamente validadas como medicinais. Para

uma planta ser validada, deve responder positivamente à aplicação de um conjunto de ensaios biológicos ou farmacológicos capazes de comprovar a existência da propriedade terapêutica que lhe é atribuída, bem como seu grau de toxicidade nas doses compatíveis com emprego medicinal. A transformação de uma planta em medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação farmacológica e segurança de seu uso, além de valorizar seu potencial terapêutico, requerendo assim, estudos prévios de modo a desenvolver metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL; MIGUEL, 2003).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com cerca de 100 mil espécies, das quais menos de 1% foram estudadas sob o ponto de vista medicinal. Só no Amazonas, existem 25 mil espécies diferentes de plantas, das quais muito pouco se conhece, sendo muitas delas inéditas para a comunidade científica (LIMA, 2007).

Segundo Simões e colaboradores (2000) o uso de plantas medicinais é uma prática generalizada. A medicina popular é o resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais, tradicionalmente repassados de geração para geração, por diversos grupos étnicos.

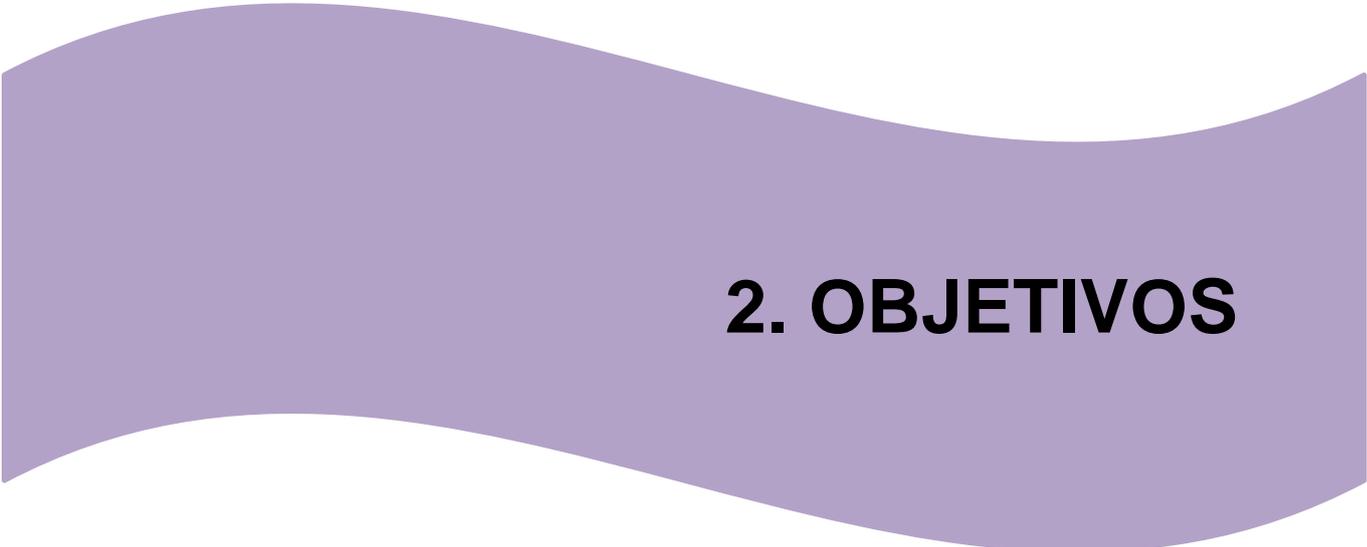
O Nordeste brasileiro é, sem dúvidas, um dos centros mundiais de biodiversidade mais importante do planeta, estimando-se mais de 20.000 espécies de plantas espalhadas em vários ecossistemas (FREITAS, 2009).

O Bioma Caatinga (Figura 1, pág.26) se estende pela totalidade do estado do Ceará (100%) e mais de metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%), quase metade de Alagoas (48%) e Sergipe (49%), além de pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%) (IBGE,2004).



Figura 1. Distribuição dos biomas-Fonte IBGE.

Esse trabalho relata o estudo fitoquímico das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, com isolamento, determinação estrutural e avaliação das atividades biológicas do extrato etanólico bruto (Ab-EEB) e das fases obtidas na partição líquido-líquido (Ab-Hex, Ab-CHCl₃ e Ab-AcOEt).



2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar os constituintes químicos e realizar a atividade antibacteriana, fotoprotetora e antioxidante *in vitro* da espécie *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. Atendendo a este objetivo geral, têm-se os seguintes objetivos específicos:

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar e identificar taxonomicamente a espécie *A. brasiliana*;
- Preparar extrato etanólico bruto com partes aéreas da espécie *A. brasiliana* e obter as fases Hexânica, Clorofórmica e Acetato de Etila;
- Determinar fenóis totais e flavonoides totais nos extratos obtidos;
- Realizar ensaios de atividades antioxidante, antibacteriana e fotoprotetora com o extrato etanólico bruto (Ab-EEB) e as fases obtidas (Ab-Hex, Ab-CHCl₃ e Ab-AcOEt).;
- Caracterizar estruturalmente os compostos isolados através de técnicas espectrométricas adequadas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. Fundamentação Teórica

3.1 Considerações sobre a família Amaranthaceae

A família Amaranthaceae foi estabelecida por A. L. Jussieu em 1789 e, pertence à classe Magnoliopsida ordem Caryophyllales. Está dividida em quatro tribos: Celosieae, Amarantheae, Braylineae e Gomphreneae (SIQUEIRA, 1994/1995)

A família Amaranthaceae Juss. possui distribuição cosmopolita, exceto nas regiões mais frias do Hemisfério Norte, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da América e África (SIQUEIRA, 2004). (Quadro 1, pág. 31).

Atualmente a família Amaranthaceae inclui cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 20 gêneros nativos e aproximadamente 100 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

A família Amaranthaceae possui plantas com relatos de várias atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, tripanocida, leishmanicida, anti-inflamatória, imunomodulatória etc.) e algumas espécies são utilizadas na medicina popular e como alimentos. Como por exemplo, *A. pungens*, *A. sessilis*, *A. tenella* e *A. brasiliana*.

O estudo com espécies de Amaranthaceae pode ser justificado pela diversidade estrutural dos constituintes químicos, complexidade taxonômica, importância alimentícia e medicinal, apresentando algumas atividades biológicas tais como antineoplásica, antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, imunomodulatória, diurética, etc. Quanto à atividade antioxidante, alguns trabalhos têm sido realizados com espécies de Amaranthaceae estando relacionado na maioria das vezes com seu conteúdo fenólico (Quadro 2, pág. 32 e 33). Entretanto poucas espécies de Amaranthaceae têm sido estudadas explorando seu potencial. (SALVADOR et al., 2006; CAI; SUN; CORKE, 2003; 2005).

Quadro 1. Distribuição de gêneros da família Amaranthaceae que ocorrem no Brasil nas respectivas tribos Celosieae, Achyrantheae e Gomphereae.

CELOSIEAE[#]	ACHYRANTHEAE[#]	GOMPHEREAE[#]
<i>Celosia</i> L. (50,30)	<i>Achyranthes</i> L. (6,2)	<i>Alternanthera</i> Forsskal. (80,30)
	<i>Amaranthus</i> L. (60,10)	<i>Blutaparou</i> Raf. (4,2)
	<i>Cyathula</i> Lour. (20,2)	<i>Froelichia</i> Moench (12,3)
	<i>Chamissoa</i> H.B.K. (2,2)	<i>Gomphrena</i> L. (120,46)
	<i>Herbstia</i> Sohmer (monotípico/monoespecífico)	<i>Iresine</i> P. Br. (80,5)
		<i>Pfaffia</i> Mart (50,20)
		<i>Pseudoplantago</i> Susseng (monotípico/monoespecífico)
		<i>Quaternella</i> Pedersen (monotípico/monoespecífico)

*The America Chemical Society, 1907 a 2007; # o primeiro número refere-se ao número de espécies que ocorrem no gênero e o segundo as que ocorrem no Brasil, respectivamente. Fonte: (TOMEI,2008)

Quadro 2. Espécies da família Amaranthaceae estudadas quanto à atividade antioxidante.

ESPÉCIES	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE / MÉTODO EMPREGADO	SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Amaranthus caudatus</i> <i>Amaranthus paniculatus</i>	Positiva / β -caroteno ac.linoleico Positiva / β -caroteno ac.linoleico	Fenólicos	Klimczak; Malecka; Pacholek (2002)
<i>Amaranthus hybridus</i> <i>Celosia argentea</i>	Positiva (Baixa atividade)/DPPH Negativa DPPH	-	Iwalewa e colaboradores (2005)
<i>Amaranthus sp</i>	Positiva / Inibição da lipoperoxidação	-	Lindsey; Motsei; Jager (2002)
<i>Amaranthus paniculatus</i>	Positiva / Quimioluminescência-luminol, ABTS	-	Haque e colaboradores (2006)
<i>Alternanthera sessilis</i>	Positiva / DPPH, inibição da lipoperoxidação	Fenólicos	Shyamala e colaboradores (2005)
<i>Amaranthus tricolor</i> <i>Amaranthus cruentus</i> <i>Amaranthus powellii</i> <i>Iresine herbstii</i> <i>Celosia cristata</i> <i>Gomphrena globosa</i> <i>Celosia plumosa</i>	Positiva / DPPH	Betalainas (Betacianinas e Betaxantinas)	Cai; Sun; Corke (2005) / Cai; Sun; Corke (2003)
<i>Alternanthera tenella</i>	Positiva / ORAC	Flavonoides	Salvador e colaboradores (2006)
<i>Amaranthus paniculatus</i> <i>Amaranthus gangeticus</i> <i>Amaranthus blitum</i> <i>Amaranthus viridis</i>	Positiva principalmente A. blitum / β -caroteno-ac.linoleico, DPPH	Fenólicos	Amin; Norazaidah; Hainida (2006)
<i>Amaranthus hybridus</i>	Positiva Baixa atividade / DPPH, FRAP	Fenólicos	Chitindingu e colaboradores (2007)

<i>Achyranthes aspera</i>	Positiva Baixa atividade / DPPH, ,ABTS, FRAP	Fenólicos (Baixo conteúdo)	Surveswaran e colabadores (2007)
<i>Pfaffia glomerata</i>	Positiva / TBARS	-	De Souza e colabadores (2005)

Fonte: (TOMEI, 2008).

3.2 Considerações sobre o gênero *Alternanthera*

O gênero *Alternanthera* é formado por 80 espécies, amplamente distribuídas pelo mundo, sendo que 25% delas são encontradas no Brasil (SIQUEIRA, 1994/1995).

O gênero *Alternanthera* abrange uma grande diversidade de espécies, possuindo representantes amplamente distribuídos pelo mundo (SOUZA et al., 1998, SALVADOR et al., 2004). Suas espécies são usadas na medicina popular de seus países com diversos fins terapêuticos, incluindo o tratamento de infecções virais, como hepatite, herpes simples, febre hemorrágica e influenza, distúrbios gástricos, hepáticos, renais, e do aparelho respiratório, além do uso como agente emoliente, antidiarréico, anti-inflamatório, vermífugo, antimicrobiano e analgésico.

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de *Alternanthera* mostram a ocorrência de alcalóides, esteróides, flavonoides, saponinas, e terpenóides como metabólitos secundários. (Quadro 3, pág. 34 e 35).

Quadro 3. Principais classes de metabólitos secundários identificados em espécies do gênero *Alternanthera* (Gomphereneae, Amaranthaceae).

ESPÉCIES	CLASSE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Alternanthera amoema</i>	Alcalóides	Saenz et al.,(1970)
<i>Alternanthera brasiliana</i>	Esteróides, flavonoides e terpenóides	Brochado e colaboloadores (2003); Macedo e colaboloadores (1999); Xu; Salt (1991)
<i>Alternanthera caracasana</i>	Cumarinas	Canales-Martinez et al., (2005)
<i>Alternanthera canescens</i> , <i>Alternanthera caracasana</i> , <i>Alternanthera flavescens</i> , <i>Alternanthera halimifolia</i> , <i>Alternanthera paronychioides</i>	Esteróides	Patterson; Xu; Salt (1991)
<i>Alternanthera ficoidea</i>	Alcalóides e benzenóides	Sacena (1975); Griffiths (1959)
<i>Alternanthera marítima</i>	Esteróides, Saponinas, Flavonoides	Salvador; Dias (2004); Salvador et al., (2004);Patterson; Xu; Salt (1991); Salt et al., (1991)
<i>Alternanthera nodiflora</i>	Hidrocarbonetos	Mathams; Sutherland (1952)
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Ácidos. Carboxílicos, Betalaínas, Esteroides, Flavonoides, Isoflavonoides, Proteínas, Saponinas, e Terpenóides	Blunden et al.,(1999); Gerald et al., (1999); Battha; Paes (1996);He; Meng (1995); Dewanji; Matai (1996);Zhou; Blasko; Cordell (1988); Dogra; Ojba (1978); Zielske; Simons; Silverst (1972)

<i>Alternanthera polygonoides</i>	Betalainas	Blunden et al., (1999); Gerald et al .,(1999)
<i>Alternanthera pungens</i>	Alcalóides, Antraquinonas, Esteroides, Flavonoides, Saponinas e Terpenoides	Ragasa; Tremor; Rideout (2002); Calderon;Garcia Aseff; Fuentes (1996) Ruiz et al ., (1996); De Rutz; Fusco;Ruiz (1993); Ruiz et al., (1991); Gupta; Sascena(1987); Dogra;Jha; Mishra (1977)
<i>Alternanthera repens</i>	Saponinas	Sanoko et al ., (1999)
<i>Alternanthera sessilis</i>	Carotenóides, Esteróides, Ésteres graxos, Flavonoides, Hidrocarbonetos, Lipídeos, Saponinas e Terpenóides	Bhaskarachary et al .,(1995); Sahu; Chakrabarty (1993); Sridhar; Laks(1993)Penders;Kapundu; Delaude (1992);Kapundun; Lami; Delaude (1986); Baruah;Sarma (1984); Sinha; Arora;Wahi (1984); Jou et al (1979); Agrawal; Jain (1978); Dogra;Jha;Mishra (1977); Lin;Chen (1975); Jansz et al., (1974)
<i>Alternanthera tenella colla</i>	Flavonoides	Salvador et al .,(2006)
<i>Alternanthera versicolor</i>	Betacianinas	Piattelli; Minale (1964)

FONTE: (TOMEI, 2008)

Estudos farmacológicos tem confirmado que espécies deste gênero, como *A. pungens*, *A. sessilis*, *A. tenella* e *A. brasiliana* têm importantes atividades que justificam seu uso na medicina popular (RUIZ et al., 1991; GARCIA; CALDERÓN; FUENTES, 1995).

Da espécie *A. pungens* foram isolados diferentes metabólitos secundários como alcalóides, esteroides, triterpenos, leucoantocinidinas, β -espinasterol e uma saponina derivada do núcleo oleano, com açúcares glicose e ramnose. Recentemente, o cloridrato de colina também foi descrito para essa mesma espécie (CALDERÓN; GARCÍA ASSEF; FUENTES, 1997).

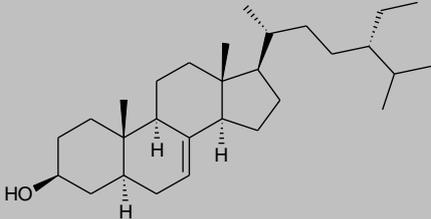
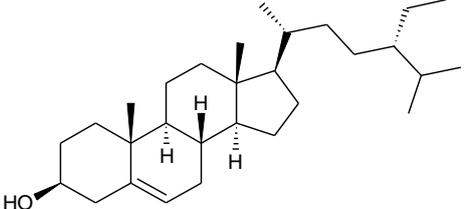
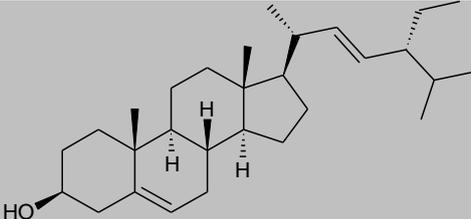
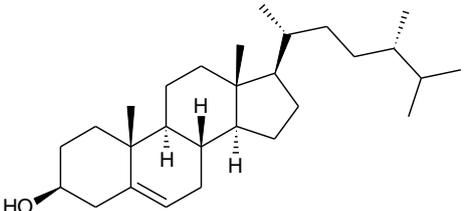
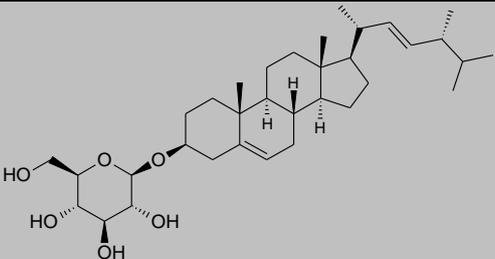
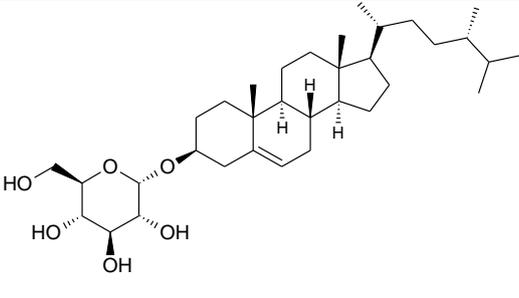
A partir de *A. marítima* foram isolados os seguintes constituintes: esteroides (estigmasterol, β -sitosterol, campesterol, espinasterol e Δ^7 -estigmasterol), ácidos orgânicos (ácido palmítico e vanílico) e estas estruturas foram confirmadas por comparação de espectro de RMN com os obtidos por Kojima e colaboradores (1990) e Chaurasia e Swichtl (1987), além de análises de CG com uso padrão. (SALVADOR et al., 2004).

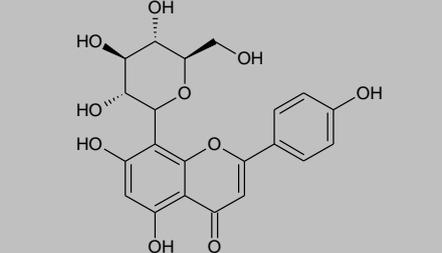
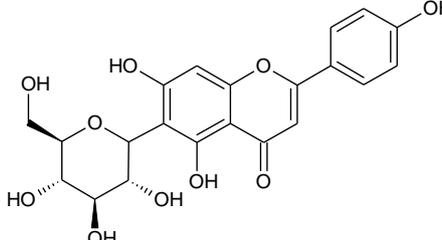
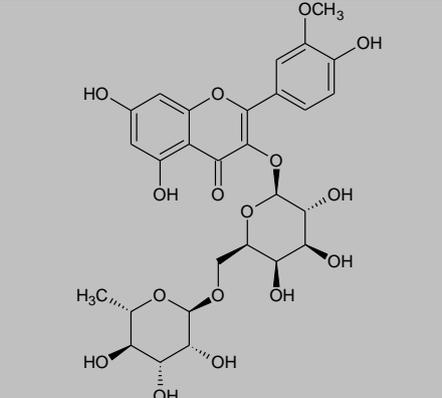
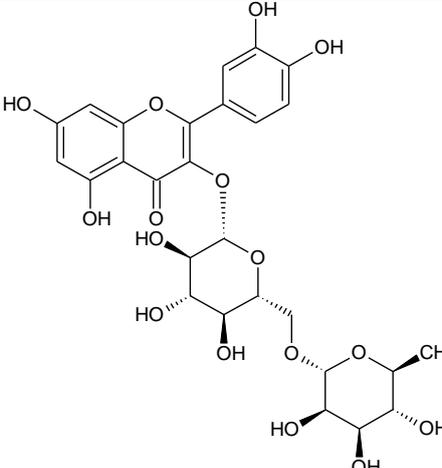
As saponinas Estigmasterol-3-O- β -glucopiranosídeo e espinasterol-3-O- α -D- glucopiranosídeo foram identificadas por análises espectroscópicas e comparação com dados publicados. Também foram relatados os flavonoides glicosídicos vitexina, isovitexina, isoramnetina-3-O-robinobiosídeo e quercetina-3-O-rutinosídeo (SALVADOR et al., 2004).

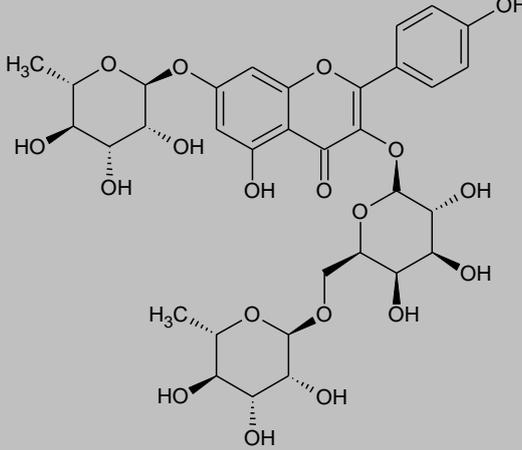
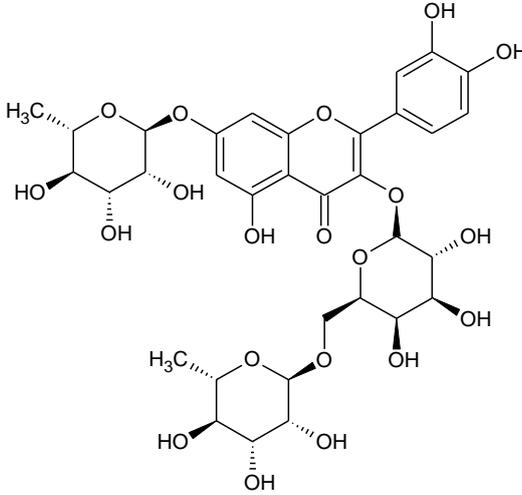
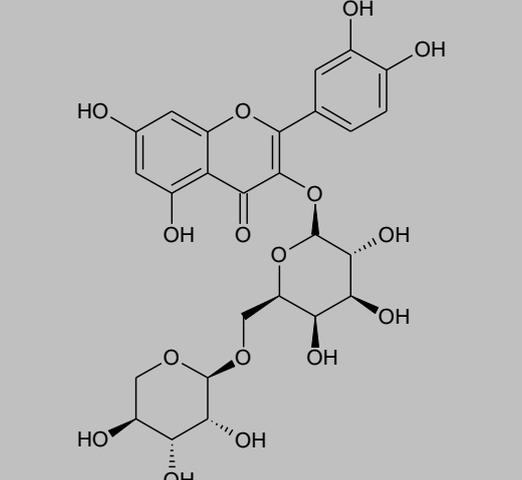
Brochado e colaboradores (2003), isolaram seis flavonoides da *A. brasiliana*: canferol 3-O-rubinosídeo-7-O- α -ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo-7- α -L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-rutinosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, canferol 3-O-rutinosídeo. Estas estruturas foram elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono-13 (RMN ^1H e RMN ^{13}C , COSY ^1H - ^1H , APT, HETCOR) estando todos os dados de acordo com a literatura.

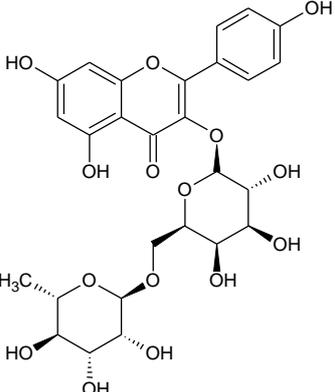
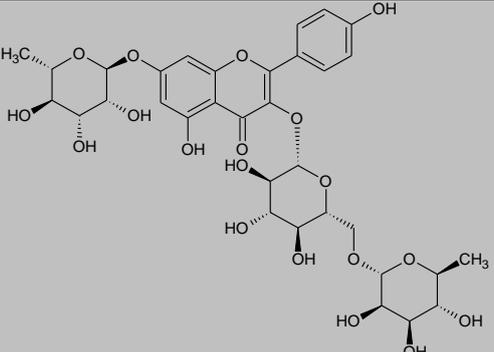
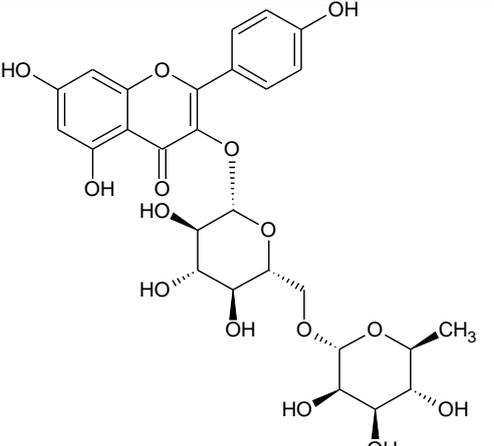
No quadro 4, pág. 37 a 40, estão mencionados metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Alternanthera*.

Quadro 4: Substâncias isoladas de espécies do gênero *Alternanthera*.

Nome	Estrutura	Espécie vegetal
β-Espinasterol		<i>A. pungens</i> <i>A. maritima</i>
β-Sitosterol		<i>A. pungens</i> <i>A. maritima</i>
Estigmasterol		<i>A. pungens</i> <i>A. maritima</i>
Campesterol		<i>A. pungens</i> <i>A. maritima</i>
Estigmasterol-3-O-β-glucopiranosídeo		<i>A. maritima</i>
Espinasterol-3-O-α-D-glucopiranosídeo		<i>A. maritima</i>

Vitexina		<i>A. marítima</i>
Isovitexina		<i>A. marítima</i>
Isoramnetina 3-O-robinisídeo		<i>A. marítima</i>
Quercetina 3-O-rutinosídeo		<i>A. marítima</i>

<p>Canferol 3-O-rubinosídeo-7-O-α-ramnopiranosídeo</p>		<p><i>A. brasiliana</i></p>
<p>Quercetina 3-O-robinobiosídeo-7-α-L-ramnopiranosídeo</p>		<p><i>A. brasiliana</i></p>
<p>Quercetina 3-O-robinobiosídeo</p>		<p><i>A. brasiliana</i></p>

<p>canferol 3-O-robinobiosídeo</p>		<p><i>A. brasiliana</i></p>
<p>canferol 3-O-rutinosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo</p>		<p><i>A. brasiliana</i></p>
<p>canferol 3-O-rutinosídeo</p>		<p><i>A. brasiliana</i></p>

3.3 Considerações sobre a espécie *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze

Alternanthera brasiliana (L.) KUNTZE é uma espécie herbácea perene, ereta ou rasteira, muito ramificada, como observado por Smith e Downs, (1972). É uma planta nativa da América tropical até o sul da ilha de Santa Catarina exclusiva de restingas litorâneas, xerófitas e heliófitas (Figura 2, pág 41).

A espécie *Alternanthera brasiliana* é conhecida popularmente como “penicilina” e “terramicina” é empregada no tratamento de infecções (CAETANO et al., 2002), anti-inflamatória, analgésica e ainda a atividade inibidora do vírus do herpes simples (EDWIN e REITZ, 1967).



Figura 2. *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, planta conhecida comumente em Petrolina por “benzetacil” e “terramicina”

No Brasil, ocorrem cerca de trinta espécies de *Alternanthera* (KISSMANN e GROTH, 1999), sendo que *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik compartilham a mesma sinonímia popular: penicilina, terramicina. Devido à grande semelhança morfo-anatômica entre essas espécies, autores como Kissmann e Groth (1999) e Lorenzi e Matos (2002) citam as mesmas espécies como espécie única, ou seja, *A. brasiliana*.

Estudos fitoquímicos feitos com *A. brasiliana* registraram a presença de terpenos, esteroides, compostos fenólicos e flavonoides. Compostos dessas classes podem justificar a ação analgésica do extrato hidroalcoólico desta espécie comparada a do ácido acetilsalicílico e ao paracetamol (SANTOS et al., 1995).

De acordo com Lagrota e colaboradores (1994), *A. brasiliana* apresentou, uma pronunciada atividade *in vitro* contra o vírus do herpes simples, podendo esse efeito ser devido à diferença de mecanismo dependentes da ação da timidina quinase viral ou da DNA polimerase.

