



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, FARMACOGNÓSTICA E
MICROBIOLÓGICA DE DERIVADOS DE *Alternanthera
brasiliiana* L. (KUNTZE)**

Jailton Nascimento da Anunciação

BELÉM - PA
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ABORDAGEM FITOQUÍMICA, FARMACOGNÓSTICA E
MICROBIOLÓGICA DE DERIVADOS DE *Alternanthera
brasiliensis* L. (KUNTZE)**

Autor: Jailton Nascimento da Anunciação
Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Ciências Farmacêuticas área de concentração:
Fármacos e medicamentos, do Instituto de Ciências da
Saúde como requisito para a obtenção do título de mestre
em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Anunciação, Jailton Nascimento da.

Abordagem fitoquímica, farmacognóstica e microbiológica de derivados de *Alternanthera brasiliana* L. (Kuntze) / Jailton Nascimento da Anunciação; orientador, Wagner Luiz Ramos Barbosa, co-orientador, Francisco Martins Teixeira — Belém, 2012.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Belém, 2012.

1. *Alternanthera brasiliana* L. (Kuntze). 2. Plantas Medicinais - Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDD: 22. ed.: 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jailton Nascimento da Anunciação

Abordagem fitoquímica, farmacognóstica e microbiológica de derivados de *Alternanthera brasiliana* L. (Kuntze)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas área de concentração: Fármacos e medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa – UFPA
Orientador

Prof. Dr. Valdir Florencio da Veiga Júnior – UFAM
Examinador

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos – UFPA
Examinador

DEDICATÓRIA



A minha avó (em memória) e Maria Luduvina de Nazareth pelo exemplo de vida que a mim foi demonstrado e no qual admiro e respeito.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e por permitir mais esta realização em minha vida.

Aos meus pais (em memória), irmãos, filhos e cunhados (as) pelo amor, carinho e incentivo que sempre me dedicaram.

A minha esposa (em memória) pelo amor, carinho e apoio que me concedeu enquanto estive ao meu lado.

.A minha noiva pelo amor, carinho e apoio que me concede.

A meus amigos de infância pela lealdade, respeito e confiança a mim depositada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa pela orientação concedida e confiança depositada.

Aos amigos do Laboratório de Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), cuja contribuição foi imprescindível para a realização deste trabalho. Agradecimento em especial ao Prof. Dr. Norberto Lopes, João Paulo Sousa e José Carlos Tomaz.

À minhas amigas Myrth Soares e Nádia Couto pelo companheirismo e contribuição no laboratório.

Aos bolsistas José Fonseca e Natália Estrella do LAFQ pelo companheirismo e contribuição no laboratório.

Aos técnicos do Laboratório de Análises Clínicas da UFPA.

Aos meus amigos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e do LACEN-PA pelo companheirismo, apoio e amizade.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros e profundos agradecimentos.

RESUMO

ANUNCIAÇÃO, J. N. Abordagem fitoquímica, farmacognóstica e microbiológica de derivados de *Alternanthera brasiliana* L. (Kuntze). 2012. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

Alternanthera brasiliana Kuntze (Amaranthaceae) é uma planta herbácea utilizada na fitoterapia popular Amazônica como digestiva, depurativa, diurética e anti-inflamatória. A droga vegetal obtida da espécie foi extraída com etanol e diclorometano fornecendo EEB e EDM. O EEB (extrato etanólico bruto) foi analisado qualitativamente para 19 classes de metabólitos secundários, e posteriormente fracionado com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol), obtendo-se as frações correspondentes. O EEB e suas frações foram analisados por CCD, tendo avaliado seu potencial antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. O EDM foi separado em coluna, e as frações obtidas analisadas por EM, CG-EM, RMN¹³C e RMN ¹H. Saponinas, esteróides e triterpenóides, carotenóides, alcalóides, açúcares redutores e derivados da cumarina foram detectados pela prospecção fitoquímica. Os cromatogramas do EEB e suas frações, por CCD, mostraram zonas violetas quando aspergidos com anísaldeído, uma característica de terpenóides. A avaliação da atividade antimicrobiana demonstrou que as amostras são inativas nas concentrações usadas. A análise das frações obtidas a partir do EDM revelou a presença de duas substâncias, cujos dados espectrais indicam ser acetato de α -amirina e 1-Etil-4-(4-morfolinalamina)-1,2,3,6-tetraidropiridina. A análise microscópica e microquímica das folhas de *A. brasiliana* permitiu caracterizar estruturas como idioblastos do tipo drusa e classes de metabólitos como os alcaloides, que são comuns no gênero *Alternanthera*.

Palavras-chave: *Alternanthera brasiliana*; atividade antimicrobiana; acetato de α -amirina; 1-Etil-4-(4-morfolinalamina)-1,2,3,6-tetraidropiridina.

ABSTRACT

ANUNCIAÇÃO, J. N. Phytochemical, pharmacognostic and microbiologic approach of derivatives *Alternanthera brasiliana* L. (Kuntze). 2012. Thesis (MA) - Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2012.

Alternanthera brasiliana Kuntze (Amaranthaceae) is an herbaceous plant used in the Amazonian popular phytotherapy, in the Pará state, as digestive, depurative, diuretic and anti-inflammatory. The herbal drug from its was extracted with ethanol and dichloromethane furnishing EEB and EDm. EEB (crude ethanolic extract) was qualitatively analyzed for 19 secondary metabolic classes and subsequently fractionated using solvents of increasing polarity (hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol), yielding fractions the corresponding. EEB and its fractions were analyzed by TLC, and have evaluated their antimicrobial potential against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. EDm was column and the fractions obtained analyzed by MS, CG-MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR. Saponins, steroids and triterpenoids, carotenoids, alkaloids, reducing sugars and coumarin derivatives were detected by the phytochemical approach. The chromatograms of EEB and its fractions, by TLC, showed violet zones when sprayed with anisaldehyde, a characteristic of terpenoids. The evaluation of the antimicrobial activity demonstrated that the samples are inactive at the used concentrations. The analysis of the fractions obtained from the EDm revealed the presence of two substances, whose spectral data indicate to be α -amyrin acetate and 1-Ethyl-4-(4-morfolinalamina)-1,2,3,6-tetraidropiridina. Microscopic analysis and microchemistry of leaves of *A. brasiliana* allowed to characterize structures like idioblasts type druse and metabolites class like alkaloids that are common in the genus *Alternanthera*.

Keywords: *Alternanthera brasiliana*; antimicrobial activity; α -amyrin acetate; 1-ethyl-4-(4-morpholinelamine)-1,2,3,6-tetrahydropyridine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral das betalaínas: (A) porção de ácido betalâmico, presentes em todas moléculas de betalaína; (B) radical que representa uma betacianina ou betaxantina, dependendo dos radicais R1 E R2 (DELGADO- VARGAS et al. 2000). Nas betacianinas, R= glicose ou ácido glucurônico. As betaxantinas possuem um anel di-hidropirínico	24
Figura 2 – Detalhe da parte aérea de <i>Alternanthera brasiliana</i> cultivada no horto da Fundação de Medicina Tropical de Tocantins – FMT/TO.....	26
Figura 3 – Fluxograma referente a atividades desenvolvidas para a obtenção de amostras e análises preliminares de <i>Alternanthera brasiliana</i>	30
Figura 4 – Corte transversal do limbo (mesófilo). EAd (Epiderme Adaxial); PL (Parênquima Paliçádico); Tric (Tricoma); EAb (Epiderme Abaxial); PL (Parênquima Lacunoso).....	41
Figura 5 – Corte transversal da nervura central	41
Figura 6 – Corte transversal da nervura central. Xil (xilema); FI (floema); Esc (esclerênquima); Col (colênquima); D (drusa).....	42
Figuras 7, 8 e 9 – Lâminas de análise microquímica	43
Figura 10 – Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) e das frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), fração acetato de etila (FAE) e metanólica (FM) em hexano/acetato de etila (70: 30), observado sob luz visível (A), ultravioleta nos comprimentos de onda 254nm (B) e 365nm (C), e após aspensão com anisaldeído sulfúrico (D)	55
Figura 11 – Cromatograma de íons totais mostrando pico majoritário de 212.17727.	57

Figura 12 – Espectro de massas (modo de detecção positivo) da amostra polar obtida pela separação do EDm por short column.....	58
Figura 13 – Espectro da amostra polar de <i>A. brasiliiana</i> por infravermelho	59
Figura 14 – Espectro da amostra polar por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C , 125 MHz	59
Figura 15 – Estrutura da 1-Etil-4-(4-morfolinalamina)-1,2,3,6-tetraidropiridina, substância correspondente à amostra polar obtida de <i>Alternanthera brasiliiana</i>	60
Figura 16 – Espectro da amostra polar por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , 125 MH	61
Figura 17 – Espectro obtido pela análise da Fr.DM8 por CG-EM.....	62
Figura 18 – Espectro do acetato de α -amirina armazenado na biblioteca do equipamento.....	62
Figura 19 – Estrutura do Acetato de α -amirina	63
Figura 20 – Resultado da avaliação da atividade antimicrobina do extrato (1) e suas frações hexânica (2), clorofórmica (3) e metanólica (4). A: <i>Staphylococcus aureus</i> , B: <i>Escherichia coli</i> , C: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e D: <i>Candida albicans</i>	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição granulométrica do pó de folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>	44
Gráfico 2 – Curva de (TG) do pó de <i>Alternanthera brasiliana</i> em atmosfera de ar..	46
Gráfico 3 – Curva de (TG) do pó de <i>Alternanthera brasiliana</i> em atmosfera de nitrogênio.....	47
Gráfico 4 – Curva de DTA do pó de <i>Alternanthera brasiliana</i> em atmosfera de ar...	48
Gráfico 5 – Curva do perfil térmico diferencial do pó de <i>Alternanthera brasiliana</i> em atmosfera de nitrogênio.....	49
Gráfico 6 – Curvas de TG produzidas pela análise do pó de <i>Alternanthera brasiliana</i> em atmosfera de oxigênio e nitrogênio	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resultado da análise microquímica das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> L. (Kuntze)	43
Quadro 2 – Resultado da prospecção fitoquímica do extrato etanólico de <i>Alternanthera brasiliiana</i>	53
Quadro 3 – Amostras obtidas pela separação do EDm por cromatografia em coluna e frações resultantes da reunião conforme perfil cromatográfico por CCD	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Amostra polar
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CIT	Cromatograma de íons totais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
Col	Colênquima
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
D	Drusa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Análise térmica diferencial
EAb	Epiderme Abaxial
EAd	Epiderme Adaxial
EDm	Extrato diclorometano
EEB	Extrato etanólico bruto
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Esc	Esclerênquima
FAE	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmica
FH	Fração hexânica
FI	Floema
FM	Fração metanólica
Fr. DM	Fração diclorometano
IV	Infravermelho
LACEN-PA	Laboratório Central do Estado do Pará
EM	Espectrometria de Massas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PL	Parênquima Lacunoso
PP	Parênquima Paliçádico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução

Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
TG	Termogravimetria
Tric	Tricoma
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
Xil	Xilema

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

Å	Angstrom
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
δ	Delta
g	Grama
°GL	grau Lussac
H	Hora
Hz	Hertz
J	Joule
Kg	Quilograma
kJ	Quilojoule
m	Metro
mg	Miligrama
MHz	Mega-Hertz
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mV	Milivolts
m/z	Massa/carga
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
%	Porcentagem
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil termogravimétrico (TG) do pó das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> em atmosfera de ar	46
Tabela 2 – Perfil termogravimétrico (TG) do pó das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> em atmosfera de nitrogênio	48
Tabela 3 – Perfil térmico diferencial do pó das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> em atmosfera de ar	49
Tabela 4 – Perfil térmico diferencial do pó das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> em atmosfera de nitrogênio.....	50
Tabela 5 – Perfil térmico diferencial (DTA) do pó das folhas de <i>Alternanthera brasiliiana</i> unindo os dois evento (atmosfera de ar e nitrogênio)	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Estudo do gênero <i>Alternanthera</i>.....	24
3.2 Utilização popular de <i>A. brasiliana</i> (terramicina)	25
3.3 <i>Alternanthera brasiliana</i>	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Material	28
4.1.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	28
4.1.2 REAGENTES SOLVENTES E SOLUÇÕES.....	28
4.1.3 EQUIPAMENTOS	28
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA E MICROQUÍMICA DAS FOLHAS DE <i>A. brasiliana</i>	31
4.2.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....	31
4.2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DAS FOLHAS DE <i>Alternanthera brasiliana</i> (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010)	32
4.2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DO DECOCTO DE <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010)...	33
4.2.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE <i>A. brasiliana</i> ...	34
4.2.6 PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) (BARBOSA, 2001).....	34
4.2.7 FRACIONAMENTO DO EEB	34
4.2.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	35
4.2.9 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DICLOROMETANO (EDm)	35

4.2.10 FRACIONAMENTO DO EDM POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA CURTA (SHORT COLUMNM).....	35
4.2.11 ESPECTRÔMETRIA DE MASSAS (MS).....	36
4.2.12 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO (IV) DE <i>Alternanthera brasiliana</i>	36
4.2.13 ANÁLISE DA AMOSTRA POLAR POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN ¹ H) E CARBONO (RMN ¹³ C).....	36
4.2.14 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS).....	37
4.2.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze (CLSI, 2003).....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Descrição anatômica e microquímica das folhas de <i>A. brasiliana</i> (L.) Kuntze.....	41
5.2 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de <i>A. brasiliana</i> (Farmacopéia Brasileira 5ª Ed., 2010).....	44
5.2.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DO PÓ	44
5.2.2 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO PÓ	44
5.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS	45
5.2.4 ANÁLISE TÉRMICA DO PÓ DE <i>Alternanthera brasiliana</i>	45
5.3 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico	52
5.4 Caracterização físico-química do decocto (Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed., 2010)	52
5.4.1 DETERMINAÇÃO DO pH DO DECOCTO DE <i>A. brasiliana</i>	52
5.4.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE DO DECOCTO	52
5.5 Prospecção fitoquímica do extrato etanólico bruto	53
5.6 Avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD)	55
5.7 Fracionamento do EDM por cromatografia em coluna.....	56
5.8 Análise da AP por EM	57
5.9 Análise da AP por infravermelho (IV)	58
5.10 Análise da AP por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C (RMN¹³C)	59
5.11 Análise da AP por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H).....	61

5.12 Análise da Fr. DM8 por Cromatografia de fase Gasosa Acoplada a Massa (CG-EM).....	62
5.13 Atividade antimicrobiana.....	64
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

Observa-se que o tratamento das enfermidades humanas a partir de plantas medicinais ou seus derivados é uma prática antiga e que, no momento, encontra-se em expansão por todo o mundo. Atualmente as descobertas de várias substâncias de origem vegetal, indicadas pelo uso popular, tiveram suas atividades farmacológicas científicas comprovadas (MIGUEL e MIGUEL, 1999).

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples utilizadas pelo homem das cavernas, buscando na natureza recursos para melhorar sua condição de vida, aumentando assim suas chances de sobrevivência, até as formas mais sofisticadas empregadas pelo homem moderno. Em ambos os casos o que é percebido é a existência de “algo”, com propriedade de provocar reações benéficas no organismo, resultando na recuperação da saúde (LORENZI e MATOS, 2008).

Durante séculos têm-se buscado nas plantas medicinais alternativas para o tratamento de diversas doenças, inclusive as dermatológicas (RASKIN et al. 2002) principalmente naquelas que apresentam processos cicatriciais de difícil resolução. Na antiguidade, de forma empírica, já eram conhecidas algumas propriedades medicinais atribuídas às flores da *Calêndula officinalis* L., popularmente conhecida como calêndula (ALONSO, 1998).

Com os avanços científicos, esta prática milenar cedeu espaço aos medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e seus efeitos colaterais contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia (OLIVEIRA et al. 2001).

A aplicação do conhecimento tradicional, ou popular, acerca do uso curativo de vegetais no desenvolvimento de fitoterápicos mostra-se como uma estratégia bastante consequente e consistente; pois, pode gerar ocupação e renda a partir da inserção da comunidade organizada no processo de desenvolvimento, produção e entrada do produto assim desenvolvido no mercado farmacêutico; e ainda pode ser adequada do ponto de vista ecológico, quando a matéria prima vegetal para a produção desse fitoterápico for obtida a partir de espécimes cultivados em áreas degradadas.

