



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA**



AMANDA DIAS DE ARAÚJO UCHÔA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE:
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE
FOLHAS DA *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE
(AMARANTHACEAE)**

Recife-PE

2014

AMANDA DIAS ARAÚJO UCHÔA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE:
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE
FOLHAS DA *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE
(AMARANTHACEAE)**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco

RECIFE-PE

2014

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso
CRB 1728

Uchôa, Amanda Dias de Araújo

Perfil fitoquímico e avaliação da bioatividade: antioxidante e antimicrobiana de extratos de folha da *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE (Amaranthaceae)/ Amanda Dias de Araújo Uchôa. – Recife: O Autor, 2014.

90 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria da Paz Carvalho da Silva

Coorientadora: Maria do Carmo Barros Pimentel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Plantas medicinais 2. Amaranthaceae I. Silva, Maria da Paz Carvalho da (orientadora) II. Pimentel, Maria do Carmo (coorientadora) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-147

AMANDA DIAS DE ARAÚJO UCHÔA

“Perfil fitoquímico e avaliação da bioatividade: antioxidante e antimicrobiana
de extratos de folhas da *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE
(Amaranthaceae)”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva
Presidente

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Prof. Dr. Roberto Afonso da Silva

Data: 27 / 02 / 2014

Dedico aos amores da minha vida: Minha mãe Francisca, meu pai Floriano, meu marido
Camilo, minhas irmãs e sobrinhos, por todo amor, incentivo e carinho!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por me dar saúde e força e por sempre atender minhas orações em busca da sabedoria, coragem e serenidade, e a Nossa Senhora por sempre interceder por mim.

Aos meus amados pais Francisca e Floriano, pelas orações, pelos seus ensinamentos, princípios éticos, exemplos de caráter, dedicação e amor.

Ao meu marido Camilo por todo amor, incentivo, orientação, companheirismo conselhos, compreensão, por sempre caminhar comigo durante esse mestrado e por não medir esforços para me auxiliar no que fosse possível durante a elaboração deste trabalho.

As minhas irmãs queridas que sempre torcem por mim, pelo carinho, por estarem sempre ao meu lado, aos meus sobrinhos que me distraem e me dão tanta alegria, a minha sogra e a toda minha família.

À minha orientadora Maria da Paz por ter sido mais que uma orientadora, uma grande amiga, pelos ensinamentos, conselhos, carinho, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pelo apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada em todas as fases para conclusão desse trabalho.

À minha co-orientadora Maria do Carmo pela amizade, ensinamentos, dedicação, prática de laboratório, pela energia desprendida para superar as adversidades, por compartilhar de sua experiência e por estar sempre disponível durante a realização deste trabalho.

Ao professor Nicácio pelo carinho, amizade, ensinamentos imprescindíveis.

Ao Sr. João pela ajuda valiosíssima e pela amizade.

À Djalma pela atenção e colaboração, sempre disposto a nos ajudar e pela amizade.

Ao Professor Oleg, que onde estiver estará torcendo por mim.

Ao Professor Pabyton, pelos conselhos valiosos, por todo o conhecimento transmitido, pela constante atenção, pelo incentivo, por compartilhar com tanta simplicidade um pouco de sua experiência, por todas as dicas e pela amizade.

Ao Dr. Roberto Afonso por todo apoio científico e solidariedade, pela colaboração imprescindível, dedicação e amizade e por estar sempre disposto a me auxiliar.

A Profa. Norma e a todos do Departamento de Antibióticos, pela forma carinhosa e hospitaleira com que me receberam.

Aos professores da banca por terem aceitado estar presente na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Aos meus amigos que mesmo na distância do dia a dia estão sempre comigo.

As “Pimentinhas” minhas amigas, parceiras e companheiras de laboratório Camila e Mikaela, pelos bons e divertidos momentos de convivência e pela ajuda durante esta jornada.

À minha querida Da Paizete (Milena), pela grande amizade, ombro amigo, companheirismo, conselhos, idas e vindas divertidas da UFPE e pelas alegrias compartilhada.

Aos amigos e colegas do mestrado que sempre faziam de nossos encontros estímulos para continuarmos a luta.

Aos meus queridos professores da UFPE, pois sempre me incentivaram a fazer uma Pós-Graduação.

Aos colegas da Biotecnologia do LIKA, por toda amizade.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial à Coordenação e aos professores da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, pelo esforço e dedicação para o sucesso do programa.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (Lika) por disponibilizar sua infraestrutura.

Ao Comitê de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e incentivaram para que eu alcançasse o tão sonhado objetivo.

Muito Obrigada!

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

RESUMO

Alternanthera brasiliana (Amaranthaceae), conhecida por “terramicina”, “penicilina” e “perpétua do mato”, é uma planta medicinal utilizada no tratamento de diversas patologias, sendo comprovadas as ações anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiproliferativa de linfócitos e inibidora do vírus do herpes simplex. O presente trabalho investigou os compostos químicos contidos no extrato das folhas de *A. brasiliana*. Carboidratos, compostos fenólicos totais e proteínas foram determinados por métodos espectrofotométricos, foi realizada SDS-PAGE para obter o perfil proteico e cromatografia em camada delgada para identificar os tipos de açúcares contidos no extrato. Foi realizado um estudo *in vitro* do seu potencial bioativo: Atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico) e atividade antimicrobiana pelo método padronizado de microdiluição em placa de 96 poços, para determinar a CMI (concentração mínima inibitória) e CMM (concentração mínima microbicida). A toxicidade letal do extrato foi avaliada pelo o ensaio CL₅₀ utilizando *Artemia salina*. Os resultados mostraram a presença de açúcares totais (1340,540 ± 0,002 µg/ml), ácidos urônicos (320,263 ± 0,001 µg/ml), compostos fenólicos totais (326,750 ± 0,005 µg/ml) e proteínas (54,149 ± 0,001 µg/ml). A cromatografia em camada delgada apresentou bandas identificando a presença de açúcares, especialmente glicose, frutose, galactose, manose, sacarose, inulina e pectina. A SDS-PAGE apresentou várias bandas proteicas entre 21 e 31 KDa, 14 e 21 KDa e abaixo de 14 KDa. Para a atividade antimicrobiana o extrato apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) – CMI: 2000 µg/ml, *Micrococcus luteus* (ATTC 2225) – CMI: 2000 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* (39-UFPEDA) – CMI: 1000 µg/ml, *Mycobacterium smegmatis* (71-UFPEDA) – CMI: 15,6 µg/ml, *Enterococcus faecalis* (ATCC6057) – CMI: 2000 µg/ml, *Candida albicans* (1007-UFPEDA) – CMI: 31,2 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* (IC, 736-UFPEDA) – CMI 2000 µg/ml, e não mostrou atividade contra os micro-organismos: *Bacillus subtilis* (16-UFPEDA), *Escherichia coli* (ATCC25922); *Serratia sp* (398-UFPEDA); *Staphylococcus aureus* (IC, 731-UFEDA) *Enterobacter aerogenes* (IC, 739-UFPEDA). A CMM foi negativa na concentração utilizada para todos micro-organismos utilizados exceto para *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71) – CMM: 1000 µg/ml. *Alternanthera brasiliana* apresentou atividade antioxidante significativa em função do tempo com porcentagem de inibição de 94,57±0.29% após 120 min, equivalentes a TEAC de 2084,66±7,07 µM Trolox. A citotoxicidade letal (CL₅₀) foi de 500 µg/ml. Os resultados mostraram que a *Alternanthera brasiliana* contém moléculas com grande potencial biotecnológico o que confirma sua atividade farmacológica servindo de base para o desenvolvimento de novas drogas com possível aplicação na prevenção e no tratamento de diversas doenças globais.

Palavras-chaves: *Alternanthera brasiliana*, Amaranthaceae, plantas medicinais, antioxidante, antimicrobiana

ABSTRACT

Alternanthera brasiliana (Amaranthaceae), is also known as "terramycin", "penicillin" and "perpetuates the bush", is a medicinal plant used in the treatment of various pathologies like anti-inflammatory action, analgesic, antimicrobial, antiproliferative activity of lymphocytes and inhibiting herpes simplex virus. The present study investigated the chemical compounds contained in the *A. brasiliana* leaf extract. Some assays were carried out to analyse carbohydrates, total phenolic compounds and proteins which were determined by spectrophotometric methods, was performed SDS-PAGE for the protein profile and thin layer chromatography to identify the types of carbohydrates contained in the extract. An *in vitro* study of their potential bioactive was performed: antioxidant activity by ABTS method (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid) and antimicrobial activity by microdilution method standard in 96-well plates to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum microbicidal concentration (MMC). The lethal toxicity of the extract was evaluated by the LC₅₀ assay using *Artemia salina*. The results showed the presence of total sugars (1340.540 ± 0.002 µg/ml), uronic acids (320.263 ± 0.001 µg/ml), total phenolic compounds (326.750 ± 0.005 µg/ml) and proteins (54.149 ± 0.0007 µg/ml). Thin layer chromatography showed bands related to the presence of sugars, especially glucose, fructose, mannose, sucrose, inulin and pectin. The SDS-PAGE showed several protein bands between 21 and 31 kDa, 14 and 21 kDa, and below 14 kDa. The extract showed antimicrobial activity against: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) – MIC: 2000 µg/ml, *Micrococcus luteus* (ATTC 2225) – MIC: 2000 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* (39-UFPEDA) – MIC: 2000 µg/ml, *Mycobacterium smegmatis* (71-UFPEDA) – MIC: 15.6 µg/ml, *Enterococcus faecalis* (ATCC6057) – MIC: 2000 µg/ml, *Candida albicans* (1007-UFPEDA) – MIC: 31,2 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* (CI, 736-UFPEDA) – MIC: 2000 µg/ml, but without activity against the microorganism: *Bacillus subtilis* (16-UFPEDA), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Serratia sp* (398-UFPEDA), *Staphylococcus aureus* (CI, 731-UFPEDA) *Enterobacter aerogenes* (CI, 739-UFPEDA). The CMM was negative at the concentration used for all microorganism except for *Mycobacterium smegmatis* (71-UFPEDA) – MMC: 1000 µg/ml. *Alternanthera brasiliana* showed significant antioxidant activity in function of time with inhibition percentage of $94.57 \pm 0.29\%$ after 120 minutes, equivalent to TEAC of 2084.66 ± 7.07 µM Trolox. The lethal cytotoxicity (LC₅₀) was 500µg/ml. The results showed that *Alternanthera brasiliana* contains molecules with great biotechnological potential which confirms their pharmacological activities as the basis for the development of new drugs with possible application in the prevention and treatment of various global diseases.

Keywords: *Alternanthera brasiliana*, Amaranthaceae, medicinal plants, antioxidant, antimicrobial

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1: <i>Alternanthera brasiliana</i>	19
Figura 2: Flor da <i>Alternanthera brasiliana</i>	19
Figura 3: (A) Mercado global de medicamentos em 2011 e sua distribuição de acordo com as diversas regiões geográficas. (B) Mercado global de medicamentos fitoterápicos em 2011 e sua distribuição de acordo com as diversas regiões geográficas.....	26
Figura 4: Classificação dos antioxidantes.....	34

CAPÍTULO 1

Chemical analysis of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae) leaf extract

Figure 1: Chromatographic spots from Thin Layer Chromatography (TLC) for monosaccharides of the <i>Alternanthera brasiliana</i> leaf extract aqueous and methanolic. Glc = glucose, Fru = fructose, Mann = mannose, Rib = ribose, aq.E = aqueous extract, meth.E = methanolic extract.....	64
Figure 2: Chromatographic spots from Thin Layer Chromatography (TLC) for disaccharides of the <i>Alternanthera brasiliana</i> leaf extract aqueous and methanolic. Lac = lactose, Malt = maltose, Suc = sucrose, aq.E = aqueous extract, meth.E = methanolic extract.....	65
Figure 3: Chromatographic spots from Thin Layer Chromatography (TLC) for polysaccharides of the <i>Alternanthera brasiliana</i> leaf extract aqueous and methanolic. Inu = inulin, Pec = pectin, CM-Cell = CM-Cellulose aq.E = aqueous extract, meth.E = methanolic extract.....	66
Figure 4: SDS-PAGE ELECTROPHORESIS of <i>Alternanthera brasiliana</i> . 1 = molecular weight standard, 2-3 = <i>Alternanthera brasiliana</i> leaf aqueous extract, 4 = standard.....	67

CAPÍTULO 2

Antimicrobial and antioxidant activities of *Alternanthera brasiliana* (l.) kuntze
(amaranthaceae) leaf

Figure 1: Lethal toxicity (LC₅₀) using *Artemia salina*..... 76

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	32
Tabela 2: Fontes endógenas e exógenas de formação de radicais livres.....	33

CAPÍTULO 1

Chemical analysis of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae) leaf extract

Table 1: Determination of carbohydrates in the aqueous extract of leaves of <i>Alternanthera brasiliana</i>	61
Table 2: Determination of Proteins of <i>Alternanthera brasiliana</i>	62

CAPÍTULO 2

Antimicrobial and antioxidant activities of *Alternanthera brasiliana* (l.) kuntze (amaranthaceae) leaf

Table 1: Antioxidant activity (ABTS ⁺) of <i>Alternanthera brasiliana</i>	74
Table 2: The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC) of <i>Alternanthera brasiliana</i> leaf a queous extract and reference drugs on twelve tested microorganisms.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

A . *brasiliiana* – *Alternanthera brasiliiana*

ABTS – 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid

AcOEt – Acetato de Etila

AN – Agar nutrient

ANTI-HSV – Anti herpes vírus simplex

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQ.E – Aqueous extract

ATCC – American Type Culture Collection

BE – Butanolic extract

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCLS – Committee for clinical laboratory standards

CI – Clinical isolates

CL₅₀ – Citotoxicidade letal

CM-cel - CM-Cellulose Carboxi Metil Celulose CMC

CMM – Concentração Mínima microbicida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DMSO – Dimetilsulfóxido

EAE – Etil Acetate Extract

FRU – Fructose

GAL – Galactose

GL – Glicose levedura

GLC – Glucose

HC – Hospital das Clinicas

HPLC – High-performance Liquid Chromatography

IC– Isolados clinicos

INU – Inulin

LAC – Lactose

LC – Lethal cytotoxicity

LIKA – Laboratório de Imunopatologia KeizoAsami

MAL- Maltose

MANN- Mannose

METH.E – Methanol extract

MIC – Minimum inhibitory concentration

MMC – Minimum microbicide concentration

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORSA – *Staphylococcus aureus* Oxacillin resistant

PAA – Ácido fosfonoacético

PEC– Pectin

RIB – Ribose

ROS – Espécies reativas de oxigênio

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SUC– Sucrose

TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TLC – Thin Layer Chromatography

UFPE –Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

Páginas

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 <i>Alternanthera brasiliana</i>	20
2.1.1 Características gerais.....	21
2.1.2 Uso popular e estudos científicos	22
2.1.3 Perfil fitoquímico.....	24
2.2 Plantas medicinais e fitoterápicos	25
2.3 Atividade antimicrobiana	30
2.4 Atividade antioxidante.....	34
2.5 Metabólitos secundários.....	37
3. OBJETIVOS	40
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
5. CAPÍTULO 1: Chemical analysis of <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze	
(Amaranthaceae) leaf extract.....	55
INTRODUCTION	57
EXPERIMENTAL SECTION.....	57
Plant material.....	57
Preparation of the extract	57
Determination of the Carbohydrates	57
Thin Layer Chromatography (TLC)	58
Determination of total phenolic compounds	58
Determination of protein in the crude aqueous extract	58
Extraction and determination of proteins in solution of protein isolated from the crude aqueous extract	58
SDS-PAGE	58
▪ RESULTS AND DISCUSSION.....	59
▪ ACKNOWLEDGEMENT.....	60
REFERENCES	61
TABLES	62

LEGENDES FIGURES.....	64
FIGURES	65
6. CAPÍTULO 2: Antimicrobial and antioxidant activities of <i>Alternanthera</i>	
<i>brasiliensis</i> (L.) Kuntze (Amaranthaceae) leaf extract.....	69
1. Introduction	71
2. Materials and methods.....	72
2.1 Plant material	72
2.2 Preparation of plant extract.....	72
2.3 Antioxidant activity of <i>Alternanthera brasiliensis</i> using	
2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS).....	72
2.4 Antimicrobial activity test.....	73
2.4.1 Microorganisms.....	73
2.4.2 Preparation of inoculum.....	73
2.4.3 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicide	
concentration (MMC) determinations.....	73
2.4.4 Standard drugs used for antimicrobial assay.....	74
2.4.5 Toxicity assay.....	74
3. Results and discussion.....	74
3.1 Results.....	75
3.2 Discussion.....	78
4. Conclusion.....	80
Acknowledgement.....	80
References.....	81
7. CONCLUSÃO.....	85
8. ANEXOS.....	86

1. INTRODUÇÃO

Alternanthera brasiliana conhecida como “terramicina”, “penicilina” e “perpétua do mato” é uma planta medicinal amplamente utilizada no tratamento de diversas patologias, sendo comprovadas a ação anti-inflamatória (DELAPORTE et al., 2001), analgésica (DE SOUZA et al., 1998) e inibidora do vírus do herpes simplex (LAGROTA et al., 1994), atividade antiproliferativa de linfócitos (BROCHADO et al., 2003), e antimicrobiana (CAETANO et al., 2002).

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (TAKAMURA, 2008). O Brasil possui uma grande diversidade vegetal, contando com aproximadamente 35 mil espécies distribuída em seus biomas (FORZZA et al., 2013), porém apenas 17% delas são exploradas para pesquisas de compostos biologicamente ativos (POLITI; PIETRO; MOREIRA, 2009; RODRIGUES et al., 2013).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais derivam diversos fármacos comercializados no mundo inteiro. O avanço ocorrido na área científica permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros, embora ainda faltem estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (VIEIRA et al., 2010).

Ainda que as plantas representem a maior diversidade em moléculas com diferentes estruturas, propriedades fisiológicas e físico-químicas que justificam o uso popular, é imprescindível conhecer a constituição química das espécies uma vez que a presença ou mesmo as concentrações dos produtos metabólicos, como metabólitos secundários, são influenciadas por vários fatores ambientais como sazonalidade, umidade, temperatura e tipo de solo entre outros (SIMÕES et al., 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Estes são derivados de processos de biotransformação de macromoléculas, como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos; os seus produtos garantem vantagens para a sobrevivência das plantas e a perpetuação das espécies (SIMÕES et al., 2004).

