

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

RAFAEL RODRIGUES TOMEI

**PROSPECÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM *Alternanthera maritima*
(PLANTA *in natura* E OBTIDA POR CULTURA DE CÉLULAS)**

São José dos Campos, SP
2008

RAFAEL RODRIGUES TOMEI

**PROSPECÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM *Alternanthera maritima*
(PLANTA *in natura* E OBTIDA POR CULTURA DE CÉLULAS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade do Vale do Paraíba como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador

São José dos Campos, SP
2008

T618p

Tomei, Rafael Rodrigues

Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células)/ Rafael Rodrigues

Tomei. São José dos Campos: UniVap, 2008.

1 Disco laser.: color

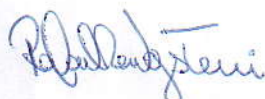
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento-Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

1. Antioxidantes 2. Fitoquímica 3. Cultura de células vegetais 4. Fitoterapia I. Salvador, Marcos José, Orient II. Título.

CDU: 615.322

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data: 29/02/2008

RAFAEL RODRIGUES TOMEI

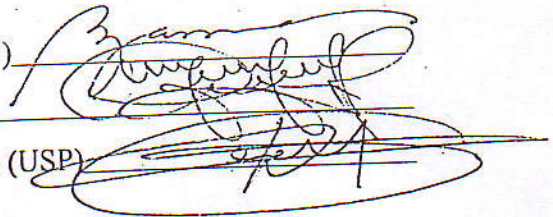
**“PROSPECÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALTERNANTHERA
MARITIMA (PLANTA IN NATURA E OBTIDA POR CULTURA DE
CÉLULAS)”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dra. STELLA REGINA ZAMUNER (UNIVAP)

Prof. Dr. MARCOS JOSÉ SALVADOR (UNIVAP)

Prof. Dr. WANDERLEY PEREIRA DE OLIVEIRA (USP)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 29 de fevereiro de 2008.

Apoio Financeiro: FAPESP

Dedicatória

*Dedico este trabalho às pessoas
mais importantes da minha vida:*

Ao meu avô **Joaquim** (*in memóriam*)

Aos meus pais **Soledad e Odair**

Ao meu irmão **Marcelo**

À minha namorada **Mariana**

E a todos meus **familiares**

Agradeco

A DEUS por tornar tudo isto possível;

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida;

A minha namorada Mariana por ser uma pessoa especial e fundamental em minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos José Salvador pela confiança, pela amizade, e por todos ensinamentos científicos e de vida dispensados, com os quais cresci muito nesta etapa;

Aos amigos e professores do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica;

Aos professores Drs. Suzelei de Castro França e Paulo Sérgio Pereira da UBV/UNAERP pela colaboração nos experimentos com as culturas de células;

A profa. Dra. Yara M. Lucisano-Valim e sua equipe, da FCFRP/USP, pela colaboração nos ensaios de quimiluminescência;

Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e sua equipe, da FCFRP/USP, pela colaboração nos experimentos de espectrometria de massa;

Ao prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira da PUC/RJ pela identificação do material vegetal;

À prof. Dra. Cristina Pacheco Soares por ceder gentilmente seu laboratório para a execução de alguns ensaios;

Às secretárias da Pós-graduação do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Valéria e Ivone;

Às bibliotecárias da UniVap, Rúbia Gravito Gomes e Rosangela Regis Cavalcanti;

À Fapesp pela bolsa de estudos concedida;

A UniVap por permitir a concretização deste mestrado;

Aos meus familiares, principalmente a meu tio Sérgio pelos serviços de informática dispensados;

E a todos amigos e conhecidos que direta ou indiretamente foram parte desta trajetória.

PROSPECÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM *Alternanthera maritima* (PLANTA *in natura* E OBTIDA POR CULTURA DE CÉLULAS)

Resumo

Este estudo teve por objetivo a busca de substâncias com propriedades antioxidantes acumuladas em *Alternanthera maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células). Para tanto adequou-se metodologia de ensaios *in vitro* (ensaios β -caroteno em CCDC, fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, redução do radical DPPH, ORAC_{FL} e quimiluminescência) para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos (etanólico e aquoso), frações e substâncias isoladas de *A. maritima*. O estudo fitoquímico foi guiado pela atividade antioxidante, sendo isolados por métodos cromatográficos diversos (CCC, CCDC e CLAE) e identificados empregando-se a CLAE-UV/DAD por comparação com substâncias padrão e/ou espectrometria de massa (IES-EM) nove flavonóides: duas agliconas (*Quercetina* –A23 e *3-metoxi quercetina* –A11); três O-glicosilados (*Isoramnetina 3-O-a-L-ramnosil (1@6)-b-D-galactopiranosídeo* –A16; *Isoramnetina 3-O-a-L-ramnosil (1@6)-b-D-glucopiranosídeo* –A20 e *Quercetina 3-O-a-L-ramnosil (1@6)-b-D-glucopiranosídeo* –A17) e quatro C-glicosilados (*Vitexina* –A14; *2''-O-a-L-ramnopiranosilvitexina* –A18; *2''-O-a-L-glucopiranosilvitexina* –A19; *5,7 diidroxí-4'-metoxiflavona-8- O-a-L-ramnosil (1@2)-C-b-D-glucopiranosídeo* –A21). Quanto à cultura de células foram obtidos os extratos de *A. maritima* cultivada em dois meios de culturas (T11 e T43) e estes extratos também apresentaram atividade antioxidante, porém com menor intensidade que os da planta *in natura*. Desta maneira, no estudo fitoquímico guiado pela atividade antioxidante foi possível observar a presença de flavonóides como constituintes majoritários nos extratos ativos de *A. maritima*. (planta *in natura* e obtida por cultura de células). Os flavonóides C-glicosilados isolados apresentaram-se pouco ativos (ORAC_{FL}) ou sem atividade (DPPH e quimiluminescência). Os agliconas foram os que apresentaram melhor atividade em todos os métodos, enquanto os flavonóides O-glicosilados apresentaram-se consideravelmente ativos nos métodos DPPH, ORAC_{FL} e quimiluminescência livre de células. Quanto a relação estrutura-atividade, a presença do grupo catecol na estrutura demonstrou ser fator importante para atividade antioxidante, bem como o fato de ser C- ou O-glicosídeo. Em ensaios de citotoxicidade *in vitro* frente a polimorfonucleares (teste de exclusão com Azul de Tripán e atividade da Lactato Desidrogenase), nenhum dos extratos e flavonóides estudados apresentou-se tóxico. Assim procedeu-se o estudo com *A. maritima* para a busca de antioxidantes naturais de maneira a contribuir para a obtenção de novas fontes de insumo para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

Palavras chave: *Alternanthera maritima*, Amaranthaceae, Atividade antioxidante, Flavonóides, Cultura de células vegetais.

ANTIOXIDANT PROSPECTION IN *Alternanthera maritima* (*in natura* PLANT AND FROM CELL CULTURE)

Abstract

The objective of this study was the search of antioxidants compounds accumulated in *Alternanthera maritima* (*in natura* plant and from cell culture). For that, *in vitro* assays were adapted (β -carotene bleaching in TLC assays; total phenol content by Folin-Ciocalteu; DPPH radical reduction; ORAC_{FL}; and chemiluminescence assays) for the evaluation of the antioxidant capacity of the crude extracts (ethanolic and aqueous), fractions and isolated substances of *A. maritima*. The phytochemical study was guided by the antioxidant activity, being isolated by chromatographic methods (CCC, TLC and HPLC) and identified using HPLC–UV/DAD by comparison with standard compounds and/or mass spectrometry (ESI-MS) nine flavonoids: two aglycones (*Quercetin* –A23 and *Quercetin 3-methyl ether* –A11); three O-glycosides (*Isorhamnetin 3-O-a-L-rhamnosyl (1®6)-b-D-galactopyranoside* –A16; *Isorhamnetin 3-O-a-L-rhamnosyl (1®6)-b-D-glucopyranoside* –A20 e *Quercetin 3-O-a-L-rhamnosyl (1®6)-b-D-glucopyranoside* –A17) and four C-glycosides (*Vitexin* –A14; *2''-O-a-L-rhamnopyranosyl-vitexin* –A18; *2''-O-a-L-glucopyranosyl-vitexin* –A19; *5,7 dihydroxi-4'-methoxyflavone-8- O-a-L-rhamnosyl (1®2)-C-b-D-glucopyranoside* –A21). About the cell culture, the extracts of *A. maritima* were obtained in two culture mediums (T11 and T43) and these extracts also showed antioxidant activity, but with lower intensity than *in natura* plant. This way, in the bioassay-guided fractionation it was able to observe the presence of flavonoids as major constituents in the active extracts of *A. maritima* (*in natura* plant and from cell culture). The isolated C-glycosides flavonoids have shown low activity (ORAC_{FL}) or no activity (DPPH and chemiluminescence). The aglycones have shown the best activity in all of the methods, while the O-glycosides flavonoids showed considerably active in the DPPH assay, ORAC_{FL} and chemiluminescence free of cell. About the structure-activity relationship, the presence of the catechol group in the structure showed to be an important factor for the antioxidant activity, as well as the fact of being O or C-glycosides. In the *in vitro* cytotoxicity assays against polymorphonuclears (Tripan Blue exclusion test and Lactate Dehydrogenase activity), none of the extracts or isolated flavonoids were toxic. So, the study with *A. maritima* was proceeded to search for natural antioxidants to contribute for the obtention of new sources for the pharmaceutical, cosmetical and food industries.

Key words: *Alternanthera maritima*, Amaranthaceae, Antioxidant activity, Flavonoids, Plant cell culture.

Lista de Figuras

Figura 1: Espécie <i>Alternanthera maritima</i> em seu habitat natural e obtida por culturas de células em meio semi-sólido (T11 e T43).....	44
Figura 2: Esquema da preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos.....	45
Figura 3: Esquema da preparação dos extratos aquosos liofilizados.....	46
Figura 4: Esquema da partição do extrato etanólico bruto de <i>Alternanthera maritima</i>	47
Figura 5: Etapas do isolamento dos constituintes químicos com atividade antioxidante do extrato em etanol das partes aéreas (Ampae) de <i>Alternanthera maritima</i>	50
Figura 6: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD (coluna C-18, spe, Altech) do extrato etanólico bruto (Ampae) das partes aéreas de <i>Alternanthera maritima in natura</i>	59
Figura 7: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD (coluna C-18, spe, Altech) da fração butanólica (AmpaeEb) do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Alternanthera maritima in natura</i>	59
Figura 8: Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD (coluna C-18, spe, Altech) da fração butanólica (AmpaeEb) do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Alternanthera maritima in natura</i>	61
Figura 9: Flavonóides identificados de <i>Alternanthera maritima</i>	62
Figura 10: Cromatogramas obtidos por CLAE para as substâncias: (a) 3-metoxi-quercetina padrão; (b) substância A11 isolada e (c) 3-metoxi-quercetina padrão + substância A11 isolada.....	63
Figura 11: Espectro de massa de A14, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	65
Figura 12: Espectro de massa de A14, IES-EM, módulo positivo, 30V.....	66
Figura 13: Espectro de massa de A16, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	67
Figura 14: Espectro de massa de A16, IES-EM, módulo positivo, 30V.....	68
Figura 15: Espectro de massa de A17, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	69
Figura 16: Espectro de massa de A17, IES-EM, módulo positivo, 30V.....	70
Figura 17: Espectro de massa de A18, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	71
Figura 18: Espectro de massa de A18, IES-EM, módulo positivo, 30V.....	72
Figura 19: Espectro de massa de A19, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	73
Figura 20: Espectro de massa de A19, IES-EM, módulo positivo, 30V.....	74
Figura 21: Espectro de massa de A20, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	75
Figura 22: Espectro de massa de A20, IES-EM, módulo positivo, 30V.....	76
Figura 23: Espectro de massa de A21, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	77
Figura 24: Espectro de massa de A21, IES-EM, módulo positivo, 30V.....	78
Figura 25: Espectro de massa de A23, IES-EM, módulo negativo, 30V.....	79
Figura 26: Cromatogramas obtidos por CLAE UV/DAD (coluna C-18, spe, Altech) do extrato etanólico (Ampae) e da fração butanólica (AmpaeEb) das partes aéreas de <i>Alternanthera maritima in natura</i> X extratos obtidos por cultura de células nos meios T11 e T43 (Am T11 e Am T43).....	81
Figura 27: Comportamento cinético das amostras Ampae, AmpaeEb e Trolox na concentração de 12,5 µg/mL (percentagem de redução do radical DPPH em função do tempo em minutos).....	83

Figura 28: Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH (em porcentagem, %) do extrato Ampae, da fração AmpaeEb e dos controles positivos quercetina e trolox.....	84
Figura 29: Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH (em porcentagem, %) dos flavonóides isolados de <i>Alternanthera maritima</i>	85
Figura 30: Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH dos extratos das culturas de células (AmT11 e AmT43) e do extrato etanólico (Ampae) de <i>Alternanthera maritima</i> planta <i>in natura</i>	86
Figura 31: Efeito da concentração do Trolox na curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína.....	89
Figura 32: Curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína frente as seguintes amostras: extrato Ampae e fração AmpaeEb de <i>Alternanthera maritima</i> , branco e Trolox.....	89
Figura 33: Efeito do extrato etanólico bruto de <i>Alternanthera maritima</i> (Ampae) e de sua fração butanólica (AmpaeEb) na quimioluminescência gerada em sistema livre de células. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência <i>versus</i> concentração final das amostras na reação.....	92
Figura 34: Efeito do extrato etanólico bruto de <i>Alternanthera maritima</i> (Ampae) e de sua fração butanólica (AmpaeEb) na quimioluminescência gerada em sistema celular. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência <i>versus</i> concentração final das amostras na reação.....	92
Figura 35: Efeito dos flavonóides isolados de <i>Alternanthera maritima</i> na quimioluminescência gerada em sistema livre de células. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência <i>versus</i> concentração final das amostras na reação.....	94
Figura 36: Efeito dos flavonóides isolados de <i>Alternanthera maritima</i> na quimioluminescência gerada em sistema celular. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência <i>versus</i> concentração final das amostras na reação.....	94

Lista de Tabelas

Tabela 1: Distribuição dos gêneros da família Amaranthaceae que ocorrem no Brasil nas respectivas tribos.....	25
Tabela 2: Espécies da família Amaranthaceae estudadas quanto a atividade antioxidante.....	26
Tabela 3: Principais classes de produtos naturais identificadas em espécies do gênero <i>Alternanthera</i> (Gomphreneae, Amaranthaceae).....	27
Tabela 4: Rendimento em massa dos extratos brutos obtidos de <i>Alternanthera marítima</i>	58
Tabela 5: Sinais cromatográficos obtidos por CLAE-UV/DAD (tempo de retenção em min e absorção máxima no UV em nm) dos flavonóides isolados de <i>Alternanthera marítima</i> planta <i>in natura</i> no estudo fitoquímico direcionado pela atividade antioxidante.....	60
Tabela 6: Sinais equivalentes aos íons formados (em m/z) obtidos no espectro de massa IES-EM (módulo negativo e módulo positivo, 30V) dos flavonóides isolados das partes aéreas de <i>Alternanthera marítima</i> planta <i>in natura</i> no estudo fitoquímico direcionado pela atividade antioxidante.....	64
Tabela 7: Porcentagem de redução do radical DPPH do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Alternanthera marítima</i> (Ampae), fração butanólica (AmpaeEb) e controles positivos (quercetina e Trolox).....	84
Tabela 8: Porcentagem de redução do radical DPPH dos flavonóides isolados de <i>Alternanthera marítima</i>	85
Tabela 9: Porcentagem de redução do radical DPPH do extrato Ampae de <i>Alternanthera marítima</i> e dos extratos obtidos das culturas de células (meios de cultura T11 e T43).....	86
Tabela 10: Valores de concentração inibitória (IC ₅₀) para os extratos, frações e flavonóides obtidos de <i>Alternanthera marítima</i> frente ao ensaio DPPH.....	87
Tabela 11: Conteúdo de fenóis solúveis totais do extrato Ampae, fração AmpaeEb obtidos de <i>Alternanthera marítima</i> planta <i>in natura</i> e dos extratos obtidos das culturas de células (meios de cultura T11 e T43).....	88
Tabela 12: Valores de Trolox equivalente para os extratos obtidos de <i>Alternanthera marítima</i> frente ao ensaio ORAC.....	90
Tabela 13: Valores Trolox equivalente para os flavonóides isolados de <i>Alternanthera marítima</i> frente ao ensaio ORAC.....	90
Tabela 14: Valores de concentração inibitória (IC ₅₀) para extrato etanólico bruto de <i>Alternanthera marítima</i> planta <i>in natura</i> e sua fração butanólica e para os extratos obtidos das culturas de células (meios de cultura T11 e T43) no ensaio de quimioluminescência do luminol em sistemas livre de células e celular.....	91
Tabela 15: Valores de concentração inibitória (IC ₅₀) para os flavonóides isolados de <i>Alternanthera marítima</i> no ensaio de quimioluminescência do luminol em sistemas livre de células e celular.....	93
Tabela 16: Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos, frações e flavonóides isolados de <i>Alternanthera marítima</i> frente a polimorfos nucleares.....	95

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenóxiacético

AAPH - 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado

ABTS - 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonate

AcOEt - Acetato de etila

AGE - Ácido gálico equivalente

Ampae - *Alternanthera maritima* partes aéreas extrato etanólico

Ampah - *Alternanthera maritima* partes aéreas extrato hexânico

AmpaeD - Fase diclorometânica da partição de Ampae

AmpaeE - Fase etanólica da partição de Ampae

AmpaeH - Fase hexânica da partição de Ampae

AmpaeEaq - Fração aquosa de AmpaeE

AmpaeEb - Fração butanólica de AmpaeE

Am T11 - *Alternanthera maritima* extrato orgânico da cultura de células – meio de cultura – tratamento 11

Am T43 - *Alternanthera maritima* extrato orgânico da cultura de células – meio de cultura – tratamento 43

ANA - Ácido α -naftalenoacético

B-PE - β -phycoerythrin

BAP - 6-benzil-aminopurina

BAW - *Buthanol – acetic acid and water*

ButOH - n-butanol

CC - Cromatografia em coluna

CCC - Cromatografia em coluna clássica

CCDC - Cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CHCl₃ - Clorofórmio

CH₂Cl₂ - Diclorometano

DMSO - Dimetil-sulfóxido

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAFL - Extrato aquoso frio liofilizado

EAQL - Extrato aquoso quente liofilizado

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ERNS - Espécies reativas de nitrogênio

EtOH - Etanol

FCFRP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FFCLRP - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

FCR - *Folin-Ciocalteu reagent*

FL - Fluoresceína

FRAP - *Ferric reducing antioxidant power*

Hex - Hexano

HRP - *Horseradish peroxidase*

IC₅₀ - Concentração que inibe 50%

IES-EM - Espectrometria de massa com injeção por eletron spray

kgf/cm² - Quilograma força por centímetro quadrado

KIN - Cinetina

LDH - Lactato Desidrogenase

LDL - *Low density lipoprotein*

LPMN - Leucócitos polimorfonucleares

MeOH - Metanol

MS - MURASHIGE & SKOOG

nm - Nanômetros

NP/PEG - *Natural Products-Polyethyleglycol-reagent*

ORAC - *Oxygen radical absorbance capacity*

ppm - Parte por milhão

PVP - Polivinilpirrolidona

QL - Quimiluminescência

T11 - Meio de cultura - tratamento 11

T43 - Meio de cultura - tratamento 43

TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances*

TE - Trolox equivalente

TEAC - *Trolox equivalent antioxidant capacity*

UBV - Unidade de Biotecnologia Vegetal

UNAERP - Universidade de Ribeirão Preto

USP - Universidade de São Paulo

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 Revisão de literatura.....	21
2.1 Os produtos naturais e a química de plantas medicinais.....	22
2.2 Considerações gerais sobre a família Amaranthaceae e o gênero <i>Alternanthera</i> ..	24
2.3 Considerações gerais sobre estresse oxidativo e atividade antioxidante.....	29
2.3.1 Considerações gerais sobre flavonóides e atividade antioxidante.....	31
2.3.2 Metodologia para avaliação da atividade antioxidante.....	32
2.3.2.1 ORAC.....	33
2.3.2.2 Ensaio de redução do β -caroteno.....	35
2.3.2.3 Ensaio com reagente Folin-Ciocalteu.....	35
2.3.2.4 Redução do radical DPPH.....	36
2.3.2.5 Quimiluminescência do luminol.....	37
3 OBJETIVO.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Coleta, classificação e obtenção do material vegetal.....	42
4.2 Preparação dos extratos brutos.....	45
4.3 Fracionamento biomonitorado dos extratos brutos da planta in natura.....	46
4.4 Método geral de trabalho no estudo fitoquímico biomonitorado.....	48
4.5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos.....	49
4.6 Identificação dos constituintes químicos.....	51
4.7 Monitoramento de metabólitos na planta in natura e na cultura de células.....	51
4.8 Avaliação da atividade antioxidante in vitro.....	52
4.8.1 Ensaio com β caroteno em CCDC.....	53
4.8.2 Ensaio para avaliação da redução do radical DPPH.....	53
4.8.3 Ensaio de fenóis total por Folin–Ciocalteu (FCR).....	54
4.8.4 Ensaio ORAC _{FL}	54
4.8.5 Ensaio de quimiluminescência.....	55
4.8.5.1. Ensaio celular.....	55
4.8.5.2. Ensaio livre de células.....	55
4.8.6 Ensaio para avaliação da citotoxicidade.....	56
4.9 Análise estatística.....	56
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Preparação dos extratos, fracionamento e identificação de substâncias majoritárias com atividade antioxidante.....	58
5.2 Análise comparativa: planta in natura e obtida por cultura de células.....	80
5.3 Avaliação da atividade antioxidante in vitro.....	82
5.3.1 Ensaio de redução do β -caroteno em CCDC.....	82
5.3.2 Ensaio de redução do radical DPPH.....	82
5.3.3 Ensaio de fenóis totais solúveis por Folin-Ciocalteu.....	87
5.3.4 Ensaio ORAC.....	88
5.3.5 Ensaio de quimiluminescência.....	91

6 DISCUSSÃO.....	96
6.1 Estudo fitoquímico – fracionamento monitorado pela atividade antioxidante.....	98
6.2 Atividade biológica – avaliação da atividade antioxidante in vitro.....	100
6.3 Estudo biotecnológico – avaliação comparativa entre os extratos obtidos da planta in natura e obtida por cultura de células.....	106
7 CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade a utilização de produtos naturais demonstrou ser uma alternativa para o tratamento de enfermidades (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000;2003). O conhecimento sobre as propriedades terapêuticas de plantas medicinais muitas vezes era a maneira mais acessível para se obter alívio e/ou cura de doenças.