Há uma estimativa que no ano de 2000 houve uma movimentação de cerca de 30 bilhões de dólares no comércio de produtos a base de plantas medicinais (ENGELKE, 2003). A prática da fitoterapia é bem aceita e acessível a todos os

povos do mundo e, em especial no Brasil onde esse recurso é adequado às necessidades da atenção primária a saúde (ELDIN e DUNFORD, 2001).

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, com pelo menos metade das espécies vegetais podendo apresentar alguma propriedade terapêutica, sendo útil à população (MARTINS et al. 1994). Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 14/2010 da ANVISA, fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente a partir de espécies vegetais de uso medicinal ou partes delas (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentação tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase 3.

Observa-se que o tratamento das enfermidades humanas usando plantas medicinais ou seus derivados é uma prática antiga e que, no momento, encontra-se em expansão por todo o mundo (MIGUEL e MIGUEL, 1999).

Os efeitos colaterais observados na utilização dos fitoterápicos são poucos, desde que utilizados de forma racional. A maioria dos efeitos colaterais conhecidos, registrados para plantas medicinais, é extrínseca à preparação e está relacionada a vários problemas de processamento, tais como: identificação incorreta das plantas, contaminação, adulteração de plantas, preparação e/ou dosagem incorretas (CALIXTO, 2000).

O uso de plantas medicinais ou fitoterápicos se deve a diversos fatores, tais como: a decepção com os resultados obtidos em tratamentos com a terapêutica convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos, o fato de que amplas camadas da população mundial não têm acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

O desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade e de novas formas de preparação e de administração de produtos fitoterápicos, um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados e um menor custo comparado com os fármacos sintéticos, impulsionou o consumo destes produtos (VIEIRA, 2001; CAÑIGUERAL et al. 2003).

Desde a declaração de Alma-Ata, em 1978, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em conta que 80% da população mundial utilizam essas plantas ou suas preparações, para tentar suprir as lacunas da atenção primária em saúde. A OMS vem estimulando o uso da medicina tradicional /complementar/ alternativa nos sistemas de saúde de forma integrada às técnicas modernas da medicina ocidental, preconizando o desenvolvimento de políticas, observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso a este tipo de medicamento (MICHILES, 2004).

O Estado brasileiro, através da Portaria no. 971, publicada em 3 de maio de 2006, após várias reivindicações de pesquisadores da área de plantas medicinais e fitoterapia, instituiu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde e, por meio do Decreto Federal no. 5813 de 22 de junho de 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). Em fevereiro de 2009 o prefeito Gilberto Kassab, decretou e promulgou a Lei no. 14903 (Projeto de Lei) sobre a criação do Programa de Produção de Fitoterápicos e Plantas Medicinais no Município de São Paulo.

A ANVISA, por meio de Instrução Normativa 5/2008 publicou uma lista de espécies vegetais, base de fitoterápicos com registro simplificado, e buscou estabelecer a padronização de marcadores químicos para diversas plantas e limite diário para seu uso. Entende-se esta preocupação como etapa fundamental para assegurar o uso e garantir eficácia ao fitoterápico (BRASIL, 2008). Procedimentos de controle de qualidade de plantas medicinais devem ser realizados e envolvem, numa primeira etapa, análises macroscópicas e microscópicas que busquem a identificação e análise do grau de pureza das mesmas (CHOI et al. 2002). Acredita-se que análises quantitativas dos produtos vegetais podem alcançar a qualidade farmacêutica dos fitoterápicos (BARA et al. 2006).

Muitas bases científicas confirmam a eficácia de produtos fitoterápicos. Porém, o aumento da busca por plantas medicinais em relação à demanda levou a queda de qualidade do produto final a ser oferecido ao consumidor. Uma análise minuciosa dos materiais visando à obtenção de produtos de qualidade é indispensável, pois uma matéria-prima de qualidade duvidosa pode oferecer riscos à saúde do consumidor. Muitos produtores desconhecem os cuidados que devem ser considerados nas diversas etapas de produção da matéria-prima vegetal, sobretudo

por não contarem com a orientação de profissionais capacitados para auxiliá-los. (OLIVEIRA, 1991; ZARONI et al. 2004).

Em muitas regiões são os raizeiros os responsáveis pela comercialização dessas plantas, podendo-se observar substituições destes produtos, contribuindo para a adulteração da matéria-prima vegetal além da presença de contaminantes como insetos, terra e micro-organismos (DELAPORTE et al. 2002).

A identificação e a pureza da droga vegetal, assim como a avaliação de seus princípios ativos, são tarefas indispensáveis àqueles que buscam obter produtos de boa qualidade (OLIVEIRA et al. 2005).

O controle de qualidade de um produto fitoterápico se desenvolve em várias etapas que incluem a análise da matéria-prima, de todas as fases da produção e do produto final. O controle de qualidade de um produto não garante a sua eficácia, mas é fator determinante para a mesma (FARIAS 2004).

A má qualidade de um produto fitoterápico ou droga vegetal pode comprometer a eficácia podendo oferecer riscos à saúde do consumidor. Profissionais da área da saúde e da comunidade científica devem se preocupar com todos os aspectos que possam contribuir para a qualidade destes produtos (MELO et al. 2007).

Garantir a qualidade do material vegetal é fundamental, devendo-se considerar os seus aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. Assim, além do teor de substância ativa e intensidade das atividades farmacológicas e toxicológicas, outros aspectos de qualidade a serem avaliados são a carga bacteriana, determinação do teor de água e da perda por dessecação, determinação de cinzas, pesquisa de material estranho, orgânico e inorgânico, como terra, areia, partes de vegetais, insetos e pequenos vertebrados ou produtos oriundo destes (BRASIL, 2000; BRASIL, 2007).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece normas para o registro de fitoterápicos, enfatizando a necessidade de estudos químicos, físico-químicos, toxicológicos, clínicos, certificado de boas práticas de fabricação e controle das indústrias, no sentido de garantir maior eficácia e segurança a esses medicamentos. Além disso, estabelece a necessidade de pesquisa de marcadores, representados por substâncias ou classes de substâncias identificadas na espécie, que possam ser

utilizados como parâmetros para o controle de qualidade da droga e dos respectivos medicamentos fitoterápicos. (BRASIL, 2010).

Dentre as espécies encontradas na região Amazônica encontra-se *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae), conhecida popularmente como “penicilina”, “terramicina” e “perpétua do mato”, utilizada na fitoterapia popular pela alegação de propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (REITZ, 1972).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir para a padronização de derivados farmacopéicos preparados a partir da espécie *Alternanthera brasiliana* para utilização de fitoterápicos.

2.2 Específicos

- Avaliação microscópica das folhas de *A. brasiliana*;
- Caracterização físico-química do material vegetal e insumos de *A. brasiliana*;
- Isolamento e caracterização de marcadores de extratos obtidos da espécie em estudo utilizando-se EM e CG-EM;
- Caracterização de marcadores em potencial para padronização de material vegetal e insumo, utilizando CG-EM;
- Avaliação microbiológica do extrato e frações de *A. brasiliana*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estudo do gênero *Alternanthera*

A família Amaranthaceae compreende cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, ocorrendo 20 gêneros nativos e 100 espécies no Brasil. Muitas destas espécies são utilizadas como ornamentais ou na medicina popular, sendo comumente encontradas em ambientes abertos, porém algumas espécies estão presentes no interior de florestas (SOUZA e LORENZI, 2005 apud MARCHIORETTO et al. 2010).

Estudos realizados por Marchioretto et al. (2008) mostram que o Rio Grande do Sul apresenta 11 gêneros e 43 espécies de plantas dessa família, sendo o gênero *Alternanthera* o mais representativo, com 11 espécies.

Conforme Ferreira e Dias (2000) espécies dessa família possuem compostos biologicamente ativos conhecidos, entre eles betalaínas (betacianinas e betaxantinas), ecdisteroides, flavonóides, saponinas e tripterpenos.

As betalaínas (figura 1) são compostos solúveis em água, localizados nos vacúolos das plantas. Seu precursor comum é o ácido betalâmico (CAI; SUN; CORKE, 2005). Produzem coloração vermelha, amarela, rosa e laranja em flores e frutas, sendo que a beterraba constitui a principal fonte deste pigmento (ELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES LÓPEZ, 2000).

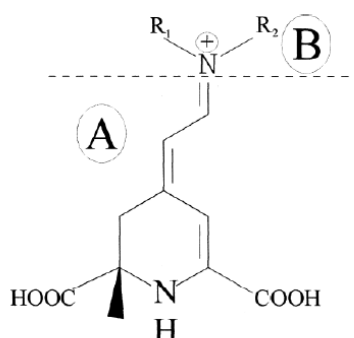


Figura 1 – Estrutura geral das betalaínas: (A) porção de ácido betalâmico, presentes em todas moléculas de betalaína; (B) radical que representa uma betacianina ou betaxantina, dependendo dos radicais R1 E R2 (DELGADO- VARGAS et al. 2000). Nas betacianinas, R= glicose ou ácido glucurônico. As betaxantinas possuem um anel di-hidropirínico.

Dentre suas propriedades funcionais, as betalaínas são identificadas como um antioxidante natural por estarem envolvidas na proteção da partícula de LDL-colesterol, contra modificações oxidativas (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES LÓPEZ, 2000). Ainda, as betaninas (em forma de extratos da beterraba) demonstraram atuar também na prevenção de alguns tipos de câncer, dentre eles os cânceres de pele e fígado, devido suas propriedades antioxidantes (LILA, 2005)

Plantas desse gênero são conhecidas por possuírem propriedades antimicrobianas, antivirais e em algumas espécies deste gênero tem sido reportada a inibição da atividade linfocitária, hepatoprotetoras e atividade analgésica (FERREIRA *et al.* 2003). Estudos etnofarmacológicos relataram atividades antiviral, antimicrobiana, hepatoprotetor, antifúngica, antidiarreico e analgésica de extratos de plantas desse gênero, como *Alternanthera brasiliana*, *A. philoxeroides*, *A. sessilis* e *A. tenella*

3.2 Utilização popular de *A. brasiliana* (terramicina)

As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores (CUNHA, 1995). Na medicina popular, as plantas são utilizadas concomitantemente ao uso de medicamentos convencionais (AMORIM, 1999)

A espécie vegetal *Alternanthera brasiliana* é empregada na medicina popular, para tratamento de infecções e é conhecida popularmente como “terramicina e penicilina” (CAETANO *et al.*, 2002). O uso popular difundido como antimicrobiano, conduz a boas perspectivas quanto ao desenvolvimento de medicamentos à base de vegetais. Devido a inúmeras infecções de difícil cicatrização, agravadas por fatores tais como a resistência microbiana, toxicidade e baixa eficácia dos fármacos comercialmente disponíveis, há esperança de que plantas como a *Alternanthera brasiliana* possam ser estudadas a fim de comprovar a eficácia deste vegetal no tratamento de patologias.

3.3 *Alternanthera brasiliana*

Conforme Resolução 261- CONAMA (1999) esta planta está classificada como vegetação de dunas internas e planícies, podendo desenvolver-se sobre dunas móveis, semifixas ou fixas, além de ocorrer em planícies arenosas após a praia ou associadas a dunas e lagunas, recebendo menor ou nenhuma influência marítima. Desta forma, sendo uma planta potencialmente tolerante ao sal, pode ser uma cultura alternativa para ser utilizada em solos salinizados.

A espécie *Alternanthera brasiliana* (figura 2) é popularmente conhecida como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho, sendo uma planta herbácea perene, de base lenhosa atingindo até 120 cm de altura (LORENZI e MATOS, 2008). É amplamente encontrada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PEREIRA et al. 2007) e, além de ser cultivada como ornamental pelo colorido arroxeadado de suas folhas, é utilizada na medicina popular (LORENZI e MATOS, 2008), onde a infusão de suas folhas é utilizada como digestiva, depurativa e diurética e a maceração da planta inteira é utilizada contra a prisão de ventre (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).



Figura 2 – Detalhe da parte aérea de *Alternanthera brasiliana* cultivada no horto da Fundação de Medicina Tropical de Tocantins – FMT/TO.
Fonte: BATISTA (2008)

As folhas de *A. brasiliana* foram analisadas morfoanatomicamente por Delaporte et al. (2002), Duarte e Debur (2004) e quimicamente por Brochado et al.

(2003) objetivando, respectivamente, o controle de qualidade e a identificação dos compostos químicos presentes nesta espécie.

Análises anatômicas desta espécie, realizadas por Delaporte et al. (2002) revelaram a presença de folhas anfiestomáticas, com tricomas tectores ornamentais, sendo observado alterações na disposição e no tamanho dos feixes vasculares na nervura principal, apresentando tecido esclerenquimático no polo floemático. Tanto a seção paradérmica adaxial como a abaxial apresentam estômatos predominantemente diacíticos (PEREIRA, 2007).

Estudos *in vitro* com *A. brasiliiana* confirmaram a presença de flavonóides como o canferol (BROCHADO et al. 2003), terpenos, esteroides, compostos fenólicos e pigmentos da classe betalaína (FERREIRA e DIAS, 2000)

Sendo isolados seis flavonóides da *A. brasiliiana*, responsáveis pelas suas atividades farmacológicas: canferol 3-O- rubinosídeo-7-O- α -ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo-7- α -L- ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-rutinosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo e canferol 3-O-rutinosídeo. Estas estruturas foram elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio.

Quanto aos estudos farmacológicos, foram avaliadas a atividade analgésica por Macedo et al. (1999), a atividade antiedematogênica por Delaporte et al. (2001), e a atividade antiproliferativa de linfócitos por Brochado et al. (2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

Para o estudo foram utilizadas folhas jovens e maduras de *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) conhecida popularmente como “penicilina”, “perpétua do mato”. O material vegetal (setenta maços correspondentes a 9,5 kg) foi adquirido no mercado de ervas do Ver-o-Peso, procedente distrito de Icoaraci região metropolitana de Belém-PA, coletado em 15 de junho de 2010. A seleção do material vegetal forneceu 2,3 kg de folhas que após secagem e trituração produziu 600 g da droga vegetal.

A identificação foi realizada por comparação com a exsicata Nº 160815 que depositada no herbário do Instituto Agronômico do Norte, vinculado à estrutura administrativa da Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

4.1.2 REAGENTES SOLVENTES E SOLUÇÕES

Todos os solventes utilizados possuíam grau de pureza p.a. e eram da marca Quimex quando não citado no texto.

Foram utilizados acetato de etila, ácido clorídrico (HCl) 5 %, peróxido de hidrogênio, água ultrapura, álcool etílico absoluto 96 °GL, álcool etílico a 70 %, azul de toluidina 1 %, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), éter etílico, hexano, metanol, etanol, reativo de Pascová, reativo de Fehling A e B, reativo de Bouchardat, reativo de Draggendorff, reativo de Mayer, e reativo de Kedde, solução de hidróxido de amônio, lugol, solução aquosa de ninhidrina a 1 %, solução alcoólica de cloreto férrico a 1 %, ácido clorídrico concentrado, raspas de magnésio, solução aquosa de vanilina a 1 %.

4.1.3 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos estufa termo estatizada Quimis Q-314M222; estufa modelo S805T (BIOPAR); moinho de facas tipo Willy; agitador

eletromagnético para peneiras (Bertel); balança analítica modelo BK 500 (GEHAKA); forno mufla modelo 355I (ENGRO); alcoômetro de Gay Lussac; potenciômetro modelo pHS3B (pHTek); balança analítica FA2104N (Bioprecisa); liofilizador modelo Micro Modulo/115 série 1K470021-1B frequência 60 Hz 20Å acoplado a bomba de vácuo modelo VLP-200 e ao filtro de óleo VPOF-110 (Thermo Savent); analisador térmico modelo DTG-60 e DSC-60 (Shimadzu); espectrofotômetro de infravermelho IR100 spectrometer (Thermo électron corporation), potenciômetro pH21 pH/mV meter (HANNA), espectrômetro de massas modelo: microtof II – ESI - TOF MASS SPECTROMETER (Bruker Daltonics, MA, EUA), cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa (CG /EM) modelo - QP2010 (Shimadzu).

4.2 Métodos

As atividades descritas a seguir foram desenvolvidas nos laboratórios de Fitoquímica, de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) Farmacotécnico, de Controle de Qualidade e de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) sendo ilustradas no fluxograma apresentado na figura 3.