A utilização de produtos de origem vegetal é crescente em todo o mundo, principalmente devido aos problemas que são atribuídos aos produtos sintéticos que ocasionam danos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011). Em comprovação a isso, estudos relatam que dos 520 novos medicamentos aprovados entre 1983 e 2010; 39% eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2010). Partes da planta como raiz, caule, folha

podem fornecer substâncias ativas que serão empregadas na obtenção de um medicamento (ROSA et al., 2012).

Neste contexto, pesquisas direcionadas a investigar os compostos químicos e avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de plantas medicinais torna-se oportuno, principalmente pelo grande número de pessoas com doenças associadas com a ação de radicais livres e doenças infecciosas causadas por micro-organismos.

Segundo Lima (2006) a aceitação da medicina tradicional tem aumentado entre todos os grupos socioeconômicos, tornando a fitoterapia um setor econômico importante. Cerca de 80% da população mundial utiliza medicamentos à base de plantas (KUETE et al., 2008). Muitas comunidades rurais dependem quase exclusivamente de plantas medicinais para o tratamento de doenças, e a população urbana começa a retornar para remédios de plantas medicinais, devido aos medicamentos convencionais serem mais caros (ADAMS et al., 2007; NAILI et al., 2010; DERWICH et al., 2011; BOULANOUAR et al., 2013).

Dentre as várias moléculas bioativas com efeitos benéficos ao organismo, destacam-se os antioxidantes e os antimicrobianos.

Em maio de 2006, o Ministério da Saúde normalizou, por meio da Portaria 971 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que uma das principais medidas inseridas é a proposta para plantas medicinais e fitoterapia, podendo as unidades do SUS implementar o seu uso (BRASIL, 2006). Com uso de plantas na manipulação de fitoterápicos, o país teria muitas vantagens, como a redução da importação de medicamentos, fomentando assim, a autossuficiência e fornecendo à população um maior número de medicamentos e uma maior valorização das tradições populares.

Através do desenvolvimento da ciência e tecnologia, as plantas medicinais estão sendo valorizadas quanto ao seu potencial terapêutico, não só na área da pesquisa, mas também se tornou crescente o seu uso recomendado pelos profissionais da saúde. (CARREIRA, 2010).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Alternanthera brasiliana*

2.1.1 Características gerais

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 são encontradas no interior de florestas (SOUZA; LORENZI, 2005). Sendo amplamente distribuídas pelo mundo. (SILVA et al., 2005).

Os espécimes são de ocorrência anual e perenal, seu porte varia entre herbáceo e arbustos (SIQUEIRA, 1987).

O nome *Alternanthera* tem origem do latim e se refere aos estames e pseudoestaminódios que se alternam (*alternus* + *antera*). *Alternanthera brasiliana* popularmente conhecida como “*terramicina*”, “*penicilina*” e “perpétua do mato”, é uma planta nativa da América Tropical até o sul da ilha de Santa Catarina (DELAPORTE et al., 2002). É uma espécie herbácea perene, ereta ou rasteira, muito ramificada (SMITH et al., 1972). De acordo com Delaporte et al. (2002), sobre as características morfo-anatômicas do vegetal a espécie trata-se de uma planta com folhas simples, oval-lanceoladas, penínérveas, opostas cruzadas, membranáceas, pilosas e com diversos padrões de coloração, do verde à púrpura (Figura 1).

Figura 1: *Alternanthera brasiliana*



Fonte: Carrera, 2010.

Figura 2: Flores da *Alternanthera brasiliana*



Fonte: <http://jardimdecateia.com.br/alternanthera-brasiliana-perpetua-do-brasi>

Classificação taxonômica:

Reino - Plantae

Subreino - Tracheobionta

Super divisão - Spermatophyta

Divisão - Magnoliophyta

Class - Magnoliopsida

Subclasse - Caryophyllidae

Ordem - Caryophyllales

Família - Amaranthaceae

Gênero - *Alternanthera*

Espécies – *Alternanthera brasiliana*

2.1.2 Uso popular e estudos científicos

A medicina popular descreve o uso de plantas da família Amaranthaceae com finalidade curadora para estados febris e processos inflamatórios (SALVADOR et al., 2004; SIQUEIRA, 1987). Para o gênero, o uso popular envolve tratamento de processos infecciosos e a espécie *Alternanthera brasiliana* é amplamente utilizada em diversas patologias, tais como inflamação, processos dolorosos e infecção.

Pereira et al. (2007) em um estudo realizado nas Guianas com populações nativas e indígenas, verificaram que estes grupos usam as folhas deste vegetal como adstringente e

antidiarréico, enquanto que o macerado proveniente da planta inteira é usado contra prisão-de-ventre.

Conforme Mors et al. (2000) a infusão das folhas pode ser considerada diurética, digestiva e depurativa, sendo empregada no tratamento de doenças do fígado e da bexiga. O pigmento vermelho extraído de suas folhas é usado no tratamento de injúrias da pele (SILVA et al., 2005).

Rodrigues e De Carvalho (2001) consideram que as flores quando ingeridas sob a forma de infusão ou decocto, são consideradas béquicas, devendo ser ingeridas 3 a 4 xícaras desse chá por dia.

De acordo com Lorenzi & Matos (2001), a infusão das folhas de *A. brasiliana* apresenta efeito diurético, digestivo, depurativo, sendo empregada para moléstia do fígado e da bexiga. Já a infusão da inflorescência é considerada béquica, suas folhas são usadas como adstringentes e antidiuréticos.

De Souza et al. (1998), mostraram que o extrato hidroalcoólico obtido da planta produziu uma ação analgésica, com resposta mais potente do que aquelas obtidas pelos fármacos de uso padrão (ácido acetilsalicílico, dipirona, indometacina), sem interferir no efeito quanto à via de administração utilizada (oral ou intraperitonal). O extrato produziu efeito significativo e de longa duração (0,5 – 4h) quando avaliados para antinocicepção, com contrações abdominais induzidas por ácido acético em ratos. No teste da dor induzida por formalina, o mesmo extrato promoveu inibição da dor. A potente atividade analgésica proporcionada pelo extrato pode estar relacionada com a presença de esteróides (principalmente o β -sitosterol), terpenos e compostos fenólicos, o que confirma o uso popular de *Alternanthera brasiliana* como analgésica.

A atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico da planta, na concentração de 65 mg/ml, frente às cepas de *S. aureus* (ATCC 6538 e ATCC 9144) e *S. aureus* de isolados hospitalares (metilicina resistentes e não resistentes), foram realizados por Caetano et al. (2002), o resultado encontrado indicou uma atividade bastante semelhante ao cloridrato de tetraciclina (1 mg/mL) utilizado como padrão.

Brochado et al. (2003) relataram a ocorrência de seis flavonóides em sua composição, inéditos para o gênero *Alternanthera*. Por inibirem a proliferação linfocitária sugeriu-se que as propriedades anti-inflamatórias observadas *in vivo* poderiam ser atribuídas à ação desses flavonóides.

A atividade antiviral foi avaliada por Lagrota et al. (1994) e observou-se que o extrato aquoso das folhas de *A. brasiliiana* produziu o maior percentual de inibição (99%) frente ao vírus do herpes simplex. Esse efeito foi atribuído a diferentes mecanismos dependentes da ação da timidina quinase viral ou da DNA polimerase, o extrato aquoso da *A. brasiliiana* na concentração de 0,15%, produziu um percentual de inibição favorável de 99% da atividade anti-HSV. Neste estudo, as substâncias utilizadas como padrão para determinar a atividade anti-HSV foram: Aciclovir, ácido fosfonoacético (PAA) e 5-bromo-2, desoxiuridina (Brdurd).

Outros estudos realizados comprovaram a ação anti-inflamatória (DELAPORTE, et al., 2001). Conforme Schenkel et al. (2001) é possível que a atividade farmacológica seja decorrente da ação de mais de um componente, que podem eventualmente atuar sobre os mesmos processos bioquímicos, assim como de outras maneiras, modificando solubilidade, alterando fenômenos de absorção ou influenciando a estabilidade.

2.1.3 Perfil fitoquímico

De acordo com Delaporte et al. (2005), pôde-se constatar que o nitrogênio (3,13%) é o principal macronutriente constituinte da folha seguido do potássio (2,35%) e do cálcio (1,22%). Em relação aos micronutrientes, o manganês (0,30%) apresentou percentual maior nas folhas. Alguns elementos, tais como P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr e Pb foram detectadas por Macedo et al. (2004).

Brochado et al. (2003), isolaram seis flavonóides da *A. brasiliiana*, responsáveis pelas suas atividades farmacológicas: canferol 3-O-rubinosídeo-7-O-alfa-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo-7-alfa-L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-rutinosídeo-7-O-alfa-L-ramnopiranosídeo e canferol 3-O-rutinosídeo. Estas estruturas foram elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio.

Em um estudo realizado por Caetano et al. (2002), foi detectada a presença de terpenóides e do pigmento betacianina na sua composição. Esse pigmento extraído das folhas são da classe de betalainas e são bastante utilizados para tratar de lesões da pele, conferindo a cor vermelha (ou púrpura) para os caules e as folhas e, menos frequentemente, para flores e frutos (SILVA et al., 2005). De acordo com Khatabi et al. (2013) pigmentos da classe de betalainas possuem propriedades antioxidantes.

Estudos fitoquímicos de partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* revelaram a presença de terpenos, esteroides e compostos fenólicos, sendo o β -sitosterol o constituinte mais abundante (MENDES, 2012).

Segundo Delaporte, et al. (2001), a quantidade de compostos fenólicos presentes na planta diminuem consideravelmente nos meses de inverno e outono. Esta condição está diretamente relacionada com o metabolismo do vegetal em cada uma das estações do ano e é um critério importante para estabelecer a época melhor de coleta do material vegetal.

2.2 Plantas medicinais e fitoterápicos

O uso de plantas como recurso terapêutico vem sendo descrito ao longo da história da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas, talvez, tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). Para utilizarem as plantas como medicamentos, os povos antigos usavam de suas próprias experiências e da observação do uso das plantas pelos animais (OLIVEIRA, 2006). Diversas plantas foram utilizadas pelos indígenas como remédio para suas doenças e como veneno em suas guerras e caças (CARVALHO, 2004). A natureza foi a primeira farmácia a que o recorreu.

Entre 1880 e 1900, começaram as mudanças com o desenvolvimento do primeiro medicamento sintético, as antipirinas, seguidas pela antifebrina e pela aspirina. Após a II Guerra Mundial, as pesquisas com ervas medicinais foram deixadas de lado pelo grande avanço das formas sintéticas, sendo retomadas somente nos dias atuais (FRANCESCHINI FILHO, 2004).

No Brasil, a utilização das plantas não só como alimento, mas também como fonte terapêutica teve início desde que os primeiros habitantes chegaram ao Brasil, há cerca de 12 mil anos, dando origem aos paleonídeos amazônicos, dos quais derivaram as principais tribos indígenas do país. (CARVALHO, 2004). Ainda hoje em muitas regiões do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (CALDERON et al., 2009)

Segundo Forzza et al. (2013) o Brasil possui aproximadamente 35 mil espécies de vegetais, distribuídas nos diferentes tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata

Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010), porém apenas 17% delas são exploradas para pesquisas de compostos biologicamente ativos (POLITI; PIETRO; MOREIRA, 2009; RODRIGUES et al., 2013).

Essa grande biodiversidade da flora brasileira com potencial terapêutico leva a um significativo consumo de fitoterápicos e preparações extraídas de plantas que através do conhecimento tradicional e tecnológico podem ser validadas cientificamente. Este imenso patrimônio genético encontrado no Brasil tem, na atualidade, um valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades (BRASIL, 2006), mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade, uma vez que existem inúmeros medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais.

Em 1975 o Conselho Nacional de Saúde já valorizava à importância da medicina popular: *“A denominada “medicina popular” é constituída por práticas paralelas à “medicina oficial” dominante. Quem faz esta distinção é o sistema oficial de saúde, constatando sua existência e crescimento, a despeito de todo o avanço científico e tecnológico atual que tem o respaldo do saber científico e do sistema de produção (V CNS, 1975)”*. Desta forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante também às populações dos países em desenvolvimento, devido ao seu custo diminuído (SANTOS et al., 2012).

Há uma demanda crescente por produtos de origem vegetal. Muitas comunidades rurais dependem quase exclusivamente de plantas medicinais para o tratamento de doenças, e a população urbana começa a retornar para remédios de plantas medicinais, devido aos medicamentos convencionais serem mais caros (ADAMS et al., 2007; DERWICH et al., 2011; NAILI et al., 2010; BOULANOUAR et al., 2013).

Inicialmente, estes medicamentos à base de plantas eram utilizados na forma de infusão (chá), pó ou decocto, ou ainda, através da via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo para unguentos e cataplasmas (VIEIRA et al., 2010).

Conforme a Resolução da Diretoria Colegiada. RDC nº 14, de 31 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, fitoterápicos são aqueles medicamentos preparados a partir de plantas ou partes de plantas medicinais que possuem propriedades reconhecidas de cura, diagnóstico, prevenção ou tratamento sintomático de

doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase três.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), as plantas medicinais são plantas capazes de tratar ou curar doenças. Estas plantas têm tradição, pois são usadas como remédio em uma população ou comunidade. Uma das grandes preocupações com o uso de plantas medicinais como forma de tratamento ou cura é o seu uso indiscriminado e sem comprovação científica.

Conforme Vieira et al. (2010) o aumento do consumo de plantas medicinais nas últimas décadas foi devido a muitas pessoas acreditarem que esses produtos seriam “naturais”, ou seja, não apresentariam “produtos químicos” passando a ser sinônimos de produtos saudáveis, seguros e benéficos à saúde. Por ser uma prática comum na sociedade e até mesmo pela falta de medicamentos sintéticos (FERREIRA; PINTO, 2010). Grande parte das interpretações distorcidas sobre os efeitos deste tipo de medicamentos ocorre devido à difusão de informações errôneas por parte da população e, além disso, sem qualquer controle na maioria dos países.

O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto, ou seja, para cada parte a ser usada, para cada grupo de princípio ativo a ser extraído e para cada doença a ser tratada, existe forma de preparo e uso adequados (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005). Partes da planta como raiz, caule, folha podem fornecer substâncias ativas que serão empregadas na obtenção de um medicamento (ROSA et al., 2012).

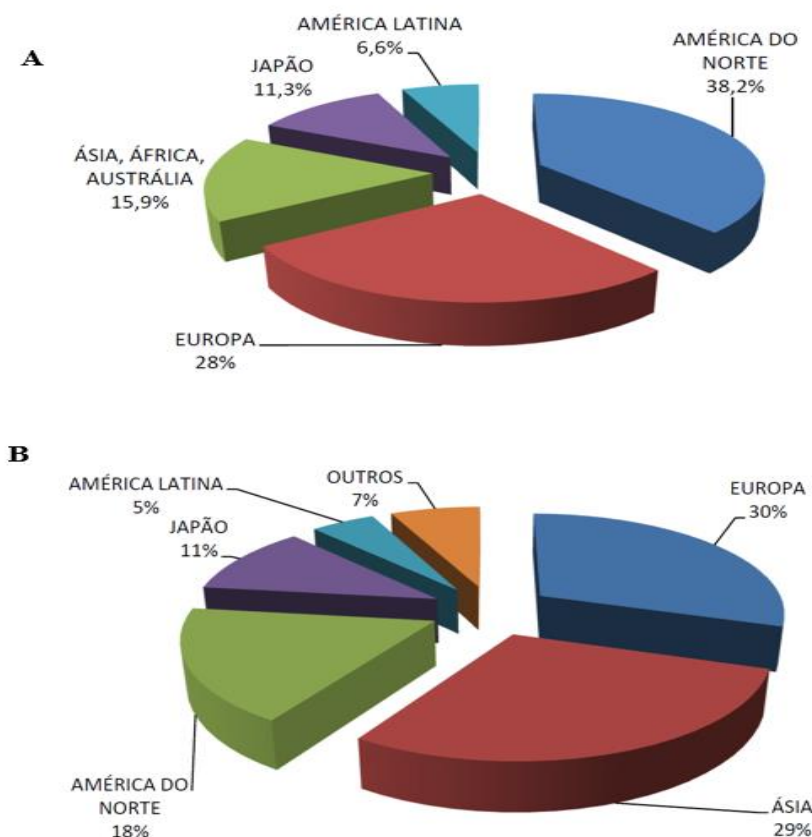
Segundo Oliveira et al. (2006), os fitoterápicos são também uma oportunidade de obtenção de medicamentos mais barato em países em desenvolvimento, onde a maior parte da população não tem acesso à medicamentos sintéticos por seu alto custo. Muitas vezes esses medicamentos são rotulados e aparecem na mídia com promessa de cura (VEIGA JÚNIOR et al., 2005), o que não está correto, pois primeiro são necessários estudos botânicos, farmacológicos, toxicológicos que comprovem a eficácia de determinada substância, para sua comercialização (OLIVEIRA, 2007).

Segundo informações da ANVISA todos os medicamentos a base de vegetais assim como qualquer outro medicamento podem causar reações desagradáveis e até mesmo problemas mais sérios de saúde, deve-se ter uma atenção especial com crianças, idosos e gestantes. (VEIGA JÚNIOR, 2008).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse no aproveitamento de fontes naturais, principalmente no que se refere às plantas para o uso farmacêutico, sendo que, na última década houve um significativo crescimento no uso de medicamentos fitoterápicos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Segundo Alves et al. (2013), em 2011, o mercado global de medicamentos (sintéticos e naturais) alcançou a cifra de U\$ 800 bilhões. Este valor, é claro, variou de acordo com as condições econômicas e sociais da cada região do globo (figura 3 A), enquanto o mercado para os fitoterápicos atingiu o patamar de U\$ 26 bilhões, com uma desigualdade regional semelhante (figura 3 B).

Figura 3: (A) Mercado global de medicamentos em 2011 e sua distribuição de acordo com as diversas regiões geográficas. (B) Mercado global de medicamentos fitoterápicos em 2011 e sua distribuição de acordo com as diversas regiões geográficas.



Fonte: Alves, 2013.

Os principais passos para a utilização de um composto bioativo a partir de recursos vegetais são: a extração, a triagem farmacológica, o isolamento e caracterização de compostos bioativos, a avaliação toxicológica e a avaliação clínica. Esta última é essencial para garantir a eficácia de um composto bioativo, podendo fornecer também, sua farmacocinética, biodisponibilidade, segurança e interações medicamentosas (SASIDHARAN et al., 2011).