Foi atribuído ao extrato alcoólico de *A. brasiliana* uma relação de analgesia dose dependente, sendo sua resposta, muitas vezes mais potente que a dos fármacos utilizados como padrão (ácido acetilsalicílico, dipirona e indometacina), não apresentando interferência no efeito quanto à via de administração (oral ou peritoneal) (SOUZA et al., 1998).

Estudos realizados, *in vitro*, com *A. brasiliana* puderam comprovar que, principalmente os flavonoides canferol 3-O-rutinosídeo e canferol 3-O-robinosídeo inibiram de modo eficiente à proliferação de linfócitos humanos sendo duas vezes mais ativos que o extrato bruto (BROCHADO et al., 2003) (Figuras 3 e 4).

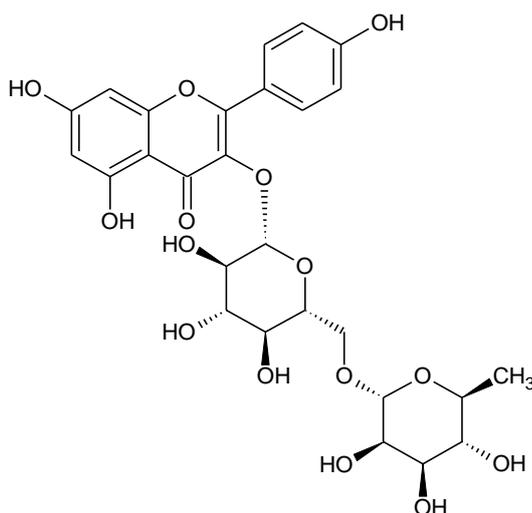


Figura 3. Canferol 3-O-rutinosídeo

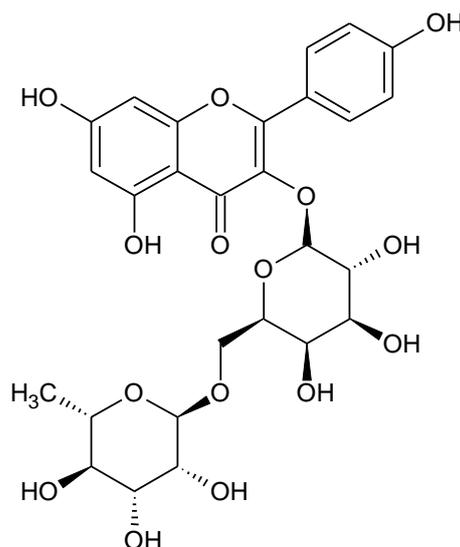


Figura 4. Canferol 3-O-robinobiosídeo

Caetano e colaboradores (2002) analisaram o extrato bruto de *A. brasiliana* quanto a sua atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e ATCC 9144) e *S. aureus* de isolados hospitalares (metilicina resistente e não resistente). O extrato mostrou uma atividade bastante semelhante ao cloridrato de tetraciclina utilizado como padrão.

Em estudo feito por Delaporte e colaboradores (2005) com a espécie *A. brasiliana* pode-se constatar que o nitrogênio é o principal micronutriente constituído da folha seguindo do potássio e do cálcio. Nas cinzas totais das partes aéreas o cálcio foi detectado em maior concentração e, em relação aos micronutrientes, o manganês teve sua percentagem maior nas folhas, enquanto que nas cinzas, o zinco foi o mineral mais presente. Este estudo contribui no controle de qualidade da espécie além de fornecer suporte para seu uso na nutrição humana.

Na literatura científica há dois trabalhos relatando estudos fitoquímicos com *A. brasiliana*. Brochado e colaboradores (2003), descreve o isolamento de seis flavonoides (Quadro 4). E o de Facundo e colaboradores (2012), onde descrevem o isolamento do sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosídeo e três flavonas, crysoeriol (5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona), tricina (5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona) e 7-O- β -D-glucopiranosídeo-5,4'-dihidroxi-3' metoxiflavona. A estrutura desses compostos foi determinada usando espectros de RMN de ^1H e

¹³C uni e bidimensionais, espectro de massas e infravermelho, e comparação com dados da literatura.

3.4 Considerações gerais sobre terpenoides e esteroides

A classificação dos terpenos se baseia no número de unidades isoprênicas: monoterpenos (C10, 2 unidades), sesquiterpenos (C15, 3 unidades), diterpenos (C20, 4 unidades), sesterpenos (C25, 5 unidades), triterpenos (C30, 6 unidades) e tetraterpenos (C40, 8 unidades) sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os terpenos mais frequentes em óleos voláteis (SIMÕES et al., 2010).

Os núcleos dos triterpenos e esteroides têm a mesma origem até a formação do óxido de esqualeno. Os esteroides são formados por um esqueleto de 27-29 carbonos dispostos num sistema tetracíclico. Para os esteroides, o óxido de esqualeno cicliza numa conformação cadeira-barco-cadeira-barco formando o cicloartenol (em algas e plantas verdes) ou lanosterol (em fungos e organismos não fotossintéticos) após vários rearranjos. Após clivagem oxidativa de três metilas, o cicloartenol, entre outros compostos forma os esteroides (SIMÕES et al., 2010) (Figura 5, pág 45).

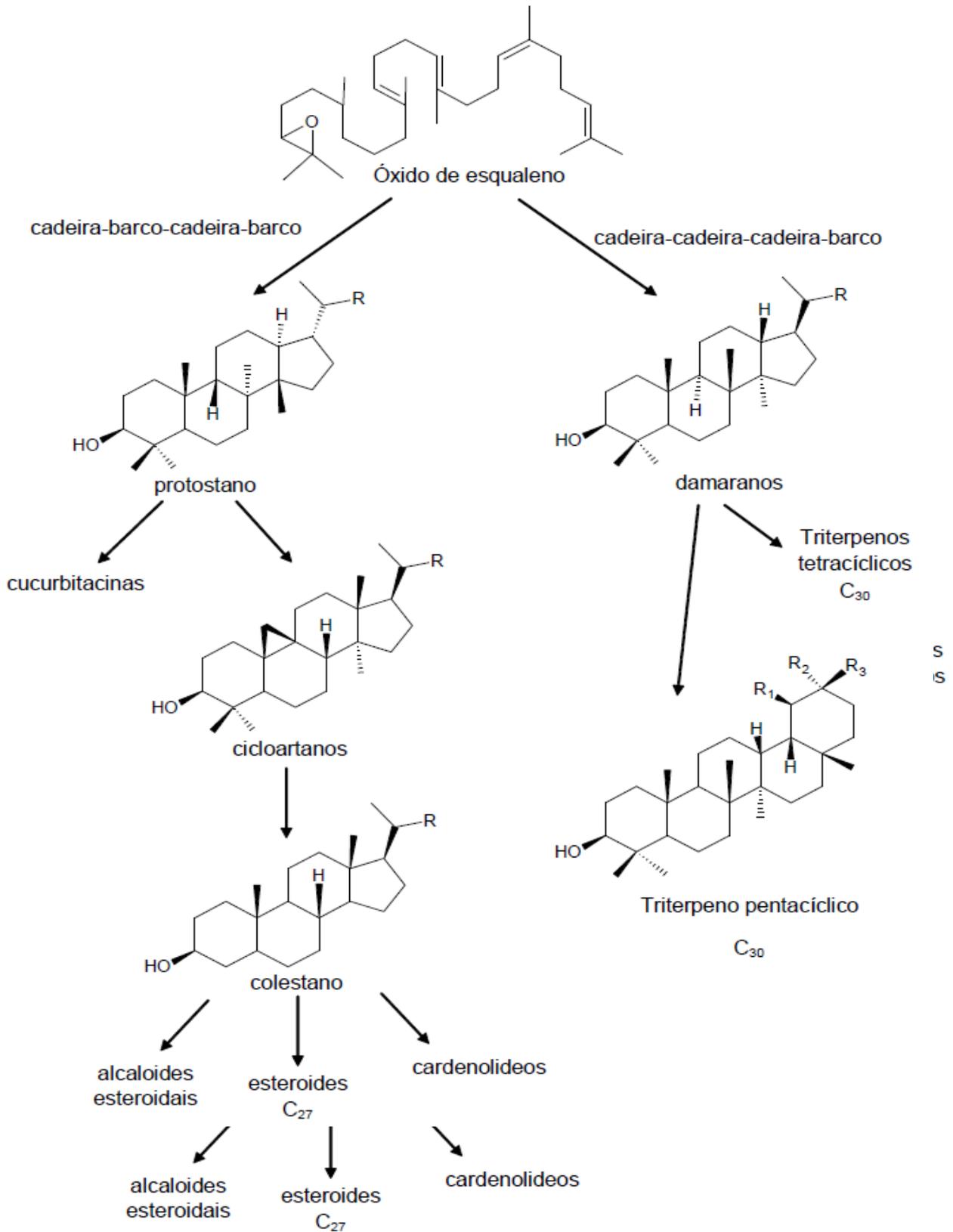


Figura 5. Formação de triterpenos e esteroides em plantas (SIMÕES et al., 2010).

3.5. Considerações gerais sobre flavonoides

Flavonoides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (MANN, 1987). Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON; HARRISON, 1990) e estão presentes na maioria das plantas, concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001).

3.5.1 Aspectos químicos

Mais de 8.000 flavonoides já foram identificados (PIETTA, 2000) e sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 6) (DI CARLO et al., 1999) que são denominados A, B e C como consequência da ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, isto é, derivados difenilpropânicos.

Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os carbonos recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números, seguidos de uma linha (') para o núcleo B (FIGURA 6) (SIMÕES et al ., 2010).

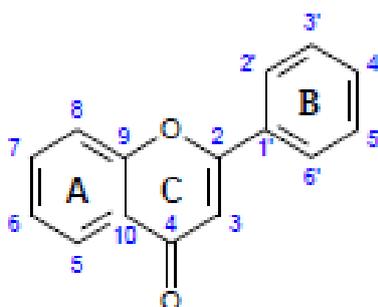
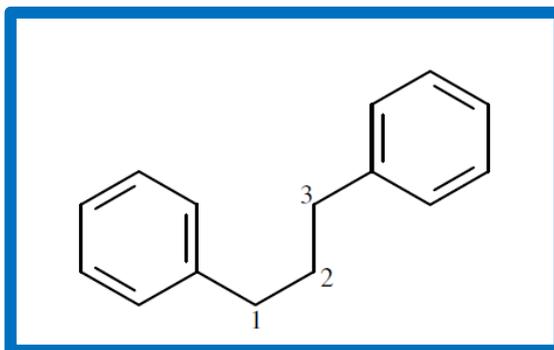
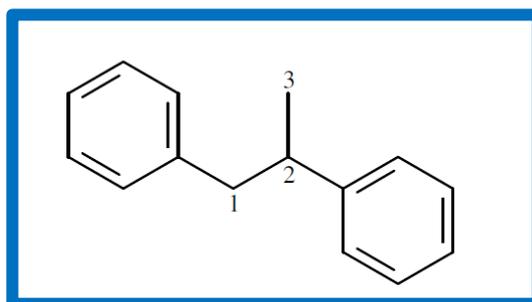


Figura 6. Esqueleto básico dos flavonoides

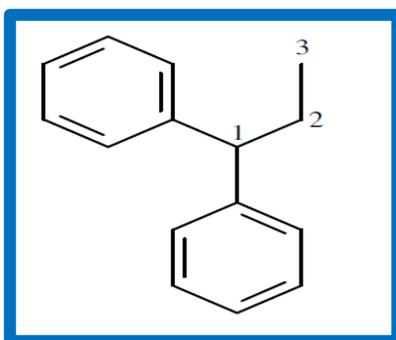
É comum designar os produtos naturais derivados do esqueleto 1,3; 1,2; 1,1 diarilpropânico em três grandes classes, respectivamente, como flavonoide propriamente dito **(1)**, isoflavonoides **(2)** e neoflavonoides **(3)** (Figura 7).



Flavonoide propriamente dito (1)



Isoflavonoide (2)



Neoflavonoide (3)

Figura 7. Representação das classes de flavonoides.

As várias classes de flavonoides diferem no grau de oxidação e de substituição do anel C, enquanto que compostos individuais em uma classe diferem quanto à substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000).

Estas substâncias são usualmente oxigenadas e possuem substituintes hidroxilas, metoxilas, metilenodioxila e prenila (PIETTA, 2000).

Os flavonoides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Essa forma chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo. São denominados de O-heterosídeo quando a ligação se dá pelo intermédio de uma hidroxila e de C-heterosídeo quando a ligação se dá com um átomo de carbono. Quando o metabólito (flavonoide, antraquinonas, terpenos etc.) encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo frequentemente denominado de forma livre. (SIMÕES et al., 2010)

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é determinada por sua estrutura, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons e suportar como resultado a deslocalização em torno do sistema aromático. Outro determinante estrutural importante é a capacidade antioxidante de flavonoides atribuída às hidroxilas em C4 e C3, que atuam no aumento do potencial antioxidante (LIEN et al., 1999).

3.5.2 Atividade biológica dos Flavonoides

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides presentes nas plantas. Dentre elas, podem-se citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE, 1989).

As suas principais aplicações na indústria são como corantes, aromatizantes e flavorizantes (BECHO et al., 2009). Além disso, as pesquisas demonstraram o seu envolvimento com propriedades farmacológicas importantes como antioxidantes (RICE-EVANS et al., 1995), vasodilatadoras

(DUARTE et al.,1993), anti-inflamatórias (PATHAK et. al, 1991), anticarcinogênica, antivirais (MIDDLETON et al., 2000), cardioprotetoras e antioxidantes (PATHAK et al., 1991; HOLLMAN et al., 1995; MARTINEZ-FLOREZ et al., 2002).

3.6 Considerações sobre atividade antioxidante

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos. Dessa forma, levam em conta os pontos fortes, pontos fracos e aplicabilidade de cada tipo de ensaio (SANCHEZ-MORENO et al., 1998).

Atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente à “capacidade antioxidante total” de uma amostra (PRIOR et al., 1999).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005; BARREIROS et al., 2006).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2\bullet$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\bullet$), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. (VALKO et al., 2004; EI-AGAMEY et al., 2004; OMOMI et al., 2005).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por exemplo, superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. (VALKO et al, 2004; EL-AGAMEY et al., 2004; OMONI et al., 2005; HASLAM et al.,1996).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante. (ATOUI et al., 2005; BARREIROS et al., 2006; (VALKO et al., 2004; EL-AGAMEY et al ., 2004; OMONI et al., 2005).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM et al., 1996; SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK et al., 2004).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM et al., 1996; SOARES, 2002, CHUN et al., 2005).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados com esta finalidade são o (1) butil hidroxi-anisol (BHA), (2) butil-hidroxi-tolueno (BHT), (3) *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), (4) tri-hidroxi-butyl-fenona (THBP) e (5) galato de propila (GP), (Figura 9, pág.48). Estudos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos. O galato de propila, por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos (HASLAM et al., 1996; SOARES, 2002).

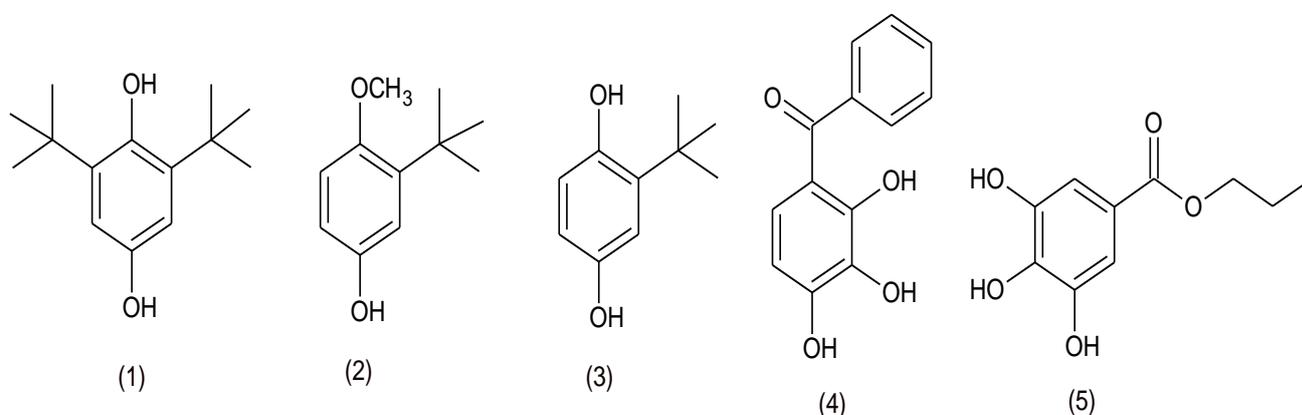


Figura 8. Antioxidantes Sintéticos (1) BHA, (2) BHT, (3) TBHQ, (4) THBP e (5) GP.

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUSA et al., 2007).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 515 nm (ROGINSKY, 2005).

Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenilpicrilhidrazila, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada

pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS e colaboradores, 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998.)

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

3.7 Considerações sobre atividade antimicrobiana

A busca por tratamentos a base de fitoterápicos intensificou-se nas ultimas décadas. O Brasil apresenta uma extensa e diversificada flora, sendo grande o número de pesquisadores que tem contribuído para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas.

No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et al., 2001).

Alguns trabalhos vêm demonstrando a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de plantas da flora nordestina – bioma caatinga (KONE et al., 2004; MAIGA et al., 2005).

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública (DUARTE, 2006).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário, também são reconhecidas empiricamente há séculos

e foram comprovadas cientificamente apenas recentemente (JANSEN et al., 1987)

A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (DIDRY et al,1993; CONNER, 1993; SMID et al., 1996; HELANDER et al .,1998).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. O baixo número de registros pode ser consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais. Além disso, a maioria dos estudos são testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseados em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas (DUARTE, 2006).

3.8. Considerações sobre a atividade Fotoprotetora

A incidência de câncer de pele e o fotoenvelhecimento induzido pela radiação solar crescem em todo o mundo. Segundo a OMS o melanoma é o tipo de câncer que mais cresce no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública (IARC/WHO, 2001).

A exposição à radiação UV é um dos maiores fatores de risco que tem levado a um aumento dos casos destes tipos de câncer de pele, os quais são mais prevalentes em indivíduos de pele clara e nas regiões mais próximas do Equador (CHANG et al., 2010).

O Brasil é o país de maior área intertropical e um dos mais ensolarados do planeta (ALIGIERI, 1995). Estes fatores somados à redução da camada de ozônio são um dos responsáveis pelo aumento de casos de câncer de pele no país. De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a neoplasia de maior incidência é o câncer de pele, sendo previstos 113.850

novos casos de câncer de pele não melanoma e 2.970 para o tipo melanoma para 2010 (INCA, 2010; ANVISA, 2010).

A limitação da exposição solar nos períodos críticos de irradiação, o uso de fotoprotetores e bloqueadores solares e o diagnóstico precoce são mecanismos eficazes de prevenção.

Pesquisas nas últimas décadas têm focado na busca de substâncias que promovam o aumento da proteção solar tais como: síntese e modificação estrutural de filtros solares (VENDITTI et al., 2008; KLEIN, 2000; SANTOS et al., 1999), associação de diferentes filtros (SANTOS et al., 2000) e a busca de produtos naturais com ação antissolar (COUTEAU et al., 2008; RAMOS et al., 2003; RAMOS, et al., 1996; SANTOS et al., 1992). Um dos primeiros trabalhos sobre a avaliação de produtos naturais como antissolar baseado na analogia estrutural entre algumas substâncias naturais e os filtros sintéticos foi apresentado por Proserpio (1976).

Flavonoides, antocianinas e derivados do ácido cinâmico absorvem na região do UV, sugerindo a hipótese de filtração desta radiação (EDREVA, 2005). Estudos com produtos naturais tais como extratos de chá verde e chá preto, galato de epigallocatequina, catequina, silibina, equol, entre outros, têm demonstrado resultados encorajadores (BRAND; JENDRZEJEWSKI, 2008; LIN et al., 2008; YUSUF et al., 2007; SINGH; AGARWAL, 2005; ELMETS et al., 2001).

3.9. Espectrometria de Massa

3.9.1. Fundamentos da Espectrometria de Massas

Desde seu surgimento, em 1897, pelo trabalho pioneiro de J. J Thomson, a Espectrometria de Massas (EM) tem revolucionado muitas áreas do conhecimento como a física, química e, mais recentemente, a biologia, medicina, ciência dos materiais e ciência dos alimentos, dentre outras. Com seus novos horizontes e amplas perspectivas de desenvolvimento, a EM vem se consolidando como uma ferramenta analítica extremamente versátil e essencial nessas áreas do conhecimento. Desde pesquisas aplicadas até as

mais fundamentais, a EM tem exercido papel de grande destaque, com crescente atuação (DINIZ, 2011).

Nas aplicações mais tradicionais de EM utilizam-se as técnicas de ionização por elétrons (EI) ou ionização química (CI) (HOFFMAN et al., 2007), para a ionização dos analitos, sendo técnicas reconhecidas amplamente em análises estruturais de compostos. Para a aplicação deste tipo de ionização necessita-se que o composto seja volatilizado primeiramente, e posteriormente, ionizado, limitando o uso desta técnica a compostos voláteis, termolábeis e que possuem baixas massas moleculares (DINIZ, 2011).

O surgimento de novas técnicas de ionização, como a (MALDI), (SCHALLEY, 2000) e a ionização por electrospray (ESI) (WHITEHOUSE et al., 1985/1993) permitiu a extensão da aplicação da ionização por dessorção a laser assistida por matriz EM para praticamente todas as classes de moléculas. Tanto ESI como MALDI, consideradas técnicas brandas de ionização, permitem a análise de moléculas termolábeis e de alta massa molecular, como proteínas e peptídeos, íons em solução, complexos organometálicos e polímeros, dentre outras (DINIZ, 2011).

O princípio de funcionamento de qualquer espectrômetro de massas baseia-se na detecção de íons selecionados de acordo com a sua razão massa/carga, sendo m a massa em u [massa atômica unificada, chamada também de Dalton (Da)] e z a carga formal. A essência da técnica envolve a geração de íons que são depois detectados. A sofisticação surge nos métodos que são usados para a geração desses mesmos íons e no modo de analisá-los (DINIZ, 2011).

Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, cada qual com suas vantagens e limitações. Porém, todos apresentam os mesmos componentes básicos: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector e registrador. Um esquema da estrutura básica de um espectrômetro de massas é mostrado na Figura 10. Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons e os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massas. A função do analisador de massas é separar tais íons de acordo com a sua relação m/z . Os espectrômetros de massas podem ser classificados em várias

categorias dependendo da natureza do analisador de massas. Finalmente, um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, armazenados na memória de um computador e mostrados em uma tela (PAVANELLI, 2010).

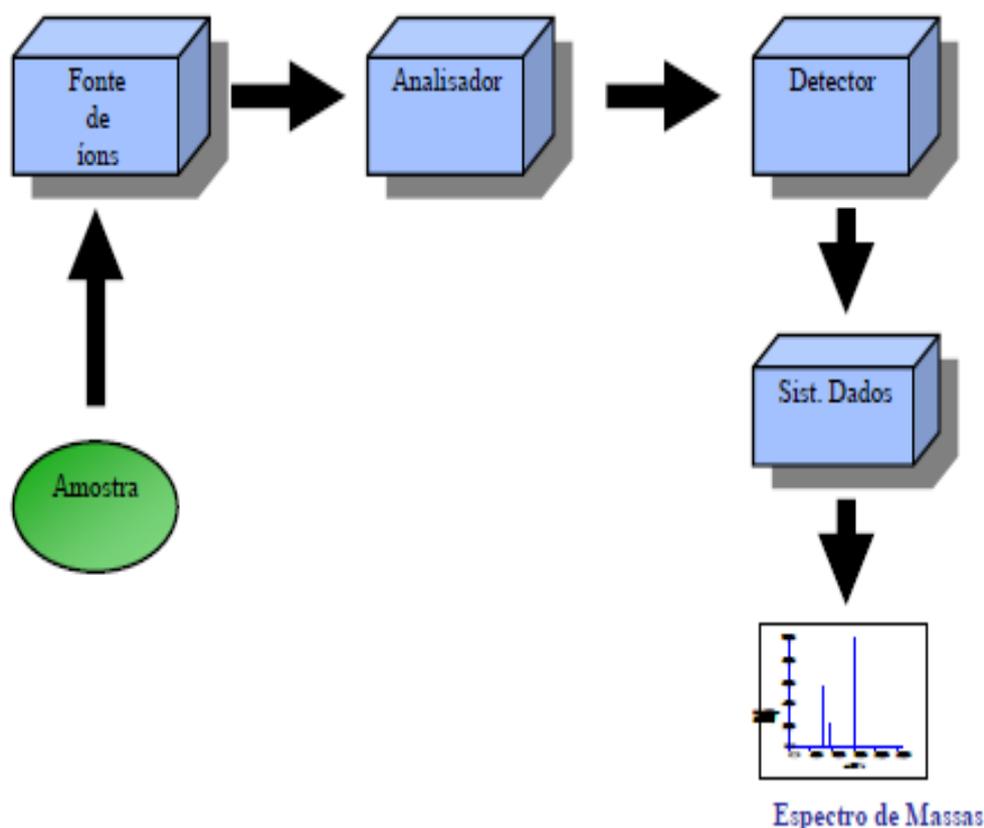


Figura 9. Componentes básicos de um espectrômetro de massas.

3.9.2. Métodos de Ionização

A fonte de ionização é um dispositivo que promove a ionização dos analitos da amostra antes da sua entrada no analisador de massas. Existe uma grande variedade de técnicas de ionização, cuja escolha deve levar em conta as propriedades físico-químicas do analito e a energia transferida durante o processo de ionização (DALMÁZIO, 2007).

Os métodos de ionização mais conhecidos são: ionização por elétrons (EI), ionização química (CI), bombardeamento por átomos rápidos (FAB), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização por electrospray (ESI) (SCHALLEY, 2000). Os métodos de EI e CI são adequados para analisar apenas moléculas voláteis e termicamente estáveis, pois os íons são formados após a molécula ser volatilizada. A técnica FAB pode ser aplicada para amostras polares, iônicas, termicamente lábeis, energeticamente instáveis e de alto peso molecular, que normalmente não podem ser analisadas pelas técnicas EI e CI. A técnica MALDI baseia-se na ionização do analito adsorvido em uma substância (matriz) por um feixe de laser. Na técnica APCI as moléculas do solvente são transferidas à fase gasosa, sendo então, aplicado uma tensão em uma agulha, próximo à saída do vaporizador, que cria uma descarga de íons através de interações com as moléculas do gás de arraste e do solvente. É uma técnica parecida com a CI, porém todo o processo ocorre sob pressão atmosférica (SCHALLEY, 2000).

3.10. Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS)

O conceito de ionização electrospray foi proposto inicialmente por Dole em 1968. No entanto, seus experimentos não foram convincentes, pois estes visavam à análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não são ionizados em solução. A partir do trabalho desenvolvido por Yamashita e Fenn (1984), a técnica sofreu um grande avanço devido à possibilidade de se ionizar proteínas, o que permitiu a determinação de suas massas molares. Posteriormente, ESI-MS foi aplicada à análise de outros biopolímeros e pequenas moléculas polares, revelando-se uma técnica sensível e facilmente acoplável a técnicas cromatográficas (WHITEHOUSE et al., 1985/1993). Fenn recebeu o prêmio Nobel em Química, em 2002, pelo desenvolvimento da ionização por electrospray para análise de macromoléculas biológicas.

Desde seu surgimento, ESI-MS tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. Dentre as vantagens de ESI-MS

incluem alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra. Uma ampla variedade de substâncias pode ser analisada, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos (LOO, 2000; HECK, 2004) .

Há essencialmente três características que fazem com que ESI seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira destas características é a capacidade para produzir íons multiplamente carregados, reduzindo assim a razão m/z , de tal modo que é possível analisar compostos de elevada massa molecular. A segunda característica é que as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último, ESI é uma técnica de ionização suave, provocando pouca (ou nenhuma) fragmentação dos analitos estudados (DINIZ, 2011).