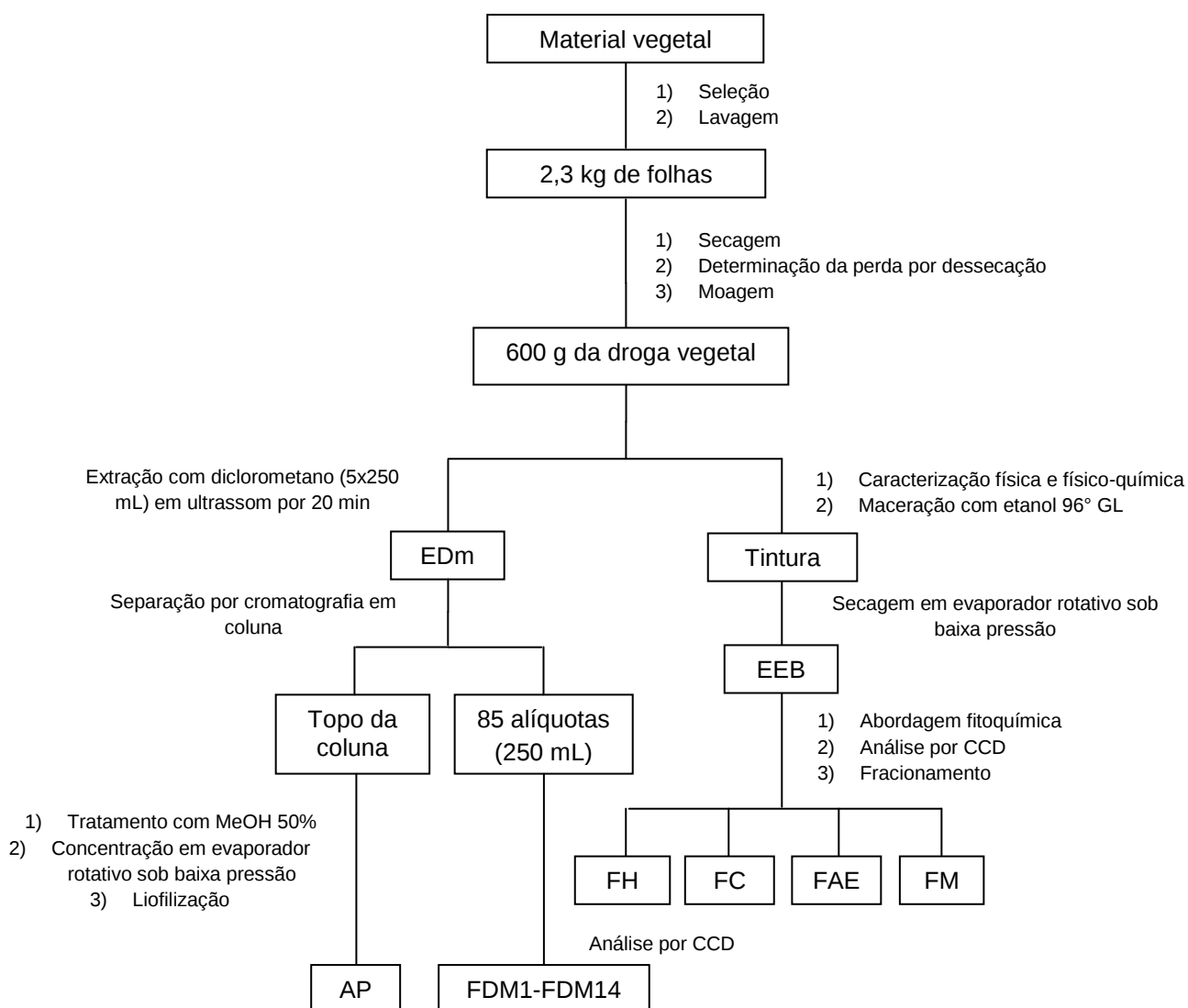


Figura 3 – Fluxograma referente a atividades desenvolvidas para a obtenção de amostras e análises preliminares de *Alternanthera brasiliana*.

4.2.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA E MICROQUÍMICA DAS FOLHAS DE *A. brasiliana*

Para caracterização anatômica, foram utilizadas folhas completamente expandidas, as quais foram hidratadas em água destilada e seccionadas com lâmina de aço nas regiões do limbo, nervura central e margem. Os cortes do material vegetal foram feitos à mão livre com o auxílio de lâminas de aço no sentido transversal e colocados em água destilada para, posteriormente, serem clarificados com hipoclorito de sódio 20 %, corados com azul-de-astra seguido de fucsina básica, sendo então montados em lâminas com glicerina a 50 %, os cobrindo com lamínula e vedando-a com esmalte incolor (KRAUS, 1997). Foram obtidas fotomicrográficas em foto microscópio do modelo ZEISS Axiolab acoplado a uma câmera digital do modelo Moticam 2300 3.0 MPixel Live Resolution, para ilustração dos caracteres anatômicos.

Para os testes microquímicos, as secções confeccionadas a mão livre foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 50 % e lavadas com água destilada. Logo após, foram instilados sobre os cortes os reagentes referentes a cada teste, sendo o excesso retirado com papel de filtro finalizando a montagem da lâmina com glicerina 50% cobrindo-se o corte com lamínula, vedando-a com esmalte incolor (KRAUS, 1997).

4.2.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas frescas foram separadas do caule, descartando-se as que se apresentavam deterioradas, manchadas e com sinal de ataque por insetos ou fungos. As folhas selecionadas foram submetidas à lavagem com água corrente para a retirada das sujidades e lavadas com álcool etílico a 70 %, a fim de se promover sua desinfecção e retardar o metabolismo das folhas. Após este procedimento, o material vegetal foi submetido à secagem prévia, por aproximadamente três dias, a temperatura ambiente sobre bancadas cobertas com papel absorvente. Após esta etapa, o material vegetal foi colocado em uma estufa de ar circulante a temperaturas entre $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e lá permaneceu por 7 dias. Após a retirada das folhas, já secas, da estufa, estas foram trituradas em moinho de facas inoxidável obtendo-se 600 g da droga vegetal

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DAS FOLHAS DE *Alternanthera brasiliana* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010).

4.2.3.1 Determinação do teor de umidade

Aproximadamente 2 g da droga vegetal foram submetidos à secagem direta por radiação no infravermelho. A amostra foi levada a aquecimento de 105 °C durante 15 minutos, sendo que esse procedimento foi realizado, pois é um método oficial que diminui o tempo de análise e fornece um resultado imediato, visto que o aparelho é composto de uma balança e um programa que processa e mostra o resultado. Esse procedimento foi realizado em triplicata, para obter um resultado mais preciso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010).

4.2.3.2 Determinação da distribuição granulométrica

Aproximadamente 25 g do pó foram submetidos a uma série de tamises com abertura de malha (1.700, 710, 355, 250, 180 e 125 µm) usando-se um vibrador de tamises, durante 15 min. A distribuição granulométrica da droga vegetal foi determinada, em triplicata, e a quantificação percentual do pó retido em cada tamis permitiu calcular o tamanho médio das partículas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010).

4.2.3.3 Determinação do teor de cinzas totais

Nessa análise, aproximadamente 3 g do pó foram transferidos a cadinhos de porcelana previamente calcinados, resfriados e pesados. As amostras foram carbonizadas em mufla e incineradas a 450 °C por 2 h. Após resfriamento em dessecador, as mesmas foram pesadas em balança analítica, repetindo-se o procedimento até a obtenção de peso constante (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010).

4.2.3.4 Análise térmica do pó das folhas de *Alternanthera brasiliana*

Para obtenção das curvas termogravimétricas (TG e DTA) da droga vegetal, foram utilizados aproximadamente 3 mg da amostra, que foram transferidos para um cadinho de platina, e logo após, submetidos a uma faixa de temperatura entre 25 °C e 600 °C, sob atmosfera dinâmica de ar e de nitrogênio (25,00 ml/min) e razão de aquecimento de 5 °C/min. Os cálculos de perda de massa foram realizados com auxílio do programa TA-60W da Shimadzu® (SILVA JUNIOR, 2006; ALVES, 2008; NUNES, 2009)

4.2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DO DECOCTO DE *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010).

4.2.4.1 Preparo do decocto

Transferir aproximadamente de 5 g da droga vegetal moída, para frasco de Erlenmeyer contendo 50 ml de água fervente, manter sob fervura moderada durante 15 min, resfriar e filtrar sobre algodão para balão volumétrico de 100 ml. Completar o volume, até 100 ml.

4.2.4.2 Determinação do pH do decocto

A determinação do pH foi realizada com potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010).

4.2.4.3 Determinação da densidade aparente do decocto

Um picnômetro com capacidade para 5 ml, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água recém-destilada e fervida) e pesado. Em seguida, o picnômetro foi enxaguado e preenchido com 5 ml da amostra (decocto), e então, pesado. A relação determinada entre o peso do volume da amostra e o do padrão a 20 °C fornece o valor da densidade relativa do decocto de *A. brasiliana*.

4.2.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *A. brasiliana*

Para obtenção do EEB utilizou-se o processo extrativo de maceração. Nesse processo, 350 g da droga vegetal permaneceram por 10 dias em recipiente de aço inoxidável, fechado, periodicamente agitado, usando-se como líquido extrator o etanol na proporção 1: 5. Durante todo o processo de maceração, o material esteve ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Após a maceração, a tintura foi filtrada, armazenada em recipientes escuros e colocada sobre refrigeração (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª Ed, 2010). A tintura obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob baixa pressão para a obtenção do EEB de folhas da espécie.

4.2.6 PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) (BARBOSA, 2010).

A prospecção química do extrato etanólico foi realizada no intuito de verificar a presença de constituintes químicos naturais, tais como: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcalóides, aminoácidos, antraquinonas, catequinas, depsídeos e depsidonas, derivados da cumarina, esteroides, fenóis, flavonóides (antocianinas, antocianidinas, catequinas (taninos catéquicos), chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanonóis, leucoantocianidinas, xantonas), glicosídeos cardíacos, polissacarídeos, proteínas, purinas, saponinas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, taninos e triterpenóides. As análises foram realizadas em triplicata, na concentração de 5 mg/ml.

4.2.7 FRACIONAMENTO DO EEB

Para o fracionamento do EEB empregou-se o método de partição sólido-líquido utilizando solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol).

Pesaram-se aproximadamente 6,8 g do extrato etanólico de *Alternanthera brasiliana*, aos quais se adicionaram sucessivamente cinco alíquotas de 50 ml de cada um dos solventes citados na ordem apresentada anteriormente.

As soluções provenientes do fracionamento foram concentradas em evaporador rotativo sob baixa pressão, fornecendo as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e metanólica (FM).

4.2.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Inicialmente, amostra do extrato etanólico bruto de *A. brasiliiana* e suas respectivas frações, hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica foram analisadas por cromatografia em camada delgada – CCD. Durante estas análises diferentes fases móveis, compostas de hexano, diclorometano e acetato de etila em diferentes proporções foram testadas. Esta análise mostrou um perfil cromatográfico com resolução adequada para a sequência do trabalho usando como fase móvel hexano: acetato de etila na proporção de 70: 30.

4.2.9 PREPARAÇÃO DO EXTRATO EM DICLOROMETANICO (EDm)

Outro extrato a partir da droga vegetal de *A. brasiliiana* foi preparado utilizando-se de 100 g da droga vegetal e 250 ml de diclorometano. Esta mistura foi submetida ao ultrassom por 20 min, sendo o solvente extrator renovado por cinco vezes após decantação. Ao final deste processo, as frações diclorometânicas foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo sob baixa pressão, obtendo-se o EDm. O extrato foi analisado por CCD e em seguida fracionado por cromatografia em coluna.

4.2.10 FRACIONAMENTO DO EDm POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Cerca de 3 g de EDm foram adsorvidos a cerca de 10 g de sílica gel 70-230 mesh. Logo em seguida, esta amostra foi acondicionada no topo da coluna cromatográfica (50 x 3 cm) a qual estava preenchida com 60 g de sílica. Iniciou-se o procedimento cromatográfico utilizando-se 100 % de hexano como fase móvel. Ao longo deste procedimento, a polaridade da fase móvel foi incrementada adicionando-se alíquotas de acetato de etila. Este processo foi finalizado usando-se 100 % de acetato de etila coletando-se 85 frações de 250 ml cada, numeradas de 1 a 85.

O topo da coluna correspondente a pastilha não eluído da amostra foi removido e tratado com metanol/água 50 %. Essa solução foi concentrada em evaporador rotativo sob baixa pressão para retirada do metanol e posteriormente, congelada e liofilizada, obtendo-se assim a fração polar. Esta amostra foi analisada por EM (espectrometria de massas) e espectroscopia no infravermelho, sendo submetida ainda à análise por ressonância magnética nuclear RMN de ^1H e de ^{13}C , empregando-se para isso 50 mg da fração polar. Todas as demais frações coletadas foram analisadas por CCD e reunidas com base na similaridade de seus perfis.

4.2.11 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

A análise foi realizada em espectrômetro de massas de alta resolução micrOTOF II-ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker-Daltonics, Billerica, MA, EUA), utilizando-se bomba de Infusão e fluxo de 3000 $\mu\text{L/h}$. A fase móvel empregada para a solubilização foi constituída de metanol: água, e a detecção foi realizada no modo positivo para a amostra. O aparelho é de alta resolução necessitando de calibração interna antes de realizar as análises, usando-se para este fim uma solução de Na - TFA a 10 mg/ml.

4.2.12 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO (IV) DE *Alternanthera brasiliana*

A espectroscopia por infravermelho de *Alternanthera brasiliana* foi realizada por um espectrofotômetro de infravermelho modelo FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer), marca Shimadzu IR-Prestige-21, sendo as leituras realizadas em comprimento de onda na faixa de 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} , resolução 2x, sendo a droga comprimida em brometo de potássio (KBr).

4.2.13 ANÁLISE DA AMOSTRA POLAR POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR HIDROGÊNIO (RMN ^1H) E CARBONO (RMN ^{13}C)

Para a obtenção dos espectros de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C), a amostra polar (AP) foi dissolvida em DMSO deuterado (dimetilsulfóxido deuterado) e analisada em espectrômetro Brucker – Avance DRX 400, na frequência de 500

MHz e 125 MHz respectivamente. Esse procedimento foi realizado na Faculdade de Química de Ribeirão Preto (USP).

4.2.14 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS (CG-EM)

Para análise por CG-EM as frações 1, 6, 7 e 8 (Seção 4.2.9) foram preparadas na concentração de 10 mg / mL. Assim, 1 mL de cada amostra foi analisada por cromatografia em fase gasosa capilar. Para isso, foi usado um CG/EM Shimadzu "QP2010 equipado com sistema automático Sampler AOC 20SI no modo split (1: 100)". Todas as análises foram realizadas em uma coluna de sílica fundida capilar (DB-5, 30 m 0,25 mm, espessura de revestimento 0,25 mm); sendo o hidrogênio utilizado como gás de arraste em 1,30 mL/min e os espectros de massa foram analisados no modo de varredura, a energia de ionização foi de 70 eV (40 – 500 m/z). A temperatura do detector foi de 250 °C e a do forno, 60 °C – 240 °C a 3 °C / min. Os espectros obtidos foram analisados e comparados com os disponíveis na biblioteca do cromatógrafo.

4.2.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (CLSI, 2003).

Para os testes de avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método Kirby – Bauer ou difusão em disco (BAUER et al. 1966; CLSI, 2003; KARTAL et al. 2003) onde foram utilizadas cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25313), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Cândida albicans* (ATCC 14053), gentilmente fornecidas pela FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz ao LACEN-PA (Laboratório Central do Estado do Pará), para a realização deste trabalho.

4.2.15.1 Preparação do ágar Mueller-Hinton

O meio ágar Mueller-Hinton foi preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente, conforme as instruções do fabricante HIMEDIA, que imediatamente após passar pela autoclave, deixou-se resfriar.

O meio recém-preparado e resfriado foi colocado em placas de Petri descartáveis, numa superfície horizontal, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm. Isso corresponde a 25 - 30 ml para as placas com diâmetro de 100 mm usadas no ensaio. O ágar foi esfriado a temperatura ambiente e armazenado em geladeira a 3 °C.

4.2.15.2 Controle de turbidez para a preparação do inóculo

Para padronizar a densidade do inóculo para um teste de sensibilidade como esse realizado, utiliza-se um controle de turbidez a base de BaSO₄, equivalente a uma solução padrão de MacFarland, tubo 0,5; correspondendo à concentração de aproximadamente 180 Unidades Formadoras de Colônia – (UFC / ml). O controle de turbidez a base de sulfato de bário foi agitado vigorosamente num misturador mecânico tipo vórtex antes de cada uso, verificando-se a uniformidade da dispersão das partículas no turbidímetro digital de bancada.