No período de 1941 a 2002, dos 90 fármacos analisados no *Annual Report of Medicinal Chemistry*, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e 9 eram oriundos de produtos naturais (SILVEIRA et al., 2009). O avanço ocorrido na área científica permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros, embora ainda faltem estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (VIEIRA et al., 2010).

Através do Decreto Presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, o Governo Federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais, onde as ações decorrentes desta política são manifestadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF e uma de suas propostas é inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade, em conformidade com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. (BRASIL, 2006).

Esses medicamentos devem ser extraídos de espécies cultivadas no Brasil não ameaçadas de extinção seguindo a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de que os países devem usar os recursos naturais disponíveis no próprio território para promover a atenção primária à saúde e contribuir para o uso sustentável da biodiversidade nacional (BRASIL, 2011).

Um levantamento bibliográfico cobrindo apenas os primeiros meses de 2012 e considerando apenas o mecanismo de ação dos princípios ativos envolvidos, mostra a eficácia das plantas medicinais no tratamento da doença de Alzheimer (MAHDY et al., 2012; ORHAN et al., 2012), de doenças cardíacas (LANG et al., 2012; XING et al., 2012), malária (SISODIA, et al., 2012; MBEUNKUI et al., 2012), leishmania (HAZRA et al., 2012), esquistossomose (OLIVEIRA et al., 2012), câncer (MALHOTRA et al., 2012; PARK et al., 2012), herpes (ASTANI et al., 2012), artrite (LI et al., 2012), como antibiótico (MULAUDZI et al., 2012), anti-inflamatório (NIU et al., 2012), antiúlcera (SILVA et al., 2012; FREITAS

et al., 2011), antioxidante (Konrath et al., 2012), antinociceptivo (LIMA et al., 2012), antidiabético (SOUZA et al., 2012; LIMA et al., 2012) e antidiurético (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2012).

2.3 Atividade antimicrobiana

Agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados desde o século XVII para o tratamento de doenças infecciosas. Os antibióticos são produtos metabólicos naturais de fungos, actinobactérias e bactérias capazes de impedirem o crescimento, ou de destruírem micro-organismos (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2010).

A busca por novos agentes antimicrobianos a partir de plantas superiores tem sido de grande interesse nas últimas décadas. O “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” métodos para a avaliação de compostos antimicrobianos são amplamente aceitos pelos órgãos reguladores em todo o mundo (DAS et al., 2010).

Desde a origem dos antibióticos na década de 1950, o número de agentes antimicrobianos derivados de plantas tem sido insuficiente. A utilização de extratos vegetais, bem como outras formas alternativas de tratamento médico, vem demonstrando grande popularidade desde a década de 1990. Bactérias multirresistentes são um emergente e conhecido problema mundial de saúde (VONBERG et al., 2008). As indústrias se concentram em programas de triagem a fim de identificar novos Princípios ativos a partir de fontes naturais (KUMAR et al., 2010).

De acordo com Guimarães et al. (2010) os antimicrobianos podem ser naturais ou sintéticos e podem agir tanto inibindo o crescimento, sendo chamado de bacteriostático ou, causando a morte da bactéria, sendo classificado como bactericida.

Um agente antimicrobiano ideal exhibe toxicidade seletiva, e isto implica que uma substância deve ser eficiente contra a bactéria alvo, porém seguro quanto à toxicidade ao paciente (BROOKS et al., 2008; SOFIATI, 2009).

Conforme Haida et al. (2007), as plantas constituem-se importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, servindo para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de fármacos.

A pesquisa com Briófitas até Angiospermas e suas diversas atividades farmacológicas têm se tornado uma alternativa promissora no combate às infecções causadas por bactérias e

fungos (MORANTES et al., 2007; PERES et al., 2009; LEE et al., 2008; SANTOS et al., 2010; MORAIS-BRAGA et al., 2013).

As doenças infecciosas ainda são uma das principais causas de morte no mundo, sendo de significativa importância o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. Nesse contexto as plantas podem ser uma boa fonte para direcionar a busca por compostos promissores (BERTUCCI et al., 2009). Estas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos cardiotônicos, terpenos que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (SIMÕES et al. 2004).

As plantas com maior atividade antimicrobiana são aquelas ricas em polifenóis, flavonóides e taninos (DOUGHARI; EL-MAHMOOD; TYOUNA, 2008; RODRIGUES et al., 2011), terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, e cumarinas (RESCHKE; MARQUES, 2007; HAIDA et al., 2007).

A determinação do composto biologicamente ativo a partir de um material vegetal é dependente do tipo de solvente usado no processo de extração (DAS et al., 2010). Na extração de compostos hidrofílicos, por exemplo, são usados solventes polares tais como metanol, etanol ou acetato de etila. Já para compostos mais lipofílicos, são usados diclorometano ou uma mistura de diclorometano/metanol na proporção de 1:1 (SASIDHARAN et al., 2011).

Segundo Das et al. (2010), um bom solvente utilizado na extração de planta deve possuir propriedades como: baixa toxicidade, facilidade de evaporação a baixa temperatura, absorção fisiológica rápida do extrato, ação conservante. Além disso, o solvente não deve interferir no bioensaio.

De acordo com González-Lamothe et al. (2009), os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção.

O estudo de agentes antimicrobianos de origem vegetal inicia com uma avaliação biológica completa dos extratos para garantir a eficácia e segurança, seguido pela

identificação de princípios ativos, formulações de dosagem e perfil farmacocinético do novo fármaco (DAS et al., 2010).

De acordo com Silva Jr. et al. (2009), o aumento de estudos de atividade antimicrobiana com plantas inclui diminuição de novas substâncias antimicrobianas sintéticas, além de muitas serem potencialmente tóxicas e apresentarem efeitos colaterais no paciente

Devido ao aumento alarmante na incidência de novas doenças infecciosas e resistência aos fármacos atuais, existe uma grande necessidade em descobrir novos compostos químicos com atividade antimicrobiana e, possivelmente, com novos mecanismos de ação (ADWAN et al., 2010).

A resistência aos antimicrobianos é um problema sério em todo o mundo, sendo de fundamental importância a pesquisa por novos agentes antimicrobianos. (PADILHA et al., 2010; MIRANDA et al., 2013).

O grande aumento em infecções hospitalares, causada por bactérias resistentes ou multirresistentes é um dos maiores problemas de saúde pública (FONTANAY et al., 2008). Especialmente na última década, o grau de resistência aos antibióticos comuns é cada vez mais crescente em todo o mundo (TANG et al., 2011). Incluindo o Brasil, principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs) (PUEYOA et al., 2011).

De acordo com Furtado et al. (2008), uma das principais causas de resistência antimicrobiana é a grande exposição aos fármacos antimicrobianos, dentre outros, através da prática da automedicação.

O mecanismo de ação da maioria dos antimicrobianos não está totalmente esclarecido, mas, podem ser divididos em 4 categorias: (I) inibição da síntese da parede celular; (II) inibição da função da membrana celular; (III) inibição da síntese de proteínas; (IV) inibição da síntese de ácidos nucleicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003; BLACK, 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN et al., 2010).

As bactérias também podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (JACOBY, 2005; MIN et al., 2007). Os mecanismos incluem: modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas; alteração do sítio de ligação do antibiótico; substituição do sítio de ligação do fármaco; diminuição da permeabilidade ao antibiótico; aumento da síntese de substrato com o qual o fármaco compete; síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

Os fatores que contribuem para a ocorrência e persistência da resistência bacteriana são: o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos (CRISAN et al., 1995; VARGAS et al., 2004), a utilização de antibióticos para o tratamento e prevenção de infecções em animais e no controle de infecção bacteriana em frutas e legumes que aumentam a transmissão de organismos multirresistentes para seres humanos (COHEN, 1992; HOEFEL et al., 2006).

A resistência aos antimicrobianos é um processo genético relacionado à existência de genes no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos e evitam a ação dos medicamentos. Ela pode ter origem em mutações que ocorrem no micro-organismo durante seu processo reprodutivo ou através do intercâmbio de material genético (transferência horizontal gênica – THG) através da conjugação, transdução e transformação (TAVARES, 2000; UETANABARO; GÓES-NETO, 2006).

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos e, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais (NASCIMENTO et al., 2000; HAIDA et al., 2007).

A busca de novos agentes antimicrobianos é importante, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, tornado ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (TRIAS and GORDON, 1997; LABARCA, 2002; ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010).

Através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 44, de 26 de outubro de 2010 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ratifica e estabelece os critérios, de forma mais rigorosas, para a embalagem, rotulagem, liberação e controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. A liberação destes medicamentos contendo as substâncias antimicrobianas fica sujeita à retenção de receita e escrituração em farmácias e drogarias, nos termos desta resolução (BRASIL, 2010).

2.4 Atividade antioxidante

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato (NIKI, 2010).

Naturalmente, alguns antioxidantes são produzidos pelo corpo humano e outros podem ser adquiridos pelo consumo de alimentos (ARAÚJO, 2004). Os radicais livres são espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, devido a isto eles são altamente instáveis e causam danos a outras moléculas através da captação de elétrons, a fim de alcançar a estabilidade. Células vivas geram espécies reativas de oxigênio (ROS), como resultado das alterações fisiológicas e processos bioquímicos (DEEPA et al., 2012).

Segundo Sun et al. (2011), a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reações que levam a produção de radicais livres podem levar ao estresse oxidativo celular, podendo causar doenças degenerativas ou patologias.

Radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e o radical peroxila ($ROO^\cdot$) são particularmente reativos e conhecidos por serem produtos biológicos na redução molecular do oxigênio (BIGLARI; ALKARKHI; EASA, 2008). Há grandes evidências que mostram a participação destes radicais livres em uma variedade de doenças, Podendo causar danos às biomoléculas celulares tais como o ácido nucléico, as proteínas, os lipídios e os carboidratos, e conseqüentemente podem adversamente afetar funções imunes (PRAKASH et al., 2007).

O estresse oxidativo induzido por radicais livres é considerado um fator primário nas doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (MARKESBERY; LOVELL, 2006; GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012), câncer (BIANCHI; ANTUNES, 1999, BARNETT et al., 2006), doenças cardiovasculares como a aterosclerose (VOKURKOVA et al., 2007; BHATTACHARYA et al., 2011), sendo também a causa principal da morte celular e lesões tecidulares resultantes de enfartes do miocárdio (IDE et al., 2001), processos inflamatórios e envelhecimento (WANG et al., 2007). Mais recentemente, foi demonstrado que o estresse oxidativo também pode ser a causa da diabetes tipo II (DOGRU et al., 2012).

Tabela 1. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

ROS	Nomeclatura
O_2^-	Radical superóxido
OH^-	Radical hidroxila
NO	Óxido nítrico
$ONOO^-$	Peroxinitrito
Q	Radical semiquinona
O_2	Oxigênio singlete

Fonte: Moreira, 2013 – modificado

O aumento do nível de ROS pode danificar a estrutura das biomoléculas e modificar suas funções; levar à disfunção celular e até mesmo a morte celular. A nossa rica flora e fauna levou a formação de seres vivos capazes de produzir variadas moléculas com ação antioxidante, e essas substâncias naturais podem ser uma importante estratégia para o combate de várias enfermidades (MISHRA et al., 2012).

A formação de radicais livres pode ser ocasionada por fatores endógenos e exógenos, alguns exemplos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Fontes endógenas e exógenas de formação de radicais livres

Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbica	Ozônio
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta
	Cigarro

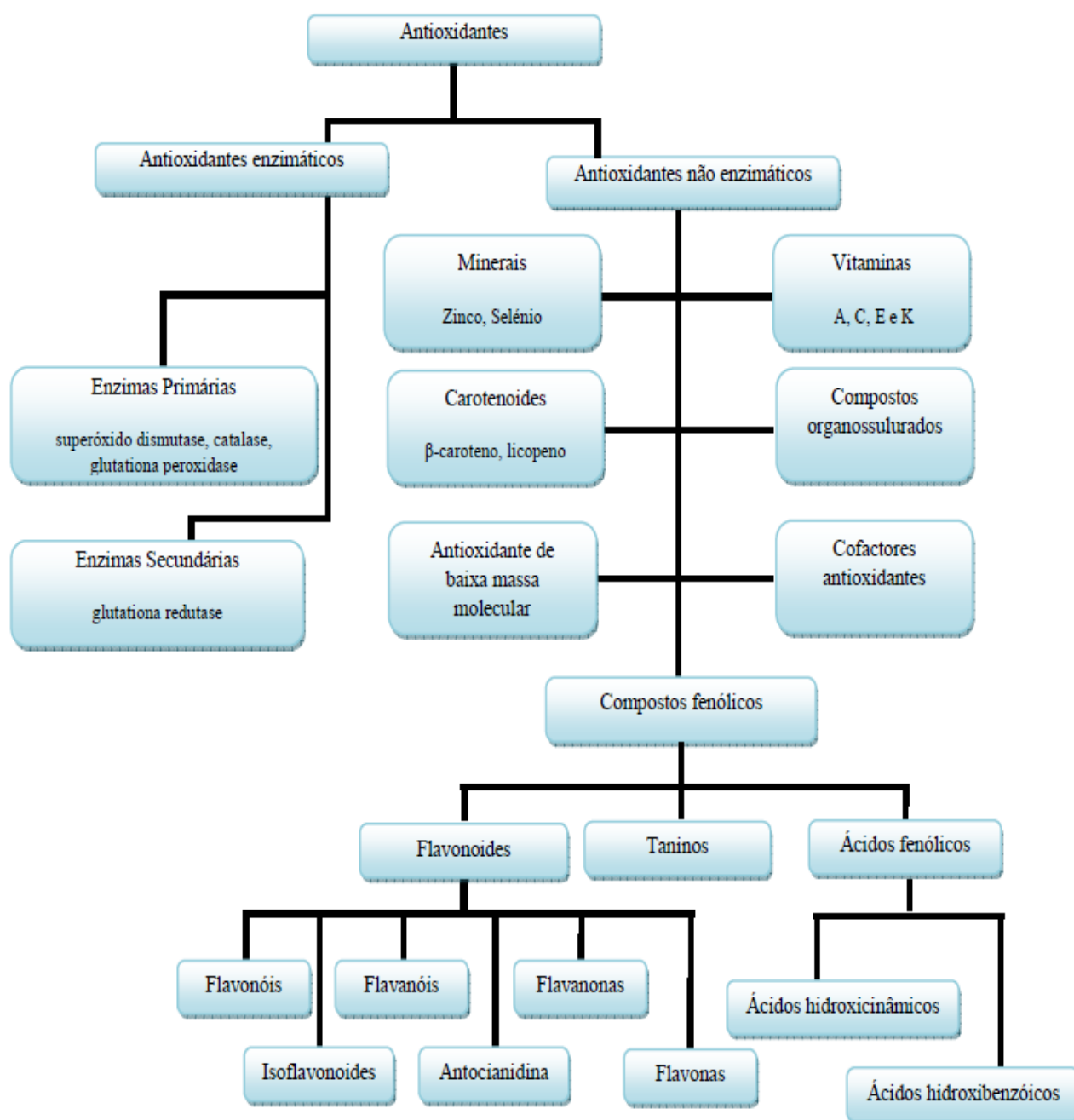
Fonte: Moreira, 2013.

Existem duas categorias de compostos antioxidantes, os de origem natural e os designados sintéticos (CHEUNG et al., 2003).

Os antioxidantes naturais dividem-se em dois grandes grupos, os enzimáticos e os não enzimáticos (Figura 4). Os antioxidantes enzimáticos incluem as principais enzimas

antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C, compostos fenólicos hidrossolúveis e compostos lipossolúveis (vitamina E e carotenoides) (NDHLALA et al., 2010).

Figura 4. Classificação dos antioxidantes



Fonte: Ratnam, 2006

De acordo com Sun et al. (2011), atualmente existem disponíveis muitos antioxidantes sintéticos tais como butilhidroxianisol e butil-hidroxitolueno, entretanto, estes podem se acumular no corpo resultando em lesão hepática e carcinogênese. Por esta razão, como um esforço para proteção do ser humano aos radicais livres e retardamento do progresso de muitas doenças crônicas tem se dado grande atenção aos antioxidantes naturais.

Antioxidantes mais naturais são obtidas a partir de recursos vegetais incluindo ervas aromáticas, especiarias, frutas, legumes, oleaginosas e produtos (SHAHIDI; ZHONG, 2010). Alguns estudos mostraram que a ingestão de frutas e verduras reduz a taxa de doenças cardíacas, câncer, e outras doenças degenerativas, e que este fato pode está atribuído a presença de antioxidantes naturais nestes alimentos. As plantas também são capazes de combater esses radicais livres (MOTAMED; NAGHIBI, 2010).

De acordo com Niki et al. (2010) as evidências que implicam o estresse oxidativo no desenvolvimento de diversas doenças e desequilíbrios conduzem ao reconhecimento do papel dos antioxidantes na preservação da saúde humana e na prevenção e ajuda no tratamento de doenças.

A atividade dos antioxidantes é de extrema importância, uma vez que o seu papel na preservação da saúde humana, na prevenção e no tratamento de doenças tem sido evidenciado. Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a eficácia antioxidante. As suas vantagens e desvantagens têm sido discutidas em termos de simplicidade, instrumentação necessária, mecanismos, método de quantificação e relevância biológica (NIKI, 2010).

2.5 Metabólitos secundário

A utilização de produtos de origem vegetal é crescente em todo o mundo, principalmente devido aos problemas que são atribuídos aos produtos sintéticos que ocasionam danos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011).

Os compostos resultantes de reações químicas celulares são denominados metabólitos, sendo divididos em primários, os quais são fundamentais na matéria-viva, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do organismo (DEMAIN, 2000; DEWICK, 2002) e, secundários, aqueles que não são necessários às funções básicas

intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação organismo e ambiente, podendo ser interpretados como a interface química entre o organismo e os outros seres vivos (BRIZUELA et al., 1998; KUTCHAN, 2001).

Os metabólitos secundários já foram considerados produtos de excreção vegetal. Entretanto, sabe-se que essas substâncias são responsáveis pela adaptação ao meio.

Os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, na maioria das vezes apresentam atividades biológicas. Muitos destes compostos são de importância na área farmacêutica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (SANTOS, 2003; OKUNADE; ELVIN-LEWIS; LEWIS, 2004; HAIDA et al., 2007). São de grande importância também nas seguintes áreas: alimentar, agrônômica e cosmética (GAMBETA, 2008).

Atualmente, há um interesse pelas plantas medicinais, devido à grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficácia de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos produtos alopáticos e a busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo humano, principalmente no atendimento primário à saúde (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005; HARVEY, 2008).