Segundo Veiga Jr., Pinto e Maciel (2005) define-se planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos. Tais substâncias estão relacionadas aos metabólitos gerados pelo vegetal em seu ciclo vital, com ênfase para os metabólitos secundários, dada sua importância terapêutica ou sua toxicidade (YAMADA, 1998; MANCINE, 1996).

Atualmente observa-se um aumento no uso de fitoterápicos, alimentos nutracêuticos e produtos derivados de plantas pela população. Entretanto, estudos visando o desenvolvimento de produtos naturais e fitoterápicos validados, seguros e eficazes, e que apresentem qualidade aliada ao uso sustentável são cada vez mais necessários (SIMÕES et al., 2004; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Até 1993, cerca de 120 substâncias químicas, derivadas de 90 espécies vegetais, eram consideradas como importantes fármacos utilizados em diversos países, das quais pouco mais de 70% eram frutos de estudos de isolamento de ativos direcionado pelo conhecimento popular (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Nos países industrializados estima-se que 25% dos medicamentos prescritos e registrados contenham como ativos extratos vegetais e/ou substâncias puras ou modificadas oriundas de plantas medicinais. Por exemplo, nos Estados Unidos, mais de 50% dos fármacos utilizados derivam de produtos naturais (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Em países em desenvolvimento cerca de 65 a 80% da população utiliza-se de plantas medicinais como fonte de fármacos, muitas vezes, sem nenhum embasamento científico,

prática esta que pode dar origem a intoxicações agudas ou crônicas, podendo até mesmo levar o indivíduo a óbito (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; VEIGA Jr; PINTO; MACIEL, 2005). No Brasil isto também é uma realidade, agravada por se ter no país uma rica biodiversidade com espécies vegetais ainda não descritas taxonomicamente, com valor intrínseco potencial e que não foram estudadas em termos químicos e biológicos.

Por outro lado, o estudo e a purificação dos componentes da planta intacta requerem muitas etapas e são processos normalmente demorados, devido à presença de pigmentos, polímeros como a celulose etc. Para a utilização econômica de compostos derivados de plantas seria necessário superar algumas limitações, tais como: a pequena quantidade do princípio ativo no extrato da planta; a separação do composto desejado, que além de ser um processo demorado, pode ser de alto custo financeiro; a concentração do composto desejado que depende, na maioria das vezes, das condições climáticas e fisiológicas das plantas; e o fato de algumas espécies vegetais serem endêmicas e crescerem em lugares geograficamente ou politicamente inacessíveis.

Uma alternativa que pode contribuir para a solução de algumas destas dificuldades pode ser o uso da cultura de células e tecidos vegetais (RAMAWAT; MERILLON, 1999) que apesar de apresentar certos empecilhos (condições do meio de cultivo; balanço entre reguladores de crescimento; reprodutibilidade à planta *in natura*) apresentam vantagens tais como: as condições de crescimento são controladas e por isto, há uma reprodutibilidade no rendimento do produto final desejado; as culturas *in vitro* admitem o uso de precursores exógenos e de estimuladores ou indutores (físicos, químicos e biológicos) da biossíntese de substâncias micromoleculares; as culturas de células de plantas podem ser uma excelente fonte de enzimas, com bioacumulação enzimática superior à planta *in natura*.

Dentre as substâncias naturais com propriedades terapêuticas acumuladas em vegetais, os polifenóis merecem destaque. Esta classe de produtos naturais vem sendo objeto de estudos face às suas potenciais propriedades antioxidantes, o que pode resultar em diferentes atividades farmacológicas em consequência da capacidade de seqüestrar radicais livres e também contribuir para a quimioprevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (doenças degenerativas, cardiovasculares, inflamatórias) (KIM et al., 2004; MARRONI, 2002).

Dentre as famílias de plantas existentes na flora brasileira têm-se a família Amaranthaceae que apresenta espécies capazes de acumular substâncias fenólicas como metabólitos secundários (FERREIRA; DIAS, 2004; 2000; SALVADOR; DIAS, 2004; BROCHADO et al. 2003; POMILIO et al., 1992). Em estudos prévios com *Alternanthera maritima* observou-se a presença de substâncias polifenólicas, porém, até o momento não foram encontrados na literatura estudos relacionados a investigação da sua capacidade antioxidante. Deste modo, neste estudo avaliou-se o potencial antioxidante de extratos de *A. maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células) visando à obtenção de novas fontes de insumos para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os produtos naturais e a química de plantas medicinais

A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de produtos naturais na saúde humana, com destaque para a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os primeiros relatos do uso de plantas medicinais datam de 2600 a.C., na Mesopotâmia, onde aproximadamente 1000 produtos derivados do reino vegetal eram utilizadas com fins medicinais. Na medicina egípcia foi relatada a existência do “*Ebers papyrus*”, datando de 1500 a.C., neste documento estavam documentados mais de 700 produtos terapêuticos naturais, incluindo formulações para gargarejos, inalantes, infusões, pílulas e unguentos que eram veiculados com leite, vinho e mel. Na China encontram-se também vários relatos do uso de plantas medicinais, tais como: a *Materia Medica* (~1100 a.C.), seguido de trabalhos como o *Shennong Herbal* (~100 a.C., 365 drogas) e o *Tang Herbal* (659 d.C., 850 drogas). Também com grande destaque surgia na Índia, em meados de 1000 a.C. a medicina *Ayurvedica*, onde estão relacionadas aproximadamente 850 medicações (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

No mundo Ocidental os gregos também contribuíram para o desenvolvimento de produtos derivados de plantas. O filósofo e naturalista Theophrastus em 300 a.C. relacionou a qualidade das ervas medicinais com as alterações nas suas características a partir do cultivo das mesmas. O grego Dioscorides, através de suas viagens pelo velho mundo, reconheceu, coletou e utilizou diversas ervas medicinais, sendo considerado por muitos como um dos maiores representantes da ciência das plantas medicinais no mundo antigo. Em Roma, Galeno praticou e lecionou farmácia e medicina e publicou cerca de 30 livros nesta área do conhecimento. Já na Idade Média, nos monastérios de países como Inglaterra, Irlanda, França e Alemanha ainda se mantinham este conhecimento adquirido no mundo Ocidental, porém, foram os árabes, juntamente com os chineses e indianos, os responsáveis pela expansão desta sabedoria. Os árabes foram também os primeiros a estabelecerem suas próprias drogarias em meados do século oito (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

No Brasil, os médicos que aqui chegaram nos navios da colonização portuguesa não tardaram a perceber a importância dos remédios indígenas. Em 1576, Gabriel Soares de Souza, cronista da história brasileira, já tratava os produtos medicinais aqui utilizados como “as árvores e ervas da virtude”. Não menos importante que os remédios indígenas foram os corantes extraídos do Pau-Brasil, que se tornaram um dos principais produtos de exportação (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006; PINTO et al., 2002).

O profundo conhecimento das propriedades dos produtos naturais por estes povos primitivos foi, e ainda é extremamente importante para o descobrimento de substâncias com atividades biológicas. Foi através da observação e da experimentação realizadas por estes povos que as potenciais propriedades terapêuticas e nutracêuticas de muitas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Apesar deste vasto conhecimento adquirido ao longo do tempo, muitas vezes as propriedades terapêuticas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas cientificamente (BUTLER, 2004). Assim, o estudo sistemático e detalhado de plantas medicinais faz-se necessário, podendo muitas vezes ser direcionado pelo conhecimento popular ou por bioensaios, a fim de se comprovar a atividade biológica, bem como identificar, isolar e caracterizar os princípios ativos majoritários (MACIEL et al., 2002).

Neste contexto iniciaram-se os estudos científicos com produtos naturais, a fim de avaliar suas propriedades químicas e biológicas e caracterizar seus componentes.

A química das plantas medicinais teve seu início em meados de 1800. Nesta época a química se estabelecia como ciência moderna com os trabalhos de Lavoisier e Berzelius. Nesta época, os químicos estudavam as plantas medicinais, dedicando-se a principalmente ao isolamento e à determinação estrutural dos constituintes químicos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

O início do processo de extração de princípios ativos de plantas é marcado pelo isolamento da morfina de *Papaver somniferum* em 1803 pelo farmacêutico Friedrich Sertürner. Posteriormente, do mesmo vegetal, isolou-se a codeína em 1932 por Robiquet e a papaverina em 1948 por Merck. Pode-se mencionar também outras substâncias como a

quinina e quinidina, isoladas de *Cinchona* spp, em 1819 e a atropina, isolada de *Atropa belladonna*, em 1831 (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Da *Ephedra sinica*, planta conhecida pelos chineses desde 2800 a.C., isolou-se a efedrina por Nagai, em 1887, a qual ainda é usada clinicamente como um potente agente broncodilatador (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Atualmente, com o avanço científico e tecnológico, observa-se um desenvolvimento considerável de métodos e equipamentos de análise e a química de produtos naturais progrediu consideravelmente com a ajuda destas ferramentas analíticas modernas, tornando-se crescente o número de trabalhos fitoquímicos envolvendo a busca de produtos naturais bioativos (PINTO et al. 2002).

2.2 Considerações gerais sobre a família Amaranthaceae e o gênero Alternanthera

A família Amaranthaceae foi estabelecida em 1789 por A. L. Jussieu (SIQUEIRA, 1994/1995). Esta família pertence à classe das Magnoliopsida e a ordem Caryophyllales e é constituída de aproximadamente 1000 espécies estando estas inseridas em 65 gêneros, sendo que 14 destes ocorrem em território brasileiro, podendo ser encontrados na Mata Atlântica (SIQUEIRA, 1990), nos cerrados e campos rupestres (SIQUEIRA, 1994/1995; 1989).

A família Amaranthaceae subdivide-se em quatro tribos: Celosieae, Achyrantheae, Braylineae e Gomphreneae (SIQUEIRA, 1994/1995) sendo que no Brasil encontram-se apenas as tribos Celosieae, Achyrantheae e Gomphreneae (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos gêneros da família Amaranthaceae que ocorrem no Brasil nas respectivas tribos.

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

*The American Chemical Society, 1907 a 2007; ♦O primeiro número refere-se ao número de espécies que ocorrem no gênero e o segundo as que ocorrem no Brasil, respectivamente.

Flavonóides, esteróides, terpenóides, saponinas e alcalóides foram descritos em estudos fitoquímicos realizados com espécies da família Amaranthaceae (FERREIRA; DIAS, 2004; 2000; FERREIRA et al., 2004; SALVADOR; DIAS, 2004; SALVADOR et al., 2004; BROCHADO et al. 2003; POMILIO et al., 1992; PATTERSON; XU; SALT, 1991; ZHOU; BLASKO; CORDELL, 1988). Entretanto a família continua praticamente intocada sob o ponto de vista fitoquímico.

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

Tabela 2: Espécies da família Amaranthaceae estudadas quanto a atividade antioxidante.

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

:- foram avaliados somente extratos destes vegetais, as substâncias presentes nos extratos não foram caracterizadas.

O gênero *Alternanthera*, objeto deste estudo, apresenta algumas espécies exclusivas do ecossistema de restinga, aparecendo tanto nos cordões arenosos e rochosos como também nas dunas, sendo, portanto, espécies indicadoras pioneiras da ante-praia (SIQUEIRA, 1994/1995). Por outro lado, algumas espécies apresentam caráter cosmopolita, sendo encontradas em diferentes ambientes como cerrado, campos rupestres, beiras de rio e centros urbanos. Este gênero contém 80 espécies, sendo que destas, 30 ocorrem no Brasil (SIQUEIRA; GUIMARÃES, 1984).

O gênero *Alternanthera*, juntamente com *Gomphrena* e *Pfaffia*, são os que mais se destacam dentro da tribo Gomphreneae, tanto pelo número de espécies quanto pelas atividades biológicas apresentadas. O gênero *Alternanthera* tem-se mostrado rico em espécies promissoras quanto a atividade antiinflamatória (BROCHADO et al., 2003), analgésica (MACEDO et al., 1999; DE SOUZA et al., 1998), imunomodulatória e antitumoral (GUERRA et al., 2003), diurética (CALDERON; GARCIA ASEFF; FUENTES, 1997), antimicrobiana (CANALEZ-MARTINEZ et al., 2005; SALVADOR et al., 2004; 2003), anti-vírus HIV (LAGROTA et al., 1994; ZHANG et al., 1988), hepatoprotetora (LIN et al., 1994), antimalária (MESA et al., 1998), antioxidante (SALVADOR et al., 2006; SHYMALA et al., 2005), entre outras.

Algumas espécies de *Alternanthera* são utilizadas na medicina popular para uma variedade de fins como: *A. brasiliana* (infusão das flores) empregada no combate a tosse; *A. pungens* (plana total) empregada no tratamento de sífilis e moléstias cutâneas; *A. tenella* (infusão das folhas) usada como diurético e *A. bettzichiana* (plana total) empregada como analgésico e anti-pirético (SIQUEIRA, 1987; SIQUEIRA; GUIMARAES, 1984).

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de *Alternanthera* mostraram a ocorrência de alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas e terpenóides como metabólitos secundários (Tabela 3).

Tabela 3: Principais classes de produtos naturais identificadas em espécies do gênero *Alternanthera* (Gomphreneae, Amaranthaceae).

ESPÉCIES	CLASSE DOS CONSTITUENTES QUÍMICOS	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
<i>Alternanthera amoema</i>	Alcalóides	Saenz et al. (1970)
<i>Alternanthera brasiliana</i>	Esteróides, flavonóides e terpenóides	Brochado et al. (2003); Macedo et al. (1999); Patterson; Xu; Salt (1991)
<i>Alternanthera caracasana</i>	Cumarinas	Canales-Martinez et al. (2005)
<i>Alternanthera canescens</i> , <i>Alternanthera caracasana</i> , <i>Alternanthera flavescens</i> , <i>Alternanthera halimifolia</i> , <i>Alternanthera paronychioides</i>	Esteróides	Patterson; Xu; Salt (1991)
<i>Alternanthera ficoidea</i>	Alcalóides e benzenóide	Sacena (1975); Griffiths (1959)

Continuação da tabela 3.

<i>ALTERNANTHERA MARITIMA</i>	ESTERÓIDES, SAPONINAS, FLAVONÓIDES (AGLICONAS, O-GLICOSÍDEOS E C-GLICOSÍDEOS)	SALVADOR; DIAS (2004); SALVADOR ET AL. (2004); PATTERSON; XU; SALT (1991); SALT ET AL. (1991)
<i>Alternanthera nodiflora</i>	Hidrocarbonetos	Mathams; Sutherland (1952)
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Ácidos carboxílicos, betalaínas, esteróides, flavonóides, isoflavonóides, proteínas, saponinas e terpenóides	Blunden et al. (1999); Gerald et al. (1999); Battha; Paes (1996); He; Meng (1995); Dewanji; Matai (1996); Zhou; Blasko; Cordell (1988); Dogra; Ojba (1978); Zielske; Simons; Silverst (1972)
<i>Alternanthera polygonoides</i>	Betalaínas	Blunden et al. (1999); Gerald et al. (1999)
<i>Alternanthera pungens</i>	Alcalóide, antraquinonas, esteróides, flavonóides, ionones, saponinas e terpenóides	Ragasa; Tremor; Rideout (2002); Calderon; Garcia Aseff; Fuentes (1996); Ruiz et al. (1996); De Rutz; Fusco; Ruiz (1993); Ruiz et al. (1991); Gupta; Sascena (1987); Dogra; Jha; Mishra (1977)
<i>Alternanthera repens</i>	Saponinas	Sanoko et al. (1999)
<i>Alternanthera sessilis</i>	Carotenóides, esteróides, ésteres graxos, flavonóides, hidrocarbonetos, lipídeos, saponinas e terpenóides	Bhaskarachary et al. (1995); Sahu; Chakrabarty (1993); Sridhar; Laks (1993); Penders; Kapundu; Delaude (1992); Kapundu; Lami ; Delaude (1986); Baruah; Sarma (1984); Sinha; Arora; Wahi (1984); Jou et al. (1979); Agrawal; Jain (1978); Dogra; Jha; Mishra (1977); Lin; Chen (1975); Jansz et al. (1974)
<i>Alternanthera tenella</i> Colla	Flavonóides	Salvador et al. (2006)
<i>Alternanthera versicolor</i>	Betacianinas	Piattelli; Minale (1964)

A espécie *Alternanthera maritima* (Mart.), St. Hil., é uma herbácea encontrada normalmente nas areias das praias do litoral brasileiro (HENRIQUES; MEIRELLES; HAY, 1984; SIQUEIRA; GUIMARÃES, 1984).

Apesar de não ser usada na medicina popular, em trabalhos prévios seus extratos apresentaram atividade antibacteriana, antifúngica, tripanocida, leishmanicida e imunomodulatória, sendo verificada a ocorrência de flavonoides, alcalóides, esteróides e saponinas nos extratos bioativos (SALVADOR; 2005; SALVADOR et al. 2003). Quanto às substâncias isoladas de *A. marítima* outros estudos também relataram a presença de esteróides, saponinas e flavonóides (SALVADOR; DIAS, 2004; PATTERSON; XU; SALT, 1991; SALT et al., 1991).

Em relação aos estudos biotecnológicos, algumas espécies de Amaranthaceae já foram estudadas na tentativa de serem desenvolvidas culturas de células destes vegetais. Quintero Ruiz e Valadez (1985) e Castañeda e Ruiz (1991) estudaram as culturas de células de *Gomphrena globosa*. Dentro do gênero *Alternanthera* Macedo et al. (1999) estudou as culturas de calos de *A. brasiliana* visando obter extratos das culturas que apresentassem atividade farmacológica. Mudalige e Longstreth (2006) estabeleceram condições de cultivo para cultura de células em suspensão de *A. philoxeroides* e avaliou o efeito da salinidade sobre o mecanismo fotossintético deste vegetal. Silva et al. (2005) avaliaram o efeito de fatores de crescimento e da radiação UVA sobre a produção de pigmentos em *A. brasiliana*.

Quanto a *A. maritima* culturas de células deste vegetal também foram estabelecidas em dois meios de cultura (T11 e T43 – composição na p. 42), e foi verificado que os extratos obtidos destas culturas de células mantiveram-se ativos frente a bactérias, fungos e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (SALVADOR, 2005; SALVADOR et al., 2003).

Devido ao fato desta espécie estar distribuída nas restingas e cordões arenosos do litoral brasileiro, este vegetal está sujeito e adaptado a diferentes fatores edáficos como salinidade, altas taxas de luminosidade e variação de temperatura que podem ser desencadeadores de estresse oxidativo. Assim estes fatos incentivaram este estudo para a prospecção de antioxidantes em *A. maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células).

2.3 Considerações gerais sobre estresse oxidativo e atividade antioxidante

A vida em aerobiose se caracteriza pela contínua produção de radicais livres que é contrabalançada pelo consumo de defesas antioxidantes não enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, há equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes. Quando esse equilíbrio é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos ao sistema biológico (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Segundo Llesuy (2002) se considera um radical livre qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. A

presença destes elétrons desemparelhados confere a esta espécie um caráter paramagnético, ou seja, uma alta reatividade e uma pequena meia-vida.

Os principais radicais livres envolvidos no processo de estresse oxidativo são os radicais de oxigênio, ou espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre as EROs encontram-se os radicais: hidroxila (-OH); superóxido (O_2^-); peroxil (ROO-); alcoxil (RO-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – não radicalar). Existem também outros radicais envolvidos como os radicais de nitrogênio, alguns metais de transição, entre outros (MARRONI, 2002).

