

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA COMPARATIVA
ENTRE *ALTERNANTHERA BRASILIANA* (L.) KUNTZE E
ALTERNANTHERA DENTATA (MOENCH) STUCHLIK;
ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
*ALTERNANTHERA BRASILIANA***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Danielle Fontana Pereira

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA COMPARATIVA
ENTRE *ALTERNANTHERA BRASILIANA* (L.) KUNTZE E
ALTERNANTHERA DENTATA (MOENCH) STUCHLIK;
ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
*ALTERNANTHERA BRASILIANA***

por

Danielle Fontana Pereira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo-assinado,
aprova a Dissertação de Mestrado

**MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA COMPARATIVA ENTRE
ALTERNANTHERA BRASILIANA (L.) KUNTZE E *ALTERNANTHERA
DENTATA* (MOENCH) STUCHLIK; ESTUDO FITOQUÍMICO E
BIOLÓGICO DE *ALTERNANTHERA BRASILIANA***

elaborada por
Danielle Fontana Pereira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO ORGANIZADORA:

Margareth Linde Athayde, Prof^a. Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Clarice Azevedo Machado, Prof^a. Dr^a. (PUCRS)

Melânia Palermo Manfron, Prof^a. Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 29 de janeiro de 2007

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, sem sua presença nada disso seria possível. Principalmente nos maiores obstáculos pude perceber que a fé me fez forte para superá-los.

À Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde, meu agradecimento e admiração por ter 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 necessário para que prosseguisse em busca do meu ideal.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves e à sua aluna, colega e amiga Patrícia Pozzatti, do laboratório de pesquisas micológicas da UFSM, pela realização dos testes acerca da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados assim como pelo auxílio na interpretação dos resultados.

A Maria Angélica Silveira Lima (setor de Ressonância Magnética do Departamento de Química da UFSM) por ter disponibilizado de seu tempo de modo a me repassar seus conhecimentos sobre interpretações de espectros, além da realização de análises de ¹³C RMN e ¹H RMN de *Alternanthera brasiliana*.

Ao chefe do Departamento de Morfologia Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira, por me despertar para o mundo das pesquisas e por ter acompanhado todos meus passos até o dia de minha titulação.

Ao Departamento de Farmácia Industrial, principalmente ao Prof. Dr. Sérgio Dalmora, por se sensibilizar com meu acidente, dando-me todo o apoio necessário.

Aos professores do curso de pós-graduação pelos conhecimentos compartilhados durante minha formação, disponibilidade e atenção, meus mais sinceros agradecimentos. Principalmente à coordenadora do curso Prof^a. Dr^a. Simone Cardoso, a qual pude compartilhar inúmeros momentos de descontração, juntamente com outros docentes do programa de pós-graduação estando entre eles o Prof. Dr. Ruy Beck.

À todos que no dia 29 de abril de 2006, se mobilizaram acerca do meu acidente e que, das mais diversas formas, prestaram algum tipo de solidariedade, se estendendo pelos longos e tão sofridos meses de recuperação. Pelos inúmeros abraços, beijos, telefonemas, mensagens de incentivo. Nesta época pude perceber

que, além de um grupo de pesquisadores, pertenço a um grupo de amigos. Pessoas que conviveram comigo e, igualmente a mim, fazem do Centro de Ciências da Saúde (CCS) sua segunda casa, ao pessoal dos laboratórios, da coordenação do curso, ao diretor do Centro e ao reitor Clovis Lima.

Uma homenagem muito especial de agradecimento à técnica de laboratório Vera Pagliarin por ter me ajudando, reduzindo os danos em meu corpo. Serei eternamente grata a ti, meu carinho e admiração são imensuráveis.

Ao, em breve, Dr^o. Gilberto Dolejal Zanetti pelo conhecimento botânico repassado, de fundamental importância para a realização deste trabalho além dos telefonemas de preocupação com minha recuperação, meu respeito por ti ultrapassa as barreiras do conhecimento e quero muito que esse laço de amizade perdure por todo nosso caminho. Concomitantemente, quero agradecer a Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron que também participou ativamente neste trabalho e solidariamente, me levou até o Pronto Socorro tentando minimizar minhas dores, passando-me a força necessária para superar aquele momento.

Ao meu “bixo”, aluno, colega e, principalmente, amigo Francisco Maikon pelos inúmeros gestos e palavras de carinho e preocupação.

Aos colegas de pós-graduação pelo tempo que deixaram de realizar seus trabalhos para me dar alguns minutos de atenção.

Aos bolsistas Mariane, Bruna, Ticiane, Clarice, Aline, mestrandos Leandro, Aline Bolzan, Maikon, Adiene, Janaína e Michel e ao já mestres Ricardo e Chana, que conviveram comigo no laboratório de fitoquímica tornando as inúmeras horas de trabalho momentos de descontração e demonstração de companheirismo, amizade e incentivo quando, por muitas vezes, todo o conhecimento e empenho pareciam lutar contra nossos ideais, fazendo com que mais uma vez as tradicionais frases surgissem: “Resultado negativo também é resultado!”, “Fala sério!”, “É mole?!” Muito obrigada a todos vocês.

As minhas verdadeiras amigas com quem pude compartilhar, diariamente, os momentos de “despressurização”, Marcela (Alemoa), Gabriela, Silvinha, Fibebe, vocês estarão para sempre no meu coração.

Ao meu namorado Luis Henrique pelo amor e carinho, por entenderes quando não podia estar presente e por toda tua dedicação quando me tornei, temporariamente, dependente de tua ajuda. Te amo, Baby!

Aos meus queridos pais, Érico e Nelise e a minha irmã Marcelle que mesmo distante fisicamente estava sempre presente em meu coração. Como no dia de minha formatura, torno a repetir: “vocês são a fórmula do meu sucesso”. Obrigada por darem apoio as minhas invenções, por me darem o chão quando o senti faltar, por me darem atenção e principalmente amor. Não poderia deixar de agradecer profundamente por se mostrarem uma verdadeira família, quando mesmo depois de crescida, tornei a depender de vocês e, independente do obstáculo, estavam em todos os momentos presentes nessa difícil etapa. Te amo pai! Te amo mãe! Te amo Mar!

Alguns homens vêem as coisas como elas são e perguntam:

POR QUE?

Nós sonhamos com as coisas como elas nunca foram e nos perguntamos:

POR QUE NÃO?

Georges Bernard Shaw

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA COMPARATIVA ENTRE *ALTERNANTHERA BRASILIANA* (L.) KUNTZE E *ALTERNANTHERA DENTATA* (MOENCH) STUCHLIK; ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *ALTERNANTHERA BRASILIANA*

AUTORA: DANIELLE FONTANA PEREIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARGARETH LINDE ATHAYDE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de janeiro de 2007.

A família Amaranthaceae compreende, aproximadamente 65 gêneros e 1000 espécies de herbáceas. O gênero *Alternanthera* está inserido nesta família e encontra-se amplamente distribuído pelo mundo. As espécies *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik são igualmente conhecidas por “penicilina”, sendo encontradas no Brasil, mais comumente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O uso popular da espécie *A. brasiliana* destina-se ao tratamento de amigdalites, gripes e resfriados já para a espécie *A. dentata* foi referenciada em infecções, febre acompanhadas de dor de cabeça e também como antiséptico para sarnas e feridas. Este trabalho visa determinar parâmetros farmacognósticos de diferenciação entre as referidas espécies, uma vez que há discordância entre botânicos da existência da espécie *dentata*. As características macroscópicas que podem auxiliar na autenticação das espécies são contorno, cor, abundância de tricomas no limbo e a forma do pecíolo. As análises anatômicas permitiram a diferenciação através do tipo de estômatos encontrados (anfiestomático e hipostomático) além da ocorrência do colênquima, disposição do floema e a ausência de tricomas tectores na face adaxial de *A. dentata*. A presença da bainha vascular com anatomia de Kranz caracterizou o tipo C4 da família Amaranthaceae. Adicionalmente, o trabalho descreve a identificação de β -sitosterol, estigmasterol e espinasterol oriundos da fração diclorometânica das folhas de *A. brasiliana*. As folhas de *A. brasiliana* para as análises farmacobotânica, fitoquímicas e atividades biológicas foram coletadas em dezembro de 2004 e março de 2005 nos municípios de Santa Cruz do Sul e Santa Maria, sendo identificadas pela bióloga Dr^a. Thaís do Canto Dorow (Dpto. Biologia, UFSM). As excicatas estão depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM sob registro SMDB10038 e 10039, respectivamente. A espécie *A. dentata* utilizada no estudo morfo-anatômico foi coletada no município de Florianópolis, sendo identificada pelo pesquisador da EPAGRI-SC Antônio Amaury Silva Jr., e confirmada pelas biólogas da Universidade Federal de Pelotas Elen N. Garcia e Sílvia Rubin, tendo seu registro no herbário da instituição 03 (PEL-UFPEL) 04/07/06 e no Herbário da UFSM SMDB 10100. Quanto a atividade antimicrobiana, a melhor resposta obtida foi com a fração diclorometânica frente a alga *Prototheca zopffi* mas também foram encontrados CIM satisfatórios para as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis* e para o fungo *S. cerevisiae*. A maior atividade antioxidante foi encontrada na fração acetato de etila, a qual evidenciou um IC₅₀=163, 01 μ g/mL. Não foi evidenciada correlação entre teores de polifenóis e atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera dentata*, morfoanatomia, histoquímica, fitoquímica, microbiologia, antioxidante e polifenóis.

ABSTRACT

Máster Dissertation
Post-Graduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

COMPARATIVE MORPHOANATOMY AND HISTOCHEMISTRY BETWEEN *ALTERNANTHERA BRASILIANA* (L.) KUNTZE AND *ALTERNANTHERA* *DENTATA* (MOENCH) STUCHLIK; PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF *ALTERNANTHERA BRASILIANA*

AUTHOR: DANIELLE FONTANA PEREIRA

ADVISER: PROF^a. DR^a. MARGARETH LINDE ATHAYDE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de janeiro de 2007.

The family Amaranthaceae consist of approximately 65 genus and 1000 species of herbaceous plants. The genus *Alternanthera* is in this family and can be found spread worldwide. The *Alternanthera brasiliiana* (L.) Kuntze and *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik species are known as “penicillin” and can be found in Brazil, commonly in Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The popular usage of the *A. brasiliiana* specie is for the treatment of tonsillitis, cold and the influenza and the *A. dentata* is used to treat infections, fever along with headache and is also used as antiseptical for the treatment of itches and wounds. This work aims at to stipulate pharmacognostics parameters of distinguishment between the two cited species because there is a disagreement among the botanics about the existence of the *dentata* species. The macroscopical characteristics that can help authenticate them are: the perimeter, color, the abundance of trichomas in the limb and the shape of the stalk. The anatomical analysis had allowed the distinction through the type of found stomata (anfiestomatic and hipostomatic), the existence of the collenchyma disposal of the phloem and the absence of trichomes in the adaxial surface of *A. dentata*. The presence of the Kranz sheath characterized the type C4 of the Amaranthaceae family. Additionally, this work describes the identification of β -sitosterol, stigmasterol and espinasterol isolated from dichloromethane fraction of *A. brasiliiana* leaves. The *A. brasiliiana* leaves used in the pharmacobotanic and phytochemistry analyses and in the biological activities were collected in December 2004 and March 2005 in Santa Cruz do Sul (RS) and Santa Maria (RS), the leaves were identified by the biologist Dr. Thais do Canto Dorow (Dpt. of Biology, UFSM). The vouchers are deposited in the Department of Biology herbarium of UFSM respectively under the register numbers SMDB 10038 and 10039. The *A. dentata* specie used in the morpho-anatomic study was collected in Florianópolis (SC) and was identified by the researcher Antônio Amaury Silva Jr. of EPAGRI-SC and confirmed by Elen N. Garcia and Sílvia Rubin, both biologists of the Federal University of Pelotas. This specie used in the study is registered in the institution 03 herbarium (PEL-UFPEL) 04/07/06 and in the UFSM herbarium SMDB 10100. In relation to the antimicrobial activity the best result was obtained in the dichloromethane fraction with the *Prototheca zopffi* algae but it was also found satisfactory MIC for the Gram-positive *S. aureus* and *B. subtilis* bacteria and for the *S. cerevisiae* fungus. The biggest antioxidant activity was found in the acetate of ethyla fraction wich evidenced a $IC_{50}=163, 01\mu\text{g/mL}$. The correlation between the polyphenol tenors and the antioxidant activity was not possible.

Key-words: *Alternanthera brasiliiana*, *Alternanthera dentata*, morphoanatomy, histochemistry, phytochemical, microbiology, antioxidant and polyphenol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos	24
FIGURA 2 – Estrutura química do ácido gálico (ácido fenólico derivado do ácido benzóico)	29
FIGURA 3 – Estames de <i>Alternanthera brasiliana</i>	34
FIGURA 4 – Aspecto geral das flores com brácteas de <i>Alternanthera brasiliana</i> .	36
FIGURA 5 – Aspecto geral das flores com brácteas de <i>Alternanthera dentata</i> ...	36
FIGURA 6 – Partição líquido-líquido e obtenção das frações orgânicas de <i>Alternanthera brasiliana</i> a partir de um fracionamento neutro do extrato bruto hidroalcoólico 70%	44
FIGURA 7 – Aspecto geral dos ramos vegetativos de <i>Alternanthera brasiliana</i> (7a) e <i>Alternanthera dentata</i> (7b)	52
FIGURA 8 – Aspecto macroscópico da folha fresca de <i>Alternanthera brasiliana</i> (fig. 8a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 8b). 1a.-lâmina foliar vista ventral; 1b.-lâmina foliar vista dorsal; 2a.-lâmina foliar vista dorsal; 2b.-lâmina foliar vista ventral	54
FIGURA 9 – Margem da lâmina foliar de <i>Alternanthera brasiliana</i> (fig. 9a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 9b). Legenda: as setas indicam os tricomas presentes na margem foliar	54
FIGURA 10 – Tricomas da face dorsal da folha fresca de <i>Alternanthera brasiliana</i> (fig. 10a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 10b)	55
FIGURA 11 – Limbo de <i>Alternanthera brasiliana</i> (fig. 11a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 11b) evidenciando os tricomas tectores	55
FIGURA 12 – Aspecto geral da seção transversal do pecíolo de <i>Alternanthera brasiliana</i> (fig. 12a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 12b)	55

FIGURA 13 – Margem fimbriada, camptódroma, eucamptódroma de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 13a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 13b) em detalhe	56
FIGURA 14 – Aureola pentagonal a irregular das faces ventrais dos limbos foliares de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 14a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 14b)	56
FIGURA 15 – Seção transversal evidenciando o aspecto geral da região central do limbo da folha de <i>Alternanthera brasiliiana</i> . Legenda: 1. epiderme adaxial; 2. epiderme abaxial; 3. Parênquima paliçadico; 4. Parênquima esponjoso; 5. Feixe vascular, 6. colênquima	59
FIGURA 16 – Seção transversal evidenciando o aspecto geral da região central do limbo da folha de <i>Alternanthera dentata</i> . Legenda: 1. epiderme da região superior; 2. epiderme da região inferior; 3. Parênquima paliçádico; 4. Parênquima esponjoso; 5. Feixe vascular; 6. Colênquima	60
FIGURA 17 – Seção transversal evidenciando o aspecto geral do feixe vascular central no limbo da folha de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 17a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 17b). Legenda: 1- Xilema; 2- Floema; 3- Parênquima	60
FIGURA 18 – Seção transversal da região lateral do limbo da folha de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 18a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 18b) evidenciando feixe vascular secundário protegido por bainha vascular parenquimática. Legenda: 1. Bainha vascular parenquimática; 2. Xilema; 3. Floema	61
FIGURA 19 – Seção transversal da região lateral do limbo da folha de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 19a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 19b) evidenciando detalhe de feixes vasculares laterais. Legenda: 1. idioblasto cristalífico; 2. feixe vascular; 3. Bainha vascular parenquimática	61
FIGURA 20 – Seção transversal da região lateral do limbo da folha de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 20a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 20b) evidenciando mesofilo. Legenda: 1. Estômatos xerofíticos na epiderme da região abaxial e adaxial; 2. Parênquima paliçadico; 3. Parênquima esponjoso	62

FIGURA 21 – Seção paradérmica da face abaxial do limbo de folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 21a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 21b) evidenciando tricomas tectores. Legenda: 1a.- tricoma tector unisseriado com parede verugosa formado por 3células; 1b.- tricoma tector unisseriado com parede verugosa formado por 4 células; 2a.- tricoma tector unisseriado com parede verrugosa formado por 3 células	62
FIGURA 22 – Seção paradérmica da face abaxial do limbo de folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 22a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 22b) evidenciando células epidérmicas. Legenda: 1a. e 2a.- célula epidérmica com parede anticlinal sinuosa; 1b.e 2b.- estômatos diacíticos (predomina)	63
FIGURA 23 – Seção paradérmica da face adaxial do limbo de folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 23a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 23b) evidenciando células epidérmicas. Legenda: 1a.- células epidérmica com parede anticlinal reta e/ou levemente sinuosa; 2ª.- células epidêmicas com parede anticlinal pouco sinuosa; 1b. e 2b.- estômato diacítico	63
FIGURA 24 – Coloração por tinta da china evidenciando mucilagens – folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 24a) e de <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 24b)	65
FIGURA 25 – Coloração por cloreto férrico evidenciando polifenóis em seção transversal da folha de <i>Alternanthera brasiliiana</i>	65
FIGURA 26 – Coloração por hidróxido de potássio 5% evidenciando flavonóides em seção transversal das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 26a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 26b)	66
FIGURA 27 – Coloração do Sudan III evidenciando óleos voláteis em seção transversal das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 27a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 27b)	66
FIGURA 28 – Coloração por reativo lugol evidenciando grãos de amido em seção transversal das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 28a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 28b)	66
FIGURA 29 – Coloração por reativo de Dragendorff evidenciando alcalóides em seção transversal das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> (fig. 29a) e <i>Alternanthera dentata</i> (fig. 29b)	67

FIGURA 30 – Cromatograma das frações diclorometânicas de <i>A. brasiliana</i> com observação sob luz visível. Sistema eluente: CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	71
FIGURA 31 – Cromatograma das frações 4 a 10 da coluna 1 com observação sob luz visível. Sistema eluente: hexano:acetona (9:1)-migrado 4 vezes, revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C ..	72
FIGURA 32 – Cromatograma das frações 1 a 34 da coluna 2 com observação sob luz visível. Sistema eluente: hexano:acetona (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	73
FIGURA 33 – Cromatograma das frações 1 a 34 da coluna 2 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: hexano:acetona (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	73
FIGURA 34 – Cromatograma das frações 13 a 15 da coluna 2 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CH ₂ Cl ₂ -migrado 2 vezes, revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	74
FIGURA 35 – Cromatograma das frações 28 a 32 da coluna 3 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CH ₂ Cl ₂ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	75
FIGURA 36 – Isolamento de Ab1 a partir do fracionamento da fração diclorometânica de <i>Alternanthera brasiliana</i> sobre gel de sílica	76
FIGURA 37 – Cromatograma bidimensional de Ab1 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: 1ª migração: hexano: AcoEt (1:1); 2ª migração: CHCl ₂ : AcoEt (7:3), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100° C	76
FIGURA 38 – Diferença estrutural entre os triterpenos estigmasterol, β-sitosterol e espinasterol	77
FIGURA 39 – Espectro de ¹³ C RMN de Ab1, em CDCl ₃	78
FIGURA 40 – Cromatograma das frações 1 a 6 da coluna 4 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl ₃ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	83
FIGURA 41 – Cromatograma das frações 6 a 11 e material de partida da coluna 4 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl ₃ (migrado 3 vezes), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	84

FIGURA 42 – Cromatograma das frações 1 a 30 da coluna 5 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl ₃ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	84
FIGURA 43 – Cromatograma das frações 1 a 30 da coluna 5 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: CHCl ₃ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	85
FIGURA 44 – Cromatograma da mistura Ab1 e frações 22 a 24 (Ab3) da coluna 5 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl ₃ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	85
FIGURA 45 – Cromatograma da mistura Ab1e 22 a 24 (Ab3) da coluna 5 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: CHCl ₃ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C	86
FIGURA 46 – Cromatograma das frações 49 a 52 (Ab4) e 12 a 14 (Ab2) da coluna 5 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl ₃ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C ..	86
FIGURA 47 – Cromatograma das frações 49 a 52 (Ab4) e 12 a 14 (Ab2) da coluna 5 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: CHCl ₃ , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C ..	87
FIGURA 48 – Isolamento das substâncias Ab2, Ab3 e Ab4 a partir do fracionamento de extrato diclorometânico de <i>Alternanthera brasiliana</i> sobre gel de sílica	88
FIGURA 49 – Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão), extrato bruto e das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt e BuOH das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	94
FIGURA 50 – Classificação quanto à capacidade antioxidante de alguns compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário vegetal	97
FIGURA 51 – Curva de calibração do ácido pirogálico com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Riscos ao lactente pela contaminação da mãe, proveniente de fármacos presentes em plantas medicinais	23
TABELA 2 – Diferenças morfológicas entre as espécies de <i>Alternanthera</i>	35
TABELA 3 – Sistemas de solventes empregados na preparação da coluna 4	46
TABELA 4 – Concentrações dos extratos utilizados nos ensaios microbiológicos ..	47
TABELA 5 – Cultivos padrões e fármacos utilizados no estudo	48
TABELA 6 – Análise morfológica de <i>Alternanthera brasiliana</i> versus <i>Alternanthera dentata</i>	53
TABELA 7 – Análise microscópica da folha de <i>Alternanthera brasiliana</i>	57
TABELA 8 – Análise microscópica de <i>Alternanthera dentata</i>	58
TABELA 9 – Análise histoquímica das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i> e de <i>Alternanthera dentata</i>	64
TABELA 10 – Valores espectroscópicos de 13 C-RMN atribuídos a estigmasterol (Ab1. ^a), β-sitosterol (Ab1. ^b) e espinasterol (Ab1. ^c) da mistura e dos compostos 1-3 tidos como referências (δ _c =ppm)	79
TABELA 11 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM), concentrações bactericidas mínimas (CBM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) obtidas para o extrato bruto e as frações diclorometânica, acetato de etila e butanólica frente as cepas testadas	89
TABELA 12 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e das frações diclorometânicas, acetato de etila e n-butanol de <i>Alternanthera brasiliana</i>	92

TABELA 13 – Média das leituras, desvio padrão e coeficiente de variação percentual (CV%) obtidos para o ácido pirogálico, extrato bruto e frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	98
TABELA 14 – Total de conteúdo fenólico presente nas folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	99

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	absorbância
AcoEt	acetato de etila
AgNO ₃	nitrato de prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPFC	Boas Práticas de Fabricação e Controle
CBM	concentração bactericida mínima
CC	cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CCMP	cromatografia em coluna de média pressão
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CFM	concentração fungicida mínima
CHCl ₃	clorofórmio
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CIM	concentração inibitória mínima
COSY	Espectroscopia de Correlação
CV%	coeficiente de variação percentual
DMSO	dimetil sulfóxido
EB	extrato bruto
EtOH	etanol
FDA	Food and Drug Administration
HETCOR	Espectroscopia de Correlação Heteronuclear
n-BuOH	n-butanol
MS	Espectroscopia de massa
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada

REBLAS	Rede Brasileira de Laboratórios em Saúde
^1H RMN	RMN – ressonância magnética nuclear protônica
^{13}C RMN	ressonância magnética nuclear de carbono-13
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV	ultravioleta
δ	deslocamento químico
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Histórico sobre a importância de plantas para a humanidade	22
3.2 Pesquisas com o gênero <i>Alternanthera</i> (Amaranthaceae)	29
3.3 Usos empíricos na medicina popular: informações etnofarmacológicas ..	30
3.4 Informações etnofarmacológicas embasadas em ensaios de atividades ..	31
3.5 Metabólitos Secundários no Gênero <i>Alternanthera</i>	32
3.6 Descrição das espécies <i>Alternanthera brasiliana</i> e <i>Alternanthera dentata</i> ..	34
3.7 Características morfo-anatômicas de folhas de espécies de alternantheras .	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Material vegetal	39
4.2 Procedimentos gerais	39
4.3 Equipamentos	40
4.4 Solventes e reagentes	41
4.5 Preparação do material vegetal	42
4.5.1 Preparação do material vegetal para os estudos morfo anatômicos e histoquímicos (<i>Alternanthera brasiliana</i> x <i>Alternanthera dentata</i>)	42
4.5.2 Preparação do material vegetal para os estudos fitoquímicos e farmacológicos em <i>Alternanthera brasiliana</i>	43

4.5.2.1 Perfil cromatográfico	45
4.5.2.2 Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico	45
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana	46
4.6.1 Microorganismos	47
4.7 Avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	48
4.8 Doseamento de polifenóis das frações das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Introdução aos resultados e discussão referentes à parte I	51
5.2 Análise morfo-histológica	51
5.2.1 Análise morfológica	52
5.2.2 Análises anatômicas das folhas – <i>Alternanthera brasiliana</i> e <i>Alternanthera dentata</i>	56
5.2.3 Análise histoquímica	63
5.3 Introdução aos resultados e discussões referentes a parte II	70
5.4 Rendimento dos extratos das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	71
5.4.1 Rendimento e perfil das frações diclorometânica, acetato de etila e n- butanol	71
5.4.2 Perfis cromatográficos das frações das colunas 1, 2 e 3	72
5.5 Elucidação estrutural da substância Ab1	75
5.5.1 Perfis cromatográficos das frações das colunas 4 e 5	83
5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana	88
5.7 Avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	92
5.8 Determinação da quantidade de polifenóis nas frações das folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que, no mundo, aproximadamente 80% da população depende principalmente da medicina tradicional para seus cuidados primários de saúde, bem como do uso de extratos de plantas ou de seus princípios ativos (AKELERE, 1992; 1984; FARNSWORTH *et al.*, 1985).

Uma imensidade de plantas vêm sendo utilizadas tradicionalmente com finalidade terapêutica sendo elas uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisas com produtos encontrados na natureza revelam uma gama de estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas (WALL e WANI, 1996). Geralmente, os efeitos medicinais ou tóxicos destas plantas estão relacionados aos metabólitos secundários. A este grupo de metabólitos pertencem substâncias como taninos, saponinas, lactonas, sesquiterpenos, alcalóides entre outros. A valorização destes produtos e a maior aceitação dos mesmos vêm estimulando a indústria farmacêutica a aumentar a produção de fitoterápicos e o investimento em produtos naturais (ZANETTI, 2002).

No entanto, apenas uma pequena parte destas plantas já foram estudadas e tiveram suas ações farmacológicas comprovadas cientificamente (SOEJARTO, 1996), o que ocasiona um uso ainda muito restrito quando analisado em paralelo aos grandes benefícios que poderiam ocasionar. Assim, por mais que o Brasil tenha uma grande diversidade de plantas com alto potencial para o tratamento de diversas patologias e que existam pesquisadores dispostos a comprovar os efeitos farmacológicos das ervas medicinais, o número de espécies presentes na Farmacopéia Brasileira ou em outras publicações oficiais ainda é muito restrito.

Para que os fitoterápicos ganhem expressão e se consolidem definitivamente no mercado farmacêutico é preciso, além das pesquisas interdisciplinares que visam retirar o uso dos produtos naturais apenas por critério empírico e conhecimento popular, o estabelecimento de normas de controle de qualidade conferindo ao fitoterápico a segurança de efeitos conforme são preconizados para os medicamentos sintéticos em geral (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Na década de 90 foi desencadeado um processo de readequação do

mercado, firmando definitivamente a condição de medicamento aos fitoterápicos. Conforme Brito et al. (1996), as portarias SVS nº 06 de 1995 e subseqüentes, ilustram as providências tomadas nessa década, que se caracterizou pelo aumento na produção desses medicamentos e pelas medidas efetivas no controle de qualidade da produção em larga escala. Com isso, segundo Sonaglio *et al.* (1999), a fundamentação científica é o grande diferencial entre preparações utilizadas em medicina popular e fitoterápicos.

A família *Amaranthaceae* compreende, aproximadamente, 65 gêneros e 1000 espécies de plantas herbáceas, anuais e perenes, arbustos e árvores, localizando-se em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (SIQUIERA, 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, anti-diarréico, anti-inflamatório, vermífugo, antimicrobiano e analgésico (LAGROTA *et al.*, 1994; CALDERÓN *et al.*, 1997; MACEDO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1998).

No Brasil ocorrem cerca de 30 espécies de *Alternanthera* (KISSMANN e GROTH, 1999), sendo que *Alternanthera brasiliensis* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuebel compartilham a mesma sinonímia popular: penicilina, terramicina (LORENZI e MATOS, 2002; KISSMANN e GROTH, 1999). Devido à grande semelhança morfo-anatômica entre essas espécies, autores como Kissmann e Groth (1999) e Lorenzi e Matos (2002) citam as mesmas como espécie única, ou seja, *A. brasiliensis*.

A presente dissertação está dividida em duas partes. A primeira parte trata do estudo morfo-anatômico e histoquímico comparativo entre *Alternanthera brasiliensis* e *Alternanthera dentata*, visando evidenciar elementos de diferenciação entre ambas. A segunda parte descreve os estudos relacionados à análise fitoquímica e atividades biológicas de *Alternanthera brasiliensis*.

2 OBJETIVOS

Parte I

- Estabelecer parâmetros de distinção para a identificação botânica das espécies *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata* através de análises morfoanatômicas e histoquímicas de suas folhas.