4.2.15.3 Preparação do inóculo

Quatro mililitros de caldo preparado segundo o fabricante (Merck®) foram transferidos para 25 tubos de ensaio; imediatamente após passar pela autoclave, o caldo foi deixado esfriar até a temperatura ambiente e, em seguida, armazenado em geladeira a 3 °C.

4.2.15.4 Método do crescimento

De três a cinco colônias das cepas padrão foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para uma placa contendo ágar Mueller - Hinton que foram armazenadas em estufa a 36 °C ± 1 °C por 24 h.

Após esse período, foram retiradas da placa anteriormente semeada duas a três colônias que foram colocadas em tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo Mueller-Hinton. Os tubos foram levados para estufa a 35 °C, até alcançar o valor 0,5

de turbidez segundo a escala de MacFarland (em torno de duas horas). Quando necessário, a turbidez foi ajustada pela adição de mais caldo, o que resultou numa suspensão contendo de 1 a 2×10^8 UFC/ml de cada microrganismo testado.

4.2.15.5 Inoculação das placas de teste

Em condições adequadas de turbidez, mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 min após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido para ajudar a retirar qualquer excesso de inóculo no swab;

A superfície seca da placa de ágar Mueller - Hinton foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar. Repetiu-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se um swab na borda da placa de ágar;

A tampa foi deixada entreaberta de três a cinco minutos, embora nunca mais de 15 min, para não permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de se aplicar os discos impregnados de droga.

4.2.15.6 Aplicação de discos às placas de ágar inoculadas

Sobre as placas de ágar inoculadas foram adicionados discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, respectivamente impregnados com 10 μ L de uma solução de extrato bruto, fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato de etila e fração metanólica, dissolvidos em DMSO a 8 mg/ml. Em seguida, as placas foram incubadas na estufa à temperatura de $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h para as bactérias e por 48 h para o fungo.

4.2.15.7 Leitura das placas e interpretação dos resultados

Após 18 - 24 h de incubação, examinou-se cada placa. Se a placa foi satisfatoriamente semeada, e o inóculo correto, os halos de inibição resultantes serão uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento. Se

colônias individuais forem aparentes, o inóculo era demasiado leve e o teste deverá ser repetido. Os diâmetros dos halos de inibição total (julgados a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos foram medidos em milímetros usando um paquímetro, que foi encostado na parte posterior das placas de Petri invertida.

Após o período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, medindo-se o diâmetro do halo formado ao redor dos discos, considerando-se como resultado final a média de três valores de halos. Nessa análise, halos com diâmetro igual ou superior a 8mm são considerados sensíveis e os halos de diâmetro inferior são considerados resistentes (PAREKH e CHANDA, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição anatômica e microquímica das folhas de *A. brasiliiana* (L.) Kuntze

Os cortes em secção transversal do limbo foliar de *A. brasiliiana* mostram uma epiderme uniseriada envolvida por uma fina cutícula, assim como um mesófilo dorsiventral, comum em *Amaranthaceae* (DUARTE, 2004), composto de uma única camada de parênquima paliçádico e cerca de quatro camadas de parênquima lacunoso, as quais ocupam por volta de 50 a 60 % do mesófilo (figura 4). Ocorre a presença abundante de idioblastos do tipo drusa ao longo dos parênquimas, predominando nas proximidades do paliçádico, sendo esta uma característica do gênero *Alternanthera* (METCALF, 1950). Tricomas tectores pluricelulares também podem ser visualizados, principalmente na face abaxial, coincidindo com o observado por Delaporte (2002). A nervura central possui formato bicôncavo com feixes vasculares que variam em número, formato e tamanho, sendo sustentados por tecido esclerênquimático (figuras 5 e 6). No lado adaxial da nervura nota-se a presença de colênquima formado por volta de quatro camadas e por duas camadas no lado oposto, conforme visto por Duarte (2004).

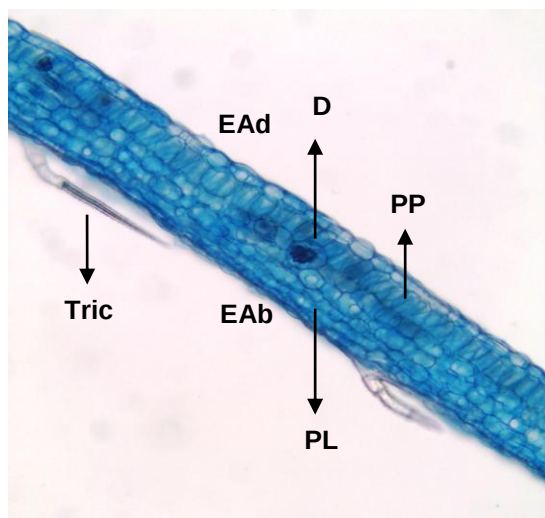


Figura 4 – Corte transversal do limbo (mesófilo). EAd (Epiderme Adaxial); PP (Parênquima Paliçádico); Tric (Tricoma); EAb (Epiderme Abaxial); PL (Parênquima Lacunoso)

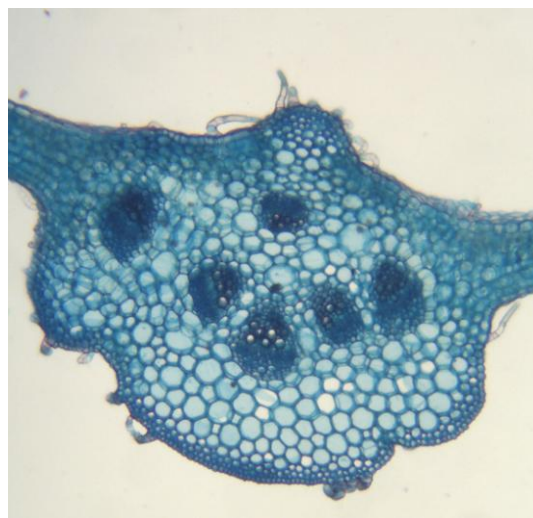


Figura 5 – Corte transversal da nervura central.

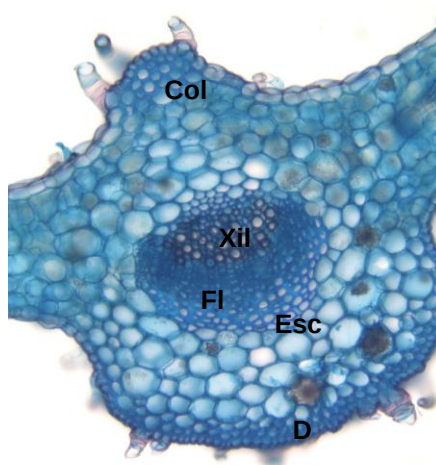


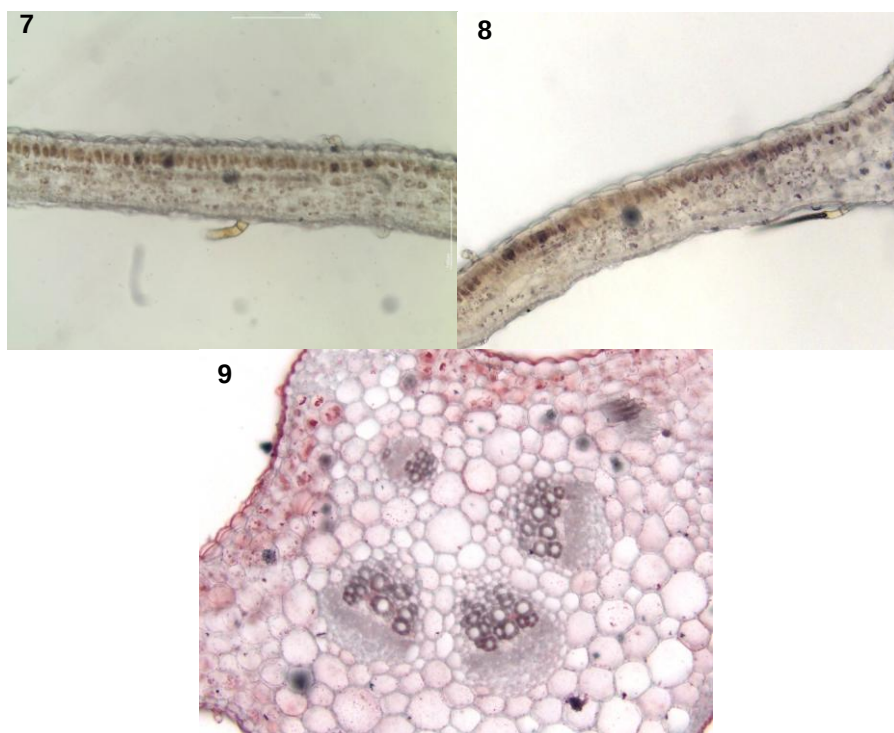
Figura 6 – Corte transversal da nervura central. Xil (xilema); Fl (floema); Esc (esclerênquima); Col (colênquima); D (drusa).

A análise microquímica realizada revelou resultados positivos para alcalóides, substâncias graxas e amido. Pode-se observar a presença de tais compostos no parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, epiderme e feixes vasculares, conforme mostrados nas figuras 7, 8 e 9. Esses dados reforçam os resultados obtidos na prospecção fitoquímica quanto à presença de alcaloides na espécie. Além disso, as substâncias graxas podem se tratar dos esteroides e tripterpenos detectados anteriormente e citados em trabalhos disponíveis na literatura (SOUZA et al. 1998; MACEDO et al. 1999; MACEDO et al. 2004; BARUA et al. 2012; FACUNDO et al. 2012).

Os testes para açúcares redutores, compostos fenólicos e flavonóides foram negativos (quadro 3 e figuras 7 A 9), o que difere do exposto por Duarte (2004) em seu estudo, porém a presença de amido mostra um resultado compatível. A diferença no clima e no tipo de solo podem ser razões para tais divergências.

Quadro 1 – Resultado da análise microquímica das folhas de *Alternanthera brasiliana* L. (Kuntze).

TESTE	RESULTADO	FIGURA
Açúcares Redutores	Negativo	Sem figura
Alcalóides	Positivo	7
Flavonóides	Negativo	Sem figura
Compostos fenólicos	Negativo	Sem figura
Amido	Positivo	8
Substâncias graxas	Positivo	9

**Figuras 7, 8, 9** – Lâminas de análise microquímica.

5.2 Caracterização física e físico-química do pó das folhas de *Alternanthera brasiliana* (Farmacopéia Brasileira 5ª Ed., 2010).

5.2.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DO PÓ

O pó da droga vegetal apresentou como teor de umidade 7,38 %, sendo esta análise de fundamental importância para conservação, armazenamento, pois mantém a qualidade da matéria prima vegetal, sendo o principal fator para o desenvolvimento de processos de crescimento de micro-organismo, tais como o desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias, sendo que o resultado encontrado mostra-se em conformidade com a Farmacopéia Brasileira 5ª Ed.

5.2.2 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO PÓ

A análise granulométrica do material vegetal triturado é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois pode influenciar diretamente na eficiência do processo extrativo. Após a tamisação do pó das folhas de *Alternanthera brasiliana*, constatou-se que as partículas passaram em sua totalidade pelo tamis de malha 1.70 e menos de 40 % (1,2 g) passaram pelo tamis de malha 355 μm (conforme representado no gráfico 1), caracterizando-o como pó grosso.

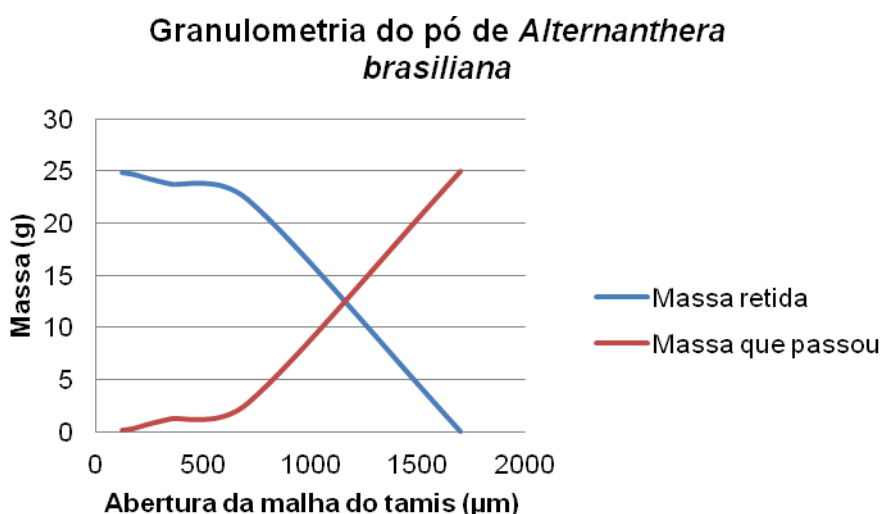


Gráfico 1 – Gráfico da distribuição granulométrica do pó de folhas de *Alternanthera brasiliana*

5.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

A amostra analisada apresentou como teor de cinzas totais 16,77 %, que corresponde a qualidade de substâncias não voláteis no processo de incineração, sendo este valor superior ao encontrado para outras drogas vegetais descritas na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Em relação à presença de macro e micronutrientes nas folhas e cinzas das espécies, observa-se de uma forma geral, uma maior porcentagem destes nas cinzas, com exceção do nitrogênio. Isto provavelmente esteja relacionado com a existência de compostos nitrogenados orgânicos que fazem parte dos complexos enzimáticos, clorofilas e outras substâncias, que no processo de mineralização seriam perdidas como compostos voláteis e passam a não fazer parte das cinzas.

5.2.4 CURVA TERMOGRAVIMETRICA (TG) DO PÓ DE *Alternanthera brasiliana* EM ATMOSFERA DE AR

As curvas TG, obtidas em atmosfera de ar (gráfico 2), evidenciaram que a perda de água superficial ou de umidade ocorre entre 34 °C e 69 °C (8,174 %). Após a desidratação, a curva TG mostrou quatro eventos térmicos distintos. O primeiro ocorreu entre 132 °C e 139 °C com perda de massa de 1,97 % que está relacionado à queima de metabolitos presentes na amostra.

A segunda etapa de decomposição térmica, entre 228 °C e 310 °C envolveu perda de massa de 42,549 % que representa a formação de carvão, sendo o último evento entre 411°C e 453 °C de perda de 29,386 % que corresponde à queima do material da etapa anterior e formação de cinzas correspondentes aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra. Assim, observou-se uma perda total de 82,079 % na faixa de temperatura a qual o pó das folhas da espécie foi submetido (25 °C a 600 °C), com resíduo de 17,92 %. Os valores citados encontram-se resumidos na tabela 1.

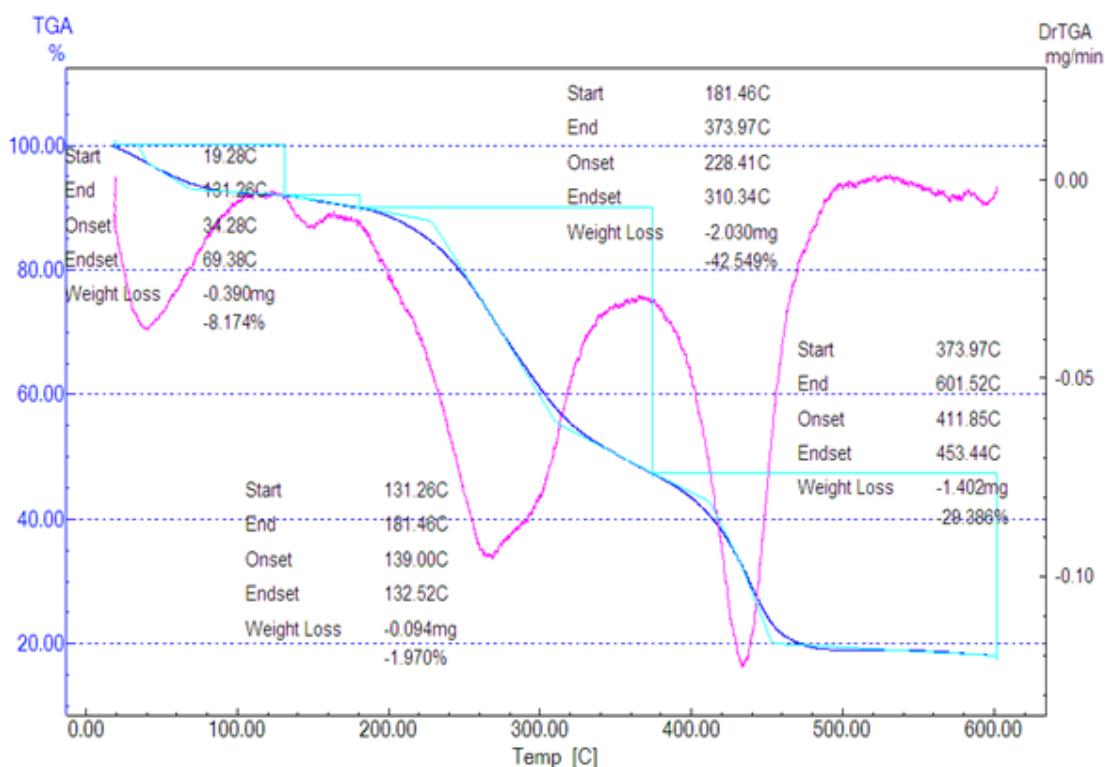


Gráfico 2 – Curva de (TG) do pó de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de ar.