No organismo, a produção destes radicais livres está envolvida em vários processos fisiológicos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, se a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante em um sistema vivo, espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) podem reagir com lipídios, proteínas, enzimas e com o DNA, conduzindo a dano estrutural e/ou funcional nas células, enzimas e material genético (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Desta maneira, várias patologias incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e de Parkinson, seguidas de doenças inflamatórias e imunológicas como artrite, asma, alergia e outras relacionadas com o processo de envelhecimento apresentam em sua etiologia, pelo menos em parte, os efeitos danosos da produção de radicais livres em consequência do estresse oxidativo (SIES, 1997).

Devido a este fato, atualmente, é crescente a busca por antioxidantes de origem exógena, tanto provenientes dos alimentos (vitaminas, compostos fenólicos, carotenóides, etc), quanto de origem sintética (BHA-butil-hidroxi-anisol, BHT-butil-hidroxi-tolueno, entre outros) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Porém, devido ao fato de alguns antioxidantes sintéticos apresentarem algumas complicações (alto índice de aditivos químicos em alimentos; alta ingestão de conservantes químicos) (WURTZEN, 1990) as pesquisas tem-se voltado para a busca de antioxidantes naturais, principalmente os provenientes de espécies vegetais.

Neste contexto os compostos fenólicos tem-se apresentado como importantes substâncias no combate a produção de radicais livres devido principalmente a sua capacidade

reduzora e estrutura química, o que reflete em propriedades como: seqüestro de radicais livres, quelatação de metais de transição e inibição da lipoperoxidação (SOARES, 2002).

Algumas espécies vegetais são capazes de produzir como metabólitos secundários substâncias polifenólicas, as quais segundo Soares (2002) podem estar distribuídas em dois grandes grupos: os flavonóides e seus derivados e os ácidos fenólicos.

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos ocorrem, principalmente, devido a seu potencial de oxirredução, que os permitem atuar como agentes redutores, doando hidrogênio e neutralizando radicais livres (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

2.3.1 Considerações gerais sobre flavonóides e atividade antioxidante

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, mas são constituintes de diversos vegetais. Os flavonóides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível e, desta maneira, apresentam papel de defesa das plantas contra radiação UV. Além disso, os flavonóides podem representar barreira química contra microorganismos, insetos e outros animais (HAVSTEEN, 2002; PIETTA, 2000).

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico, compostos do tipo C₆-C₃-C₆, onde os dois anéis C₆ são necessariamente aromáticos (anéis A e B), conectados por uma ponte de 3 carbonos. De acordo com as características químicas e biossintéticas os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos, podendo ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002).

Flavonóides são fenólicos, e desta forma, sua atividade antioxidante depende da reatividade dos substituintes hidroxil em reações de abstração de elétrons e átomos de hidrogênio. As reações mais importantes e mais estudadas são as reações com radicais peróxil, hidroxil e superóxido (PIETTA, 2000). Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer a relação entre a estrutura e a atividade antioxidante destes compostos. Segundo

Rice-Evans, Miller e Paganga (1997; 1996) os principais determinantes para a atividade de seqüestro de radicais são: a presença de um grupo *o*-dihidroxil (catecol) no anel B; uma dupla ligação na posição 2, 3 conjugada com um grupamento 4-oxo. A presença de um grupo 3-hidroxil no anel heterocíclico também aumenta a atividade antioxidante.

2.3.2 Metodologia para avaliação da atividade antioxidante

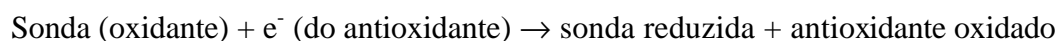
Atualmente têm-se verificado um aumento significativo na busca de antioxidantes em produtos naturais para emprego tanto como alimentos nutracêuticos, quanto como fármacos, medicamentos e cosméticos. Este interesse expandiu-se desde meados da década de 90 quando começou a se conhecer os benefícios dos antioxidantes no organismo. Segundo Huang, Ou e Prior (2005) o número de publicações com antioxidantes e estresse oxidativo quase quadruplicou nos últimos anos (1.684 em 1993; 6.510 em 2003). Da mesma forma, intensificou-se a busca e a validação de metodologias analíticas para a avaliação da atividade antioxidante em matrizes complexas como alimentos, produtos naturais e fluídos biológicos (ROGINSKI; LISSI, 2005; SANCHEZ-MORENO, 2002).

Embora a produção dos radicais livres seja difícil de medir em tecidos biológicos, pela alta reatividade das mesmas, várias manifestações indiretas deste processo podem ser utilizadas, como a oxidação de lipídios (lipoperoxidação), reações de oxi-redução, a oxidação de grupamentos sulfidril de proteínas e oxidação de bases púricas e pirimídicas entre outros (MARRONI, 2002).

Os ensaios antioxidantes hoje disponíveis podem ser classificados em duas categorias: ensaios onde há transferência de hidrogênio (HAT), geralmente baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos (dentre eles o ensaio ORAC (ensaio para a avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigênio) e o ensaio β -caroteno); ensaios mediados pela transferência de elétrons (ET) também denominados de métodos indiretos tais como o ensaio TEAC (ensaio para avaliação de capacidade antioxidante trolox-equivalente), o teste DPPH (baseado na redução deste radical) e ensaios baseados na redução de Fe^{+3} (FRAP); e também outros métodos como o ensaio utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (FCR) para mensuração de substâncias fenólicas e o ensaio de quimioluminescência (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Os métodos diretos avaliam o efeito de amostras contendo antioxidantes no processo de degradação oxidativa. Este processo caracteriza-se pela presença de uma competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres (ROGINSKI; LISSI, 2005). Como substrato para oxidação podem ser utilizados lipídios individuais, misturas lipídicas, proteínas, DNA, ou lipídios contendo espécies biológicas relevantes como plasma sanguíneo, LDL, membranas biológicas, etc. A peroxidação lipídica apresenta-se como sendo um método conveniente para este propósito uma vez que a cinética da lipoperoxidação já está bem estudada tanto em termos teóricos, quanto experimentais (BARCLAY; VINQUIST, 2003).

Em ensaios indiretos (baseados na transferência de elétron) o processo é caracterizado por uma reação de oxi-redução entre o oxidante (geralmente uma sonda para monitorar a reação) e o antioxidante. Estão baseados na seguinte reação de transferência de elétrons:



A sonda ao ser reduzida pelo antioxidante sofre mudanças colorimétricas. A intensidade da mudança de cor é proporcional à atividade deste antioxidante ou à concentração do mesmo. Com o auxílio de espectrofotômetro, em comprimentos de onda específicos, a mudança na absorbância é analisada juntamente com a concentração de antioxidante em uma relação linear. O declive da curva reflete a capacidade redutora do antioxidante, que geralmente pode ser expressa como Trolox equivalente (TE) ou ácido gálico equivalente (AGE) (BENZIE; STRAIN, 1999).

A seguir são apresentados alguns métodos atualmente empregados para avaliação da atividade antioxidante:

2.3.2.1 ORAC

O método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) foi originalmente desenvolvido por Cao, Alessio e Cutler (1993). Este método, relativamente simples e sensível, mede a capacidade do antioxidante em seqüestrar radicais peroxil que são gerados por uma fonte radicalar, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado), a 37°C. Neste ensaio, *β-phycoerythrin* (B-PE), uma proteína isolada de *Porphyridium cruentum*, foi escolhida como

a sonda fluorescente. A queda na fluorescência do B-PE indica a extensão do dano causado pela sua reação com os radicais gerados. O efeito protetor de uma amostra contendo antioxidante é mensurado pelo cálculo da área sob a curva de decaimento da fluorescência da amostra comparando-se com a de uma amostra “branco”, sem antioxidante presente. O ensaio ORAC permite o monitoramento do tempo e do grau de inibição durante o andamento da reação em um ensaio de reação cinética (CAO et. al., 1995; CAO; ALESSIO; CUTLER, 1993). Porém, uma limitação encontrada neste ensaio foi a utilização da B-PE como sonda. Pode-se citar como limitações desta sonda:

- a B-PE apresenta uma grande variabilidade o que pode resultar numa reatividade variável desta com os radicais (CAO; PRIOR, 1999);
- devido a B-PE não ser fotoestável, após a exposição à luz excitável por um período de tempo a sonda pode ser oxidada pela luz, sem a adição da fonte radicalar (HUANG et al., 2002);
- a B-PE interage com polifenóis, devido a ligação protéica não-específica, perdendo então a fluorescência sem a adição da fonte radicalar.

Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) resolveram utilizar em substituição à B-PE, a Fluoresceína (FL), uma sonda sintética que melhorou as limitações da B-PE, tornando o ensaio mais barato, reprodutivo e robusto (ORAC_{FL}). Recentemente Huang et al. (2002) desenvolveram ensaio utilizando β -ciclodextrinas para solubilizar a amostra, permitindo a análise também de substâncias lipofílicas.

O método ORAC_{FL} (lipofílico e hidrofílico), em sua versão atual, permite fornecer informações substanciais sobre a capacidade antioxidante de alimentos, frutas e vegetais (WU et al., 2004; MOYER et al., 2002; CALDWELL, 2001; EHLENFELDT; PRIOR 2001; KALT; McDONALD; DONNER, 2000; WANG; LIN, 2000; KALT et al. 1999; GUO et al., 1997; WANG; CAO; PRIOR, 1996), cafeína (LEE, 2000), vinho tinto (ALONSO et al., 2002), plantas medicinais e extratos vegetais (HANDELMAN et al., 1999; PRIOR; CAO, 1999) bem como substancias isoladas (SALVADOR et al., 2006; AABY; HVATTUM; SKREDE, 2004; WANG; CAO; PRIOR, 1997).

2.3.2.2 Ensaio de redução do β -caroteno

Este ensaio está baseado na capacidade de uma amostra contendo substâncias antioxidantes em retardar a oxidação do β -caroteno na presença de luz. A solução de β -caroteno em diclorometano (CH_2Cl_2), de coloração amarelada, atua como um revelador em cromatografia em camada delgada sendo que quando aplicada em uma corrida cromatográfica e exposta a luz inicia-se o processo de oxidação do β -caroteno ocasionando a descoloração da placa. Substâncias antioxidantes serão evidenciadas através de manchas amareladas demonstrando o efeito antioxidante da amostra (PRATT; MILLER, 1984).

O ensaio é muito utilizado no intuito de monitorar a separação ou fracionamento de uma determinada amostra a fim de verificar a presença ou não de substâncias antioxidantes. Estudos científicos com produtos naturais e atividade antioxidante geralmente lançam mão deste recurso (RIBEIRO et al., 2005; CARDOSO et al., 2005; AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; RIBEIRO; SILVA; BOLZANI, 2002; SILVA et al., 2001; CAVIN et al., 1998; DUVE; WHITE, 1991).

2.3.2.3 Ensaio com reagente Folin-Ciocalteu

O reagente Folin-Ciocalteu foi inicialmente utilizado com a intenção de analisar proteínas devido sua capacidade de reagir com resíduos do aminoácido tirosina que contem grupo fenol em sua estrutura (FOLIN; CIOCALTEU, 1927).

O ensaio Folin-Ciocalteu (FCR) é um dos mais antigos métodos de determinação da quantidade total de fenóis solúveis em uma amostra, portanto também é conhecido como ensaio de fenóis totais solúveis. Foi desenvolvido inicialmente por Singleton e colaboradores em 1965 (SINGLETON; ROSSI, 1965) e em 1999 o ensaio foi delineado e padronizado para quantificação de fenóis totais (SINGLETON et al., 1999). Atualmente, o ensaio FCR é utilizado para mensurar a capacidade redutora de uma amostra, o que aparentemente pode não estar refletido na sua característica de “ensaio de fenóis total”. Porém, um crescente número de publicações tem empregado o ensaio de fenóis total, juntamente com um ensaio baseado na transferência de elétrons (por exemplo TEAC, FRAP, etc.) encontrando excelentes correlações lineares entre o perfil de fenóis total e a atividade antioxidante.

O reagente FCR apresenta-se numa coloração amarela intensa e em contato com agentes redutores levam o reagente a uma coloração verde, sendo que a adição de agentes oxidantes podem restaurar a coloração original do reagente. A natureza química do FCR não está plenamente esclarecida. O sistema caracteriza-se por uma mistura de ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico em um meio básico. Os fenóis são energeticamente oxidados em meio básico, resultando na formação do O_2^- , o qual reage com os ácidos formando compostos com uma intensa absorção em 750nm. O teor de fenólicos totais determinados por FCR são freqüentemente expressos em termos de ácido gálico equivalente.

Apesar da química do FCR ainda não estar bem esclarecida, o ensaio de fenóis totais solúveis por FCR é um ensaio barato, simples, reprodutivo e está se tornando um ensaio rotineiro em estudos com antioxidantes fenólicos.

O ensaio com FCR é comumente utilizado em conjunto com outro ensaio para avaliação da capacidade antioxidante a fim de se estabelecer correlações entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante da amostra. Na área de produtos naturais pode-se citar trabalhos com frutas (JAYAPRAKASHA et al., 2007), vinhos (ALONSO et al., 2002), chás e infusões (ATOUI et al., 2005; PICINNELI et al., 2004), microalgas (LI et al., 2007), extratos vegetais (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; SOUSA et al., 2007; SURVESWARAN et al., 2007; ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006; STRATIL; KLEJDUS; KUBAN, 2006; SALVADOR et al., 2006) bem como em culturas de calos vegetais (TADHANI; PATEL; SUBHASH, 2007), entre outros.

2.3.2.4 Redução do radical DPPH

O teste DPPH foi primeiramente sugerido em meados de 1950, sendo utilizado para determinar a atividade antioxidante de fenóis, alimentos e amostras biológicas. O radical DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela.

O método está baseado na capacidade do radical DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes este radical recebe H^+ sendo então reduzido. Pode ser facilmente detectado em ensaios espectrofotométricos devido a sua intensa

absorção na região do visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH e a amostra, em solução. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem do radical DPPH restante no sistema. Então a porcentagem do radical DPPH restante é proporcional a concentração de antioxidante (SANCHEZ-MORENO, 2002; BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997).

Alguns autores recomendam a utilização do método DPPH por ser um ensaio fácil, rápido e preciso para a avaliação da atividade antioxidante de amostras complexas como as obtidas a partir de frutas e vegetais (HUANG; OU; PRIOR, 2005; ROGINSKI; LISSI, 2005). Atualmente se apresenta como um dos métodos mais utilizados na avaliação da capacidade antioxidante de produtos naturais, tais como: extratos vegetais (CETINUS et al., 2007; STOILOVA et al., 2007; ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006; DI MAMBRO; FONSECA, 2005), chás e infusões (ATOUI et al., 2005), substâncias isoladas como alcalóides (RACKOVA et al., 2004) e flavonóides (CARDOSO et al., 2005; GABRIELI; KEFALAS; KOKKALOU, 2005; RIBEIRO; SILVA; BOLZANI, 2002), compostos fenólicos (VILLAÑO et al., 2007), culturas de calos vegetais (TADHANI; PATEL; SUBHASH, 2007).

2.3.2.5 Quimiluminescência do luminol

O princípio geral deste método está baseado na habilidade do luminol e de compostos relacionados em gerar luminescência sob um fluxo de radicais livres (quimiluminescência, QL). A produção de espécies reativas de oxigênio gera certa luminescência, a qual pode ser aumentada através da inserção do luminol no sistema. A QL então ocorre devido a uma reação dos radicais livres derivados do luminol com os radicais livres ativos.

A adição de um antioxidante no sistema, como um “seqüestrador” de radicais, resulta numa extinção da QL, num determinado período de indução. A atividade antioxidante neste caso é dada como Trolox equivalente e a quantidade do antioxidante testado pode ser estimada através da duração do período de indução. Outras versões do método diferem no tipo de radical livre ativo produzido e no modo como este é produzido (ROGINSKI; LISSI, 2005).

Foi possível observar um grande número de trabalhos utilizando esta metodologia, entre eles pode-se citar alguns relacionados a produtos naturais, tais como em: frutas e

vegetais (TRIANSTIS et al., 2005), extratos vegetais (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006; TERMENTZI; KEFALAS; KOKKALOU, 2006; MARQUELE et al., 2005; FERNANDES et al., 2004) substâncias isoladas (RIGANO et al., 2007; GABRIELI; KEFALAS; KOKKALOU, 2005; WENLI; YAPING; BO, 2004; OLIVEIRA et al., 2002), chás e infusões (ATOUI et al., 2005), entre outros.

Uma das variantes do método consiste em mensurar a QL de radicais gerados em um meio celular, por exemplo, através do processo de fagocitose por neutrófilos estimulados. Os neutrófilos, quando expostos a alguns estímulos, como o contato com partículas antigênicas opsonizadas, desencadeiam um processo conhecido como “burst respiratório”, sofrendo alterações metabólicas imediatas e liberando espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são produzidas sequencialmente, iniciando-se com a produção de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) através da ativação de uma enzima ligada a membrana de células fagocíticas, a NADPH oxidase. As EROs estão intimamente relacionadas, por exemplo, à morte de microrganismos invasores e de células tumorais.

Neste método, utiliza-se como estímulo para ativação dos neutrófilos o Zimosan opsonizado. O Zimosan é uma preparação de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) sendo esta opsonizada com soro normal de coelho, e, em contato com o soro, são obtidas partículas revestidas (opsonizadas) com componentes do sistema complemento. Estas partículas antigênicas são então reconhecidas por receptores de membrana dos neutrófilos, iniciando o processo fagocítico e a liberação das EROs. Este processo é acompanhado da geração de luz (QL), porém, a intensidade desta QL é tipicamente muito baixa, porém pode ser aumentada em presença de substâncias como o luminol e a lucigenina, as quais são capazes de ampliar o efeito da QL. Amostras contendo antioxidantes são avaliadas neste sistema frente a capacidade de neutralizar estas EROs inibindo então a QL gerada (KANASHIRO et al., 2004; KABEYA et al., 2002).

O método da quimioluminescência pode também ser avaliado frente a um sistema enzimático. Nesta variante utiliza-se para a geração de espécies reativas de oxigênio a oxidação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada por uma enzima, como a “*Horseradish peroxidase*” (HRP). As EROs geradas através da oxidação do H_2O_2 na presença do luminol são também capazes de gerar QL e amostras contendo antioxidantes serão avaliadas frente a estes radicais através da inibição da QL (KROL et al., 1994).

3 OBJETIVO

3 OBJETIVO

Foram objetivos deste estudo:

- Adequar metodologia e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos brutos etanólico e aquoso de *A. maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células);
- Proceder o estudo fitoquímico dos extratos ativos da planta *in natura* monitorado pela atividade antioxidante;
- Realizar o estudo comparativo quanto ao perfil químico e da atividade antioxidante dos extratos da planta *in natura* e obtidos das culturas de células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta, classificação e obtenção do material vegetal

O material vegetal (partes aéreas) da espécie *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil, planta *in natura* (Figura 1), foi coletado em seu hábitat natural - Restinga de Marica, R.J. em 2002- pelos Profs. Drs. Diones Aparecida Dias (FCFRP/USP) e Marcos José Salvador (número do coletor - DAD 0035). A identificação botânica foi efetuada pelo Prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira, especialista na família Amaranthaceae, da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-R.J.), sendo uma amostra do material vegetal depositada no herbário da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP) sob o número SPFR-4758.

A biomassa vegetal das culturas de células de *A. maritima* para a obtenção dos extratos brutos das culturas de células (Figura 1) foi fornecida pelos Profs. Drs. Paulo Sérgio Pereira e Suzelei de Castro França da Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto (UBV-UNAERP) os quais foram colaboradores nesta etapa do trabalho. As culturas de calos de *A. maritima* foram estabelecidas previamente junto ao UBV-UNAERP pelo Dr. Marcos José Salvador e vem sendo mantidas por repiques mensais em dois meios de cultura T11 e T43 (SALVADOR, 2005).

Para o desenvolvimento de culturas de células foram utilizados explantes foliares de *A. maritima*, devidamente obtidos e assepsiados, e meios de cultura semi-sólidos. Para tanto, dissolveu-se os sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em água destilada e deionizada e adicionou-se 30,00 g/L de sacarose e reguladores de crescimento. O pH foi ajustado em $6,0 \pm 0,1$ com solução de NaOH 1M. Os reguladores de crescimento utilizados foram as seguintes combinações de auxinas e citocininas:

- meio T11: 2,50 mg/L de ácido α -naftalenoacético (ANA) e 1,00 mg/L de 6-benzil-aminopurina (BAP).
- meio T43: 1,00 mg/L de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e 1,00mg/L de cinetina (KIN).

Para a obtenção do meio de cultura semi-sólido, adicionou-se Phytigel (Sigma) a 0,3% e porções contendo 12,0 mL de meio de cultura foram transferidas para frascos de vidro de 250,0mL (8,5 cm de altura por 5,5 cm de diâmetro) os quais, depois de vedados e identificados, foram autoclavados (pressão de 1,0 kgf/cm² e temperatura de 121°C) durante 15min.

O período de incubação dos calos obtidos foi de 30 dias. Decorrido o período de incubação, esses calos foram transferidos para novos frascos, contendo os mesmos tipos de meio de cultura, e subcultivados a cada 30 dias (calos estoque). Os procedimentos de subcultivo dos calos foram realizados sob assepsia em câmara de fluxo laminar e as culturas estão sendo mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 27±2°C e em regime de fotoperíodo de 16h dia com iluminação de 2000 ± 200 lux, utilizando-se lâmpadas do tipo luz do dia - GE 12 W.