Parte II

- Isolar metabólitos secundários de *Alternanthera brasiliana*, principalmente os constituintes químicos de possível interesse farmacêutico.
- Identificar quimicamente o(s) composto(s) isolado(s)
- Realizar testes antimicrobianos com frações do extrato de *Alternanthera brasiliana*.
- Determinar o potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *Alternanthera brasiliana*.
- Determinar o conteúdo de polifenóis totais no extrato bruto e frações de *Alternanthera brasiliana*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico sobre a importância de plantas para a humanidade

O acúmulo de conhecimentos empíricos versando sobre plantas medicinais, que vem sendo transmitido desde as antigas civilizações até os dias de hoje, faz com que estas sejam amplamente utilizadas em medicina popular e, sendo o Brasil detentor de uma das floras mais ricas do mundo em matéria-prima para fitoterápicos, é indispensável o estabelecimento de bases científicas para o emprego destes vegetais na terapêutica (SIMÕES, 1984).

Segundo Ferreira (2002) há alguns anos o Brasil já se encontra entre os dez maiores consumidores de medicamentos do mundo, entretanto a lei de patentes enfraqueceu substancialmente as perspectivas das indústrias químicas brasileiras. Sendo assim, o alto custo investido na promoção da saúde, somado a barreira imposta pelas grandes indústrias farmacêuticas, tornou quase nula a participação de indústrias químico-farmacêuticas brasileiras no campo de medicamentos patenteados. Isto impôs uma necessidade de diversificação fazendo com que o segmento de fitoterápicos se torne muito atraente, confirmando os valores citados por Leite *et al.* (2001) onde o mercado brasileiro, referente a plantas medicinais, tem movimentado recursos na ordem de 0,7 a 1,0 bilhão de dólares/ano. Estes valores são ainda mais expressivos quando se referem ao mercado europeu ou norte-americano os quais ostentam cifras, no ano de 2000, de 8,5 e 6,3 bilhões de dólares/ano respectivamente (SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

Conforme Grünwald (1996), o fitomedicamento deve ser visto como um elemento de ligação entre a medicina complementar de base tradicional e a medicina convencional, altamente científica.

O uso popular serve como orientador das pesquisas e, depois de estabelecida esta relação, deve ser preconizado um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo e manejo das plantas até a distribuição das drogas vegetais, assegurando, em grande parte, a qualidade do produto final. A etnobotânica e a etnofarmacologia entram neste contexto a fim de aumentar o consumo e a confiabilidade no medicamento de origem natural expandindo o conhecimento referente aos metabólitos secundários isolados e sintetizados (MONTELLANO, 1975; JÚNIOR e

VIZZOTTO, 1996; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998)

A ausência de estudos somados ao uso indiscriminado das plantas com propriedades farmacológicas podem acarretar graves conseqüências ao organismo humano. Ainda é comum a idéia de que produtos naturais são desprovidos de reações tóxicas ou efeitos adversos. Na tabela 1 é possível perceber o quanto determinados produtos do metabolismo secundário vegetal podem danificar ou alterar a fisiologia humana (VEIGA *et al.*, 2005).

TABELA 1 – Riscos ao lactente pela contaminação da mãe, proveniente de fármacos presentes em plantas medicinais.

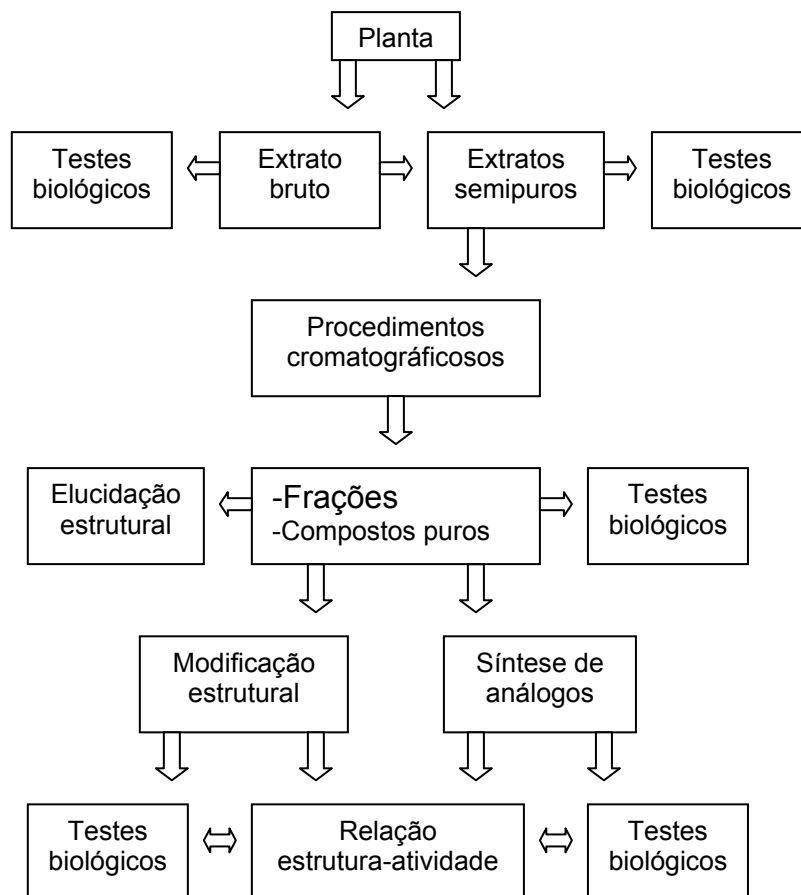
Composição do fármaco	Efeito biológico
Salicilatos	Tendência à hemorragia
Bases purínicas	Taquicardia
Antraquinonas	Diarréia
Lactonas sesquiterpênicas	Desnutrição (por rejeição do leite devido ao gosto desagradável)
Alcalóides pirrolizidínicos	Hepatotoxicidade
Alcalóides indólicos	Vômito, diarréia, câimbras, obstrução nasal

FONTE: VEIGA *et al.* (2005).

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 utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico, requerendo assim, estudos prévios de modo a desenvolver metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL e MIGUEL, 1999).

Torna-se conveniente ressaltar o papel importante que a pesquisa tem desenvolvido com o objetivo de aumentar os conhecimentos pertinentes às plantas e aos insumos farmacêuticos oriundos de plantas quanto ao controle de qualidade, propriedade terapêutica e toxicológica, valorizando a interdisciplinaridade. Os fitoquímicos, por exemplo, conforme Sant'Anna (1996), não estão interessados somente em uma classe de constituintes de plantas, mas trabalham na obtenção de compostos biologicamente ativos. O mesmo acontece com outros profissionais, de forma que trabalhos interlaboratoriais são cada vez mais freqüentes, até pela complexidade intrínseca das várias etapas indispensáveis no desenvolvimento

tecnológico de um fitoterápico. A inter-relação entre os diferentes profissionais tornou-se mais que um princípio de trabalho, uma prioridade diante da multidimensionalidade do caminho entre a planta e a produção de medicamentos. Di Stasi *et al.* (1996) afirmam que estudos isolados perpetuam a falta de resultados e impedem, por conseqüência, o desenvolvimento de novos medicamentos. Constatam-se inúmeras plantas cujos estudos fitoquímicos e farmacológicos são potencialmente satisfatórios, contudo, a espécie em questão não possui sequer pesquisas agrônômicas e ecológicas que se preocupem com reprodução vegetal ou extrativismo sustentável. No organograma a seguir estão representadas as etapas dos processos pelos quais a planta deve passar, desde a coleta até sua caracterização como fármaco, exemplificando a interdisciplinaridade requerida (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).



FONTE: CECHINEL FILHO e YUNES (1998).

FIGURA 1 – Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos.

Com a realização de todas as etapas descritas anteriormente, torna-se

possível aumentar o número de monografias nos códigos oficiais que privilegiem desde o cultivo, passando pelo manejo adequado, até chegar a determinação de doses clínicas representando assim a saída para a indústria nacional, além de se tornarem uma solução economicamente viável aos programas de saúde mantidos por governos, prefeituras e demais organizações.

A portaria nº 6 da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS), de 31 de janeiro de 1995 (BRASIL, 1995), tornou-se um marco regulatório dos fitoterápicos brasileiros, pois foi a primeira norma moderna a regulamentar essa classe de medicamentos (MARQUES, 2003), sendo estabelecido duas etapas de 5 anos para que suas exigências fossem cumpridas, encerrando dia 30 de janeiro de 2005. Mais recentemente, em de 16 de março de 2004, foi editada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a resolução RDC nº48, visando a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. A resolução RDC nº48 determina que todos os testes referentes ao controle de qualidade de fitoterápicos deverão ser realizados em laboratórios credenciados pela Rede Brasileira de Laboratório em Saúde (Sistema REBLAS) ou por empresas que possuam certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC), exigindo para a comercialização do produto acabado a realização de testes que garantam sua qualidade através de métodos analíticos que incluam perfis cromatográficos e resultados de prospecção fitoquímica, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica. No dia 23 de junho de 2006, o Diário Oficial da União tornou pública a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais, sob o decreto nº 5.813, tendo por objetivo geral “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”.

Entretanto, por mais que existam resoluções, regulamentando o uso de produtos naturais no Brasil, ainda é grande o número de acidentes oriundos do uso incorreto destes produtos, da fraude e troca proposital de espécies e do comércio informal das mesmas (VEIGA *et al.*, 2005). Por isso, torna-se cada vez maior a necessidade do estabelecimento de rígidas leis referentes a todas as etapas do processo de produção de fitoterápicos.

O primeiro passo a ser tomado quando iniciada uma pesquisa de um produto de origem vegetal é o levantamento bibliográfico e cultural da espécie e, após esta etapa é necessário estabelecer critérios de identificação e, aliado a este controle de

qualidade da matéria prima de um fitoterápico, está a análise morfo-histológica a qual, através de padrões macroscópicos e microscópicos destaca as peculiaridades da espécie possibilitando a correta identificação botânica. O seu baixo custo e alto grau de reprodutibilidade fez com que estes testes passassem a ser obrigatórios no controle de qualidade botânico desde a década de 90, conforme rege a portaria 06/95 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, e subseqüentes (BRITO *et al.* 1996). Além destas análises para a precisão na identificação da droga vegetal, pode-se fazer uso da histoquímica a qual refere-se ao tratamento de partes da planta fresca ou desidratada conforme Gattuso e Gattuso (1999) com reagentes específicos para determinar a presença de metabólitos secundários baseando-se nas colorações desenvolvidas e/ou precipitados através da formação de complexos insolúveis. As precipitações ocorrem pela formação de sais, por reações ácido/base, e as formações cromáticas pela obtenção de um complexo entre parte do reagente e o grupo químico específico.

O estudo fitoquímico compreende as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis ou não por uma ação biológica. Este estudo compreende um conjunto de técnicas espectrais como UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C e MS aliado ao uso de técnicas sofisticadas de RMN (COSY, HETCOR, etc.). Estas técnicas permitem propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais. Além disso, o uso de difração de raios-X, quando possível, possibilita avaliar a estereoquímica real destas substâncias (WHISTON, 1987). Esses conhecimentos conjuntamente com ensaios de atividade biológica permitem caracterizar as frações ou substâncias bioativas (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Contudo, somente a qualidade da matéria-prima não garante a segurança e eficácia de um fitoterápico, é preciso verificar e comprovar a atividade biológica da planta assim como a dose terapêutica recomendada e seu potencial tóxico ao organismo. Segundo Farias (1999) a eficácia é comprovada por estudos pré-clínicos e clínicos e a segurança confirma-se após determinar a ausência de efeitos tóxicos e contaminantes. Conforme Hamburger e Hostettmann (1991), devem ser levados em consideração a simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e o baixo custo dos testes biológicos, visto que o número de amostras a serem testadas geralmente é grande. Por exemplo, para a realização de testes de atividade antifúngica e antibacteriana as

principais metodologias preconizadas são:

- Método da difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1966; LIMA *et al.*, 1995).
- Método da concentração inibitória mínima (MITSCHER *et al.*, 1972; CECHINEL FILHO *et al.*, 1996).

A capacidade das bactérias em adquirir resistência aos fármacos utilizados como agentes terapêuticos é enorme (COHEN, 1992), sendo este problema crescente, o estímulo a pesquisas que visem o conhecimento de novos composto eficazes perante microorganismos já resistentes é fundamental. Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos em diversos países objetivando a determinação de atividade antimicrobiana de extratos vegetais (FERESIN *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2001; RAMESH *et al.*, 2002). Estes extratos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, óleos essenciais e taninos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Entretanto esses estudos devem ser realizados com plantas oriundas do local em que se pretende estimular o uso, pois uma pesquisa realizada por Cechinel Filho (1999) com a espécie *Aleurites moluccana* L. Willd, coletada no Brasil não apresentou atividade antimicrobiana, enquanto que a mesma espécie coletada e analisada no Havaí (EUA) mostrou-se portadora de atividade antiviral contra o vírus do HIV e também contra algumas bactérias. Isto sugere que o ambiente influencia na síntese de determinados compostos, podendo alterar a composição química da planta.

Ahmad e Beg (2001) explicitam que a atividade antimicrobiana é decorrente da interferência das mais diferentes substâncias, causando a morte ou inibindo o crescimento dos microorganismos. Através do teste da concentração inibitória mínima e posterior repique da menor concentração efetiva ao combate do crescimento do microorganismo pode-se verificar se a planta tem ação bactericida ou bacteriostática.

Além da atividade antimicrobiana, as plantas também podem se mostrar excelentes antioxidantes naturais. De acordo com Mensor *et al.* (2001), as substâncias antioxidantes presentes nos vegetais neutralizam a ação dos radicais livres e o consumo destas substâncias pode fortalecer o sistema imunológico, além de reduzir o risco de uma série de doenças como o desenvolvimento de cânceres pela ação silenciosa dos radicais livres, proporcionando ao paciente um grande benefício a sua saúde. A indústria de cosméticos também está bastante receptiva às

descobertas de compostos bioativos naturais, visto que a demanda da sociedade por produtos que previnam o envelhecimento é crescente.

Dentre os compostos mais efetivos para esta ação estão os polifenóis, eles promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação do processo oxidativo, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIRMIC e JAVANOVIC, 1994). Além de seqüestradores de radicais, os antioxidantes fenólicos também podem atuar como quelantes de metais (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992).

Os polifenóis pertencem à categoria dos antioxidantes naturais e são os antioxidantes mais presentes em nossa dieta. Uma ampla variedade de alimentos e bebidas tem se mostrado valiosos veículos quanto ao efeito antioxidante e são, conseqüentemente, recomendados para inclusão na dieta promovendo um balanceamento na dose de antioxidantes benéficos para a saúde humana.

Há algum tempo vem sendo associado ao consumo moderado de vinho, principalmente vinho tinto, a redução da mortalidade por doenças cardiovasculares (RENAUD e DE LORGERIL, 1992). Os compostos polifenólicos presentes no vinho têm alta capacidade antioxidante e a estes constituintes foi atribuída uma atividade protetora contra as patologias oriundas do efeito oxidativo. Os polifenóis são considerados redutores naturais do processo de trombose pela inibição da aglomeração de plaquetas, da peroxidação de lipídios e da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (CASTELLUCCIO *et al.*, 1995; SOLEAS *et al.*, 1997; KINSELLA *et al.*, 1993).

A busca pela indústria farmacêutica de novos compostos naturais bioativos é crescente, devido à demanda da sociedade por produtos que previnam o envelhecimento. Adicionalmente, para uso cosmético também é de fundamental importância a descoberta de fármacos capazes de combater, por exemplo, o desenvolvimento de cânceres pela ação silenciosa dos radicais livres, proporcionando ao paciente um grande benefício a sua saúde.

Na seleção de antioxidantes são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%), ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor do produto, compatibilidade e facilidade de incorporação ao produto, estabilidade nas condições de processo e armazenamento, além da inexistência de efeitos tóxicos (BAILEY, 1996).

Conforme Ramalho e Jorge (2006), o tocoferol é um dos melhores

antioxidantes naturais devido a sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais lipídicos interrompendo a reação em cadeia.

Ferguson e Harris (1999) descreveram os ácidos fenólicos como portadores de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula (fig. 2), que conferem propriedades antioxidantes. Segundo Nawar (1985), os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. Sendo assim, a pesquisa de plantas que possuam compostos fenólicos torna-se alvo de vários pesquisadores.

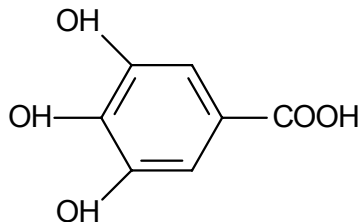


FIGURA 2 – Estrutura química do ácido gálico (ácido fenólico derivado do ácido benzóico).

Um método simples e rápido de estimar o potencial antioxidante *in vitro* de uma amostra é pela aplicação do método fotolorimétrico do DPPH, que se apresenta na forma de um radical livre relativamente estável que produz coloração violeta em etanol. Quando em contato com amostras portadoras de atividade antioxidante, a forma radicalar do DPPH sofre uma redução e a coloração violeta intensa diminui. A redução na concentração de DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância em espectrofotômetro.

3.2 Pesquisas com o gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae)

A família *Amaranthaceae* compreende várias espécies com atividade biológica (LAGROTA *et al.*, 1994; SALVADOR *et al.*, 2002) e elas são usadas na nutrição e medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades (MACEDO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1998; GORISTEIN, NUE e ARRUDA, 1991; SI-MAN *et al.* 1988; SIQUEIRA, 1987).

3.3 Usos empíricos na medicina popular: informações etnofarmacológicas

Grenand, Moretti e Jacquemin (1987) em um estudo realizado com as populações nativas e indígenas das Guianas verificaram que estes usam as folhas de *A. brasiliana* como adstringente e antidiarréico, ao passo que o macerado oriundo da planta inteira é usado contra prisão-de-ventre.

Mors, Rizzini e Pereira (2000) relatam que a infusão das folhas de *A. brasiliana* pode ser considerada diurética, digestiva e depurativa, sendo empregada nas moléstias do fígado e da bexiga.

Conforme Rodrigues e De Carvalho (2001) as flores de *A. brasiliana*, quando ingeridas na forma de infusão ou decocto são consideradas béquicas, devendo ser ingeridas de 3 a 4 xícaras deste chá por dia.

Em relação à espécie *A. dentata*, não foram encontrados registros na literatura científica referentes ao seu uso popular e o mesmo ocorreu em relação a estudos fitoquímicos e/ou farmacológicos. Entretanto, Sens (2002) relatou, em sua dissertação de mestrado o uso popular de diversas plantas por uma tribo indígena de Santa Catarina. Dentre as plantas citadas, encontraram-se alguns dados de *A. dentata*, cuja transcrição integral encontra-se a seguir.

Alternanthera dentata (Moench) Scheygr. (AMARANTHACEAE)
Pulle, Fl. Surinam, (Meded. K. Ver. Kol. Inst. Amst. xxx.) 39, 1932.

NOME: Erva-de-penicilina.

INFORMANTE: Congó Patté.

INDICAÇÕES: Infecções, febre com dor de cabeça, lavar sarna e feridas bravas.

MODO DE PREPARO: P/ febre com dor de cabeça - 1 punhado de folhas e caule lavados em 1 litro de água, aquecer até ferver e retirar do fogo.

MODO DE USAR: Beber chá quente ou frio.

POSOLOGIA: 1 colher de sopa 3 vezes ao dia até melhorar.

MODO DE PREPARO: P/ infecções -1 punhado de folhas lavadas em 1 litro de água, aquecer até ferver e retirar do fogo.

MODO DE USAR: Beber chá quente ou frio.

POSOLOGIA: 1 copo 3 vezes ao dia até melhorar.

MODO DE PREPARO: P/ lavar sarna e feridas bravas - 10 punhados de folhas e caules em 5 litros de água, aquecer até ferver e retirar do fogo.

MODO DE USAR: Banhos ou lavagens frios ou mornos.

POSOLOGIA: Lavar a região afetada 5 vezes ao dia até melhorar.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE (ISI, espécie/gênero: 0/83):

Alternanthera spp.: Extratos de cultura de callus, analgésico (MACEDO *et al.*, 1999); saponinas triterpênicas (SANOKO *et al.*, 1999); betaínas (BLUNDEN *et al.*, 1999); antimalárico (MESA *et al.*, 1998); extrato etanólico, diurético (CALDERON *et al.*, 1997); extrato hepatoprotetor (LIN *et al.*, 1994); extratos antivirais, 193 Herpes simplex (LAGROTA *et al.*, 1994) e HIV

(ZHANG *et al.*, 1988); flavonóide-C-glicosídeo (ZHOU *et al.*, 1988).
 PATENTES (DERWENT-ISI, espécie/gênero: 0/4).

Alternanthera spp.: As patentes referem-se a cosméticos para o cabelo, a um antifúngico e a um herbicida sintético eficiente contra o gênero.

COMENTÁRIOS: Não há estudos sobre conteúdo químico ou atividades biológicas desta espécie. A literatura registra atividades analgésicas e antivirais para diversas espécies do gênero, o que pode estar relacionado aos usos tradicionais (p. 192).

3.4 Informações etnofarmacológicas embasadas em ensaios de atividades

Estudos farmacológicos tem confirmado que algumas plantas deste gênero, incluindo *A. pungens*, *A. sessilis*, *A. tenella* e *A. brasiliana* têm importantes atividades que justificam seu uso na medicina popular (RUIZ *et al.*, 1991; QU, YANG e XIANG, 1993; GARCIA, CALDERÓN e FUENTES, 1995).

A. brasiliana evidenciou, *in vitro*, uma pronunciada atividade contra o vírus do herpes simples, podendo esse efeito ser devido a diferentes mecanismos dependentes da ação da timidina quinase viral ou da DNA polimerase (LAGROTA *et al.*, 1994).

O extrato alcoólico de *A. brasiliana* produziu 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 intraperitoneal). O mecanismo de ação, porém, não foi definido pelos autores (SOUZA *et al.*, 1998).

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

Caetano *et al.* (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 resistentes e não resistentes) e o extrato mostrou uma atividade bastante semelhante ao cloridrato de tetraciclina utilizado como padrão.

Mazzini e Faria (2002) determinaram a atividade antifúngica do extrato etanólico de *Alternanthera sp.*, o qual inibiu o crescimento de *Rhizoctonia sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. A

metodologia utilizada não foi descrita.

Extratos de *Alternanthera* spp. mostraram atividade antiviral, sendo que a espécie *A. phyloxeroides* apresentou, *in vitro*, inibição do HIV, além do vírus do herpes simples (CHANG *et al.*, 1988).

O extrato alcoólico de *A. pungens*, na concentração de 100 mg/kg, foi efetivo no aumento do volume urinário, aumentando também a eliminação de sódio, mostrando-se equivalente aos resultados obtidos com a furosemida (CALDERÓN, GARCÍA ASSEF e FUENTES, 1997).

A. sessilis evidenciou efeito hepatoprotetor em modelo de hepatite aguda induzido por tetracloreto de carbono e paracetamol em camundongos e D(+)-galactosamina em ratos (LIN *et al.*, 1994).

A atividade antimicrobiana atribuída ao extrato de *A. maritima* está associada, principalmente, às bactérias Gram-positivas e a alguns fungos (leveduras e dermatófitos); os extratos etanólicos e hexânicos das partes aéreas da *A. marítima* mostraram alguma inibição contra bactérias Gram-negativas. Com o extrato bruto foi obtido apenas efeito fungistático, mas para os compostos isolados foi verificado o efeito fungicida, podendo ser usado como aditivo antimicrobiano natural em cosméticos ou na indústria alimentícia ou, então auxiliar na síntese de novas drogas (SALVADOR *et al.*, 2004).

Alternanthera repens comprovou seu uso popular quanto ao seu efeito antidiarréico, porém ao avaliar a atividade antimicrobiana do extrato, através do método de difusão em ágar, não foram obtidos resultados positivos (ZAVALA *et al.*, 1998).

Em um estudo feito por Delaporte *et al.* (2005) com a espécie *Alternanthera brasiliana* pode-se constatar que o nitrogênio é o principal macronutriente constituinte da folha seguido 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 mineral mais presente. Este estudo contribui no controle de qualidade da espécie além de fornecer suporte para seu uso na nutrição humana.

3.5 Metabólitos Secundários no Gênero *Alternanthera*

Estudos químicos com algumas espécies de *Alternanthera* relataram a

existência de betacianinas, betaínas, ecdisteróides, flavonóides, protoalcalóides, saponinas, esteróides e triterpenos (FERREIRA e DIAS, 2000; POMILIO *et al.*, 1992; POMILIO *et al.*, 1994; PATTERSON, XU e SALT, 1991; ZHOU, BLASKÓ e CORDELL, 1988; BANERJI *et al.*, 1971).

A partir de *A. pungens* foram isolados diferentes constituintes como alcalóides, esteróides, triterpenos, leucoantocianidinas, beta-espinaesterol e uma saponina derivada do núcleo oleanano, com os açúcares glicose e ramnose. Recentemente o cloridrato de colina também foi descrito (CALDERÓN, GARCÍA ASSEF e FUENTES, 1997).

Estudos fitoquímicos preliminares feitos com *A. brasiliiana* indicaram a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos. No extrato hexânico foi confirmada a presença de fitosterol e β -sitosterol; estes compostos, juntamente com outros grupamentos existentes nas frações mais polares, podem justificar a ação analgésica, com potência equivalente ao ácido acetilsalicílico e ao paracetamol, evidenciada com o extrato hidroalcoólico desta espécie (SANTOS *et al.*, 1995),

Brochado *et al.* (2003), isolaram seis flavonóides da *A. brasiliiana*: canferol 3-O-robinobiosideo-7-O-alfa-ramnopiranosideo, quercetina 3-O-robinobiosideo-7-O-alfa-L-ramnopiranosideo, quercetina 3-O-robinobiosideo, canferol 3-O-robinobiosideo, canferol 3-O-rutinosideo-7-O-alfa-L-ramnopiranosideo e canferol 3-O-rutinosideo. Estas estruturas foram elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (^1H RMN e ^{13}C RMN, ^1H - ^1H -COSY, APT, HETCOR) estando todos de acordo com a literatura.

Em discordância com os estudos acima, Macedo *et al.* (1999), não encontraram em seus extratos de *A. brasiliiana* alcalóides e compostos fenólicos (taninos, flavonóides, etc) em concentrações detectáveis. As reações positivas quanto a presença de diferentes esteróis ou triterpenos foram obtidas com anisaldeído e reagente de Lieberman-Burchard. Entretanto, foi confirmada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa (CG) a presença de β -sitosterol que é o principal constituinte do fitosterol, o qual já tinha sido previamente detectado no extrato hidroalcoólico.

A partir da *A. marítima* foram isolados os seguintes constituintes: esteróides (estigmasterol, beta-sitosterol, campesterol, espinaesterol e Δ^7 -estigmasterol), ácidos orgânicos (ácido palmítico e vanílico) e estas estruturas foram confirmadas por comparação de espectros de RMN com os obtidos por Kojima *et al.* (1990) e

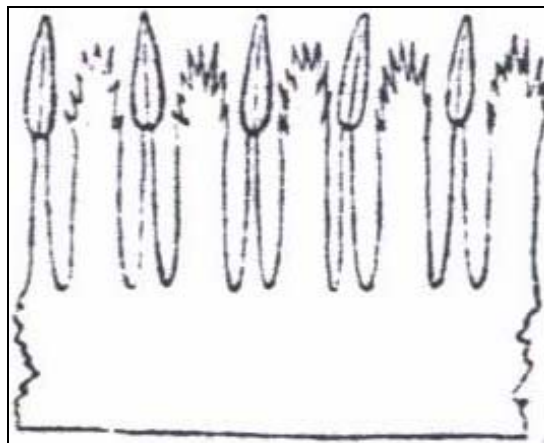
Chaurasia e Swichtl, (1987), além de análises em CG com uso de padrões. As saponinas Δ^7 estigmasterol-3-O- β -D-glucopiranosídeo, e espinasterol-3-O- α -D-glucopiranosídeo foram identificadas por análises espectroscópicas e comparação com dados publicados. Também foram relatados os flavonóides glicosídicos vitexina, isovitexina, isoramnetina-3-O-robinobiosídeo e quercetina-3-O-rutinosídeo (SALVADOR *et al.*, 2004).

Mazzini e Faria (2002), após a obtenção de resultados positivos de atividade antifúngica para *Alternanthera* sp., conduziram um estudo químico com os extratos ativos e, através de coluna cromatográfica de sílica gel e posterior análise em cromatógrafo gasoso acoplado a espectômetro de massas detectaram a presença do 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol.

Delaporte *et al.* (2001), assinalaram para a *Alternanthera brasiliana* uma variação na concentração de taninos entre 0,46% e 0,87% em relação a época de coleta.

3.6 Descrição das espécies *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata*

O gênero *Alternanthera* compreende cerca de 170 espécies. O nome *Alternanthera* tem origem no latim e se refere aos estames e pseudoestaminódios que se alternam (*alternus* + *antera*), como mostrado na figura 3 (EDWIN e REITZ, 1967).



FONTE: EDWIN e REITZ (1967).

FIGURA 3 – Estames de *Alternanthera brasiliana*.

São ervas com folhas opostas com inflorescência em espiga e flor hermafrodita com estames soldados na base formando um tubo baixo (EDWIN e REITZ, 1967).