Tabela 1 – Perfil termogravimétrico (TG) do pó das folhas de *A. brasiliana* em atmosfera de ar.

Δ temperatura °C	Δ Massa	Perda %
34 - 69	0,390 mg	8,174 %
132 - 139	0,094 mg	1,970 %
228 - 310	2,030 mg	42,549 %
411 - 453	1,402 mg	29,386 %

Delaporte et al. (2005) em sua pesquisa analisou as folhas de *A. brasiliana* e encontrou como resultado do teor de cinzas totais de 13,23 % $\pm$ 0,47. Em relação à presença de macro e micronutrientes nas folhas observou-se uma maior concentração de nitrogênio (3,13 %) e manganês (0,296 %). Os dados relatados, cinzas totais, macro e microelementos, contribuem significativamente no controle de qualidade e padronização de drogas vegetais.

Como principal macronutriente das folhas de *A. brasiliana* se encontra o nitrogênio (N) com concentração de 3,13 %, seguido do potássio (2,35 %) e do cálcio (1,22 %), os principais micronutrientes encontrados foram o manganês (0,30 %) e em suas cinzas, o zinco (1,75 %).

5.2.5 CURVA TERMOGRAVIMETRICA (TG) DO PÓ DE *Alternanthera brasiliana* EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO

A análise térmica do pó de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de nitrogênio produziu a curva termogravimétrica (TG) apresentada no gráfico 3.

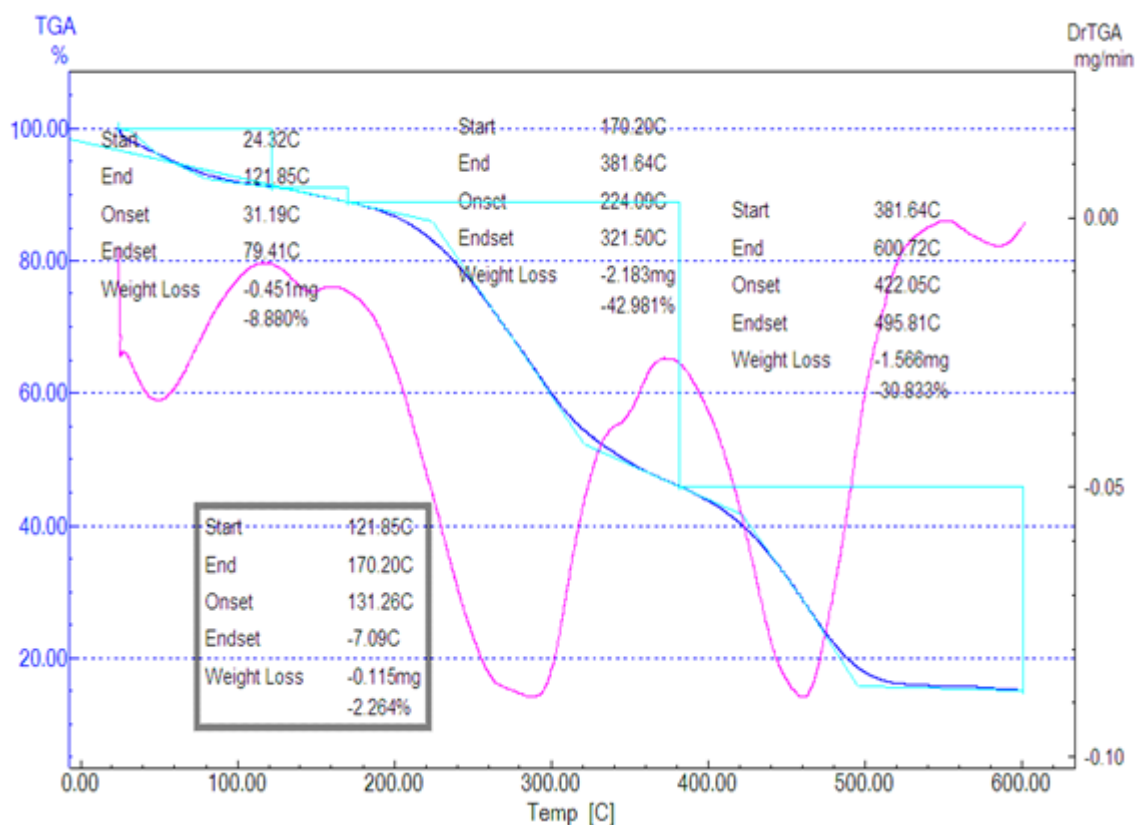


Gráfico 3 – Curva de (TG) do pó de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de nitrogênio.

A curva produzida mostra que na faixa de temperatura de 31 °C a 79 °C houve perda inicial de 0,451 mg (8,880 %) da massa aproximada utilizada (3 mg), em um segundo evento na faixa de temperatura entre 131 °C até aproximadamente 170 °C houve perda de 0,115 mg (2,264 %), e de 224 °C até 321 °C a amostra perdeu 2,183 mg (42,981 %). Em um quarto evento, na faixa de temperatura entre 422 °C e 495 °C houve uma perda de 1,566 mg (30,833 %), conforme apresentado na tabela 2. Dessa forma, foi observada perda total de massa de 84,958 % na faixa de temperatura analisada (25 °C a 600 °C), com resíduo de 15,042 %.

Tabela 2 – Perfil termogravimétrico (TG) do pó das folhas de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de nitrogênio.

Δ temperatura °C	Δ Massa	Perda %
31 - 79	0,451 mg	8,880 %
131- 170	0,115 mg	2,264 %
224 -321	2,183 mg	42,981 %
422 -495	1,566 mg	30,833 %

5.2.6 CURVA DE ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) DO PÓ DE *Alternanthera brasiliana* EM ATMOSFERA DE AR

A curva de DTA produzida pela análise do pó de *Alternanthera brasiliana* (gráfico 4) mostra um evento endotérmico na faixa de temperatura de 48 °C , com um consumo de energia de 237,12 J/g e três evento exotérmicos na faixa de temperatura entre 152 °C (35,36 J/g), 299 °C ($\Delta H=1,83$ kJ/g) e de 436 °C ($\Delta H=3,17$ kJ/g) com suas respectivas perdas de energia.

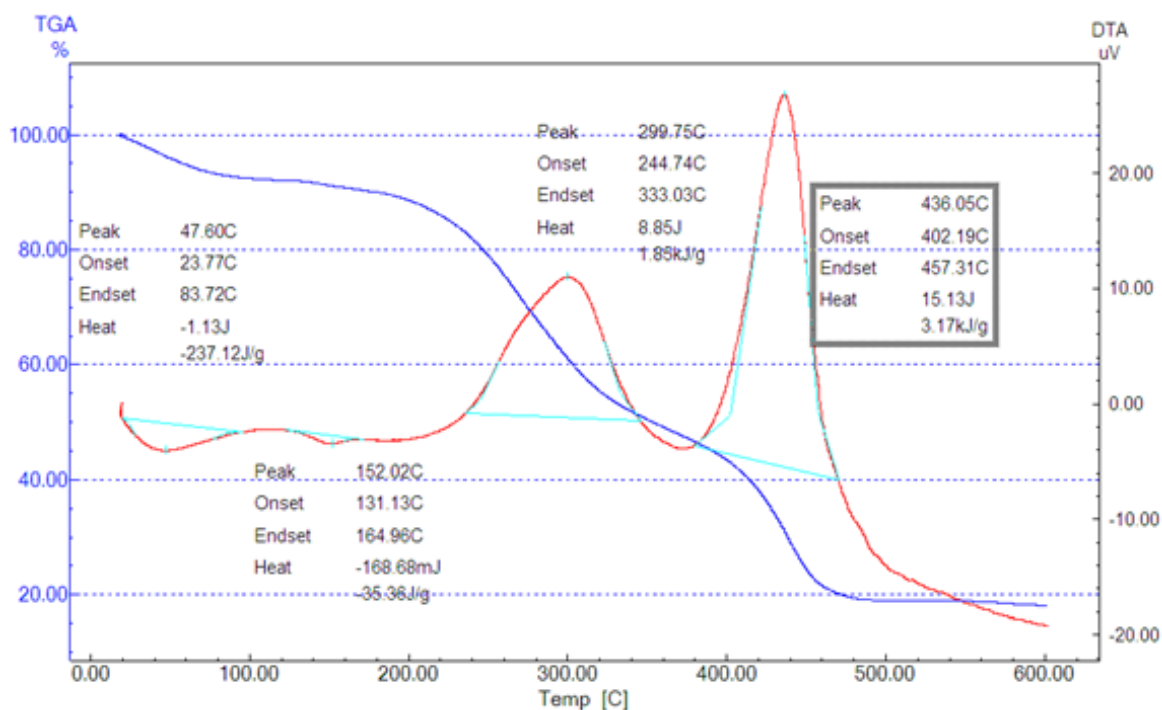


Gráfico 4 – Curva de DTA do pó de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de ar.

Os valores referentes às perdas de energia a partir pó de *Althernantera brasiliana* são sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 – Perfil térmico diferencial do pó das folhas de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de ar.

Δ temperatura °C	Δ H	Eventos
48	237,12 J/g	Endotérmico
152	35,36 J/g	Exotérmico
299	1,830 kJ/g	Exotérmico
436	3,17 kJ/g	Exotérmico

5.2.7 CURVA DE ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) DO PÓ DE *Alternanthera brasiliana* EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO

A análise térmica diferencial do pó de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de nitrogênio produziu a curva de DTA apresentada no gráfico 5.

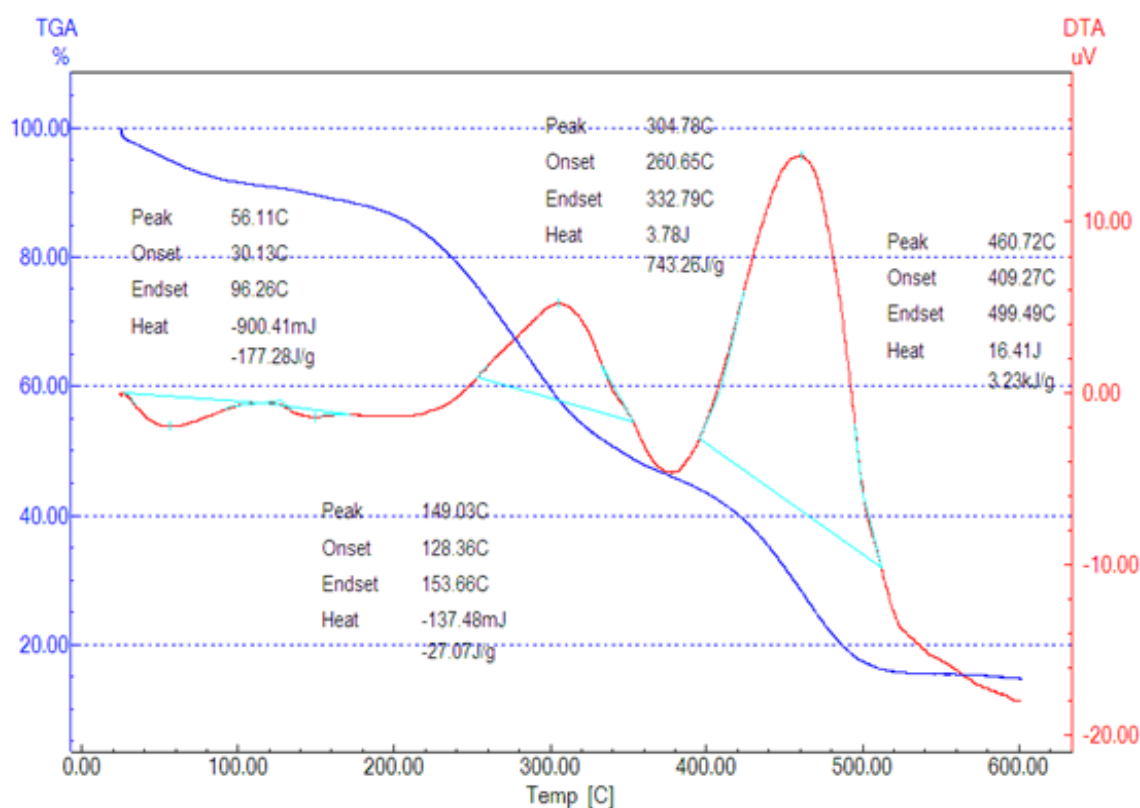


Gráfico 5 – Curva do perfil térmico diferencial do pó de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de nitrogênio.

A curva produzida (gráfico 5) mostra um evento endotérmico na faixa de temperatura de 56 °C, com um consumo de energia de 177,28 J/g, outro evento

endotérmico na faixa entre 149 °C, com perda de 27,07 J/g, e, ainda, dois processos exotérmicos, sendo um deles na faixa entre 304 °C ($\Delta H=743,26$ J/g) e o outro de 460 °C ($\Delta H= 3,23$ J/g), conforme resumido na tabela 4.

Tabela 4 – Perfil térmico diferencial do pó das folhas de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de nitrogênio.

Δ temperatura °C	Δ H	Eventos
56	177,28 J/g	Endotérmica
149	27,07 J/g	Endotérmica
394	743,26 J/g	Exotérmica
460	3,23 J/g	Exotérmica

5.2.8 COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS PRODUZIDAS PELA ANÁLISE TERMOGRAVIMETRICA (TG) DO PÓ DE *Althernanthera brasiliana* NAS ATMOSFERAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO.

Uma comparação entre as curvas produzidas pela TG da amostra nas atmosferas de ar e nitrogênio é estabelecida no gráfico 6, que revela a semelhança entre os eventos produzidos por essa análise, demonstrando que não há variação significativa na decomposição da amostra no final dos eventos.

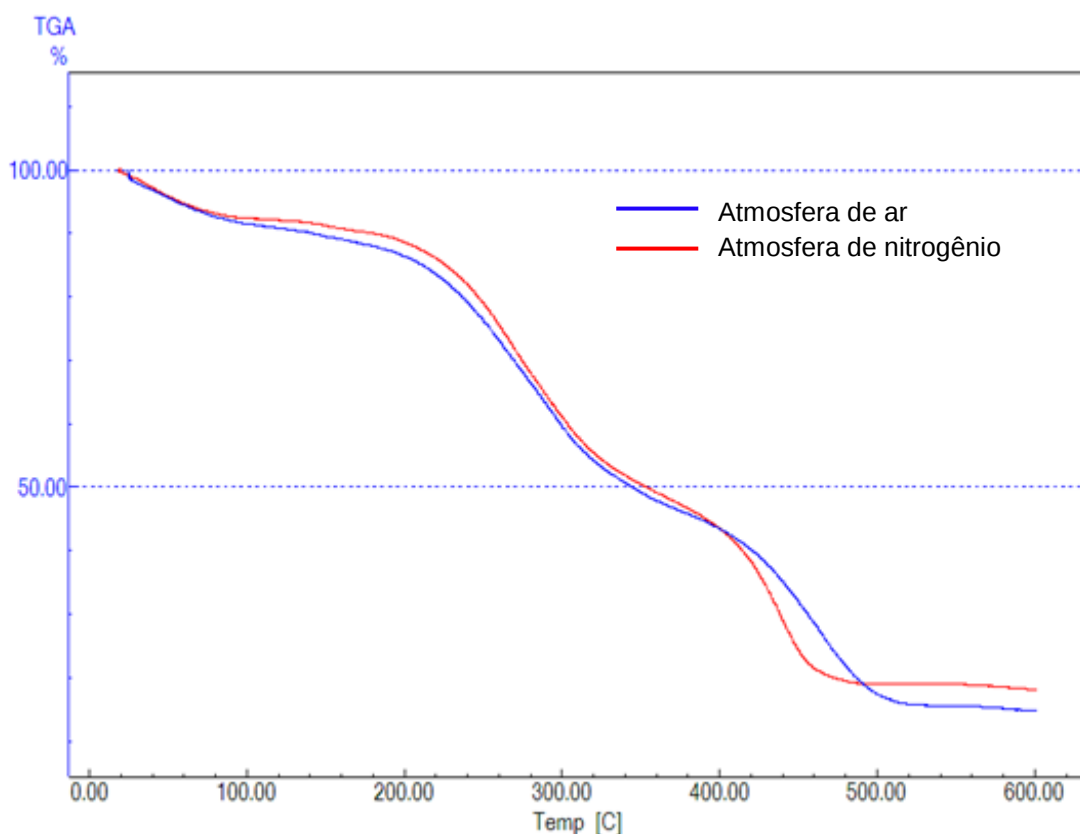


Gráfico 6 – Curvas de TG produzidas pela análise do pó de *Alternanthera brasiliana* em atmosfera de oxigênio e nitrogênio.