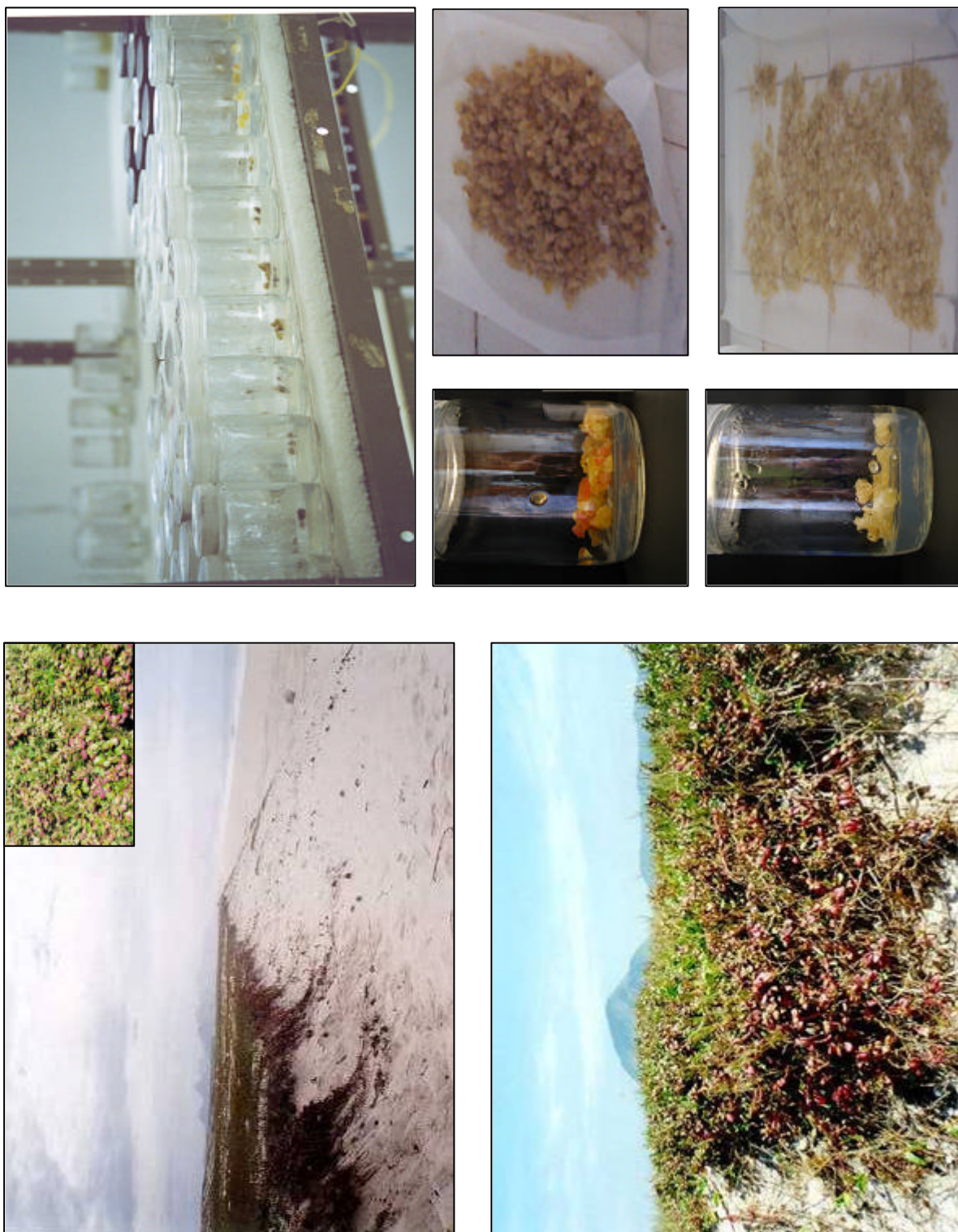


Figura 1: Espécie *Alternanthera maritima* em seu habitat natural e obtida por culturas de células em meio semi-sólido (T11 e T43).

4.2 Preparação dos extratos brutos

Para a preparação dos extratos brutos o material vegetal (partes aéreas da planta *in natura*) foi estabilizado (estufa a 60°C por 10 min) e seco em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C, sendo em seguida pulverizado em moinho de faca. O pó obtido foi submetido ao processo de maceração exaustiva com solventes orgânicos (Figura 2) em ordem crescente de polaridade (hexano para baixa polaridade e etanol para alta polaridade), na proporção massa de pó/solvente 1:20 (massa/volume). Das soluções obtidas, foram removidos os solventes (sob pressão reduzida) em um rotaevaporador (temperatura inferior a 60°C), obtendo-se assim, os extratos brutos em hexano (Ampah) e em etanol (Ampae).

A biomassa de calos obtida da cultura de células de *A. maritima*, separada dos meios de cultura (T11 e T43), foi seca em estufa com ar circulante a 40°C e pulverizada. Foram também submetidas, separadamente (T11 e T43), ao processo de extração (maceração) com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e etanol) na proporção massa de pó/solvente extrator 1:20 (m/v). A extração foi realizada a temperatura ambiente por 24 horas, sendo os solventes removidos sob pressão reduzida e os extratos orgânicos reunidos obtendo-se um extrato de cada condição de cultivo por amostra (extratos AmT11 e AmT43).

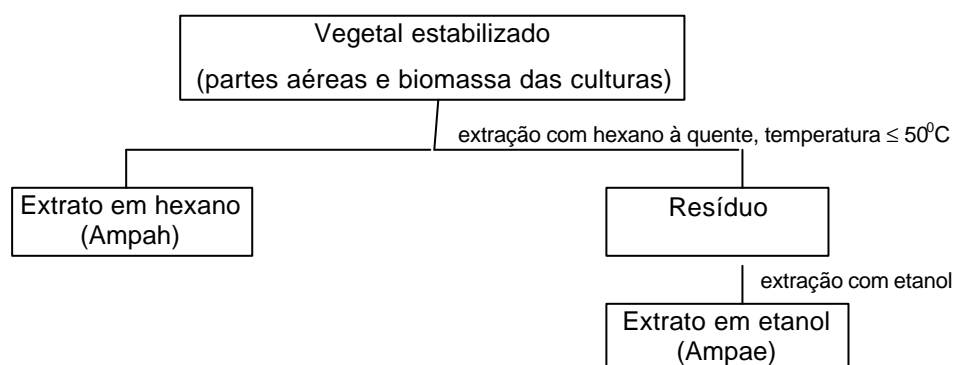


Figura 2: Esquema da preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos.

Uma parte do material vegetal (planta *in natura*) estabilizado e triturado foi submetido à extração com água deionizada (Figura 3), na proporção massa de pó/solvente 1:20(m/v), por um período de 12 horas a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) ou por 30 minutos a 50-60°C, sendo em seguida liofilizados obtendo-se os respectivos extratos liofilizados a frio (EAFL) e a quente (EAQL).

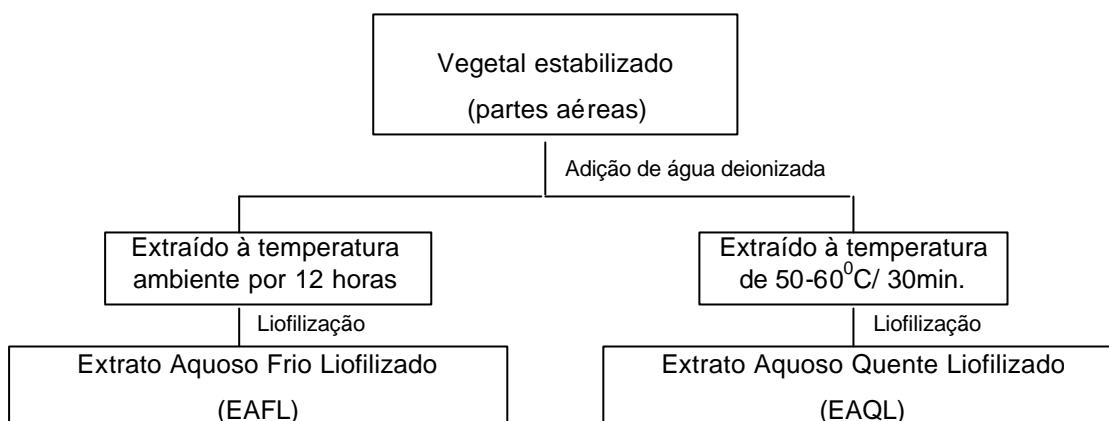


Figura 3: Esquema da preparação dos extratos aquosos liofilizados.

4.3 Fracionamento biomonitorado dos extratos brutos da planta *in natura*

O fracionamento foi guiado pela atividade antioxidante *in vitro* e para tanto utilizou-se procedimentos convencionais (partição e cromatografia em coluna, CC) considerando a atividade antioxidante apresentada nos ensaios selecionados, como também a análise dos perfis cromatográficos (cromatografia em camada delgada comparativa, CCDC e cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE).

Os extratos vegetais brutos obtidos (hexânico, etanólico e aquoso) foram inicialmente submetidos à avaliação da atividade antioxidante *in vitro* para dar-se seqüência ao estudo. O extrato bruto em etanol, ativo, foi submetido ao processo de partição (extração líquido-líquido) com hexano e diclorometano (Figura 4), visando a eliminação de pigmentos e substâncias apolares de menor interesse. As fases obtidas da partição que apresentaram atividade antioxidante foram fracionadas prioritariamente, após a análise dos perfis cromatográficos em camada delgada comparativa.

Após a eliminação do solvente a solução metanol/água (3:2), procedente da partição, foi submetida à coluna contendo Amberlite XAD-2 (polímero composto por ésteres acrílicos do estireno-divinil benzeno) sendo eluída primeiramente com H₂O, visando a eliminação de aminoácidos, açúcares e sais inorgânicos e em seguida com etanol (EtOH), concentrando nesta fase etanólica, saponinas, flavonóides e outros compostos polares (HARBORNE et al., 1975). A fase etanólica (AmpaeE), depois de concentrada e submetida a avaliação de sua atividade, foi solubilizada em água deionizada e submetida a extração com n-butanol (ButOH; Reagen), obtendo-se a fase butanólica (AmpaeEb), que na seqüência foi também avaliada frente a atividade antioxidante e em seguida cromatografada utilizando-se coluna contendo

sephadex LH-20 (100 x 5 cm) e eluida com metanol (MeOH). A partição com butanol/H₂O foi processada a fim de se evitar que substâncias insolúveis em metanol precipitem na coluna contendo sephadex LH-20.

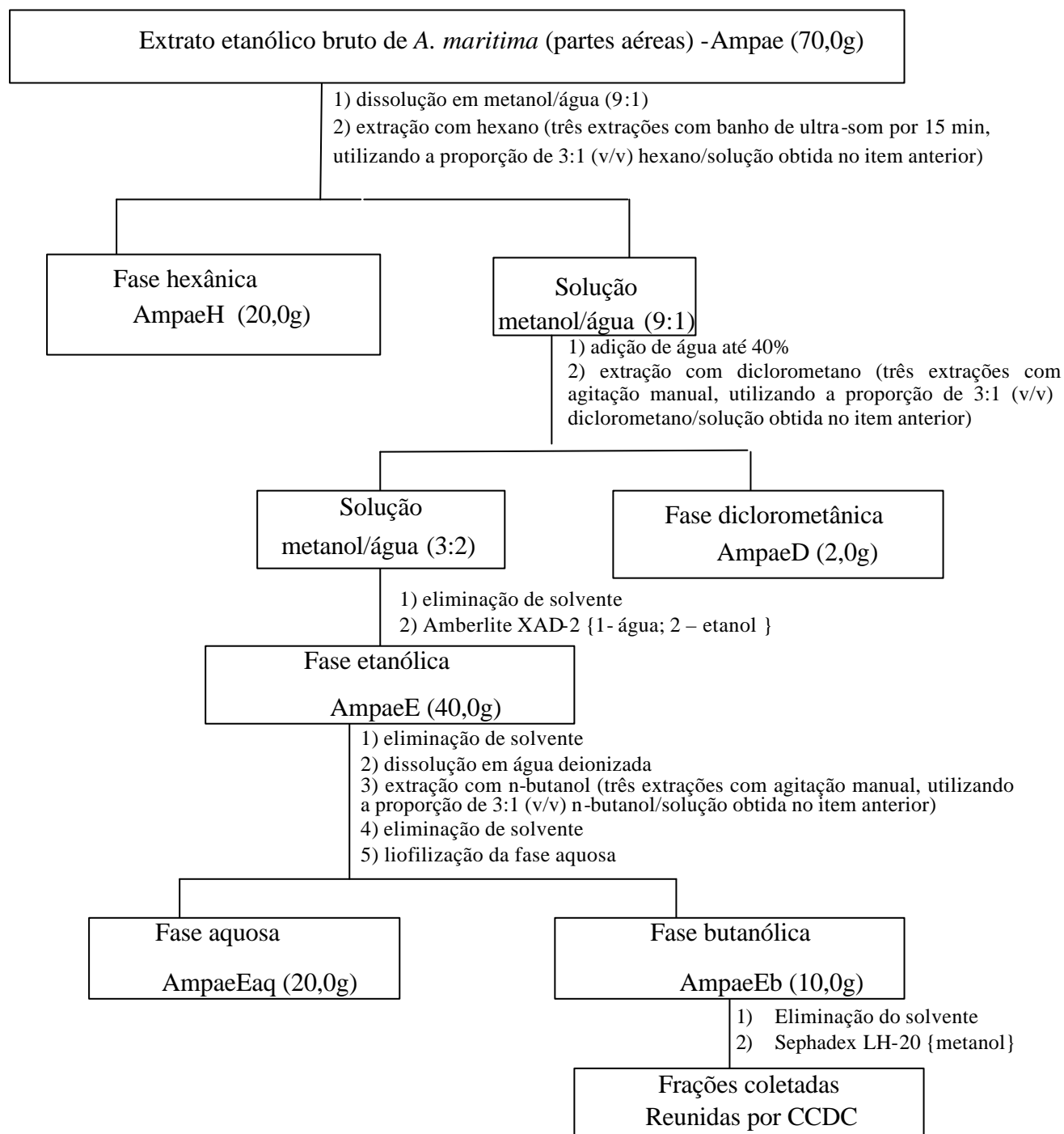


Figura 4: Esquema da partição do extrato etanólico bruto de *Alternanthera maritima*.

4.4 Método geral de trabalho no estudo fitoquímico biomonitorado

Os extratos obtidos da *A. maritima* foram submetidos ao monitoramento da atividade antioxidante. Para a seqüência de purificação foram selecionadas as frações bioativas no *screening* que apresentaram atividade antioxidante *in vitro* em pelos menos duas metodologias de ensaios antioxidantes utilizadas. A escolha deste caminho deveu-se ao fato de que uma mistura complexa de substâncias pode apresentar efeito antagônico (onde o efeito isolado das substâncias é maior que o efeito destas em mistura) ou as substâncias bioativas podem estar em baixa concentração na mistura.

Os extratos e fases da partição ativos foram submetidos a cromatografia em coluna clássica (CCC) sephadex LH-20 (25,0 a 100,0 μm , Aldrich) como fase estacionária na proporção de 1,0 g de amostra para 150,0 g de sephadex LH-20. As colunas de sephadex LH-20 foram eluídas exaustivamente com MeOH (fase móvel), vazão de 0,50 mL/min, coletando-se frações de 15,00 mL.

As fases da partição e frações coletadas foram concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo (Buchi-R-124), com banho de água (temperatura $\leq 50^\circ\text{C}$).

Os extratos, fases e frações obtidos foram analisados quanto ao seu perfil químico lançando-se mão de procedimentos cromatográficos diversos tais como CCDC e CLAE.

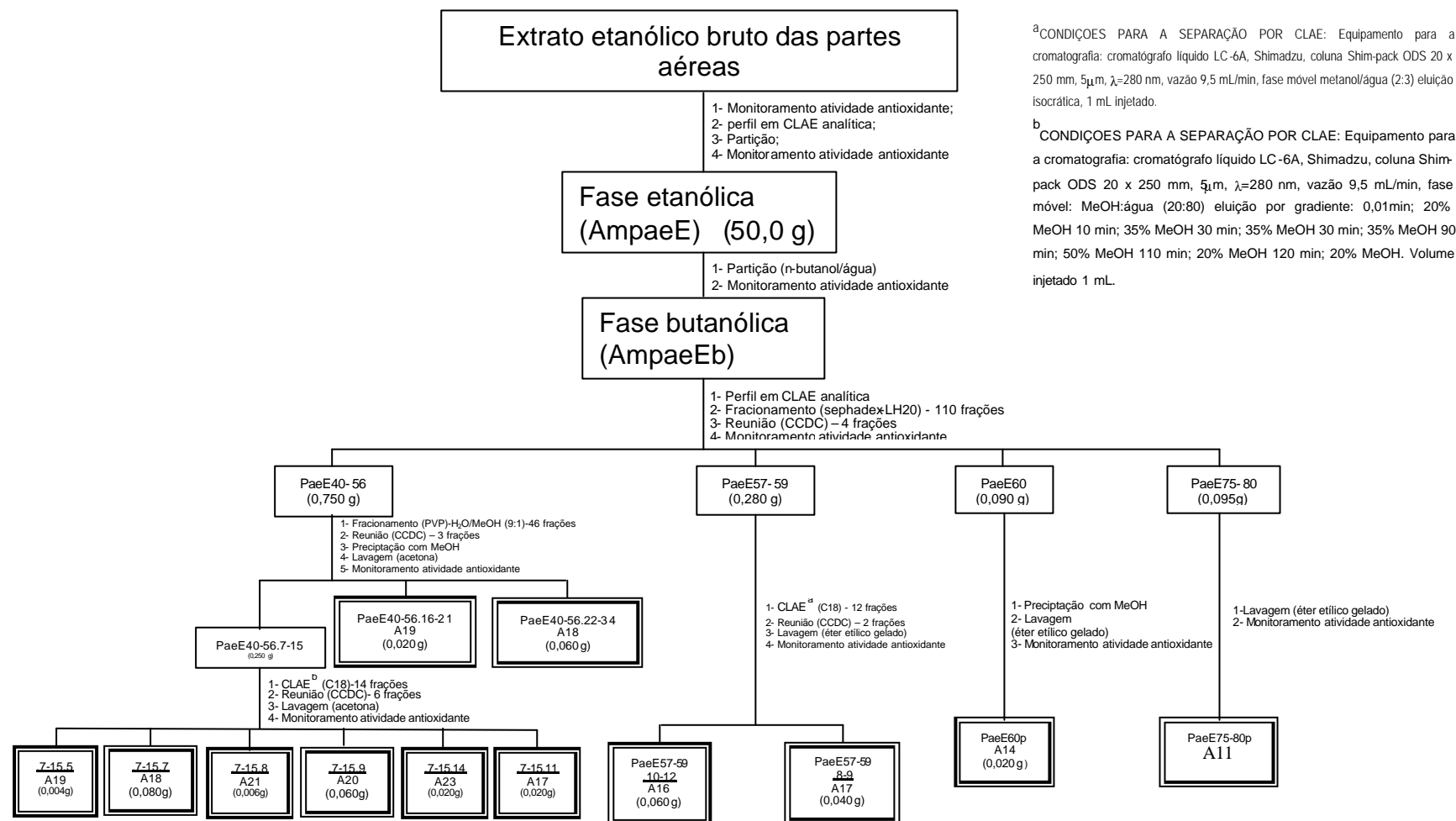
Para os perfis cromatográficos obtidos por CCDC utilizou-se placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) com espessura de 0,25mm. Como eluentes na CCDC utilizaram-se diferentes proporções das misturas: Hex/AcOEt, AcOEt/MeOH, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, MeOH/H₂O, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ ou BAW. Como reveladores utilizou-se irradiação com UV em 254 e 366 nm (lâmpadas Mineralight, modelo UV-GL-25), nebulização com ácido sulfúrico seguido de aquecimento a 100° C e nebulização com reagente NP/PEG *Natural Products-Polyethyleglycol-reagent*. De acordo com os perfis cromatográficos na CCDC, as frações semelhantes foram reunidas e monitoradas pela atividade antioxidante.

Os perfis cromatográficos obtidos via CLAE (escala analítica) foram realizados em cromatógrafo líquido LC-6A Shimadzu equipado com detector espectrofotométrico UV-visível SPD-6A, controlador modelo SCL-6B e integrador C-R6A. As colunas utilizadas

foram Shim-pack ODS 4,6 x 250 mm. Como fase móvel foram utilizados diferentes sistemas solventes.

4.5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

Com base nos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante e pelas análises por CCDC e CLAE os constituintes químicos das frações foram isolados e purificados empregando-se processos cromatográficos diversos tais como: cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), cromatografia em coluna clássica (CCC) e por cromatografia de alta eficiência (CLAE) (MARSTON; HOSTETTMANN, 1991). Para a purificação de substâncias sólidas foram utilizadas também recristalizações e lavagens em solventes apropriados (acetona, éter etílico, hexano, CHCl_3 e MeOH, quente ou gelado) de acordo com a figura 5.