3.11. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais

O perfil metabólico de extratos brutos não é uma tarefa fácil de ser realizada em razão da diversidade de estruturas químicas presentes na planta. Porém, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hifenadas, proporcionou um papel importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás. Isso possibilitou o estudo do extrato vegetal bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso de técnicas hifenadas.

As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia. As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações diferentes, ou seja, ser ortogonais. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a

cromatografia gasosa (GC), com técnicas espectrométricas como espectrofotômetro de UV-Vis (DAD), espectrômetro de massas (MS e MS-MS) e ressonância magnética nuclear (NMR), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores. A escolha do detector torna-se fundamental quando o analito se encontra em nível de traços, necessitando de baixos limites de detecção.

A principal vantagem das técnicas hifenadas em comparação com as técnicas espectroscópicas sem hifenação deve-se ao fato de não necessitar de uma grande quantidade (miligrama) do analito na sua forma purificada, o que acontece com as técnicas sem hifenação, que só são válidas após um tedioso protocolo de purificação (FERNANDES et al., 2006)

O Quadro 5 apresenta as principais características e usos das técnicas hifenadas na análise de substâncias de plantas.

Quadro 5. Aplicações de técnicas hifenadas na área de plantas medicinais.

Técnicas Hifenadas	Características	Exemplos de aplicação na área de plantas medicinais
GC-MS	Identificação de compostos. Fornece informação estrutural da molécula. Permite comparação com bibliotecas espectrais.	Estudo da sazonalidade de algumas classes de metabólitos secundários, caracterização de aromas, identificação de terpenóides Análise de flavonoides.
GC-MS-MS	Confirmação estrutural de Moléculas	Análise de fragrâncias
LC-DAD	Identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico. Não fornece informação estrutural.	Análise de flavonoides Controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos ativos, estudos de ecologia química e quimiossistemáticos.

LC-MS	Raramente resulta na identificação definitiva. Muitas vezes acoplado com LC-DAD para fornecer informações estruturais complementares.	Análise de antocianinas
LC-MS-MS	Determinação de novos compostos, com a incrível vantagem da simplicidade no preparo da amostra e rapidez na obtenção dos resultados.	Determinação de flavonoides, saponinas.
LC-NMR	Fornece informações estruturais (espectro $^1\text{H-NMR}$). Constitui-se a técnica mais poderosa na determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas	Determinação de alcaloides, flavonoides.

Para análise de compostos voláteis e termicamente estáveis, o método mais utilizado é a cromatografia gasosa acoplada ao detector seletivo de massas.

3.11.1. LC-MS e LC-MS-MS

Dentre os acoplamentos, o LC-MS é muito mais seletivo e, em certas circunstâncias, mais sensível que o LC-DAD. Já a identificação de compostos é mais difícil e nem sempre é viável, por causa da menor resolução cromatográfica (em comparação com CG) e a possível coeluição de compostos.

Uma dificuldade encontrada para acoplamento da LC com o MS era a manutenção do vácuo no detector de massas, o que foi resolvido em parte pela introdução da fase móvel de HPLC na forma de “spray” dentro da fonte de íons do MS, onde apenas uma pequena fração do solvente entra no analisador de massas (LEVSEN et al., 2000).

O principal problema do uso da LC-MS na química de produtos naturais é a ionização de uma grande variedade de compostos existentes no extrato bruto. Embora existam vários tipos de interfaces disponíveis no mercado, nenhuma delas permite a detecção universal de todos os constituintes da matriz vegetal. Cada interface tem suas próprias características e sua faixa de aplicação (WOLFENDER et al., 1998).

O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por eletronebulização ou eletrospray (ESI) tornaram a técnica de LC-MS aplicável para uma grande variedade de matrizes. Mais recentemente a disponibilidade do equipamento com fotoionização (APPI) conferiu universalidade à técnica de LC-MS, permitindo a análise de compostos com baixa massa molecular até proteínas (PEREIRA et al., 2005).

O Quadro 6 sumariza algumas das principais características das interfaces utilizadas em LC-MS.

Quadro 6. Interfaces para LC-MS.

Interface/ Ionização	Fluxo	Tipo de ionização	Compostos	Vantagens e desvantagens
Feixe de partículas	0,1–1 mL/min	EI, CI+, CI-	Apolares ou Moderadamente polares; Termicamente estáveis; Massa molecular de 100-1400;	Resposta não linear; Variação na resposta; Menos sensível; Necessita usar tampões voláteis; Bibliotecas para EI;
TSP	0,1–2 mL/min	CI+, CI-	Pouco polares a polares; Massa molecular de 100-2000;	Fragmentação limitada e dificilmente reprodutível; Nenhum espectro de referência; Instabilidade da intensidade do sinal; Condições para LC limitadas;

APCI	0,2–2 mL/min	CI+, CI-	Pouco polares a polares; Massa molecular de 100-1200;	Fragmentação limitada; Nenhum espectro de Referência; Altamente sensível; Possibilidade de degradar certos compostos termolábeis;
ESI	1µL/min – 2mL/min	CI+, CI-	Pouco polares a Altamente polares; Massa molecular baixa a elevada(formação de íons com cargas múltiplas);	Fragmentação limitada; Nenhum espectro de referência; Altamente sensível;
ESI-nanospray	20nL/min - 5µL/min	CI+, CI-	Pouco polares a altamente polares; Massa molecular baixa a elevada (formação de íons com cargas múltiplas);	Fragmentação limitada; Nenhum espectro de referência; Utilizável com colunas capilares;
FAB dinâmica	1 - 5µL/min	CI+, CI-	Polares e altamente Polares; Massa molecular até milhares de daltons;	Fragmentação limitada; Nenhum espectro de referência; Baixo fluxo da fase móvel;

Fonte: ENSMINGER, 1998. Legenda: TSP termospray; EI ionização eletrônica; CI+ ionização química positiva; Clonização química negativa; FAB “fast atom bombardement”

As interfaces de LC-MS normalmente produzem uma ionização branda dos metabólitos, gerando informação apenas da massa molecular do composto. Algumas informações como a perda de uma molécula de açúcar são obtidas utilizando a interface termospray, mas esse número é relativamente pequeno. Para obter um número maior de fragmentos característicos, o

espectro de dissociação induzido por colisão pode ser gerado utilizando-se os sistemas MS-MS ou íon-trap MS (WOLFENDER et al., 1998).

3.11.2. Algumas aplicações das técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais

São indiscutíveis os benefícios trazidos pela utilização de técnicas hifenadas, sobretudo em estudos complexos como o caso de extratos vegetais. As técnicas mais utilizadas na triagem química de metabólitos de plantas são GC-MS, principalmente, no estudo de óleos essenciais e das técnicas de LC-DAD-MS e LC-MS-MS, no estudo de compostos mais polares. Na análise de compostos polares presentes em produtos vegetais, as hifenações com a cromatografia líquida de alta eficiência são as mais utilizadas, principalmente a LC-MS-MS pelo grande número de informações geradas e sua alta seletividade. Dentre estes, uma classe que tem merecido destaque no estudo de plantas medicinais é a dos flavonoides, graças à grande variedade de compostos e diversas aplicações terapêuticas. Nesse campo é importante distinguir entre a simples determinação de agliconas (tipo mais frequente de análise com um número mais limitado de compostos presente em concentrações relativamente altas na amostra), com a análise de seus conjugados dentro da aglicona correspondente, muitas vezes presentes em baixas concentrações (traços) na matriz vegetal. O emprego da LC-MS-MS não somente permite a formação de fragmentos de estrutura específica, mas também reduz a interferência da coeluição de compostos e da matriz.

A tendência futura é de que novas técnicas hifenadas surjam devido ao avanço tecnológico, permitindo acoplamentos mais sofisticados, através de interfaces modernas e otimizadas, aliando métodos de separação altamente eficientes e de amplo domínio, como a cromatografia, com um ou mais detectores espectroscópicos (RODRIGUES et al., 2006).

4. Parte Experimental

4. Parte Experimental

4.1. Coleta e Identificação do material vegetal

As partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze foram coletadas no mês de agosto de 2011, na cidade de Petrolina - PE e a exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sob o número de tombo 19072,(Figura 11, pág. 66) e foi determinada por Duílio Paulino de Souza. Abaixo dados coletados do site do HVASF.

19072 - *Alternanthera brasiliana*

Família: Amaranthaceae

Espécie: *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze

Determinador: D. P. Souza

Coletor: E. E. S. Silva 1, 04/02/2013

Localização: Bairro Jardim Amazônia, Rua Manoel da Gama Neto, Petrolina, Pernambuco

Observações: Caatinga. Erva com ca. de 30 cm. Folhas simples, opostas, com tricomas. Flores alvas.



Figura 10. Exsicata de *Alternanthera brasiliana* de número 19072.

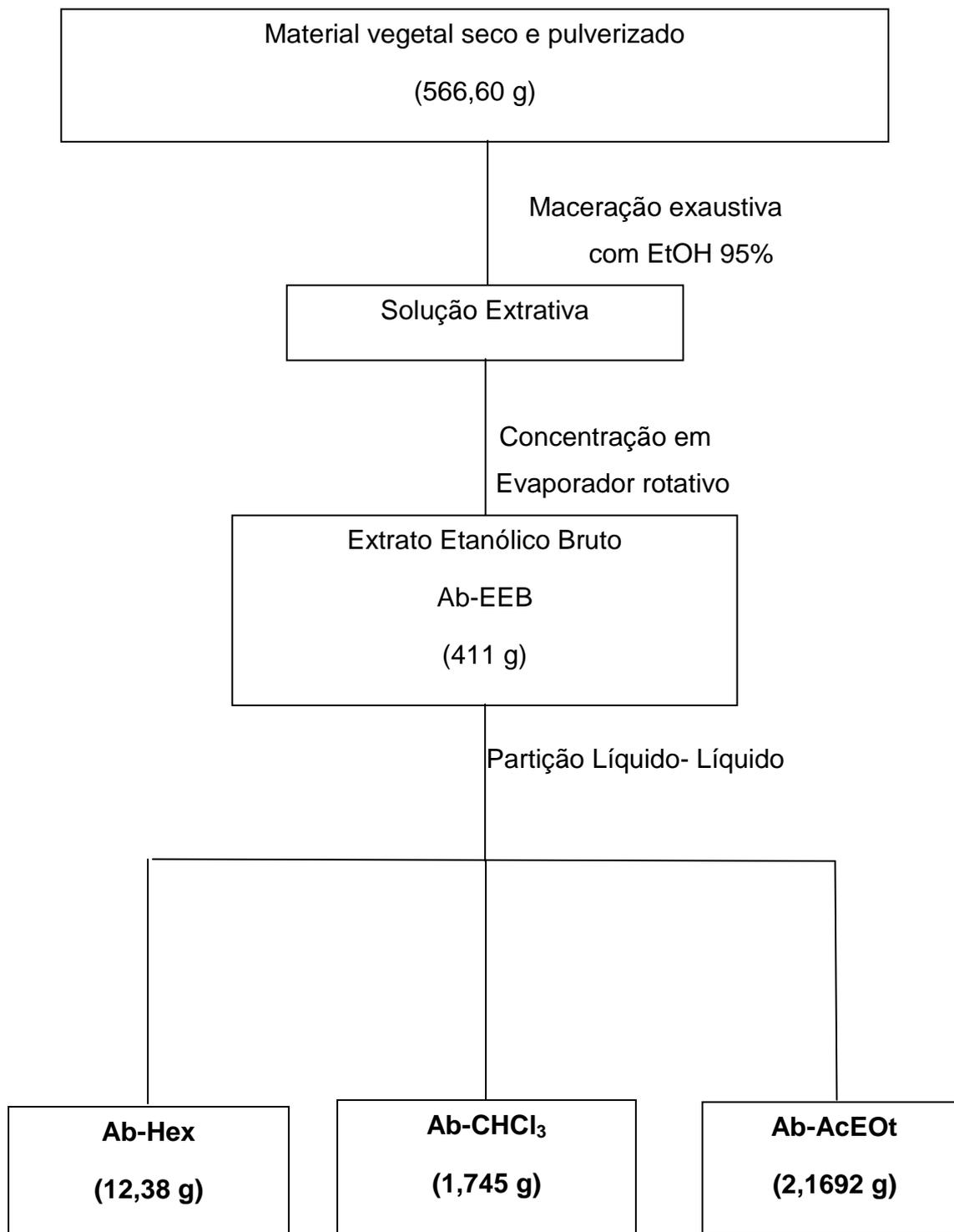
4.2. Processamento do material botânico para obtenção do extrato etanólico bruto

O material botânico, 1000 g das partes aéreas, foi seco em estufa com ar circulante à temperatura média de 40 °C durante 72 horas. Após a secagem e completa estabilização (eliminação de água e inativação de enzimas), o material foi pulverizado separadamente em moinho de facas, obtendo-se o material vegetal seco e pulverizado das partes aéreas (555 g).

4.3. Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido a extração exaustiva com etanol 95% em recipiente de aço inoxidável. Foram realizadas três extrações, substituindo o solvente a cada 72 horas até máximo esgotamento da droga. Após este processo a solução extrativa passou por um processo de evaporação do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C, em seguida obteve-se o extrato etanólico bruto (Ab-EEB) que pesou 101,70 g. Posteriormente foram separadas quantidades de Ab-EEB para realização dos testes biológicos. Com o restante foi feita uma partição líquido-líquido para o fracionamentos dos constituintes químicos, fazendo uso de solventes em ordem crescente de polaridade. Inicialmente se dissolveu o extrato em 1 litro de mistura de solventes, sendo a seguinte proporção: 70% de água e 30% de metanol. A partir disso, o frasco onde estava contida a solução permaneceu sob agitação mecânica por 40 min. Em seguida, se dispensou essa solução em funil de separação, e logo após adicionou-se hexano (solvente de menor polaridade usado na partição), o funil foi vedado e agitado para que todo o material se misturasse. Deixou-se o funil em um suporte para que houvesse a separação das duas fases (a fase hidroalcoólica e a fase hexânica). A fase hexânica ficou na parte superior, visto que sua densidade é menor que a densidade da fase hidroalcoólica. A separação foi realizada e reservou-se a primeira fase obtida na partição. O mesmo foi feito usando os solventes clorofórmio e acetato de etila,

respectivamente. As soluções obtidas, através desta metodologia, foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, em temperatura em torno de 50 °C. Dessa forma foram obtidas as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, como pode ser observado no Fluxograma 1,pág.69.



Fluxograma 1. Fluxograma de obtenção e fracionamento de Ab-EEB das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana*.

4.4. Métodos de análise

4.4.1. Métodos cromatográficos

Para cromatografia de adsorção em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60 (70- 230 mesh, ASTM) de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm (MERCK), tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Para cromatografia em camada delgada (CCD), foi usada sílica gel 60 PF254 (MERCK). As frações foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) da Silicycle TLC – Aluminum F254, determinando-se a pureza da amostra quando observada uma única mancha, a revelação das substâncias foram executadas pela exposição das placas a lâmpada de irradiação ultravioleta com dois comprimentos (254 e 366 nm), em placas eluídas em sistemas de solventes distintos.

4.4.2. Métodos espectrofotométricos

Para os métodos espectrofotométricos foi utilizado o espectrofotômetro Quimis (Q798U2M) de monofeixe, operando em uma faixa de trabalho de 190 a 1000 nm. Este método é utilizado para determinar a concentração de uma amostra utilizando a técnica da espectrofotometria ou colorimetria, a qual consiste na determinação da concentração de uma solução a partir da coloração apresentada por ela, já que a intensidade da cor é proporcional à quantidade da substância sobre a qual agiu o reativo.

4.4.3. Métodos espectrométricos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker NMR (DRX 500), operando na frequência do Hidrogênio a 500 MHz e na do Carbono-13 a 125 MHz. A amostra para análise foi preparada dissolvendo-se pequena quantidade

da mesma em dimetilsulfóxido- d_6 (DMSO- d_6). O deslocamento químico (δ) foi referenciado para RMN 1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencente à fração não deuterada deste solvente em relação ao TMS: DMSO ($\delta H = 2,49$). Para os espectros de RMN ^{13}C , em relação ao TMS foi utilizado: DMSO ($\delta C = 39,7$).

As multiplicidades dos sinais de RMN 1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singlete), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *t* (triplete), *q* (quarteto), *m* (multiplete).

4.4.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos (CLAE-DAD) Acoplada a Espectrometria de Massas (IES-EM)

As análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), utilizando um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de Diodos (CLAE-DAD) acoplado a Espectrômetro de Massas (EM) com ionização por eletrospray (IES), modelo Esquire 3000 Plus – Bruker Daltonics.

As amostras foram diluídas em metanol (Merck) e injetadas no aparelho em uma coluna C-18 Phenomenex Luna, 5 μm , 250/4, 6 mm.

Para eluição na coluna foram utilizados o solvente A (ácido fórmico 1%) e o solvente B (metanol) de acordo com o gradiente de eluição descrito na tabela 1.

Tabela 1. Gradiente usado na CLAE.

Gradiente	Tempo
70% de A:30% de B	0 – 15 min
60% de A:40% de B	16 – 30 min
40% de A:60% de B	31 – 40 min
100 % de B	41 – 45 min

O detector UV-DAD utilizado foi configurado para registrar substâncias capazes de absorver radiação ultravioleta nos comprimentos de onda 290 a 320 nm. Nas análises de impressões digitais IES-EM, as condições gerais

foram: fonte de temperatura de 40 °C e tensão capilar de 4 kV em modo positivo, IES-(+).

As análises estruturais dos íons individuais dos espectros de massas foi realizada por IES-EM e EM/EM. As substâncias foram identificadas conforme a interpretação dos espectros através do padrão de fragmentação e comparação com dados da literatura.

4.5. Fracionamento cromatográfico de Ab-Hex

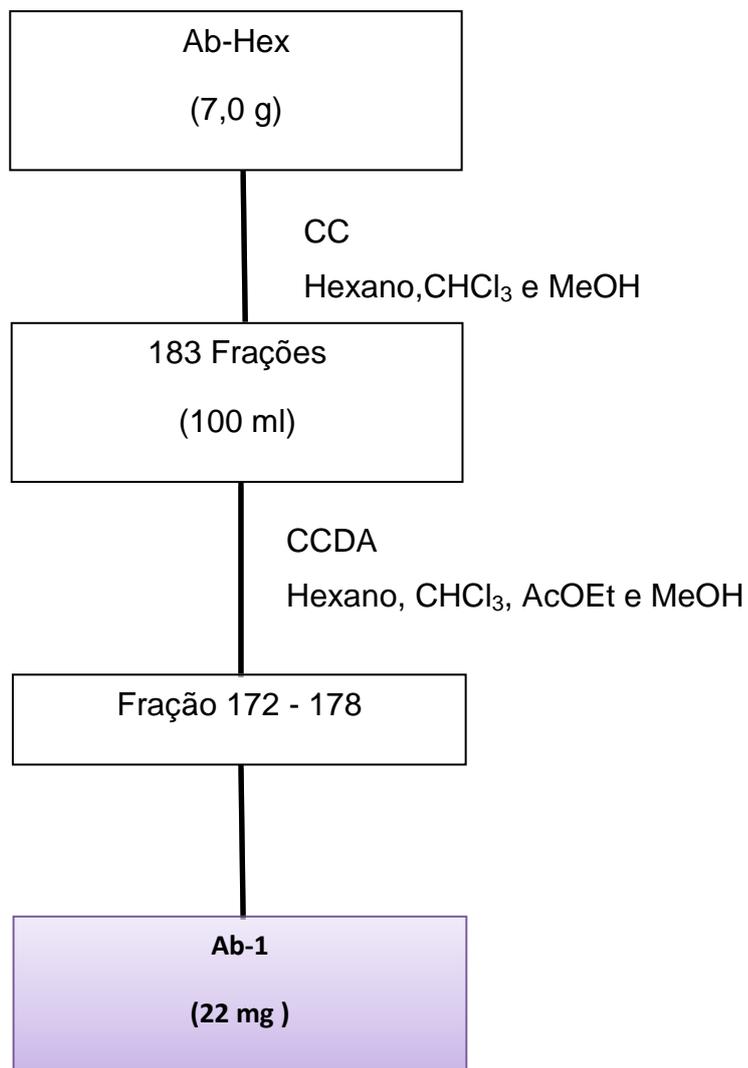
A fase Ab-Hex (7,0 g) foi cromatografada em coluna, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e como fase móvel, hexano, clorofórmio e metanol, isoladamente ou em misturas binárias de solventes, seguindo-se um gradiente crescente de concentração, conforme demonstrado na Tabela 2, abaixo. Ao todo, foram coletadas 183 frações de 100 mL cada.

Tabela 2. Dados do fracionamento Cromatográfico de Ab-Hex.

Fração	Sistema de solvente	Proporção
1-28	HEXANO	100
29-33	HEXANO: CHCl ₃	99:1
34-50	HEXANO: CHCl ₃	97:3
51-68	HEXANO: CHCl ₃	94:6
69-81	HEXANO: CHCl ₃	90:10
82-91	HEXANO: CHCl ₃	80:20
92-96	HEXANO: CHCl ₃	70:30
97-111	HEXANO: CHCl ₃	50:50
112-120	HEXANO: CHCl ₃	30:70
121-142	CHCl ₃	100
143-148	CHCl ₃ :MeOH	99:1
149-154	CHCl ₃ :MeOH	97:3
155-160	CHCl ₃ :MeOH	95:5
161-171	CHCl ₃ :MeOH	93:7
172-182	CHCl ₃ :MeOH	90:10
183	MeOH	100

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico, e quando necessário, as placas foram reveladas com vanilina sulfúrica 1% sob aquecimento. As frações foram reunidas em 16 grupos.

As frações 172 a 178 apresentaram um precipitado foram monitorados em CCDA e após visualização no ultravioleta foram reunidas, resultando no isolamento de uma substância codificada como Ab-1 (22 mg). (Fluxograma 2, abaixo).



Fluxograma 2. Fluxograma da obtenção de Ab-1.

4.6. Determinação do teor de fenóis totais

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas. O reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação +6 porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica. O teor de fenóis totais foi mensurado através do método colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu (SIGMA) e ácido gálico como padrão, baseado no método descrito por Slinkard & Singleton (1977), apenas os volumes foram ajustados (ALMEIDA et al., 2011).

Para isso, uma alíquota (40 µL) do extrato e fases (Ab-HEX, Ab-CHCl₃ e Ab-AcOEt) diluídos foi adicionada a 3,16 mL de água destilada e 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, sendo misturados logo em seguida. A mistura foi deixada em repouso por 6 minutos e posteriormente foram adicionados 600 µL de uma solução estoque de Na₂CO₃ e em seguida agitados. As soluções finais foram deixadas em repouso a 20 °C por 2 horas. Ao final do processo, a absorbância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro (QUIMIS) em 756 nm contra o branco (todos os componentes, exceto a amostra em análise) e os resultados foram plotados em um gráfico que correlaciona a absorbância da amostra com sua concentração.

Assim, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi expresso como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g), através da curva de calibração do ácido gálico. A curva de calibração foi obtida em concentrações que variaram de 50 a 1000 mg/L. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7. Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides total foi medido pelo ensaio colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio (DEWANTO et al., 2002). Uma alíquota (300 µL) de Ab-EEB, fase de acetato de etila e o padrão de (+)-catequina foi adicionado, separadamente, ao frasco que contém 1,5 mL de água destilada. Para o balão foi adicionado 90 µL de NaNO₂ (5%). Após 6 minutos de reação, 180 µL de AlCl₃ (10%) foi adicionado. Depois de 5 minutos, 600 µL de NaOH 1 M foi adicionado. Completou-se o volume total com 330 µL de água destilada. A solução foi bem agitada e a absorbância foi medida contra o branco de reagente preparada a 510 nm, em espectrofotômetro (QUIMIS). O conteúdo de flavonoides totais foram expressos como mg equivalentes de catequina por grama da amostra (mg de CE/g) por meio da curva de calibração com catequina. A gama da curva de calibração foi de 50 a 1000 mg/L (R = 0,9914). Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

4.8. Avaliação da atividade antioxidante

Para análise da atividade antioxidante do extrato e fases foram realizados os seguintes ensaios: sequestro do radical livre DPPH e Inibição da auto-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.

4.8.1. Teste do sequestro do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH é feita medindo quanto os constituintes químicos do extrato e das frações conseguem doar um próton para o DPPH e permanecerem estáveis. Para isso uma solução-mãe de 1 mg/mL foi preparada do EEB, e das três fases (hexânica, clorofórmica e acetato de etila) e dos padrões (ácido ascórbico, BHA e BHT) usando etanol como solvente. A partir disso, foram feitas diluições para as concentrações de 1, 3, 9, 27, 81 e 243 ppm (µg/mL). A solução de DPPH foi preparada em etanol na concentração de 50 µg/mL. Nas cubetas adicionou-se

2,5 mL das soluções dos extratos, fases e padrões e mais 1 mL do DPPH. Deixou-se reagir por 30 min à temperatura ambiente. O branco foi preparado usando 2,5 mL da solução do extrato, mais 1 mL do solvente (etanol). Como controle negativo usou-se uma mistura de 2,5 mL de etanol e 1 mL de DPPH. Os controles positivos foram os das soluções padrões (ácido ascórbico, BHA e BHT). Os resultados foram expressos em CE_{50} , onde os valores foram calculados por regressão linear. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 518 nm.

4.8.2. Teste da inibição da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

O teste da Inibição da auto-oxidação do β -caroteno é realizado para avaliar qual o grau de proteção que uma determinada amostra tem no sentido de se oxidar, ao invés de permitir que o β -caroteno se oxide. Foram preparadas soluções de 1mg/mL das amostras em etanol (EEB e fases) a serem observadas e dos padrões (quercetina, ácido ascórbico e ácido pirogálico). Para o preparo do meio oxidante 2 mg do β -caroteno cristalino foram dissolvidos em 10mL de clorofórmio; adicionou-se uma alíquota de 2 mL dessa solução recém preparada a 40 mg de ácido linoléico purificado e 400 mg do emulsificador Tween 40 em balão de fundo redondo e de boca de vidro esmerilhada. O clorofórmio foi então removido em evaporador rotativo; logo em seguida adicionou-se 100mL de água destilada ao balão e agitou-se vigorosamente por 2 minutos para promover a aeração do meio e criar o oxigênio radical. Foram transferidos para cubetas de leitura 0,12 mL dos padrões e extratos e, adicionou-se 3,0 mL do meio oxidante, preparado como descrito anteriormente. Logo após foi realizada uma primeira leitura em espectrofotômetro UV/VIS a 470 nm, e os mesmos foram colocados em banho maria a 50 °C por 120 minutos. As leituras foram realizadas no tempo zero e após 2 horas. Em seguida fez-se uma nova leitura no espectrofotômetro no mesmo comprimento de onda. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. O branco foi preparado com 5 mL da solução oxidante e 0,2 mL de

etanol 99,5%, sendo tratado da mesma maneira que as amostras. O branco do aparelho será o próprio etanol. O ácido ascórbico, BHT e BHA foram usados como controle positivo. No controle negativo, os extratos foram substituídos por um volume igual de etanol. A porcentagem de atividade antioxidante (%) foi avaliada em termos de branqueamento do β -caroteno utilizando a seguinte fórmula:

$$\%AA = \frac{1 - (A_0 - A_t)}{A_0^0 - A_t^0}$$

Onde: A_0 é a absorbância inicial e A_t é a absorbância final medida para a amostra de teste, A_0^0 trata-se da absorbância inicial e A_t^0 é a absorbância final medida para o controle negativo (branco). Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

4.9. Avaliação da atividade antibacteriana

Para avaliação da atividade antibacteriana, as cepas bacterianas de referência utilizados neste estudo foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ-BRASIL). Os microrganismos usados foram os seguintes: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella enterica* (ATCC 10708), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

O efeito antibacteriano foi avaliado pelo método de microdiluição conforme recomendado pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos. Inicialmente, uma solução de estoque de 25 mg/mL de extrato e frações foi preparado utilizando uma solução aquosa de DMSO a 20% (v/v). Foi transferido 200 μ L desta diluição para a microplaca contendo 200 μ L de caldo de Muller-Hinton. Em seguida, foram realizadas diluições em série, resultando em concentrações de 12500, 6250, 3120, 1560, 780, 390 e 190 μ g/mL. O inóculo contendo 5×10^5 UFC mL⁻¹ (na escala de 0,5 de McFarland) foi

adicionado a cada poço. Foi reservados poços em microplaca para o controle de esterilidade do caldo, o crescimento bacteriano e a ação antimicrobiana de referência (Gentamicina). Para a Gentamicina foi usado uma concentração inicial de 1,6 mg/mL, que foi diluída para concentrações de 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 µg/mL. As microplacas foram incubadas em condições de aerobiose por 18-24 horas, a 37 °C, quando 10 µL de 2,3,5-trifenil-tetrazólio 2% (CTT) foram adicionados a cada poço para detectar a mudança de cor do CTT (incolor) para o vermelho, refletindo o metabolismo bacteriano ativo. A CIM foi definida como a concentração mais baixa do que os extratos visivelmente inibiu o crescimento bacteriano.