Alternanthera dentata (Moench) Stuchlik tem suas origens nas regiões tropicais do globo mais especificamente do leste da Índia ao Brasil, principalmente a região sul do Brasil. Possui nestas regiões alguns nomes comuns como trevo Indor, planta-do-Cálico ou Folha-Rubi, além de penicilina e/ou perpétua-dentata. Como sinonímia botânica foram encontrados os epítetos *Gomphrena dentata*, *Telanthera dentata*, *Gomphrena brasiliensis* e *Mogiphanes brasiliensis* (EDWIN e REITZ, 1967).

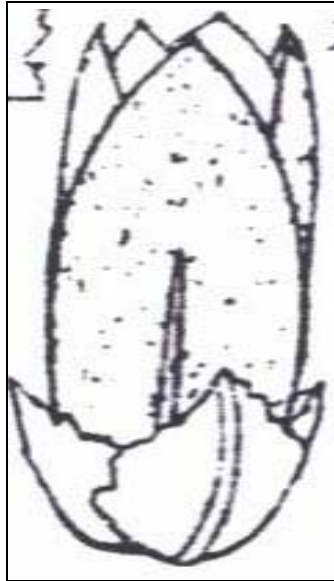
A espécie congênica *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze é descrita por Edwin e Reitz (1967), embora existam autores que consideram as duas espécies como apenas uma. Coloração geralmente arroxeada das folhas e ramos e a presença de brácteas mais longas que as tépalas e com margens lacerado-denteadas, são as diferenças morfológicas mais citadas entre *Alternanthera dentata* e a espécie *Alternanthera brasiliana* típica (LORENZI e MATOS, 2002). A tabela 2 referencia diferenças descritas por Edwin e Reitz (1967), entre folhas e flores de *A. brasiliana* e *A. dentata*.

TABELA 2 – Diferenças morfológicas entre as espécies de *Alternanthera*.

	<i>Alternanthera dentata</i>	<i>Alternanthera brasiliana</i>
Folhas	Esverdeadas	Variáveis
Flores	Com sépalas mais curtas que bractéolas. Alvo pilosas	Branco amarelentas com brácteas e bracteóloas com metade do tamanho das flores

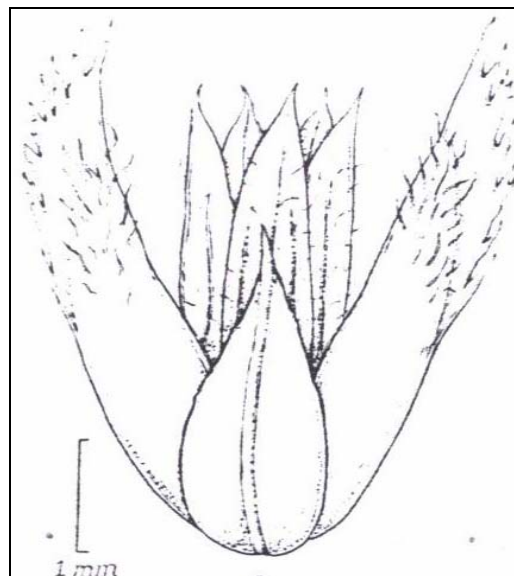
A *Alternanthera brasiliana* é uma planta nativa da América Tropical até o sul da Ilha de Santa Catarina, exclusiva de restingas litorâneas, xerófita e heliófita. Popularmente, essa erva é conhecida por penicilina, terramicina ou perpétua-do-mato (EDWIN e REITZ, 1967).

As figuras 4 e 5 ilustram as flores e brácteas de *A. brasiliana* e *A. dentata*.



FONTE: EDWIN e REITZ (1967).

FIGURA 4 – Aspecto geral das flores com brácteas de *Alternanthera brasiliana*.



FONTE: EDWIN e REITZ (1967).

FIGURA 5 – Aspecto geral das flores com brácteas de *Alternanthera dentata*.

Até o presente momento não foi encontrado nenhum artigo ou trabalho de pesquisa que utilizasse ambas espécies concomitantemente como objeto de estudo visando determinar características de modo a estabelecer diferenças entre as mesmas com o intuito de corroborar no controle botânico de qualidade destas espécies, visto a utilização com fins medicinais. Entretanto, vários artigos foram encontrados a respeito de outras espécies do gênero *Alternanthera*, tratando dos

mais diversos assuntos. Dentre as espécies pode-se citar a *A. repens* (ZAVALA *et al.*, 1998); *A. philoxeroides* (CHANG *et al.*, 1988); *A. marítima* (SALVADOR *et al.*, 2004); *A. sessilis* (LIN, YUN-HO e SHYH-JONG, 1994); *A. pungens* (CALDERÓN, GARCÍA ASSEF e FUENTES, 1997).

3.7 Características morfo-anatômicas de folhas de espécies de *alternantheras*

Delaporte *et al.* (2002) estudaram as características morfo-anatômicas das folhas de *A. brasiliiana* e concluíram se tratar de uma planta com folhas simples, oval-lanceoladas, peninérveas, opostas cruzadas, membranáceas, pilosas e com diversos padrões de coloração, do verde ao púrpura. A análise anatômica revelou folhas anfiestomáticas, com tricomas tectores ornamentados, mesófilo dorsiventral e padrão de venação eucampitódroma. Foram observadas alterações na disposição e no tamanho dos feixes vasculares da nervura principal os quais são sempre do tipo colateral, com tecido esclerenquimático no pólo floemático.

Outra espécie do gênero com descrição morfo-anatômica é *Alternanthera tenella* Colla. Kissmann e Groth (1999), comenta que esta planta daninha, *Alternanthera tenella*, popularmente conhecida como “apaga-fogo”, possui folhas simples, sésseis, opostas, com limbo oblongo-lanceolado de base atenuada e ápice agudo, margens inteiras e nervuras marcadas na face ventral e proeminente na dorsal.

Ferreira *et al.* (2003), ao realizarem um estudo morfo-anatômico mais detalhado da *Alternanthera tenella* constataram que a espessura média a lâmina foliar é de 252,39 μ m, a epiderme é simples, sendo a face adaxial mais espessa que a da abaxial. Seu mesófilo foliar é dorsiventral; o parênquima paliçádico apresenta uma camada de células com espessura média de 65,33 μ m, e a espessura média do parênquima lacunoso é de 92,54 μ m. Suas folhas são anfiestomática, estando os estômatos, nas duas faces, dispostos no mesmo nível das demais células da epiderme. Tanto na face adaxial como na abaxial os estômatos são diacíticos, sendo os ostíolos da face adaxial de maior comprimento. Foi verificada a maior presença de estômatos na face abaxial das folhas. Tricomas glandulares multicelulares não ramificados foram observados em ambas faces das folhas e mostrou alto teor de cera epicuticular. A taxa de vascularização foliar média é de três feixes a cada

590 μ m de largura de lâmina foliar. Também foi verificada a presença de drusas entre os feixes vasculares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal constituiu-se de folhas frescas de *Alternanthera brasiliana*, coletadas nos municípios de Santa Cruz do Sul-RS e Santa Maria-RS nos meses de junho de 2004 e março de 2005 e identificadas pela bióloga Dr^a. Thaís do Canto Dorow do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria. Submeteu-se ambas amostras a um macerado hidroalcoólico por uma semana de modo a obter um extrato bruto, realizou-se uma cromatografia em camada delgada e após a verificação de igual perfil cromatográfico para as duas coletas, optou-se em utilizar o material oriundo do município de Santa Cruz do Sul para os estudos fitoquímicos e biológicos, o qual foi desenvolvido com folhas secas e as folhas coletadas no município de Santa Maria destinaram-se ao estudo farmacobotânico, pelo fato de alguns testes necessitarem da utilização da planta fresca.

As exsicatas encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM sob o registro SMDB 10038, para o material coletado em Santa Cruz do Sul e registro SMDB 10039, referente ao material coletado no município de Santa Maria.

A espécie *Alternanthera dentata* utilizada no estudo morfo-anatômico foi coletada no município de Florianópolis-SC, identificada pelo pesquisador da EPAGRI-SC, Antônio Amaury Silva Júnior. Sua identificação foi confirmada pelas biólogas Elen Nunes Garcia e Sílvia Rubin da Universidade Federal de Pelotas, estando registrada na instituição por E. Nunes & S. Rubin, 03 (PEL-UFPeL) 04/07/06 e na Universidade Federal de Santa Maria sua exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia com o registro SMDB 10100.

As espécies utilizadas no estudo farmacobotânico foram submetidas as mesmas condições ambientais como incidência solar, quantidade de água e substrato e, só após o desenvolvimento das mudas, iniciou-se os testes a cerca de suas características macroscópicas e microscópicas.

4.2 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes utilizados foram procedentes das marca Belga,

Quimex, Vetec ou Merck de grau p.a. e a água utilizada nos experimentos foi submetida a uma destilação prévia.

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas recobertas com gel de sílica GF₂₅₄ Merck de espessura 0,2mm com suporte de alumínio 20x20cm. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente, sendo utilizadas diferentes proporções de misturas de solventes como eluente.

A detecção das substâncias sobre CCD se deu pela visualização sob luz visível e ultravioleta (UV) em comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguida de aspersão da placa com o reagente cromogênico anisaldeído-sulfúrico, cuja composição está descrita a seguir e posterior aquecimento a 100°C.

Anisaldeído sulfúrico	0,5mL
Ácido sulfúrico concentrado	1,0mL
Ácido acético glacial	25,0mL
Etanol	25,0mL

Para as cromatografias em coluna (CC) foram utilizados gel de sílica 60 Merck com tamanhos de partículas 63-200µm.

Para identificação das substâncias isoladas foram realizadas as seguintes técnicas espectrais: espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (¹H RMN e ¹³C RMN). Os espectros foram obtidos no Departamento de Química da UFSM.

4.3 Equipamentos

- Balança analítica OHAUS Voyager
- Balança semi-analítica MARTE AS 5500C
- Banho de ultrassom THORNTON Unique
- Bomba de vácuo PRIMAR
- Espectrômetro de RMN BRUCKER DPX. Para a obtenção dos espectros de RMN (RMN ¹H→ 400MHz e RMN ¹³C→ 100MHz), as amostras foram solubilizadas em CDCl₃

- Estufa BIOMATIC
- Evaporador rotatório BÜCHI R – 114, acoplado a um banho de água BÜCHI Waterbath B – 480 e a uma trompa de água
- Lâmpada UV CHROMATOVUE
- Lâmpada UV BOITTON
- Microscópio ótico acoplado à câmera digital (Tron)
- Microscópio Carl Zeiss
- Micrótomo rotativo com navalha de aço inox com perfil D
- Moinho de facas com tamis de malha 0,86 μ m
- Capela de fluxo laminar horizontal
- Estereomicroscópio binocular
- Lâminas
- Lamínulas

4.4 Solventes e reagentes

- Etanol absoluto p.a.
- Hexano
- Diclorometano
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado
- Gel de sílica G60 F₂₅₄ em cromatofolhas
- Acetato de etila
- n-butanol
- Anisaldeído
- Água destilada
- Dibenzoil peróxido – ativador de historresina
- Dimetil sulfóxido –DMSO
- Historresina[®]
- Resina básica
- Resina acrílica autopolimerizante
- Bálsamo sintético entellan[®]

4.5 Preparação do material vegetal

4.5.1 Preparação do material vegetal para os estudos morfo anatômicos e histoquímicos (*Alternanthera brasiliana* x *Alternanthera dentata*)

Porções de 2x2 mm foram retiradas da região mediana das lâminas foliares adultas (JOHANSEN, 1940). O material ficou imerso em álcool etílico 70% para fixação e conservação, e mantido sob refrigeração. Na análise do corte transversal, o material botânico foi desidratado em série etílica ascendente de 70 a 96°GL – uma hora em cada álcool – e incluído em blocos de hidroxietilmetacrilato conforme Gerrits e Smidt (1983) e Ruetze e Schimitt (1986). Obteve-se cortes de 4µm em micrótomo rotativo. Cada corte foi levado à banho histológico, em temperatura ambiente, repassado para lâmina e corado com azul de toluidina 1% (GERLACH, 1977). Após a coloração fixou-se lamínula com bálsamo sintético entellan. As lâminas montadas tiveram registros efetuados por fotografias obtidas em microscópio com câmara digital (Tron), e as lâminas permanentes encontram-se registradas, sob número 111 para *A. brasiliana* e 112 para *A. dentata*, junto ao laminário do Departamento de Farmácia Industrial, CCS, UFSM (METCALFE e CHALK, 1950; CUTTER, 1987; ESAÚ, 1990).

A análise morfológica da planta fresca e da droga foi efetuada através de observações a olho nu e com auxílio de estereomicroscópio binocular (FELLIPE e ALENCASTRO, 1966; HICKEY, 1974; ESAÚ, 1990).

O estudo da epiderme abaxial e adaxial da folha foi obtido em lâminas temporárias, com cortes a mão livre de material fresco (OLIVEIRA e AKISUE, 1989).

Na análise histoquímica montou-se lâminas semi-permanentes com secções transversais de folhas dos exemplares mantidos a fresco, tratando-se com reagentes indicativos de compostos específicos para óleos voláteis (Sudan III), alcalóides (Dragendorff), saponinas (Ácido sulfúrico), flavonóides (Hidróxido de potássio 5%), polifenóis (taninos) (Cloreto férrico), mucilagem (Tinta da china), antocianinas (vapores de ácido acético) e amido (Lugol), (COSTA, 1982; GATTUSO e GATTUSO, 1999). Todas as lâminas foram registradas através de fotografias obtidas em microscópio com câmara digital (Tron).

4.5.2 Preparação do material vegetal para os estudos fitoquímicos e farmacológicos em *Alternanthera brasiliana*

O material coletado foi quebrado manualmente e desidratado em temperatura ambiente. Depois de pulverizado em moinho de facas, com tamis de malha 0,86 μ m, a droga foi macerada a frio com etanol 70% com agitação diária, após o período de sete dias, o líquido extrativo foi filtrado e, em evaporador rotatório, eliminou-se o álcool e, a partir da fração aquosa, foi realizado o fracionamento com solventes de polaridade crescente. (diclorometano, acetato de etila e n-butanol, 3 x 200 mL para cada solvente). O preparo do material vegetal, extratos e fracionamentos, está esquematizado na figura 6. Paralelamente o mesmo procedimento descrito acima foi realizado com 100 g de droga pulverizada, sem fracionamento posterior, com a finalidade de obtenção de um extrato bruto (EB).

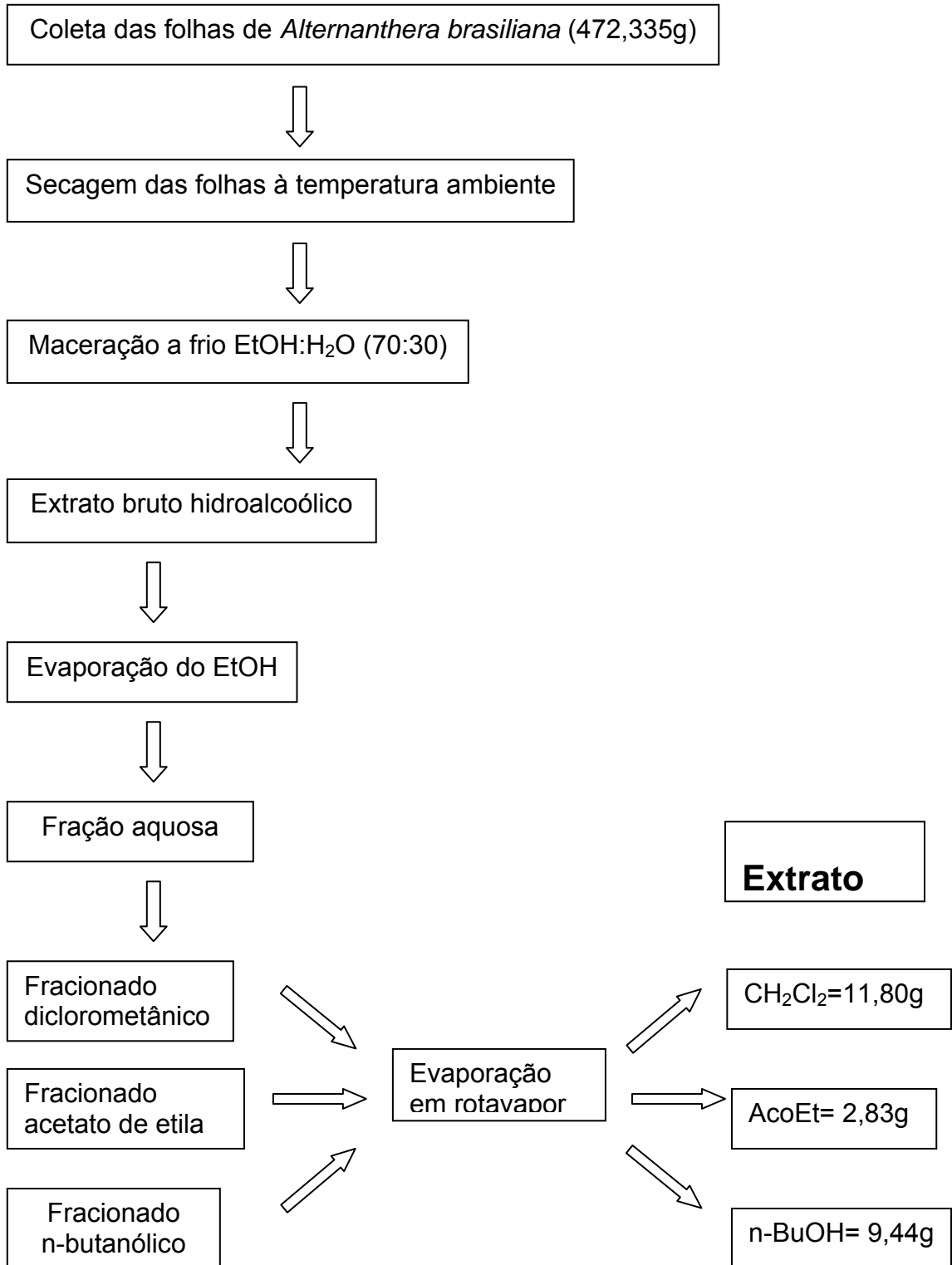


FIGURA 6 – Partição líquido-líquido e obtenção das frações orgânicas de *Alternanthera brasiliana* a partir de um fracionamento neutro do extrato bruto hidroalcoólico 70%.

4.5.2.1 Perfil cromatográfico

De modo a avaliar o melhor extrato fracionado (diclorometânico, acetato de etila ou n-butanol) a ser trabalhado fez-se uma CCD em cromatofolhas de sílica gel G 60 F₂₅₄ e optou-se então por direcionar os estudos de isolamento de constituintes com a fração diclorometânica.

4.5.2.2 Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico

Coluna 1

O fracionamento preliminar do extrato iniciou-se através de cromatografia em coluna do tipo “flash”. Para a execução desta coluna utilizou-se 3g de extrato diclorometânico e 150 g de sílica gel. Nesta técnica, o gel de sílica foi suspenso em hexano:acetona (9:1) e a suspensão foi transferida para uma coluna de vidro, a qual possui uma das extremidades afilada e munida de uma torneira. Após a transferência e compactação do adsorvente, a amostra foi ressuspensa em pequena quantidade de eluente e aplicada sobre a coluna de gel de sílica.

Os constituintes do extrato foram eluídos através da coluna com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada à extremidade superior desta. As frações recolhidas possuíam volume variável, na dependência da sua coloração, não excedendo o volume de 200mL.

Os resultados da separação foram monitorados por CCD utilizando-se anisaldeído-ácido sulfúrico como revelador, sendo que as frações foram reunidas conforme a semelhança de seus constituintes.

Coluna 2

Após analisar as frações obtidas com a coluna “flash”, foram escolhidas as frações 4, 5 e 6 para realizar uma nova separação. A separação dos constituintes foi realizada através de cromatografia em coluna (CC), seguindo-se a mesma técnica descrita no item 3.5.2.2, porém sem a utilização de pressão. As condições da coluna estão descritas a seguir.

Coluna: 40g de sílica gel 60

Amostra: 199mg das frações 4, 5 e 6 da coluna 1

Eluente: hexano:acetona (9:1)

Vazão: 15 a 20 gotas/minuto

Coluna 3

A fração resultante da reunião das alíquotas 13, 14 e 15 foi submetida a nova cromatografia em coluna nas condições detalhadas abaixo.

Coluna: 20g de sílica gel 60

Amostra: 54,4mg das frações 13, 14 e 15 da coluna 2

Eluente: diclorometano

Vazão: 15 a 20 gotas/minuto

Coluna 4

Com a finalidade de isolar mais compostos, foi realizada uma nova coluna “flash”, utilizando a mesma quantidade de amostra da fração diclorometânica e de sílica. Optou-se por um sistema gradiente nesta coluna, o qual está descrito na tabela 3.

TABELA 3 – Sistemas de solventes empregados na preparação da coluna 4.

Sistema eluente da fração diclorometânica	Sub-frações
Diclorometano	1-5
Hexano:acetona (9:1)	6-11

Coluna 5

Após a análise das frações obtidas, optou-se trabalhar, primeiramente, com a fração de nº 2, devido à mesma apresentar manchas características de terpenos além do seu rendimento ter sido bastante significativo. As condições da coluna estão descritas a seguir.

Amostra: 111,9mg

Eluente: Clorofórmio

Vazão: 15 a 20 gotas/minuto

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de *Alternanthera brasiliana* foram realizados no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da UFSM, com a colaboração do Profº. Drº.

Sydney Hartz Alves. Para tanto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A2 para fungos leveduriformes (NCCLS, 2002) e M7-A4 para bactérias (NCCLS, 1997).

Esta metodologia avalia a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a mais baixa concentração da substância que inibe completamente o crescimento do microorganismo.

A interpretação dos resultados é baseada na turvação ou não das cavidades. A turvação evidencia a ineficácia da amostra na concentração testada perante o microorganismo, enquanto que a limpidez indica a concentração inibitória mínima (CIM) da fração testada em relação ao microorganismo em questão. Na possibilidade de se estabelecer um CIM, é feito um repique dessa concentração objetivando a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), quando se trata de bactérias e concentração fungicida mínima (CFM) quando o microorganismo em questão pertence a classe dos fungos ou algas.

As concentrações das frações testadas estão descritas na tabela 4.

TABELA 4 – Concentrações dos extratos utilizados nos ensaios microbiológicos.

Atividade antibacteriana ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade antifúngica ($\mu\text{g/mL}$)
2500,0	1250,0
1250,0	625,00
625,00	312,50
312,50	156,25
156,25	78,125

4.6.1 Microorganismos

A tabela 5 apresenta os microorganismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana além dos fármacos utilizados como controle frente a cada cepa testada.

TABELA 5 – Cultivos padrões e fármacos utilizados no estudo.

Microorganismo	ATCC	Controle	µg/mL
Escherichia coli	ATCC 2792	Ampicilina	8,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Ceftriazone	16,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293	Ampicilina	2,0
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Imipenem	0,06
<i>Cândida albicans</i>	ATCC 44773	Fluconazol	16,0
<i>Cândida glabrata</i>	Isolado clínico	Fluconazol	32,0
<i>Saccharomyces cereviseae</i>	ATCC 28952	Fluconazol	2,0
<i>Prototheca zopfii</i>	Isolado clínico	Anfotericina B	0,5

4.7 Avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de *Alternanthera brasiliana*

A preparação do material vegetal se deu conforme o item 3.5.2. Foram avaliados o extrato bruto, as frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol das folhas de *Alternanthera brasiliana*. Para avaliação da atividade antioxidante foi usado o método fotocolorimétrico do DPPH (1,1-difenil, 2-picrilidrazila) utilizando o método (CHOI *et al.*, 2002). Para o ensaio foram preparadas soluções de 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,8µg/mL de cada amostra em etanol. À 2,5mL das amostras adicionou-se 1mL da solução de DPPH 0,3mM em etanol. Após 30 minutos foram feitas as leituras das absorvâncias a 518nm, onde o radical DPPH apresenta máximo de absorção. Uma solução de DPPH (1mL, 0,3mM) em etanol (2,5mL) foi usada como controle negativo e uma preparação de ácido ascórbico foi utilizada como padrão (controle positivo) nas mesmas concentrações das frações. Etanol foi usado para zerar o espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1021), tendo como branco as soluções testes de cada fração sem adição do DPPH visando minimizar a interferência de componentes dos extratos na leitura. As leituras foram efetuadas em triplicata, sendo determinados o desvio padrão e o coeficiente de variação percentual (CV%) para cada uma das concentrações.

A porcentagem da inibição de cada fração analisada frente ao DPPH foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{(\text{Ab amostra} - \text{Ab branco})}{\text{Ab controle}} \times 100 \right]$$

onde:

Ab amostra = absorbância da amostra;

Ab branco = absorbância do branco;

Ab controle = absorbância do controle.

4.8 Doseamento de polifenóis das frações das folhas de *Alternanthera brasiliana*

O doseamento de polifenóis foi realizado com as mesmas frações e extrato bruto utilizado para a realização do método do DPPH, com a finalidade de estabelecer uma possível correlação entre ambos, uma vez que os polifenóis possuem atividade antioxidante reconhecida (GOUPY *et al.*, 1999; HOUR *et al.*, 1999).

Foram doseadas as frações diclorometânicas, acetato de etila, n-butanol e o extrato bruto das folhas de *A. brasiliana*. Para o doseamento dos polifenóis foi utilizado o método de Chandra e Mejia (2004) modificado, o qual usa Folin-Ciocalteu (reagente para fenóis) que permite a determinação indireta dos compostos fenólicos utilizando o ácido gálico como padrão de todos os fenóis. Nesta reação forma-se um complexo de cor azulada, que absorve radiação no comprimento de onda de 760 nm. O método não é específico, porque outros compostos podem ser reduzidos, como açúcares e ácido ascórbico (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Este método foi adaptado utilizando como padrão o ácido pirogálico no lugar do ácido gálico (F. Bras.IV). As concentrações de polifenóis das amostras foram determinadas por comparação com a curva de calibração elaborada com o ácido pirogálico.

Para o ensaio foram preparadas soluções de 0,15mg/mL de cada amostra onde se utilizou 10mL etanol de modo a solubilizar as frações e após o volume total foi completado a 100 mL com água destilada. À 1mL das amostras foram adicionados 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu, após 5minutos acrescentou-se 10mL de carbonato de sódio 20% e as leituras das absorbâncias foram realizadas após 10 minutos, em 730nm. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. A

curva de calibração foi feita com ácido pirogálico nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,015; 0,025 e 0,03mg/mL e suas leituras procedidas da mesma forma das amostras. Para zerar o espectrofotômetro (Shimadzu, UV 1021) foi utilizado água destilada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Introdução aos resultados e discussão referentes à parte I

Devido à crescente demanda mundial, as plantas utilizadas como medicinais necessitam cada vez mais de um estabelecimento de normas que venham a contribuir para o controle de qualidade, que garanta a identidade correta dos insumos bem como em todas as etapas do desenvolvimento para a utilização dos mesmos pela indústria farmacêutica.

Sendo assim, esta dissertação, em sua primeira parte, objetivou avaliar os aspectos botânicos existentes entre duas espécies de *Alternanthera* com uso medicinal popular comum, procurando definir diferenças consistentes, destacando aspectos de relevância para a padronização de matérias primas de *A. brasiliana* e *A. dentata*.

Muitas vezes, as diferenças a olho nu de espécies do mesmo gênero não são suficientes para a correta identificação requerendo uma análise mais profunda das estruturas presentes no vegetal. O detalhamento deste estudo está descrito a seguir

5.2 Análise morfo-histológica

A primeira diferença detectada entre as duas espécies se refere a estrutura do caule principal que reflete basicamente o desenvolvimento destas plantas. Em *Alternanthera brasiliana* as folhas se distribuem ao longo de todo o caule principal com muitas gemas e nós que ocorrem ao longo deste caule, e por vezes se apresenta de forma decumbente. Em *Alternanthera dentata* as folhas se encontram concentradas no ápice do caule, assim como os nós dando origem a ramificações, o que lhes confere uma característica mais ereta com um caule principal. Outra diferença estabelecida foi a coloração das folhas onde a primeira espécie apresenta uma coloração mais avermelhada e a espécie *Alternanthera dentata* uma coloração mais esverdeada (fig. 21). Estas diferenças permaneceram mesmo quando ambas foram submetidas à mesma incidência solar e com o mesmo tipo de substrato.



Figura 7a



Figura 7b

FIGURA 7 – Aspecto geral dos ramos vegetativos de *Alternanthera brasiliana* (7a) e *Alternanthera dentata* (7b).

5.2.1 Análise morfológica

A tabela 6 apresenta os resultados da análise morfológica das folhas de *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata*, seguida das figuras 8 a 14, correspondentes. Destaca-se a coloração, o contorno e a margem das folhas, bem como a abundância de tricomas na face dorsal e a forma do pecíolo em seção transversal como sendo características macroscópicas úteis na diferenciação entre estas duas espécies.

TABELA 6 – Análise morfológica de *Alternanthera brasiliana* versus *Alternanthera dentata*.