^aCONDIÇÕES PARA A SEPARAÇÃO POR CLAE: Equipamento para a cromatografia: cromatógrafo líquido LC-6A, Shimadzu, coluna Shim-pack ODS 20 x 250 mm, 5 μ m, λ =280 nm, vazão 9,5 mL/min, fase móvel metanol/água (2:3) eluição isocrática, 1 mL injetado.

^b CONDIÇÕES PARA A SEPARAÇÃO POR CLAE: Equipamento para a cromatografia: cromatógrafo líquido LC-6A, Shimadzu, coluna Shim-pack ODS 20 x 250 mm, 5 μ m, λ =280 nm, vazão 9,5 mL/min, fase móvel: MeOH:água (20:80) eluição por gradiente: 0,01min; 20% MeOH 10 min; 35% MeOH 30 min; 35% MeOH 30 min; 35% MeOH 90 min; 50% MeOH 110 min; 20% MeOH 120 min; 20% MeOH. Volume injetado 1 mL.

Figura 5: Etapas do isolamento dos constituintes químicos com atividade antioxidante do extrato em etanol das partes aéreas (Ampae) de *Alternanthera maritima*.

4.6 Identificação dos constituintes químicos

A identificação dos constituintes químicos foi realizada utilizando-se cromatografia de alta eficiência (CLAE – UV/DAD) e comparação com amostras-padrão quando possível e necessário. Utilizou-se também análise por espectrometria de massa (IES-EM) (TAKEARA et al., 2007; CROTTI et al., 2006).

Os espectros de massa foram obtidos utilizando-se IES-EM (espectrometria de massa com ionização por *electrospray*) – aparelho Micromass Quattro LC, 30V, módulos positivo e negativo.

4.7 Monitoramento de metabólitos na planta *in natura* e na cultura de células

O estudo comparativo das substâncias presentes nos extratos da planta *in natura* e obtidos por cultura de células foi realizado utilizando CCDC, CLAE (em fase reversa).

Inicialmente procedeu-se o monitoramento da atividade antioxidante dos extratos das plantas *in natura* e obtidas por culturas de células (meios T11 e T43) e realizou-se análise por CCDC utilizando placas de sílica gel (10x10 cm, Aldrich) como fase estacionária e clorofórmio/metanol (4:1) como fase móvel. Realizados os cromatogramas as placas foram visualizadas sob luz UV e em seguida reveladas com ácido sulfúrico e aquecimento.

Utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), traçou-se o perfil cromatográfico dos extratos das plantas *in natura* e obtidas por culturas de células (meios T11 e T43 semi-sólidos).

Para tanto, 40,0 mg dos extratos foram submetidos a uma coluna C-18 (Altech, spe, 3,0 mL) e eluídos, consecutivamente, com metanol (9,0 mL), diclorometano (9,0 mL) e hexano (9,0 mL), sendo os solventes evaporados.

As frações metanólicas foram analisadas utilizando-se a CLAE-UV/DAD (JACOME et al., 2004; PAIVA et al., 2002), sendo obtidos os perfis cromatográficos dos extratos e realizadas injeções das amostras-padrão de flavonóides (Tabela 5, p. 60 - Anexo) isolados dos extratos das plantas *in natura*. Tanto as frações metanólicas quanto as substâncias-padrão isoladas das plantas *in natura* (1,0 mg) foram solubilizados em 1,0 mL de metanol/água (1:1) e 20,0 µL analisados.

As condições cromatográficas de operação para as análises por CLAE foram:

- aparelhagem: cromatógrafo líquido shimadzu-LC 10, equipado com duas bombas LC10ADvp shimadzu, detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos (UV/DAD) SPD-M10Avp, sistema de controle SCL-10Avp e autoinjeter SIL-10Avp com volume de injeção de 20,0µL.

- para análise dos flavonóides isolados das plantas *in natura* empregou-se a CLAE em fase reversa utilizando coluna supelco RP-18 (2550,0 x 4,6 mm x 5 µm), temperatura da coluna de 35°C. A composição da fase móvel variou em gradiente linear de metanol:água com 0,1 % de ácido acético: [0 a 15 min (10 a 30% de metanol), 15 a 25 min (30% metanol), 25 a 50 min (30 a 100% metanol), 50 a 55 min (100 a 10% metanol), 55 a 60 min (10% metanol)]. A vazão da fase móvel permaneceu a 1,0 mL/min. Detecção por varredura de espectro de 200 a 400 nm com acompanhamento em 3 comprimentos de onda 220, 280 e 320 nm.

4.8 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Na monitoração e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos vegetais, frações e substâncias isoladas foram utilizados os ensaios abaixo relacionados.

4.8.1 Ensaio com b caroteno em CCDC

As amostras (extratos e frações) foram aplicadas, em diferentes concentrações (6,25 a 800 ppm), em placa cromatográfica tendo como adsorvente sílica gel 60 (Merck) com espessura da camada adsorvente de 0,25 mm e a CCDC foi desenvolvida em sistema solvente apropriado para eluição das amostras (BAW – ButOH/Ac.Acético/Água – 80:2:18). Após finalização do processo cromatográfico e evaporação do solvente a cromatoplaça foi revelada utilizando solução de β - caroteno a 0,02% em CH_2Cl_2 . A indicação da presença de antioxidante deu-se através do aparecimento de manchas amarelas quando exposto o material à presença da luz ambiente (PRATT; MILLER, 1984). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo o flavonóide quercetina (40ppm). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.2 Ensaio para avaliação da redução do radical DPPH

O radical DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras-teste e amostra-padrão de reduzir o radical DPPH. Para tanto, os extratos, frações ou substâncias isoladas (2,60 mg para extratos e frações ou 1,30 mg para substâncias isoladas) foram dissolvidos em etanol (1 mL), obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas em etanol a fim de se obter concentrações finais no ensaio de 3,125 a 100 ppm (extratos e frações) ou de 1,5625 a 50 ppm (substâncias puras). Para cada amostra (10 μ L) foram adicionados 100 μ L de etanol, 100 μ L de tampão fosfato (100mM) e 50 μ L de solução de DPPH (250 μ M). Decorridos 30min a absorbância foi medida em espectrofotômetro ($\lambda=517\text{nm}$) e a porcentagem de redução do radical foi calculada pela equação: %redução = $100 - [(Abs. Amostra - Abs. controle negativo)/Abs. controle DPPH - Abs. controle negativo] \times 100$ (HUANG; OU; PRIOR, 2005; CUENDET et al., 1997). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo o flavonóide quercetina e/ou Trolox (1,5625 a 50 ppm). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.3 Ensaio de fenóis total por Folin–Ciocalteu (FCR)

Os extratos e frações foram analisados quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais solúveis utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (PICCINELLI et al., 2004; WU et al., 2004). Para tanto, os extratos e frações foram solubilizados em metanol, sendo preparadas diluições com concentrações entre 20 e 200 ppm. Para a substância de referência (ácido gálico) foi elaborada curva analítica na concentração de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 ppm. A absorvância das amostras e amostra-padrão foi medida em espectrofotômetro ($\lambda=730$ nm) e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (AGE) por grama de extrato ou fração em base seca (mg de AGE/g). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo o flavonóide quercetina (40 ppm). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.4 Ensaio ORAC_{FL}

A capacidade antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC_{FL} com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (2,2'-Azobis (2-amidipropane) dihydrochloride) como fonte de radical livre. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com metodologia descrita por Prior et al. (2003) e Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001) com modificações (SALVADOR et al., 2006). Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos (50 mg/mL), frações (5 mg/mL) em tampão fosfato/DMSO (99:1) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato. As substâncias isoladas e o Trolox (substância de referência (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) - análogo da vitamina E) foram analisadas nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 μ M, empregando-se o mesmo sistema diluente. A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda=485$ nm e emissão $\lambda=528$ nm) em leitor de microplaca monitorando a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 min (temperatura=37°C). Os resultados foram expressos como μ mol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração em base seca (μ mol de TE/g) e como Trolox equivalente relativo para as substâncias isoladas. Como controle positivo utilizou-se ácido cafeico, ácido clorogênico e quercetina e como controle negativo a solução diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.5 Ensaios de quimiluminescência

4.8.5.1. Ensaio celular

Este ensaio foi realizado como descrito por Kanashiro et al. (2004) e Souza et al. (2007). No tubo reacional, às suspensões de leucócitos polimorfonucleares (LPMN) (1×10^6 células/mL) foi adicionada solução contendo luminol (160 $\mu\text{mol/L}$), sendo em seguida tratadas com o diluente DMSO, concentração final $\leq 1\%$ (controle negativo) ou com as amostras-teste (6,25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico bruto ou frações ou 3,125 a 50 $\mu\text{g/mL}$ das substâncias isoladas e controle positivo) dissolvidas em DMSO (diluente). Os tubos foram incubados por 3 min. a 37°C e o zimosan opsonizado (ZO, 1mg/mL) foi adicionado para iniciar a geração das EROs. ZO foi preparado segundo método de Cheung et al. (1983) com pequenas modificações (KANASHIRO et al. 2004). A produção de quimiluminescência (QL) foi mensurada em um luminômetro (AutoLumat LB953, EG&G Berthold, Germany) durante 15 min, a 37°C . A área sob a curva da QL (AUC) foi usada para calcular a atividade inibitória de cada amostra, como segue: porcentagem de inibição = $100 - (\text{AUC amostra}/\text{AUC controle}) \times 100$. A atividade relativa de cada amostra analisada foi comparada através de seus valores de IC_{50} (concentração necessária para promover 50% de inibição da QL). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras (DMSO a 1%) e como controle positivo o flavonóide quercetina (3,125 a 50 ppm). Todos os procedimentos foram realizados pelo menos em triplicata.

4.8.5.2. Ensaio livre de células

Este ensaio foi desenvolvido segundo Krol et al. (1994) com modificações. No tubo reacional, alíquotas de solução de H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) foram adicionadas, juntamente com a solução de luminol (160 $\mu\text{mol/L}$) e tratadas com o diluente DMSO, com concentração final $\leq 1\%$ (diluente, controle negativo) ou as amostras-teste (6,25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico bruto ou frações ou 3,125 a 50 $\mu\text{g/mL}$ das substâncias isoladas e controle positivo) dissolvidos em DMSO (diluente). Os tubos foram incubados por 3 min. a 30°C e a geração das EROs foi iniciada pela adição da HRP (*Horseradish Peroxidase*) (0,2UI/mL). HRP e H_2O_2 foram

preparados em tampão sódio-fosfato pH 7,4 (0,1mol/L). A quimiluminescência (QL) foi mensurada em luminômetro por 15 min. a 30°C. A inibição da QL foi expressa em porcentagem, como no ensaio celular. Determinaram-se também os valores de IC₅₀. Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras (DMSO a 1%) e como controle positivo o flavonóide quercetina (3,125 a 50 ppm). Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata.

4.8.6 Ensaio para avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* frente a polimorfonucleares foi avaliada empregando dois ensaios: o teste de exclusão com Azul de Tripán e a atividade da Lactato Desidrogenase (LDH). Estes ensaios foram realizados como descrito em Lucisano-Valim et al. (2002) e Souza et al. (2007). Alíquotas de LPMN (1 x 10⁶ células/mL) foram incubadas por 15 min. a 37°C com as amostras-teste (flavonoides em 50 µmol/L e extrato bruto e fração a 100 µg/mL) e DMSO a 1% (controle negativo, diluente). A lise total das células (controle positivo) foi atingida com 0,2% (v/v) Triton X-100. A atividade da Lactato Desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante foi mensurada usando o kit LDH LiquiformTM e este ensaio está baseado no decréscimo da absorbância da NADH o qual foi lido em 340 nm em um espectrofotômetro DU-70 (Beckman, Fullerton, CA, USA) durante 3 min, a 37°C. Na avaliação da citotoxicidade pelo teste de exclusão com Azul de Tripán, os botões (*pellets*) de células foram suspensos em HBSS-gel e a viabilidade celular foi estimada, baseando-se em contagem de 200 células. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 Análise estatística

Para cada tipo de experimento foi utilizado o teste estatístico mais adequado (por exemplo, ANOVA, teste de Tukey, dentre outros). Os resultados foram apresentados como média (coeficiente de variação, %CV).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Preparação dos extratos, fracionamento e identificação de substâncias majoritárias com atividade antioxidante

Inicialmente foram obtidos os extratos brutos da planta *in natura*, os quais tiveram seus rendimentos em massa calculados (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimento em massa dos extratos brutos obtidos de *Alternanthera maritima*

Parte da planta (<i>alternanthera maritima</i>)	Extratos	Código	massa (g)
Partes aéreas Material vegetal estabilizado (2300 g)	Hexânico	AmpaH	10,60 g
	Etanólico	Ampae	86,77 g
Partes aéreas Material vegetal estabilizado (500,0 g)	Aquoso	EAFL	43,90 g
		EAQL	28,37 g

EAFL: Extrato aquoso frio liofilizado; EAQL: Extrato aquoso quente liofilizado

Com o objetivo de encontrar, isolar e identificar substâncias antioxidantes nos extratos de *A. maritima* (partes aéreas) procedeu-se o fracionamento direcionado pela avaliação da atividade antioxidante empregando-se diferentes ensaios *in vitro*.

Na avaliação inicial da atividade antioxidante dos extratos brutos (hexânico, etanólico e aquoso) obtidos das partes aéreas de *A. maritima* planta *in natura*, apenas o extrato etanólico apresentou-se ativo. Dando seqüência ao fracionamento este extrato foi então suspenso em metanol/H₂O e submetido à partição líquido – líquido com hexano e diclorometano visando a eliminação de pigmentos e constituintes apolares de menor interesse.

A fração hidroalcoólica procedente desta partição foi cromatografada em uma coluna contendo Amberlite XAD-2, obtendo-se, após eluição com H₂O e etanol, a fase etanólica (AmpaeE). Esta etapa do processo foi realizada visando extrair aminoácidos, açúcares e sais inorgânicos pela eluição com H₂O e concentrar glicosídeos (flavonóides, saponinas, e outros compostos polares) na fase etanólica (AmpaeE). No monitoramento da atividade antioxidante a fase etanólica (AmpaeE) manteve-se ativa, sendo em seguida concentrada e submetida à partição com *n*-butanol e H₂O, obtendo-se então a fase butanólica (AmpaeEb) que apresentou-se com elevada atividade antioxidante.

Dando-se seqüência à investigação fitoquímica, obteve-se o perfil químico do extrato bruto etanólico (Ampae) e da fração butanólica (AmpaeEb) ativos empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE (Figuras 6 e 7).

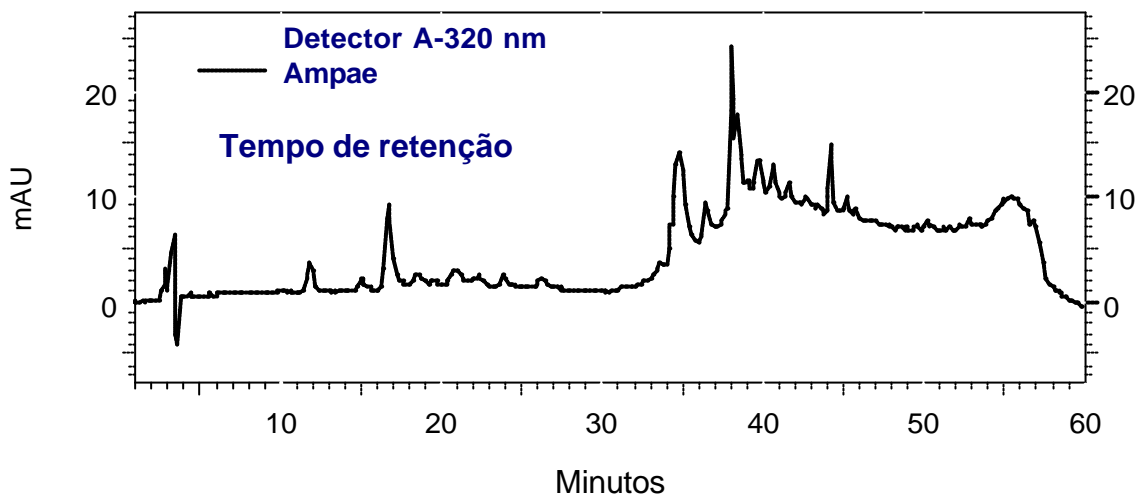


Figura 6: Cromatograma obtido por CLAEUV/DAD (coluna G-18, spe, Altech) do extrato etanólico bruto (Ampae) das partes aéreas de *Alternanthera maritima in natura*.

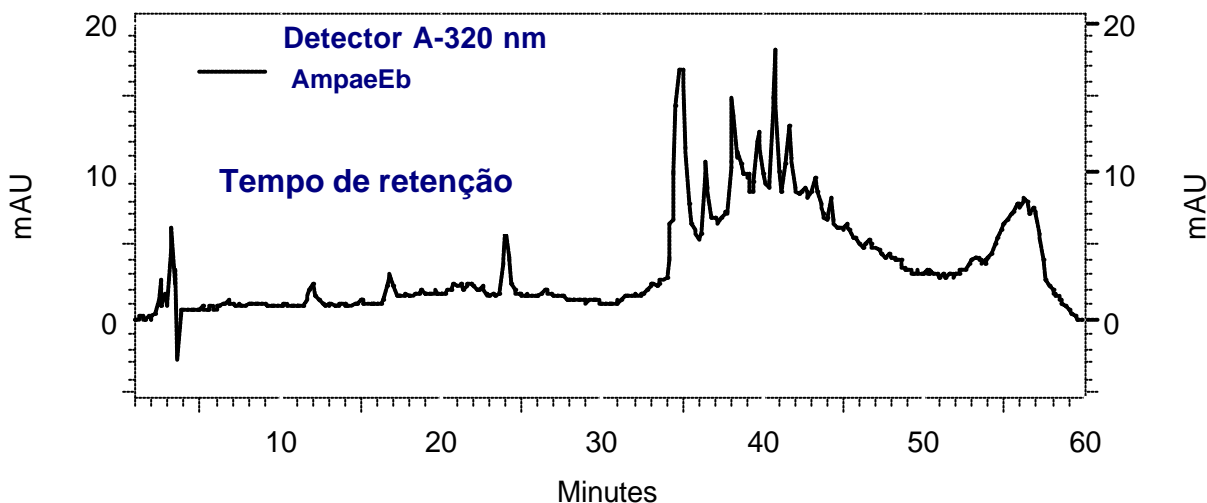


Figura 7: Cromatograma obtido por CLAEUV/DAD (coluna C-18, spe, Altech) da fração butanólica (AmpaeEb) do extrato etanólico das partes aéreas de *Alternanthera maritima in natura*.

Condições de análise: coluna supelco RP-18, 5 μ m e fase móvel, a 1,0 mL/min, MeOH:H₂O com 0,1% de ácido acético-eluição por gradiente: [0 a 15 min (10 a 30% de metanol), 15 a 25 min (30% metanol), 25 a 50 min (30 a 100% metanol), 50 a 55 min (100 a 10% metanol), 55 a 60 min (10% metanol)]. Substâncias caracterizadas pelo tempo de retenção e espectro na região do ultravioleta.

Observou-se através da análise via CLAE de Ampae e AmpaeEb que os seus perfis cromatográficos foram similares, porém verificou-se que em AmpaeEb algumas substâncias foram concentradas, sendo possível visualizar a presença de picos mais intensos, principalmente entre 30 e 45 minutos de retenção.

Então, no intuito de se identificar estas substâncias majoritárias presentes nos extratos ativos (Ampae e AmpaeEb), procedeu-se a análise comparativa do perfil cromatográfico destes extratos com comparação com substâncias padrão de referência do banco de padrões do laboratório (estudo de desreplicação). Todas as análises foram realizadas nas mesmas condições, sendo as substâncias caracterizadas pelo tempo de retenção e espectro na região do ultravioleta. (Tabela 5). Para confirmação da presença ou não das substâncias no extrato e fases da partição ativos lançou-se mão da técnica de enriquecimento padrão ou técnica de co-injeção, sendo as amostras sob análise enriquecidas com as substâncias padrão e em seguidas submetidas á análise cromatográfica. Nove flavonóides puderam ser identificados no extrato Ampae e na fase AmpaeEb.

Tabela 5: Sinais cromatográficos obtidos por CLAE-UV/DAD (tempo de retenção em min e absorção máxima no UV em nm) dos flavonóides isolados de *Alternanthera maritima* planta *in natura* no estudo fitoquímico direcionado pela atividade antioxidante.

Flavonóide (amostra-padrão isolada planta <i>in natura</i>)	Tempo de retenção (min)	Comprimento de onda máximo no espectro (nm)
3-metoxi quercetina (A11)	42,485	258; 295; 358; 387
Vitexina (A14)	34,702	215; 268; 338
Isoramnetina 3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosídeo (A16)	39,708	256; 356
Quercetina 3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (A17)	37,504	256; 356
2''-O- α -L-ramnopiranosilvitexina (A18)	34,748	215; 269; 335; 337
2''-O- α -L-glucopiranosilvitexina (A19)	34,386	215; 269; 339
Isoramnetina 3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (A20)	39,572	255; 356
5,7 diidroxí-4'-metoxiflavona-8- O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 2)-C- β -D-glucopiranosídeo (A21)	37,699	205; 214; 217; 269; 334
Quercetina (A23)	41,209	255; 372

Condições de análise: coluna supelco RP-18, 5 μ m e fase móvel, a 1,0 mL/min, MeOH:H₂O com 0,1% de ácido acético-eluição por gradiente: [0 a 15 min (10 a 30% de metanol), 15 a 25 min (30% metanol), 25 a 50 min (30 a 100% metanol), 50 a 55 min (100 a 10% metanol), 55 a 60 min (10% metanol)]. Substâncias caracterizadas pelo tempo de retenção e espectro na região do ultravioleta.