A tabela 5 estabelece uma comparação entre os valores correspondentes à perda de massa em atmosfera de ar e nitrogênio.

Tabela 5 – Perfil termogravimétrico (TG) do pó das folhas de *Alternanthera brasiliana* unindo os eventos (atmosfera de ar e nitrogênio).

Δ temperatura °C		Δ Massa		Perda %	
Ar	Nitrogênio	Ar	Nitrogênio	Ar	Nitrogênio
34 - 69	31 - 79	0,390 mg	0,451 mg	8,174 %	8,880 %
132 - 139	131- 170	0,094 mg	0,115 mg	1,970 %	2,264 %
228 - 310	224 -321	2,030 mg	2,183 mg	42,549 %	42,981 %
411 - 453	422 -495	1,402 mg	1,566 mg	29,386 %	30,833 %

5.3 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico

A maceração da droga vegetal forneceu 24,98 g de um extrato etanólico bruto (EEB), representando um rendimento 7,14 % em relação à quantidade de droga utilizada, 350 g.

O fracionamento de 6,8 g de EEB produziu 4,22 g de fração hexânica (FX), 1,18 g de fração clorofórmica (FC), 0,02 g de fração acetato de etila (FAE) e 1,16 g de fração metanólica (FM), representando, respectivamente, rendimentos de 61,76 %, 17,35 %, 0,29 % e 17,05 %.

5.4 Caracterização físico-química do decocto (Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed., 2010).

5.4.1 DETERMINAÇÃO DO pH DO DECOCTO DE *A. brasiliana*

O valor de pH encontrado para o decocto das folhas de *A. brasiliana* foi de 6,8 o qual se apresenta dentro da faixa de variação descrita para drogas vegetais de outras espécies, no código oficial brasileiro.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE DO DECOCTO

O valor de densidade encontrado que foi de 0,27 g/cm³ encontra-se dentro dos valores preconizados pelo código oficial brasileiro para avaliar qualidade do material vegetal (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª Ed., 2010).

5.5 Prospecção fitoquímica do extrato etanólico bruto

Das classes de metabólitos testadas apenas seis foram detectadas no extrato etanólico. O resultado é mostrado no quadro abaixo.

Classe de Metabólitos	Resultados	
Saponinas	+	
Ácidos orgânicos	-	
Heterosídio cianogenetico	-	
Esteroides e tripterpenos	+	
Azulenos	-	
Glicosídeos cardíacos	-	
Flavonóides	-	
Carotenoides	+	
Derivados de Benzoquinonas, Naftoquinonas e Fenantraquinonas.	-	
Sesquiterpenolactonas	-	
Purinas	-	
Alcalóides {	Dragendorff	+
	Bouchardat	-
	Mayer	-
Depsídios e depsidonas	-	
Açúcares redutores	+	
Polissacarídeos	-	
Fenóis e taninos	-	
Proteínas e Aminoácidos	-	
Derivado da cumarina	+	
Antraquinonas	-	
Catequinas	-	

Quadro 2 – Resultado da prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Alternanthera brasiliana*.

O resultado referente à presença de esteroides e triterpenóides no extrato etanólico da espécie está de acordo com outros trabalhos disponíveis na literatura (SOUZA et al. 1998; MACEDO et al. 1999; MACEDO et al. 2004; BARUA et al. 2012; FACUNDO et al. 2012). A detecção de alcaloides na espécie corrobora os

resultados obtidos em trabalhos anteriores, tal como o realizado por Barua et al (2012), no qual essa classe de metabólitos foi detectada pelo emprego de duas técnicas distintas em prospecção fitoquímica.

Além de esteroides, triterpenóides e alcaloides, foram detectados ainda saponinas, carotenoides, açúcares redutores e derivados da cumarina, classes para as quais não foram encontrados registros na literatura referentes à presença deles em derivados da espécie. Entretanto, o trabalho desenvolvido por Sanoko et al (1999) descreve o isolamento de quatro saponinas a partir de *A. repens*, sugerindo que essa classe de metabólitos seja frequente no gênero *Alternanthera*.

Alguns metabólitos descritos em trabalhos anteriores com *A. brasiliana*, tais como compostos fenólicos (flavonoides e taninos) (SOUZA et al. 1998; DELAPORTE et al. 2001; BROCHADO et al. 2001) não foram detectados nesse trabalho. Conforme revisado por Hundiwale Jogendra et al (2012), os flavonoides são metabólitos muito frequentes em *Alternanthera*, tendo sido identificado um número importante desses metabólitos no gênero.

A discordância entre os constituintes químicos citados na literatura e os detectados na prospecção fitoquímica pode estar relacionada a diversos fatores considerados influentes sobre a concentração de metabólitos secundários em plantas medicinais. Dentre eles, a sazonalidade é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade ou até mesmo a natureza dos constituintes químicos não é constante durante o ano, o que poderia explicar a diferença entre os resultados obtidos neste trabalho e os descritos na literatura. Além da sazonalidade, outros fatores exercem influência sobre a concentração de metabólitos em uma espécie vegetal, tais como ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta e nutrientes, conforme revisado por Gobbo-Neto e Lopes (2007).

5.6 Avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por CCD foram realizadas com objetivo de estabelecer o perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto (EEB) das frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e fração metanólica (FM), no intuito de contribuir para a identificação dos metabólitos presentes na droga vegetal, e gerar dados para o controle de qualidade da espécie vegetal e seus derivados, atendendo às recomendações da ANVISA descritas na RDC nº 10/2010 e RDC nº 14/2010, que tratam da notificação de drogas vegetais e do registro de fitoterápicos, respectivamente.

Foram utilizados para essa análise vários sistemas de eluentes, sendo que o melhor resultado em termos de distribuição das substâncias no cromatograma foi obtido com hexano/acetato de etila (70: 30), eluente de baixa polaridade adequada a um extrato rico em substâncias correspondentes, mais evidentes nas frações FH e FAE, conforme mostra a figura 10.

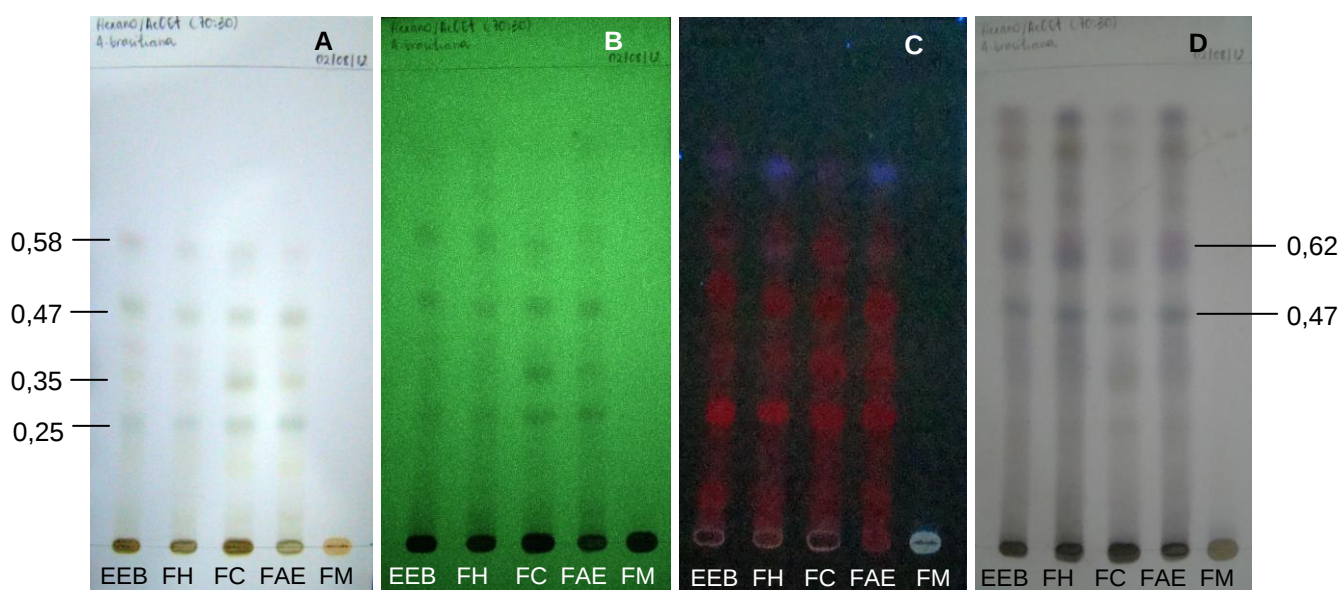


Figura 10 – Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) e das frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), fração acetato de etila (FAE) e metanólica (FM) em hexano/acetato de etila (70: 30), observado sob luz visível (A), ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm (B) e 365 nm (C), e após aspersão com anisaldeído sulfúrico (D).

Como mostra a figura 10, sob luz visível e sob luz UV de 254 e 365 nm, o EEB, as frações FH, FC, FAE apresentaram quatro bandas observadas no visível,

cujos valores de R_f são 0,25, 0,35, 0,47 e 0,58. Sob luz UV no comprimento de onda 365 nm as mesmas bandas apresentam diferentes colorações.

Após borrifar com anisaldeído sulfúrico e aquecer a 100 °C por 5- 10 minutos foi observada a presença de outras bandas de coloração vermelho violeta característico de terpenóides (WAGNER BLADT, 1995) sendo seus R_f 0,47 e 0,62, respectivamente (figura 10). A observação dessas bandas reforça o resultado da prospecção fitoquímica, referente à presença dessa classe de metabólitos na espécie.

5.7 Fracionamento do EDM por cromatografia em coluna

A concentração do extrato descrito na seção 4.2.9, em evaporador rotativo sob baixa pressão, forneceu 3 g de EDM que, submetidos à separação por cromatografia em coluna, permitiu a obtenção de 85 alíquotas de 250 mL, reunidas com base em seus perfis cromatográficos por CCD, conforme o quadro abaixo.

Amostras e respectivas frações	Frações
1	Fr. DM1
2, 3 e 4	Fr. DM2
5 a 12	Fr. DM3
13 a 16	Fr. DM4
17 a 21	Fr. DM5
22 a 24	Fr. DM6
25 a 28, 33 a 51 e 55 e 56.	Fr. DM7
29	Fr. DM8
30 a 32	Fr. DM9
52, 53 e 54	Fr. DM10
57 a 71	Fr. DM11
72 a 74	Fr. DM12
75 a 85	Fr. DM13
50	Fr. DM14

Quadro 3 – Amostras obtidas pela separação do EDM por cromatografia em coluna e frações resultantes da reunião conforme perfil cromatográfico por CCD.

A liofilização da solução hidrometanólica a 50 % obtida pelo tratamento do topo da coluna, não eluído, forneceu 0,252 g de um material denominado amostra polar (AP).

5.8 Análise da AP por EM

O espectro de íons totais (CIT) de AP mostra o pico 212,17727 (figura 11) registrado em modo positivo, mais adequado para alcaloides, pois AP mostrou reação positiva ao reagente de Dragendorff.



Figura 11 – Espectro de massa de íons totais mostrando pico majoritário de 212.17727.

A fragmentação da substância responsável pelo pico detectado no espectro de íons totais (CIT) forneceu o espectro apresentado na figura 12, no qual é possível observar um pico base com massa total 212.17993, cujas fórmulas moleculares atribuídas são $C_{11}H_{22}N_3O$ (erro de 4,2 ppm) e $C_{10}H_{22}N_5$ (erro de 7,0 ppm). São observados fragmentos com massa 196,18215; gerado pela eliminação de [O] 16 u.m.a, evidenciada a presença de oxigênio na molécula, o que exclui a outra fórmula possível o pico de massa 144,11550, gerado pela eliminação de $[C_4H_4O]$, indica a presença de anel morfolina.

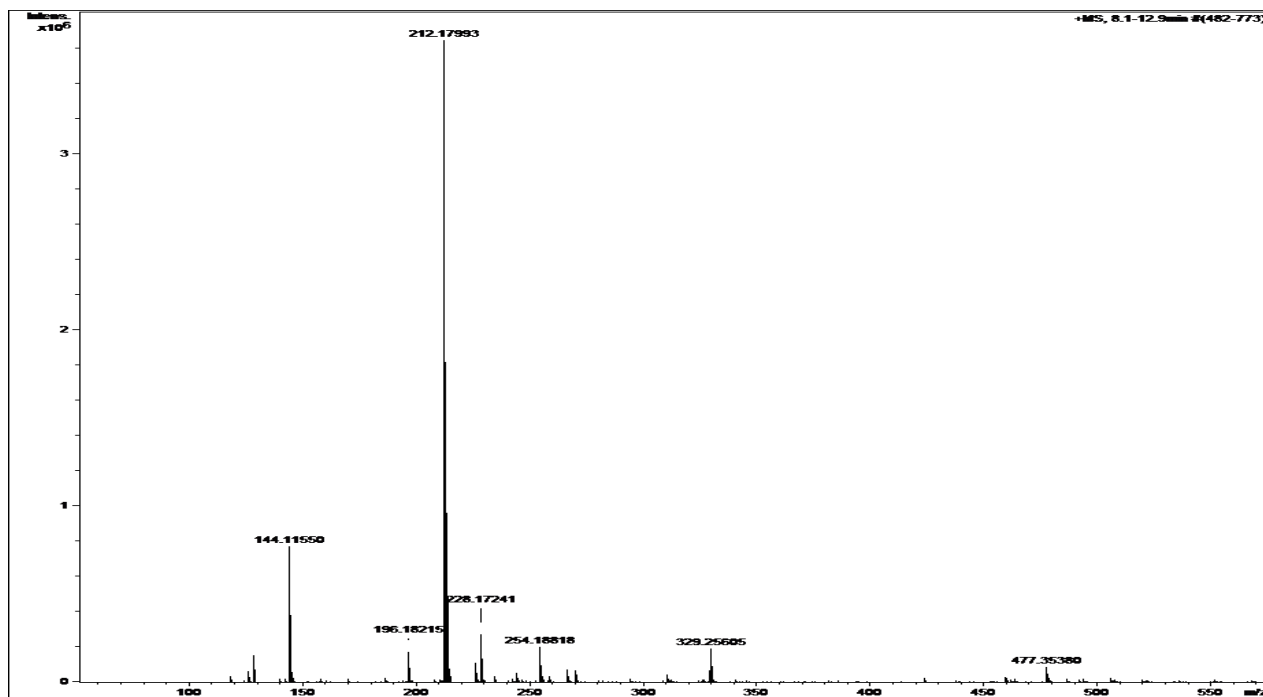


Figura 12 – Espectro de massas (modo de detecção positivo) da amostra polar obtida pela separação do EDM por short column.

5.9 Análise da AP por infravermelho (IV)

No espectro de IV apresentado na figura 13, obtido da amostra polar (AP) observa-se uma banda larga de média intensidade centralizada em 3378 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H e do C-H de carbono sp^2 e uma banda de média intensidade a 1609 cm^{-1} referente à deformação axial (ou estiramento) de N-H, que sugerem a presença dessa função.

A absorção a 1397 cm^{-1} pode estar relacionada à deformação angular de ligação C-H de grupo alquila, e a registrada a 1024 cm^{-1} (média intensidade) pode estar associada à deformação angular de C-N, indicativo de amina alifática. A absorção a 998 cm^{-1} (média intensidade) pode estar associada à deformação angular de ligação C-H de alqueno.