	<i>Alternanthera dentata</i>	<i>Alternanthera brasiliana</i>
Lâmina Foliar		
Contorno	Oblongo com pouca pilosidade.	Elíptico, oblongo-lanceolado com pilosidades alvas e em maior quantidade que na outra espécie
Ápice	Agudo (mais expressivo que em <i>A. brasiliana</i>).	Agudo (mais tênue que em <i>A. dentata</i>).
Base	Simétrica, cuneata.	Simétrica, cuneata.
Margem	Inteira com poucos tricomas tectores muito espaçados entre si.	Inteira com tricomas tectores muito próximos e em número elevado.
Subdivisão do limbo	Inteiro e mais largo na região mediana e mais longo em comprimento do que em <i>A. brasiliana</i> .	Inteiro e mais delgado na região mediana do que em <i>A. dentata</i> .
Nervação	Peninérvia.	Peninérvia.
Tamanho	7,0cm compr. x 4,0cm larg.	4,5cm compr. x 2,0 cm larg.
Transparência	com poucos tricomas esbranquiçados e evidentes pontos translúcidos irregulares.	com tricomas esbranquiçados do tipo viloso.
Consistência	Membranácea.	Membranácea.
Pecíolo		
Aspecto Geral	Achatado com 25-30mm de comprimento.	Delgado com 10-15mm de comprimento.
Inserção	Marginal.	Marginal.
Secção transversal	Côncavo-convexo.	Circular, levemente canaletado.
Filotaxia	Oposta	Oposta
Venação		
Venação	Pinada, camptódroma, eucamptódroma.	Pinada, camptódroma, eucamptódroma.
Última marginal	Fimbriada.	Fimbriada.
Aoréola	Pentagonal a irregular bem demarcada.	Pentagonal a irregular não evidente ao estereomicroscópio.

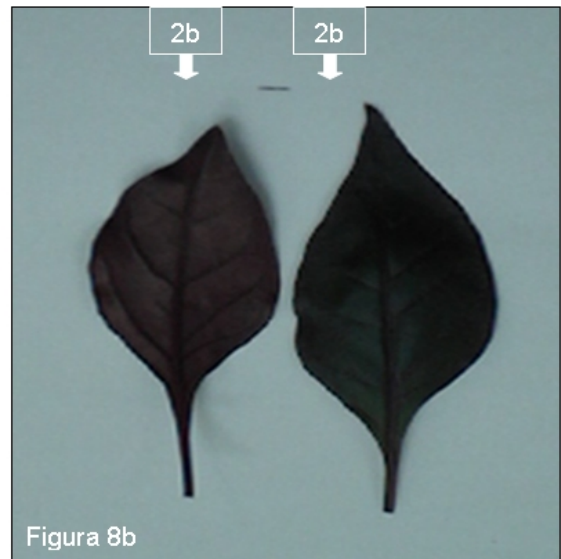


FIGURA 8 – Aspecto macroscópico da folha fresca de *Alternanthera brasiliana* (fig. 8a) e *Alternanthera dentata* (fig. 8b). 1a.-lâmina foliar vista ventral; 1b.-lâmina foliar vista dorsal; 2a.-lâmina foliar vista dorsal; 2b.-lâmina foliar vista ventral.

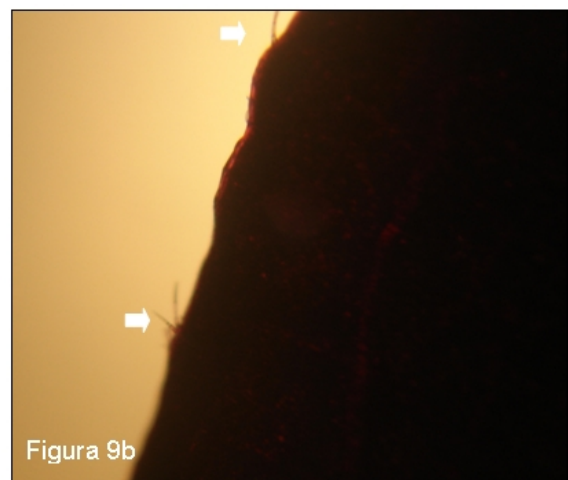
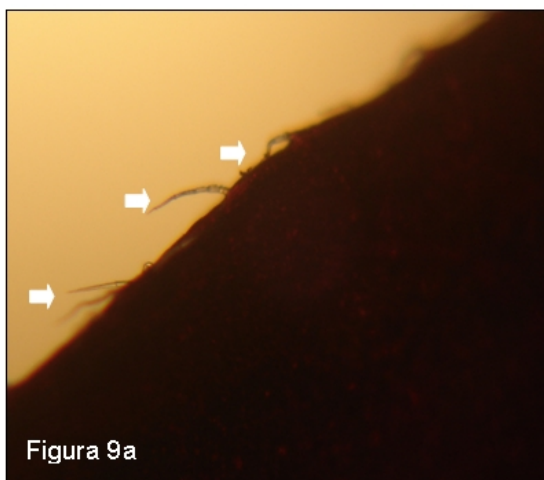


FIGURA 9 – Margem da lâmina foliar de *Alternanthera brasiliana* (fig. 9a) e *Alternanthera dentata* (fig. 9b). Legenda: as setas indicam os tricomas presentes na margem foliar.

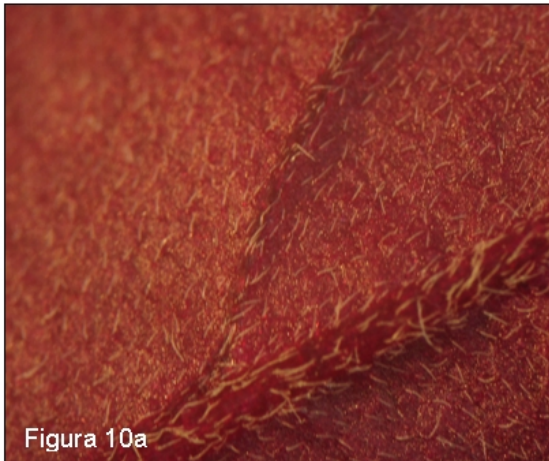


FIGURA 10 – Tricomas da face dorsal da folha fresca de *Alternanthera brasiliana* (fig. 10a) e *Alternanthera dentata* (fig. 10b).

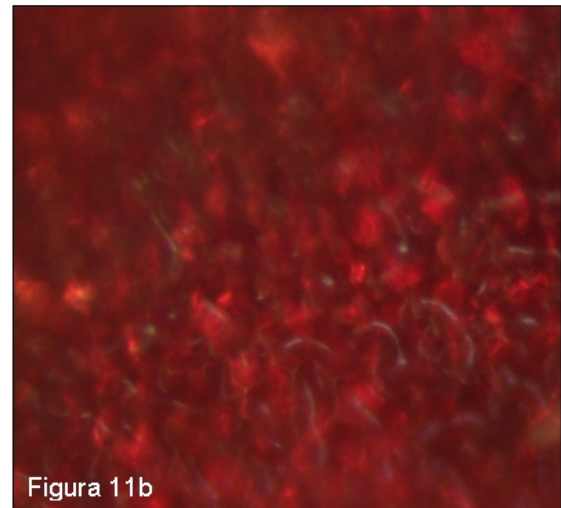
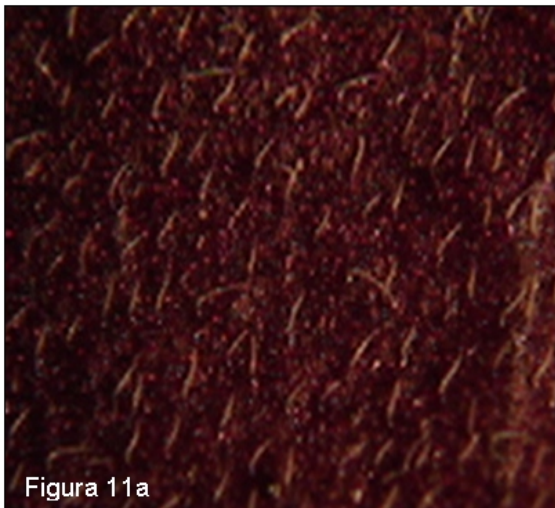


FIGURA 11 – Limbo de *Alternanthera brasiliana* (fig. 11a) e *Alternanthera dentata* (fig. 11b) evidenciando os tricomas tectores.



FIGURA 12 – Aspecto geral da seção transversal do pecíolo de *Alternanthera brasiliana* (fig. 12a) e *Alternanthera dentata* (fig. 12b).

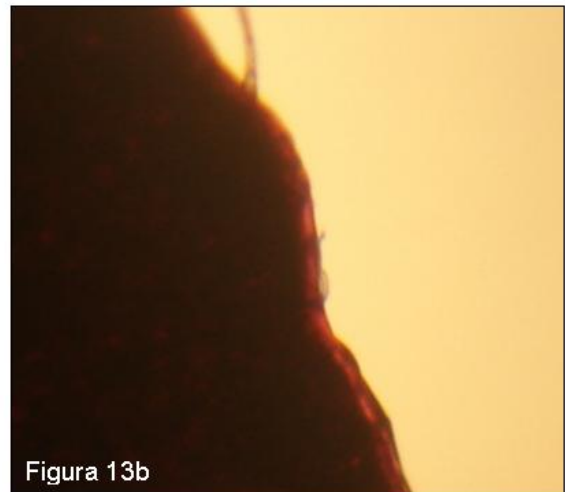
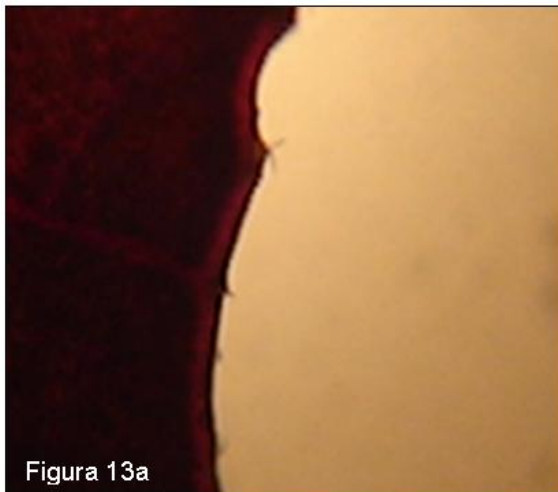


FIGURA 13 – Margem fimbriada, camptódroma, eucamptódroma de *Alternanthera brasiliana* (fig. 13a) e *Alternanthera dentata* (fig. 13b) em detalhe.

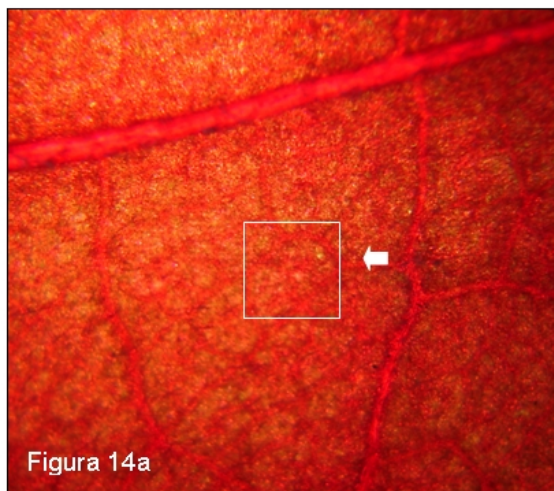


FIGURA 14 – Aureola pentagonal a irregular das faces ventrais dos limbos foliares de *Alternanthera brasiliana* (fig. 14a) e *Alternanthera dentata* (fig. 14b).

5.2.2 Análises anatômicas das folhas – *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata*

As tabelas 7 e 8 referem-se as análises microscópicas de *A. brasiliana* e *A. dentata*, respectivamente. Os caracteres microscópicos da folha de *A. dentata* e *A. brasiliana* exibem características próximas como a epiderme uniestratificada com estômatos do tipo xerofítico, o mesofilo heterogêneo com idioblastos contendo drusas, e os feixes vasculares protegidos por uma bainha parenquimática característica de plantas do tipo C4. Contudo, pode-se averiguar que a cutícula em *A. brasiliana* é mais espessa que em *A. dentata*. Os estômatos são anfiestomáticos

para *A. brasiliiana*, enquanto que *A. dentata* exibe estômatos hipostomáticos. O parênquima esponjoso em *A. dentata* mostra-se mais frouxo que em *A. brasiliiana* que, por vezes, assume um menor número de camadas celulares neste parênquima. Os tricomas da face adaxial são muito numerosos em *A. brasiliiana* e também ocorre, na região central das folhas, uma aresta de nervura convexa e também arqueada em *A. dentata*, porém em *A. brasiliiana* a região central das folhas exibe uma aresta de nervura do tipo convexo. Na região central em *A. brasiliiana* ocorre um colênquima junto a epiderme inferior, enquanto que em *A. dentata* o colênquima é subjacente à epiderme superior. O feixe vascular de *A. dentata* mostra células parenquimáticas junto ao floema o que não foi observado em *A. brasiliiana* que exibe um floema compacto.

TABELA 7 – Análise microscópica da folha de *Alternanthera brasiliiana*.

Seção transversal	Limbo	Epiderme (uniestratificada, anfiestomática com estômato do tipo xerofítico)	<u>Cutícula</u> : delgada sem formações epicuticulares, sendo mais espessa na região central do limbo.
			<u>Células epidérmicas</u> : camada simples de células pavimentosas. A parede periclinal é maior que a parede anticlinal. A epiderme na região abaxial apresenta células de, aproximadamente, a metade do comprimento das células epidérmicas na região adaxial.
			<u>Estômatos</u> : xerofítico, anfiestomático.
			<u>Tricomas tectores</u> : esparsos, unisseriados composto por 3 a 4 células e com base simples.
		Mesofilo (heterogêneo, bifacial)	<u>Parênquima paliçádico</u> : composto por apenas 1 camada de células.
			<u>Parênquima esponjoso</u> : composto por 2 a 3 camadas de células; as de maior dimensão estão localizadas nas camadas próximas a paliçada. Também, próximo a paliçada ocorrem idioblastos com acúmulo de oxalato de cálcio do tipo drusa. Ocorrem células justapostas, mas o espaço intercelular é irregular. Em todas as formações parenquimáticas não foram evidenciados canais ou células secretoras.
Sistema de feixe vascular	<u>Região de nervuras primárias</u> : As nervuras de grande porte apresentam-se protegidas por uma bainha vascular composta de parênquima esponjoso. Abaixo da epiderme abaxial ocorre 2 a 3 camadas de colênquima do tipo angular. Os feixes vasculares são do tipo colateral fechado e possuem formato côncavo-convexo.		

(cont. Tabela 7)

Seção transversal	Limbo	Sistema de feixe vascular	<u>Região de nervuras secundárias e menores:</u> A estrutura das nervuras secundárias e das que possuem menor porte segue o mesmo padrão das nervuras primárias, porém a bainha vascular fica mais definida na estrutura como um todo.
Seção paradérmica (adaxial)	<u>Parede celular:</u> sinuosa ao centro e reta próximo as extremidades.		
	<u>Estômatos:</u> diacíticos (predominam), anisocíticos e paracíticos.		
	<u>Tricomas tectores:</u> são unisseriados com extremidades afiladas e parede verrugosa. Em geral apresentam 3 células, entretanto, também são encontrados tricomas com 2 células.		
Seção paradérmica (abaxial)	<u>Parede celular:</u> sinuosa.		
	<u>Estômatos:</u> diacíticos (predominam), anisocítico e anomocítico.		
	<u>Tricomas tectores:</u> unisseriados com extremidades afiladas e parede verrugosa (predomina) e lisa. Células unidas por vilosidades. Os tricomas são formado por 3 células, mas também se encontra tricomas com 2 a 5 células.		

TABELA 8 – Análise microscópica de *Alternanthera dentata*.

Seção transversal	Limbo	Epiderme (uniestratificada, anfiestomática com estômato do tipo xerofítico)	<u>Cutícula:</u> mais tênue que na espécie <i>A. brasiliana</i> e com um discreto espessamento na região central. Sem formações epicuticulares.
			<u>Células epidérmicas:</u> camada simples de células pavimentosas. A parede periclinal geralmente apresenta-se com tamanho superior ao da parede anticlinal. As células epidérmicas na região abaxial apresenta comprimento inferior ao das células da epiderme adaxial.
			<u>Estômatos:</u> xerofítico, hipostomático.
		Mesofilo (heterogêneo, bifacial)	<u>Tricomas tectores:</u> pouco numerosos, unisseriados, composto por 2 células e uma base simples (unicelular).
			<u>Parênquima paliçádico:</u> composto por apenas uma camada de células.
			<u>Parênquima esponjoso:</u> composto por 3 a 4 camadas de células; as células próximas ao parênquima paliçádico possuem maior tamanho e, as próximas a epiderme abaxial, são menores. O espaço intercelular é irregular e as células encontram-se mais distantes entre si do que em <i>A. brasiliana</i> . Ocorrem idioblastos com acúmulo de oxalato de cálcio do tipo drusa.

(cont. Tabela 8)

Seção transversal	Limbo	Sistema de feixe vascular	Região de nervuras primárias: As nervuras de grande porte apresentam-se protegidas por uma bainha parenquimática. Logo abaixo da epiderme abaxial ocorre uma camada tênue de colênquima. Os feixes vasculares são do tipo colateral.
			Região de nervuras secundárias e menores: A estrutura das nervuras secundárias e das que possuem menor porte segue o mesmo padrão das nervuras primárias, porém a bainha vascular parenquimática está bem delimitada.
Seção paradérmica (adaxial)	Parede celular: sinuosa a reta.		
	Estômatos: diacíticos.		
	Tricomas tectores: não foi encontrado tricoma em nenhuma seção paradérmica.		
Seção paradérmica (abaxial)	Parede celular: sinuosa.		
	Estômatos: diacíticos (predominam), anisocítico e anomocítico.		
	Tricomas tectores: unisseriados com extremidades afiladas e parede verrugosa. Geralmente estes tricomas encontram-se compostos por 2 células, mas também são encontrados tricomas de 3 células.		

As figuras 15 a 20 evidenciam diferentes estruturas das folhas de *A. brasiliiana* e *A. dentata* em cortes transversais e as figuras 21 a 23 expõem as características evidenciadas em cortes paradérmicos nas folhas das referidas espécies.

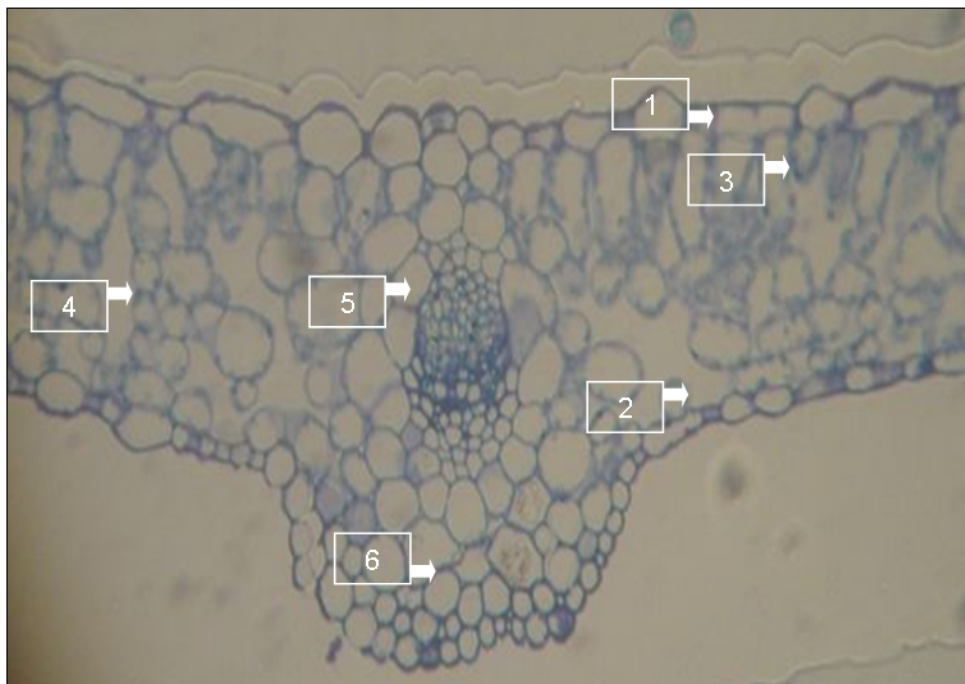


FIGURA 15 – Seção transversal evidenciando o aspecto geral da região central do limbo da folha de *Alternanthera brasiliiana*. Legenda: 1. epiderme adaxial; 2. epiderme abaxial; 3. Parênquima paliçadico; 4. Parênquima esponjoso; 5. Feixe vascular, 6. colênquima.

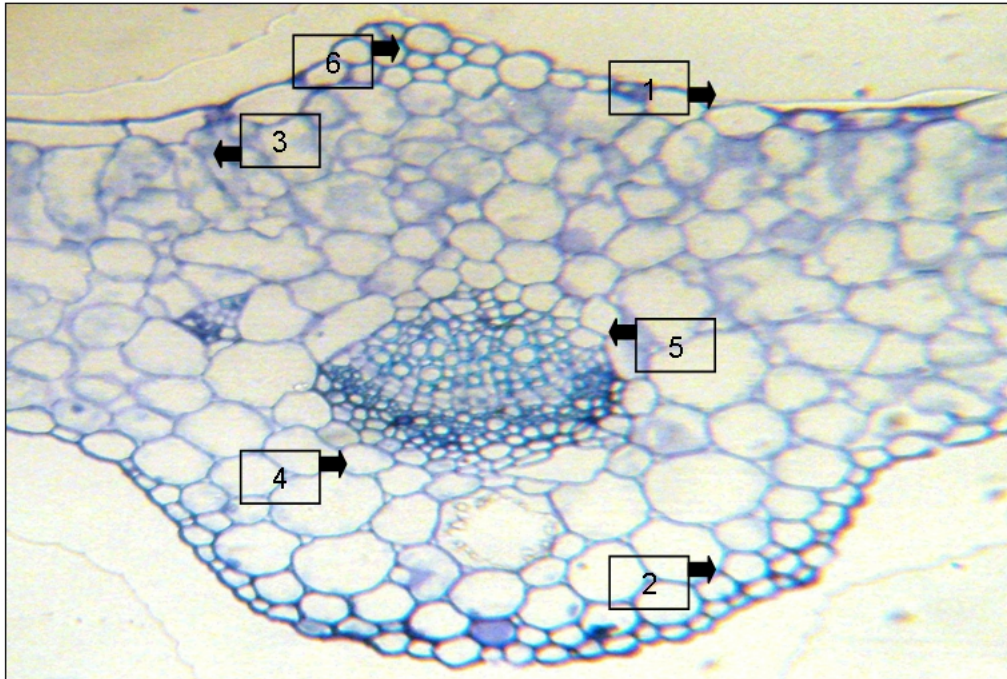


FIGURA 16 – Seção transversal evidenciando o aspecto geral da região central do limbo da folha de *Alternanthera dentata*. Legenda: 1. epiderme da região superior; 2. epiderme da região inferior; 3. Parênquima paliçádico; 4. Parênquima esponjoso; 5. Feixe vascular; 6. Colênquima.

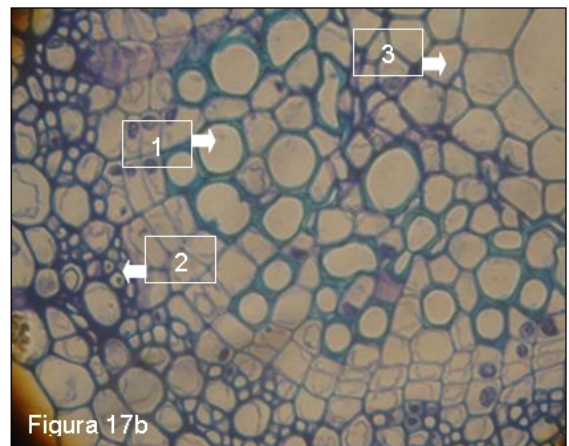
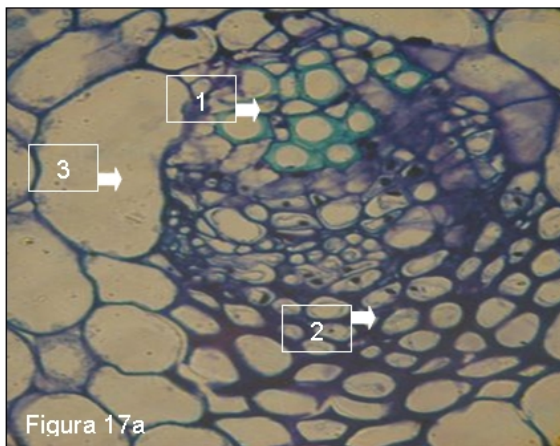


FIGURA 17 – Seção transversal evidenciando o aspecto geral do feixe vascular central no limbo da folha de *Alternanthera brasiliana* (fig. 17a) e *Alternanthera dentata* (fig. 17b). Legenda: 1- Xilema; 2- Floema; 3- Parênquima.

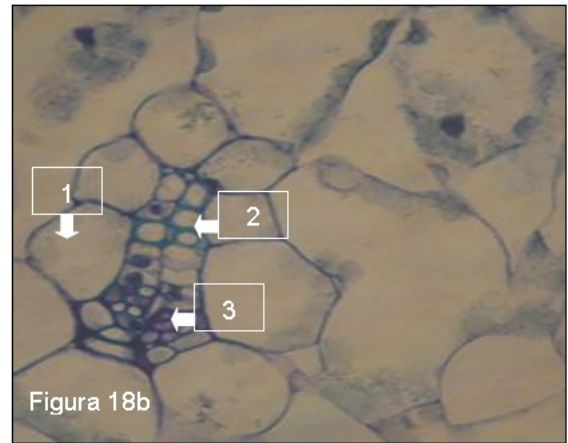
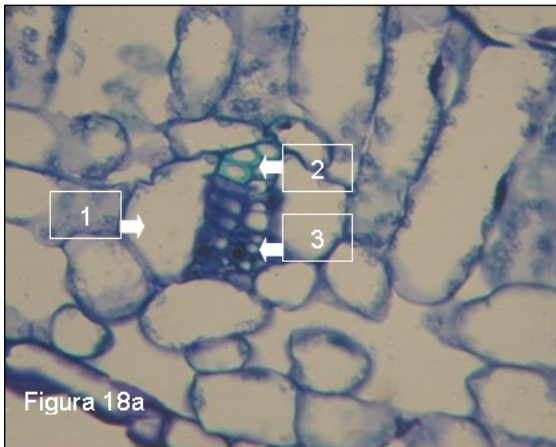


FIGURA 18 – Seção transversal da região lateral do limbo da folha de *Alternanthera brasiliana* (fig. 18a) e *Alternanthera dentata* (fig. 18b) evidenciando feixe vascular secundário protegido por bainha vascular parenquimática. Legenda: 1. Bainha vascular parenquimática; 2. Xilema; 3. Floema.

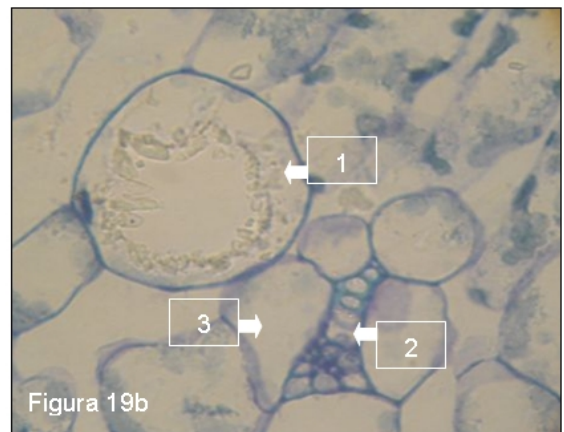
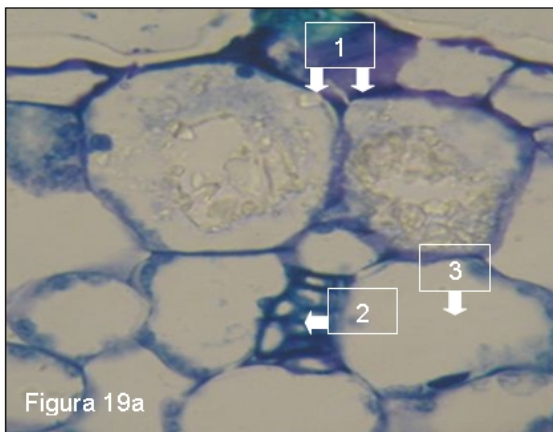


FIGURA 19 – Seção transversal da região lateral do limbo da folha de *Alternanthera brasiliana* (fig. 19a) e *Alternanthera dentata* (fig. 19b) evidenciando detalhe de feixes vasculares laterais. Legenda: 1. idioblasto cristalífico; 2. feixe vascular; 3. Bainha vascular parenquimática.

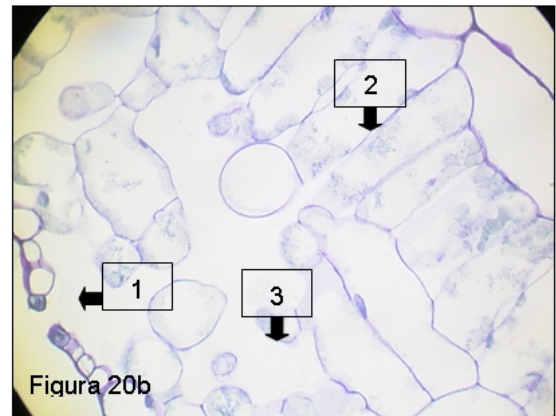
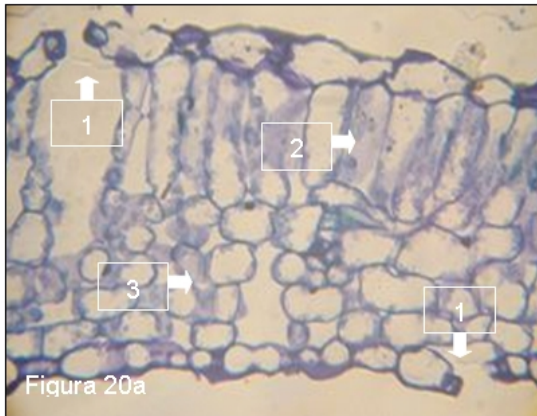


FIGURA 20 – Seção transversal da região lateral do limbo da folha de *Alternanthera brasiliana* (fig. 20a) e *Alternanthera dentata* (fig. 20b) evidenciando mesofilo. Legenda: 1. Estômatos xerofíticos na epiderme da região abaxial e adaxial; 2. Parênquima paliçádico; 3. Parênquima esponjoso.