Para determinar o CBM, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada uma das cavidades contendo os extratos e transferidos para placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. A aparência de colônias de bactérias para uma dada concentração indica que não foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado. Os ensaios foram realizados em triplicata. A densidade dos extratos foi empregada para converter µL/mL em mg/mL. A última a ser usado para expressar o CIM e CBM.

A atividade antibacteriana foi avaliada por esse método para as seguintes amostras: Ab-EEB, Ab-Hex, Ab-CHCl₃, Ab-AcEOt.

4.10. Avaliação da atividade fotoprotetora

Os extratos foram previamente secos em estufa a 40 °C e, em seguida, diluídos em etanol absoluto, obtendo-se concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L. A leitura foi realizada através de varredura em espectrofotômetro (QUIMIS) entre os comprimentos de 260 a 400 nm. Posteriormente, foi calculado o Fator de Proteção Solar (FPS) das amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização estrutural de Ab-1

A substância Ab-1 (22 mg) foi obtida da fração Ab-Hex na forma de cristais brancos e após a análise dos espectros e posterior comparação com dados da literatura (KOJIMA et al., 1990) foi possível identificar como sendo o esteroide β -sitosterol glicosilado (Figura 11).

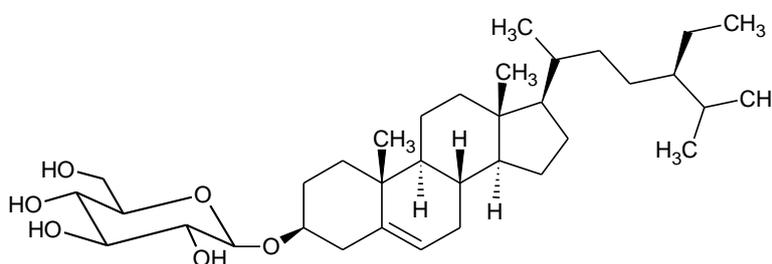


Figura 11. Estrutura do β -sitosterol glicosilado.

Estudos *in vivo* em animais demonstraram que o β -sitosterol glicosilado apresenta atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imuno modulatória (BOUIC et al., 1999).

O espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^\circ$ (Figura 12, pág.84) mostrou a presença de 21 sinais correspondentes à carbonos hidrogenados, sendo 8 carbonos metínicos (CH), 9 sinais de carbonos metilênicos (CH₂) e 6 carbonos metílicos (CH₃). Dentre os sinais observados destaca-se a presença de um carbono oximetínico glicosilado em δ_c 77,0 para C-3, dois carbonos olefínicos em δ_c 140,4 e δ_c 121,19, referente a C-5 e C-6, respectivamente, além da presença de sinais característicos para uma unidade de açúcar, destacando-se o sinal para carbono metilênico em δ_c 61,00, característico para C-6' de uma glicose e o carbono anomérico C-1' com δ_c em 100,81.

Através do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 13, pág.85), foi possível observar, que além dos seis carbonos da glicose, a estrutura apresenta mais vinte e nove carbonos, caracterizando um esteroide glicosilado e não um triterpeno.

A tabela 3, abaixo apresenta a correlação com a numeração da estrutura.

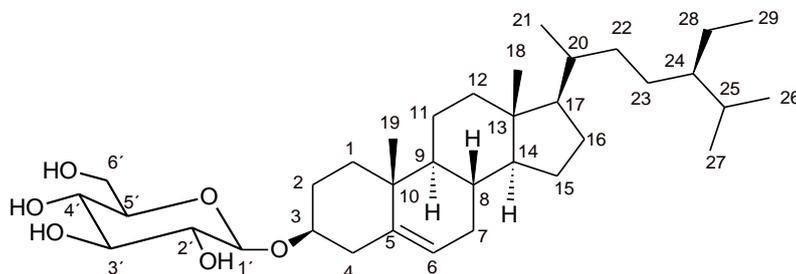


Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) para Ab-1 em DMSO- d_6 e comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (KOJIMA et al., 1990).

	δ_c Ab-1	* δ_c Sitosterol-3-O-R-D- glicopiranosídeo
C		
5	140,4	141,00
10	36,2	37,00
13	41,8	42,40
CH		
3	77,0	78,30
6	121,19	122,00
8	31,42	32,10
9	49,06	50,40
14	56,2	56,30
17	55,45	56,50
20	35,5	36,50
24	45,16	46,10
25	28,72	29,50
1'	100,81	102,60
2'	73,5	75,40
3'	76,7	78,70
4'	70,1	71,70
5'	76,2	77,50
CH₂		
1	36,8	37,60
2	29,2	30,30
4	38,3	39,40
7	31,4	32,20
11	20,60	21,40
12	39,7	40,00
15	23,9	24,60

16	29,0	28,70
22	31,4	34,30
23	28,7	26,40
28	22,61	23,40
6'	61,00	62,90
CH₃		
18	11,8	12,00
19	18,9	19,30
21	18,62	19,10
26	19,1	19,50
27	19,7	20,10
29	11,8	12,20

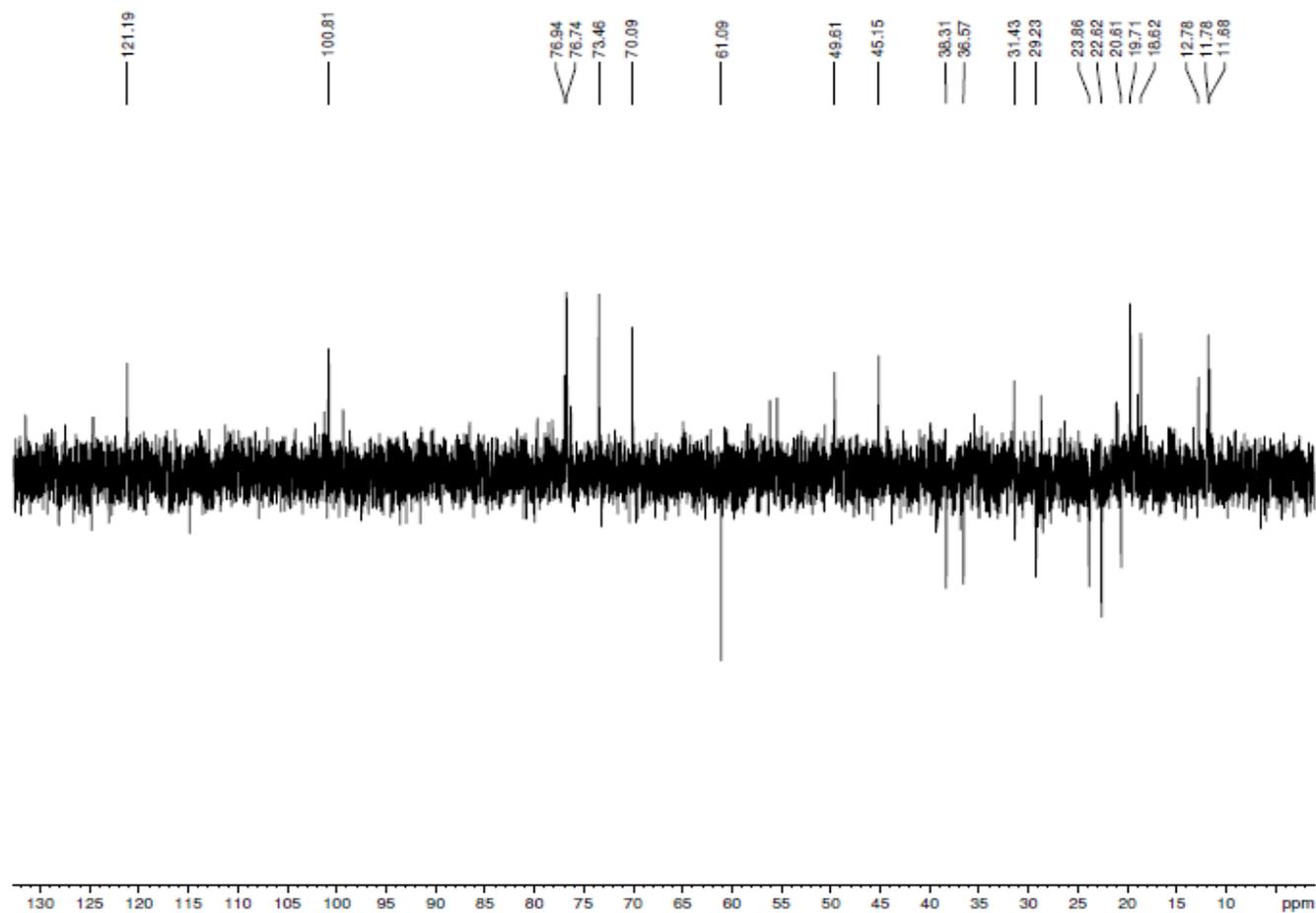


Figura 12. Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° de Ab-1 (DMSO- d₆, 125 MHz)

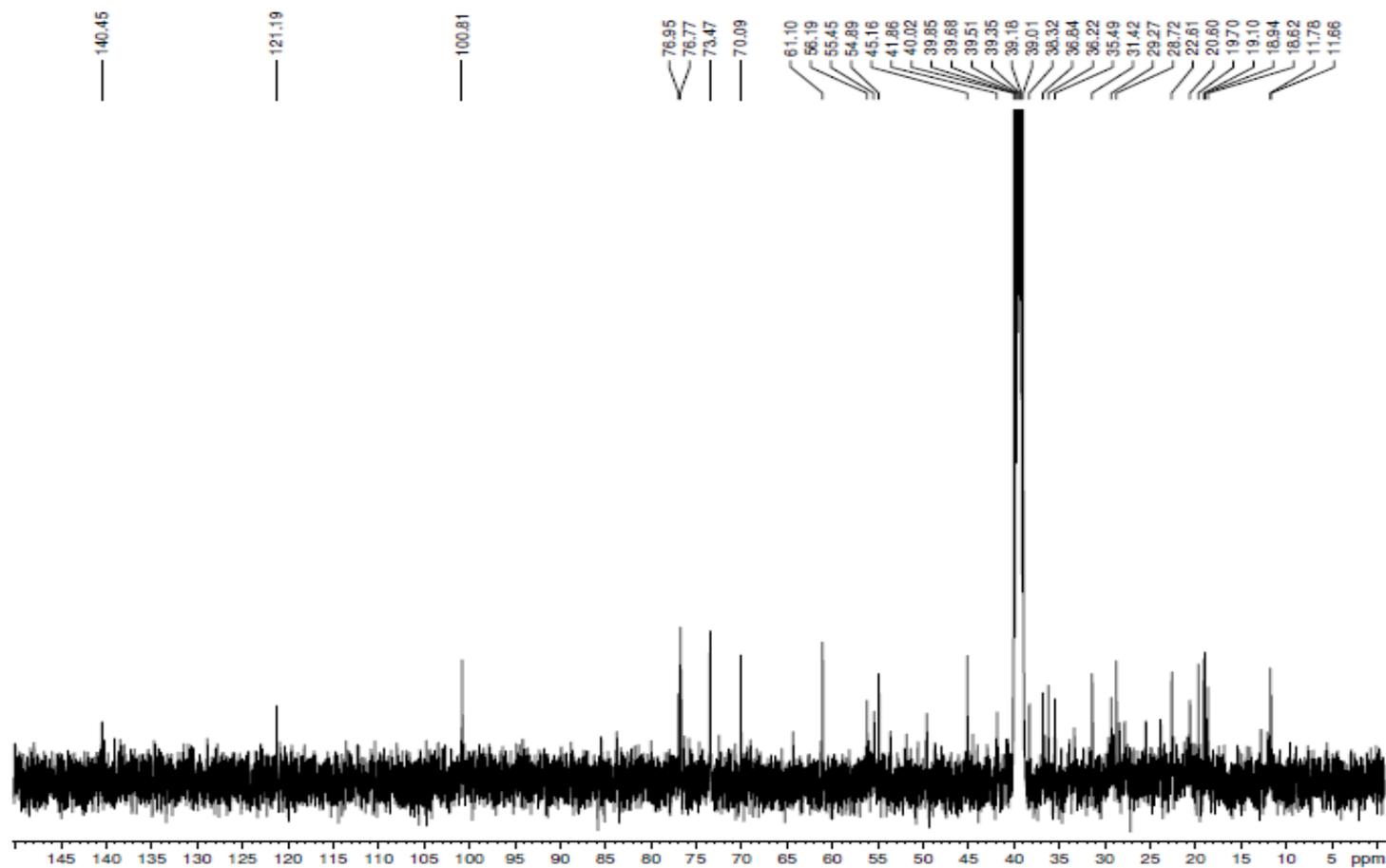


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C de Ab-1 ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz).

A análise do espectro de RMN ^1H de Ab-1 (Figura 14, pág.87) mostra δ 0,3 – 2,5 ppm vários sinais para hidrogênios principalmente metílicos e metilênicos de difícil distribuição devido a sobreposição desses sinais. Na região entre δ 3,0 – 5,0 ppm são observadas várias absorções de hidrogênios metínicos e hidroxílicos, característico da unidade de glicose, sendo possível observar no HMBC (Figura 15, pág.88) o acoplamento de H-1' (δ_{H} 4,22) com C-3 (δ_{C} 77,0), além do acoplamento de H-3 (δ_{H} 3,12) e C-1' (δ_{C} 100,81), justificando a presença da unidade osídica em C-3. Portanto, através deste espectro, juntamente com a análise de RMN ^{13}C , sugeriu-se a estrutura de um metabólito glicosilado.

O espectro de COSY (Figuras 16, pág. 89), de Ab-1 não foi muito elucidativa devido à sobreposição de sinais. Entretanto, é possível identificar o sistema de spins formado pelos hidrogênios da unidade de glicose e na expansão do COSY (Figura 17, pág.90) foi possível identificar o sistema de spins formados pelos hidrogênios da unidade esteroidal.

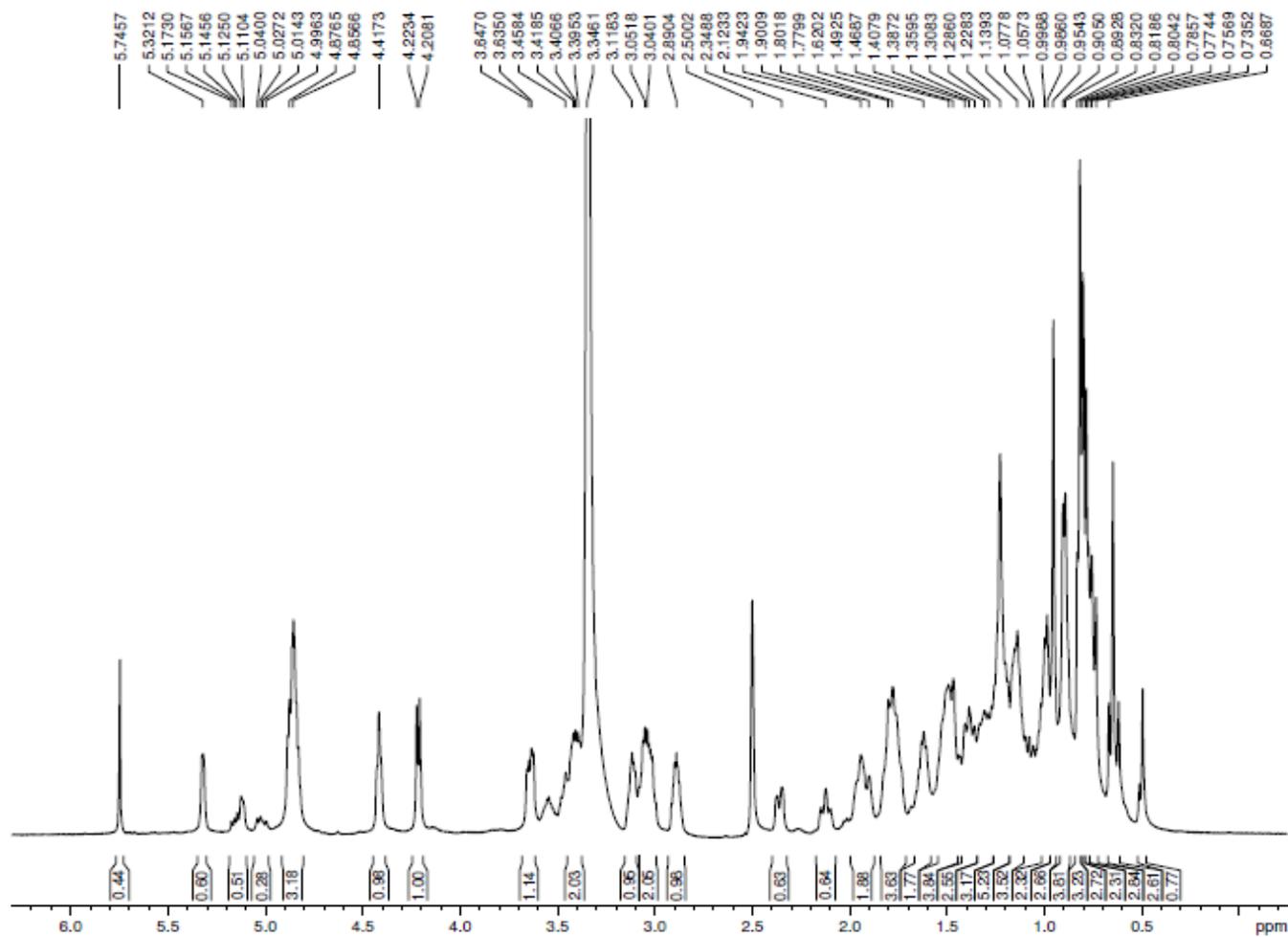


Figura 14. Espectro de RMN de ¹H de Ab-1 (DMSO- d₆, 500 MHz)

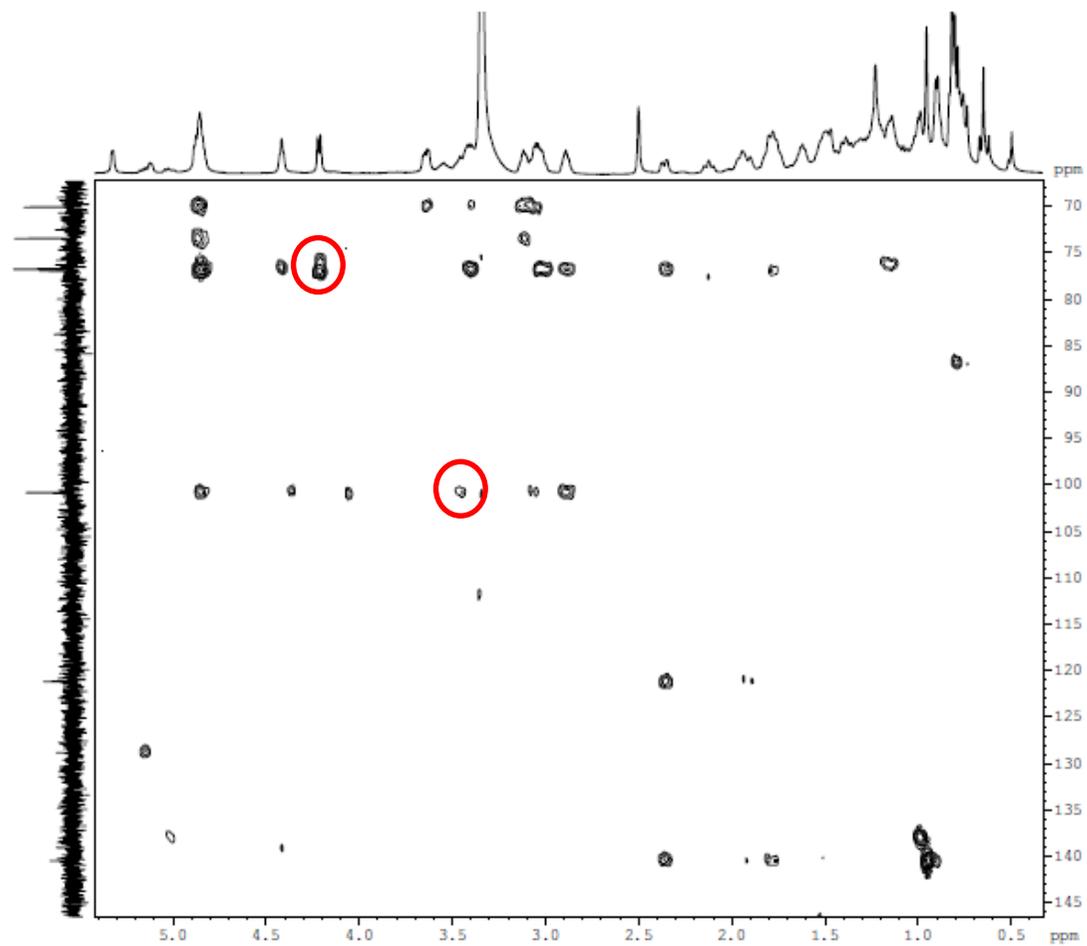


Figura 15. Espectro de expansão de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Ab-1, expansão da região 0,5 a 5,5 ^1H e 65 a 145 ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz).

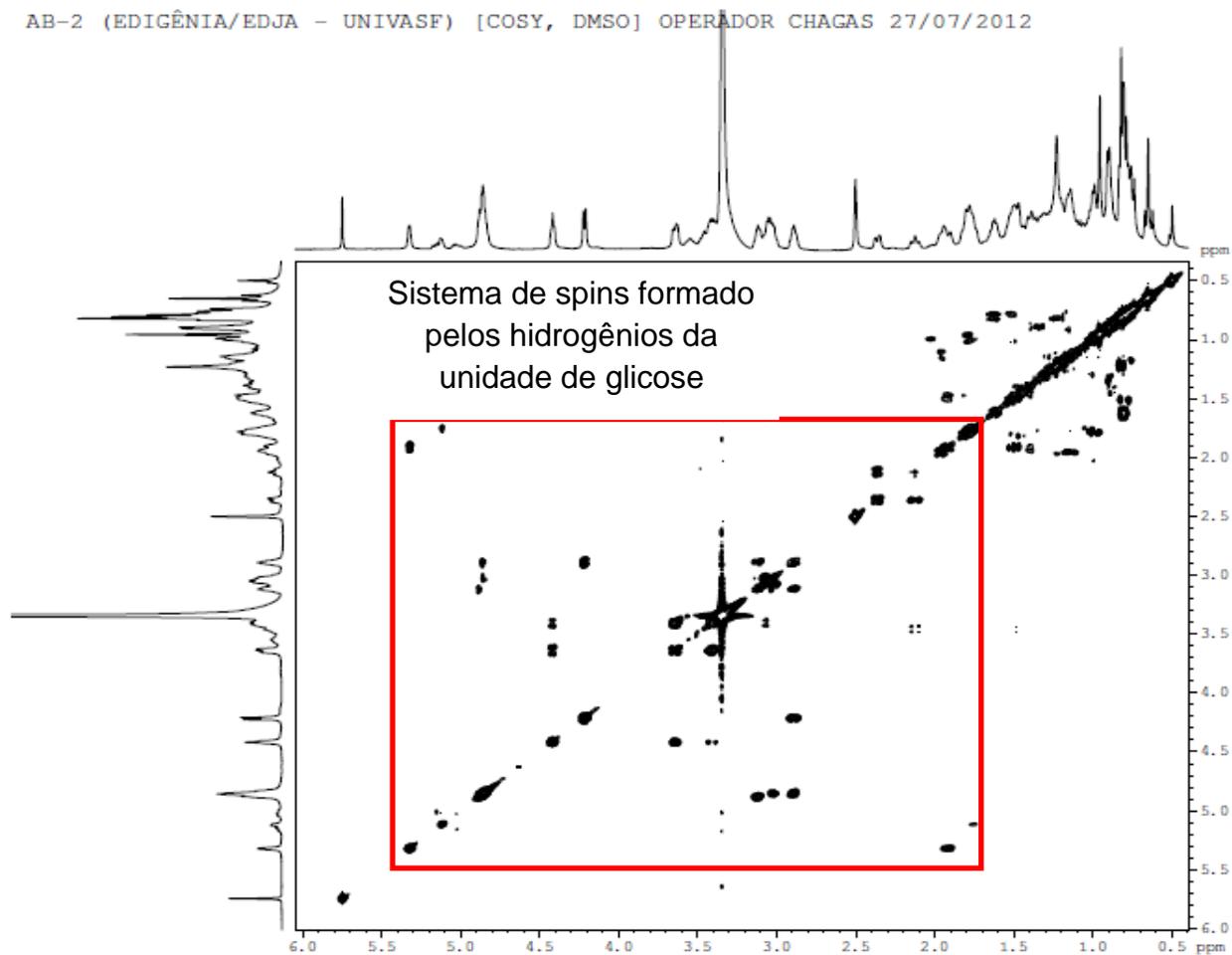


Figura 16. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Ab-1 (DMSO- d_6 , 500 MHz)

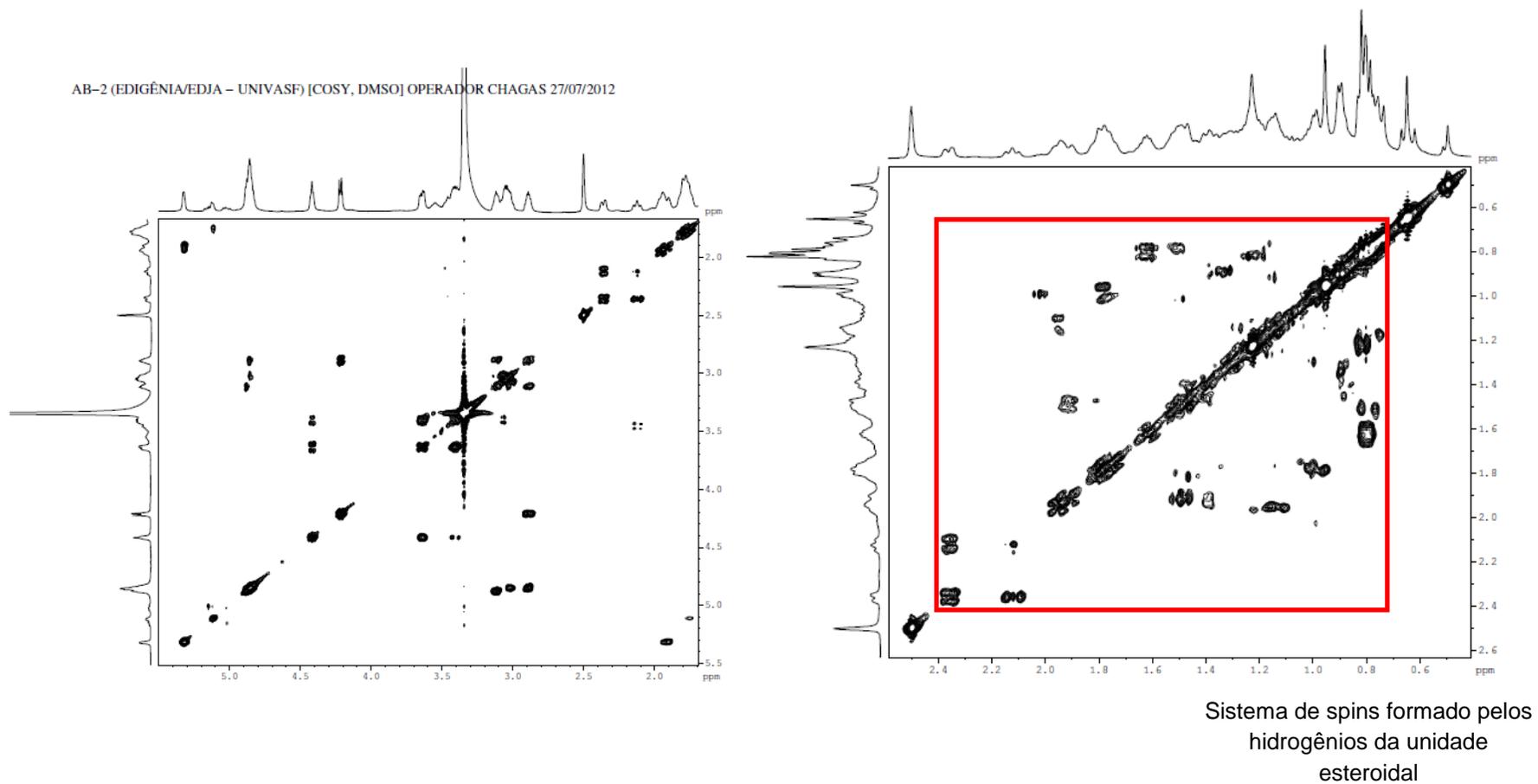


Figura 17. Expansões do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (DMSO- d_6 , 500 MHz).