De acordo com Cowan. (1999), as vias metabólicas vegetais dão origem a diversas classes de compostos, tais como, alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides entre outros, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, cujas funções, até pouco tempo eram desconhecidas.

Na maioria dos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa do vegetal contra predação por micro-organismos, insetos, e herbívoros. Algumas substâncias fornecem odor para a planta, outros (quinonas e taninos) são responsáveis pelo pigmento e muitos compostos são responsáveis pelo sabor da planta (COWAN, 1999).

Segundo Stringheta et al. (2004), os compostos bioativos são identificados como sendo compostos envolvidos no metabolismo secundário de plantas, sendo desta forma restrita a determinados grupos de vegetais. Esses compostos estão relacionados com suas propriedades funcionais, e, portanto, possuem características benéficas à saúde.

Devido a popularidade dos medicamentos fitoterápicos, a busca por esses compostos bioativos tem ganhado mais reconhecimento (DINIZ; ASTARITA; SANTAREM, 2007).

Entre os compostos bioativos oriundos do metabolismo secundário podemos citar: O grupo dos compostos fenólicos que inclui os ácidos fenólicos (constituídos pelos ácidos

hidroxibenzóicos (por ex. ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (por ex. Ácido cafeico), estilbenos (resveratrol), flavonoides (quercetina, cianidina e catequina) e compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas e taninos) (SILVA et al., 2007).

Os flavonoides são os responsáveis pelas cores de plantas e frutos, contribuindo para a qualidade sensorial dos alimentos e bebidas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Os flavonoides são constituídos por um número alargado de famílias de compostos como os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (RATNAM et al., 2006). Estes compostos estão mesmo entre as moléculas com maior atividade antioxidante (ROBARDS et al., 1999).

A posição do grupo OH na estrutura da molécula é crucial para as propriedades antioxidantes dos flavonoides. Para além da capacidade de ceder átomos de hidrogénio (H) ou elétrons aos radicais livres, os flavonoides e, em particular, as isoflavonas, poderão exercer os seus efeitos através de mecanismos como modulação das vias de sinalização celular, interações com a mitocôndria e alterações na expressão genética (HERNANDEZ-MONTES et al., 2006).

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse económico e ecológico e tem sido alvo de diversos estudos, eles possuem grande capacidade de interagir com as proteínas salivares, dando origem a complexos insolúveis que provocam a sensação de adstringência (SOARES et al., 2012).

De acordo com a sua estrutura química distinguem-se dois grandes grupos de taninos: os hidrolisáveis e os condensados (OKUDA, 2005).

Os taninos condensados são muito mais comuns que os taninos hidrolisáveis (SANTOS-BUELGA; 2000). Estes tipos de taninos são polímeros constituídos por unidades de flavanóis (SCHOFIELD et al., 2001). Estes compostos estão presentes em concentrações relativamente importantes nos frutos tais como a uva e maçãs e bebidas derivadas dos mesmos, no cacau e chocolate, entre outros (SANTOS-BUELGA et al., 2000).

Considerando-se que a diversidade molecular dos produtos naturais é superior àquela derivada dos processos de síntese química, os vegetais são excelentes fontes de matéria-prima na busca de novas drogas.

A variedade e complexidade de metabólitos biossintetizados pelas plantas sofrem a influência dos estímulos ambientais, bastante variáveis, de natureza química, fisiológica e biológica, sobre sua composição química, sintetizando moléculas de estruturas complexas e

com grande diversidade de esqueletos e grupos químicos funcionais (ALVES et al., 2001; RISSATO; ALMEIDA; SILVA, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Investigar os componentes químicos do extrato das folhas de *Alternanthera brasiliana* e seu potencial bioativo: Atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*.

3.2 Específicos:

- Preparar os extratos das folhas da *Alternanthera brasiliana*;
- Caracterizar as substâncias químicas encontradas nos extratos das folhas de *A. brasiliana*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *A. brasiliana*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *A. brasiliana*;
- Avaliar a toxicidade letal do extrato aquoso das folhas de *Alternanthera brasiliana*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M., GMUNDER, F., HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders a survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.363-381. 2007.

ADWAN, G; ABU-SHANAB, B; ADWAN, K.; Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Alone and in Combination with Different Antimicrobials Against Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.266-269, 2010.

ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p.108-120, 2010.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5 p. 450-513, 2013.

ALVES, T.M. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 831-833, 2001.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plantas medicinais e fitoterápicos: Uma resposta nacional**. Curitiba, Brasil. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/institucional/anvisa/atas:2005:23_120705.htm>. Acesso em: 03 nov. 2013.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. – Viçosa: UF. p.335, 2004.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde, Londrina**, v.6, n.2, p.1-6, jun. 2005.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. **Chemotherapy**, v.58, p. 70-7, 2012.

BARNETT, R. N., BONGIORNO, A., CLEVELAND, C. L., JOY, A., LANDMAN, U. E SCHUSTER, G. B. Oxidative damage to DNA: counterion-assisted addition of water to ionized DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v.28 p.10795-10800, 2006.

BERTUCCI, R.A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19 n.1, p.20-25, 2009.

BHATTACHARYA, S., AHMED, K. E CHAKRABORTY, S. Free Radicals and Cardiovascular Diseases: An Update. **Free Radicals and Antioxidants**, v.1, p.17-22, 2011.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta, **Revista de Nutrição**, v.12, p. 123-130, 1999.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A.F.M.; EASA, A.M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1636–1641, 2008.

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 829, 2002.

BOULANOUAR, B.; ABDELAZIZ, G.; AZZA, S.; GAGO, C.; MIGUEL, M. G. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.46, p. 85– 96, 2013.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 2.960. Aprova o **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, nº 240, p. 56, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 971, de 3 de maio de 2006. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da União, seção 1, n.84, p.19, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde). p.60, 2006.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c13443804478bef68eefcf7d1535461/resolucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 04.nov.2013.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, p.416, 2010.

BRIZUELA, M. A.; García, L.; Pérez, L.; Mansur, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios (Revisión). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 69-74, 1998.

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

BROOKS, G. F. **Microbiologia Médica**. 24 ed. São Paulo, p. 653, 2008.

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 antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12 p.132-135, 2002.

CALDERON, L.A. et al. Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1001-1023, 2009.

CARRERA, C. R. **Estudo bibliográfico sobre o potencial farmacológico de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze**. Trabalho de Conclusão de Curso de (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Feevale. Novo Hamburgo, 2010.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmedd**, p.480, 2004.

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P.C.K. E OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v.80, p.249-255, 2003.

CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos. 2002. CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4).

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

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582, 1999.

CRISAN, I. Natural propolis extract Nivcrisol in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romanian Journal of Virology**, v. 46, n. 3-4, p. 115-33, 1995.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DEEPA, G.; AYESHA, S.; ADITYA, M.; THANKAMANI, M. *In-vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. **Free Radicals and Antioxidants**, v..2, Issue 3, 2012.

DELAPORTE, R. H. Control de Calidad y Actividad Antiinflamatoria de las Drogas Vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.). **Acta Farmaceutica Bonaerens**, v. 20, p. 39-46, 2001.

DELAPORTE, R.H., MILANEZE, M.A., MELLO, J.C.P., JACOMASSI, E. Estudo farmacognóstico das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerens**, v. 21, p.169–174, 2002.

DELAPORTE, R. H. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.2, p. 133-136, 2005.

DEMAIN, A.L. Indiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. In: LUIJENDIJK, T.J.C. Ed. 2000 Years of Natural Products Research Past, Present and Future. 1ª e.d. Leiden: **Phytoconsult**, p. 119-136, 2000.

DERWICH, E., BENZIANE, Z., CHABIR, R. Aromatic and medicinal plants of Morocco: chemical composition of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Juniperus phoenicea*. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v.2, p.145–153, 2011.

DE 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, p.279–281, 1998.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. London: John Wiley & Sons, 2002.

DINIZ, A. C. B. D.; ASTARITA, L. V., SANTAREM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, p. 443-450, 2007.

DOUGHARI, J. H.; EL-MAHMOOD, A. M.; TYOYINA, I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 7-13, 2008.

DOGRU, Z., NACAR, T., UNAL, D., AKSAK, S., ALBAYRAK, A., ODABASOGLU, F., CETIN, N., KARAKUS, E., GUNDOGDU, C., GUMUSTEKIN, K. E UNAL, B. Effects of diabetes mellitus and postmenopausal period on the lungs of rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.6: p.1989-2010, 2012.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v.33, n.9, p. 1829-1829, 2010,

FONTANAY, S; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R.E.; Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, p.272–276, 2008,

FORZZA, R.C. Introdução. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do RJ, 2013.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; MEYER, B.; DOS SANTOS, A. C.; TWARDOWSCHY, A.; SANTOS, C. A.; MARQUES, M. C. Inhibition of gastric H⁺, K(+) -ATPase activity by compounds from medicinal plants. **Natural Product Communication**, v.6, p.1253, 2011.

FURTADO, G.H.C; PERDIZ, L.B; SANTANA, I.L; CAMARGO, M. M. S. C. R; PARREIRA, F.C; ANGELIERI, D.B; MEDEIROS, E. A.S.; Impact of a Hospital-wide Antimicrobial Formulary Intervention on the Incidence of Multidrug-Resistant Gram-negative Bacteria. **American Journal of Infection Control**, v.36l, p.661-4, 2008.

GAMBETA, R. M. Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* st. Hilaire. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). **Erechim**, 2008.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; PRANDO, T. B.; LEME, T. S.; GASPAROTTO, F.M.; LOURENÇO, E. L.; RATTMANN, Y. D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; KASSUYA, C. A.; MARQUES, M. C. J. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. **Ethnopharmacol**, v.141, p. 501, 2012.

GUIMARÃES D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.667-679, 2010.

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.

GOMEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, p.127-33, 2012.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v. 11, p. 185-192, 2007.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p. 481-504, 2000.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v.13, n.19/20, p. 894-901, 2008.

HAZRA, S.; GHOSH, S.; DEBNATH, S.; SEVILLE, S.; PRAJAPATI, V. K.; WEIGHT, C. W.; SUNDAR, S.; HAZRA, B. Antileishmanial activity of cryptolepine analogues and apoptotic effects of 2,7-dibromocryptolepine against *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal Parasitology Research**, v.111, p.195, 2012.

HERNÁNDEZ-MONTES, E., POLLARD, S. E., VAUZOUR, D., JOFRE-MONTSENY, L., ROTA, C., RIMBACH, G., WEINBERG, P. D. E SPENCER, J. P. E. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial

cell injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.346, p.851-859, 2006.

HOEFEL, R. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Boletim Farmacoteca.**, v. 11, p. 1-4, 2006.

IDE, T., TSUTSUI, H., HAYASHIDANI, S., KANG, D., SUEMATSU, N., NAKAMURA, K., UTSUMI, H., HAMASAKY, N.; TAKESHITA, A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. **Circulation Research**, v.88 p.529-535, 2001.

JACOBY G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 120-26, 2005.

KHATABI, O.; HANINE, H.; ELOTHMANI, D.; HASIB, A. Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*). **Arabian Journal of Chemistry**. 2013.

KONRATH, E. L.; NEVES, B. M.; LUNARDI, P. S.; PASSOS, C. S.; SIMÕES-PIRES, A.; ORTEGA, M. G.; GONÇALVES, C. A.; CABRERA, J. L.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, A. T. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, p.58-67, 2012.

KUETE, V; NGAMENI, B; SIMOC; C.C; TANKEUC, R. KENGAP; NGADJUI, B. T; MEYERD, J.J.M; LALL, N; KUIATEA, J.R. Antimicrobial Activity of the Crude Extracts and Compounds from *Ficus Chlamydocarpa* and *Ficus Cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.20, p.17–24, 2008.

KUMAR, C. G; MONGOLLA, P; JOSEPH, J; NAGESWAR, Y.V.D; KAMAL, A. Antimicrobial Activity from the Extracts of Fungal Isolates of Soil and Dung Samples from Kaziranga National Park, Assam, India. **Journal de Mycologie Médicale**, v.20, p.283-289, 2010.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LABARCA J.L. Nuevos conceptos en farmacodinâmica, debemos repensar como administramos antimicrobianos? Revista Chilena de Infectologia, v. 19, p. 33-37, 2002.

LAGROTA, M.H.C.; WIGG, M.D.; SANTOS, M.M.G.; MIRANDA, M.M.F.S.; CAMARA, F.P.; COUCEIRO, J.N.S.S.; COSTA, S.S. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the Herpes simplex virus. **Phytotherapy Research**, v.8, p.358-36, 1994.

LANG, Y.; CHEN, D.; LI, D.; ZHU, M.; XU, T.; ZHANG, T.; QIAN, W.; LUO, Y. J. Luteolin inhibited hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells proliferation and

migration by suppressing the src and akt signalling pathways. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, p.597-603, 2012.

LEE JH, YANG HY, LEE HS, HONG SK. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Cones of *Pinus koraiensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnolog**, v. 18, p. 497 – 502, 2008.

LIMA, C. R.; VASCONCELOS, C. F.; COSTA-SILVA, J. H.; MARANHÃO, C. A.; COSTA, J.; BATISTA, T. M.; CARNEIRO, E. M.; SOARES, L. A.; FERREIRA, F.; WANDERLEY, A. G. J. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. Leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p. 517-25, 2012.

LIMA, D. F.; BRANDÃO. M. S.; MOURA, J. B.; LEITÃO, J. M.; CARVALHO, F. A.; MIÚRA, L. M.; LEITE, J. R.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, F. R. J. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, p.283-92, 2012.

LIMA, M.R.F; LUNA,J.S; SANTOS, A.F; ANDRADE, M.C.C; SANTANA, A.E.G; GENET, J.P; MARQUEZ, B.M; NEUVILLE. L; MOREAU, N.; Anti-bacterial Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.137–147, 2006.

LI, P. P.; LIU, D. D.; LIU, Y. J.; SONG, S. S.; WANG, Q. T.; CHANG, Y.; WU, Y. J.; CHEN, J. Y.; ZHAO, W. D.; ZHANG, L. L.; WEI, W. BAFF/BAFF-R involved in antibodies production of rats with collagen-induced arthritis via PI3K-Akt-mTOR signaling and the regulation of paeoniflorin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p.290-300, 2012.

LORENZI, HARRI, MATOS, ABREU F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: Naturais e Exóticas**, 2001.

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.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MADIGAN, M.T. **Microbiologia de Brock**, 12ª ed. São Paulo: Artmed, p. 1128, 2010.

MALHOTRA, A.; NAIR, P.; DHAWAN, D. K. Premature mitochondrial senescence and related ultra structural changes during lung carcinogenesis modulation by curcumin and resveratrol. **Ultrastructural Pathology**, v.36, p.179-84, 2012.

MAHDY, K.; SHAKER, O.; WAFAY, H.; NASSAR, Y.; HASSAN, H.; HUSSEIN, A. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.3, p.31 42, 2012.

MARKESBERY, W. R.E LOVELL, M. A. DNA oxidation in Alzheimer disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, p.2039-2045, 2006.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C; SMIYH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, p.471, 2012.

MENDES, C. S. O. **Caracterização da composição química e atividade biológica de extratos de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze Amaranthaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Concentração em Agroecologia) - Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, 2012.

MIN, L.; LAI, Y.; VILLARUZ, A. E.; CHA, D. J.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M . Gram positive three-component antimicrobial peptidesensing system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 9469-9474, 2007.

MIRANDA, G.S.; SANTANA, G.S.; MACHADO B.B.; COELHO, F.P.; CARVALHO, C.A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.15 n.1, 2013.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v.130, p. 1036–1043, 2012.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K.A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; SARAIVA, A. A. F.; COUTINHO, H. D.M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.12 p.38 – 43, 2013.

MOREIRA, V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros *in natura* e encapsulado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, 2013.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Michigan: Algonac, p.501, 2000.

MOTAMED, S.; NAGHIBI, F.; Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran, **Food Chemistry**, v.119, p.1637–1642, 2010.

MULAUDZI, R. B.; NDHLALA, A. R.; KULKAMI, M. G.; VAN STADEN, J. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, 185-93. 2012.

NAILI, M.B., ALGHAZEER, R.O., SALEH, N.A., AL-NAJJAR, A.Y., Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Asteraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). **Arabian Journal of Chemistry**, v.3, p. 79–84, 2010.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products of therapeutic importance. **Natural products**, v. 2, p. 623- 650. 2010.

NDHLALA, R., MOYO, M. E VAN STADEN, J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules. **Molecules**, v.15, p.6905-6930, 2010.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, p.503-515, 2010.

NIU, X.; XING, W.; LI, W.; FAN, T.; HU, H.; LI, Y. Int. Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects *in vivo* and inhibited TNF- α production in LPS-induced mouse peritoneal macrophages *in vitro* via the MAPK pathway. **Immunopharmacol**, v.14, p.164-71, 2012.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v.66, p. 2012-2031, 2005.

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1017-1032, 2004.

OLIVEIRA, A. B.; LONGH, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 7, nº 2, 2006.

OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L.; SANTOS OLIVEIRA, A. S.; JUNIOR, I. M.; DE CARVALHO, J. E.; DE RUIZ, A. L.; JERALDO, V. L.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTI, S. M. Schistosoma mansoni: *in vitro* schistosomicidal activity of essential oil of Baccharis trimera (less) D. **Experimental Parasitology**, v.132, p.135-43, 2012.

ORHAN, I. E. Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.2252-61. 2012,

PADILHA, I.Q.M. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20 n.1, p.45-47, 2010.

PARK, J. J.; SEO, S. M.; KIM, E. J.; LEE, Y. J.; KO, Y. G.; HA, J.; LEE, M. Berberine inhibits human colon cancer cell migration via AMP-activated protein kinase-mediated down regulation of integrin $\beta 1$ signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.426, p.461, 2012.

POLITI F.A.Z, PIETRO R.C.L, MOREIRA R.R.D. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae)**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de fármacos e medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

PEREIRA, D. F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *Alternanthera brasiliana* L. kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik: estudo fitoquímico e biológico de *Alternanthera brasiliana***. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

PERES, M. T. L. P.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; BONANI, V. F. L.; CANDIDO, A. C. S.; CASTELLI, C. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, v. 32, p.897 – 901, 2009.

PRAKASH, D. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.58, n.1, p.18-28, 2007.

PUEYOA, M.J; GAITEB, F.B; VILLARC, R.A; MONTEROC, J.G. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. **Journal of the associação brasileira de medicina intensiva**, v.35, p.41-53, 2011.

RATNAM, D., ANKOLA, D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D. E KUMAR M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v.113, p.189-207, 2006.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2008.