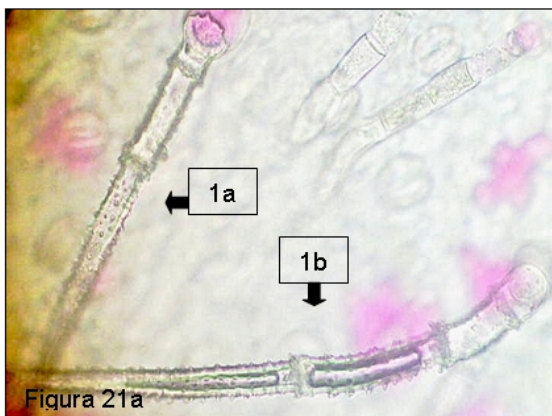


FIGURA 21 – Seção paradérmica da face abaxial do limbo de folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 21a) e *Alternanthera dentata* (fig. 21b) evidenciando tricomas tectores. Legenda: 1a.- tricoma tector unisseriado com parede verugosa formado por 3 células; 1b.- tricoma tector unisseriado com parede verugosa formado por 4 células; 2a.- tricoma tector unisseriado com parede verrugosa formado por 3 células.

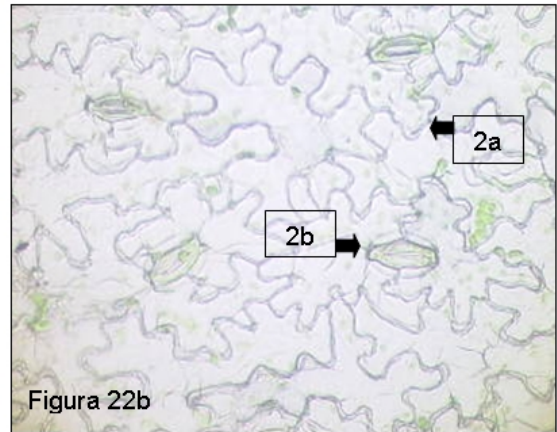
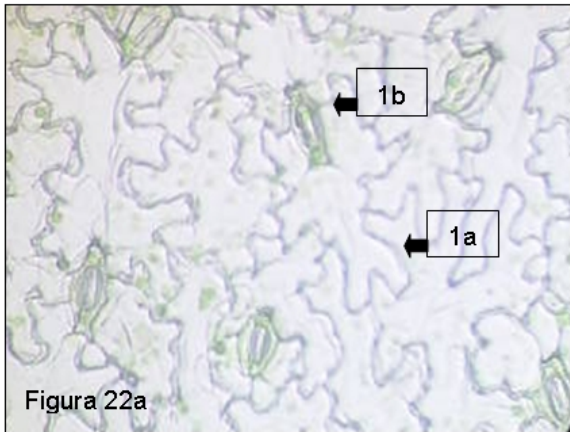


FIGURA 22 – Seção paradérmica da face abaxial do limbo de folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 22a) e *Alternanthera dentata* (fig. 22b) evidenciando células epidérmicas. Legenda: 1a. e 2a.- célula epidérmica com parede anticlinal sinuosa; 1b.e 2b.- estômatos diacíticos (predomina).

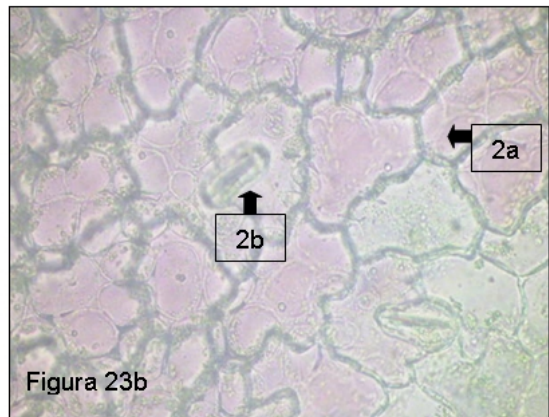
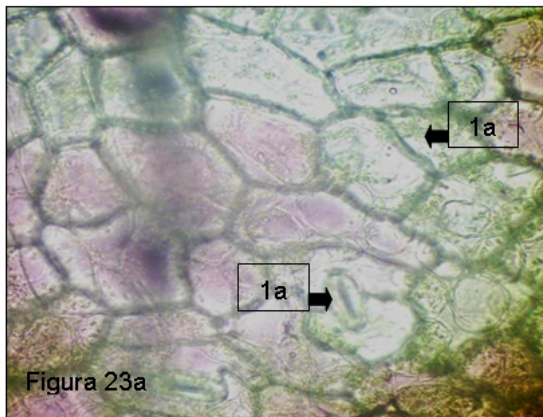


FIGURA 23 – Seção paradérmica da face adaxial do limbo de folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 23a) e *Alternanthera dentata* (fig. 23b) evidenciando células epidérmicas. Legenda: 1a.- células epidérmica com parede anticlinal reta e/ou levemente sinuosa; 2^a.- células epidérmicas com parede anticlinal pouco sinuosa; 1b. e 2b.- estômato diacítico.

5.2.3 Análise histoquímica

A tabela 9 e as figuras 24 a 29, apresentam os resultados da análise histoquímica. Pode-se constatar que as mucilagens e alcalóides ocorrem em células com localização histológica diferenciada entre as duas espécies em questão. Flavonóides e óleos voláteis diferem basicamente nestas espécies pela intensidade

dos mesmos. Os grãos de amido se diferenciam nas espécies pelo tamanho que exibem e número que são encontrados, já as antocianinas diferenciam-se pela quantidade e localização tecidual. Os reagentes e corantes utilizados estão descritos nas figuras.

TABELA 9 – Análise histoquímica das folhas de *Alternanthera brasiliana* e de *Alternanthera dentata*.

Compostos analisados	Localização histoquímica	
	<i>Alternanthera brasiliana</i>	<i>Alternanthera dentata</i>
<i>Mucilagens</i>	Junto ao parênquima, próximo ao feixe vascular central. (fig. 37a)	Junto ao parênquima próximo a epiderme na face adaxial. (fig 37b)
Polifenóis	Epiderme e parênquima subjacente a epiderme na face abaxial. (fig. 38)	Ocorre uma predominância de catequinas no parênquima esponjoso. *
Flavonóides	Epiderme na face adaxial e abaxial. (fig. 39a)	Na epiderme na face adaxial em maior quantidade. (fig. 39b)
Óleos voláteis	Parênquima esponjoso, abaixo do feixe vascular. (fig. 40a)	Parênquima esponjoso. (fig. 40b)
Alcalóides	Epiderme na face adaxial e junto ao parênquima, mais concentrado no parênquima adjacente aos feixes vasculares. (fig. 42a)	Epiderme na face adaxial. (fig. 43)
Amido	Grão de amido simples distribuídos nas células parenquimáticas. (fig. 41a)	Grãos de amido simples, em grande quantidade no parênquima esponjoso. (fig. 41b)
Antocianinas	Grande quantidade em praticamente todas as regiões anatômicas. *	Em grande quantidade no parênquima esponjoso. *

* Fotografia não mostrada

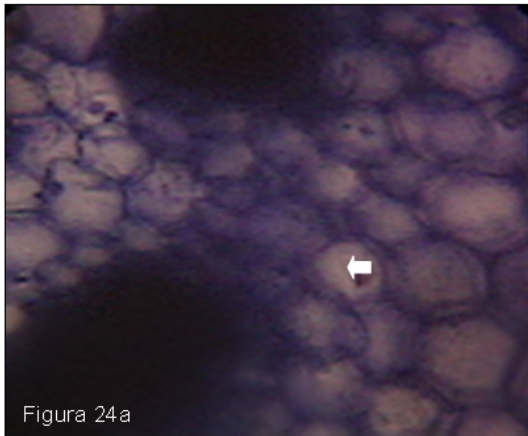


FIGURA 24 – Coloração por tinta da china evidenciando mucilagens – folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 24a) e de *Alternanthera dentata* (fig. 24b).

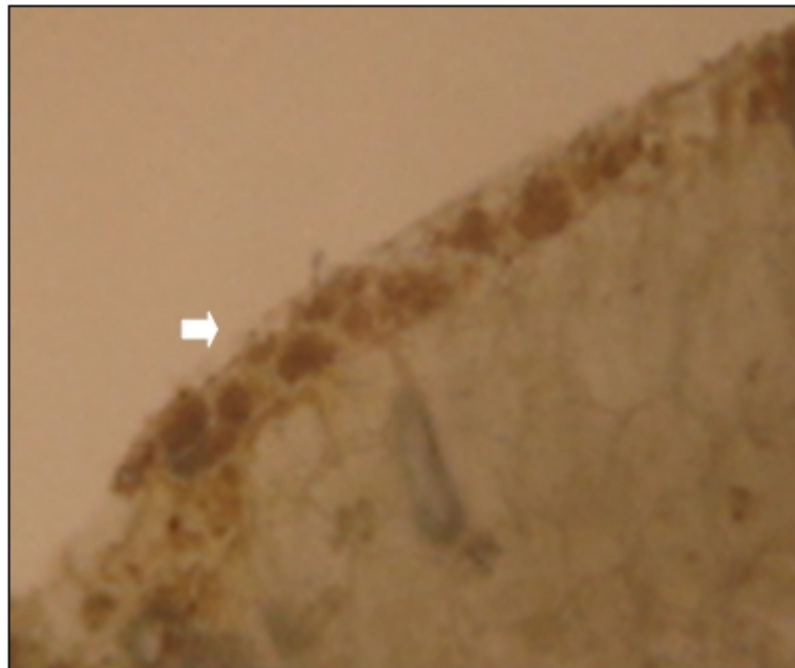


FIGURA 25 – Coloração por cloreto férrico evidenciando polifenóis em seção transversal da folha de *Alternanthera brasiliana*.

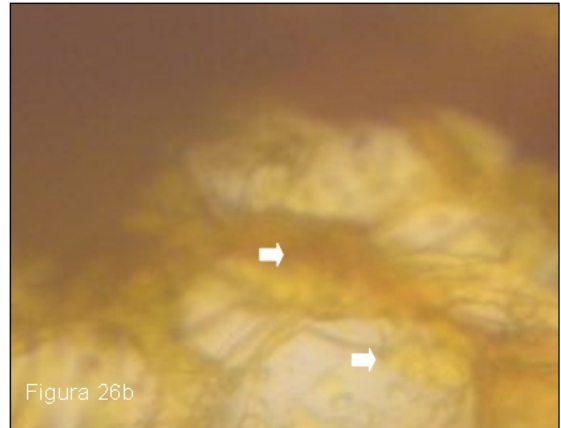
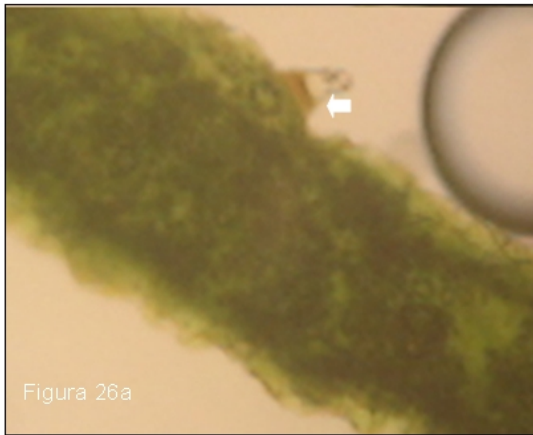


FIGURA 26 – Coloração por hidróxido de potássio 5% evidenciando flavonóides em seção transversal das folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 26a) e *Alternanthera dentata* (fig. 26b).

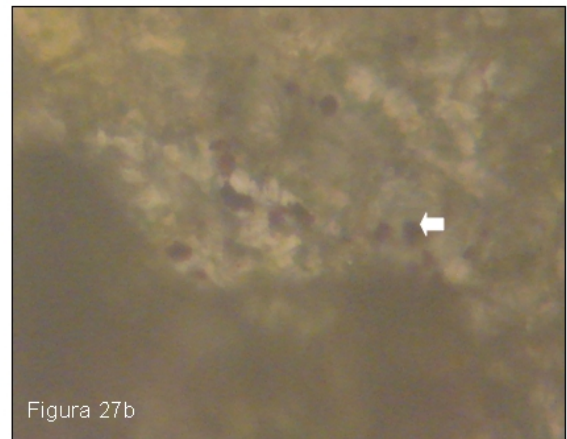
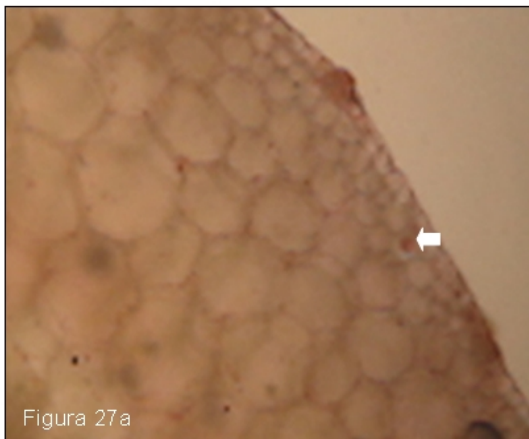


FIGURA 27 – Coloração do Sudan III evidenciando óleos voláteis em seção transversal das folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 27a) e *Alternanthera dentata* (fig. 27b).

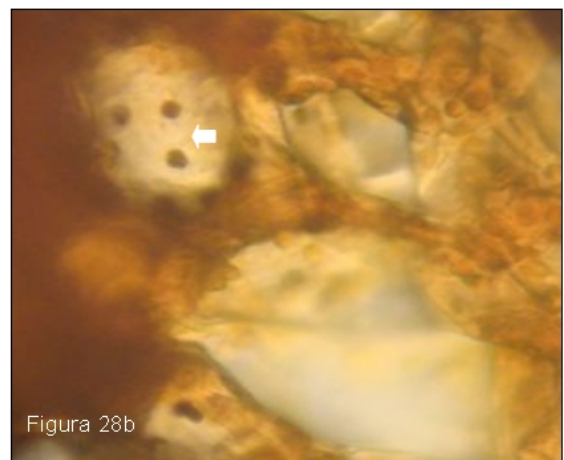
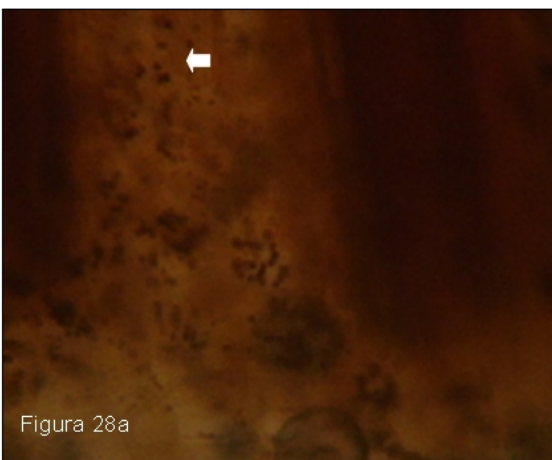


FIGURA 28 – Coloração por reagente lugol evidenciando grãos de amido em seção transversal das folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 28a) e *Alternanthera dentata* (fig. 28b).

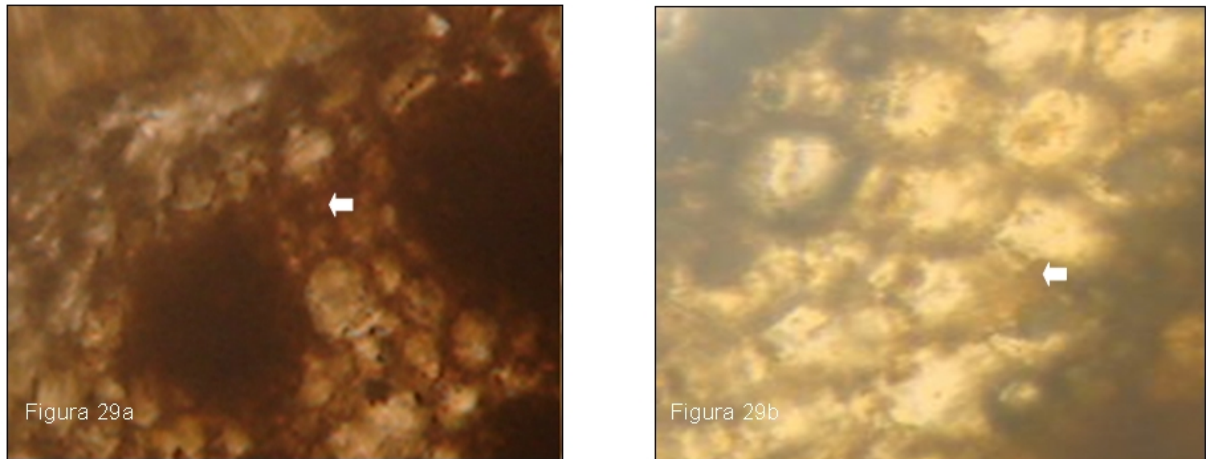


FIGURA 29 – Coloração por reativo de Dragendorff evidenciando alcalóides em seção transversal das folhas de *Alternanthera brasiliana* (fig. 29a) e *Alternanthera dentata* (fig. 29b).

A instituição e normatização de registros de produtos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (SVMS-MS), prevê algumas determinações a fim de resgatar a necessidade de estudos de segurança, eficácia e qualidade prévios às plantas. Através da farmacobotânica, cujas técnicas são de baixo custo e de resultados imediatos (GATTUSO e GATTUSO, 1999), procurou-se estabelecer padrões morfo-anatômicos capazes de caracterizar as duas espécies de *Alternanthera*, uma vez que as mesmas apresentam diferenças sutis e inconspícuas, acarretando uma dificuldade e dúvidas quanto suas corretas identificações.

A tênue diferença entre as espécies *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata* fez com que as mesmas fossem consideradas por alguns autores como uma única espécie (LORENZI e MATOS, 2002), entretanto, em nossos estudos pode-se verificar aspectos morfológicos e anatômicos que auxiliam em uma diferenciação consistente para ambas as espécies.

Morfologicamente, a venação de *A. dentata* e *A. brasiliana* são concordantes, mas a primeira espécie apresenta o limbo mais translúcido e a segunda possui o limbo mais opaco. Outra diferença bastante significativa e de fácil percepção para diferenciar as espécies está na coloração desenvolvida por suas folhas, onde em *A. dentata* as folhas preservam o tom esverdeado na base e, gradualmente, tendem a uma tonalidade mais púrpura enquanto que em *A. brasiliana* a coloração das folhas é uniformemente púrpura em ambas as faces. Além da coloração mais fechada em *A.*

dentata, suas folhas e caules são mais robustos. Em relação ao contorno da lâmina foliar, em *A. dentata* foi determinado como sendo oblongo e tendo pouca pilosidade, enquanto que em *A. brasiliiana* o limbo foi classificado como elíptico, oblongo-lanceolado apresentando pilosidades alvas e em maior quantidade. O pecíolo em *A. dentata*, em corte transversal apresentou formato côncavo-convexo e também é mais longo que em *A. brasiliiana* o qual o mesmo toma formato circular levemente canaletado quando analisado em seção transversal.

Na revisão da literatura, conforme Edwin e Reitz (1967) as folhas de *Alternanthera dentata* são mais esverdeadas e as flores possuem sépalas mais curtas que bractéolas além de serem alvo pilosas. Na mesma chave de identificação a espécie congênica *Alternanthera brasiliiana* é descrita como tendo folhas variáveis e flores branco amarelentas além das brácteas e bracteóles apresentarem metade do tamanho das flores. Lorenzi (2000), Kissmann e Groth (1999) e Lorenzi e Moreira (2001) declaram ser a coloração mais arroxeadada das folhas e ramos e a presença de brácteas mais longas que as tépalas com as margens lacerado-denteadas as únicas diferenças entre as duas espécies.

Anatomicamente, as folhas são anfiestomáticas para a espécie *A. brasiliiana* (apresentam estômatos na face dorsal e ventral) enquanto que em *A. dentata* os estômatos se localizam somente na face abaxial da folha sendo, portanto, denominado de hipostomática. A classificação de anfiestomática está de acordo com o padrão de Amaranthaceae (METCLAFE e CHALK, 1950). Duarte e Debur (2004), descreveram para *A. brasiliiana* estômatos anomocíticos e diacíticos, contudo, no presente estudo, foram encontrados, além dos dois tipos identificados pelos autores anteriores, estômatos paracíticos e anisocíticos, porém com menor ocorrência. Quando comparadas as duas espécies estudadas houve predominância de estômatos do tipo diacíticos em ambas as faces do limbo. Delaporte *et al.* (2002) referenciou para *Alternanthera brasiliiana* a existência exclusiva de estômatos anomocíticos. Em estudo com a espécie *Alternanthera tenella*, Ferreira *et al.* (2003) identificaram estômatos do tipo diacíticos e Bona (1993) relatou a prevalência do tipo diacítico nas espécies *Alternanthera aquatica* e *Alternanthera philoxeroides*, entretanto também foram encontrados estômatos anomocíticos nestas espécies.

A forma dos tricomas segue um padrão determinado nas diversas espécies, o que determina valor taxonômico para este caráter (ESAU, 1977). Em *Amaranthaceae* o padrão dos tricomas é muito variado (METCALFE e CHALK,

1950). Os tricomas tectores encontrados na análise anatômica de *A. brasiliiana* está de acordo com o que foi observado por Duarte e Debur (2004) e Delaporte *et al.* (2002) sendo unisseriado e composto por três células com extremidade afilada e junção das células por vilosidade. Também foram encontrados tricomas com o número de células variando de duas a cinco, mas em todos os casos há predominância de parede verrugosa. Em *Alternanthera dentata*, não foi verificada a existência de tricomas em seções paradérmicas adaxiais, estando presentes somente na face abaxial e portando as mesmas características de *Alternanthera brasiliiana* sendo, majoritariamente composto por 2 células, mas por vezes com tricomas formados por 4 células. Bona (1993) mostrou existir para as espécies *A. philoxeroides* e *A. aquática* dois diferentes tipos de tricomas não glandulares. *A. stellata*, estudada por Metcalf e Chalk (1988) apresentou tricomas pluricelulares não glandulares com formações dendríticas. Ferreira *et al.* (2003) encontrou em *Alternanthera tenella* tricomas do tipo glandulares multicelulares não ramificados em ambas as faces da folha. Devido a essa ampla variedade de tipos de tricomas existentes entre as espécies de *Alternanthera*, conclui-se que este caráter pode ser útil na orientação para a identificação de espécie.

Mesofilo dorsiventral (bifacial) é comum em *Amaranthaceae* (METCALFE e CHALK, 1950), sendo encontrado nas duas espécies analisadas. Os mesmos autores também descreveram as drusas como estruturas comuns em *Alternanthera*. Em *A. tenella* foi confirmada a presença de drusas entre os feixes vasculares (FERREIRA *et al.*, 2003). Duarte e Debur (2004) confirmaram essas estruturas em *A. brasiliiana* nas células idioblásticas e, igualmente a estes pesquisadores, as espécies estudadas apresentaram igual característica estando, entretanto, em maior quantidade em *A. dentata*. A localização dos idioblastos é bastante variada, havendo uma tendência a elas se situarem próximas aos vasos de médio e pequeno porte. Foram visualizadas estruturas com forma de cristais dentro das células idioblásticas de *A. brasiliiana* e *A. dentata*. Às células idioblásticas pode-se atribuir diversas funções como balanço iônico impedindo a acumulação de oxalato tóxico, armazenamento de cálcio, proteção contra o ataque de herbívoros além de funcionarem como suporte mecânico (HARRY e BRUCE, 1980).

A epiderme simples e o parênquima paliçádico formado por uma camada de células em *A. brasiliiana* e *A. dentata* também foi verificado por Ferreira *et al.* (2003) para *A. tenella*. Da mesma forma em que houve concordância de resultados com o

tipo de células epidérmicas visualizados em seções paradérmicos realizados por Duarte e Debur (2004) e Delaporte *et al.* (2002) onde a face adaxial apresentou parede sinuosa a lisa e a face abaxial com parede ondeada.

A aresta de nervura de *A. brasiliiana* foi definida como convexa, entretanto Duarte e Debur (2004) encontraram uma nervura biconvexa mais proeminente na face abaxial, em *A. dentata*, com a análise de diversas seções transversais foi verificado além da aresta de nervura convexa a existência de arestas arqueadas. O colênquima angular de *A. brasiliiana* assim como o número de camadas celulares encontrados na porção abaxial da folha entrou em concordância com os autores citados acima. O feixe vascular central é do tipo colateral fechado e se apresenta no formato côncavo-convexo em *A. brasiliiana*, assim como em *A. dentata* não sendo verificada a variabilidade de disposições e quantidades citadas por Duarte e Debur (2004). As estruturas secundárias seguem o mesmo padrão do feixe central, porém com uma bainha parenquimática mais nítida caracterizando o tipo C4 desta família.

Quanto às análises histoquímicas pode-se inferir a presença de alcalóides, amido, antocianidinas, flavonóides, mucilagens, polifenóis e óleos voláteis em ambas as espécies. Pelo fato destes resultados serem concordantes em *A. brasiliiana* e *A. dentata*, o estudo histoquímico destas espécies não pode ser utilizado como critério de diferenciação. Algumas classes de compostos identificados por corantes e reagentes utilizados nas análises histoquímicas também já tiveram sua confirmação de existência no gênero através de estudos fitoquímicos como os alcalóides, esteróides e triterpenos identificados por Calderón, García Assef e Fuentes (1997) para a espécie *A. pungens*, os terpenos, esteróides (MACEDO *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 1995) e compostos fenólicos citados por Santos *et al.* (1995) para a *A. brasiliiana* assim como os flavonóides presentes na mesma espécie e identificados por Brochado *et al.* (2003).

5.3 Introdução aos resultados e discussões referentes a parte II

A segunda parte desta dissertação contemplou análises de caráter fitoquímico, as quais visaram a identificação de metabólitos secundários existentes em *A. brasiliiana* e a aplicação de testes antimicrobianos e antioxidante além da determinação do teor de polifenóis presentes na referida espécie.

Para o estudo fitoquímico fez-se uso de técnicas cromatográficas tradicionais como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada. Técnicas por CLAE são bastantes práticas nesta linha de estudos, uma vez que trata-se de uma

metodologia bastante sensível e que permite acoplar outros métodos de análise agilizando a identificação dos constituintes entretanto, por mais que a CLAE seja uma técnica muito sensível, as análises cromatográficas empregadas também reproduzem resultados satisfatórios. Análises de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram utilizadas de modo a possibilitar a identificação dos compostos isolados. Auxiliando esta investigação encontram-se relatos científicos os quais são fundamentais na identificação das substâncias. Os testes biológicos foram realizados *in vitro* empregando espectrofotômetro para leitura e posterior interpretação dos resultados.

5.4 Rendimento dos extratos das folhas de *Alternanthera brasiliana*

5.4.1 Rendimento e perfil das frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol.

A partir de 472,33g do pó das folhas secas de *Alternanthera brasiliana*, foram obtidos 11,80g de extrato seco da fração diclorometânica, correspondendo a um rendimento de 2,49%; 2,83 g da fração acetato de etila, representando 0,59% e 9,44g da fração butanólica o que equivale a 1,99% do total da droga em pó macerada. Todas as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada. A fração diclorometânica forneceu o maior rendimento e, partir dessa, foram isolados os compostos Ab1, Ab2, Ab3 e Ab4.

A figura 30 representa o perfil cromatográfico de frações diclorometânicas de *A. brasiliana*, provenientes de 4 coletas realizadas no município de Santa Cruz do Sul.

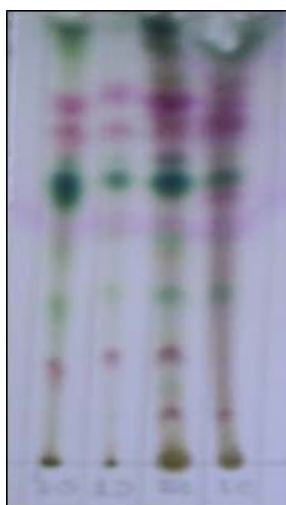


FIGURA 30 – Cromatograma das frações diclorometânicas de *A. brasiliana* com observação sob luz visível. Sistema eluente: CH_2Cl_2 : EtOH (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

5.4.2 Perfis cromatográficos das frações das colunas 1, 2 e 3

Coluna 1

Foram coletadas e analisadas cromatograficamente 22 frações. A figura 31 representa o perfil cromatográfico das frações 4 a 10, sendo escolhidas as de número 4, 5 e 6 para um novo fracionamento.



FIGURA 31 – Cromatograma das frações 4 a 10 da coluna 1 com observação sob luz visível. Sistema eluente: hexano:acetona (9:1)-migrado 4 vezes, revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C.

Coluna 2

As figuras 32 e 33 mostram o perfil cromatográfico das frações obtidas na coluna 2. Da esquerda para a direita, frações em ordem numérica crescente. A última coluna da direita representa o material de partida.