As atribuições dos sinais dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram confirmadas pelo experimento bidimensional HSQC (Figura 18, pág.92). As correlações observadas estão dispostas na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4. Sinais de correlação observados no mapa de contorno HSQC obtidos para Ab-1.

Posição	^{13}C (δ)/Padrão de hidrogenação	^1H (δ)
1	36,8 (CH ₂)	1,72 e 1,00
2	29,2 (CH ₂)	1,80 e 1,46
3	77,0 (CH)	3,50
4	38,3 (CH ₂)	2,26 e 2,16
5	140,4 (C)	-
6	121,2 (CH)	5,3
7	31,4 (CH ₂)	1,90 e 1,40
8	31,4 (CH)	1,20
9	49,0 (CH)	0,89
10	36,2 (C)	-
11	20,6 (CH ₂)	1,40 e 0,85
12	39,7 (CH ₂)	1,94 e 1,15
13	41,8 (C)	-
14	56,2 (CH)	0,98
15	23,9 (CH ₂)	1,50 e 0,98
16	29,0 (CH ₂)	1,80 e 1,40
17	55,4 (CH)	1,10
18	11,8 (CH ₃)	0,86
19	18,9 (CH ₃)	0,95
20	35,5 (CH)	1,30
21	18,6 (CH ₃)	0,88
22	31,4 (CH ₂)	1,90 e 1,40
23	28,7 (CH ₂)	1,80 e 1,40
24	45,1 (CH)	0,92
25	28,7 (CH)	1,62
26	19,1 (CH ₃)	0,80
27	19,7 (CH ₃)	0,84
28	22,6 (CH ₂)	1,4 e 0,85
29	11,8 (CH ₃)	0,68
1'	100,8 (CH)	4,20
2'	73,5 (CH)	2,90
3'	76,7 (CH)	3,10
4'	70,1 (CH)	3,05
5'	76,2 (CH)	3,05
6'	61,0 (CH ₂)	3,7 e 3,4

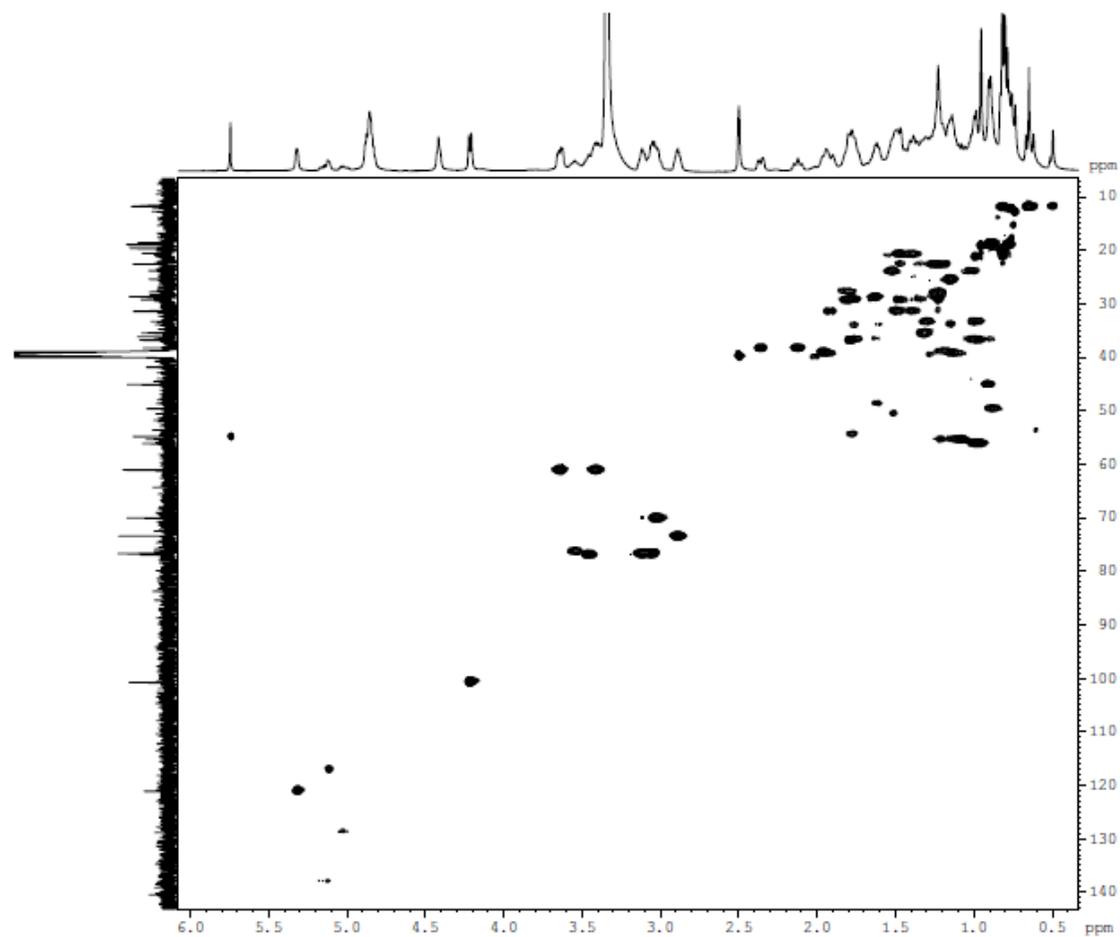


Figura 18. Espectro de correlação ¹H x ¹³C- HSQC de Ab-1 (DMSO-d₆, 500 MHz e 125 MHz)

5.2. Análise através das técnicas CLAE-DAD-IES-EM

Como foi citado no levantamento bibliográfico foram isolados compostos da classe dos flavonoides em espécies do gênero *Alternanthera* e, na perspectiva de identificação de flavonoides na espécie em estudo e, para auxiliar na justificativa dos resultados obtidos para as atividades antioxidante, fotoprotetora e antibacteriana, foi realizado um estudo metabolômico, que visa identificar um conjunto de metabólitos produzidos por um organismo.

Para tanto foram avaliadas as amostras Ab-EEB e Ab-AcOEt através da técnica hifenada de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). Estas amostras foram selecionadas para análise pois as mesmas deram teste positivo para flavonoides totais.

Os cromatogramas obtidos (Figura 19, pág.94) resultaram em informações do tempo de retenção e espectros de massas dos flavonoides presentes nas amostras.

Através da análise dos cromatogramas e espectros de massas foi possível identificar nas amostras três flavonoides, do tipo flavona, glicosilados que foram codificados como Ab-2, Ab-3 e Ab-4 de acordo com o tempo de retenção das substâncias na coluna (Tabela 5), conforme indicado nos cromatogramas (Figura 19, pág.94). A semelhança nos tempos de retenção possibilita à afirmação que a substância identificada seja a mesma.

Tabela 5. Substâncias identificadas nas amostras analisadas por CLAE-DAD-ESI-MS e os respectivos tempos de retenção na coluna.

Substâncias identificadas	Tempo de retenção (min)	
	Ab-EEB	Ab-AcOEt
Ab-2	20,2	19,9
Ab-3	35,9	36,6
Ab-4	38,5	38,4

O espectro de UV-DAD auxilia na detecção de flavonoides devido a sua faixa de absorção fazendo uma varredura entre 290-320 nm. Portanto nestes cromatogramas somente visualizamos substâncias que absorvem nesta faixa espectral.

Apesar da técnica de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensional (RMN 1D e 2D) ser a mais completa, que confere mais informações estruturais para uma inequívoca elucidação estrutural, as técnicas modernas de Espectrometria de Massas (EM) em conjunto com equipamentos de eficiente separação de constituintes em uma mistura, podem contribuir de forma significativa, já que permitem a análise de quantidades de amostra bem menores.

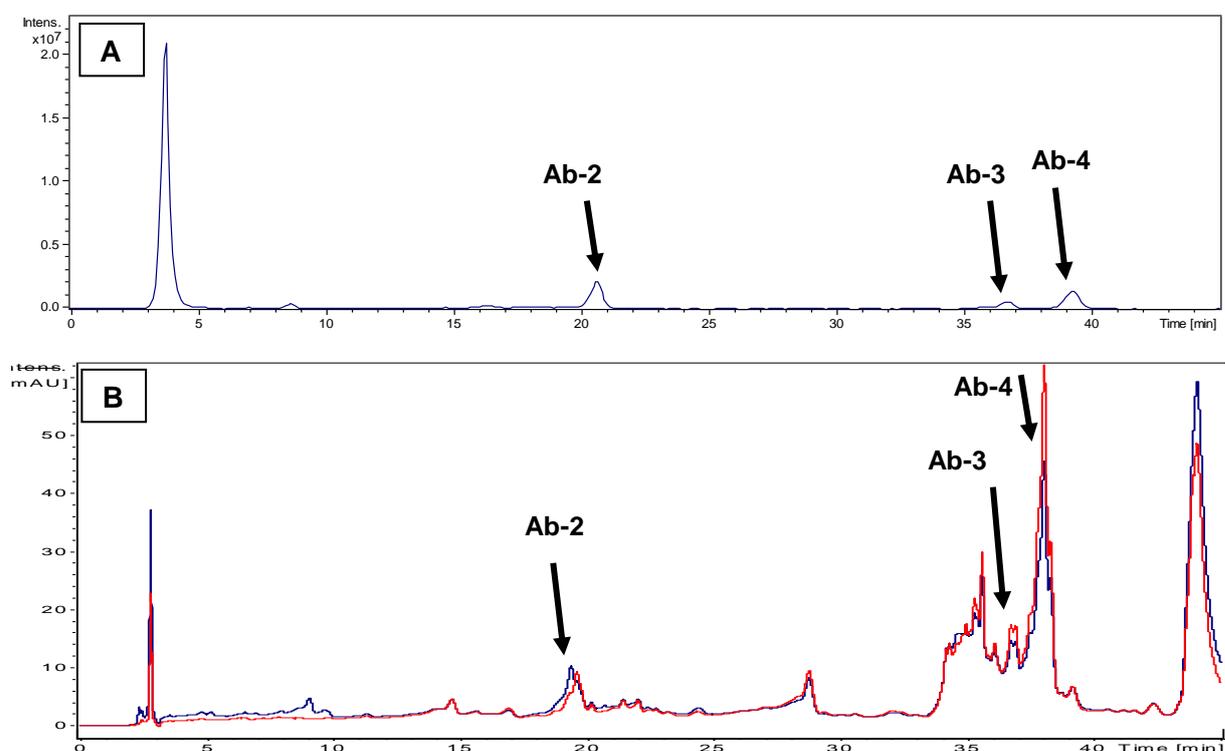


Figura 19. Cromatogramas de Ab-EEB (A) e Ab-AcOEt (B) obtidos após análise CLAE-DAD.

5.2.1 Proposta estrutural para Ab-2

A partir da análise dos dados obtidos e posterior comparação com a literatura (COLOMBO et al, 2008) foi possível identificar um dos constituintes como sendo o flavonoide vitexina acrescido de uma unidade de ramnose. A vitexina já foi isolada da espécie *A. maritima* (SALVADOR et al., 2004) por isto sugerimos que a estrutura em questão seja um derivado da vitexina com uma unidade glicosídica a mais (Figura 20), detectada nas amostras Ab-EEB e Ab-AcOEt (Figura 19, pág.94).

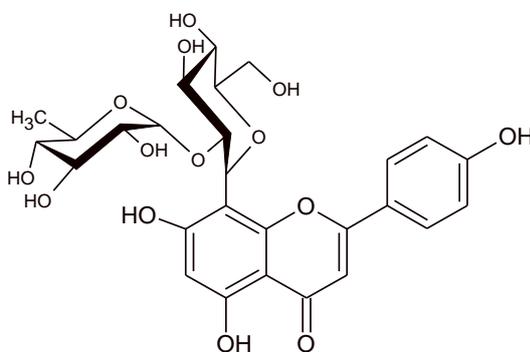


Figura 20. Estrutura da 2''-O-ramnosil vitexina

Para proceder à identificação da estrutura foi feita uma análise da massa (Figura 21, pág.96) através do pico do íon molecular (M). Como a ionização por eletronspray é no modo positivo então o pico do íon molecular (M) foi identificado como $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, massas do aduto protonado e do aduto de sódio, respectivamente.

A substância, denominada Ab-2, apresentou pico do íon molecular do aduto protonado em m/z 579 $[M+H]^+$ e m/z 601 $[M+Na]^+$ para o aduto de sódio, portanto uma massa de 578 u.m.a. da qual possibilitou chegar na fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{14}$ levando a fórmula estrutural da 2''-O-ramnosilvitexina.

A fragmentação do íon molecular $[M+H]^+$ forneceu um íon produto m/z 433 correspondente a perda de uma unidade de ramnose (146 u.m.a) e outro pico em m/z 271 condizente com a perda de uma unidade de ramnose (146 u.m.a.) e uma unidade de glicose (162 u.m.a.) resultando na aglicona (Figura 22,pág.97).

Os demais picos observados, no espectro de massas, mostram uma correlação semelhante à encontrada para a vitexina (COLOMBO et al, 2008). Na tabela 6 estão os dados de correlação do padrão de fragmentação para Ab-2 comparados a vitexina mostrando que a substância identificada neste estudo trata-se da vitexina acrescida de 146 u.m.a. o que caracteriza uma unidade ramnosídica.

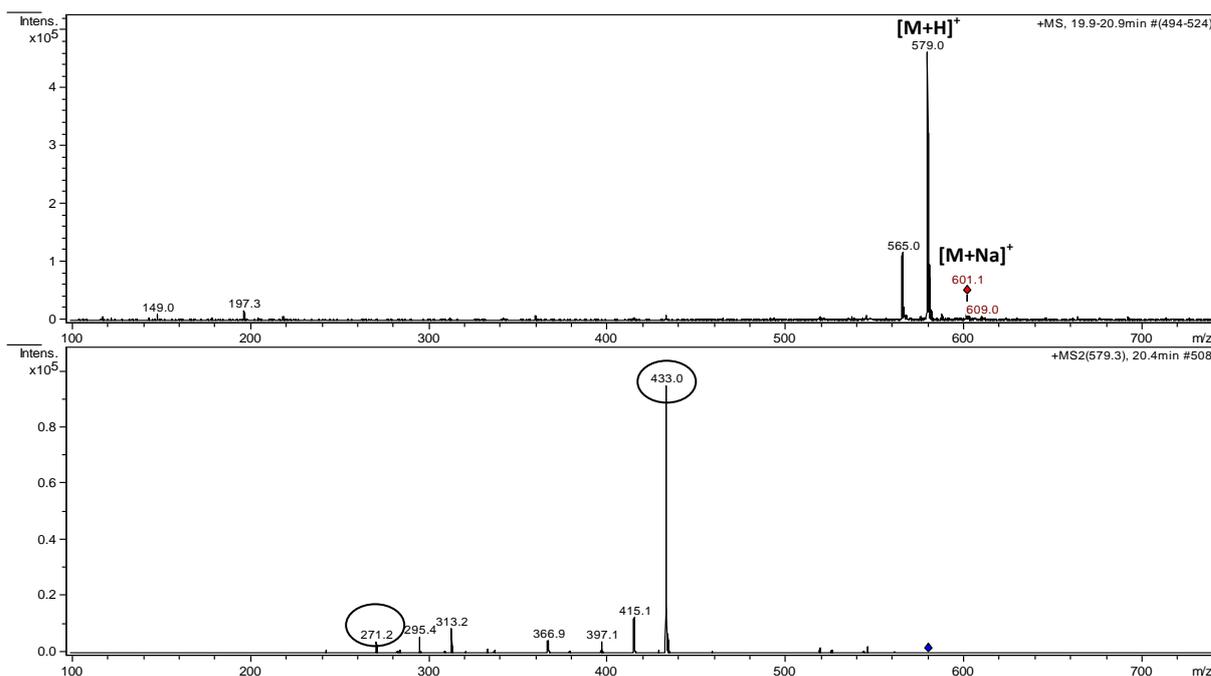


Figura 21. Espectros de massas de Ab-2 obtidos através de CLAE-DAD-ESI-MS/MS.

Tabela 6. Dados comparativos dos picos de fragmentação observados nos espectros de massas com a literatura Colombo et al.,(2008).

Ab-2 (m/z)	Vitexina (m/z)	Íons
579,0	-	[M+H] ⁺
433,0	433,1152	[M+H-146*] ⁺
415,1	415,1029	[M+H-Rha-18] ⁺
397,1	397,0925	[M+H-Rha-36] ⁺
366,9	367,0857	[M+H-Rha-30-36] ⁺
313,2	313,0711	[M+H-Rha-120] ⁺

* Ramnosil (Rha)

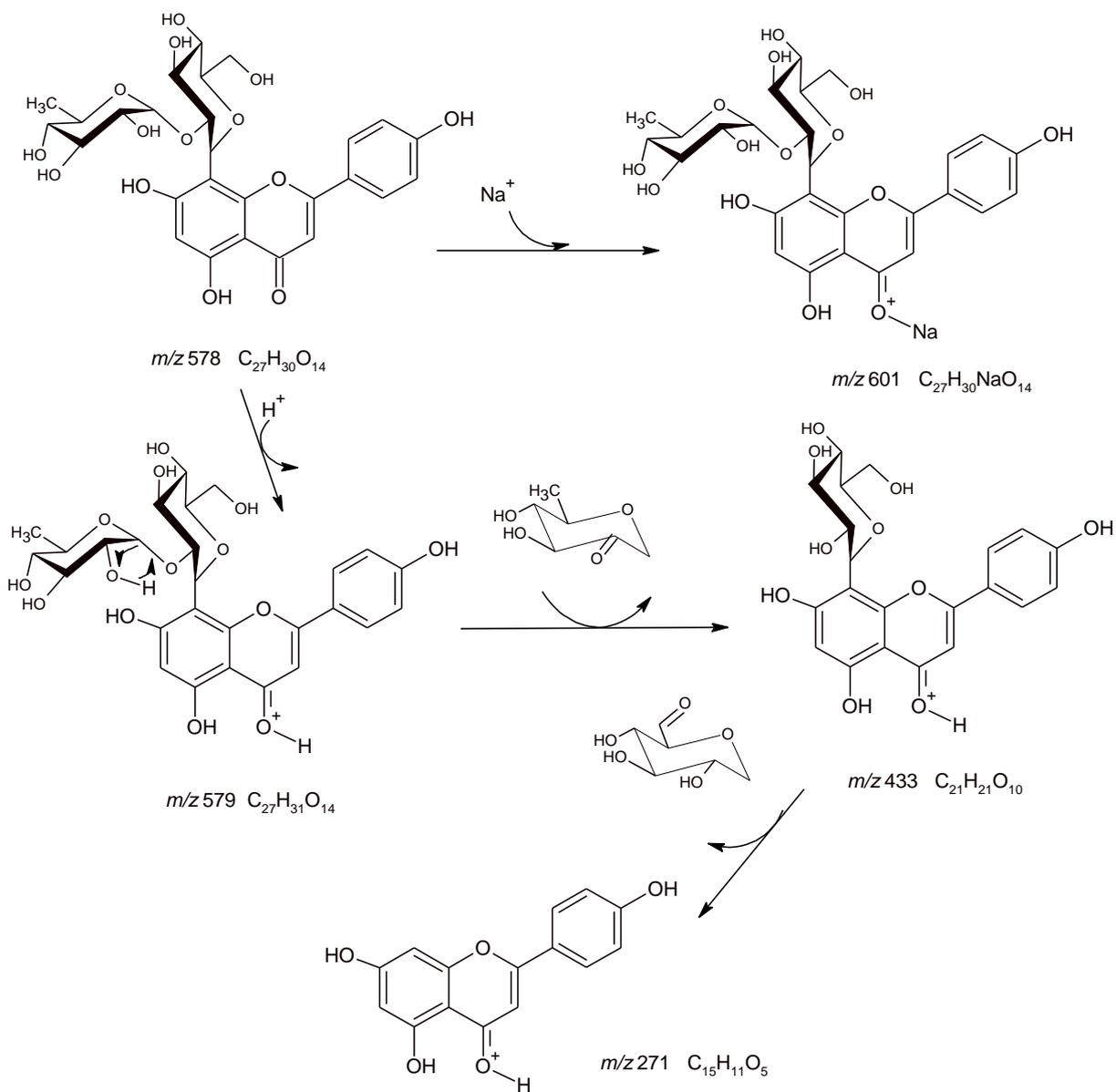


Figura 22. Possíveis caminhos de fragmentação para Ab-2.

5.2.2 Proposta estrutural para Ab-3

A análise estrutural de Ab-3 foi feita semelhante a Ab-2, comparando os picos do espectro com o padrão de dados informados por Colombo et al.,2008.

Os dados obtidos do MS/MS de Ab-3 (Figura 24,pág.99), seguiram o mesmo padrão observado para Ab-2 mostrando um pico m/z 621 $[M+H]^+$ e outro m/z 643 $[M+Na]^+$, referentes ao aduto protonado e de sódio, respectivamente. Desta forma ao eliminar os valores de massa atômica do aduto protonado e do aduto de sódio foi possível chegar a fórmula molecular $C_{30}H_{36}O_{14}$ referente a 620 unidades de massa atômica. Alguns tipos de oxigenação, como aqueles das posições dos carbonos 5,7,3' e 4', são sempre os mesmos para as duas classes(flavonas e flavonóis). Isto é devido ao fato de flavonas e flavonóis serem originários da mesma via biossintética (Simões et al.,2010).

O acréscimo na massa de Ab-3 em relação a Ab-2 possibilitou inferir a presença de metoxilas nas posições 5 e 7 do anel A e 4' do anel B da flavona. A análise dos tempos de retenção nos cromatogramas e fragmentos identificados no EM e EM2 possibilitou a identificação de Ab-3 nas amostras analisadas (Figura 25,pág 100).

A análise dos dados permitiu sugerir a estrutura da 4',5,7-trimetoxi-2''-O-ramnosil vitexina para Ab-3 (Figura 23).

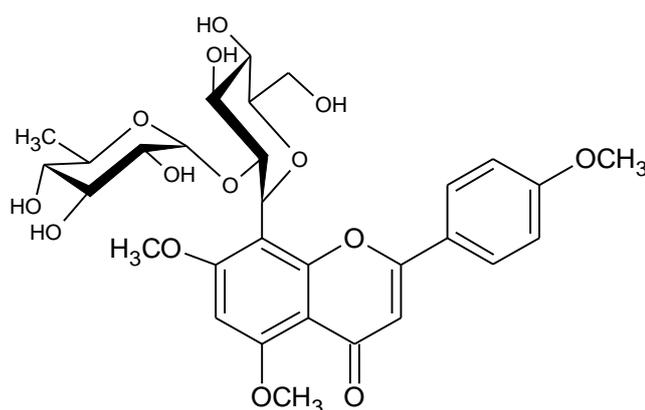


Figura 23. Estrutura da 4', 5, 7-trimetoxi-2''-O-ramnosil vitexina

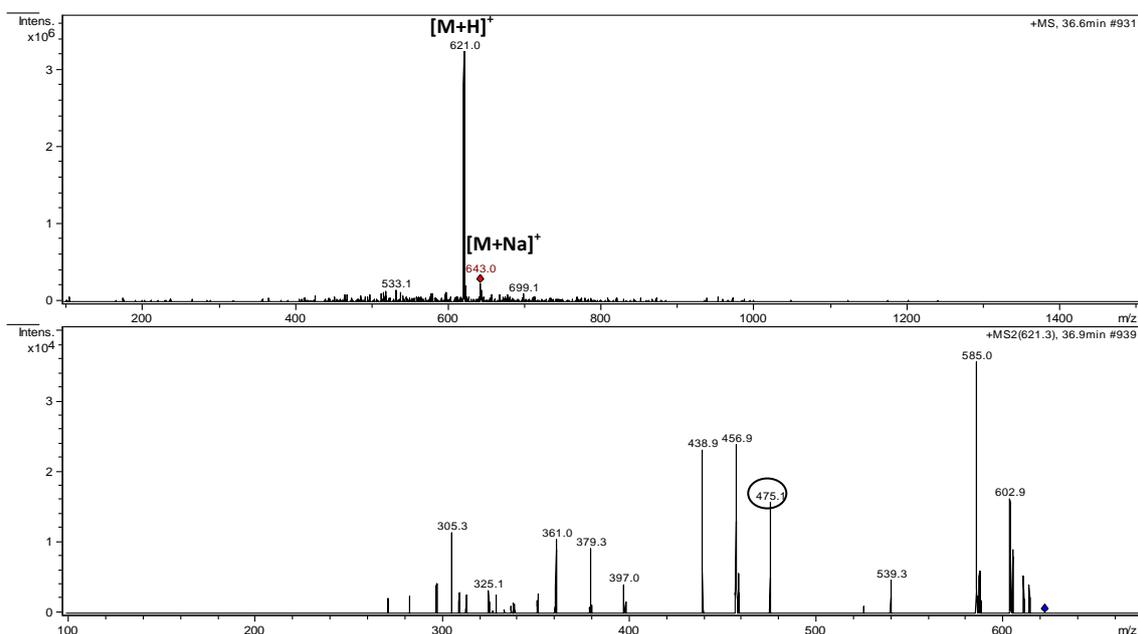


Figura 24. Espectros de massas de Ab-3 obtidos através de CLAE-DAD-ESI-MS/MS.

Tabela 7. Picos de fragmentação e possíveis íons observados nos espectros de massas de Ab-3.