Devido ao fato de que as substâncias identificadas nos extratos concentraram-se na região entre 30 e 45 minutos de retenção realizou-se ainda uma otimização das condições analíticas em CLAE – UV/DAD, obtendo-se uma melhor separação dos flavonóides em análise (Figura 8).

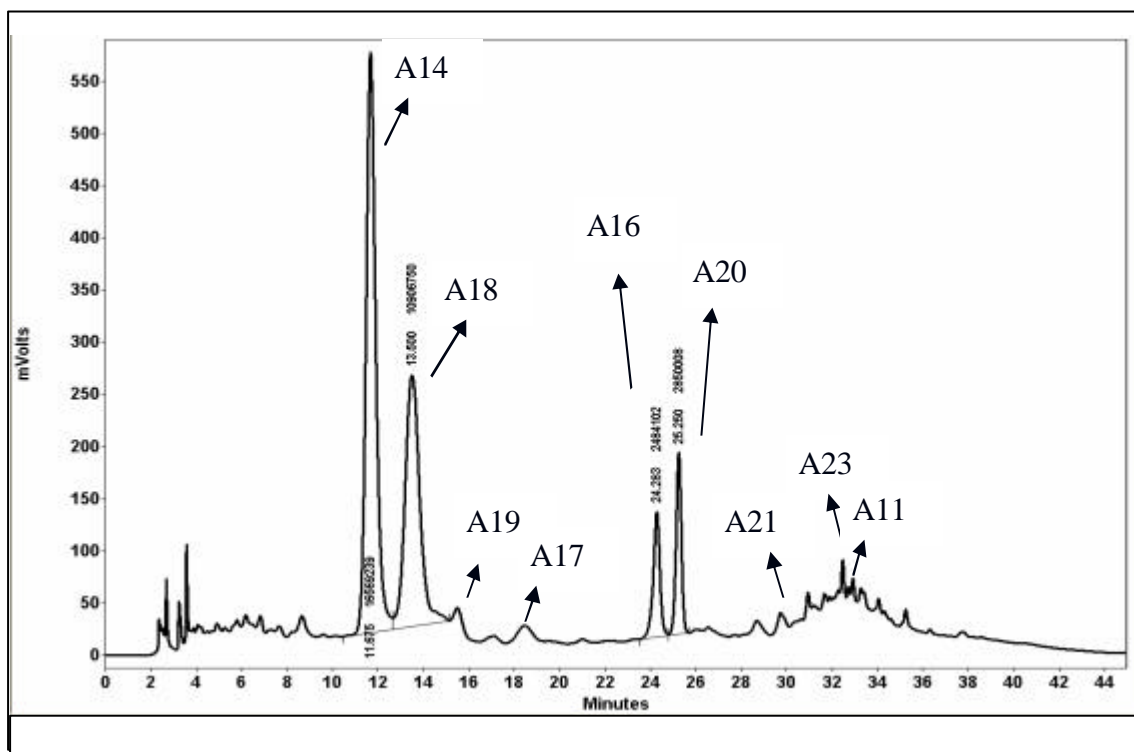
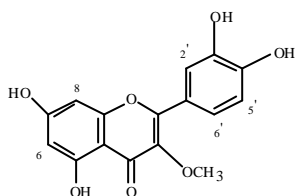


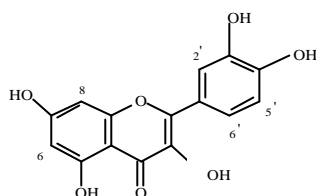
Figura 8: Cromatograma obtido por CLAEUV/DAD (coluna C-18, spe, Altech) da fração butanólica (AmpaeEb) do extrato etanólico das partes aéreas de *Alternanthera maritima in natura*.

Condições de análise: coluna supelco RP-18, 5 μ m, 225 x 4,6 mm, Merck e fase móvel, com eluição por gradiente a 0,8 mL/min, consistindo de solvente A (acetonitrila) e solvente B (água/ácido acético, 99:1, v/v, pH 2,88) como segue: 15% A (15 min), 15-20% A (7 min), 20% A (5 min), 20-40% A (5min), 40% A (5 min), 40-15% A (3min). Substâncias caracterizadas pelo tempo de retenção e espectro na região do ultravioleta ($\lambda=330$ nm).

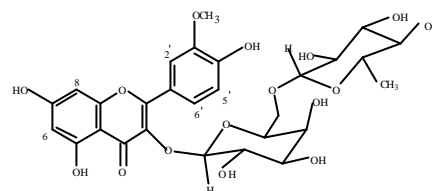
Com estas análises nove flavonóides foram identificados como substâncias majoritárias no extrato ativo Ampae de *A. maritima*: dois agliconas (A11 e A23); quatro C-glicosilados (A14, A18, A19 e A21) e três O-glicosilados (A16, A17 e A20) (Figura 9).



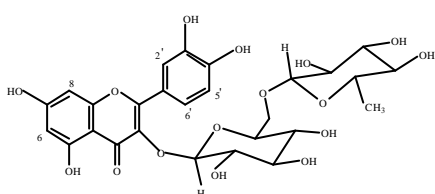
A11- 3-metoxi-quercetina



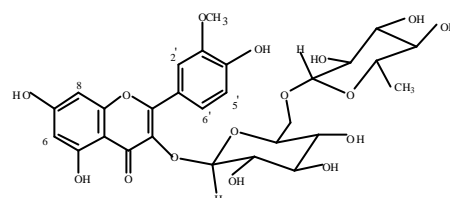
A23- Quercetina



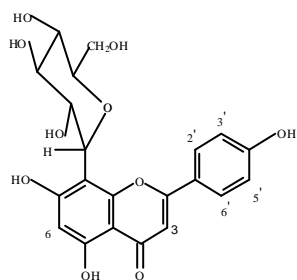
A16 - Isorhamnetina 3-O- α -L-ramnosil
(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosídeo



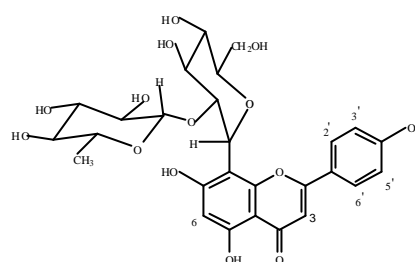
A17 – Rutina



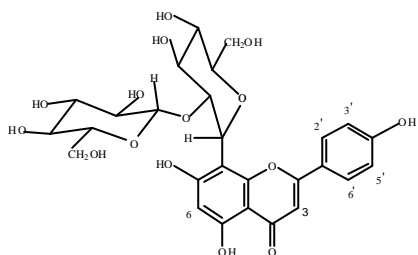
A20 - Isorhamnetina 3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo



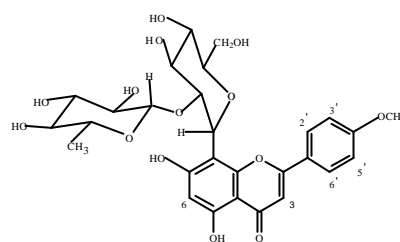
A14 – Vitexina



A18 - 2''-O- α -L-ramnopiranosilvitexina



A19 - 2''-O- α -L-glucopiranosilvitexina



A21 - 5,7 diidroxi-4'-metoxiflavona-8-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 2)-C- β -D-glucopiranosídeo

Figura 9: Flavonóides identificados de *Alternanthera maritima*

Com o objetivo de avaliar atividade antioxidante dos constituintes do extrato ativo, procedeu-se o fracionamento guiado pela atividade antioxidante, visando isolar e purificar estes flavonóides majoritários e investigar sua capacidade antioxidante individualmente. Visto que a fração butanólica foi capaz de concentrar os flavonóides identificados (maior intensidade dos picos) e da mesma forma apresentou-se mais ativa frente aos ensaios antioxidantes procedeu-se então seu fracionamento. A fase butanólica foi cromatografada utilizando-se coluna de sephadex LH-20 (100 x 5 cm) e eluição com metanol na intenção de separar os flavonóides presentes visto que o sephadex comporta-se como uma peneira molecular. Deste processo cromatográfico foram coletadas 110 frações de 15mL cada, as quais foram monitoradas por CCDC sendo então agrupadas em 4 frações principais de acordo com a similaridade dos compostos presentes. As frações foram monitoradas quanto a atividade antioxidante e destas foram isoladas nove substâncias através de métodos cromatográficos diversos e recristalizações (Figura 5, p. 50).

Os flavonóides isolados foram identificados empregando-se a CLAE-UV/DAD por comparação com substâncias padrão e/ou espectrometria de massa (IES-EM).

O flavonóide A11 identificado por CLAE-UV/DAD por comparação com amostra padrão e co-injeção (adição de padrão, enriquecimento) (Figura 10).

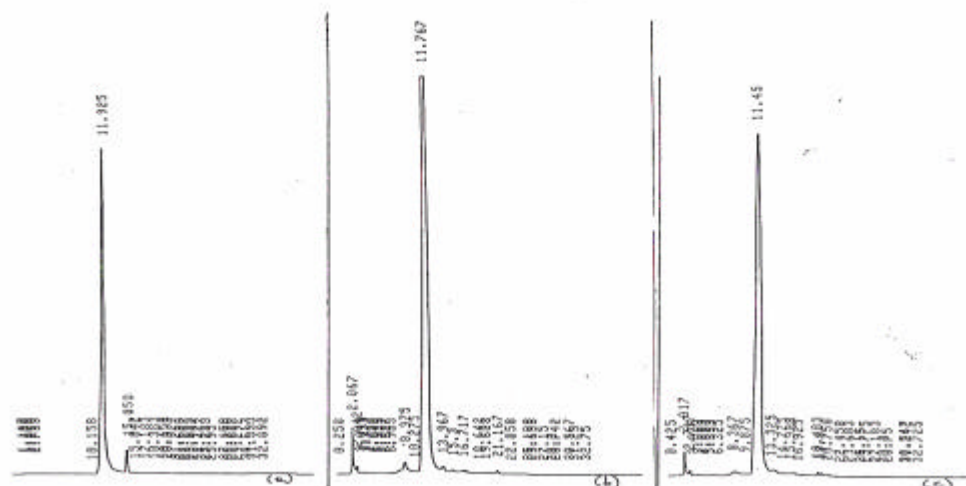


Figura 10: Cromatogramas obtidos por CLAE para as substâncias: (a) 3-metoxi-quercetina padrão; (b) substância A11 isolada e (c) 3-metoxi-quercetina padrão + substância A11 isolada.

Condições de análise: Cromatógrafo líquido LC-6A, Shimadzu, coluna Shim-pack ODS 4,6 x 250mm, $\lambda=280\text{nm}$, fluxo 1mL/min., fase móvel metanol/água (gradiente: 0,01min – 50% MetOH; 25min. – 100% MetOH; 30min. – 100% MetOH; 35min. – 50% MetOH; 40min. – 50% MetOH).

Para a confirmação da identidade dos flavonóides isolados e sua pureza procedeu-se a análise por IES – EM, sendo obtidos seus espectros de massa (Figuras 11 a 25). Pela análise de seus espectros de massa por *electrospray* em módulo negativo e positivo, foi possível identificar o íon *quase*-molecular $[M - H]^-$ e o íon correspondente ao adulto com sódio $[M + Na]^+$, contribuindo portanto para a confirmação das estruturas propostas (Tabela 6).

Tabela 6: Sinais equivalentes aos íons formados (em m/z) obtidos no espectro de massa IES-EM (módulo negativo e módulo positivo, 30V) dos flavonóides isolados das partes aéreas de *Alternanthera maritima* planta *in natura* no estudo fitoquímico direcionado pela atividade antioxidante.

Flavonóide (amostra-padrão isolada planta <i>in natura</i>)	Módulo Negativo $[M - H]^-$	Módulo Positivo $[M + Na]^+$	Peso molecular $[M]$
3-metoxi quercetina (A11)	-	-	316
Vitexina (A14)	431	455	432
Isoramnetina 3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosídeo (A16)	623	647	624
Quercetina 3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (A17)	609	633	610
2''-O- α -L-ramnopiranosilvitexina (A18)	577	601	578
2''-O- α -L-glucopiranosilvitexina (A19)	593	617	594
Isoramnetina 3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (A20)	623	647	624
5,7 diidroxí-4'-metoxiflavona-8-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 2)-C- β -D-glucopiranosídeo (A21)	591	615	592
Quercetina (A23)	301	-	302

- : Experimento não realizado

As análises dos espectros obtidos por IES-EM forneceram informações importantes para a identificação dos flavonóides isolados. Através das análises em módulo negativo é possível identificar os íons *quasi*-molecular formados, os quais apresentavam 1 u.m.a. a menos em seu peso molecular, devido a perda de um H^+ $[M - H^+]$. Já em módulo positivo foi possível identificar os adultos formados com o íon Na^+ , os quais apresentavam 23 u. m. a. a mais devido a adição do Na^+ na molécula $[M - Na^+]$.

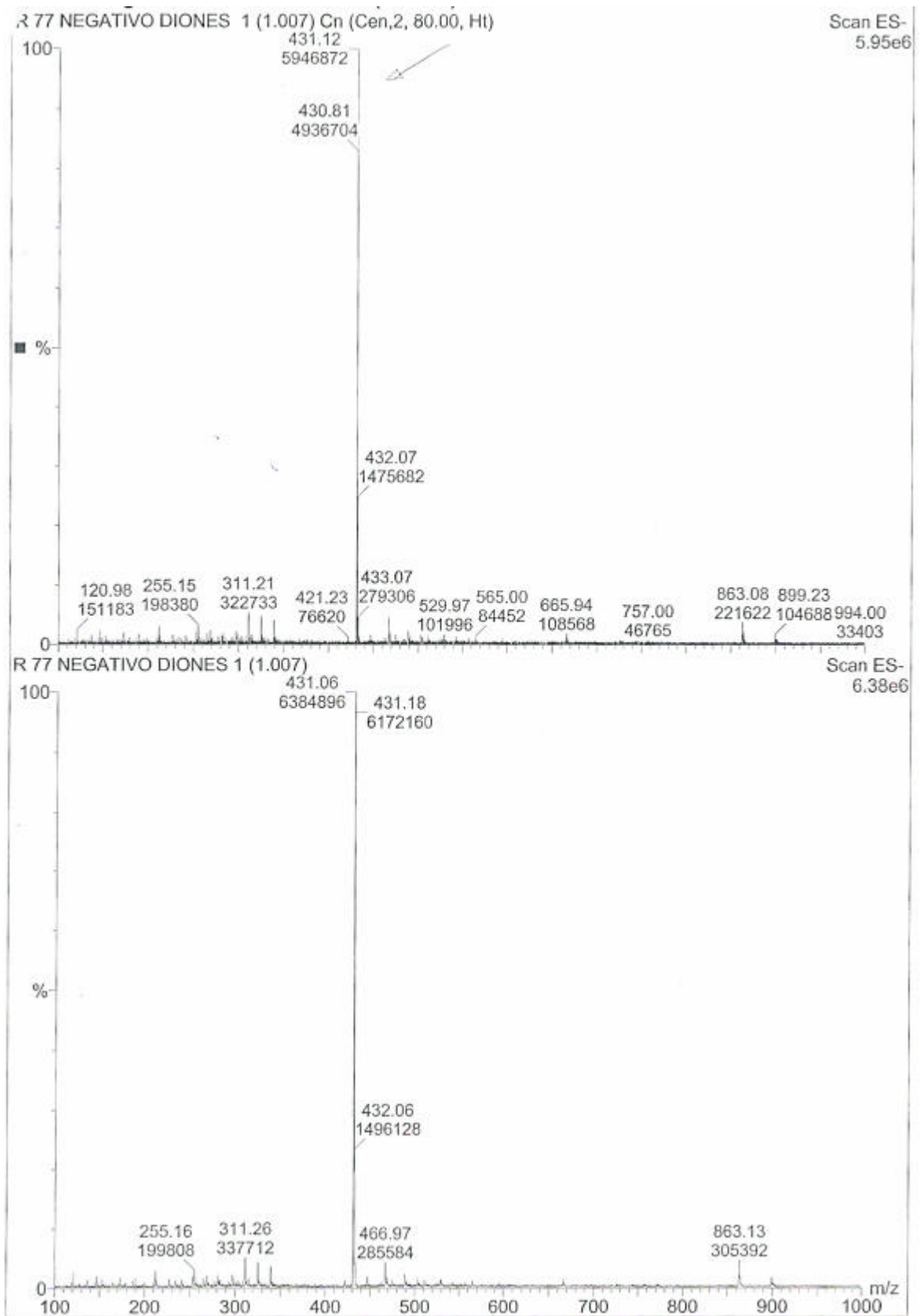


Figura 11: Espectro de massa de A14, IES -EM, módulo negativo, 30V.

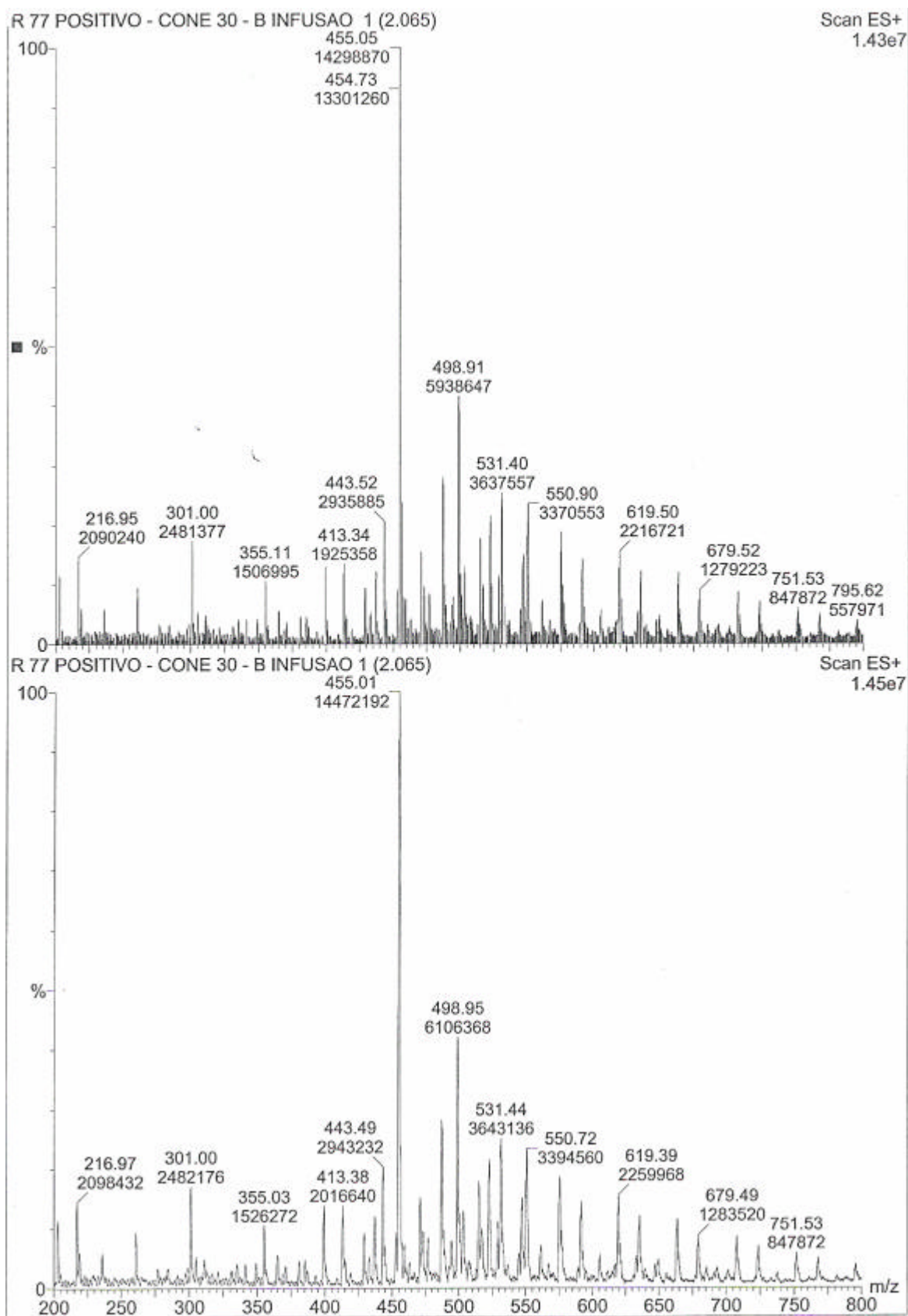


Figura 12: Espectro de massa de A14, IES -EM, módulo positivo, 30V.