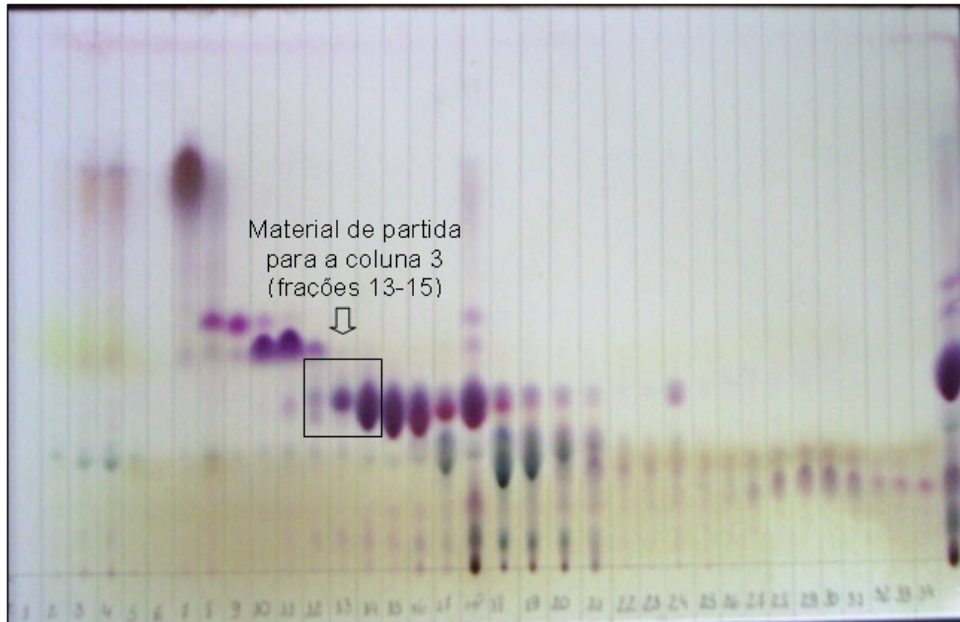


FIGURA 32 – Cromatograma das frações 1 a 34 da coluna 2 com observação sob luz visível. Sistema eluente: hexano:acetona (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C.

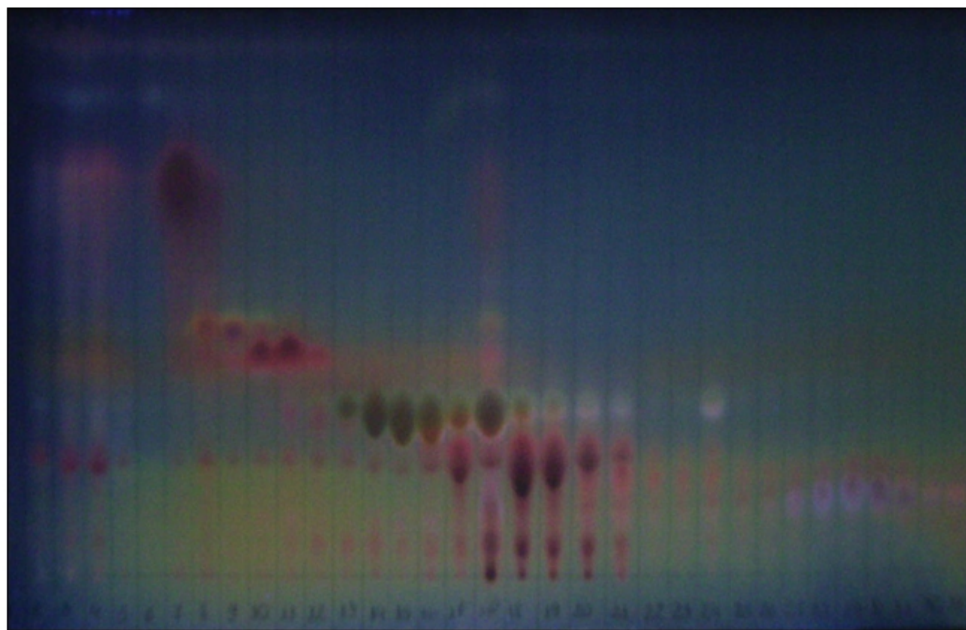


FIGURA 33 – Cromatograma das frações 1 a 34 da coluna 2 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: hexano:acetona (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C.

As frações 13, 14 e 15 foram juntadas devido suas semelhanças e seu perfil isolado é mostrado na figura 34.

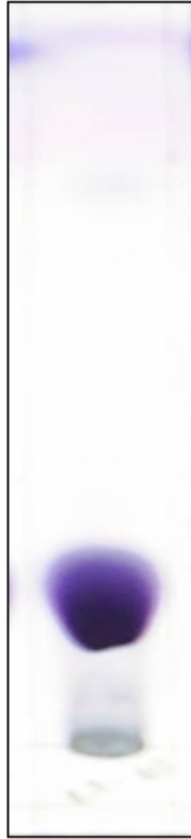


FIGURA 34 – Cromatograma das frações 13 a 15 da coluna 2 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CH_2Cl_2 -migrado 2 vezes, revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

Coluna 3

Após o fracionamento das alíquotas 13, 14 e 15, oriundas das colunas 2, obteve-se o seguinte perfil cromatográfico representado na figura 35 para as frações 28 a 32.

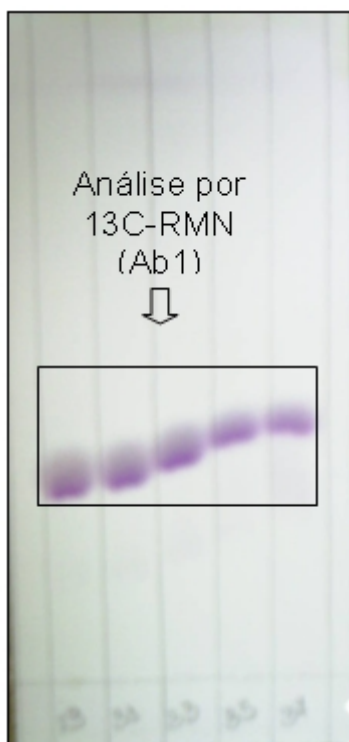


FIGURA 35 – Cromatograma das frações 28 a 32 da coluna 3 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CH_2Cl_2 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

Esta substância foi submetida a análise por ^1H RMN e ^{13}C RMN para a elucidação estrutural do composto.

5.5 Elucidação estrutural da substância Ab1

Da fração diclorometânica do extrato hidro-etanólico das folhas da planta foram isolados 42mg de um composto cristalino branco, o qual se apresentou como uma única mancha (CCD), de coloração roxa após revelação com o reagente anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C . Uma representação esquemática das etapas do isolamento de Ab1 pode ser visualizado na figura 36.

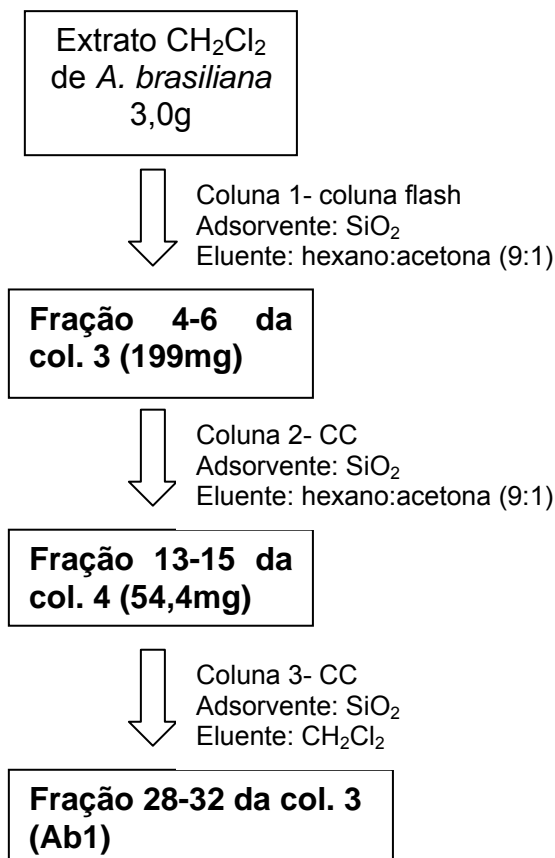


FIGURA 36 – Isolamento de Ab1 a partir do fracionamento da fração diclorometânica de *Alternanthera brasiliana* sobre gel de sílica.

O comportamento cromatográfico de Ab1 e a comparação por cromatografia em camada delgada com amostra autêntica de β -sitosterol sugeriu a presença desse esteróide em mistura. A confirmação foi realizada através de cromatografia em camada delgada bidimensional, onde foi verificada a existência do mesmo. (fig. 45).



FIGURA 37 – Cromatograma bidimensional de Ab1 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: 1ª migração: hexano: AcoEt (1:1); 2ª migração: CHCl₂: AcoEt (7:3), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100° C.

A figura 38 representa as estruturas químicas dos três compostos identificados através do espectro de ^{13}C -RMN.

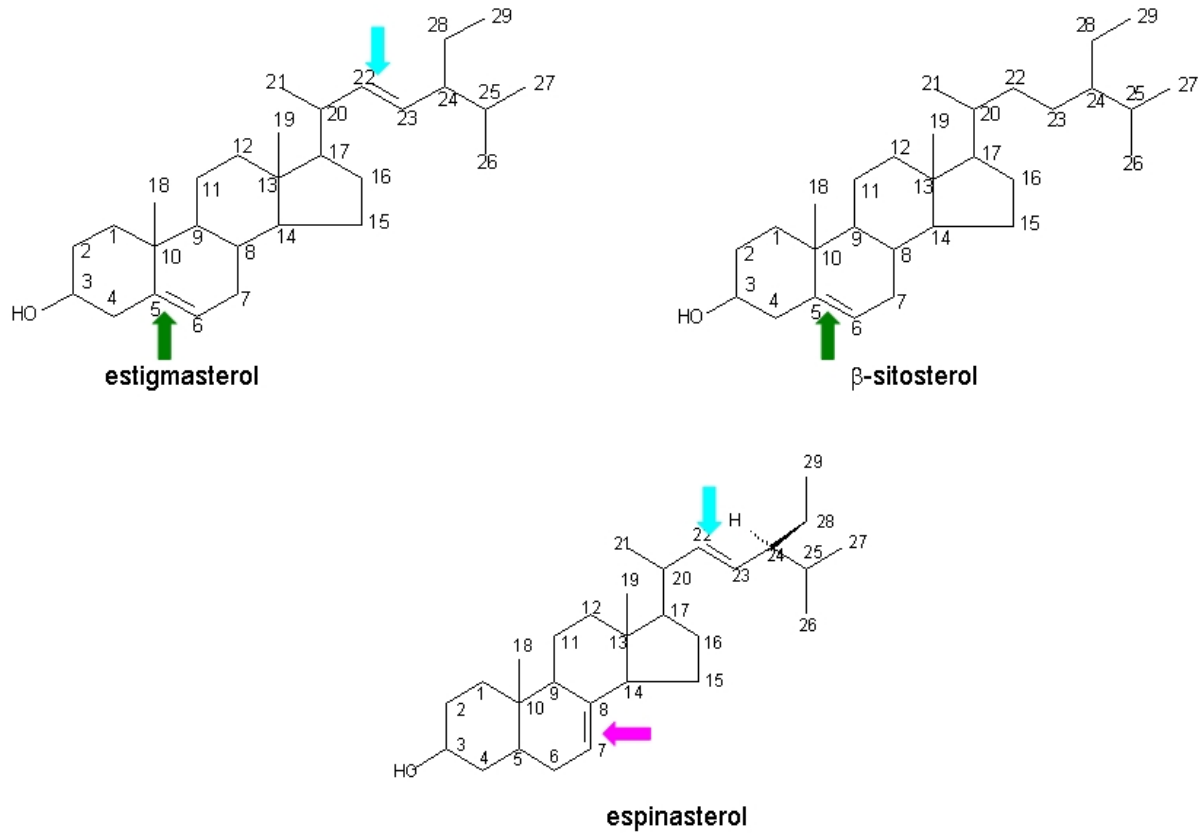


FIGURA 38 – Diferença estrutural entre os triterpenos estigmasterol, β -sitosterol e espinasterol.

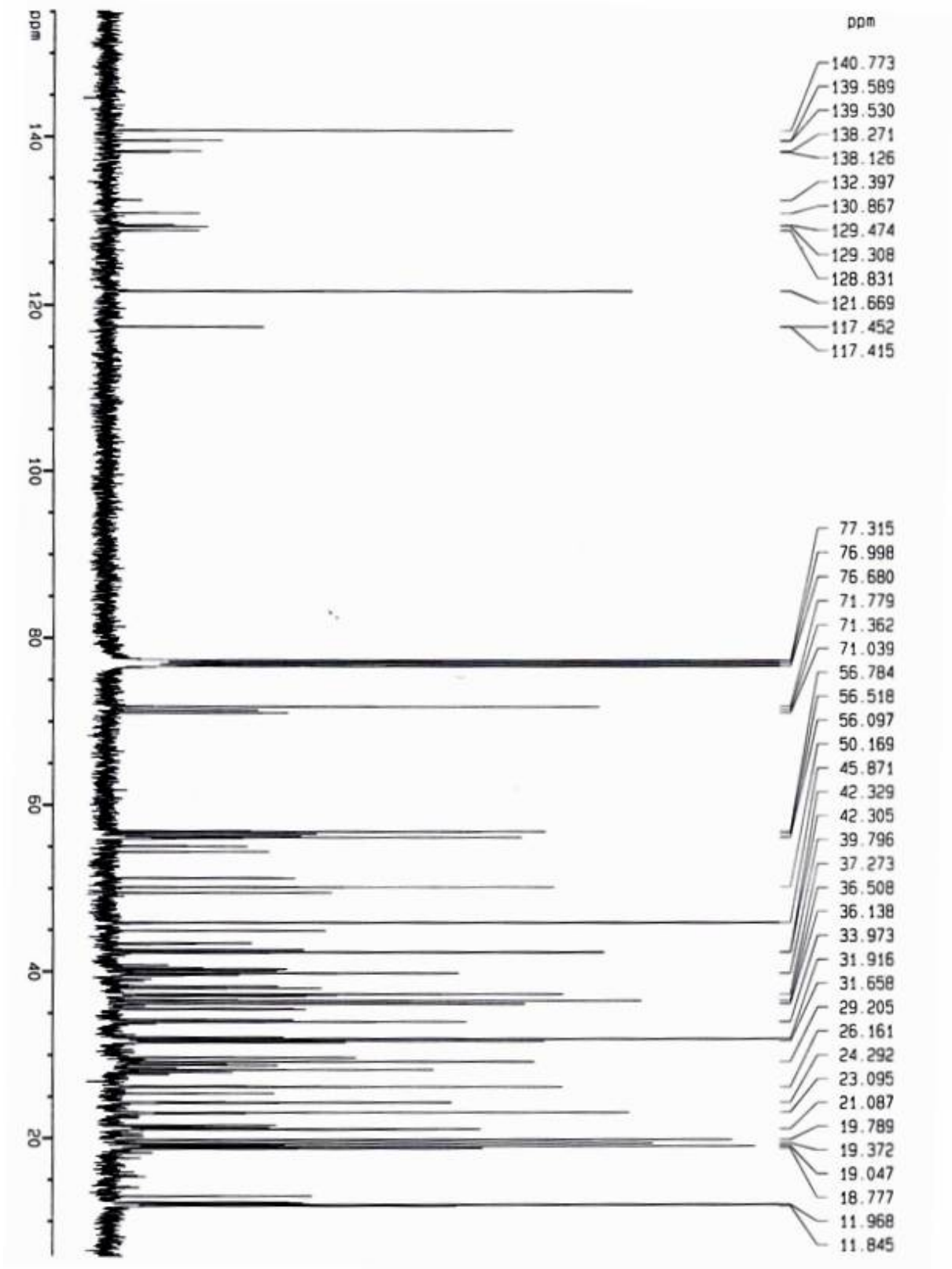


FIGURA 39 – Espectro de ^{13}C RMN de Ab1, em CDCl_3 .

Paralelamente, a substância Ab1 foi submetida à análise por Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C RMN e ^1H RMN). A análise espectroscópica indicou tratar-se

de uma mistura de três triterpenos, entre os quais o β -sitosterol, já evidenciado inicialmente por cromatografia bidimensional. O isolamento de triterpenos esteroidais em mistura é freqüentemente relatado na literatura (OLEA e ROQUE, 1990; DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003; GOULART *et al.*, 1993). Na tabela 10 estão os valores obtidos e os relatados por algumas bibliografias para os três triterpenos identificados.

TABELA 10 – Valores espectroscópicos de 13 C-RMN atribuídos a estigmasterol (Ab1.^a), β -sitosterol (Ab1.^b) e espinasterol (Ab1.^c) da mistura e dos compostos 1-3 tidos como referências (δ_c =ppm).

Estg ^a	1	Ab1. ^a	β -sit ^b	2	Ab1. ^b	Espina ^c	3	Ab1. ^c
C1	37,25	37,27	C1	37,25	37,17	C1	37,1	37,16
C2	31,64	31,65	C2	31,64	31,65	C2	31,4	31,44
C3	71,81	71,77	C3	71,81	71,77	C3	71,0	71,36
C4	42,29	42,30	C4	42,29	42,30	C4	38,0	37,99
C5	140,73	140,77	C5	140,73	140,77	C5	40,2	40,28
C6	121,72	121,66	C6	121,72	121,66	C6	29,6	29,66
C7	31,89	31,91	C7	31,89	31,91	C7	117,4	117,41
C8	31,89	31,91	C8	31,89	31,91	C8	139,5	139,58
C9	50,12	50,16	C9	50,12	50,16	C9	49,4	49,48
C10	36,40	36,50	C10	36,40	36,57	C10	34,2	34,21
C11	21,08	21,08	C11	21,08	21,08	C11	21,5	21,55
C12	39,68	39,68	C12	39,68	39,69	C12	39,4	39,48
C13	42,29	42,32	C13	42,29	42,22	C13	43,3	43,28
C14	56,87	56,78	C14	56,87	56,78	C14	55,1	55,12
C15	24,38	24,35	C15	24,30	24,29	C15	23,0	22,96
C16	28,24	28,22	C16	28,24	28,22	C16	28,5	28,75
C17	55,93	55,99	C17	56,05	56,09	C17	55,8	56,12
C18	11,87	11,96	C18	11,87	11,96	C18	12,0	12,03
C19	19,38	19,37	C19	19,38	19,37	C19	13,0	13,00
C20	40,50	40,43	C20	36,16	36,13	C20	40,8	39,79
C21	21,20	21,20	C21	19,03	19,04	C21	21,4	21,35
C22	138,40	138,27	C22	33,94	33,92	C22	138,7	138,12
C23	129,27	129,30	C23	33,12	26,27	C23	129,4	129,47
C24	51,23	51,23	C24	45,83	45,87	C24	51,2	51,23
C25	31,89	32,09	C25	26,03	28,87	C25	31,9	31,50
C26	19,0	21,26	C26	18,76	18,97	C26	21,1	21,04
C27	19,0	19,13	C27	19,81	19,78	C27	19,0	18,90
C28	25,42	25,36	C28	23,06	23,09	C28	25,4	25,36
C29	12,27	12,30	C29	11,99	11,84	C29	12,3	12,20

1 - Citado de estigmasterol (Goulart *et al.*, 1993 CDCl₃).

2 - Citado de β -sitosterol (Goulart *et al.*, 1993, CDCl₃).

3 - Citado de espinasterol (Kojima *et al.*, 1990, CDCl₃).

Um grande número de substâncias triterpênicas de ocorrência vegetal já é bem conhecido. Uma ampla diversidade quanto ao esqueleto e funcionalização predominantemente oxigenada, leva a mais de mil estruturas. Dentro dessa variedade existem alguns que ocorrem com maior frequência. Estes apresentam apenas um grupo funcional no C-3 e são pentacíclicos ou tetracíclicos que contém no máximo uma e duas ligações duplas, respectivamente. Exemplos característicos são o lupeol, α -amirina, β -amirina, friedelina e o lanostadieno (OLEA e ROQUE, 1990). Os esteróides são substâncias relacionadas aos triterpenos, apresentando um esqueleto cíclico básico igual a dos triterpenos tetracíclicos do ciclopentanoperidrofenantreno (AKIHISA *et al.*, 1986). O β -sitosterol e o estigmasterol são os esteróides majoritários geralmente presentes nas membranas celulares das plantas (KRAJEWSKY-BERTRAND, MILON e HARTMANN, 1992; SCHULER *et al.*, 1991).

Quando vários triterpenos do tipo mencionados estão presentes em um mesmo extrato vegetal, o fracionamento deste por técnicas cromatográficas convencionais dificilmente leva ao isolamento de substâncias puras. O que se obtém normalmente é uma mistura de triterpenos de difícil resolução. Estas situações podem ser enfrentadas de maneiras variadas dependendo do objetivo do estudo: se o interesse é isolar as substâncias, utilizando técnicas cromatográficas especiais (CLAE e CG de alta resolução, que envolvem custos, padrões e tempo) ou se o objetivo é meramente identificá-las, recorrendo a outros procedimentos, geralmente métodos físicos de análise para identificar triterpenos em mistura (OLEA e ROQUE, 1990; MAIA *et al.*, 2000). Muitos trabalhos tratam da dificuldade em separar estes tipos de misturas esteroidais como β -sitosterol e estigmasterol, entretanto, mostram que é possível caracterizá-los mesmo não estando purificados (CARVALHO *et al.*, 1998; BRUM *et al.*, 1998; CONEGERO *et al.*, 2003). Kojima *et al.* (1990) ao encontrarem dificuldade no isolamento, caracterizaram uma mistura de quatro esteróides através de dados de RMN.

No espectro de ^{13}C -RMN foram observados oito sinais bem desblindados na região de carbono sp^2 (121,66, 129,30, 129,40, 138,12, 138,27, 140,77, 117,41 e 139,58 ppm) sugerindo a existência de, pelo menos, quatro ligações duplas. Segundo dados da literatura, sinais nos deslocamentos 121,66 e 140,77 ppm são característicos de esteróides com uma ligação dupla entre C-5 e C-6 (AHMAD *et al.*,

1992; CHAURASIA e SWICHTL, 1987; DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003; GOULART *et al.*, 1993), sinais em 129,30 e 138,27 e 129,40 e 138,12 ppm são característicos de uma ligação dupla entre C-22 e C-23 na cadeia lateral de esteróides (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003; GOULART *et al.*, 1993), enquanto os sinais em 117,41 e 139,58 ppm são característicos de ligação dupla entre C7 e C8 em triterpenos tetracíclicos do tipo esteroidal (KOJIMA *et al.*, 1990).

Os sinais que aparecem na região entre 10 e 80ppm correspondem aos carbonos do sistema tetracíclico da estrutura do metabólito (ZANETTI, 2002). Os sinais em 71,77 e 71,36 ppm são característicos de carbonos portadores de oxigênio (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Com a revisão bibliográfica acerca de possíveis compostos possuítentes destas características, constatou-se que é comum ocorrer o isolamento da mistura de β -sitosterol (24 α -etil-colestan-5-eno-3 β -ol) e estigmasterol (24 α -etil-colestan-5,22-dieno-3 β -ol) (CARVALHO *et al.*, 1998; DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003; GOULART *et al.*, 1993; CONEGERO *et al.*, 2003; CHAVES *et al.*, 2004; BRUM *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2001; PAULA *et al.*, 1996). Estes compostos possuem uma mesma insaturação (Δ^5), portanto os sinais nos espectros de ^{13}C -RMN irão coincidir e assim os sinais para C-5 e C-6 estarão mais intensos quando comparados com os outros dois sinais referentes a insaturação em Δ^{22} (que está presente somente em estigmasterol) (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003). Os compostos β -sitosterol e estigmasterol possuem as porções cíclicas idênticas, diferindo somente na cadeia lateral. Por este motivo, apesar da existência de uma ligação dupla a mais no estigmasterol (cadeia lateral) os compostos apresentam propriedades muito semelhantes a ponto de terem comportamentos cromatográficos idênticos mesmo em sílicas impregnadas com AgNO_3 , seja em CCD ou em cromatografia em coluna. Entretanto, os sinais em 117,41 e 139,58 ppm, de pequena intensidade quando comparados com os referentes à insaturação em Δ^5 , indicam a presença de insaturação em Δ^7 , que é característica de compostos do tipo espinasterol ($\Delta^7, 22$). A presença do espinasterol na mistura Ab1 pode ser evidenciada pela existência adicional de sinais de pequena intensidade relativos à insaturação na cadeia lateral, entre C22 e C23 (138,12 e 129,47 ppm), que neste caso, não apresentaram o mesmo deslocamento químico evidenciado para o estigmasterol.

Portanto, a dificuldade de separação desta mistura muitas vezes não justifica

o gasto de tempo e material na obtenção de substâncias puras, quando o objetivo for apenas registrar a composição química da mistura (MAIA *et al.*, 2000). A análise dos espectros de ^{13}C e ^1H RMN fornece subsídios para a identificação da mistura de β -sitosterol, estigmasterol e espinasterol em *Alternanthera brasiliana* no presente estudo, sendo que as intensidades referentes aos sinais da insaturação em C5-C6 indicam o β -sitosterol como o componente majoritário, justificado pela baixa intensidade nos sinais da insaturação em C22 e C23, existentes somente no estigmasterol. Os dados relativos aos deslocamentos dos prótons olefínicos no espectro de ^1H -RMN estão de acordo com os relatados na literatura para estas substâncias (SOUZA *et al.*, 2001, DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003).

Dos Δ^5 -esteróides, os compostos β -sitosterol e estigmasterol são os mais abundantes em Amaranthaceae (PATTERSON *et al.*, 1991). Entretanto, a estrutura Δ^5 não é a mais abundante na família, pois de 19 espécies da referida família, em nove delas predominam os Δ^5 -esteróides enquanto que em dez espécies o tipo de esteróide prevalente é o Δ^7 -esteróide. No gênero *Gomphrena*, todas as 10 espécies estudadas evidenciaram a presença predominante de Δ^5 -esteróides (PATTERSON *et al.*, 1991). Em investigações fitoquímicas preliminares realizadas em *Alternanthera brasiliana* por Souza *et al.* (1998) foi detectada a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos, sendo o composto β -sitosterol o componente majoritário da fração hexânica.

Estudos prévios realizados com o composto β -sitosterol demonstraram que ele exerce um significativo efeito de analgesia (SANTOS *et al.*, 1995), entretanto respostas superiores foram obtidas com os extratos da planta, o que remete a idéia de haver um sinergismo de ação com outros compostos presentes no extrato de modo a potencializar a resposta antinociceptiva (SOUZA *et al.*, 1998). Outros ensaios farmacológicos foram realizados com estes esteróides: Galotta e Boaventura (2005) concluíram que o β -sitosterol foi inativo no teste de citotoxicidade realizado com a *Artemia salina*; já Mors, Rizzini e Pereira (2000) realizaram testes contra o veneno de cobra e destacaram para o β -sitosterol e estigmasterol uma proteção de 70% contra o veneno da cobra *Bothrops jararaca*. Segundo o mesmo autor, β -sitosterol e seu análogo estigmasterol já demonstraram atividade anti-inflamatória, redutora de colesterol plasmático e no controle de tumores prostáticos. Dentre as importâncias fisiológicas dos esteróides está a capacidade de formar

complexos necessários para o organismo, como nos ácidos biliares e seus sais. Ainda, estes esteróides têm a capacidade de converter gorduras em ácidos graxos solúveis em água ou emulsificar estes compostos facilitando sua absorção intestinal e suas hidrólises, como para vitaminas lipossolúveis (HARTMANN, 1998).

5.5.1 Perfis cromatográficos das frações das colunas 4 e 5

Coluna 4

A coluna 4, igualmente a coluna 1, foi desenvolvida com a utilização de pressão. O perfil cromatográfico de suas frações está representado na figura 40.

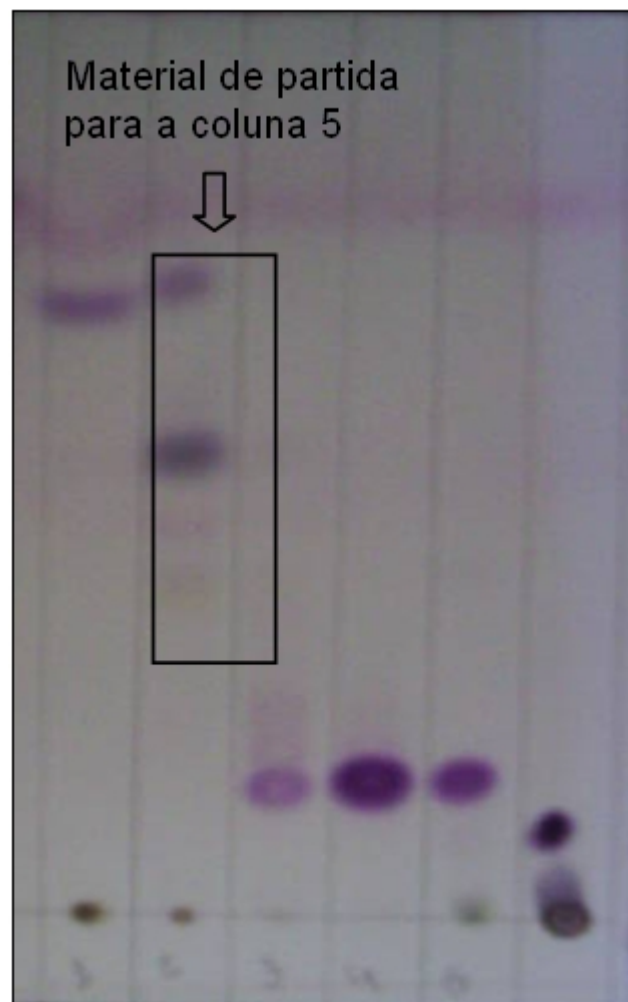


FIGURA 40 – Cromatograma das frações 1 a 6 da coluna 4 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl_3 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

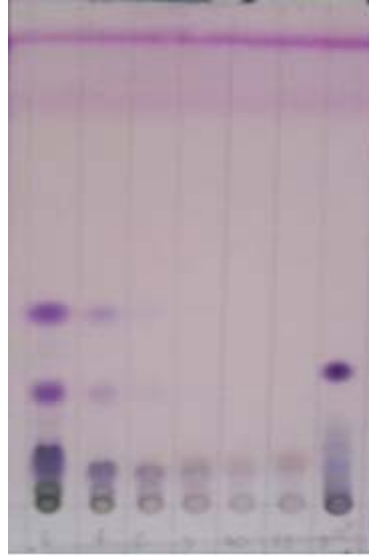


FIGURA 41 – Cromatograma das frações 6 a 11 e material de partida da coluna 4 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl_3 (migrado 3 vezes), revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

Coluna 5

A coluna 5 foi realizada com a amostra 2 oriunda da coluna 4 e seu perfil cromatográfico está apresentado na figura 42.