Ab-3 (m/z)	Íons
621,0	$[M+H]^+$
475,1	$[M+H-146^*]^+$
456,9	$[M+H-Rha-18]^+$
438,9	$[M+H-Rha-36]^+$
379,3	$[M+H-Rha-96]^+$
325,1	$[M+H-Rha-150]^+$
313,0	$[M+H-Rha-162]^+$

* Ramnosil (Rha)

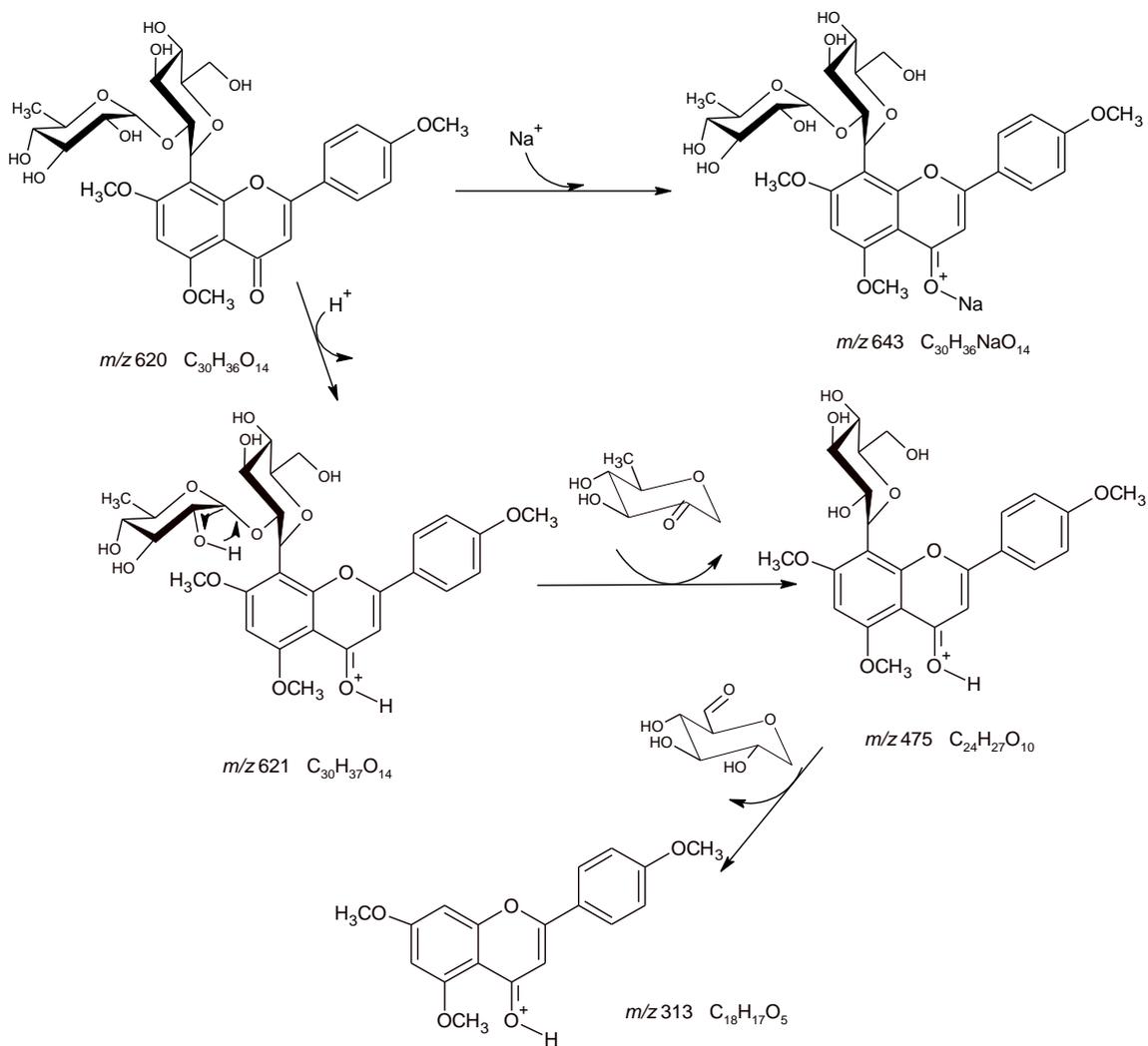


Figura 25. Possíveis caminhos de fragmentação para Ab-3.

5.2.3 Proposta estrutural para Ab-4

O espectro de massas de Ab-4 apresentou m/z 725 $[M+H]^+$ e m/z 747 $[M+Na]^+$, desta forma ao eliminar os valores de massa atômica do aduto protonado e do aduto de sódio foi possível chegar a fórmula molecular $C_{33}H_{40}O_{18}$ referente a 724 unidades de massa atômica.

A análise dos tempos de retenção nos cromatogramas e fragmentos identificados no EM e EM2 (Figura 28,pág.103) possibilitou a identificação de Ab-4 nas amostras analisadas.

A sugestão de estrutura para Ab-4 é da Ligustroflavona (Figura 26), uma flavona oxigenada nas mesmas posições das identificadas anteriormente e O-glicosilada na posição 7.

A figura 27,pág.102 mostra os espectros de massas EM e EM2 para Ab-4 com os picos característicos da fragmentação e a tabela 8, pág.102 mostra os possíveis íons fragmentados.

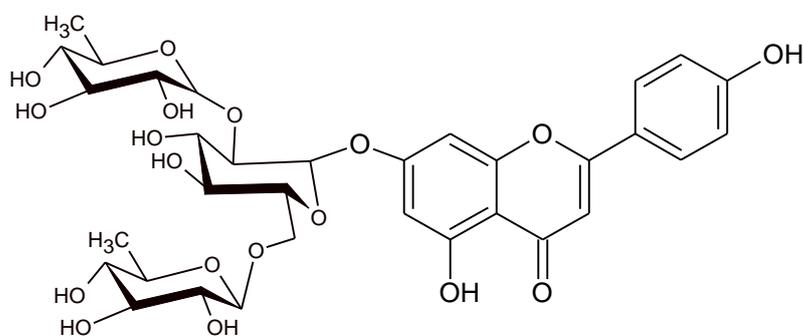


Figura 26. Estrutura da Ligustroflavona

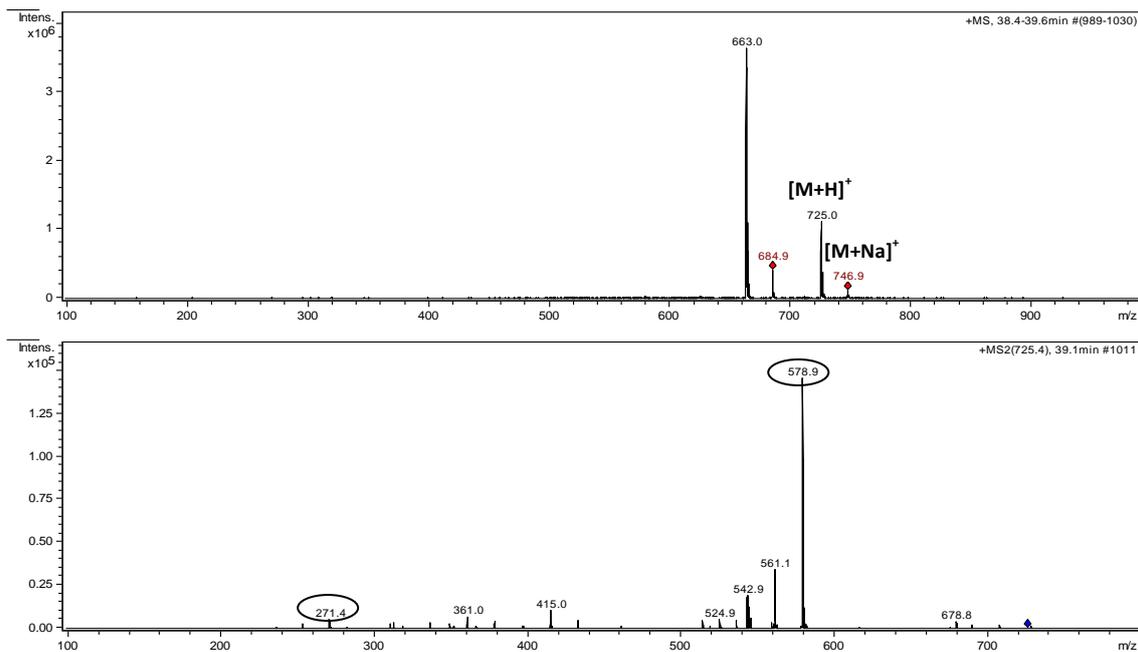


Figura 27. Espectros de massas de Ab-4 obtidos através de CLAE-DAD-ESI-MS/MS.

Tabela 8. Picos de fragmentação e possíveis íons observados nos espectros de massas (EM/EM2) de Ab-4.

Ab-4 (m/z)	Íons
725,0	[M+H] ⁺
578,9	[M+H-146*] ⁺
561,1	[M+H-Rha-18] ⁺
542,9	[M+H-Rha-36] ⁺
524,9	[M+H-Rha-54] ⁺
271,4	[M+H-Rha-146-162] ⁺

* Ramnosil (Rha)

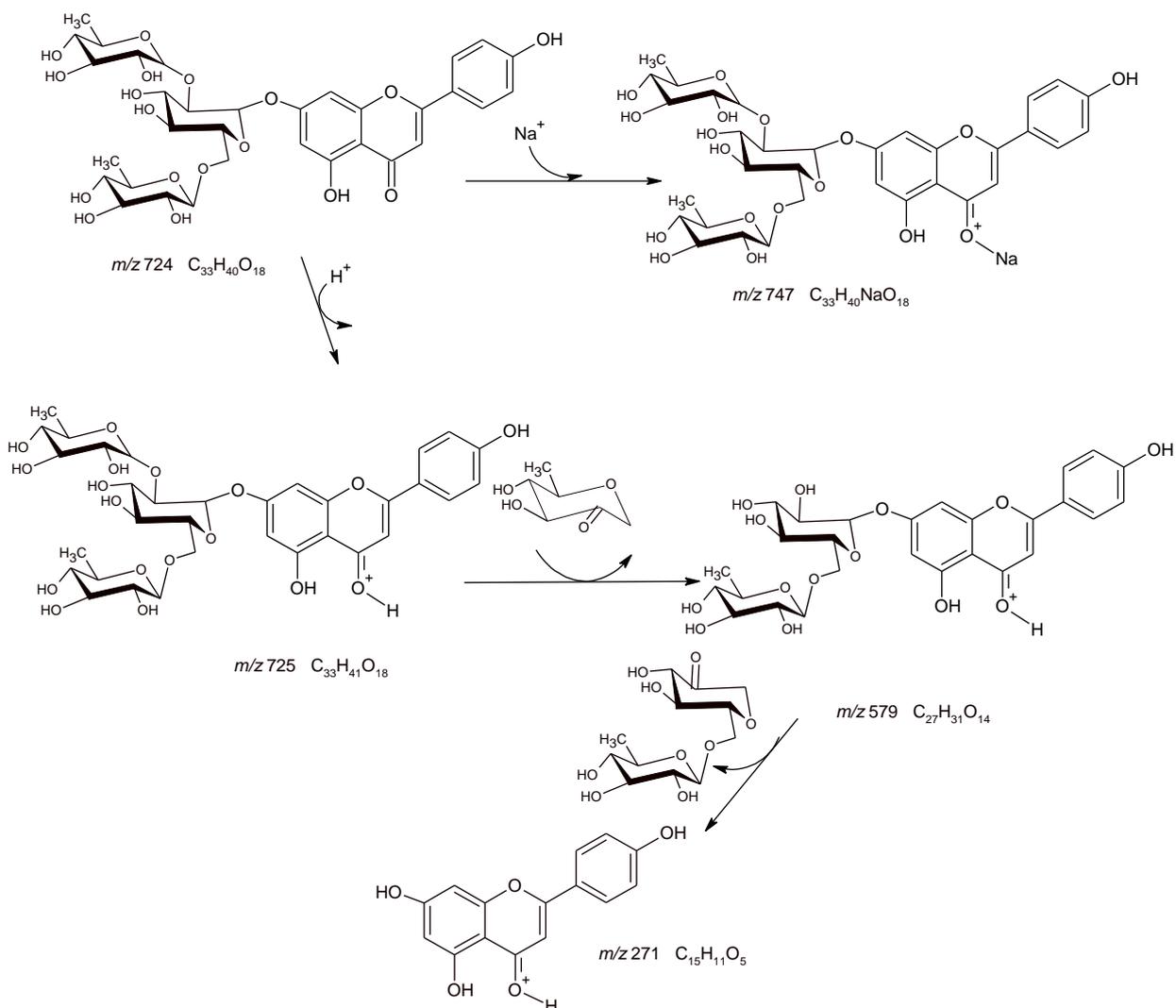


Figura 28. Possíveis caminhos de fragmentação para Ab-4.

5.3. Fenóis totais, flavonoides totais

A partir destes testes verificou-se que, a fase acetato de etila (Ab-AcOEt) foi o valor mais relevante pois apresentou o maior teor de fenóis totais $167,40 \pm 34,12$ mg EqAG/g e o maior teor de flavonoides totais $87,06 \pm 1,25$ mg EqC/g, Como descrito na tabela 9 abaixo.

Através do experimento de flavonoides totais podemos conjeturar que aproximadamente 50% do conteúdo fenólico deve corresponder a metabólitos secundários da classe dos flavonoides (Tabela 9, abaixo).

Tabela 9. Determinação de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FlaT) de Ab-EEB, fases (Ab-Hex, Ab-CHCl₃, Ab-AcOEt) *A. brasiliana*.

Amostras	FT (mg EqAG/g)	FlaT (mg EqC/g)
Ab-EEB	$81,77 \pm 2,08$	$92,90 \pm 35,22$
Ab-Hex	$69,43 \pm 33,38$	---
Ab-CHCl₃	$72,43 \pm 2,89$	---
Ab-AcOEt	$167,40 \pm 34,12$	$87,06 \pm 1,25$

5.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Os dados mostram que Ab-AcOEt apresentou excelente atividade captadora de radicais livre com um valor de IC₅₀ de $28,90 \pm 1,03$ µg/ml. A maior atividade antioxidante presente na fase acetato de etila é perfeitamente explicável pelo fato dela ser a fase mais polar dentre as obtidas. Esse tipo de atividade é geralmente atribuída a presença de grupamentos fenóis nas moléculas de seus constituintes, o que também justifica sua alta polaridade. As fases, hexânica e clorofórmica, não apresentam tamanho grau de polaridade, portanto, a atividade antioxidante proporcionada por fenóis, provavelmente, não será encontrada nestas fases.

A atividade antioxidante do extrato Ab-EEB e das fases Ab-Hex, Ab-CHCl₃ e Ab-AcOEt, também foi avaliada pelo método de branqueamento de β-caroteno. Nesse modelo as amostras apresentaram elevada atividade antioxidante (41 – 81 %) e a fração mais ativa foi a Ab-Hexano com a percentagem da atividade antioxidante de 81,82 ± 15,91 %.

A Tabela 10 abaixo, expressa os resultados sobre a atividade antioxidante das amostras testadas em comparação com dados obtidos na quantificação de fenóis e flavonoides totais.

Tabela 10. Determinação de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FlaT) e atividade antioxidante *in vitro* de Ab-EE, Ab-Hex, Ab-CHCl₃, Ab-AcOEt e dos padrões ácido ascórbico, BHA e BHT

	FT (mg EqAG/g)	FlaT (mg EqC/g)	DPPH (CE ₅₀ , µg/ml)	β-carotene (% AA)
Ab-EEB	81,77 ± 2,08	92,90 ± 35,22	190,30 ± 28,31	41,72 ± 1,57
Ab-Hex	69,43 ± 33,38	---	226,10 ± 17,99	81,82 ± 15,91
Ab-CHCl₃	72,43 ± 2,89	---	173,20 ± 8,97	73,70 ± 13,18
Ab-AcOEt	167,40 ± 34,12	87,06 ± 1,25	28,90 ± 1,03	73,70 ± 10,96
Ácido ascórbico	---	---	9,72 ± 4,33	5,19 ± 5,38
BHA	---	---	2,31 ± 0,18	102,90 ± 3,87
BHT	---	---	0,27 ± 0,06	56,01 ± 6,48

Os valores de CE₅₀ foram obtidos por interpolação a partir da análise de regressão linear com 95% de nível de confiança. CE₅₀ é definido como a concentração suficiente para se obter 50% de uma estimativa de efeito máximo em 100%. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n= 3).

Os dados obtidos dão novas informações sobre o potencial antioxidante e concentração de polifenóis da espécie *A. brasiliana* que têm sido utilizada tradicionalmente como planta medicinal.

5.5. Atividade antibacteriana

Os resultados para a avaliação da atividade antibacteriana do EEB e das fases para os extratos de *A. brasiliana* estão apresentados na Tabela 11, pág.107, e são expressos como a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). A atividade antibacteriana foi avaliada contra oito bactérias de referência. As amostras testadas mostraram eficazes principalmente, contra as bactérias *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*. O extrato etanólico bruto (Ab-EEB) e a fase clorofórmica (Ab-CHCl₃) mostraram perfil antibacteriano mais satisfatório em relação a outras frações. A atividade significativa do extrato etanólico bruto (Ab-EEB) pode ser justificada pelo sinergismo entre os componentes presentes no extrato. Este estudo mostra que os extratos de *A. brasiliana* tem atividade antibacteriana contra bactérias que causam infecções graves na pele, trato gastrointestinal e respiratório, concordando com o uso popular para cicatrização de feridas e na forma de xarope para combater doenças respiratórias.

Tabela 11. Atividade Antibacteriana de extratos e fases de *Alternanthera brasiliana*.

Microrganismo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)					CBM ($\mu\text{g/mL}$)				
	EtOH	Hexane	CHCl_3	AcOEt	GEN	EtOH	Hexane	CHCl_3	AcOEt	GEN
<i>Bacillus cereus</i>	*	*	*	*	0,400	3,12	**	6,25	6,25	0,400
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,12	3,12	0,78	3,12	0,400	3,12	3,12	6,25	3,12	0,400
<i>Escherichia coli</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,400
<i>klebsiella pneumoniae</i>	3,12	3,12	3,12	1,56	0,050	3,12	312	3,12	3,12	0,050
<i>Salmonela choleraesuis</i>	3,12	3,12	1,56	**	0,050	3,12	6,25	6,25	**	0,050
<i>Serratia marcescens</i>	1,56	3,12	1,56	1,56	*	3,12	3,12	1,56	1,56	0,025
<i>Shigella flexneri</i>	0,78	0,78	*	*	*	1,56	3,12	1,56	*	0,025
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	*	*	*	0,025	*	*	*	*	0,025

CIM: concentração inibitória mínima. CBM: concentração bactericida mínima. Os valores estão expressos em mg/mL e indicam até qual concentração a amostra foi efetiva. (*): ausência de crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas.

5.6. Atividade Fotoprotetora

Os importantes resultados das amostras nos modelos de atividade antioxidante nos levaram a avaliar sua atividade fotoprotetora. A Figura 29, pág. 109 mostra o perfil de absorção espectrofotométrica dos extratos de *A. brasiliana*. Analisando os dados pode ser observado que a fase Ab-AcOEt apresentou bandas de absorção características nas regiões UVC, UVB e UVA, indicando uma possível atividade fotoprotetora de um modo concentração dependente, o que sugere um possível potencial fotoprotetor. Estes resultados podem ser justificados pelo alto teor de flavonoides presentes em Ab-AcOEt. O comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$) com bandas de absorção na região UVA, foi observado para todas as outras amostras de Ab-EEB, Ab-Hex e Ab-CHCl₃ (Figura 29,pág.109). De acordo com a literatura, o conteúdo de flavonoides produzidos por uma planta é considerado um fator importante para a protecção de plantas contra a radiação ultravioleta (SOUZA et al., 2005). O FPS *in vitro* foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (1986), usando a região UVB. A radiação UVB, responsável pelo bronzeado indireto, é mais nociva, potencializando os efeitos da radiação UVA e causando danos ao DNA (DE PAOLA, 2001). Na Figura 30, pág.110 pode-se observar que a fase Ab-AcOEt apresentou maior FPS na concentração de 100 mg/L ($11,320 \pm 3,47$). Os dados sugerem que os efeitos fotoprotetores dos extratos ocorrem de forma concentração dependentes, ou seja, quanto maior a concentração dos extratos em solução, maior será o FPS e, conseqüentemente, a atividade fotoprotetora. Embora o teste tenha sido realizado *in vitro*, já foi demonstrado que este método se correlaciona bem com os ensaios *in vivo*, porque relaciona a absorção da substância em questão eritematogênica com o efeito da radiação e da intensidade de luz em determinados comprimentos de onda entre 290 e 320 nm (região UVB) (VIOLANTE et al, 2009). Estes resultados corroboram e comprovam o uso desta espécie pela população contra injúrias de pele.

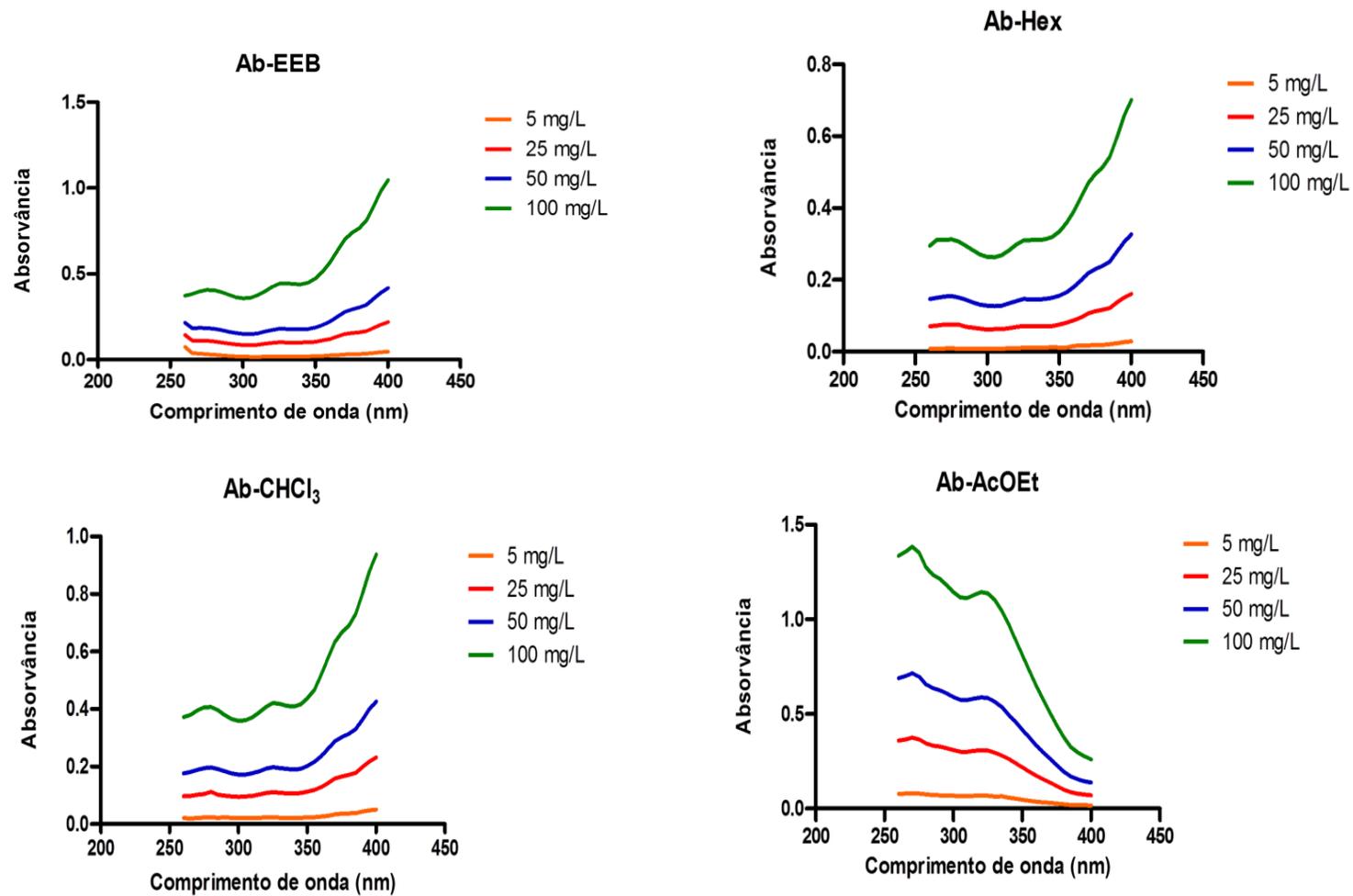


Figura 29. Absorção espectrofotométrica dos extratos secos das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze.(260 – 400 nm).

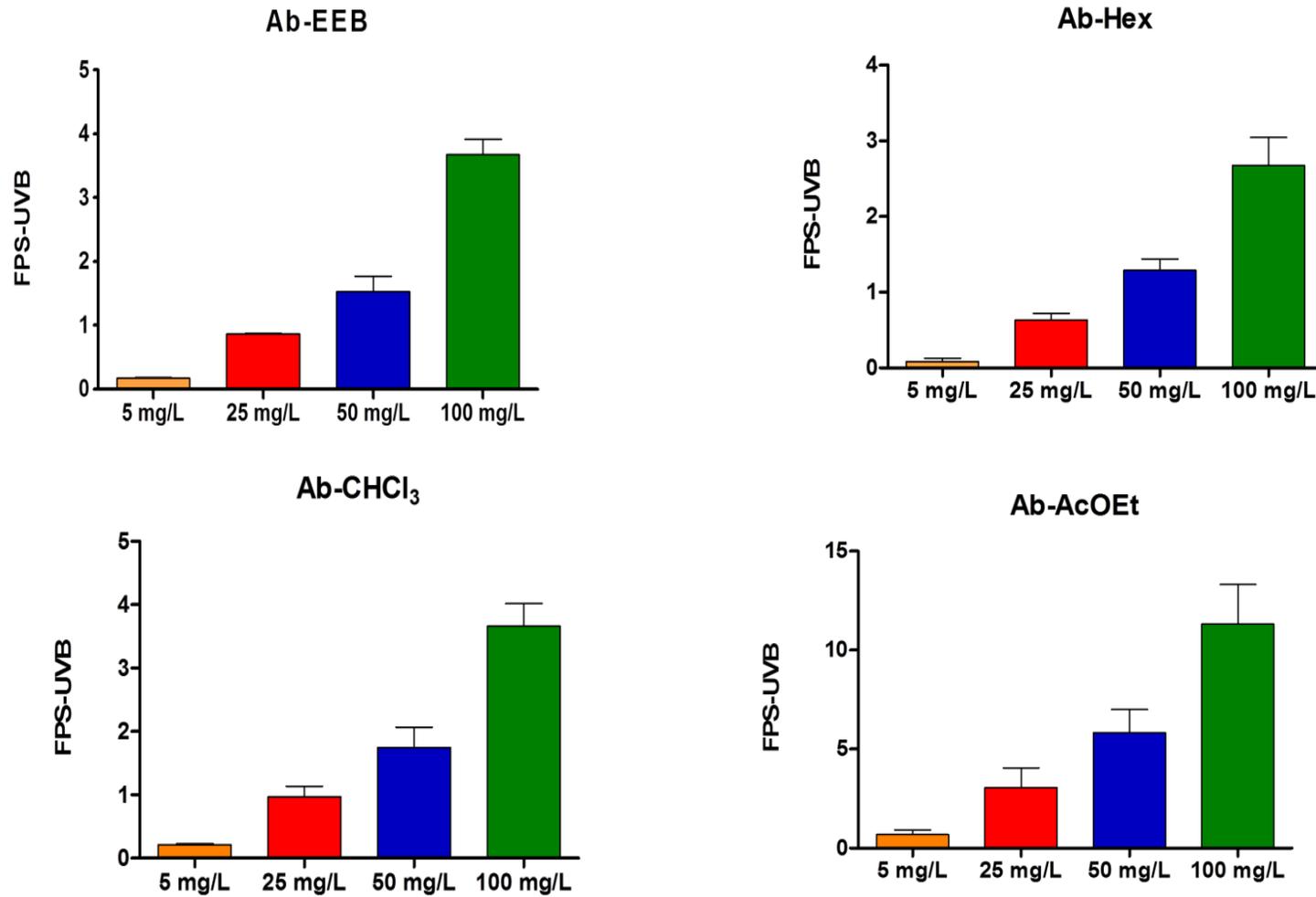


Figura 30. Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* dos extratos secos das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusão

A partir do ensaio de Fenóis Totais, verificou-se que Ab-AcOEt foi a amostra com resultados mais relevantes, que apresentou maior teor de fenóis totais ($167,40 \pm 34,12$), seguido do, Ab-EEB ($81,77 \pm 2,08$) e Ab-CHCl₃ ($72,43 \pm 2,89$).