RISSATO, S.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, L.C. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. **Revista Salusvita**, v. 23, n. 2, p. 209-222, 2004.

ROBARDS, K., PRENZLER, P. D., TUCKER, G.; SWATSITANG, P. E GLOVER, W. Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. **Food Chemistry**, v.66: 401-436, 1999.

RODRIGUES, A. C. F.; DA COSTA, J. F.; SILVA, A. L.; DO NASCIMENTO, E. P.; SILVA, F. R. G.; DE SOUZA, L. I. O.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, A. F. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, p.43 – 53, 2013.

RODRIGUES, V. E. G; CARVALHO, D. A. **Plantas Medicinais no Domínio dos Cerrados**. Lavras: Editora UFLA, p.180, 2001.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.2, p. 306-310, 2012.

SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 107–110, 2004.

SANTOS-BUELGA, C. E SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds–nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1094-1117, 2000.

SANTOS K.K.A, MATIAS E.F.F, ALMEIDA T.S, COSTA J.G.M, COUTINHO H.D.M. Atividade antifúngica de extratos vegetais e animais da região do cariri. **Caderno Ciência Cultura**, v. 2, p. 53 – 65, 2010.

SANTOS, M.M.; NUNES, M.G.S.; MARTINS, R.D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.2, p.327-334, 2012.

SANTOS, R.I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 403-434, 2003.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; LATHA, L.Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVIC, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento e medicamentos In: **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Editora UFSC, 2001.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. E PELL, A. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.91 p. 21-40, (2001).

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and healthy promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, n.9, p.930-940, 2010.

SILVA, N. C. B.; MACEDO, A. F.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A.; SATO, A. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation, growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) kuntze cultured *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 779-786, 2005.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, F. V.; GUIMARÃES, A. G.; SILVA, E. R.; SOUSA-NETO, B. P.; MACHADO, F. D.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; ARCANJO, D. D.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. J. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **Journal of Medicinal Food**, v.15, p.984-91, 2012.

SILVA JR., I.E.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S.A.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1b, p. 242-248, 2009.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Constituintes micromoleculares de Plantas do Nordeste com Potencial Farmacológico: com dados de RMN 13 C. Fortaleza: **Expressão Gráfica e Editora**, v. 1, p.213, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Florianópolis: Editora UFRGS, 2004.

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

SISODIA, B. S.; NEGI, A. S.; DAROKAR, M. P.; DWIVEDI, U. N.; KHANUJA, S. P. **Chemical Biology & Drug Design**, v.79, p. 610, 2012.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Amarantáceas**. Flora Ilustrada Catarinense, fasc. AMAR, p. 69-71, 1972.

SOARES, S., MATEUS, N., DE FREITAS, V. Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.3966–3972, 2012.

SOFIATI, F. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K. e *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae). 100 f.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2009.

SOUZA, P. M.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. **Planta Medica**, v.78, p. 393-9, 2012

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.640, 2005.

STRINGHETA, P. C. **Compostos Bioativos em Alimentos**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/biochatartigos/artigo.asp?id=50>. Acesso em 14/10/2012.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZKANG, L.; Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p. 2689–2696, 2011.

SUN WATERHOUSE, D.; THAKORLAL, J.; ZHOU, J. Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 46, n. 8, p. 1575-1585, 2011.

TAFFARELLO, D; JORGE, M. P; SOUSA, I.M.O; DUARTE, M.C.T; FIGUEIRA, G.M; QUEIROZ, N.C.A; RODRIGUES, R.A.F; CARVALHO, J.E; GOES, A.L.T.R; FOGLIO, M.A. Atividade de extratos de *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p.431-436, 2013.

TAKAMURA, O. S. Editorial: Tendências no estudo de Plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v.12, n.3, p.165-274, 2008.

TANG, X; TAN, C; ZHANG, X; ZHAO, Z; XIA, X; WU, B; GUO, A; ZHOU, R; CHEN, H.; Antimicrobial Resistances of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolates from Swine in China. **Microbial Pathogenesis xxx**, p.1-6, 2011.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, p.827, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p.386, 2008.

TRIAS, J.; GORDON, E.M. Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 757-762, 1997.

UETANABARO, A.P.T.; GÓES-NETO, A. Segurança alimentar: transferência horizontal de genes e alimentos transgênicos. **Sitientibus**, v. 35, p. 111-124, 2006.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 308, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 2005.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

VONBERG, R.P; WOLTER, A; CHABEMY, I. F; KOLA, A; ZIESING, S; SUERBAUM, S; GASTMEIER, P. Epidemiology of Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Data from an University Hospital Over a 36-month period - Int. J. Hyg. **Environmental Health**, v. 211, p. 251–257, 2008.

VOKURKOVA, M., XU, S. E TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. **Future Cardiology**. v.3, p.53-63, 2007.

WANG, Z., HSU, C.; YIN, M. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. **Food Chemistry**. v.112, p.914–918, 2009.

XING, Y.; CHEN, J.; WANG, J.; GAO, Y.; NIU, W.; ZHAO, M.; ZHU, H.; GUO, L.; LU, P.; WANG, S. J. The effects of allitridi and amiodarone on the conduction system and reverse use-dependence in the isolated hearts of rats with myocardial infarction. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p.674, 2012.

5. CAPÍTULO 1

Chemical analysis of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae) leaf extract

A.D.A. Uchôa^{1,2}; C.S. Silva^{1,2}; R.A. Silva¹; P.G. Cadena^{1,3}; N.H. Silva²; M.C.B. Pimentel^{1, 2}; M.P.C. Silva^{1, 2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50780-901, Recife, PE, Brazil. ³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author

Dr. Maria da Paz Carvalho da Silva

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 Recife –PE, Brasil.

Phone: +55 81 2126 8484; Fax: +55 81 2126 8485

e-mail:mariadapazc@gmail.com

ABSTRACT: Chemical analysis of plant extracts is an important tool in the investigation of compounds with high biotechnological potential, allowing the evaluation and discovery of new therapeutic agents. This study investigated the chemical compounds contained in the *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae) leaf extract. Total sugars (1340.54 ± 0.002 $\mu\text{g/ml}$), uronic acids (320.26 ± 0.001 $\mu\text{g/ml}$), total phenolic compounds (326.75 ± 0.005 $\mu\text{g/ml}$) and proteins (54.149 ± 0.0007 $\mu\text{g/ml}$), were detected by spectrophotometric analysis. The SDS-PAGE electrophoresis was performed to obtain the protein profile and thin layer chromatography to identify the types of carbohydrates contained in the extract. The following sugars were used as standards: Glucose, fructose, galactose, mannose, lactose, maltose, inulin and pectin. The SDS-PAGE showed several protein bands between 21 and 31 KDa, 14 and 21 kDa, and below 14 kDa. The thin layer chromatography showed bands showing the presence of sugars, especially glucose, fructose, galactose mannose, saccharose, inulin and pectin according with retention factor (RF) calculated. The results showed that the leaf extract of *Alternanthera brasiliana* contains molecules with great potential biotechnological, which confirms their pharmacological activity serving as a basis for developing new drugs with possibility application in the prevention and treatment of various global diseases.

Keywords: *Alternanthera brasiliana*. Amaranthaceae. Chemical analysis

▪ INTRODUCTION

Studies based on pharmacological properties of substances produced from plants metabolism. They have empirically been recognized for centuries, but only recently has been scientifically confirmed. Scientific researches investigating the chemical compounds of medicinal plants are essential, in a view to the discovery of new opportunities that contribute to the development of new drugs. Studies have reported that from the 520 new drugs approved between 1983 and 2010, 39% were natural products or derived from natural products.¹ Parts from the plants such as root, stem, leaf can provide active substances that are used to obtain a drug.²

Although plants represent the greatest diversity of molecules with different structures, physiological and physico-chemical properties that make it popular is essential to know the chemical composition of the species as secondary metabolites that are influenced by various environmental factors such as seasonality, humidity, temperature and other.^{3, 4} These are derived from biotransformation processes of macromolecules, such as carbohydrates, lipids, proteins and nucleic acids; which their products guarantee advantages for plant survival and perpetuation of the species.³

Alternanthera brasiliensis belonging to the Amaranthaceae family, popularly known as "terramycin" and "penicillin", is widely used in the treatment of various pathologies, and these compounds proved to be anti-inflammatory,⁵ analgesic,⁶ inhibiting herpes simplex virus,⁷ antiproliferative of lymphocytes,⁸ antimicrobial,⁹ possess astringent and anti diarrheal properties.¹⁰ Despite the medicinal use of this plant in the treatment of various diseases, there is not a deep chemical analysis to justify the high potential bioactive. The discovery of new biologically active compounds show an advance in modern medicine providing an alternative to conventional treatments, even that the compound are elucidated properly. The high potential pharmacological demonstrated by its use justifies the present work on the investigation of the chemical compounds contained in the extract of leaves of *Alternanthera brasiliensis*.

▪ EXPERIMENTAL SECTION

Plant material. The leaves of the plant *Alternanthera brasiliensis* were collected in the Limoeiro town in the State of Pernambuco, Brazil. Once collected, the samples were brought to the Immunopathology Keizo Asami (LIKA) –UFPE laboratory. The plant was identified by Dr. Marlene Barbosa de Alencar Department of Botany and cataloged in the herbarium of the Federal University of Pernambuco under n. ° 21846.

Preparation of the extracts. To obtain the aqueous extract fresh plant material (leaf - 295 g) was used and mashed with 1 L of ultrapure water, filtered and centrifuged at 9,500 x g for 30 min. For methanol extract, the leaves (25 g) were fragmented and placed in the Erlenmeyer flask to obtain a mixture of methanol: leaf (3:1) at boiling and stirring for 20 minutes. The extract was filtered, dried at 50 °C using a rotary evaporator and the residue dissolved in methanol.

Determination of the Carbohydrates. The total sugars were determined using the phenol-sulfuric method¹⁷ using glucose as a standard. The uronic acids were determined using the Carbazole-sulfuric method¹⁸ using glucuronic acid as a standard. The reagents used were from Sigma. The following experiments were performed in triplicate.

Thin Layer Chromatography (TLC). The sugars were analyzed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel chromatoplates F₂₅₄ (fast eluting) thickness of 0.25 mm using specific standards. The elution system used for monosaccharides was acetone/n-butanol/water (40:5:5 v/v/v), and was revealed with: 2% diphenylamine prepared in acetone; 2% aniline prepared in acetone and 85% orthophosphoric acid (5:5:1 v/v/v). The standards used for monosaccharides were: glucose, fructose, galactose, mannose and ribose. They were prepared in a concentration of 10 mg/ml. For disaccharides and polysaccharides elution system employed was n-propanol/ethyl acetate/distilled water (15:30:5 v/v/v) and developed with the same developer used for the monosaccharides. The standards used for disaccharides were: sucrose, maltose and lactose for disaccharides and starch, inulin, pectin and CM-cellulose for polysaccharides. They were prepared in the same concentration of the samples. The reagents used were from Sigma.

Determination of total phenolic compounds. The content of total phenolic substances was determined according to the Folin–Ciocalteu method.¹⁴ The total phenolics was expressed in terms of gallic acid equivalent. The reagents used were from Sigma. The following experiments were performed in triplicate.

Determination of protein in the crude aqueous extract. Quantification of protein of the extract was estimated by Lowry (1951) method¹⁵ using bovine serum albumin as standard. The reagents used were from Sigma. The following experiments were performed in triplicate.

Extraction and determination of proteins in solution of protein isolated from the crude aqueous extract. Aqueous extract and 20% (w/v) TCA (20:20 v/v) were used for protein extraction and the mixture was centrifuged for 30 min at 11,180 G. The precipitate was resuspended with 10 ml 5.0% (w/v) TCA and submitted to boiling at 100 °C for 15 min. After that, the precipitate was washed with 3 ml of acetone and centrifuged for 30 min at 11,180 x g, suspended in 2 ml H₂O ultra - pure and agitated. Then was added 4 ml 0.1 M NaOH, submitted to boiling at 100 °C for 10 min and centrifuged for 30 min at 11,180 x g. The precipitate was resuspended in 2 ml H₂O ultra-pure. Then the measurement of proteins was carried out by Lowry method¹⁵ using bovine serum albumin as standard. The reagents used were from Sigma. The following experiments were performed in triplicate.

SDS-PAGE. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) method according Laemmli (1970)¹⁶ was carried out to determine the molecular weight of the proteins present in the extract. Stacking gel was prepared with 4.0% (w/v) polyacrylamide, 0.8 % (w/v) N,N'-methylene-bis(acrylamide), and 10% (w/v) SDS. The separating gel (8 cm x 8 cm x 0.75 mm) was prepared with 15% (w/v) polyacrylamide, 0.6% (w/v) N,N'-methylene-bis(acrylamide) and 10 % SDS. Freeze-dried samples were prepared in buffer (0.5 M Tris–HCl pH 6.8) containing 10% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) β-mercaptoethanol and 2% (w/v) bromophenol blue. Samples were heated in water bath at 100 °C for 3 min before electrophoresis. Then, 50 µL of sample were applied on the gel surface and fractionated for 2 h, starting in constant current at 25 mA. Gels were stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 25% methanol – 10% acetic acid and the excess of dye was removed with 25% methanol – 10% acetic acid mixture. Molecular weight of the proteins was estimated using a molecular weight calibration kit as markers (Bio-Rad): phosphorylase b (97.400 Da), bovine serum albumin (66.200 Da), egg white ovalbumin (45.000 Da), carbonic anhydrase (31.000 Da), trypsin inhibitor (21.500 Da) and lisozime (14.400 Da). The reagents used were from Sigma

▪ RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained with regard to the total concentration of sugars and uronic acids are summarized in Table 1. *A. brasiliiana* is rich in carbohydrates, mainly acids, important for cell metabolism, which probably are involved in the pharmacological activity of the plant in folk medicine, that constitutes an auxiliary strategy with regard to the search for new therapeutic agents, needing further study for confirmation of their hypothesis.

Insert Table 1 here

The thin layer chromatography presented spots showing the presence of monosaccharides, disaccharides and polysaccharides, which are visualized in Figures 1, 2, and 3. Different chromatographic spots of the standards used was observed, that motivates further studies for the identification and isolation of these molecules, because *A. brasiliiana* has a variety of sugars which need further studies, being a promising species for biotechnology area.

Insert Figures 1, 2, 3 here

The content of total phenolic compounds in the extracts of the leaves of *Alternanthera brasiliiana*, and expressed as acid gallic shows that species has great quantity this secondary metabolite ($326.750 \pm 0.005 \mu\text{g/ml}$), leaf dry weight ($13.880 \mu\text{g/mg}$), these can be responsible for some pharmacological activities attributed the plant.

In another study of *Alternanthera brasiliiana* was determined the quantity of total phenol by the method of Folin-Ciocalteu in the crude ethanolic (70%) extract, fractions (dichloromethane, ethyl acetate and n-butanolic). Total phenolic contents varied from 29.0 mg/g to 56.6 $\mu\text{g/mg}$ (dry fraction).¹¹

In a study with *Aternanthera tenella colla* was determined the content of total phenolic compounds in the ethanolic extract, methanolic and ethyl acetate. The following results were obtained: ethanolic extract ($83.15 \pm 3.66 \text{ GAE } \mu\text{g/ml}$), methanolic extract ($85.15 \pm 2.94 \text{ GAE } \mu\text{g/ml}$), ethyl acetate extract ($77.10 \pm 4.7 \text{ GAE } \mu\text{g/ml}$).¹²

The different results may be related to the collecting period and environmental conditions. The quantity of phenolic compounds present in plant decreases considerably (0.46% - 0.87%) in the autumn and winter months, this condition is directly related to the metabolism of the plant in each seasons.⁵ This determination is an important criterion for establishing the best time for collecting the plant material.

The results of determination of proteins are presented in Table 2. The protein content in the crude aqueous extract was influenced by phenolic compounds, because the method is based on a mixture containing Folin-Ciocalteu reagent that has several interference such as phenolic compounds, sugars, and others. In *Alternanthera brasiliiana* extract there is an

interaction between proteins and phenolic compounds. Protein content after extraction method was successfully performed, which shows the presence of protein in the extract. This extraction method can be used to quantitate proteins in other plants that have large amounts of phenolic compounds.

Insert Table 2 here

The SDS –PAGE of the *Altrennathera brasiliiana* extract showed protein bands with molecular weight between 21 and 31 kDa, 14 and 21 kDa. Also bands were visualized with molecular weight below 14 kDa, in comparison to the standards (Figure 4).

Insert Figure 4 here

There are no reports on the *Alternanthera brasiliiana* studies related to proteins, then this plant can be a source of new proteins.

According to Schenkel¹³ is possible that the pharmacological activity is due to the action of more than one component, which may possibly act on the same biochemical processes as well as in other ways, modifying solubility, absorption or changing phenomena influencing the stability.

Alternanthera brasiliiana present a large molecular diversity. This condition provides different physicochemical properties of the plant being its extract capable of delivering up to thousands of compounds. Therefore, further studies are need for the isolation of these molecules, numerous extraction methods and chemical studies being guided by bioassays *in vivo* and *in vitro* in the search for active principle, in order to discover compounds that have biological activity of great importance for the development of new drugs, and possible use in the prevention of many pathologies.

▪ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support of Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Department of Biochemistry the University Federal de Pernambuco (UFPE) and the Committee for the Amelioration of Superior Education (CAPES).