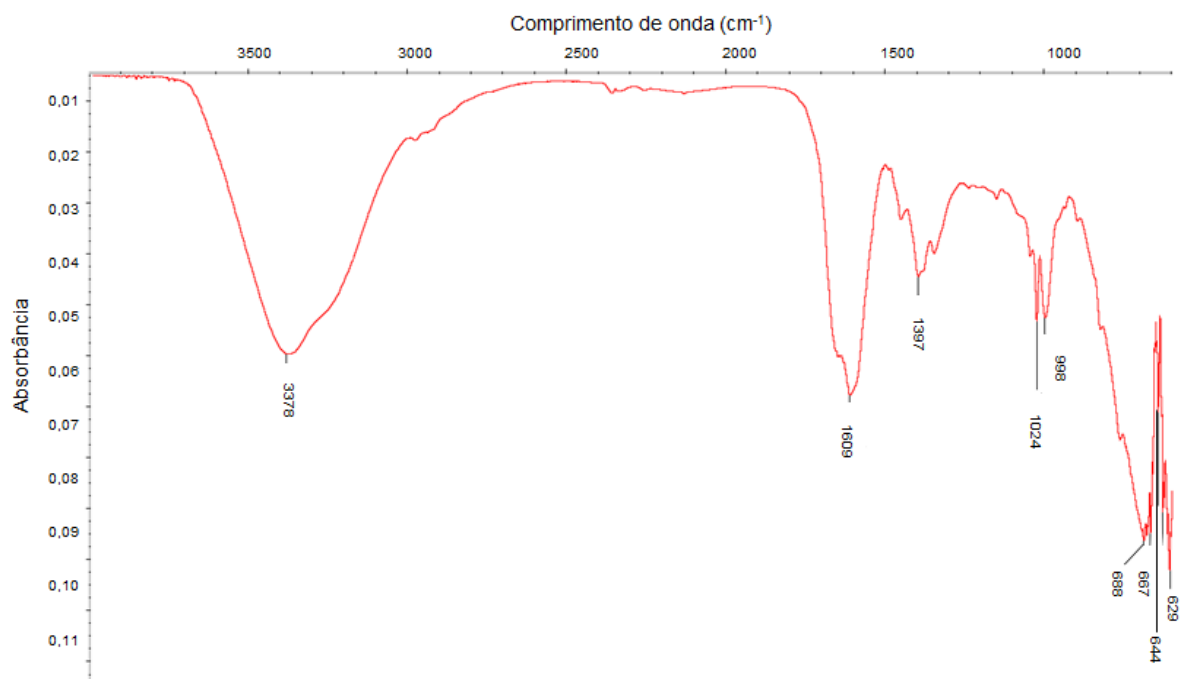


Figura 13 – Espectro da amostra polar de *A. brasiliana* por infravermelho.

5.10 Análise da AP por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C (RMN¹³C)

A análise da AP por RMN¹³C permitiu a obtenção do espectro apresentado na figura 14.

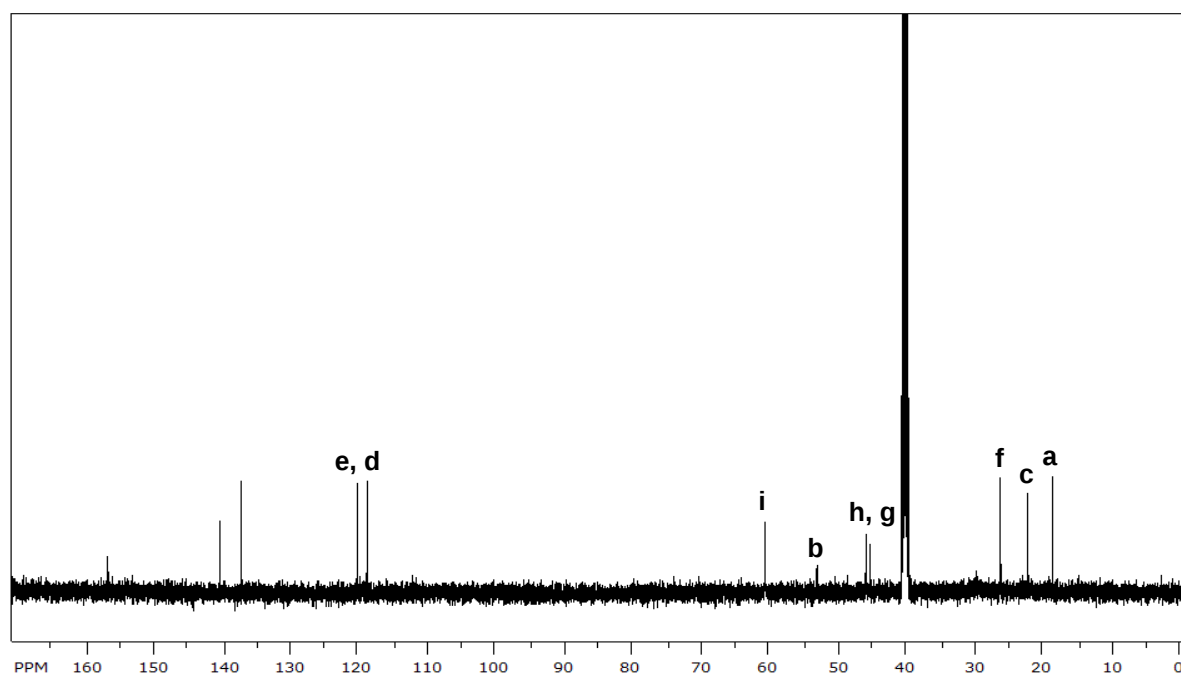


Figura 14 – Espectro da amostra polar por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C, 125 MHz.

O espectro revela sinais que sugerem a presença de carbonos alifáticos, tais como os localizados na faixa entre 15 e 30 ppm, correspondendo aos carbonos **a**, **c** e **f** da possível estrutura de AP, apresentada na figura 14. Observam-se também sinais registrados entre 40 e 60 ppm que podem estar relacionados a carbonos ligados a heteroátomos, tais como **g**, **h**, **b** e **i**. É possível observar ainda sinais entre 115 e 120 ppm que sugerem a presença de carbonos insaturados na molécula **e**, **d**. Esses resultados sugerem que a substância isolada trate-se da 1-etil-4-(4-morfolinalamina)-1, 2, 3,6-tetraidropiridina (figura 15). Já sinais entre 130 e 160 ppm sugerem carbonos insaturados ligados a heteroátomos nitrogênio e oxigênio, que podem pertencer ao isômero com a função imina envolvendo o carbono "e" e o átomo de nitrogênio adjacente.

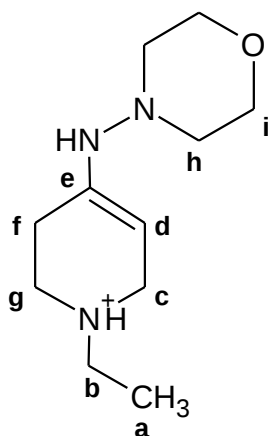


Figura 15 – Estrutura da 1-Etil-4-(4-morfolinalamina)-1, 2,3,6-tetraidropiridina, substância correspondente à amostra polar obtida de *Alternanthera brasiliana*.

Como foi sugerida, a estrutura acima pode se tratar de um alcaloide, que são compostos orgânicos heterocíclicos, que possuem um ou mais nitrogênios em sua cadeia carbônica, de origem vegetal e animal sendo utilizados na produção de fármacos naturais (CHEM SPIDER, 2012).

5.11 Análise da AP por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

A análise da AP por RMN de ^1H permitiu a obtenção do espectro apresentado na figura 16.

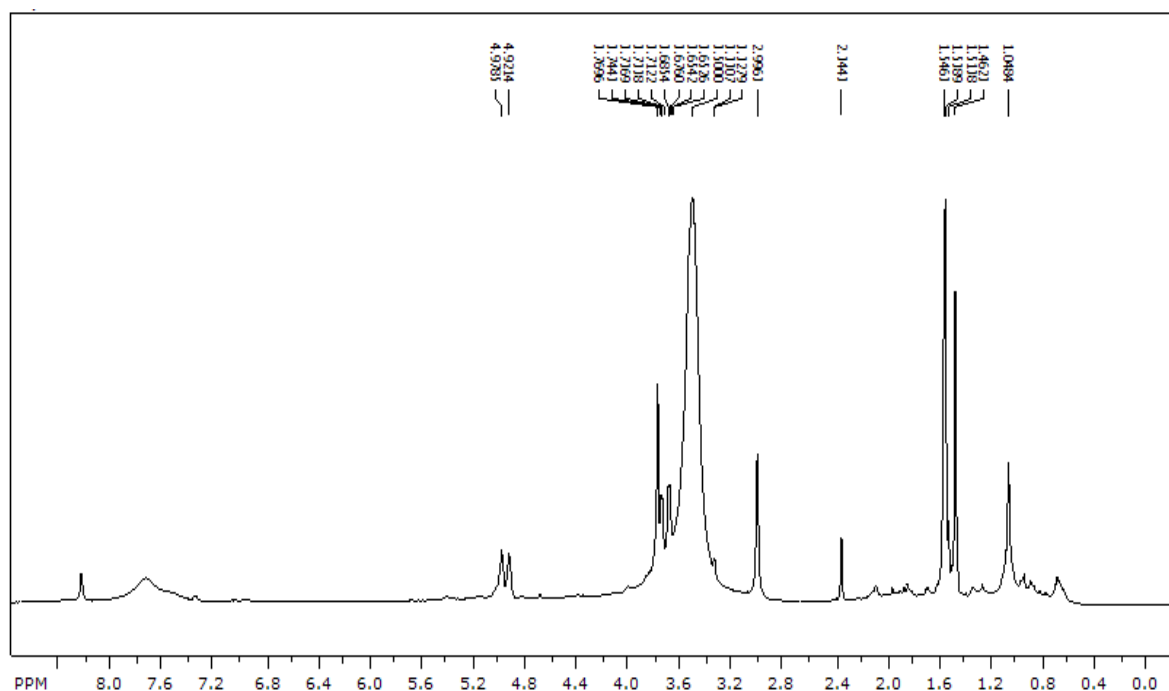


Figura 16 – Espectro da amostra polar por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , 125 MHz.

O sinal a aproximadamente 4,9 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio na posição “d”, visto que em anéis hexacíclicos nitrogenados com dupla ligação 3,4 o átomo de hidrogênio ligado a C-3 apresenta $\delta \leq 5,7$ dependendo da blindagem oferecida pela dupla ligação que, no caso da estrutura proposta, apresenta uma forma canônica com átomo de hidrogênio em “d” negativamente carregado, aumentando a blindagem e deslocando a ressonância de hidrogênio para aproximadamente 5 ppm. Esta observação reforça a proposição da estrutura acima para a substância polar (AP).

5.12 Análise da Fr. DM8 por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Massa (CG-EM).

O espectro de massa obtido pela análise da Fr. DM8 (Seção-5.6) por CG-EM é apresentado na figura 16. A comparação do espectro obtido, com aqueles registrados na biblioteca do equipamento revelou uma alta correlação (94%) do espectro da amostra com o de acetato de α -amirina, sendo observados vários fragmentos com massas coincidentes com aqueles registrados para o triterpeno citado (figura 17).

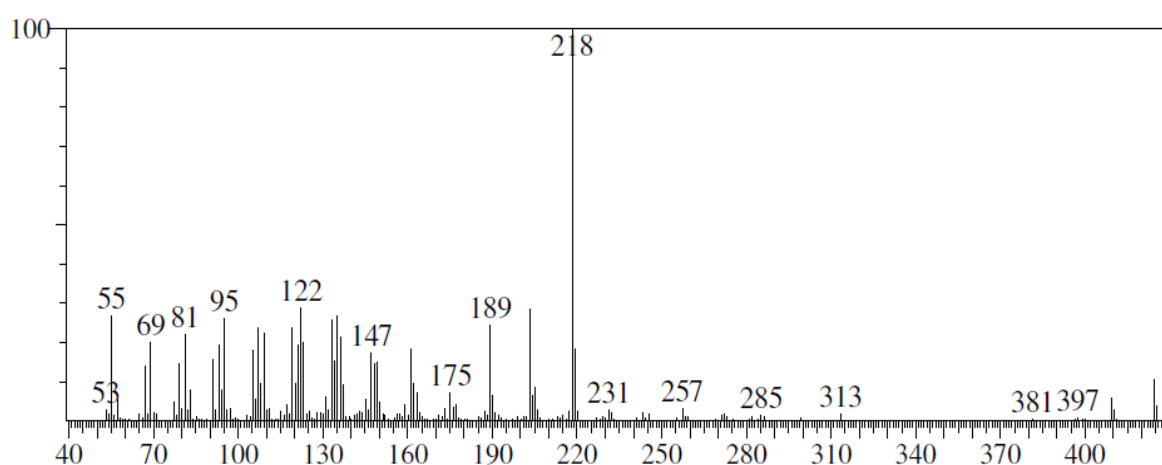


Figura 17 – Espectro obtido pela análise da Fr.DM8 por CG-EM.

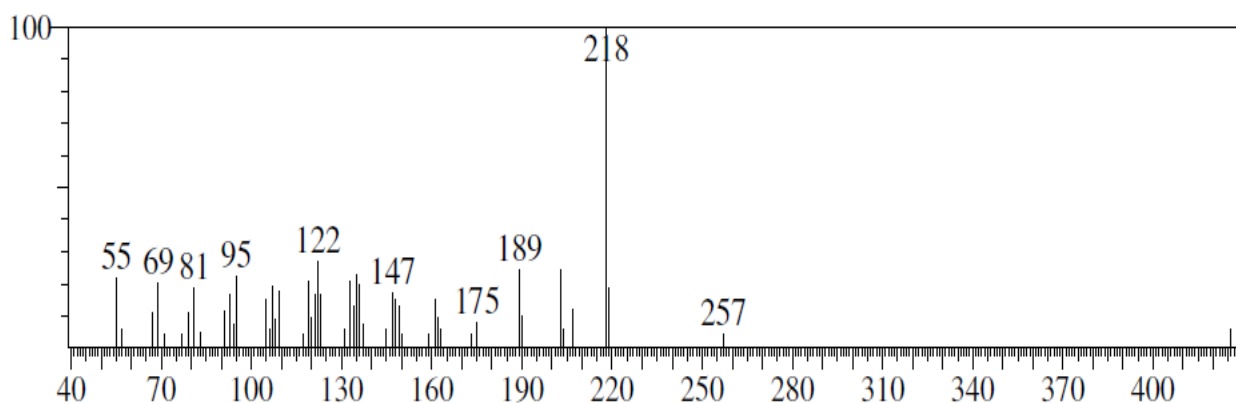


Figura 18 – Espectro do acetato de α -amirina armazenado na biblioteca do equipamento.

O alto valor de correlação entre o espectro formado pela análise de Fr. DM8 por CG-EM e o armazenado na biblioteca do equipamento, referente ao triterpeno, sugere que a Fr. DM8 se trate do acetato de α -amirina isolado, composto cuja estrutura é apresentada na figura 18.

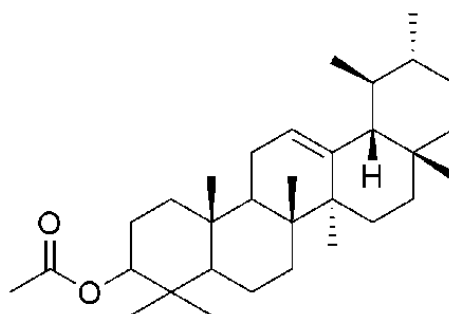


Figura 19 – Estrutura do Acetato de α -amirina.

A α -amirina demonstrou atividade anti-inflamatória nos processos inflamatórios tópicos, diminuindo a formação de edemas (OTUKI et al. 2005). Essa atividade foi também investigada por Aragão (2004), que testou uma mistura de α e β -amirina em um modelo de edema de pata induzido por carragenina e dextrano, observando, dentre outras atividades, o seu efeito antiedematogênica.

Melo (2009) avaliou em modelo experimental o efeito farmacológico de α e β -amirina na pancreatite aguda induzida por L-arginina em ratos e ceruleína em camundongos, observando que o pré-tratamento dos animais com a mistura atenuou significativamente a severidade da lesão pancreática devido à ação das substâncias como anti-inflamatório e anti-oxidante.