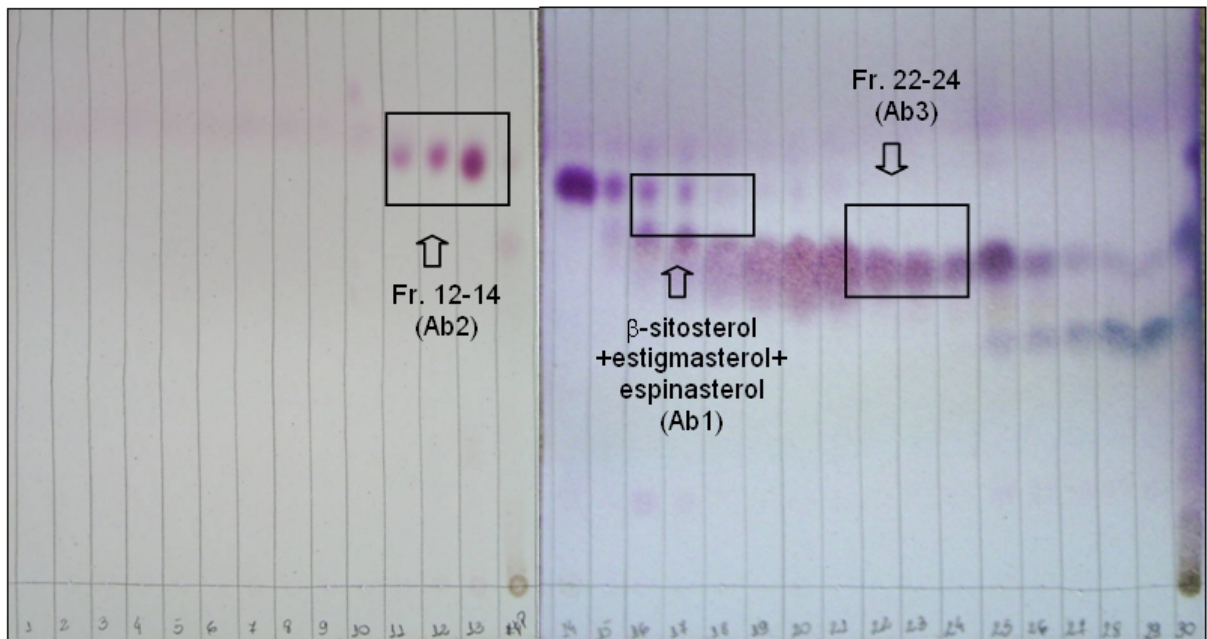


FIGURA 42 – Cromatograma das frações 1 a 30 da coluna 5 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl_3 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

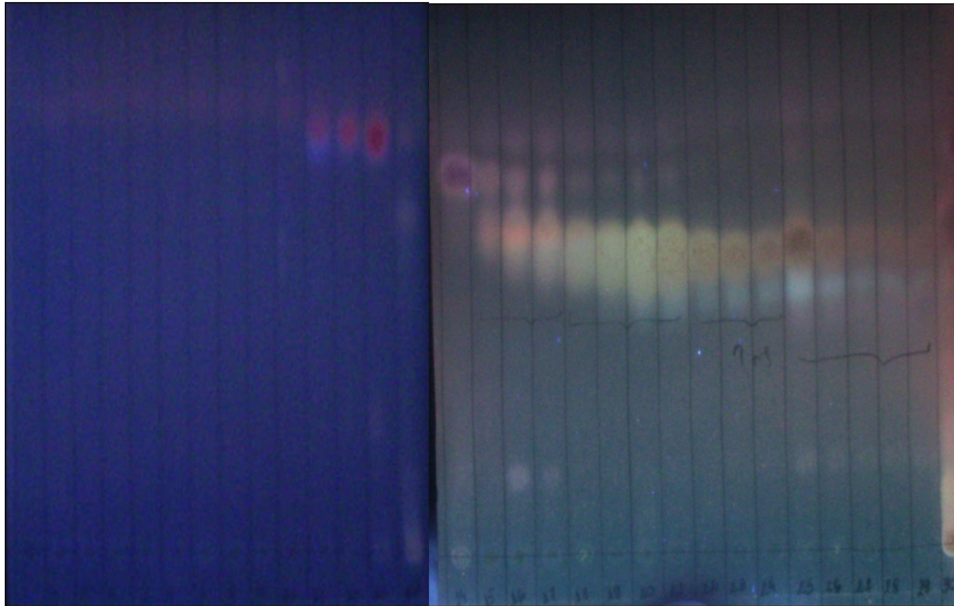


FIGURA 43 – Cromatograma das frações 1 a 30 da coluna 5 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: CHCl_3 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

As frações 22-24 (Ab3) foram juntadas devido suas semelhanças, seu rendimento foi de 1,7mg e o perfil cromatográfico isolado é mostrado nas figuras 44 e 45 juntamente com a mistura Ab1, que já teve seu processo de isolamento detalhado anteriormente.



FIGURA 44 – Cromatograma da mistura Ab1 e frações 22 a 24 (Ab3) da coluna 5 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl_3 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .



FIGURA 45 – Cromatograma da mistura Ab1e 22 a 24 (Ab3) da coluna 5 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: CHCl_3 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

As frações 12-14 também foram juntadas devido suas semelhanças, originando a substância codificada como Ab2; o mesmo ocorreu com as frações 49 a 52 originando Ab4 (fotografia não mostrada). Seus perfis cromatográficos isolados são mostrados nas figuras 46 e 47.

O rendimento foi de 8,9mg para Ab2 e menos de 1mg para Ab4.

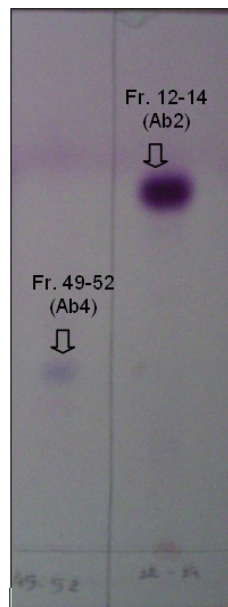


FIGURA 46 – Cromatograma das frações 49 a 52 (Ab4) e 12 a 14 (Ab2) da coluna 5 com observação sob luz visível. Sistema eluente: CHCl_3 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

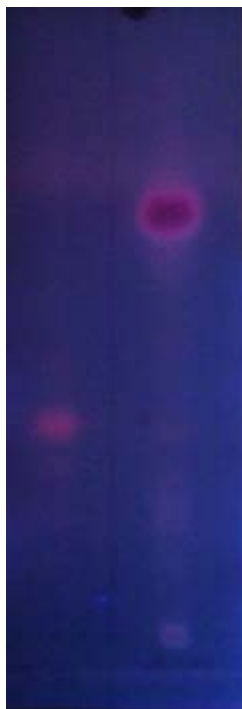


FIGURA 47 – Cromatograma das frações 49 a 52 (Ab4) e 12 a 14 (Ab2) da coluna 5 com observação sob luz ultravioleta. Sistema eluente: CHCl_3 , revelador: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C .

Não foi possível identificar por métodos espectroscópicos as substâncias Ab2, Ab3 e Ab4 mostradas nas figuras 44, 45, 46 e 47, devido as pequenas quantidades isoladas. Entretanto, encontram-se em processo de re-isolamento para a obtenção de maiores quantidades.

O organograma da figura 48 representa as etapas realizadas para a separação desses compostos.

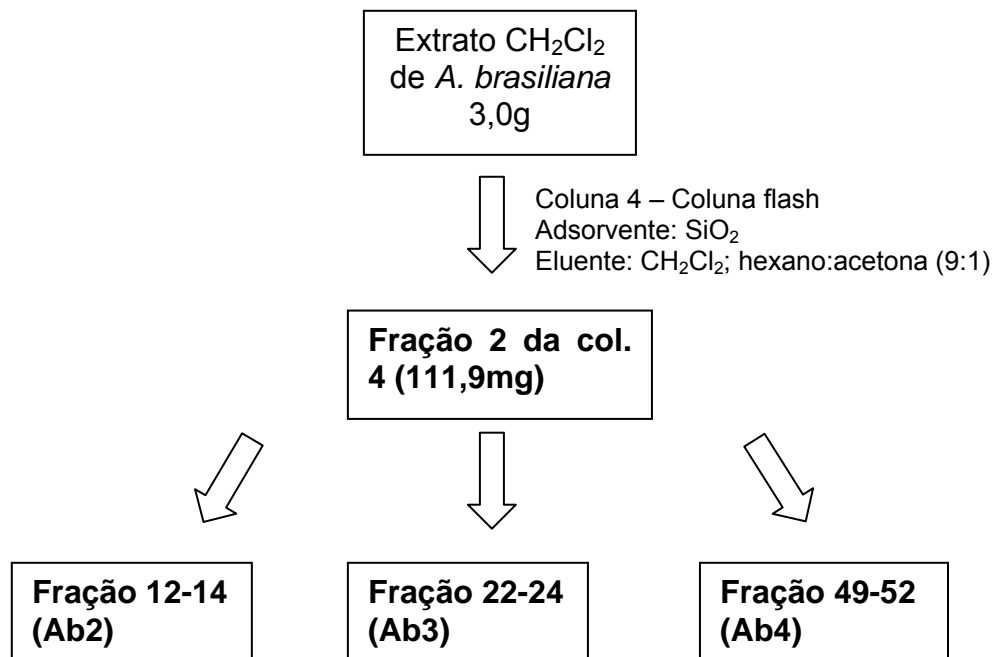


FIGURA 48 – Isolamento das substâncias Ab2, Ab3 e Ab4 a partir do fracionamento de extrato diclorometânico de *Alternanthera brasiliana* sobre gel de sílica.

5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

Atualmente é crescente o interesse por compostos antibacterianos de origem natural, uma vez que, grande parte dos microorganismos tende a desenvolver resistência aos antibióticos rotineiramente empregados na clínica e, assim, faz-se necessário essa busca constante por novos princípios ativos contra bactérias e fungos amplamente conhecidos. Este trabalho testou as frações diclorometânica, aceto de etila e n-butanol além do extrato bruto das folhas de *Alternanthera brasiliana* frente os seguintes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 2792, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 44773, *Candida glabrata* (isolado clínico) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28952 e *Prototheca zopfii* (isolado clínico).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método da microdiluição em caldo, em microplaca de 96 poços, seguindo os documentos M27-A2 para fungos leveduriformes (NCCLS, 2002) e M7-A4 para bactérias (NCCLS, 1997).

A tabela 11 mostra os resultados de atividade antimicrobiana para cada

fração e extrato bruto.

TABELA 11 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM), concentrações bactericidas mínimas (CBM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) obtidas para o extrato bruto e as frações diclorometânica, acetato de etila e butanólica frente as cepas testadas.*

	Ext. Bruto (CIM)	Ext. Bruto (CBM)	CH ₂ Cl ₂ (CIM)	CH ₂ Cl ₂ (CBM)	AcOet (CIM)	AcOet (CBM)	BuOH (CIM)	BuOH (CBM)	Controle
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 2792)	>2500	—	>2500	—	>2500	—	>2500	—	Amp 8,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>2500	—	1250	1250	>2500	—	>2500	—	Cef 16
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25293)	1250	1250	1250	>1250	1250	1250	>2500	—	Amp 2,0
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	2500	2500	1250	1250	2500	2500	2500	2500	Imi 0,06

	Ext. Bruto (CIM)	Ext. Bruto (CFM)	CH ₂ Cl ₂ (CIM)	CH ₂ Cl ₂ (CFM)	AcOet (CIM)	AcOet (CFM)	BuOH (CIM)	BuOH (CFM)	Controle
<i>Candida albicans</i> (ATCC 44773)	>1250	—	>1250	—	>1250	—	>1250	—	Flu 16
<i>Candida glabrata</i>	>1250	—	>1250	—	>1250	—	>1250	—	Flu 32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 28952)	625	625	625	>1250	625	1250	>1250	—	Flu 2,0
<i>Prototheca zopfii</i>	>1250	—	312,5	312,5	>1250	—	>1250	—	Anfo 0,5

* Valores referenciados em µg/mL.

Amp.=ampicilina, Cef.=ceftriazone, Imi.=imipenem, Flu.= fluconazol, anfo.= anfotericina B

Bons resultados antibacterianos foram evidenciados para as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis*. A fração diclorometânica apresentou as menores CIMs para ambas bactérias, sendo evidenciada a CBM frente a *B. subtilis* em 1250 µg/mL. O extrato bruto e a fração acetato de etila foram mais efetivas frente a *S.*

aureus apresentando CIM e CBM na concentração de 1250 µg/mL. Em relação a bactérias Gram-negativas, apenas a fração diclorometânica foi efetiva, apresentando CIM e CBM na concentração de 1250 µg/mL frente a *P. aeruginosa*. Os melhores resultados foram evidenciados frente ao fungo *S. cerevisiae*, onde o extrato bruto foi efetivo como fungistático e fungicida na concentração de 625 µg/mL, seguido das frações acetato de etila (CIM=625 e CFM=1250µg/mL) e diclorometânica (CIM=625, CFM=1250µg/mL). A fração butanólica apresentou discreta atividade apenas frente ao *B. subtilis* (CIM=2500 µg/mL). Nenhuma das amostras testadas foi efetiva frente as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* nas concentrações utilizadas no experimento. A fração diclorometânica foi a única que apresentou atividade algicida frente à *P. zopfii*, sendo efetiva na concentração de 312,5µg/mL.

Caetano *et al.* (2002) testaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de *A. brasiliiana* frente a cepas de *S. aureus* catalogadas (ATCC 6538 e 9144) e cepas provenientes de isolados hospitalares evidenciando resultados positivos, em uma concentração de 65000µg/mL de extrato, comparáveis com a atividade do cloridrato de tetraciclina (1000 µg/mL) utilizado como referência no ensaio. A metodologia empregada pelos autores acima foi a de difusão em ágar (discos e poços) a qual difere da metodologia utilizada no presente estudo (microdiluição em caldo). No presente estudo, o extrato bruto foi fracionado e idêntica atividade antibacteriana foi observada para a fração acetato de etila, sugerindo que os compostos ativos sejam majoritariamente extraídos por este solvente.

Salvador *et al.* (2004) realizaram ensaios antibacterianos e antifúngicos pela técnica da difusão em ágar com os extratos da *A. marítima*; dentre os resultados positivos que obtiveram, *Streptococcus* e *Trichophyton* foram os microorganismos para os quais os extratos demonstraram atividade predominante. Contudo, para *S. aureus* (ATCC 25293), *E. coli* (26.1), *P. aeruginosa* (290D) e *C. albicans* (ATCC 1023) os extratos se mostraram ineficazes. Estes resultados diferem dos obtidos com a espécie *brasiliiana* apenas para *S. aureus*, uma vez que a espécie *brasiliiana* também se mostrou pouco efetiva contra *P. aeruginosa* e ineficaz contra *E. coli* e *C. albicans*.

Em *A. caracasana*, Canales-Martinez *et al.* (2005) não obtiveram resultados positivos com a fração acetato de etila frente a *C. albicans*. Neste estudo a atividade

antimicrobiana foi confirmada para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea* e uma espécie do *Vibrio cholerae*. Essas referências reforçam as evidências de ineficácia de espécies de *Alternanthera* frente a *C. albicans*. A conformidade integral de respostas obtidas por Salvador *et al.* (2004) com nossos estudos pôde ser realizada apenas frente ao microorganismo *E. coli*, contra o qual, tanto *A. marítima* quanto *A. brasiliana* se mostraram ineficazes. Os melhores resultados obtidos com ambas as espécies se referem às bactérias Gram-positivas, uma vez que as bactérias Gram-negativas são naturalmente mais resistentes aos agentes antimicrobianos por apresentarem uma parede celular muito mais complexa (RANG, DALE e RITTER, 2001).

Salvador *et al.* (2004), no mesmo estudo antimicrobiano em *A. marítima*, realizaram um estudo fitoquímico, visando determinar a classe de compostos responsáveis por essa atividade biológica. Os esteróides, saponinas e flavonóides isolados mostraram uma atividade antimicrobiana considerável. A ação farmacológica dessas substâncias já havia sido confirmada por outros autores (YFF *et al.*, 2002; PANIZZI *et al.*, 2002; RAMESH *et al.*, 2002; RAHUA *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 2000; TERESCHUK, RIERA e ABDALA, 1997).

Quanto à eficiência de *A. caracasana* (CANALES-MARTINEZ *et al.*, 2005) e *A. brasiliana* frente a *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, verifica-se que as duas espécies de *Alternantheras* são capazes de desempenhar resultados bacteriostáticos e/ou bactericidas perante estas cepas.

Ensaio antimicrobianos empregando a técnica de discos por difusão em ágar também foram realizados por Zavala *et al.* (1998) em *Alternanthera repens*. A concentração teste utilizada foi a mesma empregada em nossos estudos (2500µg/mL), mas o autor obteve resultados negativos frente a todas as cepas testadas (*Sarcina lutea* ATCC 40322, *Proteus vulgaris* ATCC 6059, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ETECS 1552 e *Candida albicans*). Sendo assim, os resultados encontrados por Zavala *et al.* (1998) encontram concordância de respostas ao se referir a *E. coli* e *C. albicans*, os quais os extratos não evidenciaram nenhuma resposta de combate a esses microorganismos.

Os resultados apresentados permitem evidenciar para *A. brasiliana* uma boa atividade antibacteriana para a fração diclorometânica, principalmente contra bactérias Gram-positivas e a alga *P. zopfii*. As demais frações e o extrato bruto evidenciaram atividades menos pronunciadas, salientando-se a ineficácia de todas as frações testadas frente a *E. coli* e espécies de *Cândida*.

5.7 Avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de *Alternanthera brasiliana*

O método utilizado para estimar a capacidade antioxidante das folhas de *A. brasiliana* foi o de Choi *et al.* (2002), empregando-se como padrão o ácido ascórbico, uma vez que este possui atividade antioxidante comprovada. Foram testados o extrato bruto hidroetanólico das folhas e suas frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol. O comprimento de onda utilizado para o monitoramento do decréscimo da absorvância foi 518 nm.

A tabela 12 mostra a média das leituras (em absorvâncias) do DPPH, após 30 minutos de contato com o ácido ascórbico (padrão) e com as amostras testadas. A partir dessas absorvâncias foi obtido o percentual de inibição, que corresponde à atividade antioxidante dos extratos. A análise de uniformidade dos dados foi efetuada através do cálculo de desvio padrão e do coeficiente de variação percentual.

TABELA 12 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e das frações diclorometânicas, acetato de etila e n-butanol de *Alternanthera brasiliana*.

Concentrações µg/mL	Média (Abs)	Desvio padrão (±)	Coeficiente de variação percentual (CV%)	% de inibição (IP%)
Ácido ascórbico				
7,8	0,463	0,0089	1,9	43,3
15,6	0,134	0,0023	1,7	83,6
31,25	0,018	0,001	5,5	97,1
62,5	0,014	0,001	7,1	98,3
125,0	0,014	0,001	7,1	98,3
250,0	0,014	0,001	7,1	98,3
CH₂Cl₂				
7,8	0,682	0,022	3,2	27,52
15,6	0,741	0,016	2,1	21,25
31,25	0,678	0,019	2,8	27,94
62,5	0,644	0,015	2,3	31,56
125,0	0,583	0,009	1,5	38,04
250,0	0,564	0,08	14,1	40,06

(cont. Tabela 12)

Concentrações µg/mL	Média (Abs)	Desvio padrão (±)	Coefficiente de variação percentual (CV%)	% de inibição (IP%)
AcOEt				
7,8	0,696	0,011	1,5	26,03
15,6	0,681	0,006	0,008	27,63
31,25	0,681	0,019	2,8	27,63
62,5	0,629	0,008	1,27	33,15
125,0	0,530	0,001	0,18	43,67
250,0	0,336	0,015	4,46	64,29
n-BuOH				
7,8	0,699	0,02	2,8	25,71
15,6	0,697	0,009	1,3	25,92
31,25	0,673	0,013	1,9	28,48
62,5	0,687	0,03	4,3	26,99
125,0	0,668	0,04	5,9	29,01
250,0	0,628	0,013	2,0	33,26
Bruto				
7,8	0,9051	0,002	0,2	4,15
15,6	0,9015	0,003	0,3	4,61
31,25	0,8958	0,004	0,4	5,66
62,5	0,8908	0,005	0,5	6,95
125,0	0,8743	0,004	0,5	10,50
250,0	0,8324	0,004	0,4	15,49

A representação gráfica das concentrações de cada amostra em relação à sua atividade antioxidante está representada na figura 49.

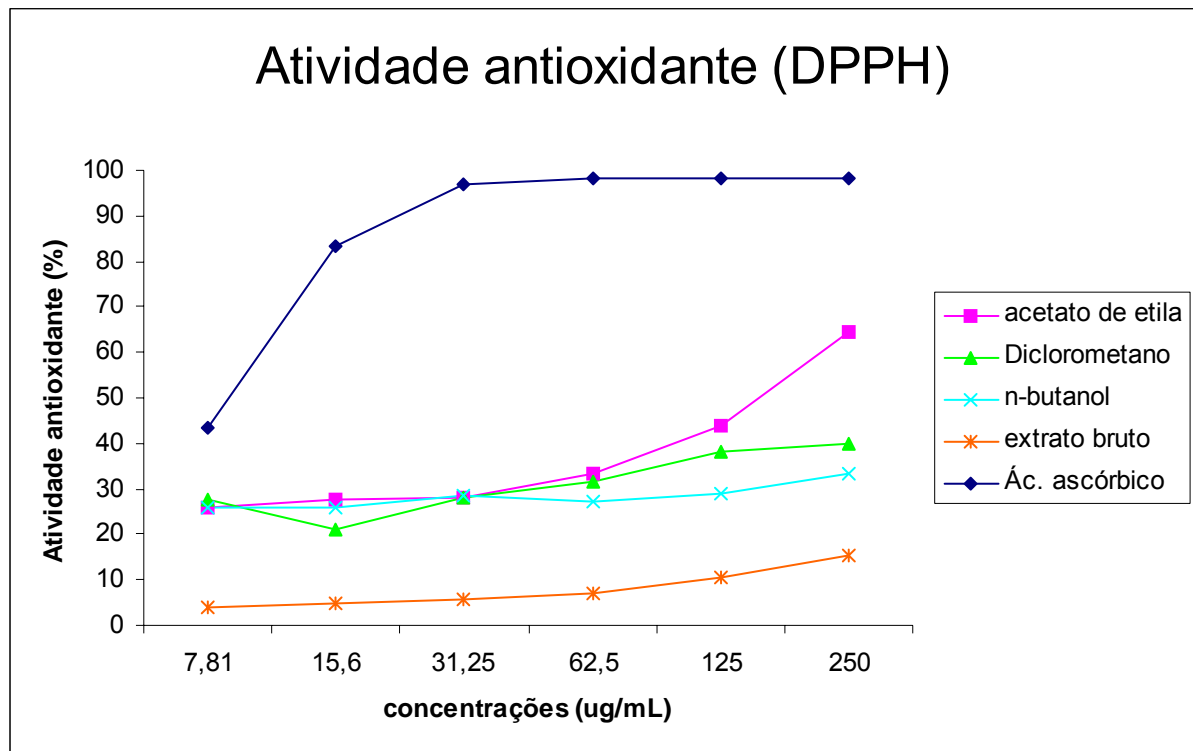


FIGURA 49 – Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão), extrato bruto e das frações CH_2Cl_2 , AcOEt e BuOH das folhas de *Alternanthera brasiliana*.

Apenas a fração acetato de etila apresentou atividade antioxidante moderada, $\text{IP}\% = 64,29\%$, na concentração de $250 \mu\text{g/ml}$, quando comparada ao ácido ascórbico ($\text{IP}\% = 98,3\%$ na concentração de $31,25 \mu\text{g/ml}$). As demais frações não apresentaram atividade antioxidante significativa e a relação dose-dependente não pode ser evidenciada.

Devido à baixa atividade antioxidante, o IC_{50} das frações diclorometânica, n-butanol e do extrato bruto não pode ser calculado. Para a construção das equações da reta da fração acetato de etila e do ácido ascórbico foram consideradas apenas as partes ascendentes das curvas, estando os valores onde se obteve um platô fora dos valores para obtenção da expressão $y = ax + b$ (TSIMOGIANNIS e OREOPOULOU, 2005).

A fração acetato de etila apresentou um efeito antioxidante razoável ($\text{IC}_{50} = 163,01 \mu\text{g/mL}$, $y = 0,1597x + 23,963$, $r = 0,998$), enquanto o ácido ascórbico apresentou $\text{IC}_{50} = 19,55 \mu\text{g/mL}$ ($y = 2,1224x + 36,239$, $r = 0,896$), representando um IC_{50} cerca de 8 vezes superior ao da fração acetato de etila.

Depois da fração acetato de etila, a fração que apresentou maior capacidade antioxidante foi a diclorometânica, seguida da fração butanólica e do extrato bruto; entretanto a capacidade antioxidante dessas frações não foi suficientemente alta de modo a possibilitar o cálculo de seu IC₅₀ pelo método dos mínimos quadrados. Sendo assim, os valores obtidos através da equação da reta seriam irrealis e impossíveis de serem encontrados quando plotados no gráfico.

Nenhumas das amostras testadas obteve valores comparáveis aos obtidos com o ácido ascórbico, uma vez que este já apresentou em sua segunda menor concentração uma porcentagem de inibição superior a 70% e nas amostras testadas a porcentagem de inibição mais alta para a maior concentração da fração acetato de etila alcançou 64,29 %. A menor atividade foi evidenciada no extrato bruto, atingindo um máximo de 15,49% de inibição na concentração de 250 µg/mL.

Os valores de IC₅₀ e IP% são considerados bons quantificadores da eficiência antioxidante para compostos puros e extrato; servindo de parâmetros para indicar qual extrato é mais apropriado como material de partida para o isolamento de compostos com atividade antioxidante em estudos futuros. Entretanto, parece não haver um critério estabelecido para classificar a atividade em alta, boa, moderada, fraca ou insatisfatória em comparação com compostos de atividade antioxidante reconhecida. Existem inúmeros métodos rápidos, diretos e simples que permitem determinar a capacidade antioxidante, porém é possível que cada um deles reproduza diferentes e contraditórias respostas para a mesma amostra, o que torna a comparação entre eles impossível de ser realizada (ALONSO *et al.*, 2002). Por este motivo, a comparação de atividades só é possível quando a amostra é submetida ao mesmo método de determinação.

Shyamala *et al.* (2005), após determinar a atividade antioxidante da *Alternanthera sessilis* pelo método do DPPH, classificou-a como tendo uma ação moderada (menos que 60% de atividade em uma concentração de 50µg/mL e em torno de 70% para 100µg/mL); neste mesmo trabalho a *Alternanthera sessilis* obteve o valor mais baixo quanto a sua capacidade de redução quando comparada com *Brassica oleracea*, *Coriandrum sativum* e *Spinacia oleracea*. Os resultados obtidos no presente estudo foram cerca de duas vezes inferiores aos obtidos com a espécie *A. sessilis*, indicando para a espécie *brasiliiana* uma fraca atividade antioxidante, manifestada apenas na fração acetato de etila.

A atividade antioxidante na fração acetato já era esperada, uma vez que os compostos fenólicos tendem a se concentrar em maior quantidade nessa fração, justificando as atividades insatisfatórias das outras frações. A literatura apresenta diversos trabalhos que relacionam alta atividade antioxidante à presença de compostos do tipo fenólico na fração acetato de etila (TUNG *et al.*, 2006, TSENG *et al.*, 1997, MENSOR *et al.*, 2001). Por exemplo, Tseng *et al.* (1997) analisaram as frações de diferentes polaridades das flores de *Hibiscus sabdariffa* e constataram que a fração acetato de etila apresentava a maior porcentagem no índice de inibição. Este resultado também foi declarado por Mensor *et al.* (2001) quando obteve os melhores resultados com as frações acetato de etila para os testes feitos com diversas plantas empregando o mesmo método.