▪ REFERENCES

- (1) Newman, D.J.; Cragg, G.M. *Natural products* 2010, 2, 623- 650.
- (2) Rosa, R.L.; Barcelos, A.L.V.; Bampi, G. *Rev. bras. plantas medicinais* 2012, 14, 306-310.
- (3) Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 2004.
- (4) Gobbo-neto, L.; Lopes, N.P. *Química Nova* 2007, 30, 374-381.
- (5) Delaporte, R. H. *Acta Farm. Bonaerense* 2001, 20, 39-46.
- (6) De souza, M.M.; Kern, P.; Floriani, A.E.O.; Cechinel-Filho, V. *Phyt. Res.* 1998, 12, 279–281.
- (7) Lagrota, M.H.C.; Wigg, M.D.; Santos, M.M.G.; Miranda, M.M.F.S.; Camara, F.P.; Couceiro, J.N.S.S.; Costa, S.S. *Phytotherapy Research* 1994, 8, 358-36.
- (8) Brochado, C.O.; Almeida, A.P.; Barreto, B.P.; Costa, L.P.; Ribeiro, L.S.; Pereira, R.L.C.; Koatz, V.L.G.; Costa, S.S. *J. Braz. Chem. Soc.* 2003, 14, 449–451.
- (9) Caetano, N.; Saraiva, A.; Pereira, R.; Carvalho, D.; Pimentel, M. C. B.; Maia, M. B. S. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2002, 12, 132-135.
- (10) Pereira, D. F. *Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Maria*. 2007.
- (11) Pereira, D. F.; Zanon, R. B.; Dos Santos, M.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L. *Antioxidant Natural Products Reserarch* 2013, 27, 1660-1663.
- (12) Wiese, L. P. L. *Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina*. 2008.
- (13) Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Petrovic, P. R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 2001.
- (14) HUA-BIN L.; Chi-Chun W.; Ka-Wing C.; Feng C.; *Swiss society of food scince and technology* 2008, 41, 385-390.
- (15) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., Randall, R.J.; *Journal of Biological Chemistry* 1951, 193, 265-275.
- (16) Laemmli, U. K. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- (17) Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. *Analitical Biochemistry* 1956, 28, 350-356.
- (18) Dische, Z. *Journal of Biological Chemistry* 1974, 167, 189-198

TABLES

Table 1

Determination of carbohydrates in the aqueous extract of *Alternanthera brasiliana* leaf extract

Variables	µg/ml extract	leaf wet weight (µg/mg)	leaf dry weight (µg/mg)
Total sugars	1340.540 ± 0.002	4.544	56.947
Uronic acids	320.263 ± 0.001	1.085	13.605

Mean ± SD, n = 3.

Table 2
Determination of Proteins of *Alternanthera brasiliana*

Assay	µg/ml extract	leaf wet weight (µg/mg)	leaf dry weight (µg/mg)
Protein in the crude aqueous extract	2183.333±0.002	7.401	92.749
Solution of proteins isolated from the crude aqueous extract	54.149±0.0007	0.183	2.300

Mean ± SD, n = 3.

Legendes figures

Figure 1. Chromatographic spots from Thin Layer Chromatography (TLC) for monosaccharides of the *Alternanthera brasiliana* leaf extract aqueous and methanolic. Glc = glucose, Fru = fructose, Mann = mannose, Rib = ribose, aq.E = aqueous extract, meth.E = methanolic extract.

Figure 2. Chromatographic spots from Thin Layer Chromatography (TLC) for disaccharides of the *Alternanthera brasiliana* leaf extract aqueous and methanolic. Lac = lactose, Malt = maltose, Suc = sucrose, aq.E = aqueous extract, meth. E = methanolic extract.

Figura 3. Chromatographic spots from Thin Layer Chromatography (TLC) for polysaccharides of the *Alternanthera brasiliana* leaf extract aqueous and methanolic. Inu = inulin, Pec = pectin, CM- Cell = CM-Cellulose, aq.E = aqueous extract, meth.E = methanolic extract.

Figure 4. SDS-PAGE ELECTROPHORESIS of *Alternanthera brasiliana*. 1 = molecular weight standard, 2-3 = *Alternanthera brasiliana* leaf aqueous extract, 4: standard.

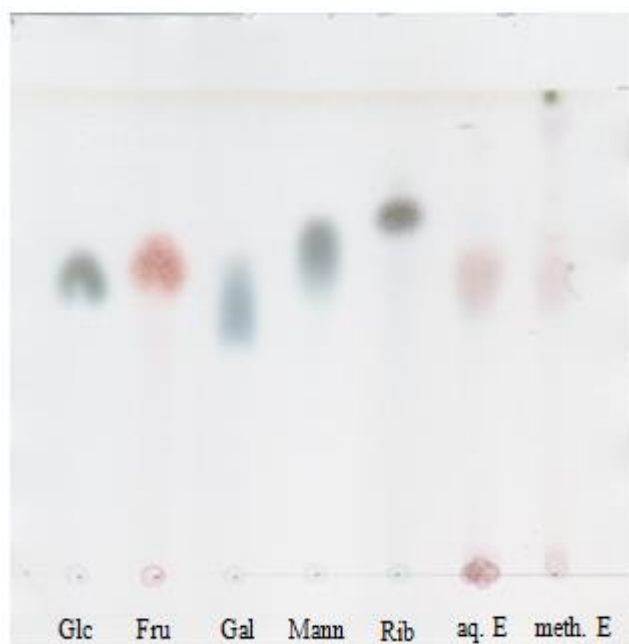
FUGURES**Figure 1.**

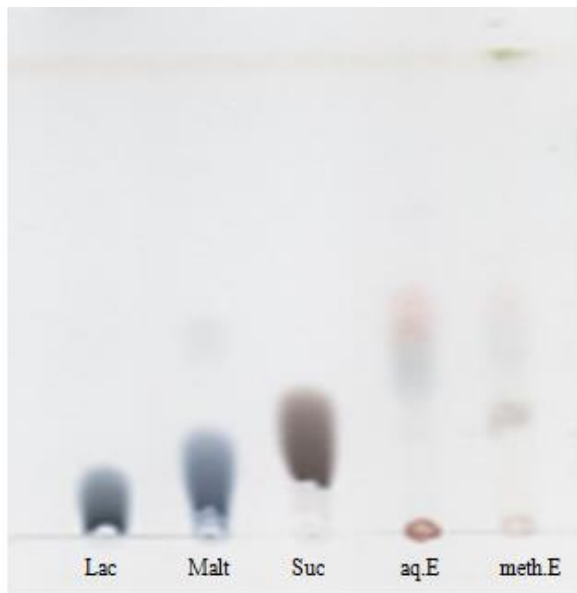
Figure 2.

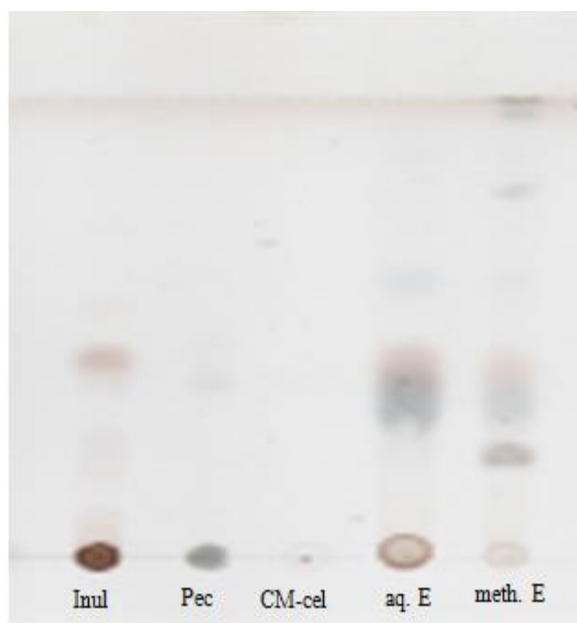
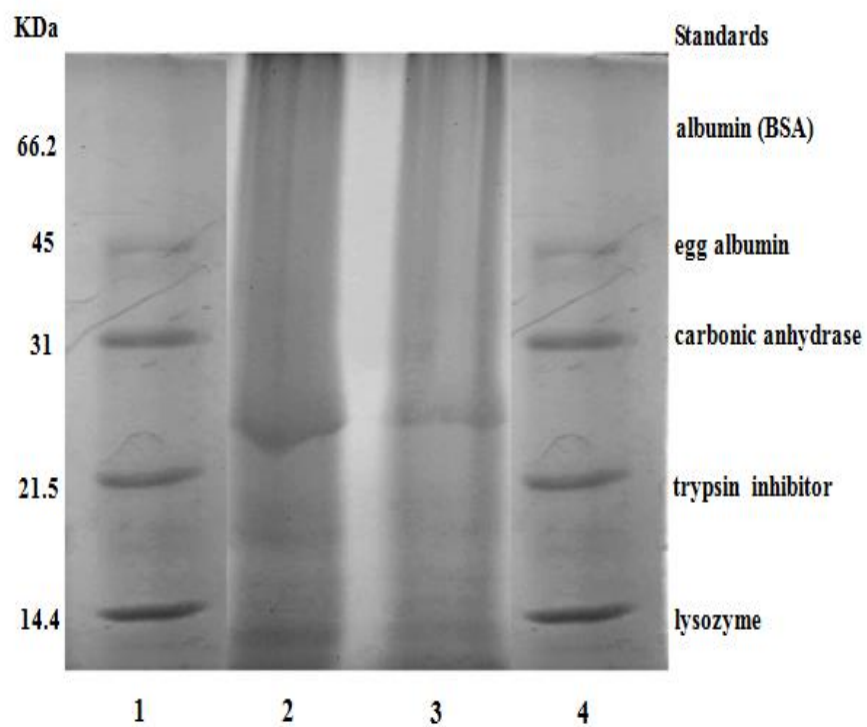
Figure 3.

Figure 4.

6. CAPÍTULO 2

Antimicrobial and antioxidant activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae) leaf extract

Uchôa, A. D. A.^{1,2}; Silva, C. S.^{1,2}; Silva, R. A.¹; Cadena, P. G.^{1,3}; Silva, N. H.²; Pimentel, M. C. B.^{1,2}; Silva, M. P. C.^{1,2}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 Recife –PE, Brasil. ³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil.

*Corresponding author

Dr. Maria do Carmo de Barros Pimentel

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 Recife –PE, Brasil.

Phone: +55 81 2126 8484; Fax: +55 81 2126 8485

e-mail: mcbcarneiro@yahoo.com.br

ABSTRACT

Aim of the study: This study aimed to determine the antioxidant and antimicrobial activities *in vitro*, and lethal toxicity of *Alternanthera brasiliana* leaves aqueous extract.

Ethnopharmacological relevance: Studies on medicinal plants has received special attention of the researchers. *Alternanthera brasiliana* known as "terramycin and "penicillin" is used in popular medicine for the treatment of several pathologies. Components synthesized by the plant have biological activity of pharmacological interest. Infectious diseases are the main cause of death worldwide and oxidative stress induced by free radicals is considered a primary factor in neurodegenerative diseases, being of great importance the development of new antimicrobial and antioxidants of natural products with low toxicity.

Material and methods: were performed antioxidant activity using the ABTS method and antimicrobial using microbroth dilution assays. Twelve microorganisms of medical interest were analysed and lethal toxicity was evaluated by (LC₅₀) assay using *Artemia salina*.

Results: Significant results were found for the antioxidant activity, percentage inhibition of 51.31 ± 2.47 to 94.57 ± 12.29 equivalent to 1054.66 ± 58.92 to 2084.66 ± 07.07 to TEACa (μ M Trolox) in a period of 6 min to 120 min. *Alternanthera brasiliana* showed antibacterial activity for: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, and it was negative for: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia sp*, *Staphylococcus aureus* - CI, *Pseudomonas aeruginosa* - CI, *Enterobacter aerogenes* - CI. Toxicity (LC₅₀) was 500 μ g/ml.

Conclusion: The results showed that extract of *Alternanthera brasiliana* exhibited antimicrobial and antioxidant activities with low toxicity.

Key words: *Alternanthera brasiliana*, antimicrobial activity, antioxidant activity, medicinal plants, plant extract

1. Introduction

Oxidative stress induced by radicals is considered a primary factor in neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson (Markesbery and Lovell, 2006; Gomez-Pinilla and Nguyen, 2012), cancer (Bianchi and Antunes, 1999), cardiovascular diseases such as atherosclerosis (Vokurkova et al., 2007; Bhattacharya et al., 2011). It is also a major cause of cell death and tissue damage caused by myocardial infarction (Ide et al., 2001), inflammatory and aging processes (Wang et al., 2007), more recently was demonstrated that oxidative stress may also be the cause of type II diabetes (Dogru et al., 2012). In recent years, there has been increasing interest in the exploitation of natural sources, particularly with regard to plants for pharmaceutical use, and, in the last decade there has been a significant growth in the use of herbal medicines (Bresolin and Cechinel Filho, 2010).

Despite extensive progress in scientific knowledge and medical technology, infectious diseases remain a leading cause of worldwide morbidity and mortality (Moellering et al., 2007; Tekwu et al., 2012). Recent studies have shown the efficacy of herbal medicines in the treatment of heart disease (Lang et al., 2012), cancer (Malhotra et al., 2012), as antioxidant ((Konrath et al., 2012), antinociceptive (Lima et al., al 2012), anti-inflammatory (Niu et al., 2012), anti-diabetic (Lima, et al., 2012), and pharmacological properties against cough and fever (Mulaudzi, R. B, 2012). The search for finding new antimicrobials from higher plants has been of great interest in recent decades. (Das et al., 2010).

Alternanthera brasiliensis (L.) Kuntze (Amaranthaceae) is known popularly in Brazil as “penicillin”, terramycin, “perpetuates the bush”, and “novalgina” and it is a perennial herb, erect or creeping, much branched (Smith et al., 1972). In folk medicine, *Altemanthera brasiliensis* is widely used in the treatment of various pathologies, including anti-inflammatory action (Delaporte, et al., 2001), analgesic (De Souza, 1998), inhibiting herpes simplex virus (Lagrotta et al., 1994), antiproliferative activity of lymphocytes (BROCHADO et al., 2003), antimicrobial (Caetano et al., 2002). The research aiming to discover new molecules with antioxidant and antimicrobial activities becomes opportune, mainly by the large number of people with diseases associated to the action of free radicals and infectious diseases caused by microorganisms. In addition to studies on bioactivity is important evaluate the cytotoxicity of plants used in traditional medicine, for greater safety of use. The lethality assay with *Artemia salina*, allows the assessment of overall toxicity and therefore is

regarded as essential in bioassay study of compounds with potential biological activity. Therefore, this study aimed to evaluate lethal toxicity (LC_{50}) using *Artemia salina*, investigate the antioxidant activity by ABTS method (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) and antimicrobial activity by the broth microdilution on the *Alternanthera brasiliana* leaf aqueous extract.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The leaves of the plant *Alternanthera brasiliana* were collected in the city of Limoeiro PE, Brazil. Once collected, the samples were brought to the Immunopathology Keizo Asami (LIKA)-UFPE laboratory. The plant was identified by Dr. Marlene Barbosa de Alencar from the Botany Department and cataloged in the herbarium of the University Federal of Pernambuco (UFPE) under nº 21846.

2.2. Preparation of plant extract

To obtain the aqueous extract, fresh plant material (leaf) was used, to get the total wet weight of the sample (295g) and dry weight (23.54 g), mashed with 1 L of ultrapure water, filtered, and then centrifuged for 30 min at 11,180 G. The extract was lyophilized, each ml of aqueous extract equivalent to 7.58 of lyophilisate.

2.3. Antioxidant activity of *Alternanthera brasiliana* using 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS)

According to Re et al. (1999), the ABTS assay is based on the generation of chromophore cationic radical obtained from the oxidation of ABTS by potassium persulfate. The oxidation reaction was prepared with 7 mM ABTS stock solution plus 140 mM potassium persulfate (final concentration) and the mixture was left in the dark at room temperature (23–25° C) for 12–16 h (time required for radical formation) before its use. The $ABTS^+$ solution was diluted in ethanol to an absorbance of 0.7 (± 0.02) units at 734 nm.

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as a reference standard. The values of oxidative inhibition percentage were calculated and plotted as a function of the reference antioxidant concentration (Trolox) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, μM). Was used 3ml of crude aqueous extract. All determinations were carried out in triplicate.

2.4. Antimicrobial activity assay

2.4.1. Microorganisms

The following microorganisms were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Micrococcus luteus* (ATTC2225), *Bacillus subtilis* (16-UFPEDA) *Pseudomonas aeruginosa* (39-UFPEDA), *Mycobacterium smegmatis* (71-UFPEDA), *Enterococcus faecalis* (ATCC6057), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Serratia sp* (398-UFPEDA), *Candida albicans* (1007-UFPEDA), *Staphylococcus aureus* (CI, 731-UFPEDA, wound Secretion-HC, ORSA), *Pseudomonas aeruginosa* (CI, 736-UFPEDA, wound Secretion-HC), *Enterobacter aerogenes* (CI, 739-UFPEDA, wound Secretion-HC). The microorganisms were provided by the Antibiotic Department the University Federal of Pernambuco – UFPE - Brazil. They were maintained at 37 ° C for 24h in culture medium bacterial incubator Mueller-Hinton agar, nutrient agar, and glucose yeast agar were prepared according to the manufacturer's instructions and autoclaved at 121 ° C for 20 minutes.

2.4.2. Preparation of inoculum

The microbial cultures were standardized to 10^8 cells / ml, estimated by comparison to the scale tube 0.5 Mac Farland (0.05ml of barium chloride dihydrate 1.175% to 9.95 ml in 1% sulfuric acid).

2.4.3. Determination of Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicide concentration (MMC).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution performed in 96-well plates. For the microbiological assay, 18 mg of lyophilized aqueous extract were diluted in 900µl of DMSO (concentration: 20mg/ml). The extract was tested at a range of concentrations from 2000 µg/ml to 3.9 µg/ml. The revelation of the microbial MIC was taken out using the resazurin (20 µl for 0.01) The MIC is considered as the lowest concentration of the sample which inhibits the visible growth of a microbe, to according to the Committee for Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - 2006). The MMC was determined by placing the sample by means of bacteriological loop, from each decoction concentration of the inoculum that MIC was positive. The reading was done after incubation of the plates at 37 ° C for 24 hours, being considered MMC the plate which did not showed microbial growth.

2.4.4. Standard drugs used for antimicrobial assay

Amoxicillin, erythromycin, ciprofloxacin and ketoconazole were used as reference antibiotics against bacteria and yeasts, respectively. The drugs were used at the same concentrations of the extract (concentration: 20mg/ml).

2.5. Toxicity assay

The cytotoxicity assay (LC₅₀) using *Artemia salina* was performed according to the methodology of Meyer et al. (1982), who considers active samples in the concentrations below 1000µg/ml, is capable of killing 50% of the larvae (LC₅₀). The statistical test ANOVA and Newman-Keuls were used for the data analysis. The experiment was performed in quadruplicate.

3. Results and discussion

3.1. Results

The antioxidant activity of *Alternanthera brasiliana* leaves extract in function of time is shown in Table 1, with oxidative inhibition of $94.57 \pm 0.29\%$, after 120 min, equivalent to TEAC of $2084.66 \pm 7.07 \mu\text{M}$ Trolox. *Alternanthera brasiliana* showed significant antioxidant activity as a function of time, which increased more than 10% of the initial concentration after 15 minutes. There was gradually increasing, remaining practically constant, after 120 minutes when the increase was of approximately 100%.

Table 1

Antioxidant activity (ABTS⁺) of *Alternanthera brasiliana*.