A identificação da α -amirina em outra espécie, *A. maritima* (SALVADOR et al. 2009) do mesmo gênero de *A. brasiliensis*, substância com reconhecida atividade anti-inflamatória, sugere que a utilização de *A. brasiliensis* na fitoterapia popular possa estar relacionada à presença desse composto.

5.13 Atividade antimicrobiana

O extrato etanólico e as frações FH, FC, e FM de *A. brasiliana* não mostraram atividade inibitória contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Cândida albicans* nas concentrações testadas, conforme mostra a figura 19.

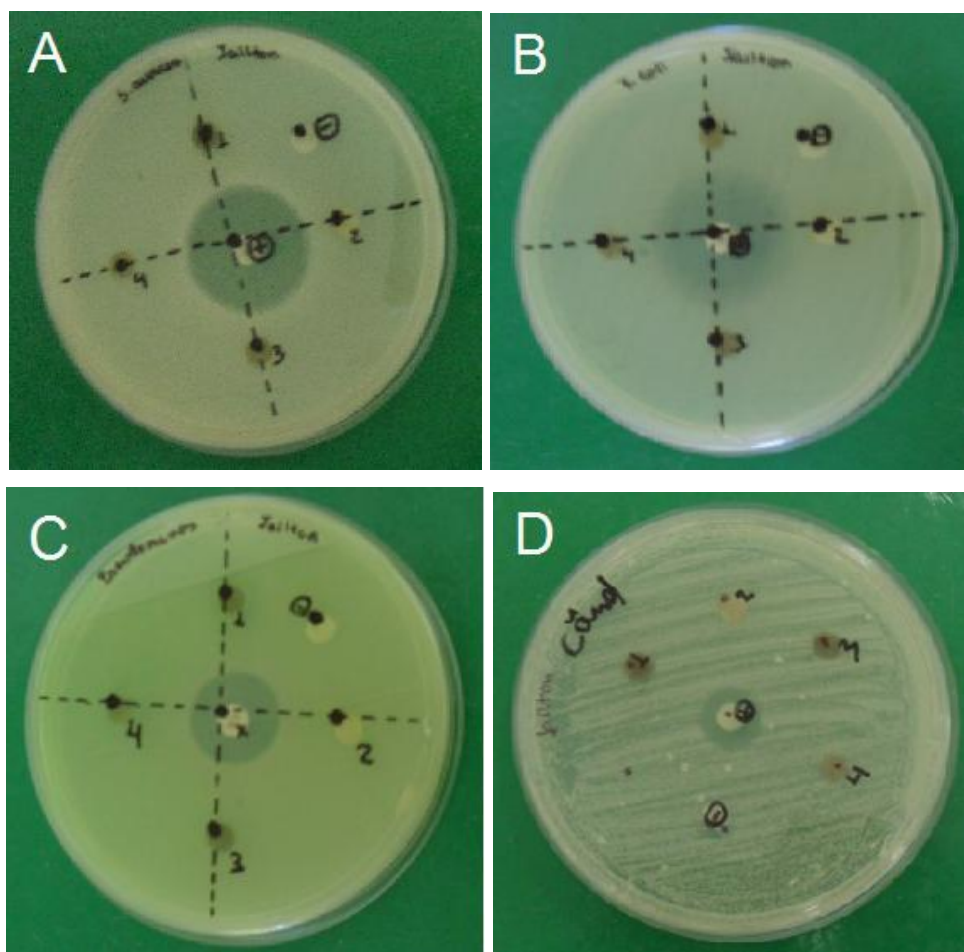


Figura 20 – Resultado da avaliação da atividade antimicrobiana do extrato (1) e suas frações hexânica (2), clorofórmica (3) e metanólica (4). A: *Staphylococcus aureus*, B: *Escherichia coli*, C: *Pseudomonas aeruginosa* e D: *Cândida albicans*.

Resultado semelhante foi encontrado por Batista (2008), que avaliando extratos etanólicos e hexânico da espécie observou ausência de inibição do crescimento dos micro-organismos testados.

Por outro lado, Caetano et al (2002) verificaram atividade do extrato hidro alcoólico liofilizado da espécie, após dissolução em água, frente a diferentes cepas

de *Staphylococcus aureus*, resultado que difere do encontrado nesse trabalho, sendo que o uso de um extrato hidro alcoólico pode ter influenciado na extração de substâncias mais polares presentes na amostra, que podem estar relacionadas a atividade antimicrobiana.

A ausência de atividade antimicrobiana observada na análise e a discordância entre os dados disponíveis na literatura indicam que o uso popular como anti-inflamatório pode ser justificado.

6 CONCLUSÃO

A análise microscópica das folhas de *A. brasiliiana* permitiu observar estruturas que são comuns no gênero *Alternanthera* e na família *Amaranthaceae*. A análise microquímica realizada revelou resultados que reforçam os observados na prospecção fitoquímica para alcalóides e indicou a presença de metabólitos não detectados na prospecção.

A análise dos resultados obtidos pela caracterização físico-química das amostras revelou valores semelhantes a outros trabalhos disponíveis na literatura, que se encontram em conformidade com a Farmacopéia Brasileira. Observou-se ainda a partir do perfil térmico do pó que as técnicas utilizadas no desenvolvimento desse trabalho foram rápidas, eficientes e capazes de avaliar com segurança a estabilidade térmica do material vegetal.

A prospecção fitoquímica revelou a presença de seis classes de metabólitos secundários, sendo três delas já descritas na literatura, e os perfis fitoquímicos por CCD das amostras analisadas mostraram bandas com diferentes valores de R_f que podem estar relacionadas aos metabólitos secundários detectados na prospecção fitoquímica.

Nas análises por EM, RMN de ^{13}C e ^1H , espectroscopia no infravermelho da amostra polar (AP), foi possível sugerir a presença de um metabólito secundário de fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}$ (erro de 4,2 ppm), podendo tratar-se de um alcaloide. Na análise por CG-EM da fração DM8 evidenciou-se a presença de um triterpeno com reconhecida atividade farmacológica, o acetato de α -amirina.

O extrato e frações de *A. brasiliiana* não mostraram atividade inibitória frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Cândida albicans* testadas, resultado esperado uma vez que não há registro na fitoterapia popular do uso dessa espécie para o tratamento de sinais e sintomas decorrentes de processos infecciosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis, 1998. 1038, p.

ALMEIDA, M. M.A.B.; LOPES, M.F.G.; NOGUEIRA, C.M.D.; MAGALHÃES, C.E.C.; MORAIS, N.M.T. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 94-97, 2002.

ALVES, M.S.M. Estudo de caracterização física, química, físico-química e de pré formulação de *Arrabidaea chica* (H&B) Verlt. **Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas**. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos) – Universidade Federal do Pará, 2008.

AMORIM, J.A. **Fitoterapia popular e saúde da comunidade: Diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba**. São Paulo, 206p. (1999). Tese Doutorado em Prática de Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1999.

ARAGÃO, G.F. **Atividade Anti-inflamatória antiagregaante plaquetaria e efeitos entrais de alfa e beta amirina isoladas de *Protium heptaphyllum* Aubl March**. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Farmacologia – Universidade Federal do Ceará, 2004.

ARAÚJO, A.A.S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina**. 225f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 2003.

BARA, M.T.F.; RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M.C.B.; AMORIM, L.L.S.; PAULA, J.R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n. 2, p. 211– 215, 2006.

BARBOSA, W. L. R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. **Revista Científica da UFPA**. Belém-Pa. 2001. Disponível em <http://www.ufpa.br/rcientifica>. v. 4, 2004. Acesso em 23 de maio de 2010.

BARUA, C. C.; TALUKDAR, A.; BEGUM, S. A.; BURAGOHAIN, B.; ROY, J. D.; PATHAK, D. C.; SARMA, D. K.; GUPTA, A. K.; BORA, R. S. Effect of *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze on healing of dermal burn wound. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, n. 1, p. 56-60, jan. 2012.

BAZZO, G.C.S.; SEGATTO, M.A.; Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC); **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v.41, n. 3, 2005.

BATISTA, H. L. Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais de Plantas do Estado do Tocantins. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Faculdade

de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, p. 42- 44, 58-152, 2008.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American J Clin Pathol.** v. 45, p. 493-96, 1966.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 48 de 16/03/2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de Março.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 971, de 03/05/2006. **Dispõe sobre a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)** no Sistema Único de Saúde.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 67 de 08 de outubro de 2007. **Dispõe sobre as Boas Práticas de Manipulação em Farmácias (BPMF).** www.anvisa.gov.br. Acesso em Junho de 2009.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa nº 5,11 de dezembro de 2008. **Dispõe sobre a “Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado”.**

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO-RDC nº 14, de 31 de março de 2010. DOU Nº 63, 5 de abril de 2010.

BROCHADO, C.O.; ALMEIDA, A.P.; BARRETO, B.P.; COSTA, L.P.; RIBEIRO, L.S.; PEREIRA, R.L.C.; GONÇALVES-KOATZ, V.L.; COSTA, S.S. Flavonol robinobiosides and rutosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 14, n. 1, p. 449-451, 2003.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p.132-135, 2002.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of bisdemethoxy curcumin. **Food Chemistry**, v. 98, p. 720-724, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A.L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: indicadores de dependencia o factores de desarrollo. **Acta Farmacêutica Bonaerense** v. 22, n. 3, p. 265-278, 2003.

CARNEIRO, E.A.; LOPES, SANDERS, A.A.; FILHO, J.J.H.; MAZZETTO, S.E.; CARIOCA, J.O.B. Síntese, caracterização e análise termogravimétrica de aditivo oriundo de fonte natural e renovável; 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2004.

CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO S.Y.; HIM, D.H.; CHANG, S.V. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology** v.181 – 182, p. 581 – 586, 2002.

CIRIO, G.M.; DONI FILHO, L.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; ZANINS, M.W. Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 67-76, jul.-dez. 2003.

CHEM SPIDER, 2012. Disponível em: file:///F:/Search%20ChemSpider.htm. Acesso em: 10 de maio de 2012.

CORRÊA, M.P 1984. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.

CORTEZ, J. C. V. Análise Termogravimétrica da Bioespuma Poliuretana do Projeto de Produto Gasolimp como Agente Cogrador de Energia; Universidade Federal da Paraíba; 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production, São Paulo, 2009.

COSTA, V.B.; COUBE, C.S.; MARINHO, B.G.; MATHEUS, M.E.; LEITÃO, S.G.; FERNANDES, S.P.D. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. **Fitoterapia**. v. 74, p. 364-371, 2003.

CUNHA, G.M.A. Atividade antimicrobiana de plantas popularmente usadas no Ceará. **Revista Brasileira Farmacognosia**. V. 76, p. 5-6, 1995.

DELAPORTE, R. H.; SÁNCHEZ, G. M.; CUÉLLAR, A. C.; MELLO, J. C. P. Control de Calidad y Actividad Antiinflamatoria de las Drogas Vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Acta Farmaceutica Boriaerense**, v. 20, n. 1, p. 39-46, 2001.

DELAPORTE, R.H.; MILANEZE, M.A.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; JACOMASSI, E. Estudo farmacognóstico das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 169-74, 2002

DELAPORTE, R.H.; GUZEN, K.P.; TAKEMURA, O.S.; MELO, J.C.P, Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fl uminensis* (Vell) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 15, n. 2, p. 133-136, 2005

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food. Science and Nutrition**. v. 40, n. 3, p.173-289, 2000.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Characters of the leaf and stem morpho-anatomy of *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze, Amaranthaceae. **Rev Bras Cien Farm**, v. 40, n. 1, p. 85-92, jan./mar., 2004.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. 2001. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo, Manole.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 1, n. 1, p. 10-15, 2003.

FACUNDO, V. A.; AZEVEDO, M. S.; RODRIGUES, R. V.; NASCIMENTO, L. F.; MILITÃO, J. S. L. T.; SILVA, G. V. J.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, abr. 2012.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina. Editora da UFSC, p. 199 – 222, 2001, 2004.

Farmacopeia Brasileira V edição. Fascículos 1 e 2, 2010.

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

FERREIRA, E.A. PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E.A.M.; SILVA, A.A.; RUFINO, R.J.N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV- *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphobia heterophylla*. Viçosa-MG. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 263-271, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. **Nomenclatura em análise térmica: Parte II**. Cerâmica, São Paulo, v. 34, p 163-164, 1988.

HUNDIWALE JOGENDRA, C.; PATIL AVINASH, V.; KULKARNI MOHAN, V.; PATIL D.A.; MALI RAVINDRA, G. A current update on phytopharmacology of the genus *Alternanthera*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 4, p. 1924-1929, 2012.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. **Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica**. Cerâmica. São Paulo, v. 26. p. 54-75, 1988.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 544, 2008.

LILA, M. A. Plant pigments and human health. In: DAVIS, S. Plant pigments and their manipulation. Oxford: CRC Press/Blackwell Publ., 2004. p. 248-274. the *Amaranthaceae*. **Trends Food Sci end Technol**, n.16, p.370-376, 2005.

MACEDO, A. F.; BARBOSA, N. C.; ESQUIBEL, M. A.; SOUZA, M. M.; CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Pharmazie**, v. 54, n.10, p. 776-777, out. 1999.

MACEDO, A. F.; LAGE, C. L.; ESQUIBEL, M. A.; SOUZA, M. M.; SILVA, K. L.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary Phytochemical and Pharmacological Studies on Plantlets of *Alternanthera brasiliana* Cultured Under Different Spectral Quality of Lights. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 515-519, 2004.

MARCHIORETTO, M.S.; AZEVEDO, F.; JOSENDE, M.V.F.; SCHNORR, D.M. Biogeografia da família *Amaranthaceae* no Rio Grande do Sul. **Botânica**, n. 59, p.171-190, 2008.

MARTINS, E.R.; CASTRO D.M.; CASTELLANI D.C.; DIAS J.E. (1994) Plantas medicinais. Viçosa: UFV, 220 p.

Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplicado". www.anvisa.gov.br. Acesso em Junho de 2009.

MELO, C.M. **Estudo do efeito farmacológico de alfa e beta amirina, uma mistura de triterpenos isolada de *Protium heptaphyllum*, na pancreatite aguda experimental**. Tese de doutorado – Programa de Pós-graduação em Farmacologia – Universidade Federal do Ceará, 2010.

MELO, J.G.; MARTINS, S.D.G.R.; AMORIM, E.L.C; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiática* (L.) Urban). **Acta bot. bras.** v. 21(1), p. 27 – 36, 2007.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon, 1950, p. 1500.

MICHILES, E. Diagnóstico situacional dos serviços de fitoterapia no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 14 (supl. 1), p. 16-19, 2004.

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

NUNES, K.M. Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calêndula officinalis* L. **Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas**. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos – Universidade Federal do Pará, 2009.

OLIVEIRA, J.E.Z.; AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D. Plantas Medicinais e aromáticas: Avanços no Melhoramento Genético. Viçosa. UFV, Departamento de Fitotecnia, 2001. 155p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. Editora Atheneu. São Paulo, 2005. 412 p.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur. J. Pharmacol.** v. 507, p. 253–259, 2005.

PINTO, L. N. **Plantas medicinais utilizadas em comunidades do município de Igarapé-Miri, Pará**: etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – PA. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Pará, 2008

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n.12, p. 522-31- 2002.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REITZ, P.R. **Amarantáceas: Flora Ilustrada Catarinense**. São Paulo: Atheneu. P.135, 1972

SALVADOR, M.J.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; TURATI, C.C; ARAÚJO, O.L.; ZUCCHI, D.; DIAS, D.A. Caracterização de esteroides e triterpenos por CG em extratos de *Alternanthera maritima* e *A. tenella* (plantas in natura e obtidas por cultura de células). **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

SILVA JÚNIOR, J.O.C. Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. (confrei). **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas**. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. São Paulo: USP-FCFRP, 2006.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica. Rio de Janeiro**: LTC, Editora. Vol 1, 7.ed., 2001

SANOKO, R.; SPERANZA, G.; PIZZA, C.; DE TOMMASI N. Triterpene saponins from *Alternanthera repens*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1043-1047, 1999.

SOUZA, M. M.; KERN, P.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 4, p. 279–281, jun. 1998.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005 apud MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. **Hoehnea**, v. 37, n. 3, p. 461-511.

VIEIRA, R.A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Revista Saúde e Ambiente**. v.(1/2), p. 57- 64. 4, p. 67-76, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. Berlin: **Springer**, p 384, 1995.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W.S.M.; FÁVERO, M.L.D.; CORRE JÚNIOR, C.; STREMEL, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira Farmacognosia**; v. 14, n.1, p. 29-39, 2004