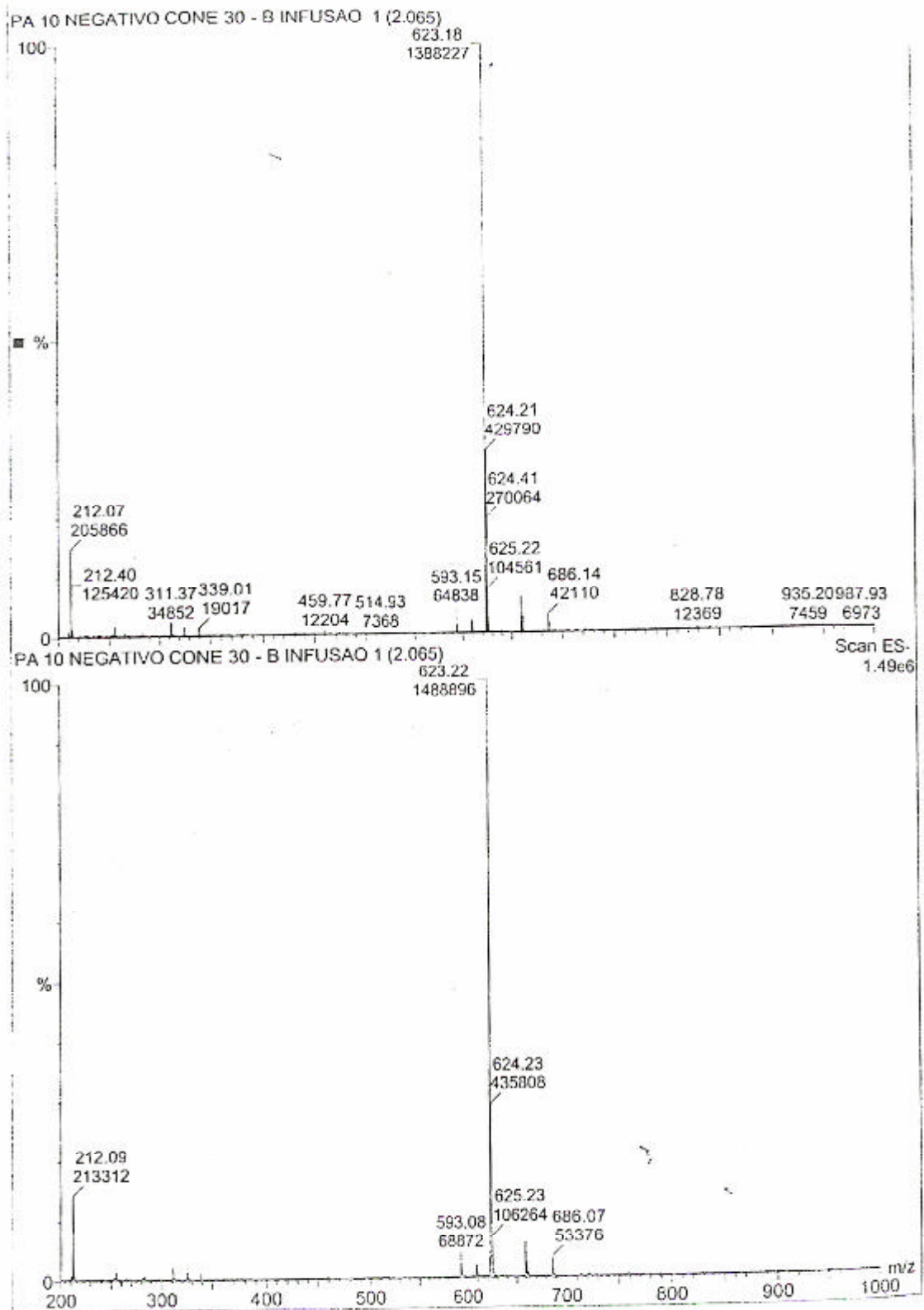


Figura 13: Espectro de massa de A16, IES -EM, módulo negativo, 30V.

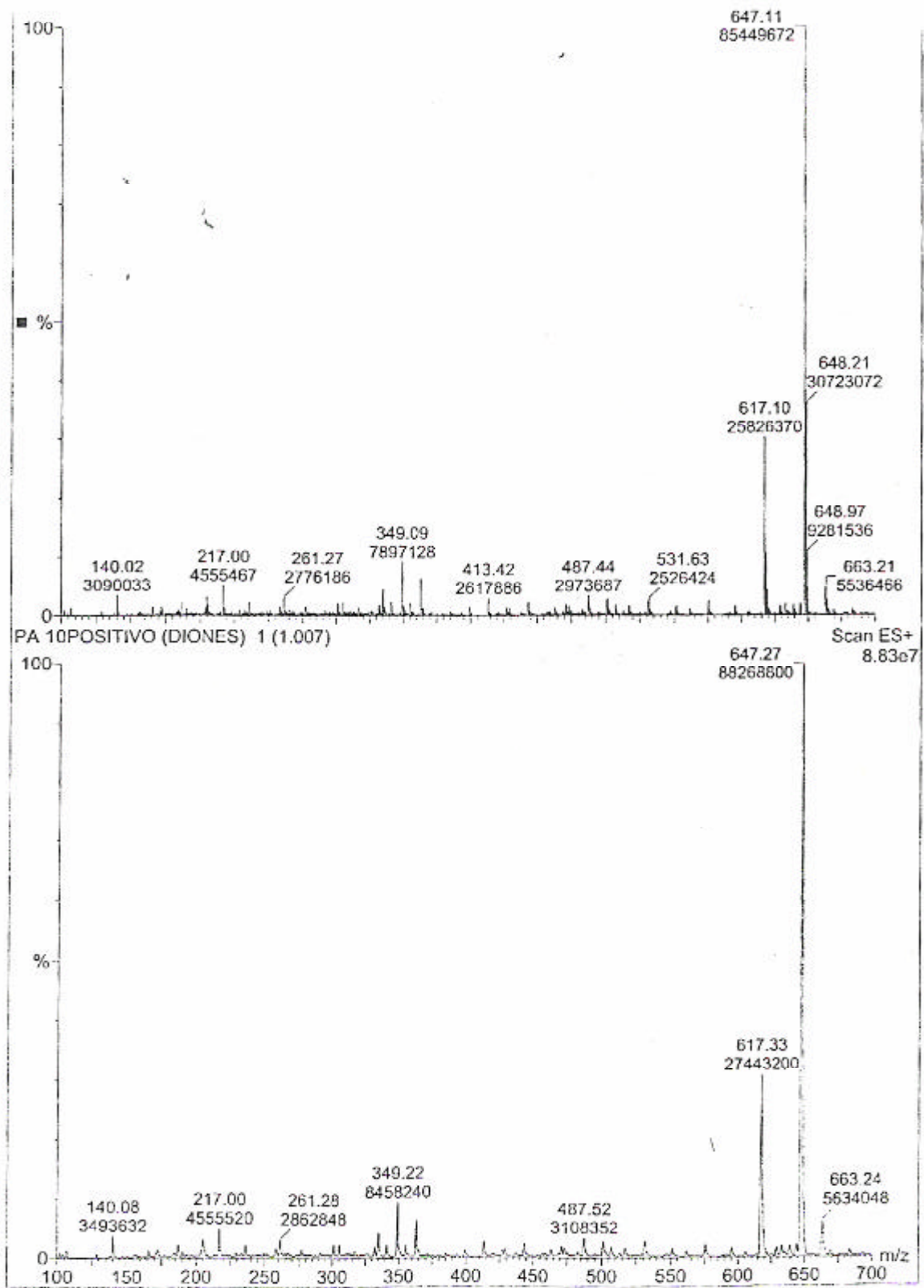


Figura 14: Espectro de massa de A16, IES -EM, módulo positivo, 30V.

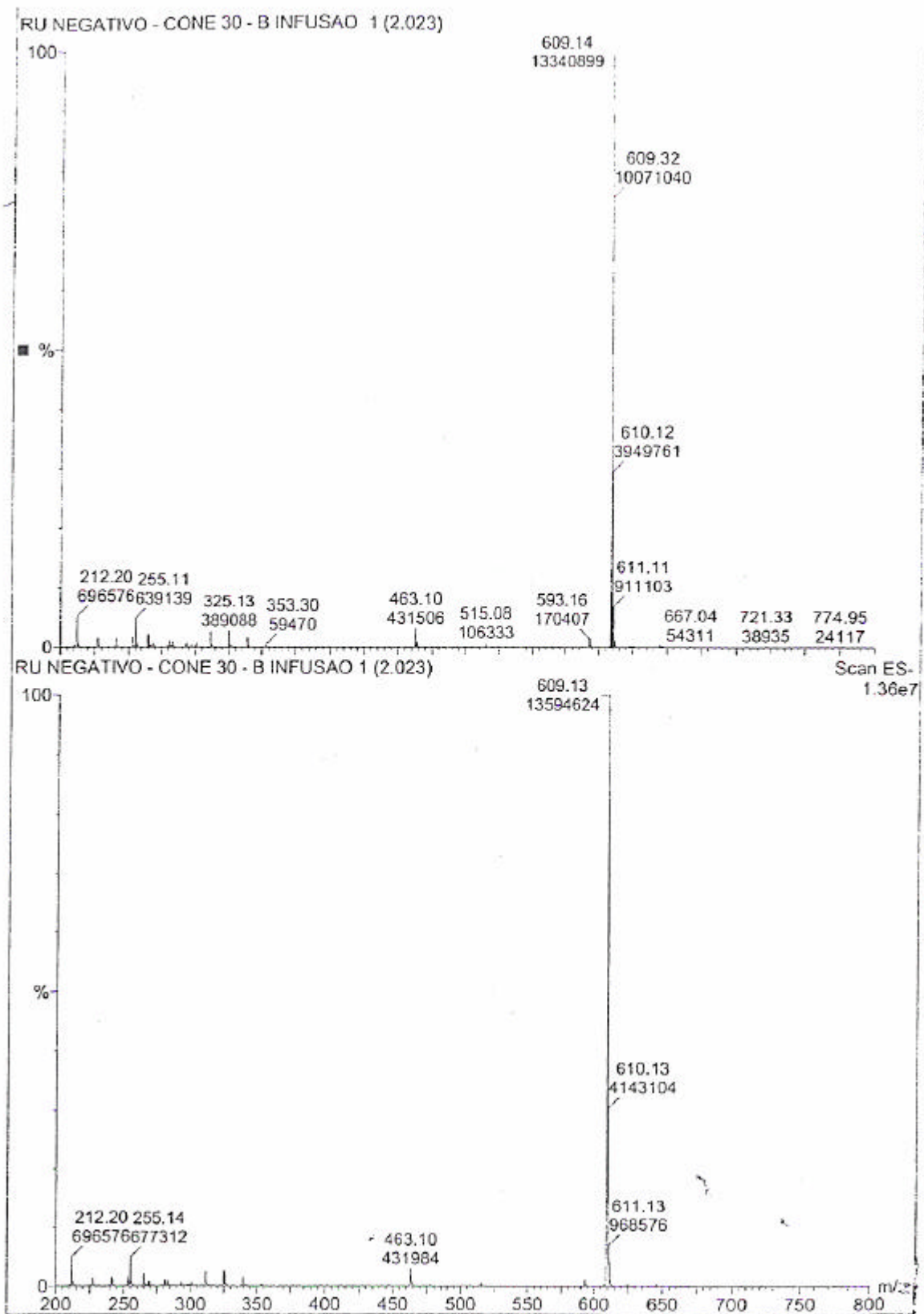


Figura 15: Espectro de massa de A17, IES -EM, módulo negativo, 30V.

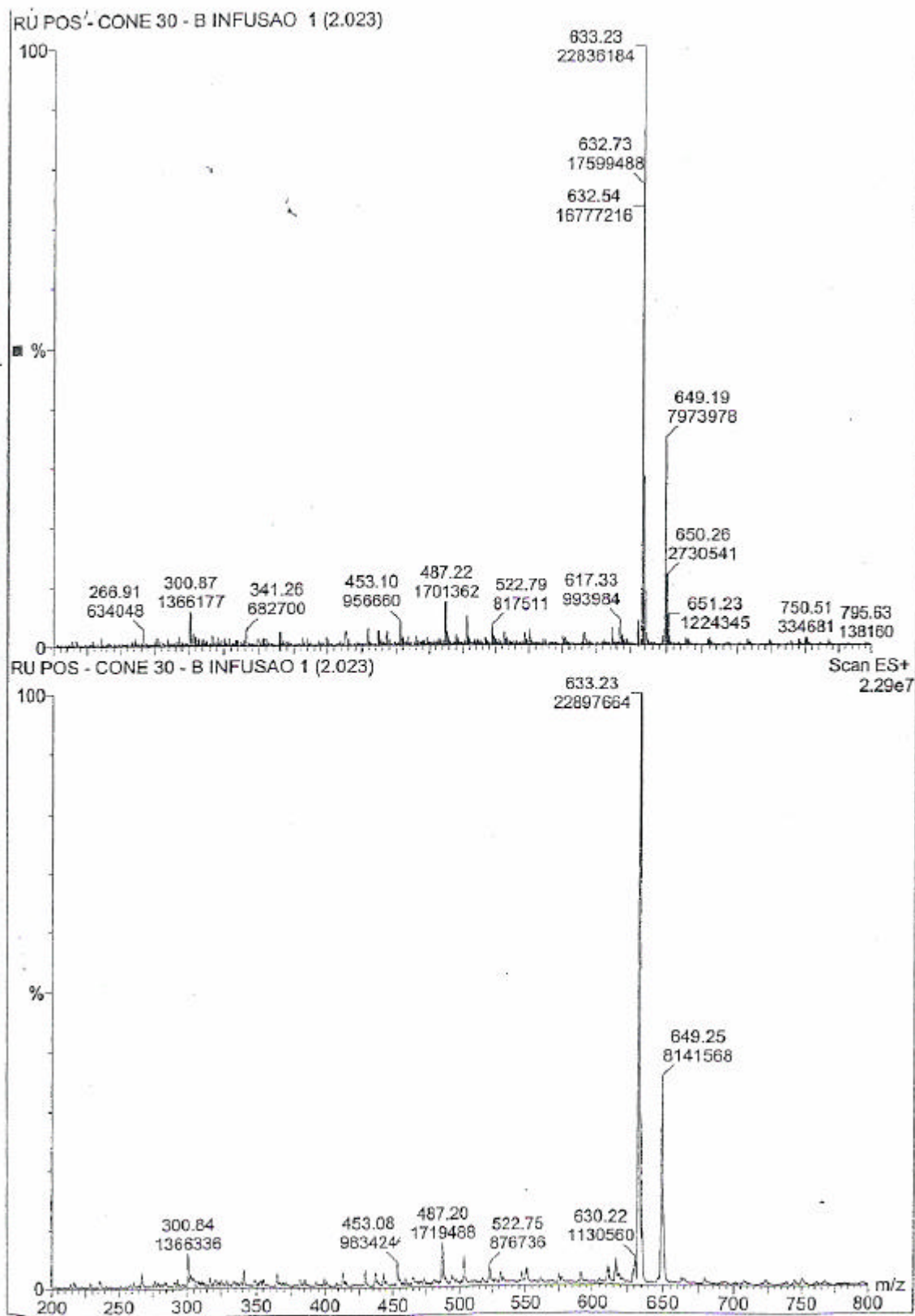


Figura 16: Espectro de massa de A17, IES -EM, módulo positivo, 30V.

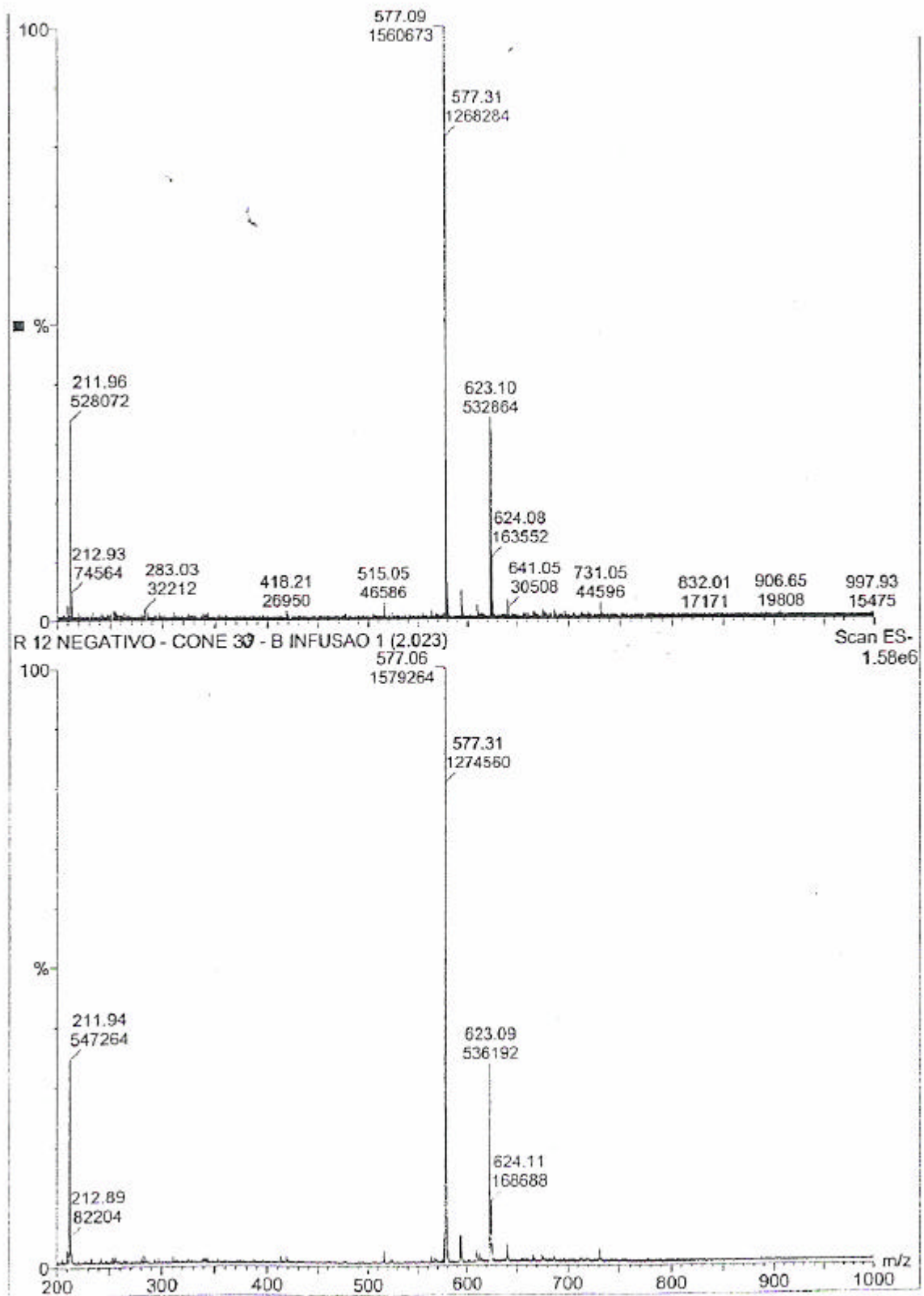


Figura 17: Espectro de massa de A18, IES -EM, módulo negativo, 30V.

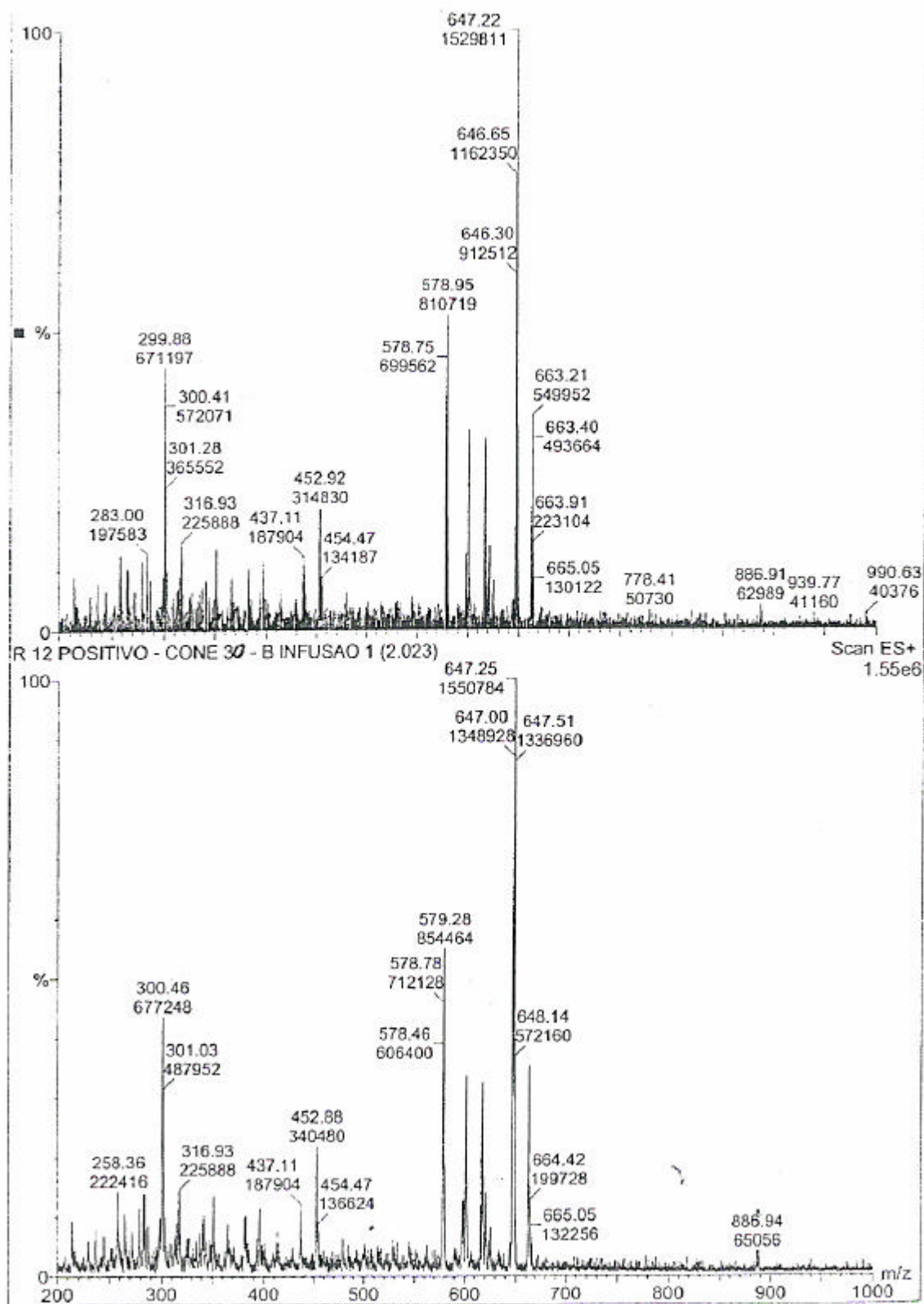


Figura 18: Espectro de massa de A18, IES-EM, módulo positivo, 30V.