Time	% Inhibition	TEAC ^a (μM Trolox)
6 min	51.31 ± 2.47	1054.66 ± 58.92
15 min	59.35 ± 0.60	1329.66 ± 103.71
30 min	76.86 ± 3.76	1662.99 ± 89.57
45 min	74.2 ± 4.75	1599.66 ± 113.13
60 min	77.84 ± 5.14	1686.33 ± 122.57
120 min	94.57 ± 0.29	2084.66 ± 7.07

Mean $\pm$ SD, n = 3. ^aTEAC = antioxidant activity equivalent to Trolox

In the present study, the *in vitro* antimicrobial activity of *Alternanthera brasiliana* extracts against 12 microbial strains were qualitatively and quantitatively assessed by the MIC and MMC. The antimicrobial activity of plant extract was compared with standard antibiotics such as Amoxicillin, erythromycin, ciprofloxacin and ketoconazole, which were used as positive controls. Results of the antimicrobial activity obtained is summarised in Table 2.

Table 2

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC) of *Alternanthera brasiliana* leaf aqueous extract and reference drugs tested on twelve microorganisms.

Microorganisms	<i>A. Brasiliana</i> MIC/MMC (Concentration: µg/ml)	Drugs MIC/MMC (Concentration: µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	2000 / *	3.9 / 124 (amoxicillin)
<i>Micrococcus luteus</i> (ATTC 2225)	2000 / *	3.9 / 500 (erythromycin)
<i>Bacillus subtilis</i> (16-UFPEDA)	* / *	3.9 / 2000 (erythromycin)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (39-UFPEDA)	1000 / *	3.9 / 31.25 (ciprofloxacin)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (71-UFPEDA)	15.6 / 1000	3.9 / 250 (Amoxicillin)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC6057)	2000 / *	3.9 / 250 (Amoxicillin)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	* / *	3.9 / 7,81 (ciprofloxacin)
<i>Serratia sp</i> (398-UFPEDA)	* / *	3.9 / 250 (ciprofloxacin)
<i>Candida albicans</i> (1007-UFPEDA)	31.2 / *	3.9 / 62.5 (ketoconazole)
<i>Staphylococcus aureus</i> (CI, 731-UFPEDA, wound Secretion-HC, ORSA)	* / *	7.81 / 2000 (amoxicillin)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CI, 736-UFPEDA, wound Secretion-HC)	2000 / *	15.62 / 2000 (ciprofloxacin)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (CI, 739-UFPEDA, wound Secretion-HC)	* / *	7.81 / 125 (ciprofloxacin)

CI: Clinical isolates

HC: Hospital clinical

MIC: Minimum Inhibitory Concentration (MIC, µg/ml).

MMC: Minimum Microbicidal Concentration (MMC, µg/ml).

(*) = Not MIC or MMC.

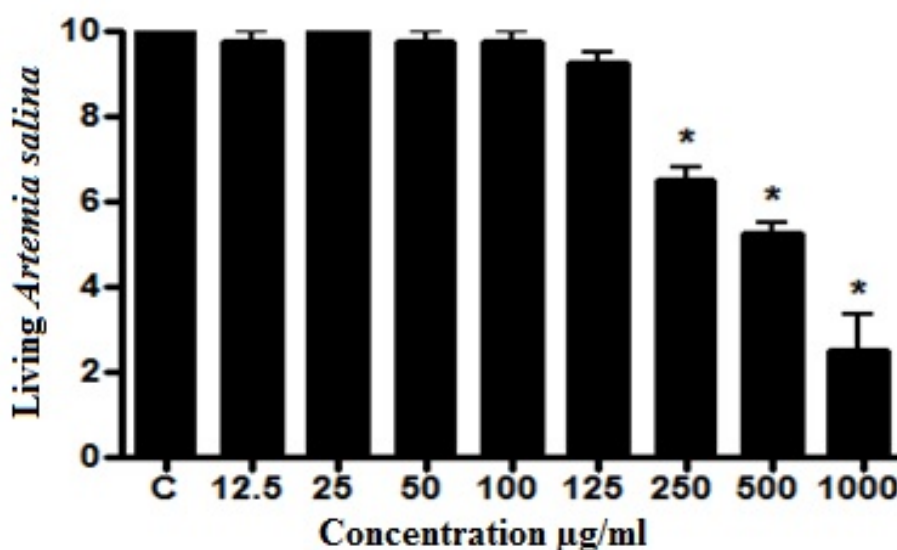
The aqueous extract of the *Alternanthera brasiliana* showed *in vitro* antimicrobial activity against one or more bacterial strains and the yeast tested.

The *Mycobacterium smegmatis* strain (71-UFPEDA) was sensitive to aqueous extract of *Alternanthera brasiliana* with MIC of 15.6µg/ml and MBC of 1.000µg/ml. The *Candida albicans* yeast (1007-UFPEDA) presented their growth inhibited efficiently MIC: 31.2µg/ml.

The other microorganisms studied showed a positive MIC: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) - MIC: 2000µg/ml, *Micrococcus luteus* (ATTC 2225) - MIC: 2000µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* (39-UFPEDA) - MIC: 1000µg/ml, *Enterococcus faecalis* (ATCC6057) - MIC: 2000µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* (CI,736-UFPEDA, wound Secretion-HC) - MIC: 2000µg/ml. Antimicrobial activity was negative for: *Bacillus subtilis* (16-UFPEDA), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Serratia sp*, (398-UFPEDA) *Staphylococcus aureus* (CI, 731-UFPEDA, wound Secretion-HC, ORSA), *Enterobacter aerogenes* (CI, 739-UFPEDA, wound Secretion-HC).

The results of toxicity assay against the *Artemia salina* can be seen in Figure 1 showing a low toxicity of the extracts tested of 500 µg/ml. The toxicity began to be significant at a concentration of 250 µg/ml. The concentrations of 250 µg/ml, 500 µg/ml and 1000 µg/ml differ statistically among themselves. It is relevant to note that concentrations below 250 µg/ml the extract hasn't significant toxicity (figure 1). The low toxicity can be considered an interesting characteristic to use of plant extracts for medicinal purposes and in the formulations of phytotherapics.

Figure 1
Lethal cytotoxicity assay (LC₅₀) of *Alternanthera brasiliensis* against *Artemia salina*



(*) = showed statistically significant differences in relation to the control.

The low toxicity of plant observed in this study suggests that the plant extract is safe and can be used for medicinal purposes.

3.2. Discussion

The use of nature products is increasing worldwide, mainly due to the problems that are attributed to synthetic products which cause damage to both health and for the environment (Machado and Fernandes Junior, 2011).

Excessive production of reactive oxygen species (ROS) and reactions leading to production of free radicals can lead to cellular oxidative stress, that can cause degenerative or pathologies diseases (Sun et al., 2011).

The increased level of ROS can damage the structure of biomolecules and modify their functions, leading to cell dysfunction and even to the cell death. The Brazilian rich flora and fauna led to the formation of organisms capable of producing various molecules with antioxidant action and these natural substances can be an important strategy for control of various diseases (Mishra et al., 2012).

Alternanthera brasiliensis proved to be a promising source of antioxidant compounds as shown in Table 1. The natural pigments possess important biological activities. Its beneficial effects to the health are related to their antioxidant properties, protecting against oxidative damage to cellular components, anti-inflammatory effects and prevention of chronic not transferable diseases (Volp et al., 2009). Polyphenols and betalains possess antioxidants properties beneficial to human health (Khattabi et al. 2013). The family Amaranthaceae plants are rich in betacyanin (Cai et al., 2005).

Caetano et al. (2002) detected the presence of terpenoids and pigment betacyanin in *Alternanthera Brasiliensis* and this pigment extracted from the leaves, are from the betalains class and are widely used to treat skin lesions. These pigments confer the color red (or violet) to the stems and leaves of this plant and, less often, to flowers and fruits (Silva et al., 2005).

Pereira et al., (2013) investigated the antioxidant activity by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl method. Only ethyl acetate fraction exhibited a modest scavenging capacity ($SC_{50} = 163.00 \mu\text{g/mL}$ and $SC\% = 64.29\%$ at $250 \mu\text{g/mL}$) in a dose-dependent manner. Crude extract, dichloromethane and butanolic fractions presented a very weak scavenging capacity ($SC\% \leq 40\%$ at $250 \mu\text{g/mL}$).

Besides the health problems related to oxidative stress, there is a great concern of researchers with infectious diseases caused by microorganisms. Infectious diseases remain a major cause of death worldwide. Antimicrobial resistance is a serious problem throughout

the world, which is very important and need more search for new antimicrobial agents. (Padilha et al., 2010; Miranda et al., 2013).

Nowadays, there are very few or none, if any, antibiotics to which these microorganisms have not developed resistance. Plant extracts are potential sources of antimicrobial agents. (Tekwu et al., 2012). The industry focus on screening programs to identify new antibiotics from natural sources (KUMAR et al., 2010).

Numerous studies demonstrated that the extracts of other plant species possessed activity with regard to antimicrobial properties (Okoli and Iroegbu, 2004; Parekh et al., 2005; Geyid et al., 2005; Mbaveng et al., 2008; Kuete, 2010; Tekwu et al., 2012). The antimicrobial activity of *Alternanthera brasiliana* (Table 2) presented MIC and MMC values for antifungal activity of the extract evaluated using *Candida albicans* with a significant inhibition. The therapy for fungal infections caused by opportunistic pathogens such as *Candida albicans* remains a major medical challenge (Sangetha et al., 2009). Infection by *C. albicans* leads to the formation of a biofilm which is resistant to the penetration of antifungal agents (Sangetha et al., 2009). In this context the *Alternanthera* has demonstrated a potential anticandidal.

Caetano et al. (2002) conducted a study with hydroalcoholic crude extract of *Alternanthera brasiliana* against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 and ATCC 9144) and *Staphylococcus aureus* hospital isolates (methicillin resistant and non-resistant) strains. The extract of *Alternanthera brasiliana* used at a concentration of 65 mg/ml showed halos up to 22 mm. This extract show an action very similar to control, tetracycline hydrochloride (1 mg /ml) used as standard, with inhibition zones up to 34 mm. The standard was used at concentrations lower than the extract.

In the present study, the aqueous extract of *Alternanthera brasiliana* inhibited *Staphylococcus aureus* strain (ATCC 6538) MIC: 2000 µg/ml in lower concentration than the used in the study of Caetano et al (2002).

Our data showed differences between MIC values on the microorganisms studied (Tabela 2). These differences found among the microorganisms against antimicrobial substances in plant extracts may be explained by the cell wall composition or the quantity and quality of the bioactive molecule in the plant extracts.

Several biological assays have been developed in order to be used in the monitoring of plant extracts, among these, the toxicity on *Artemia salina*, which is a quick and convenient bioassay as prior monitoring of plant extracts. By using this method, it is possible

to determine the 50% lethal concentration (LC_{50}) of active compounds and extracts in a saline environment. The test allows the assessment of general toxicity and hence is considered essential as a preliminary bioassay in the study of compounds with potential biological activities.

Thus, it can be inferred that the *Alternanthera brasiliana* leaf extract presented results that are favorable for studies on the biological activity of this plant. The toxicity presented by the extract (Figure 1) becomes important in directing for isolation and identification of compounds present in the plant, which can be used for future research of herbal Medicines.

Our investigations showed that *Alternanthera brasiliana* has antioxidant and antimicrobial properties showing that this plant possess biological potential for development new medicines herbal. According to Schenkel et al. (2001), it is possible that the pharmacological activity be due to the action of more than one component, which may possibly act on the same biochemical processes as well as in other ways, modifying solubility, absorption or changing phenomena influencing the stability.

4. Conclusion

In the present study, we demonstrated that the aqueous extract *Alternanthera brasiliana* sheet are sources of antioxidants and antimicrobials with low toxicity. Other future work must be carried out because the compreensão of action of the extract in the capture free radicals and antimicrobial activity are of great importance for the development of new drugs, and possible use in the prevention of many global diseases.

Acknowledgement

The authors acknowledge the support given by the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Department of Biochemistry and Department of antibiotics the University Federal of Pernambuco (UFPE) and the Committee for the Amelioration of Superior Education (CAPES).

References

- Bhattacharya, S., Ahmed, K., Chakraborty, S., 2011. Free Radicals and Cardiovascular Diseases: An Update. *Free Radicals and Antioxidants* 1, 17-22.
- Bianchi, M. L. P., Antunes, L. M. G., 1999. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Revista de Nutrição Campinas* 12, 123-130.
- Bresolin, T.M.B., Cechinel Filho, V., 2010. *Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Santos 416-2010.
- Brochado, C.O., Almeida, A.P., Barreto, B.P., Costa, L.P., Ribeiro, L.S., Pereira, R.L.C., Koatz, V.L.G., Costa, S.S., 2003. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14, 449–451.
- Caetano, N., Saraiva, A., Pereira, R., Carvalho, D., Pimentel, M. C. B., Maia, M. B. S., 2002. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12, 132-135.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H., 2005. HPLC haracterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. *Journal of Chromatographic Science* 43, 454-60.
- CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 2006. CLSI approved standard M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 17 ed.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C., 1992. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 324-325.
- Das, K., Tiwari, R.K.S., Shrivastava, D.K., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 104-111.
- Delaporte, R.H., Sánchez, G.S., Cuellar, A.C., Mello, J.C.P., 2001. Quality control and anti-inflammatory activity of the plant *drugs Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze and *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 20, 39–45.
- De Souza, M.M., Kern, P., Floriani, A.E.O., Cechinel-Filho, V., 1998. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. *Phyton Re.* 12, 279-281.
- Dogru, Z., Nacar, T., Unal, D., Aksak, S., Albayrak, A., Odabasoglu, F., Cetin, N., Karakus, E., Gundogdu, C., Gumustekin, K. E Unal, B., 2012. Effects of diabetes mellitus and postmenopausal period on the lungs of rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6, 1989-2010.

Geyid, A., Abebe, D., Debella, A., Makonnen, Z., Abera, F., Teka, F., Kebede, T., Urga, K., Yersaw, K., Biza, T., Mariam, B.H., Guta, M., 2005. Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 421–427.

Gomez-Pinilla, F., Nguyen, T., 2012. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience* 15, 127-33.

Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaky, N.; Takeshita, A., 2001. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation Research* 88, 529-535.

Khatabi, O., Hanine, H., Elothmani, D., Hasib, A., 2013. Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*). *Arabian Journal of Chemistry*.

Konrath, E. L.; Neves, B. M.; Lunardi, P. S.; Passos, C. S.; Simões-Pires, A.; Ortega, M. G.; Gonçalves, C. A.; Cabrera, J. L.; Moreira, J. C. F.; Henriques, A. T. 2012. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 139, 58-67.

Kuete, V., 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Medica* 76, 1479-1491.

Kumar, C. G., Mongolla, P., Joseph, J., Nageswar, Y.V.D., Kamal, A., 2010. Antimicrobial Activity from the Extracts of Fungal Isolates of Soil and Dung Samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Journal de Mycologie Médicale* 20, 283-289.

Lagrota, M.H.C., Wigg, M.D., Santos, M.M.G., Miranda, M.M.F.S., Camara, F.P., Couceiro, J.N.S.S., Costa, S.S., 1994. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae) against the Herpes simplex virus. *Phytotherapy Research* 8, 358-36.

Lang, Y., Chen, D., Li, D., Zhu, M., Xu, T., Zhang, T., Qian, W., Luo, Y. J., 2012. Luteolin inhibited hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration by suppressing the src and akt signalling pathways. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64, 597-603.

Lima, C. R., Vasconcelos, C. F., Costa-Silva, J. H., Maranhão, C. A., Costa, J., Batista, T. M., Carneiro, E. M., Soares, L. A., Ferreira, F., Wanderley, A. G. J., 2012. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 141, 517-525.

Lima, D. F., Brandão, M. S., Moura, J. B., Leitão, J. M., Carvalho, F. A., Miúra, L. M., Leite, J. R., Sousa, D. P., Almeida, F. R. J., 2012. Antinociceptive activity of the monoterpene α -

phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 64, 283-292.

Machado, B. F. M. T., Fernandes Junior, A., 2011. Óleos Essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Academicos Tubarão* 3, 105-127.

Malhotra, A., Nair, P., Dhawan, D. K., 2012. Premature mitochondrial senescence and related ultra structural changes during lung carcinogenesis modulation by curcumin and resveratrol. *Utrastructural Pathology* 36, 179-184.

Markesbery, W. R., Lovell, M. A., 2006. DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 2039-2045.

Mbaveng, A.T., Ngameni, B.L.M., Kuete, V., Simo, I.K., Ambassa, P.O., Roy, R., Bezabih, M., Etoa, F.X., Ngadjui, B.T., Abegaz, B.M., Meyer, J.J.M., Lall, N., Beng, V.P., 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 116, 483-489.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents *Planta Medica* 45, 31-34.

Miranda, G.S., Santana, G.S., Machado B.B., Coelho, F.P., Carvalho, C.A., 2013. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista brasileira de plantas medicinais* 15.

Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. K., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 130, 1036-1043.

Mulaudzi, R. B., Ndhala, A. R., Kulkarni, M. G., Van Staden, 2012. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 185-193.

Niu, X., Xing, W., Li, W., Fan, T., Hu, H., Li, Y., 2012. Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects *in vivo* and inhibited TNF- α production in LPS-induced mouse peritoneal macrophages *in vitro* via the MAPK pathway. *Immunopharmacology* 14, 164-171.

Okoli, A.S., Iroegbu, C.U., 2004. Evaluation of extracts of *Anthocleista djalensis*, *Nauclea latifolia* and *Uvaria afzalii* for activity against bacterial isolates from cases of non-gonococcal urethritis. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 135-144.

PADILHA, I.Q.M., 2010. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20, 45-47.

Parekh, J., Jadeja, D., Chanda, S., 2005. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turkish Journal of Biology* 29, 203-210.