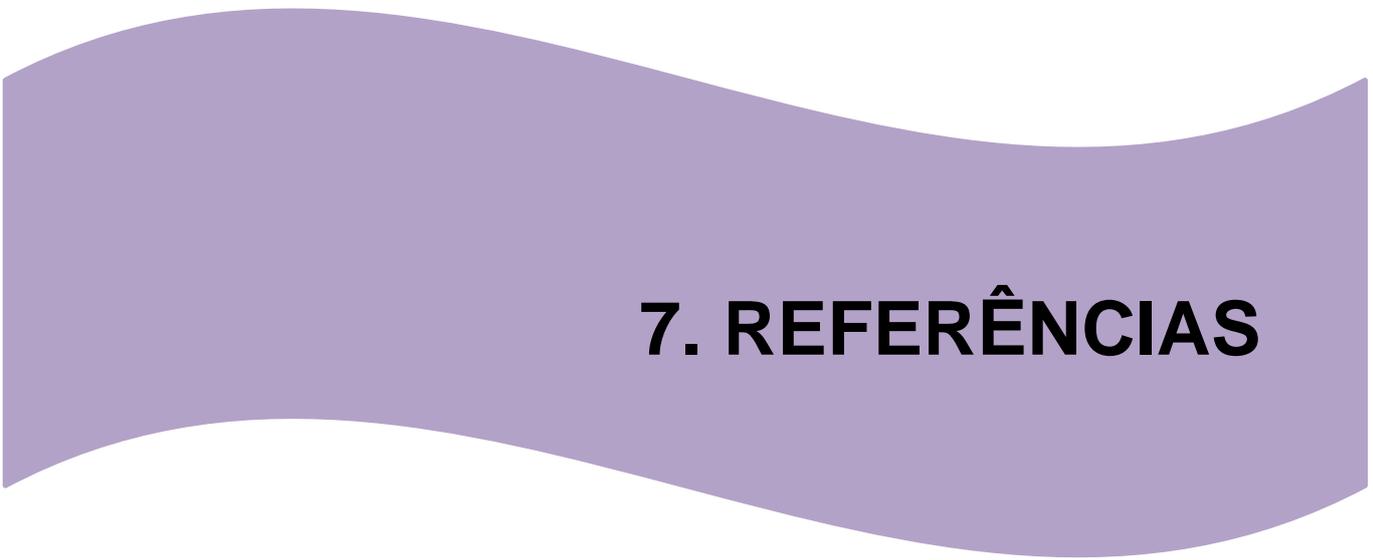
No teste da atividade antioxidante, usando o modelo do sequestro do radical DPPH, o extrato Ab-AcOEt apresentou excelente atividade captadora de radicais livres com um valor de IC₅₀ de $28,90 \pm 1,03$ µg/ml. Já no segundo modelo, o da inibição da co-oxidação do β-caroteno as amostras apresentaram elevada atividade antioxidante (41 – 81%) e a fase que foi mais ativa foi a Ab-Hex com a percentagem da atividade antioxidante de $81,82 \pm 15,91$ %.

Na atividade antibacteriana, os extratos mostraram efeito principalmente frente às bactérias *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*, para a determinação do CIM o extrato etanólico bruto (Ab-EEB) e a fase clorofórmica (CHCl₃) foram as que mostraram perfil antibacteriano mais satisfatório em relação a outras frações. A atividade significativa do (Ab-EEB) pode ser justificada pelo sinergismo entre os componentes nele presentes. Este estudo mostrou que os extratos de *A. brasiliana* tem atividade antibacteriana contra bactérias que causam infecções graves na pele, trato gastrointestinal e respiratório, corroborando com o uso popular da planta para a cicatrização de feridas e como xarope utilizado para o tratamento de doenças respiratórias.

Na avaliação da atividade fotoprotetora a Ab-AcOEt se destacou apresentando bandas de absorção características nas regiões de UVC, UVB e UVA e FPS em torno de 11, levando em consideração essa informação, a fase Ab-AcOEt pode ser considerada com ação fotoprotetora. Os teores de fenóis totais e, principalmente, de flavonoides totais, podem estar relacionados com atividade fotoprotetora de Ab-AcEOt.

Neste estudo foi possível à identificação de quatro substâncias, um esteroide (β- Sitosterol Glicosilado) e três flavonoides glicosilados (2''-O-ramnosilvitexina, 4',5,7 trimetoxi-2''-O-ramnosilvitexina e a Ligustroflavona). O esteróide foi identificado a partir das análises dos dados espectrais de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, e comparação com dados da literatura e os flavonoides glicosilados a partir do CLAE-DAD-IES-EM e comparação com dados da literatura.

Alternanthera brasiliana mostrou-se uma espécie muito interessante do ponto de visto farmacológico, o estudo contribuiu também para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Alternanthera* e da família Amaranthaceae.



7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. G. S.; OLIVEIRA, M. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; RIBEIRO, L. A. A.; LÚCIO, A. S. S. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **International Journal of Pharma and BioSciences**, v.2, n.4, p. 367-374, 2011.

ATOUI, A. K. et al. Food Chem. 2005, 89, 27; BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; **Quimica Nova** 2006, 29, 113.

BANERJI, A. *et al.* Isolation of ecdysterone from Indian plants. **Phytochemistry**. v.10, P.2225-2226, 1971.

BOUIC, P. J. D.; LAMPRECHT, J. H. Plant sterol and sterolins: A review of their immune - modulating properties. **Alternative Medicine Review**, v. 4, p. 170-177, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; **Lebensm.- Wiss. Technol.** 1995, 28, 25.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. Brasília, 2004.

BROCHADO, C. O. *et al.* Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on Lymphocyte Proliferation In vitro. **J.Braz.Chem.Soc.** v.14, n.3, p.449-451, 2003.

CAETANO, N. *et al.* Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12 (Supl.), p.132-135, 2002.

CAI, Y, et al. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **J. Agric. Food Chem.** V.51,p. 2288-2294, 2003.

_____. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Tren . Food Sci. Tchnol.** V.16, p.370-376,2005.

CALDERÓN, C.P.; GARCIA ASSEF, S.B.; FUENTES, L.B. Evaluation of Diuretic Activity of *Alternanthera pungens* Extracts in Rats. **Phytotherapy Research.** V.11, p.606-608, 1997.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Em *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; Argos Ed. Universitária: Chapecó, 2001.

CHUN, S.-S.; VATEM, D. A.; LIN, Y.-T.; SHETTY, K.; **Process Biochem.** 2005,40, 809.

COLOMBO, R., YARIWAKE, J.H. MC CULLAGH, M. Study of C- and O glycosylflavones in Sugarcane Extracts using Liquid Chromatography - Exact Mass Measurement Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 19, No. 3, 483-490, 2008.

CONNER D.E. (1993). Naturally occurring compounds. In: Antimicrobials and Foods, Davidson P.M., Branem A. L. Eds., Dekker: New York, 441-468.

DALMÁZIO, I. Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray no Monitoramento de Processos Oxidativos Avançados de Interesse Ambiental: Degradação de Fármacos, Avaliação de Sistemas Oxidativos e Oxidação do Isopreno. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2007.

DELAPORTE, R. H. *et al.* Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) kuntze e *Bouchea fluminense* (vell) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 15(2): 133-136, abr/jun, 2005.

DIDRY N., DUBREUIL L., PINKAS M. (1993). Activé antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés (Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde singly or in combinations), **Pharmazie** 48:301-304.

DINIZ, MARIA ELISA ROMANELLI, Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas, **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Belo Horizonte ,2011.

DOLE, M., L. L. Mack, et al. Molecular Beams of Macroions. **Journal of Chemical Physics**, v.49,n.5, p.2240-2249. 1968.

DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; TANARGO, J. Vasodilatador effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. **European Journal Pharmacology**, v. 239, p. 1-7, 1993.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência, Campinas**, v. 7, 2006.

EL-AGAMEY, A. et al. Arch. Biochem. Biophys. 2004, 430, 37;

ENSMINGER, A. Spectromètres de masse quadripolaires pour le couplage avec la chromatographie gazeuse et la chromatographie liquide: principaux appareils disponibles sur le marché français. **Analisis**, v. 26, n. 2, p. M42-M51, 1998

FERREIRA, E. O.; DIAS,D. A. A methyllenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*. **Phytochemistry**. v.53, P. 145-147, 2000.

FREITAS, T. Ecologia da polinização de *Chrysobalanus icaco* L.(chrysobalanaceae): uma espécie fixadora de dunas. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço - MG**

GARCIA,S. B.; CALDERÓN, C. P.; FLUENTES, L. B. Preliminary evaluation of the gastrointestinal activity of *Alternanthera pungens*.**Fitoterapia**.v.66, p.324-327, 1995.

HARBORNE,J.B. Methods in plant biochemistry. V.1.**Plant phenolics**.London: Academic Press, 1989.

HASLAM, E.; **J. Nat. Prod.** 1996, 59, 205.

HECK, A. J. R.; Van den Heuvel, R. H. H. **Mass Spectrom. Rev.** 2004, 23, 368-389.

HEINRICH, M.; **Phytother. Res.** 2000, 14, 479.

HELANDER I.M. et al. 1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria, **J. Agric. Food Chem.** 46: 3590-3595.

HOFFMAN, E; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. **Chichester: John Wiley & Sons Chichester**, UK. Third Edition. 2007.

HOLLMAN, P. C. et al. Relative Bioavailability of the flavonoide quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. n. 418, p. 152-156, 1995.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C.; **Princípios ativos de plantas superiores**, Ed. UFSC ar: São Carlos, 2003, cap. 1.

HUANG LH, WANG BG. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **J Agric Food Chem** 2004;58:4993-7.

IARC/WHO. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Working Group on the Evaluation of Cancer-preventive Agents. Sunscreens. IARC Handbooks of cancer prevention. Lyon, 2001.

IKAWA, M. et al. **J. Agric. Food Chem.** 2003, 51, 1811.

JANSEN A.M., SCHEFFER J.J.C., BAERHEIM S. A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, **Pharmazie** 45: 70.

JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, p. 326-337, 2006. Disponível em: <<http://www.doaj.org/doaj?func=openurl&genre=journal&issn=01004042&volume=29&issue=2&date=2006>> Acessado em: 21 janeiro 2013.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: Basf, T.II 1999, 976 p.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2351-2355, 1990.

KONE, W.M. et al. Traditional medicine in North Côte d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol**, v.93, p.43-49, 2004.

LAGROTA, M. H. C. et al. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the herpes Simplex vírus. **Phytotherapy Research**. V.8, p. 358-361, 1994.

LEVSEN, K.; PREISS, A.; GODEJOHANN, M. Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to complex environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 27-48, 2000.

LIEN EJ, REN S, BUI HH,WANG R. Quantitative structureactivity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radic Biol Med** 1999; 26(3-4):285-94.

LIMA A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*caryocar brasiliense*, camb.). **Tese**. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo; 2008.

LIMA, G. G. B.; A conservação da fauna e da flora silvestres no Brasil: a questão do tráfico ilegal de plantas e animais silvestres e o desenvolvimento sustentável. **Revista Jurídica**, Brasília, DF, v. 9,n. 86, p. 134-150, 2007. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/revista/Rev_86/Artigos/PDF/GabrielaGarcia_rev86.pdf> Acessado em: 21 janeiro 2013.

LOO, J. A. **Int. J. Mass Spectrom.** 2000, 200, 175-186.

LORENZI, H.; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil** – nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum do Estudo da Flora, 2002. 511 p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; **Quim. Nova** 2002, 25, 429.

MAIGA, A. et al. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. **J. Ethnopharmacol**, v.96, p.183-193, 2005.

MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, REMESY C, JIMENEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 2004;79(5):727-47.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M.C. d'A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol.**, v.61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARTÍNEZ-FLOREZ, S. et al. J. Revisión: Los Flavonoids: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MELO E. A.; MACIEL MIS, LIMA VLAG, NASCIMENTO RJ. Capacidade antioxidante de frutas. **RBCF Rev Bras Ciênc Farm** 2008; 44(2): 193-201.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 673-751, 2000.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. Desenvolvimento de Fitoterápicos. **Revista Lecta**. São Paulo, SP, v. 21, n. 1, p. 7-13, 2003. Disponível em:
<http://www.saofrancisco.edu.br/edusf/publicacoes/RevistaLecta/Volume_02/upload/Address/lecta-2%5B6224%5D.pdf> Acessado em: 21 janeiro 2013

MILLER, HE. Simplified method for evaluation of antioxidants. **J Am Chem Soc** 1971; 48(2):91.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; **J. Chromatogr.**, A 2004, 1054, 95.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; Biavatti, M. W.; Leite, S. N.; Cechinel Filho, V. Em *Ciências farmacêuticas. Contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*; BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V., eds.; Ed. UNIVALI: Itajaí, 2003.

NOLDIN, V. F. et al. GÊNERO *Calophyllum*: IMPORTÂNCIA QUÍMICA E FARMACOLÓGICA. **Química Nova** v.29, n. 3, p. 549-554, 2006

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E.; **Trends Food Sci. Technol.** 2005, 16, 344.

PAOLA, M. V.; Princípios de Formulação de Protetores Solares. São Paulo: **Cosmetics & Toiletries**, p. 74-82, 2001.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PATTERSON, W. E.; XU,S.; SALT,T. A. Sterols of Caryophyllales with emphasis on Amaranthaceae. **Phytochemistry**. V.30,p. 523-526, 1991.

PAVANELLI, S.P. Degradação de Corantes da Indústria Alimentícia por Processos Oxidativos e Redutivos: Monitoramento por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray (ESI-MS). **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2010.

PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA S.; DE NUCCI, G. Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, n. S107-S111, 2005.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

POMILIO,A. B. *et al* . Antimicrobial constituents of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. **J. Ethnopharmacol**. v.36, p. 155-161, 1992.

_____.Antitumor and cytotoxic screen of 5,6,7-trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana*. **J. Ethnopharmacol**. v.44, p. 25-33, 1994.

PRADO A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. **Dissertação** [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade de São Paulo; 2009.

PRIOR RL, CAO G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic Biol Med** 1999; 27:1173-81.

RATES, S. M. K.; **Toxicon** 2000, 39, 603.

RODRIGUES M. V. N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista Multiciência, Campinas**, v. 7, 2006.

RUIZ, R. E. L. et al. Estudio fitoquímica de la “yerba del pollo” (Amaranthaceae). **Acta. Farm. Bonaerense**. V.10, p.25-26, 1991.

SALVADOR, M. J. *et al.* In vitro antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima*. **Pharmaceutical Biology**.v.42, n.2, p. 138-148, 2004.

SALVADOR, M.J. et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* colla, *Zeitsch. Fur Naturforsch* v.61, p. 19-25, 2006.

SANCHEZ-MORENO C, LARRAURI JA, SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of poly phenols. **J Sci Food Agric** 1998;76:270-6.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F.; *J. Sci. Food. Agric.* 1998, 76, 27010. Roginsky, V.; Lissi, E. A.; *Food Chem.* 2005, 92, 235.

SANTOS, A. R. S. et al. Further studies on the anticociceptive action of the hydroalcoholic extracts from plants of the genus *Phyllanthus*. **J.Pharm. Pharmacol.** V.47, p.66-71, 1995.

SCHALLEY C. A., *Int. J. Mass Spectrom.*, 2000, 194, 11.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis, Ed. da UFSC, 6 ed., 2010.

SIMÕES, C. M. Q. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2000

SIQUEIRA, J. C. 1994/1995. Fitogeografia das Amaranthaceae Brasileiras. Pesquisas- Botânica 45:5-21

SIQUEIRA, J. C. Amaranthaceae de Mata Atlântica. **Acta Biologica Leopoldensia**,v.12,n.1,p.165-173,1990.

SIQUEIRA, J.C. 2004. Amaranthaceae: padrões de distribuição geográfica e aspectos comparativos dos gêneros Africanos e Sulamericanos. Pesquisas, Botânica 55: 177- 185.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

SMID E.J., KOEKEN J.P.G., GORRIS L.G.M. (1996). Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone. In: Modern Fungicides and Antimicrobial Compounds, Lyr H., Russell P.E., Sisler H.D. Eds.,Intercept: Andover, U.K., 173-180.

SMITH, L.B.& R.J. DOWNS, R.J. (1972) Amarantáceas. Flora Ilustrada Catarinense, **fasc. AMAR**, págs. 69-71.

SOARES, S. E.; **Rev. Nutr.** 2002, 15, 71.

SOUZA, C. M. M.et al. **Química Nova**, v.30,n. 2, p. 351-355,2007.

SOUZA, M. M. et al. Analgesic Properties of Hydroalcoholic Extract Obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytoterapy Research** .v.12, p. 279-281, 1998.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, **Instituto Plantarum**. 640 p.

TOMEI, RAFAEL RODRIGUES. Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera marítima* (Panta *in natura* e obtida por cultura de células. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas). Universidade do Vale do Paraíba, São JOSÉ DOS Camos, São Paulo, 2008.

VALKO, M. et al. Mol. Cell. Biochem. 2004, 266, 37;

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19(2A), p. 452-457, 2009.

WHITEHOUSE, C.M.; DREYER, R.N.; YAMASHITA, M. J.B. Fenn, *Anal. Chem.* 57, 1985 675; (b) J.B. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, **1993**, 524.

WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p. 299-316, 1998.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química nova*, v.24, n.1, p. 147 – 152, 2001.

APÊNDICE



FeSBE Regional 2012



Certificamos que

EDJA ELIZA DE SOUZA SILVA

participou da

VII Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada no Centro de Convenções Ruth Cardoso, Maceió – AL, de 31 de maio a 02 de junho de 2012.



Comissão Organizadora



Ministério da
Educação

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAIS RICO E PAIS SEM FOME



CNPq
60 ANOS



FIOCRUZ



FAPEAL



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE ALAGOAS



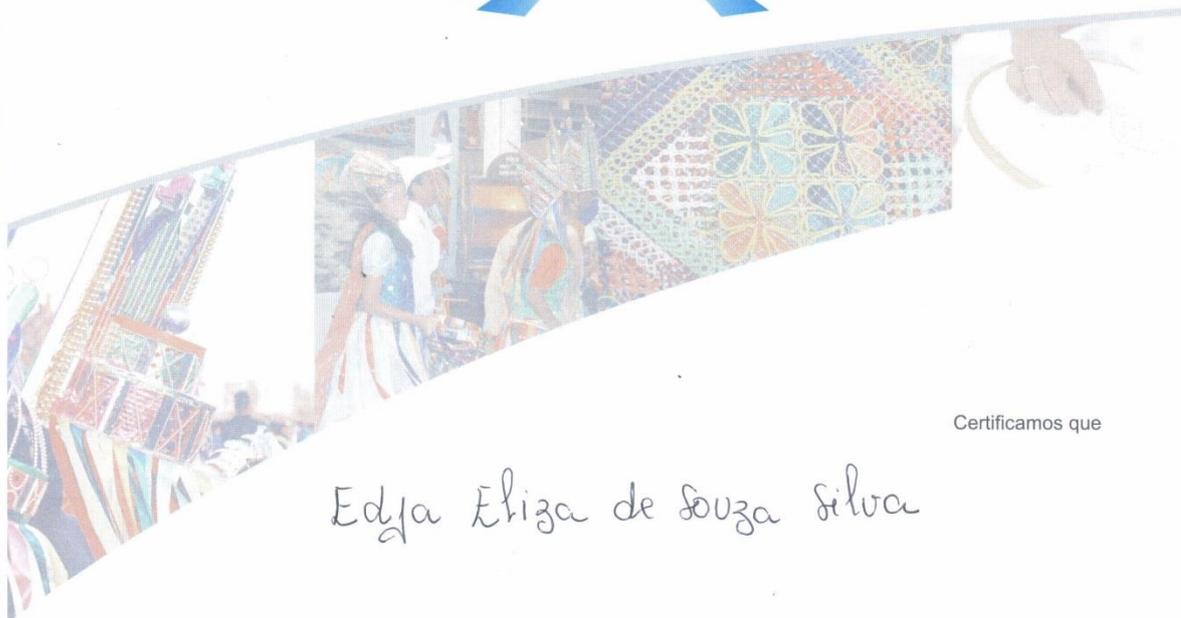
Secretaria de Estado
do Turismo
ALAGOAS
Cidade que faz parte gente



Estácio FAL



FeSBE Regional 2012



Certificamos que

Edya Eliza de Souza Silva

participou do Curso DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS, com a carga horária de 3 horas, durante a

VII Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada no Centro de Convenções Ruth Cardoso, Maceió – AL, de 31 de maio a 02 de junho de 2012.



Comissão Organizadora



Ministério da Educação

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAIS RICO E PAIS SEM POBREZA

CNPq
60 ANOS

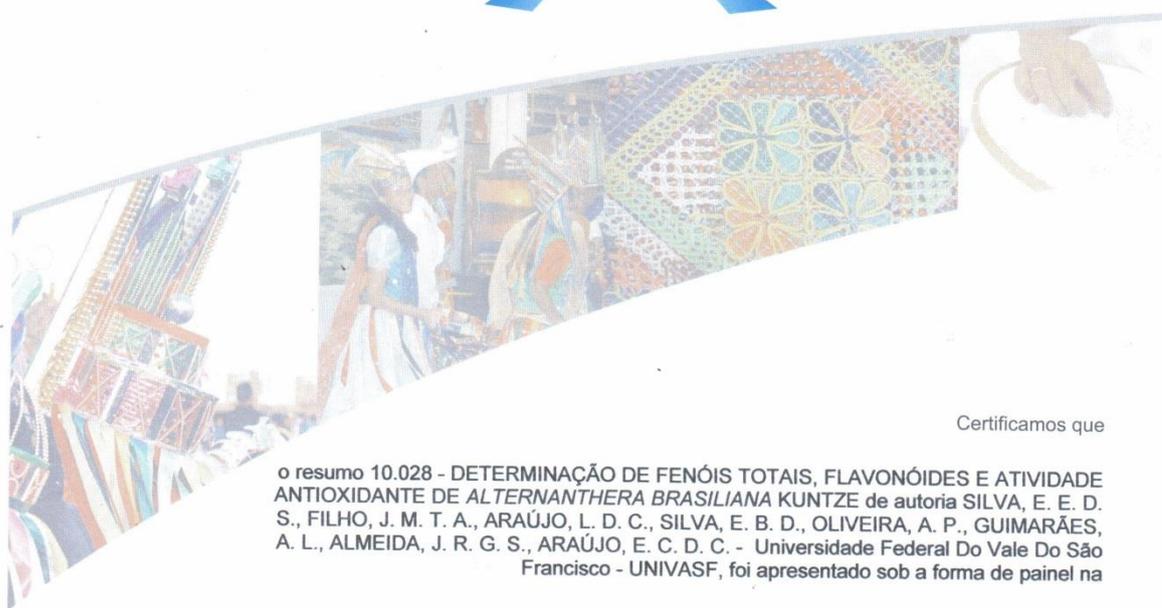


Secretaria de Estado de Turismo
ALAGOAS
Vamos que não paremos

Estácio | FAL



FeSBE Regional 2012



Certificamos que

o resumo 10.028 - DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *ALTERNANTHERA BRASILIANA* KUNTZE de autoria SILVA, E. E. D. S., FILHO, J. M. T. A., ARAÚJO, L. D. C., SILVA, E. B. D., OLIVEIRA, A. P., GUIMARÃES, A. L., ALMEIDA, J. R. G. S., ARAÚJO, E. C. D. C. - Universidade Federal Do Vale Do São Francisco - UNIVASF, foi apresentado sob a forma de painel na

VII Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada no Centro de Convenções Ruth Cardoso, Maceió – AL, de 31 de maio a 02 de junho de 2012.



Comissão Organizadora



Ministério da
Educação

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

CNPq
60 ANOS



FIOCRUZ



FAPEAL



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE ALAGOAS



Secretaria de Estado
de Turismo
ALAGOAS
SANTO ANTONIO DE SÃO CARLOS



Estácio | FAL

DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Alternanthera brasiliana* Kuntze ¹Silva, E.E.S.***, ¹Alencar Filho, J.M.T.*, ¹Araújo, L.C.*, ¹Silva, E.B.*, ¹Oliveira, A.P., ¹Guimarães, A.L., ¹Almeida, J.R.G.S., ¹Araújo, E.C.C. ¹Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE

Objetivos: *Alternanthera brasiliana*, uma espécie da família Amaranthaceae, coletada no município de Petrolina-PE, é comumente utilizada pela população local como cicatrizante, e foi estudada com o objetivo de quantificar fenóis totais pelo método de *Folin-Ciocalteu*, flavonóides totais e avaliar sua atividade antioxidante pelos modelos de sequestro do radical DPPH e inibição da autooxidação do β -caroteno. **Métodos:** O estudo iniciou-se com a secagem, pulverização e preparação do extrato etanólico das partes aéreas através da técnica de maceração. Em seguida o extrato etanólico foi submetido à partição líquido-líquido com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila para obtenção das fases. Para avaliação da atividade antioxidante no modelo de sequestro do radical livre DPPH foram preparadas soluções do extrato, fases e padrões, em etanol, nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$. Os padrões utilizados foram BHT, BHA e ácido ascórbico. Para avaliar a capacidade antioxidante, pelo modelo de inibição da autooxidação do β -caroteno, foram preparadas soluções do extrato e fases e foram utilizados os padrões quercetina, pirogallol e ácido ascórbico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. **Resultados:** Os resultados mostraram fases com alta capacidade antioxidante nos dois modelos observados principalmente nas maiores concentrações. No modelo sequestro do radical DPPH a fase acetato de etila foi a que se mostrou com maior capacidade antioxidante com um valor de sequestro de 89,75% na concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$. Estes dados são confirmados com os valores observados para a mesma fase acetato de etila na quantificação de fenóis totais que apresenta valores da ordem de 167,43 mg, medidos através de curva de calibração em mg de equivalente de ácido gálico/ g da amostra ($R^2 = 0,999$). Enquanto que no modelo de inibição da autooxidação do β -caroteno todas as fases mostraram alta atividade com valores acima de 70% de inibição, fase hexânica 81,82%, fase clorofórmica 73,70% e fase acetato de etila 73,70%. Através do experimento de flavonóides totais podemos conjecturar que aproximadamente 50% do conteúdo fenólico deve corresponder a metabólitos secundários da classe dos flavonóides. **Conclusão:** Os resultados obtidos nos permitem afirmar que o emprego popular pode estar relacionado à proeminente capacidade antioxidante explicitada nos resultados obtidos. O próximo passo será o isolamento destes componentes químicos, nas fases em que se encontram em maior quantidade, e a determinação da capacidade antioxidante dos compostos isolados.



IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais

Certificado

Certificamos que EDJA ELIZA DE SOUZA SILVA participou do IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais, realizado no período de 25 de setembro de 2012, no Tropical Hotel Tambaú, na cidade de João Pessoa – PB.

João Pessoa, 28 de setembro de 2012.

Maria de Fátima Agra
Coordenadora

Isac de Almeida Medeiros
Vice coordenador





IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais

Certificado

Certificamos que EDJA ELIZA DE SOUZA SILVA participou do IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais, realizado no período de 25 a 28 de setembro de 2012, no Tropical Hotel Tambaú, na cidade de João Pessoa – PB, na qualidade de PARTICIPANTE DE MINI-CURSO: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: ASPECTOS BÁSICOS E SUA APLICAÇÃO NA QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS, com a carga horária de 3 h.

João Pessoa, 28 de setembro de 2012.