Entretanto, em análises cromatográficas de todas as frações verificou-se a baixa concentração de compostos fenólicos em *Alternanthera brasiliana*. Adicionalmente, foi realizada uma cromatografia em camada delgada das frações juntamente com o ácido clorogênico e ácido caféico, fenóis estes que tem uma atividade antioxidante já conhecida (FILIP *et al.*, 2001, SCHINELLA *et al.*, 2000, ALONSO *et al.*, 2002) e não foi observada a presença de nenhum destes compostos na planta.

Os compostos fenólicos relatados para *A. brasiliana* até o momento, pertencem à classe dos flavonóides, sendo relatado o isolamento de seis flavonóides na espécie (BROCHADO *et al.*, 2003), dois compostos com a aglicona quercetina e quatro derivados do canferol, todos altamente glicosilados. Diversos estudos descrevem as relações existentes entre as diversas estruturas e grau de glicosilação dos flavonóides, relacionando-os com a atividade antioxidante, verificada por diversos métodos (NANJO *et al.*, 1996, TSIMOGIANNIS e OREOPOULOU, 2005). Zielinska, Gülден e Cordell (2003) verificaram que a quercetina é conhecida por ser um potente antioxidante e esta atividade é favorecida pela presença de grupos hidroxilas nas posições 3, 5, 7, 3', 4', que são importantes para essa atividade. Em estudo realizado por Tsimogiannis e Oreopoulou (2005), diversas agliconas foram classificadas quanto à atividade antioxidante, levando em consideração os resultados de IC₅₀ obtidos pelo método do DPPH. Os resultados indicaram a seguinte ordem decrescente de atividade antioxidante: quercetina > fisetina > rutina > luteolina > taxifolina > eriodictiol > canferol (fig. 49). Adicionalmente, vários estudos demonstraram que, à medida que aumenta o grau

de glicosilação dos compostos, diminui a capacidade antioxidante (NANJO *et al.*, 1996, TSIMOGIANNIS e OREOPOULOU, 2005; CHOI *et al.*, 2002). Paralelamente, a presença das duas hidroxilas em posição *orto* no anel B, a presença da ligação dupla ($\Delta^{2,3}$) no anel C e o grupo cetona em C4 desse anel, são importantes na efetividade da atividade antioxidante (NANJO *et al.*, 1996; TSIMOGIANNIS e OREOPOULOU, 2005).

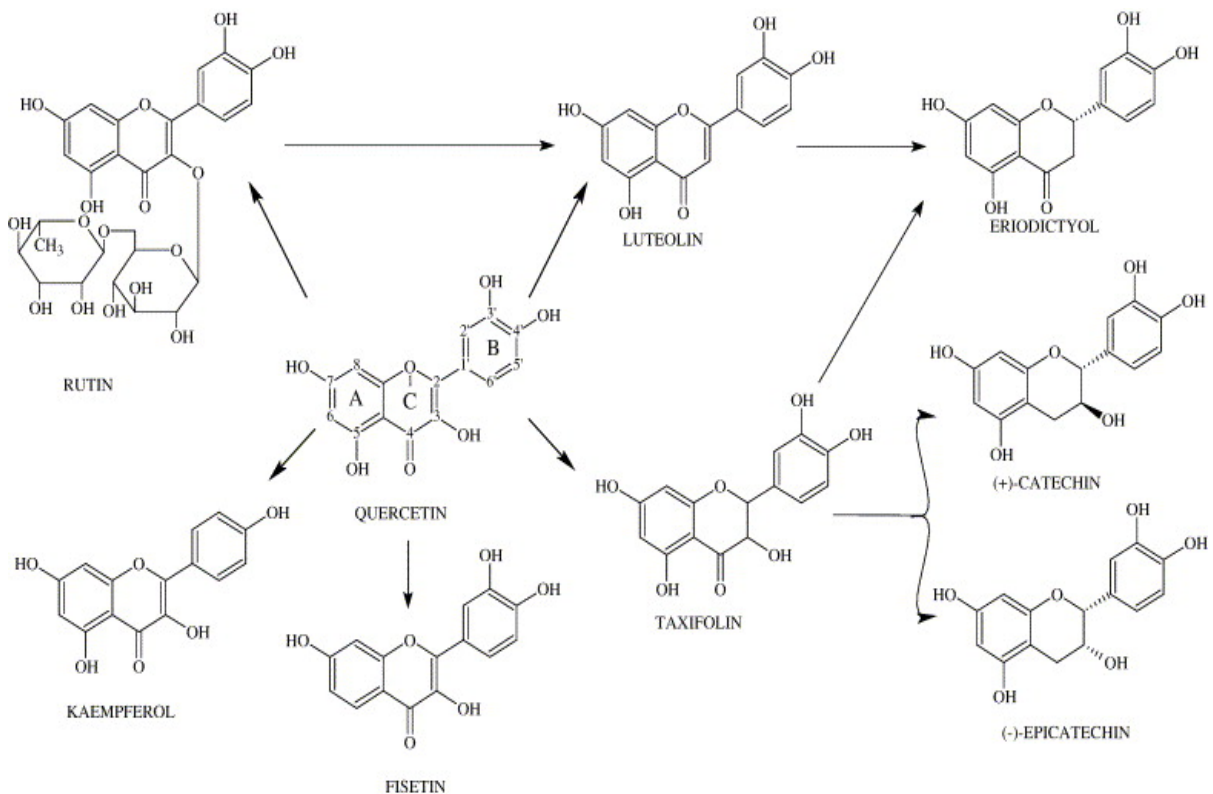


FIGURA 50 – Classificação quanto à capacidade antioxidante de alguns compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário vegetal.

Sob esta ótica, analisando as estruturas já identificadas na espécie, percebe-se que quatro dos flavonóides isolados possuem o esqueleto do canferol, o qual não apresenta a hidroxila da posição 3 do anel B, adicionalmente, todos possuem açúcares na posição 3 do anel C, além de dois flavonóides 3,7-glicosilados. Os dois flavonóides restantes possuem a quercetina como aglicona; entretanto, são também glicosilados na posição 3 do anel C. Essas particularidades estruturais podem justificar a baixa atividade antioxidante demonstrada pela espécie, uma vez que o sistema *orto*-hidroxila não está disponível em canferol, e o impedimento estérico proporcionado por açúcares nas estruturas dificulta a ligação do captador ao radical livre.

5.8 Determinação da quantidade de polifenóis nas frações das folhas de *Alternanthera brasiliana*

No presente estudo a metodologia aplicada foi a descrita por Chandra & Mejia (2004) a qual faz uso de Folin-Ciocalteu como reagente.

As diluições das amostras e do ácido pirogálico foram feitas com água destilada, sendo assim, fez-se uso desta como branco, usado para calibrar o espectrofotômetro.

A média das leituras (em absorbância) da curva padrão e das amostras, após contato durante 5 minutos com o reagente de Folin-Ciocalteu e mais 10 minutos com o carbonato de sódio 20%, está mostrada na tabela 13.

A análise da uniformidade dos dados foi efetuada através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação percentual.

TABELA 13 – Média das leituras, desvio padrão e coeficiente de variação percentual (CV%) obtidos para o ácido pirogálico, extrato bruto e frações diclorometânica, acetato de etila e n-butanol das folhas de *Alternanthera brasiliana*.

Concentração (mg/mL)	Média (Abs)	Desvio Padrão (\pm)	Coeficiente de variação (CV%)
ácido pirogálico			
0,005	0,0826	0,0022	2,66
0,010	0,2211	0,0177	8,0
0,015	0,4622	0,0125	2,7
0,025	0,7408	0,0697	9,4
0,030	0,9498	0,0014	0,14
Extrato bruto			
0,15	0,0749	0,0019	2,53
Fração CH₂Cl₂			
0,15	0,1573	0,0076	4,83
Fração AcOEt			
0,15	0,0559	0,0024	4,29
Fração n-BuOH			
0,15	0,1984	0,0042	2,11

A representação gráfica da curva de calibração do ácido pirogálico é apresentada na figura 51.

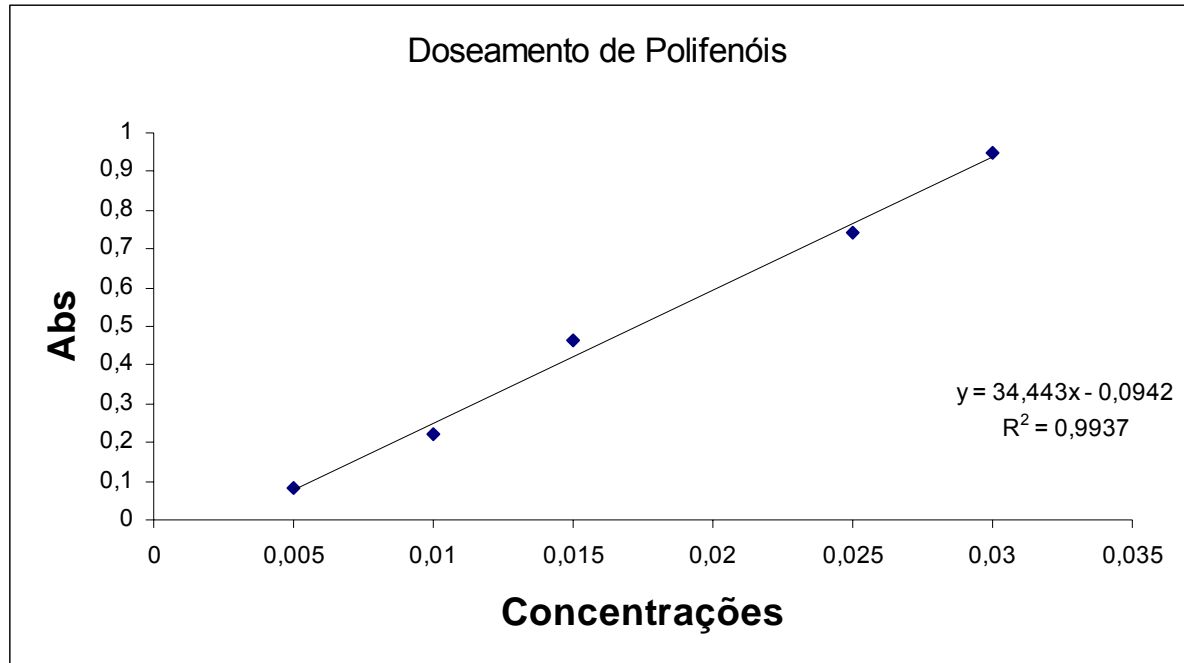


FIGURA 51 – Curva de calibração do ácido pirogálico com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

Os resultados do doseamento de polifenóis nas frações e no extrato bruto (mg/mL e mg/g de droga seca), obtido através da substituição dos valores de suas absorbâncias na equação da reta do ácido pirogálico, é mostrado na tabela 14.

TABELA 14 – Total de conteúdo fenólico presente nas folhas de *Alternanthera brasiliana*.

Frações	mg/mL ^a	mg/g FS ^b	Porcentagem de polifenóis
Diclorometano	0,0073 ± 0,0002	48,6	4,86%
Acetato de etila	0,0043 ± 0,00007	28,6	2,86%
n-butanol	0,0085 ± 0,0001	56,6	5,66%
Extrato bruto	0,0049 ± 0,0001	32,6	3,26%

Cada amostra foi analisada em triplicata. A media foi calculada e os resultados foram declarados em média±desvio padrão. Abreviações: FS, fração seca; ^aconcentração de compostos fenólicos expressos em miligramas equivalentes de pirogallol por mililitros de extrato aquoso; ^bconcentração de compostos fenólicos expressos em miligramas equivalentes de pirogallol por grama de fração seca (FS).

A fração butanólica mostrou um maior teor de fenóis (0,0085mg/mL, 5,66%) enquanto que a fração acetato de etila apresentou a menor quantidade de conteúdo fenólico (0,0043mg/mL, 2,86%). O único artigo que descreve o doseamento de polifenóis na espécie *A. sessilis* é o de Shyamala e colaboradores (2005). Nesse artigo, o autor descreve o doseamento por Folin-Ciocalteu de um extrato etanólico na concentração de 0,2 mg/mL, relatando 25 mg de polifenóis por grama de extrato.. A comparação dos resultados do extrato bruto de *A. brasiliana* com os de Shyamala indicam um predomínio de polifenóis em *A. brasiliana*. Nesse mesmo artigo, os autores relatam correlação positiva entre conteúdo fenólico e atividade antioxidante, também determinada pelo método do DPPH.

A maioria dos trabalhos que envolvem a determinação da atividade antioxidante e conteúdo total de polifenólicos relata a existência de correlação positiva entre capacidade antioxidante e conteúdo de fenólicos (ALONSO *et al.*, 2002, SHYAMALA *et al.*, 2005, CHANDRA e Mejia, 2004; TURKMEN, SARI e VELIOGLU, 2006).

Entretanto, no presente estudo, os resultados obtidos não evidenciaram essa correlação, uma vez que para os maiores conteúdos de polifenóis, não foi verificada a maior atividade antioxidante; ao contrário, os resultados apresentaram-se em ordem inversa. Este fato pode ser atribuído à diferença na composição das frações, onde distintos compostos fenólicos podem apresentar desigualdade de respostas quanto à capacidade antioxidante. Adicionalmente, o método de Folin-Ciocalteu reflete a soma dos compostos fenólicos e não permite a diferenciação entre eles, do ponto de vista químico cada classe de fenólicos evidencia uma resposta específica para a atividade antioxidante. Por esta razão, pode ser que o total de polifenóis não corresponda à atividade antioxidante das substâncias fenólicas presentes no extrato.

Adicionalmente, o conteúdo fenólico total baseados em certos padrões, como ácido gálico, epicatequina, epigallocatequina, pirogallol, catequina e quercetina, dentre outros, podem subestimar ou superestimar o valor total de conteúdo fenólico descrito para uma determinada espécie, levando a diferentes interpretações de resultados (CHANDRA e MEJIA, 2004; ALONSO *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 74, p. 113-123, 2001.

AHMAD, V. U. *et al.* A sterol glycoside from marine green alga *codium iyengarii*. **Phytochemistry**. v. 31, n. 4, p. 1429-1431, 1992.

AKELERE, O. **Importance of Medicinal Plants: WHO'S Programme in Natural resources and Human Health**. Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1992.

_____. Programa OMS de Medicina tradicional; Progresos y Perspectivas. **Crónica de la OMS**. v. 38, n. 2, p. 83-88, 1984.

AKIHISA, T. *et al.* Sterols of cucurbitaceae: the configurations at C-24 of 24-alkyl...sterols. **Lipids**. v. 21, n. 1, p. 39-47, 1986.

ALONSO, A. M. *et al.* Determination of Antioxidant Power of Red and White Wines by a New Electrochemical Method and Its Correlation with Polyphenolic Content. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 3112-3115, 2002.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 3, 5 ed. New York: John Wiley, 1996.

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

BAUER, A. W. *et al.* **Amer. J. Clin. Pathol.** v. 45, p. 493, 1966.

BONA, C. **Estudo morfo-anatômico comparativo dos órgãos vegetativos de *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. e *A. aquatica* (Parode) Chodat (Amaranthaceae)**. Curitiba: Setor de Ciências Biológicas da UFP. 1993, 196 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6 de 31.01.1995. **Regulamenta o registro de fitoterápicos**. Diário Oficial da União, 06.02.1995.

BRITO A. R.M.S *et al.* Legislação de fitoterápicos. In: DI STASI, L. C. *et al.* **Plantas medicinais: arte e ciência.** São Paulo: UNESP, p. 187-197, 1996.

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.

BRUM, R. L. *et al.* Acyl lupeols from *Cnidioscolus vitifolius*. **Phytochemistry.** v. 49, n. 4, p. 1127-1128, 1998.

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.

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

CANALES-MARTINEZ, M. *et al.* Antimicrobial activity of *Alternanthera carcasana*. **Pharmaceutical Biology.** v. 43, n. 4, p. 305-307, jun-jul. 2005.

CARVALHO, G. J. *et al.* Diterpenos, triterpenos e esteróides das folhas de *Wedelia paludosa*. **Química Nova.** v. 24, n. 1, p. 24-26, 2001.

CARVALHO, M. G. *et al.* Triterpenos isolados de *Escheweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova.** v. 21, n. 6, p. 740-743, 1998.

CASTELLUCCIO, C. *et al.* Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. **FEBS Lett.** v. 368, p. 188-192, 1995.

CECHINEL FILHO, V. *et al.* **J. Ethnopharmacol.** v. 53, p. 171, 1996.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova.** v. 23, n. 5, p. 680-685, 1999.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias Para A Obtenção De Compostos Farmacologicamente Ativos A Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização da Atividade. **Química Nova.** v. 21, n. 1, São Paulo, jan.-fev. 1998.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) Teas. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, n. 11, 2004.

CHANG, R. S. *et al.* Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*. **Chin. Med. J.** v. 101, p. 861-866, 1988.

CHAURASIA, N.; SWICHTL, M. Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. **J. Nat. Prod.** v. 50, p. 881-885, 1987.

CHAVES, M. H. et al. Caracterização química do óleo de amêndoas de *Sterculia striata* ST. HIL. ET NAUD. **Química Nova**. v. 27, n. 3, p. 404-408, 2004.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**. v. 163, p. 1161-1168, 2002.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**. Washington, v. 257, n. 11, p. 1050-1055, 1992.

CONEGERO, L. S. et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed., v. III. Lisboa: fundação Calouste Gulbenkian. 1032 p. 1982.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. v. 2. São Paulo: Roca, 336 p. 1987.

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**. v. 62, p. 389-398, 2003.

DELAPORTE, R. H. et al. Control de qualidade y actividad antiinflamatoria de las drogas vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 20, n. 1, p. 39-46, 2001.

_____. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(2): 133-136, abr/jun, 2005.

_____. Estudos farmacognósticos das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Farm. Bonaerense**. v. 21, n. 3. La Plata, p. 169-174, 2002.

DI STASI I. C. et al. In: DI STASI, L. C. et al. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, **Química de produtos naturais: principais constituintes ativos**. cap. 9, p. 109-128, 1996.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Characters of the leaf and stem morpho-anatomy of *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze, Amaranthaceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, n. 1, jan.-mar. 2004.

EDWIN, G.; REITZ, P. R. Amaranthaceae. In: REITZ, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Fasc. Amara. Itajaí, Herbário Barrbosa Rodrigues/CNPQ, 1967.

ESAÚ, K. **Anatomia das Plantas com Sementes**. São Paulo: Edgar Blücher, 1990. 293 p.

_____. **Anatomy of seed plants**. 2. ed. New York: John Wiley, 1977, 550 p.

FARIAS, M. R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In: SIMÕES C. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Cap. 12. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 197-220, 1999.

FARNSWORTH, N. R. *et al.* Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

FELIPE, G. M.; ALENCASTRO, F. M. M. R. de. Contribuição ao estudo da nervação foliar das compositae dos cerrados: I – Tribus Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae e Senecionae. **Anais da Acad. Brasileira de Ciências**. v. 38, p. 125-157, 1966.

FERESIN, G. E. *et al.* Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**. Limerick, v. 78, n. 1, p. 103-107, 2001.

FERGUSON, L. R.; HARRIS, P. J. **Eur. J. Cancer Prev.** v. 8, p. 17, 1999.

FERREIRA, E. A. *et al.* Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV – *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**. v. 21, n. 2, p. 263-271, Viçosa-MG, 2003.

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

FERREIRA, S. H. 2002. Disponível em: <<http://www.abc.org.br/~sferreira>>. Acesso em: 10 ago. 2006.

FILIP, R. *et al.* Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**. v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2001.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do Açaí (*Euterpe precatória* MART., Arecaceae). **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 610-613, 2005.

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

GATTUSO, M. A.; GATTUSO, S. J. **Manual de procedimentos para análise de drogas em polvo**. Rosário: Editora da Universidade Nacional de Rosário – Argentina, 1999, 48 p.

GERLACH, D. **Bothanische mikrotechnik**. 2. ed. Stuttgart: Georg-Thieme Verlag, 1977, 311 p.

GERRITS, P. O.; SMIDT, L. A New, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial section. **J. Micro**. n. 132, p. 81-85, 1983.

GOULART, M. O. F. et al. Fitoconstituíntes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofilonas A e B. **Química Nova**. v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

GOUPY, P. et al. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. **J. Sci. Food Agric.** v. 79, p. 1625-1634, 1999.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. **Pharmacopées Traditionnelles em Guyane**: Créoles, Palikur, Wayãpi. Editorial 1-ORSTROM, Coll. Men n. 108. Paris, France, 1987.

GRÜNWARD, J. **The European Phytotherapeutics market**: figures, trends, analysis. Drug made in Germany. v. 39, n. 1, p. 6-11, 1996.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; **Phytochemistry**. v. 30, p. 3864, 1991.

HARRY T. H. J.; BRUCE L. W. The Association of Druse Crystals with the Developing Stomium of *Capsicum annum* (Solanaceae) Anthers **American Journal of Botany**. v. 67, n. 9, p. 1347-1360, oct. 1980.

HARTMANN, M. A. Plant sterol and the membrane environment. **Trends in Plant Science**. v. 3, n. 5, p. 170-175, 1998.

HICKEY, L. J. Classification de la arquitetura de las hojas de dicotiledóneas. **Bol. Soc. Arg. Bot.** v. 16, n. 1-2, p. 1-26, 1974.

HOUR, T. C. et al. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. **Food Chem. Toxicol.** v. 37, p. 569-579, 1999.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 5. ed. New York: Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 1940, 523 p.

JÚNIOR, A. A. S.; VIZZOTTO, V.; **Agrop. Catarinense**. 1996.

KHAN, M. R. et al. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**. v. 72, n. 7. Milão, p. 825-828, 2001.

KINSELLA, J. E. et al. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant food. **J. Food Technol.** p. 85-89, april, 1993.

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

KOJIMA, H. et al. Sterols glucosides from *Prunelle vulgaris*. **Phytochemistry**. v. 29, p. 2351-2355, 1990.

KRAJEWSKY-BERTRAND, M. A.; MILON, A.; HARTMANN, M. A. Deuterium-nmr investigation of plant sterol effects on soybean phosphatidylcholine acyl chain ordering. **Chem. Phys. Lipidis**. v. 63, p. 235-241, 1992.

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

LEITE J. P. V. *et al.* Variação sazonal e intraespecífica de polifenóis e flavonóides totais em folhas de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais. **Anais...** Curitiba, Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2001, p. AO-2.

LIMA, E. O. *et al.* **Acta Farm. Bom**. v. 14, p. 213, 1995.

LIN, S. C.; YUN-HO, L.; SHYH-JONG, Shyuu. Hepatoprotective Effects of Taiwan Folk Medicine: *Alterenantha sessilis* on Liver Damage Induced by Various Hepatotoxins. **Phytotherapy Research**. v. 8, p. 391-398, 1994.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil** – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas, Instituto Plantarum. 3. ed. Nova Odessa, SP, 2000, 640 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil** - nativas e exóticas. Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA. São Paulo, 2002.

LORENZI, H.; MOREIRA, H. **Plantas ornamentais no Brasil**. 3. ed. Instituto Plantarum Nova Odessa, 1120 p. 2001.

MACEDO A. F. *et al.* Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Pharmazie**. v. 54, p. 776-777, 1999.

MAIA, R. M. *et al.* Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae): caracterização em misturas binárias. **Química Nova**. v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000.

MARQUES, L. C. **Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil**. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* 2003.

MAZZINI, L. M.; FARIA, T. J. de. Estudo de controle de plantas daninha, insetos e fungos em culturas olerícolas utilizando extratos vegetais. In.: **XI Encontro Anual de Iniciação Científica**. Maringá, PR, out. 2002.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DDPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 127-30, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons. **Oxford**: Clarendon. 2. ed., v. 1, 276 p. 1988.

_____. **Anatomy of the dicotyledons**. London: Oxford University press, Amen Hause, v. I, 724 p., 1950.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MITSCHER, L. A. *et al.* **LLOYDIA**. v. 35, p. 157, 1972.

MONTELLANO, O. B. **Science**. 1975.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan, 2000.

NANJO, F. *et al.* Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 21, n. 6, p. 895-902, 1996.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, n. 2. São Paulo, p. 247-256, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast**. Approved standard – 2. ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. Pennsylvania: NCCLS, 2002.

_____. 1997. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 3rd ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, Pa.

NAWAR, W. W. **Em Lipids**. New York: Marcel Dekker, 1985, p. 139.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos. **Química Nova**. v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1989, 216 p.

PANIZZI, L. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **J. Ethnopharmacol.** v. 79, p. 165-168, 2002.

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

PAULA, V. F. *et al.* Constituintes químicos de *Ochroma lagopus* Swartz. **Química Nova**. v. 19, n. 3, p. 225-229, 1996.

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.

RAHUA, J. P. *et al.* Antimicrobial Effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.** v. 56, p. 3-12, 2000.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos, **Química Nova**. v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMESH, N. et al. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**. Limerick, v. 79, n. 1, p. 129-132, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Guanabara Koogan, 2001.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**. v. 339, p. 1523-1526, 1992.

RODRIGUES, V. E. G.; DE CARVALHO, D. A. **Ciênc. Agrotec.** v. 25, n. 1. Lavras, p. 102-123, jan.-fev. 2001.

RUETZE, M.; SCHIMITT, U. Glycol-methacrylate (GMA) als Einbettungssystem für histologische Untersuchungen von Koniferen-Nadeln. **Eur. J. For. Path.** v. 16, n. 5-6, p. 321-324, 1986.

RUIZ, R. E. L. et al. Estudio fitoquímico de la "yerba del pollo" (*Alternanthera pungens* H. B. K., Amaranthaceae). **Acta Farm. Bonaerense**. v. 10, p. 25-26, 1991.

SALVADOR, M. J. et al. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparion portulacoides* (Amaranthaceae). **Phytomedicine**. v. 9, p. 566-571, 2002.

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

SANT'ANA, A. E. G. O papel da fitoquímica na obtenção de fármacos: monitoramento por bioensaios e produção de metabólitos secundários por técnicas biotecnológicas *in*: **Anais do Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Florianópolis: UFSC, p. 24, 1996.

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

SATO, Y. et al. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.** v. 72, p. 483-488, 2000.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 269, p. 357-360. 2000.

SCHULER, I. et al. Differential effects of plant sterol on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 88, p. 6926-6930, 1991.

SENS, S. L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos xokleng da terra indígena Ibirama**. Florianópolis: Programa Pós-Graduação em Engenharia de Produção da UFSC, 2002, 387 p.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** p. 32- 67, 1992.

SHYAMALA, B. N. *et al.* Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage stability oh heated Olis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** v. 6, p. 239-245, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SI-MAN, Z. *et al.* Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera phyloxeroides*. **Clin. Med. J.** v. 101, p. 861-866, 1988.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyroline satureoides* (Lam.) D.C. Compositae (Marcela).** Porto Alegre, 1984, 186 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SINGLETON, V. L.; RODOLF, O. ROSA, M. L. **Analysys of total pholifenol and other oxidation substract and anti-oxidant by means of focin-sioal reagent. Methods enzimology.** Dissertação, p. 152-178, 1974.

SIQUEIRA, J. C. Importância alimentícia e medicinal das Amaranthaceaes do Brasil. **Acta Biológica Leopoldensia.** v. 9, p. 5-22, 1987.

_____. Phylogeography of Brazilian Amaranthaceae. **Pesquisa Botânica.** p. 5-21, 1994/1995.

SIRMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Em Inactivation of oxygen radials by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; Ho, C. T.; Osawa, t.; Huang, T. M.; Rosen, R. T.; eds. **Food Phytochemicals for Cancer Prevention:** Washinton, p. 20, 1994.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefist sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.** v. 51, p. 1-15, 1996.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. **J. Clin. Lab. Anal.** v. 11, p. 287-313, 1997.

SONAGLIO, D. *et al.* Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, cap. 13, p. 221-258, 1999.

SOUZA, A. D. L. *et al.* Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova.** v. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

SOUZA, M. M. *et al.* Analgesic Properties of Hydroalcoholic Extract Obtaines from *Alternanthera brasiliiana*. **Phytotherapy Research.** v. 12, p. 279-281, 1998.

TERESCHUK, M. L.; RIERA, M. V. Q.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. **J. Ethnopharmacol.** v. 56, p. 227-232, 1997.

TSENG, T. H. *et al.* Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocyte. **Food and Chemical Toxicology.** v. 35, n. 12, p. 1159-1164, 1997.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3'4'-hydroxy substituted members. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** Article in press, 2005.

TUNG, Y. T. *et al.* Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Bioresource Technology.** 2006.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and folin-ciocalteau methods. **Food Chemistry.** v. 99, p. 835-841, 2006.

VEIGA, J. *et al.* Medicinal plants: safe cure? **Química Nova.** v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.** v. 51, p. 239-254, 1996.

WHISTON, C. **X-Ray Methods.** London: Prichard, F. E. Ed., John Wiley & Sons, 1987.

YFF, B. T. S. *et al.* The pharmacological screening of *Pentanísia prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. **J. Ethnopharmacol.** v. 79 p. 101-107, 2002.

ZANETTI, G. D. ***Tropaeolum majus* L. morfo-histologia, fitoquímica, atividade antimicrobiana e toxicidade.** Santa Maria, 2002, 90 p. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica da UFSM. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, 2002.

ZAVALA, M. A. *et al.* Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 61, p. 41-46, 1998.

ZHOU, B.; BLASKÓ, G.; CORDELL, G. A. Alternanthin, a glycosylated flavonoid from *Alternanthera phyloxeroides*. **Phytochemistry.** v. 27, p. 3633-3636, 1988.

ZIELINSKA, M.; GÜLDEN, M.; SEIBERT, H.; Effects of quercetin and quercetin-3-O-glicosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** v. 13, p. 47-53, 2003.