- Pereira, D. F., Zanon, R. B., Dos Santos, M., Boligon, A. A., Athayde, M. L., 2013. Antioxidant activities and triterpenoids isolated from *Alternanthera brasiliensis* (L.) Kuntze leaves. *Natural Products Research* 27, 1660-1663.
- Volp, A.C.P., Renhe, I.R.T., Stringueta, P.C., 2009. Pigmentos Naturais Bioativos. *Alimentos e Nutrição* 20, 157-166
- Prakash, D., 2007. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *International Journal of Food Science and Nutrition* 58, 18-28.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Sangetha, S., Zuraini, Z., Suryani, S., Sasidharan, S., 2009. In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activities and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. *Micron* 40,439-443.
- Schenkel, E. P., Gosmann, G., Petrovic, P. R., 2001. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento e medicamentos In: *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Editora UFSC.
- Silva, N. C. B., Macedo, A. F., Lage, C. L. S., Esquibel, M. A., Sato, A., 2005. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation, growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliensis* (L.) kuntze cultured *in vitro*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 779-786.
- Smith, L.B., Downs, R.J., 1972. Amarantáceas. *Flora Ilustrada Catarinense*, fasc. AMAR 69, 71.
- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zkang, L., 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2689–2696.
- Takamura, O.S., 2008. Editorial: Tendências no estudo de Plantas medicinais. *Arquivos de Ciências da Saúde Unipar, Umuarama* 12,165-274.
- Tekwu, E. M., Pieme, A.C., Beng, V.P., 2012. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology* 142, 265-273.
- Vokurkova, M., Xu, S., Touyz, R. M., 2007. Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. *Future Cardiology* 3, 53-63.
- Wang, Z., Hsu, C., Yin, M., 2009. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. *Food Chemistry* 112, 914–918.

7. CONCLUSÃO

- A partir dos estudos realizados podemos concluir que a *Alternanthera brasiliana* tem um grande potencial biotecnológico. Sua diversidade de usos encontrados na literatura confirma a sua potencialidade.
- Há um grande número de pessoas acometidas por doenças crônicas não transmissíveis associadas à ação de radicais livres, e doenças infecciosas causadas por micro-organismos, que constitui um problema de saúde pública.
- Nesse contexto *A. brasiliana* pode ser uma alternativa para estas problemáticas.
- São necessários maiores investimentos, e principalmente divulgação das qualidades desta Amaranthaceae.
- A identificação de novos compostos naturais efetivamente mais úteis como candidatos a protótipos de fármacos inovadores merece mais atenção no sentido de investigá-los e avaliá-los para que possam vir a atuar de forma mais específica e seletiva, com menos efeitos adversos.
- Considerando-se a necessidade da busca de novos compostos de interesse medicinal e os promissores resultados mencionados pela sabedoria popular e pelo presente estudo, *A. brasiliana* mostrou ser uma espécie promissora para o desenvolvimento de fármacos.
- Não se tem relatos de fitoterápicos desenvolvidos com o extrato dessa planta. O que seria uma possibilidade de se obter um medicamento natural eficiente e de baixo custo a população.

8. ANEXOS

I Simpósio Internacional de Mitocôndria e Metabolismo

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E AÇUCARES REDUTORES NO EXTRATO DA FOLHA DE *Alternanthera brasiliana*

Uchôa, A. D. A.^{1,2}; Santos, M. M.^{1,2}; Silva, C. S.¹; Araújo, H.D.A.²; Silva, E. P.¹; Pimentel, M. C. B.^{1,2}; Silva, M. P. C.^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ²Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife/PE E-mail: amandabiologa1@gmail.com

Introdução: Terramicina (*Alternanthera brasiliana*), planta nativa do Brasil, pertencente à família Amaranthaceae é utilizada na medicina popular no tratamento de diversas patologias, sendo comprovadas a ação anti-inflamatória, analgésica e ainda a atividade inibidora do vírus do herpes simples. As folhas de terramicina têm propriedades desinfectantes e podem ajudar a curar feridas ulcerosas. Nas Guianas as folhas são usadas como adstringente e antidiarréica e a planta inteira em maceração para prisão de ventre.

Objetivo: Visando que os componentes sintetizados por essa planta apresentem atividade biológica de interesse medicinal, buscamos avaliar o teor de proteínas e açúcares redutores, com finalidade de se obter um maior conhecimento sobre as biomoléculas contidas no extrato.

Métodos e Resultados: O experimento foi realizado no laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE. A planta foi coletada no Agreste Pernambucano na cidade de Limoeiro. Para a obtenção do extrato aquoso foi utilizado material vegetal fresco (folha), sendo primeiramente pesado (295g), e em seguida triturado com o auxílio de um liquidificador contendo 1L de água ultra-pura, logo após foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min. Para quantificar a concentração de proteínas foi utilizado método de Lowry (J. Biol. Chem. 193:265, 1951), o qual foi obtido 3,95 µg/ml de proteínas. E a determinação de açúcares redutores foi obtida pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNSA) - Miller (Analytical Chem. 31:426, 1959) no qual quantificou 7,9008 mg/ml.

Conclusão: Os resultados confirmam que o extrato da folha de *Alternanthera brasiliana* possuem proteínas e açúcares redutores, diante disso é necessário maiores estudos da composição de biomoléculas da espécie, pois o isolamento e identificação de suas moléculas e a compreensão de sua ação são de suma importância para o desenvolvimento de novas drogas, e possível utilização na prevenção e no tratamento de diversas doenças.

Apoio financeiro: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE)



Investigation of Chemical Compounds Contained in Aqueous Extract of Leaf *Alternanthera brasiliensis*

Uchôa, A. D. A.^{1,2}; Santos, M. M.^{1,2}; Silva, C. S.¹; SILVA, R. A.¹; Pimentel, M. C. B.^{1,2}; Silva, M. P. C.^{1,2}

¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), ² Department of Biochemistry, UFPE, PE, Brazil

Alternanthera brasiliensis known as penicillin or terramycin is used in folk medicine due to anti-inflammatory, analgesic and inhibits the herpes simplex virus. The high pharmacological potential demonstrated by its usage justifies the present work on the investigation of the compounds contained in the aqueous extract of the leaves. The experiments were performed in LIKA-UFPE. The plant was collected in Limoeiro-PE, and the fresh leaves used in preparing aqueous extract. We used the following spectrophotometric methods: Proteins - Lowry *et al.* (1951) and Microbiureto (Goa *et al.*, 1953), reducing sugars - DNSA - (Miller *et al.*, 1959); uronic acids - Carbazole - Sulfuric (Dische *et al.*, 1962); tannins - Ferric chloride (Hagerman *et al.*, 1978); total polyphenols - Folin Ciocalteu (Hua - Bin Li *et al.*, 2008). The protein profile was obtained using SDS-PAGE. The results showed: reducing sugars (7.91 mg / ml), uronic acids (320.26 µg / ml), tannins (325.92 µg / ml) and polyphenols (326.75 µg / ml) that constitute an auxiliary strategy as refers to the search for new therapeutic agents. While the dosage of protein by the Lowry method (3.95 g / ml) was not confirmed by microbiureto (presence of peptide bonds), SDS-PAGE electrophoresis showed several protein bands between 45 and 66 kDa, 14 and 21 kDa, and below 14 kDa. Preliminary results show that the aqueous extract of this plant contain molecules with great biotechnological potential for the development of new drugs with potential application in the prevention and treatment of various diseases overall.

Word Keys: *Alternanthera brasiliensis*, *Alternanthera*, medicinal plant
Supported by: LIKA, UFPE, CNPq and CAPES

IV Simpósio Internacional em Diagnóstico e Terapêutica

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE POTENTIAL CYTOTOXIC OF *Alternanthera brasiliana* (L.) LEAF EXTRACT

Uchôa, A. D. A.^{1,2}; Silva, C. S.¹; Silva, R. A.¹; Santos, M. M.^{1,2}; Silva, N. H.²; Pimentel, M. C. B.^{1,2}; Silva, M. P. C.^{1,2}

¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), ² Department of Biochemistry, UFPE, PE, Brazil

Alternanthera brasiliana belonging to the Amaranthaceae family, popularly known as "terramycin" and "penicillin", it is widely used in the treatment of various pathologies, and these compounds proved to be anti-inflammatory, analgesic, inhibiting herpes simplex virus and lymphocyte proliferative. The components synthesized by this plant present biological activity of pharmacological interest. In a view of this, it was proposed to chemically characterize and assess the lethal cytotoxicity of extract in attempt to investigate whether these new bioactive sources are subject to adverse health effects, and support possible developments of new drugs. The results showed the values of: total sugars (1340.54 µg/ml), reducing sugars (7.91 mg/ml), uronic acids (320.26 µg/ml), tannins (325.92 µg/ml) and polyphenols (326.75 µg/ml). While the protein content estimated by using the Lowry method (3.95 µg/ml) was not confirmed by microbiureto (presence of peptide bonds), the SDS-PAGE electrophoresis showed several protein bands between 45KDa and 66 KDa, 14KDa and 21 kDa, and below 14 kDa. The thin layer chromatography showed the presence of monosaccharides, especially glucose, mannose and ribose. The lethal cytotoxicity (LC50) using *Artemia salina* was of 500mg/ml. The aqueous extract from the *Alternanthera brasiliana* leaves possess molecules with a high biotechnological potential and with low cytotoxicity that constitute a complementary study as regards as search for new therapeutic agents. This motivates further studies for the identification and isolation of active principles responsible for these molecules that can be used in the pharmaceutical industry.

Word Keys: *Amaranthaceae*, Terramycin, cytotoxicity

Supported by: LIKA, UFPE, CNPq and CAPES

World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Alternanthera brasiliana leave extracts: evaluation of antimicrobial and antioxidant activities

A.D.A.Uchôa^{1,2}, C.S.Silva^{1,2}, R.A.Silva¹, P.G.Cadena^{1,2}, N. B. Gusmão⁴, M.P.C.Silva^{1,2}, M.C.B.Pimentel^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA/UFPE, ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brazil - CEP: 50670-901 | Tel: (81) 2126.8000, ³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA/UFRPE), ⁴Departamento de Antibióticos (UFPE) e-mail: mcbarneiro@yahoo.com.br.

INTRODUCTION

In folk medicine, *Alternanthera brasiliana* is widely used in the treatment of various pathologies, including anti-inflammatory action (DELAPORTE, et al, 2001), analgesic (DE SOUZA, 1998), inhibiting herpes simplex virus (LAGROTA et al 1994), antiproliferative activity of lymphocytes (BROCHADO et al., 2003), antimicrobial (CAETANO et al., 2002). Oxidative stress induced by free radicals is considered a primary factor in neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson (GOMEZ-PINILLA AND NGUYEN, 2012). Antioxidant compounds may be defined as substances that when present at low concentrations compared to oxidizable substrate, are able to substantially inhibit or retard oxidation of this substrate (NIKI, 2010). The high uronic acids could promote the antioxidant activities (REDOUAN et al., 2011). Polyphenols and betalains have owned the beneficial antioxidants to human health (KHATABI et al. 2013) and plants of the Amaranthaceae family are rich in betacyanin (CAI et al. 2005). The popular use and the potential of herbal sources for new bioactive compounds lead to these studies about carbohydrate content and antioxidant and antimicrobial activities evaluation of the *A. brasiliana* extracts.

EXPERIMENTAL METHODS

Plant Material

The leaves of the *Alternanthera brasiliana* were collected in the Limoeiro-PE, Brazil town. The samples were brought to the Immunopathology Keizo Asami (LIKA) - UFPE laboratory. This plant was identified by Dr. Marlene Barbosa de Alencar of the Botany Department and cataloged in the herbarium (UFPE) under n° 21846.

Preparation of the Leave Extracts

The aqueous extract was prepared with fresh leaves (295 g) blended with ultrapure water (1 L) and centrifuged at 10,000x g for 30 min. For methanol extract, leaves (25 g) were fragmented and placed in the Erlenmeyer flask containing a mixture of methanol:water (3:1) at boiling and stirring for 20 minutes. The extract was filtered, dried at 50 °C and the residue dissolved in methanol.

Determination of Carbohydrates

Total sugars and uronic acids were determined using Phenol - sulfuric and Carbazole - Sulfuric methods, respectively. The experiments were carried out in triplicate. The identification of carbohydrates was performed by Thin Layer Chromatography (TLC) using silica gel chromatoplates F₂₅₄ (fast eluting), thickness of 0.25 mm. The elution system (monosaccharides): acetone/n-butanol/distilled water (40:5:5 v/v/v), revealed with: 2% diphenylamine in acetone; 2% aniline in acetone and 85% orthophosphoric acid (5:5:1 v/v/v). The standards (10 mg/mL): glucose, fructose, galactose, mannose and ribose. For disaccharides and polysaccharides the elution system: n-propanol/ethyl acetate/distilled water (15:30:5 v/v/v) and revealed with the same solution used for monosaccharides. The standards (10 mg/mL): sucrose, maltose and lactose, starch, inulin, pectin and CM-cellulose.

Antioxidant Activity of *A. brasiliana* using 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS)
According to Re et al. (1999), the ABTS assay is based on the generation of chromophore cationic radical (ABTS^{•+}) obtained from the oxidation of ABTS by potassium persulfate. The oxidation reaction was prepared with 7 mM ABTS stock solution and 140 mM potassium persulfate (final concentration). The mixture was left in the dark at room temperature (23–25 °C) for 12–16 h (time required for radical formation) before its use. The ABTS^{•+} solution was diluted in ethanol to an absorbance 0.7 ± 0.02 units at 734 nm. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was reference standard. The values of oxidative inhibition percentage were calculated, plotted and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, µM). All assays were carried out in triplicate.

Antimicrobial activity

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the broth microdilution performed in 96-well plates and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) method according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEA-39), *Serratia* sp (UFPEA-398), *Candida albicans* (UFPEA-1007). The microorganisms were

provided by the Antibiotic Department (UFPE). Dried aqueous extract samples were prepared in DMSO. The antibiotics (20 mg/mL) used: Ciprofloxacin and Clotrimazole. All assays were carried out in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained with regard to the total concentration of neutral sugars and uronic acids are summarized in Table 1. The thin layer chromatography showed the presence of monosaccharides, disaccharides and polysaccharides (Figures 1, 2, 3). The *A. brasiliensis* is rich in carbohydrates, particularly acids, important for cell metabolism and antioxidant capacity.

Variable	Aqueous Extract (µg/mL)
Total sugar	1340.54
Uronic acid	320.26

Table 1. Determination of carbohydrates in aqueous extract of *Alternanthera brasiliensis* leaves



Figure 1. (A, B, C) TLC profile of aqueous (Aq II) and methanol (Met II) extracts from *Alternanthera brasiliensis* leaves. The standards, from left to right: A - (Glucose-Glu-Fru, galactose-Gal, mannose-Man, Rib-ribose). B - (Lactose-Lac, maltose-Malt e sucrose-Suc). C - (Inulin-Inul, pectin-Pec e CM-cellulose-CM-Cel)

Antioxidant activity of aqueous extract from *A. brasiliensis* leaves in function of time is shown in Table 2, with an oxidative inhibition of $94.57 \pm 0.29\%$ after 120 min, equivalent to TEAC of $2084.66 \pm 7.07 \mu\text{M}$ Trolox. It was obtained significant antioxidant activity as a function of time that it was gradually increasing, remaining practically constant, then after 120 minutes (50%) between the start and end time.

Time	% Inhibition	TEAC* (μM Trolox)
5 min	51.31 ± 2.47	1054.66 ± 58.92
15 min	59.35 ± 0.60	1329.66 ± 103.71
30 min	76.86 ± 3.75	1662.99 ± 89.57
45 min	74.24 ± 4.73	1599.66 ± 113.13
60 min	77.84 ± 5.14	1686.33 ± 122.57
120 min	94.57 ± 0.29	2084.66 ± 7.07

Table 2. Antioxidant activity (AITS*) of *Alternanthera brasiliensis*

Mean $\pm$ SD, n = 3. *TEAC = Antioxidant Activity Equivalent to Trolox.

Antimicrobial results of the aqueous extract of *A. brasiliensis* are summarized in Table 3 and standard antibiotics in Table 4. The results confirm that *A. brasiliensis* leaves contains antioxidant and antimicrobial compounds, which can be use as alternative therapy for global diseases.

Microorganisms	MIC (µg/mL)	MMC (µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	(1000)
<i>Serratia sp</i>	+	(3.9)
<i>Candida albicans</i>	+	(31.25)

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, µg/mL) and Minimum Microbial Concentration (MMC, µg/mL) of *Alternanthera brasiliensis*

Microorganisms	MIC (µg/mL)	MMC (µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	(3.9)
<i>Serratia sp</i>	+	(3.9)
<i>Candida albicans</i>	+	(3.9)

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, µg/mL) and Minimum Microbial Concentration (MMC, µg/mL) of antibiotics used as standard. (+) = Positive or (-) = Negative for growth inhibition or cellular viability

CONCLUSION

The results confirm that *Alternanthera brasiliensis* leaves contains antioxidant and antimicrobial biomolecules.

REFERENCES

- Brochado, C.D., Almeida, A.P., Barreto, B.P., Costa, L.P., Ribeiro, L.S., Pereira, R.L.C., Kozak, V.L.G., Costa, S.S. Flavonol robinobiosides and rutosides from *Alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. J. Braz. Chem. Soc. 34: 449-451 (2003).
- Cai, Y.; Sun, M.; Corcos, H. HPLC characterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. J. Chromatograph, 43: 454-50 (2005).
- Caciano, N.; Sami, A.; Pereira, R.; Carvalho, D.; Pinheiro, M. C. B., Maia, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. Revista Brasileira de Farmacognosia, 12:132-135 (2002).
- CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 2006. CLSI approved standard M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 17 ed.
- Delaporta, R.H., Milanese, M.A., Mello, J.C.P., Jacomani, E. Pharmacognostic analysis of the leaves of *Alternanthera brasiliensis* (L.) Karst (Amaranthaceae). Acta Farm. Bot. 21, 169-174 (2002).
- De Souza, M.M., Kern, P., Floriani, A.E.O., Cochinal-Filho, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliensis*. Phyt. Res. 12:279-281 (1998).
- Dische, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. Journal of Biological Chemistry, 167:189-198 (1974).
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Biochemistry, 28:350-356 (1956).
- Gomez-Pinilla, F. E.; Nguyen, T. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. Nutr. Neurosci. 15:127-33. (2012).
- Khatibi, O.; Hanine, H.; Elchamari, D.; Hach, A. Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*). Arabian Journal of Chemistry (2013).
- Lagoda, M.H.C.; Wigg, M.D.; Santos, M.M.G.; Minoda, M.M.F.S.; Casura, F.P.; COELHO, J.N.S.S.; Costa, S.S. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae) against the Herpes simplex virus. Phytotherapy Research. 8:355-36 (1994).
- Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radical Biology and Medicine 49: 503-515. (2010).
- Re, R.; Pellegrini, N.; Protopopescu, A.; Pantale, A.; YANG, M.; BOCE-IVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved AITS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26:1231-1237.
- Redouan, E.; Elmansal, P.; Michèle, P.; Bernard, C.; Joana, C.; Clélie, D. Evaluation of antioxidant capacity of ulvae-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan xopolysaccharide. Food Chemistry, 127:976-983 (2011).