Maria de Fátima Agra
Coordenadora

Isac de Almeida Medeiros
Vice coordenador



PGPNSB
35
Pós-Graduação em
Produtos Naturais
e Síntese Biológicas
www.pgpnsb.com.br



UFPA



UFRRN



IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais

Certificado

Certificamos que Edja E. S. Silva, Raimundo G. Oliveira-Junior; Grasielly R. Souza; Amanda G. Leite; Ana Paula Oliveira; Jackson R. G. S. Almeida participou do IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais, realizado no período de 25 de 28 de setembro de 2012, no Tropical Hotel Tambaú, na cidade de João Pessoa – PB, na qualidade de: AUTOR (S) DO TRABALHO: ATIVIDADE FOTOPROTETORA IN VITRO DE ALTERNANTHERA BRASILIANA (L.) KUNTZE (AMARANTHACEAE), na categoria PÔSTER.

João Pessoa, 28 de setembro de 2012.

Maria de Fátima Agra
Coordenadora

Isac de Almeida Medeiros
Vice coordenador



ATIVIDADE FOTOPROTETORA *IN VITRO* DE *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE (AMARANTHACEAE)

Edja E. S. Silva¹, Raimundo G. Oliveira-Junior¹, Grasielly R. Souza¹, Amanda G. Leite¹, Ana Paula Oliveira¹, Jackson R. G. S. Almeida¹, Edigênia C. C. Araújo¹. 1. NEPLAME, Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Na medicina popular, *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze é utilizada como antiinflamatória e analgésica. Estudos realizados anteriormente demonstraram que a planta possui atividade antioxidante que pode estar relacionada com o alto teor de compostos fenólicos e flavonoides. O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato etanólico bruto (EtOH) das folhas de *A. brasiliana*, bem como das fases (Hex, CHCl₃ e AcOEt) obtidas através de partição líquido-líquido. Os extratos foram previamente secos em estufa a 40 °C e, em seguida, diluídos em etanol absoluto, obtendo-se concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L. A leitura foi realizada através de varredura em espectrofotômetro entre os comprimentos de 260 a 400 nm. Posteriormente, foi calculado o Fator de Proteção Solar (FPS) das amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata. Entre as amostras testadas, a fase AcOEt apresentou maior absorção nas regiões UVA e UVB, indicando uma possível atividade fotoprotetora. O efeito foi mais pronunciado nas últimas concentrações testadas (50 e 100 mg/L). Além disso, a fase AcOEt também demonstrou maior FPS-UVB: $11,32 \pm 3,47$ (100 mg/L) e $5,83 \pm 2,03$ (50 mg/L). Os dados sugerem que o efeito fotoprotetor de AcOEt ocorre de forma concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração do extrato em solução, maior será o FPS-UVB e, conseqüentemente, a atividade fotoprotetora. O teor de flavonoides verificado em estudos anteriores pode estar colaborando com a atividade fotoprotetora da fase AcOEt. Apoio: CNPq/CAPES/BNB.



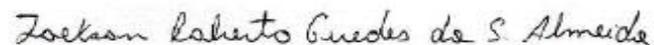
Certificado

Certificamos que **EDJA ELIZA DE SOUZA SILVA** participou do III Workshop Potencial Biotecnológico da Caatinga, realizado no dia 24 de abril de 2012 na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), com carga horária total de 08 horas.

Petrolina-PE, 24 de abril de 2012.



Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva
Presidente da Comissão Organizadora



Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da S. Almeida
Comissão Organizadora

Natural Product Research



Antioxidant, photoprotective and Antibacterial activities from *Alternanthera brasiliana* L. Kuntze

Journal:	<i>Natural Product Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Araújo, Ediqênia; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Department of Pharmaceutical Sciences (CFARM)/Program In Semi-Arid Natural Resources (PGRNSA) Silva, Edja; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Department of Pharmaceutical Sciences (CFARM)/Program In Semi-Arid Natural Resources (PGRNSA) Alencar Filho, José; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Department of Pharmaceutical Sciences (CFARM)/Program In Semi-Arid Natural Resources (PGRNSA) Oliveira, Ana; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Guimarães, Amanda; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Oliveira Junior, Raimundo; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Souza, Grasiely; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Almeida, Jackson; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Siqueira Filho, José; Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF),
Keywords:	antioxidant activity, photoprotection, <i>Alternanthera brasiliana</i> , antibacterial activity

SCHOLARONE™
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/gnpl>

Antioxidant, photoprotective and Antibacterial activities from *Alternanthera brasiliana*

L. Kuntze

Edja Eliza de Souza Silva^a, José Marcos Teixeira de Alencar Filho^a, Ana Paula Oliveira^a,
Amanda Leite Guimarães^a, Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior^a, Grasiely Rocha Souza^a,
Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^a, José Alves de Siqueira Filho^b, Edigênia
Cavalcante da Cruz Araújo^{a1}

^a*Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil*

^b*Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD), 56.300- 000, Petrolina, Pernambuco, Brazil*

Abstract

The study *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze aims to prove its effectiveness in folk medicine. With the popular use for various purposes such as sore throat and skin infections in our study demonstrates results that confirm its high efficiency against bacteria *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and these data corroborate the quantities determined for flavonoids and phenolic. In addition its high capacity for photoprotection also paves its use in cosmetology. The tests showed high antioxidant capacity of the specie and in small concentrations showed high levels of photoprotection. *Alternanthera brasiliana* is a species extremely promising with all parameters to become a herbal medicine.

Keywords: antioxidant activity; photoprotection, antibacterial activity, *Alternanthera brasiliana*, Amaranthaceae.

1. Introduction

¹ Corresponding author: Tel + 55-87-21016862. E-mail: edigenia@gmail.com

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze belongs to the family Amaranthaceae, and is popularly known in Brazil as "Penicillin" and "Terramycin", a herbaceous plant, is used against inflammation, cough and diarrhoea in Brazilian popular medicine (Barua et al, 2012).

Some studies were conducted with *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, such as its use as a food supplement (Delaporte et al., 2005). Were also performed *in vitro* studies with a view to pigment production (Smith et al, 2005). As for the evaluation of pharmacological activities are few studies as cytotoxic activity by Nihei et al (2001), Lagrota et al (1994) to give an account of showed anti-HSV activity and one fraction showed activity on DNA synthesis of infected cells. In other studies, the plant species showed activity against HIV (Silva et al., 2005), antinociceptive (Souza et al., 1998), antimicrobial (Brochado et al., 2003) and the first phytochemical study with the objective of isolating secondary metabolites was performed in 2003, in this were isolated and identified six O-glycosylated flavonoids (Brochado et al. 2003).

In recent years, a substantial amount of evidence has shown the key role of free radicals and other oxidants as largely responsible for aging and degenerative diseases associated with aging such as cancer, cardiovascular disease, cataracts, immune system decline, and brain dysfunction (Sousa et al, 2007).

In search of biologically active molecules and interest in the antioxidant and antibacterial activity of plant extracts, it was decided to conduct this study in order to evaluate the antioxidant, antibacterial and photoprotective *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze.

2. Results and discussion

2.1. Extraction yield, Total phenolic (TP), total flavonoid (TF) and antioxidant activity

Thus we determined the total phenolic and flavonoid contents of the crude ethanol extract (Ab-EtOH) and phases hexane (Ab-Hex), chloroform (Ab-CHCl₃), ethyl acetate (Ab-AcOEt) of *Alternanthera brasiliana*. This specie to possess, in the chemical constituents, phenolics and flavonoids compounds that are important antioxidant substances that are obtained from most natural plants. As show in the Table 1, of the four samples Ab-AcOEt (ethyl acetate phase) showed the highest total phenolic content (167.43 mgg⁻¹) and the highest total flavonoid content (87.06 mgg⁻¹) about a half of the total phenolic content.

Assays based on the scavenging of DPPH have been widely used to measure the antioxidant activity of different phenolic compounds. This is the most widely reported method for screening of antioxidant activity of many plant drugs (Onkar *et al.*, 2012). DPPH is one of a few stable available organic nitrogen radicals and has a UV-Vis absorption maximum at 515-518 nm. When a solution of DPPH is mixed with a substance that can donate a hydrogen atom, the reduced form of the radical is generated accompanied by loss of color (Huang *et al.*, 2005). The data showed that the Ab-AcOEt sample exhibited excellent free radical scavenging activity, with a value of IC_{50} of $28.90 \pm 1.03 \mu\text{g/ml}$. The antioxidant activity of extracts was also evaluated too by the β -carotene-linoleic acid bleaching method. This method is based on the loss of the yellow color of β -carotene due to its reaction with radicals formed by linoleic acid oxidation in an emulsion. β -carotene in this model system undergoes rapid discoloration in the absence of an antioxidant. The rate of the β -carotene bleaching can be slowed down in the presence of antioxidants (Kulisic *et al.*, 2004). In this model, the samples showed high antioxidant activity (41 – 81%), and the most active extract was the Ab-Hex with percentage of antioxidant activity of 81.82 ± 15.91 . According to these results, it was concluded that dried samples from *Alternanthera brasiliana* have potent antioxidant activity, mainly by scavenging abilities observed against DPPH radical. Previous studies have identified flavonoids and other phenolic compounds isolated from *A. brasiliana* (Facundo *et al.*, 2012). The existing data give new information for the antioxidant potential and polyphenolic content of plant species that have been traditionally used as medicinal plant.

2.2. Sun Protection Factor (SPF) *in vitro*

The important results of samples in models of antioxidant activity led us to evaluate its photoprotective activity. Figure 1 shows the spectrophotometric absorption profile of the dried extracts of *A. brasiliana*. Analyzing the data can be observed that phase Ab-AcOEt showed characteristic absorption bands in regions UVC, UVB and UVA in a concentration dependent manner, suggesting a possible photoprotective potential. These results can be justified by the high content of flavonoids present mainly in Ab-AcOEt. The maximum absorption wavelength ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$), with absorption bands in regions UVA, was observed for all other samples Ab-EEB, Ab-Hex and Ab-CHCl₃ (Figure 1). According to the literature, the content of flavonoids produced by a plant is considered an important factor for protecting plants against ultraviolet radiation (Souza *et al.*, 2005). The ultraviolet absorption spectrum of the flavonoids shows in general two peaks of maximum absorption (240-280 nm and 300-550 nm) (Bobin *et al.*, 1995).

The SPF *in vitro* was determined by the spectrophotometric method developed by Mansur (1986) using the UVB region, considered to be the region of greatest incidence during the day in which people are exposed for longer (Dutra *et al.*, 2004). In Figure 2, it can be observed that the phase Ab-AcOEt showed higher SPF at concentration 100 mg/l ($11.320 \pm 3,47$). The results about SPF also showed standard concentration-dependent. Although the test has been carried out *in vitro*, it was demonstrated that this method correlates well with *in vivo* tests, because relates the absorbance of the substance in question with the erythemogenic effect of radiation and intensity of light at specific wavelengths between 290 and 320 nm (UVB region) (Violante *et al.*, 2009). As the population already uses the species as a healing skin protection factor adds value to herbal.

2.3 Antibacterial activity

The discovery of new antibiotics is important due to the increasing incidence of multiple resistances of pathogenic microorganisms to drugs that are currently in clinical use (Oliveira-Júnior *et al.*, 2012). Verifying this result together with the possibility of the previous extract *A. brasiliana* become a herbal medicine, mainly topical, safe for the population. The results for evaluation of the antibacterial activity for extracts and phases of *A. brasiliana* are shown in Table 2, and are expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The antibacterial activity was evaluated against eight reference bacteria.

The samples tested showed very effect primarily on the bacteria *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus*. The crude ethanol extract (EtOH) and the chloroform phase (CHCl₃) showed antibacterial profile more satisfactory compared to other fractions. The significant activity of crude ethanol extract (EtOH) can be justified by the synergism between the constituents present in the extract. This study shows that extracts of *A. brasiliana* have antibacterial activity against bacteria that cause serious infections in the skin, gastrointestinal and respiratory tracts, agreeing with the popular use as a healing of wounds and syrup for respiratory diseases.

3. Experimental

3.1. Plant material and preparation of extracts

The aerial parts of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze were collected in August 2011 in the city of Petrolina (9.37714 ° S The coordinates 40.528837 ° Altitude 391m), state of Pernambuco, Northeastern Brazil, a region of arid climatic conditions involved for months with strong sunshine and low rainfall. A voucher specimen (19072) is deposited in the Herbarium of the São Francisco (HVASF), Federal University of São Francisco Valley.

The aerial parts of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze dried and pulverized (555 g) were subjected to maceration with 95% EtOH for 72 h. The solution was filtered and concentrated on rotaevaporator to 50 ° C, yielding 101.70 g of ethanol extract. To evaluate the activities, the ethanol extract was suspended in MeOH: H₂O (3:7) and partitioned with hexane, chloroform (CHCl₃) and ethyl acetate (AcOEt), in increasing order of polarity to obtain the respective phases which yielded 0.92; 0.95 and 0.35 g respectively.

3.2. Total phenolic determination

Total phenolic contents were assayed using the Folin-Ciocalteu reagent, it is based on the method reported by Slinkard and Singleton (1977), and only the volumes have been reduced (Almeida et al., 2011). Total phenolic contents of the extracts (three replicates per treatment) were expressed as mg gallic acid equivalents per gram (mg GAE/g) through the calibration curve with gallic acid. The calibration curve range was 50–1000 mg/l ($R_2 = 0.9938$). All samples were performed in triplicates.

3.3. Total flavonoid determination

Total flavonoid content was determined by using a colorimetric method described previously (Dewanto et al., 2002). The results were expressed as mg of catechin equivalents per gram of extracts (mg CE/g) through the calibration curve with catechin ($R_2 = 0.9948$). The calibration curve range was 50-1000 mg/l.

3.4. DPPH free-radical scavenging activity

The free radical scavenging activity was measured using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) assay (Mensor et al, 2001., Falcão et al, 2006). The absorbance values were measured at 518 nm and converted into the percentage antioxidant activity (AA) using the following formula: $AA\% = [(absorbance\ of\ the\ control - absorbance\ of\ the\ sample) / absorbance\ of\ the\ control] \times 100$. Ethanol (1.0 ml) plus plant extracts solutions (2.5 ml) were used as a blank. DPPH solution (1.0 ml) plus ethanol (2.5 ml) was used as a negative control. The positive

controls (ascorbic acid, BHA and BHT) were those using the standard solutions. Assays were carried out in triplicate. The IC₅₀ values were calculated by linear regression using by GraphPad Prism 5.0 program.

3.5. *β*-Carotene Bleaching Test

The β -carotene bleaching method is based on the loss of the yellow colour of β -carotene due to its reaction with radicals formed by linoleic acid oxidation in an emulsion (Wannes et al., 2010). Ascorbic acid, BHA and BHT were used as positive control. In the negative control, the extracts were substituted with an equal volume of ethanol. The antioxidant activity (%) was evaluated in terms of the bleaching of the β -carotene using the following formula: % Antioxidant activity = $[1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)] \times 100$; where A_0 is the initial absorbance and A_t is the final absorbance measured for the test sample, A_0^0 is the initial absorbance and A_t^0 is the final absorbance measured for the negative control (blank). The results are expressed as percentage of antioxidant activity (% AA). Tests were carried out in triplicate.

3.6. Determination of the maximum absorption wavelength and Sun Protection Factor (SPF) *in vitro*

For determining of the maximum absorption wavelength (λ_{max}), the dried extracts were diluted in absolute ethanol, obtaining concentrations of 5, 25, 50 and 100 mg/l. Subsequently, was performed spectrophotometric scanning at wavelengths between 260-400 nm, with intervals of 5 nm. The readings were performed using 1 cm quartz cell, and ethanol used as blank (Violante *et al.*, 2009). Calculation of SPF was obtained according to the equation developed by Mansur et al. (1986).

3.7. Antibacterial activity

The reference bacterial strains used in this study were obtained from National Institute of Quality Control in Health (INCQS/FIOCRUZ - Brazil). The microorganisms used were: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella enterica* (ATCC 10708), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

The antibacterial effect was evaluated by the method of microdilution (Santos et al., 2012) as recommended by The National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2003).

3.8. Statistical analysis

The data obtained in the experiments were statistically analyzed using the GraphPad Prism® version 5.0 and expressed as mean \pm S.D. The differences at $p < 0.05$ were considered significative.

4. Conclusion

After antibacterial effect and the use of *A. brasiliana* already widespread among the population concluded that this species has great potential to become a herbal medicine and photoprotective and antioxidant activities may prove to be composing a formulation for sun protection.

Although there are several reports in the literature of studies with *A. Brasiliana* in Brazil, most of them are with specimens found in the south of the country in different soil and climatic conditions of the specimens reported in this article.

References

- Almeida, J. R. G. S., Oliveira, M. R., Guimarães, A. L., Oliveira, A. P., Ribeiro, L. A. A., Lúcio, A. S. S. C., Quintans-Jr, L. J. (2011). Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 367-374.
- Andrade, C. A., Costa, C. K., Bora, K., Miguel, M. D., Miguel, O. G., Kerber, V. A. (2007). Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex. G. Don, Leguminosae-Mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 231-235.
- Bergold, A. M., Ponzio, H. A., Ribeiro, N. H., Camargo, L. N., Dias, M. C., Maciel, R. A. G., Sartori, V. L. (1992). Determinação do FPS do Parsol MCX. *Cosmetics and Toiletries*, 4, 46-50.
- Brochado, C. O., Almeida, A. P., Barreto, B. P., Costa, L. P., Ribeiro, L. S., Pereira, R. L. C., Koatz, V. L. G., Costa, S. S. (2003). Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on Lymphocyte Proliferation In vitro. *Journal Brazilian Chemical Society*, 14, 449-451.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2003) Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: norma aprovada – 6ª ed., M7-A6, 23, 17.
- Delaporte, R. H, Guzen, K. P., Takemura, O. S., Mello, J. C. P. (2005). Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) kuntze e *Bouchea fluminense* (vell) Mold. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 133-136.

- De Paola, M.V. (2001). Princípios de formulação de protetores solares. *Cosmetics and Toiletries* (Ed. português), 13, 74-81.
- Dewanto, V., Xianzhong, W., Kafui, K. A., Rui, H. L. (2002). Organic Foods Contain Higher Levels Of Chemical Dangerous To Infants. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, 50, 3010-3014.
- Facundo, V. A., Azevedo, M. S., Rodrigues, R. V., Nascimento, L. F., Militão, J. S. L. T., Silva, G. V. J., Braz-Filho, R. (2012). Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22, 1134-1139.
- Falcão, D. Q., Costa, E. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Kuster, R. M., Menezes, F. S. (2006). Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 73-76.
- Lagrota, M. H. C., Wigg, M. D., Santos, M. M. G., Miranda, M. M. F. S., Camara, F. P., Couceiro, J. N. S. S., Costa, S. S. (1994). Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (amaranthaceae) against the herpes simplex virus. *Phytotherapy Research*, 8, 358-361.
- Mansur, J. S., Breder, M. V. R., Mansur, M. C. A., Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61: 121-124.
- Menson, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C., Coube, C. S., Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15, 127-130.
- Nihei, J. S. D. A., Dias, P. S. Pereira. (2001) Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de extratos vegetais da plantas da família Amaranthaceae. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.
- Oliveira-Jr, R. G., Araújo, C. S., Santana, C. R. R., Souza, G. R., Lima-Saraiva, S. R. G., Guimarães, A. L., Oliveira, A. P., Siqueira-Filho, J. A., Pacheco, A. G. M., Almeida, J. R. G. S. (2012). Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4, 4489-4494.
- Santos, T. G., Rebelo, R. A., Dalmarco, E. M., Guedes, A., Gasper, A. L., Cruz, A. B., Schimit, A. P., Cruz, R. C. B., Stendel, M., Nunes, R. K. (2012). Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. *Quimica Nova*, 35, 477-481.
- Sayre, R. M., Agin, P. P., Levee, G. J., Marlowe, E. (1979). Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. *Photochemistry and Photobiology*, 29, 559-566.
- Silva, N. C. B., Macedo, A. F., Lage, C. L. S., Esquibel, M. A., Sato, A. (2005) Developmental effects of additional ultraviolet a radiattion growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. *Brazilian archives of biology and technology*, 4, 779-786.

- Slinkard, K., Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Sousa, C. M. M., Silva, H. R., Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, M. S., Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quimica Nova*, 30, 351-355.
- Violante, I. M. P., Souza, I. M., Venturini, C. L., Ramalho, A. F. S., Santos, R. A. N., Ferrari, M. (2009). Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 452-457.
- Wannes, W. A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M. B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. E., Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1362-1370.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

Table 1. Total phenolics (TP), total flavonoids (TF) and antioxidant activity of extracts from *Alternanthera brasiliana*.

	TP (mg GAEq/g)	TF (mg CEq/g)	DPPH (EC ₅₀ , µg/ml)	β-carotene (% AA)
Ab-EtOH	81.77 ± 2.08	92.90 ± 35.22	190.30 ± 28.31	41.72 ± 1.57

Ab-Hex	69.43 ± 33.38	---	226.10 ± 17.99	81.82 ± 15.91
Ab-CHCl ₃	72.43 ± 2.89	---	173.20 ± 8.97	73.70 ± 13.18
Ab-AcOEt	167.40 ± 34.12	87.06 ± 1.25	28.90 ± 1.03	73.70 ± 10.96
Ascorbic acid	---	---	9.72 ± 4.33	5.19 ± 5.38
BHA	---	---	2.31 ± 0.18	102.90 ± 3.87
BHT	---	---	0.27 ± 0.06	56.01 ± 6.48

The EC₅₀ values were obtained by interpolation from linear regression analysis with 95% of confidence level. EC₅₀ is defined as the concentration sufficient to obtain 50% of a maximum effect estimate in 100%. Values are given as mean ± SD (n=3).

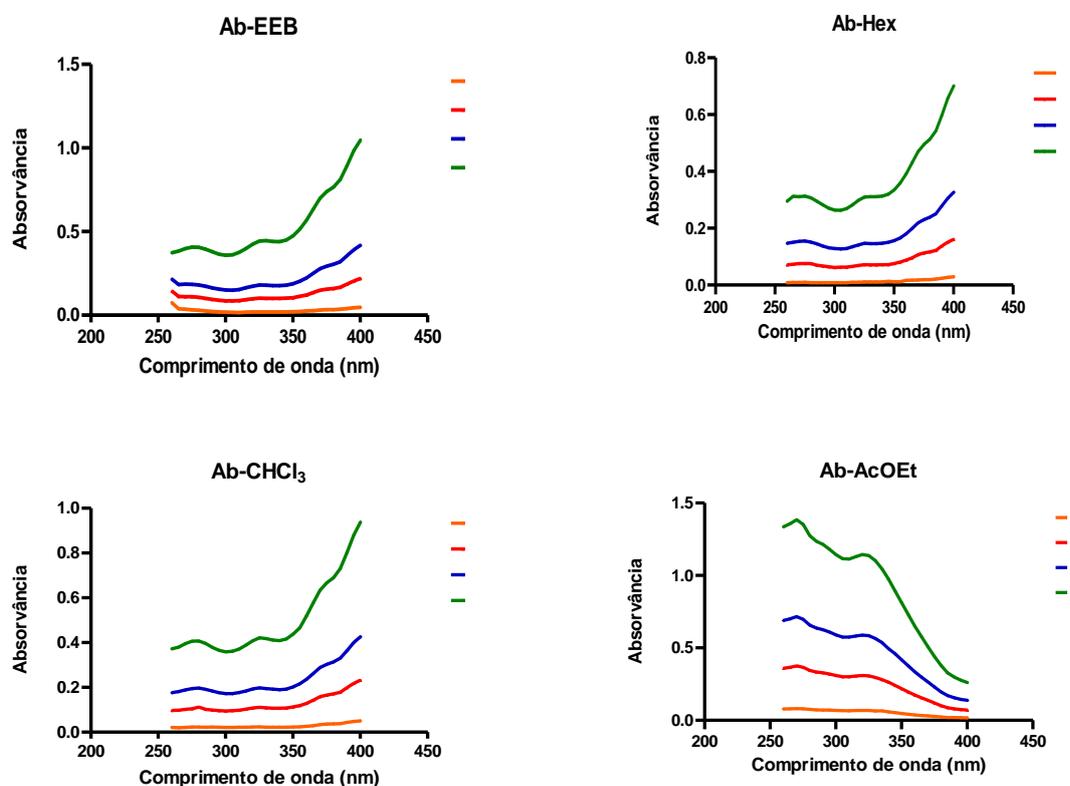


Fig. 1. Spectrophotometric absorption profile of dried extracts of *Alternanthera brasiliana* (260-400 nm).

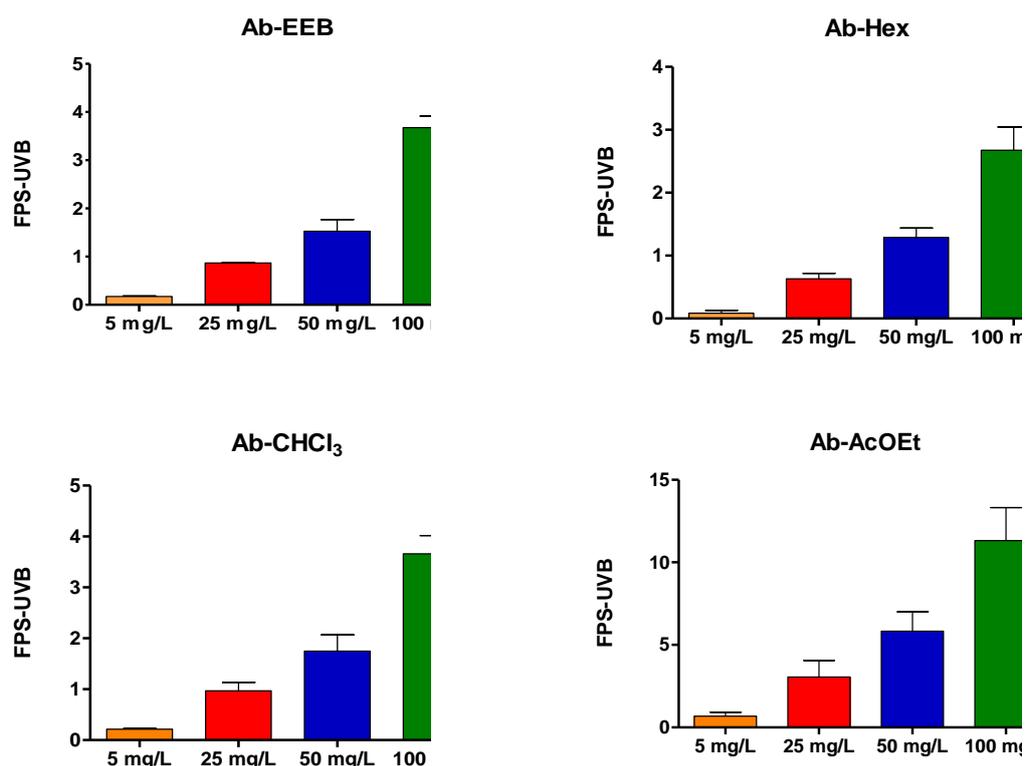


Fig. 2. Sun Protection Factor (SPF) *in vitro* of the dried extracts of *Alternanthera brasiliana*.

Table 2. Antibacterial activity of extracts from the leaves of *Alternanthera brasiliana*.

Microorganism	MIC (µg/mL)					MBC (µg/mL)				
	tOH	exane	HCl ₃	cOEt	EN	tOH	exane	HCl ₃	cOEt	EN
<i>Bacillus cereus</i>					.400	120	*	250	250	.400
<i>Enterococcus faecalis</i>	120	120	80	120	.400	120	120	250	120	.400
<i>Escherichia coli</i>										.400
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	120	120	120	560	.050	120	120	120	120	.050

<i>Salmonella choleraesuis</i>	120	120	560	*	.050	120	250	250	*	.050
<i>Serratia marcescens</i>	560	120	560	560		120	120	560	560	.025
<i>Shigella flexneri</i>	80	80				560	120	560		.025
<i>Staphylococcus aureus</i>					.025					.025

MIC: minimal inhibitory concentration. MBC: minimum bactericidal concentration. (*) absence of bacterial increase at all concentrations tested; (**) presence of bacterial increase at all concentrations tested (n=3).