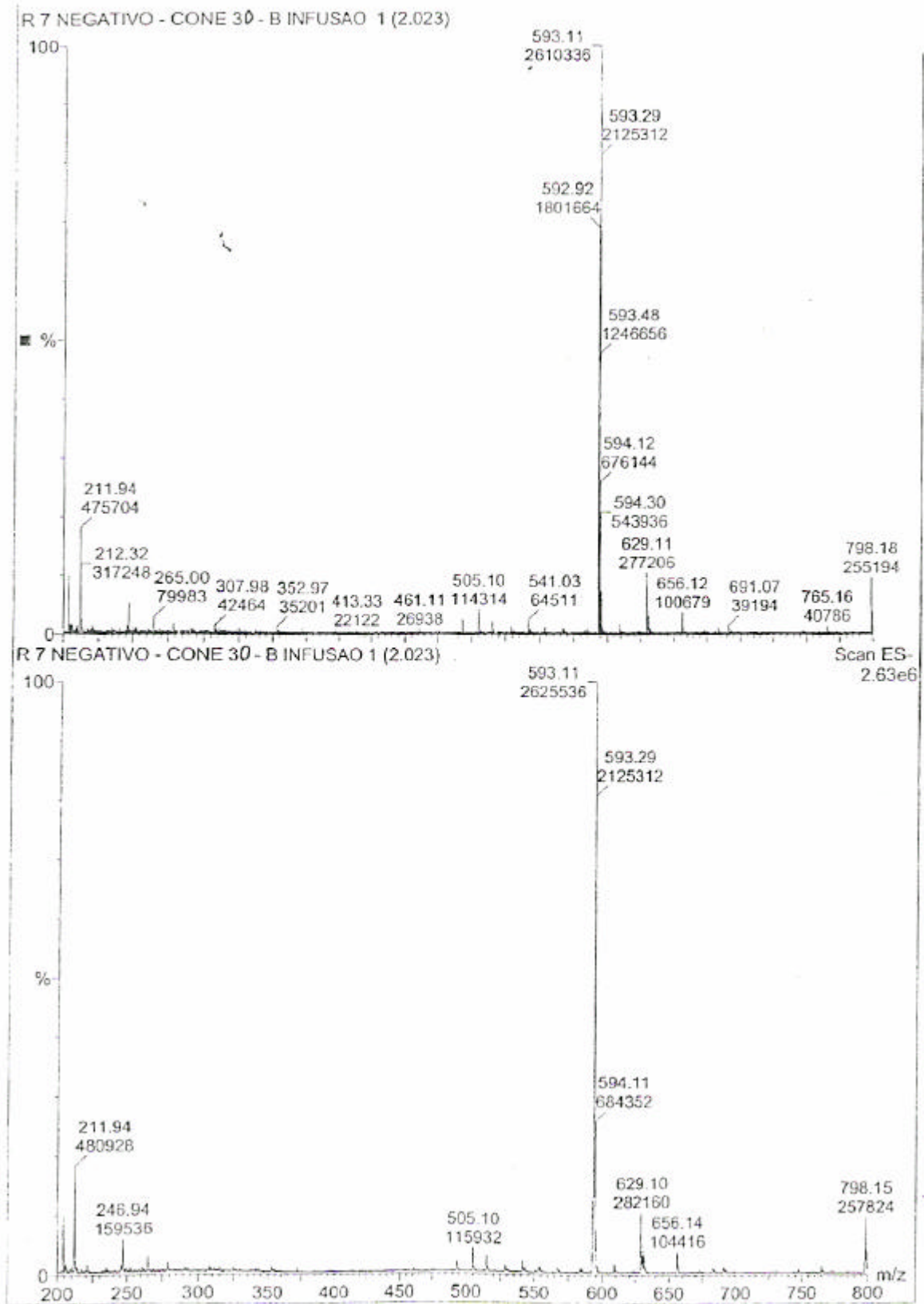


Figura 19: Espectro de massa de A19, IES -EM, módulo negativo, 30V.

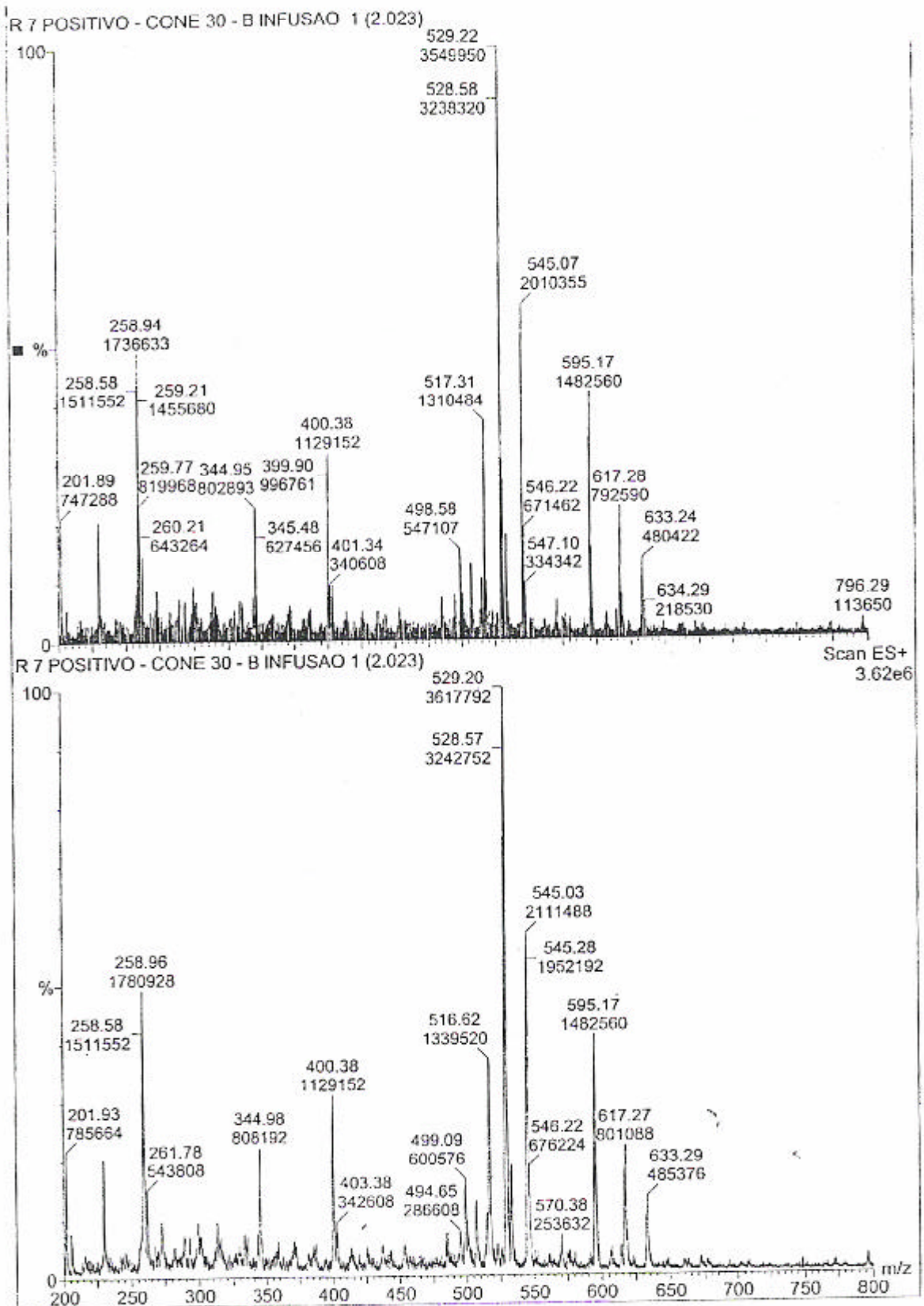


Figura 20: Espectro de massa de A19, IES -EM, módulo positivo, 30V.

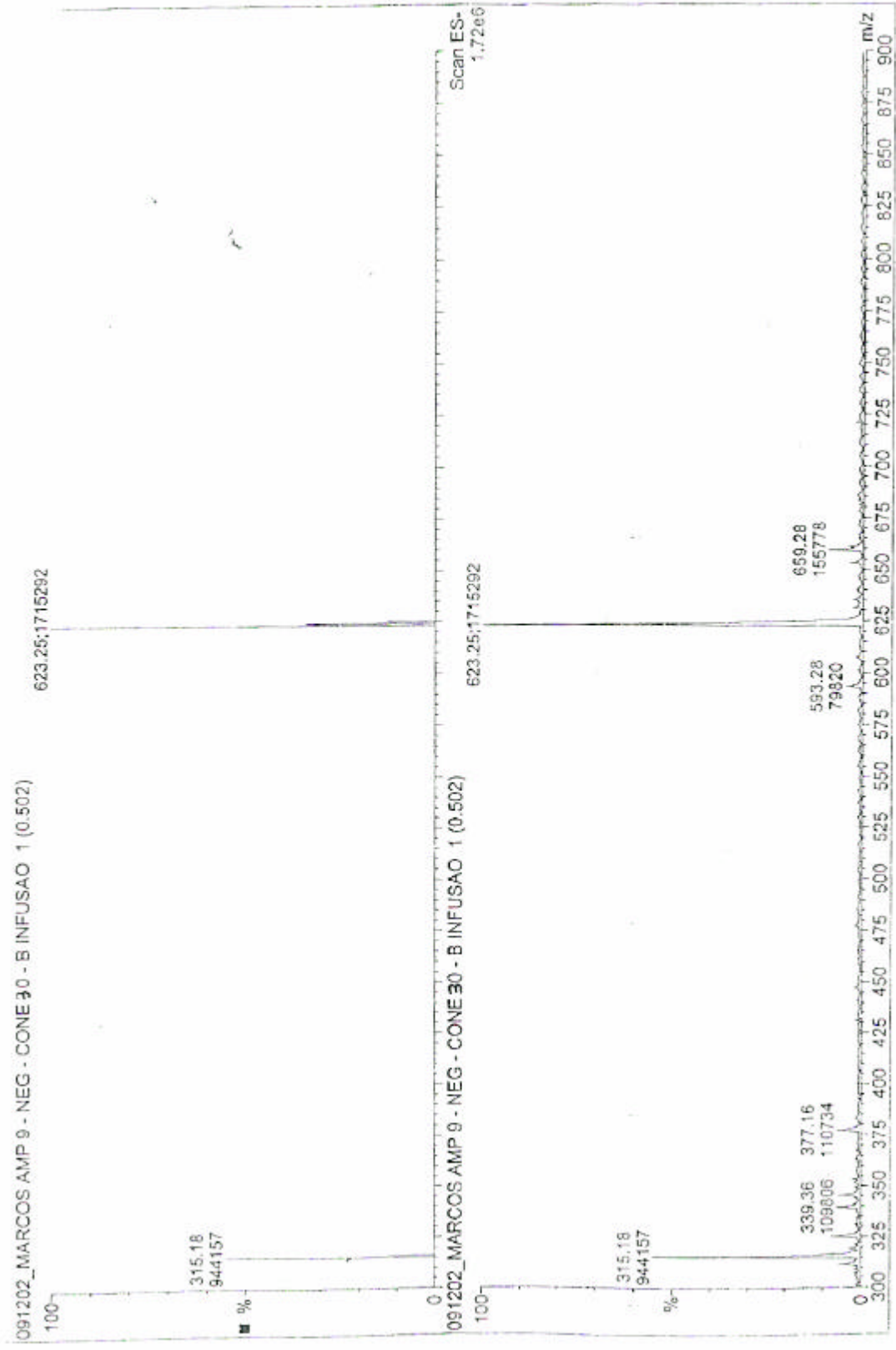


Figura 21: Espectro de massa de A20, IES -EM, módulo negativo, 30V.

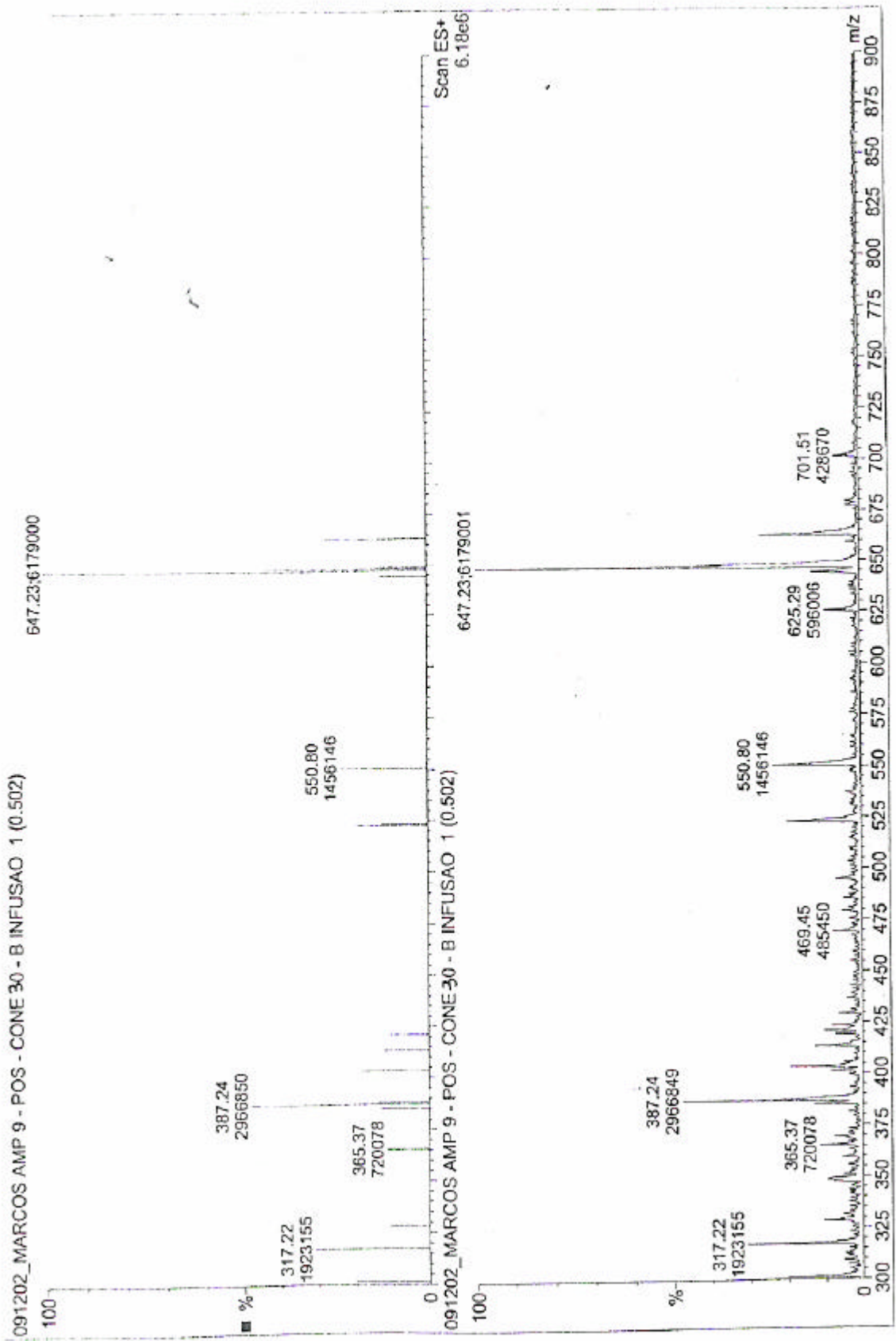


Figura 22: Espectro de massa de A20, IES -EM, módulo positivo, 30V.

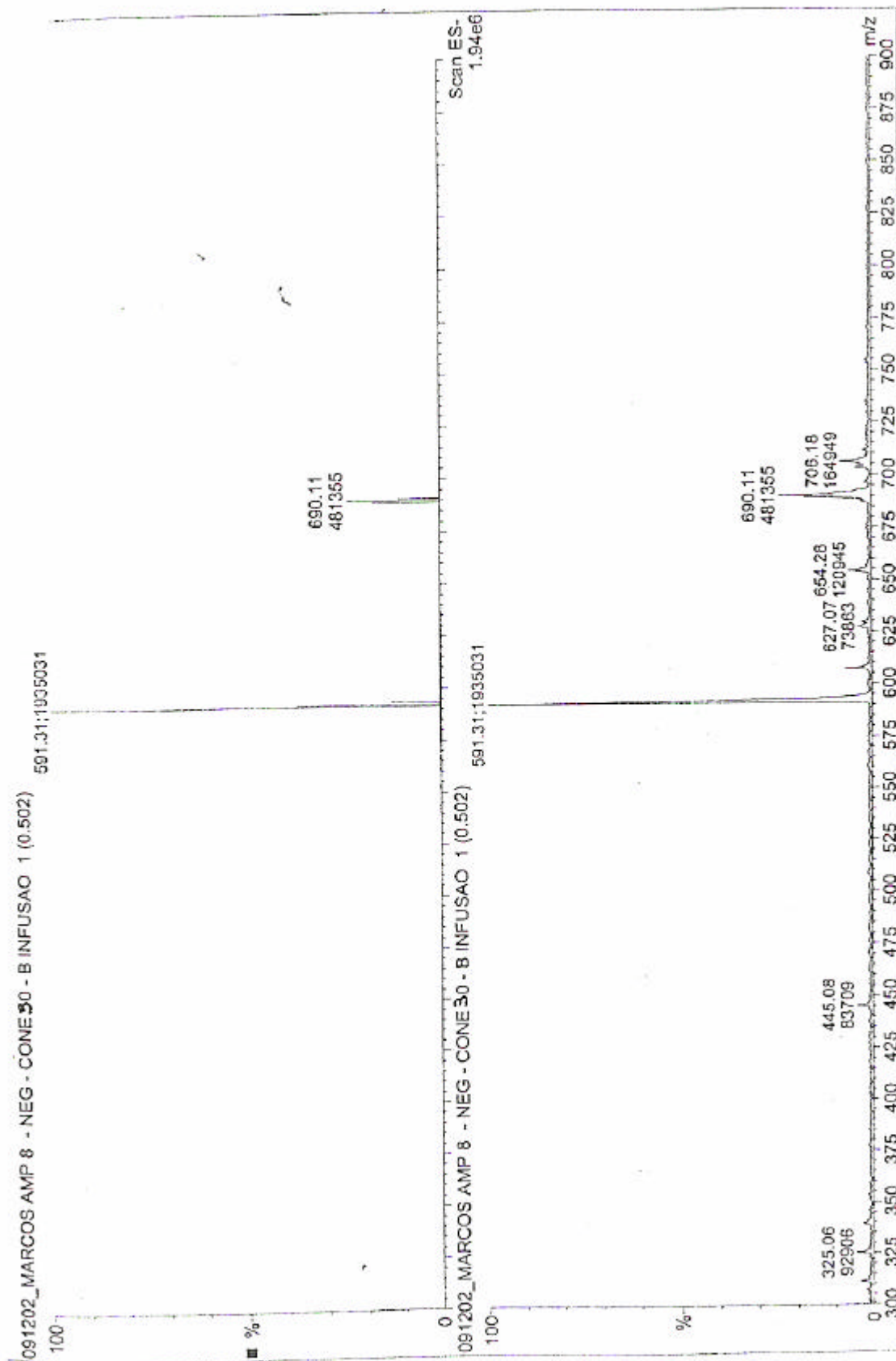


Figura 23: Espectro de massa de A21, IES -EM, módulo negativo, 30V.

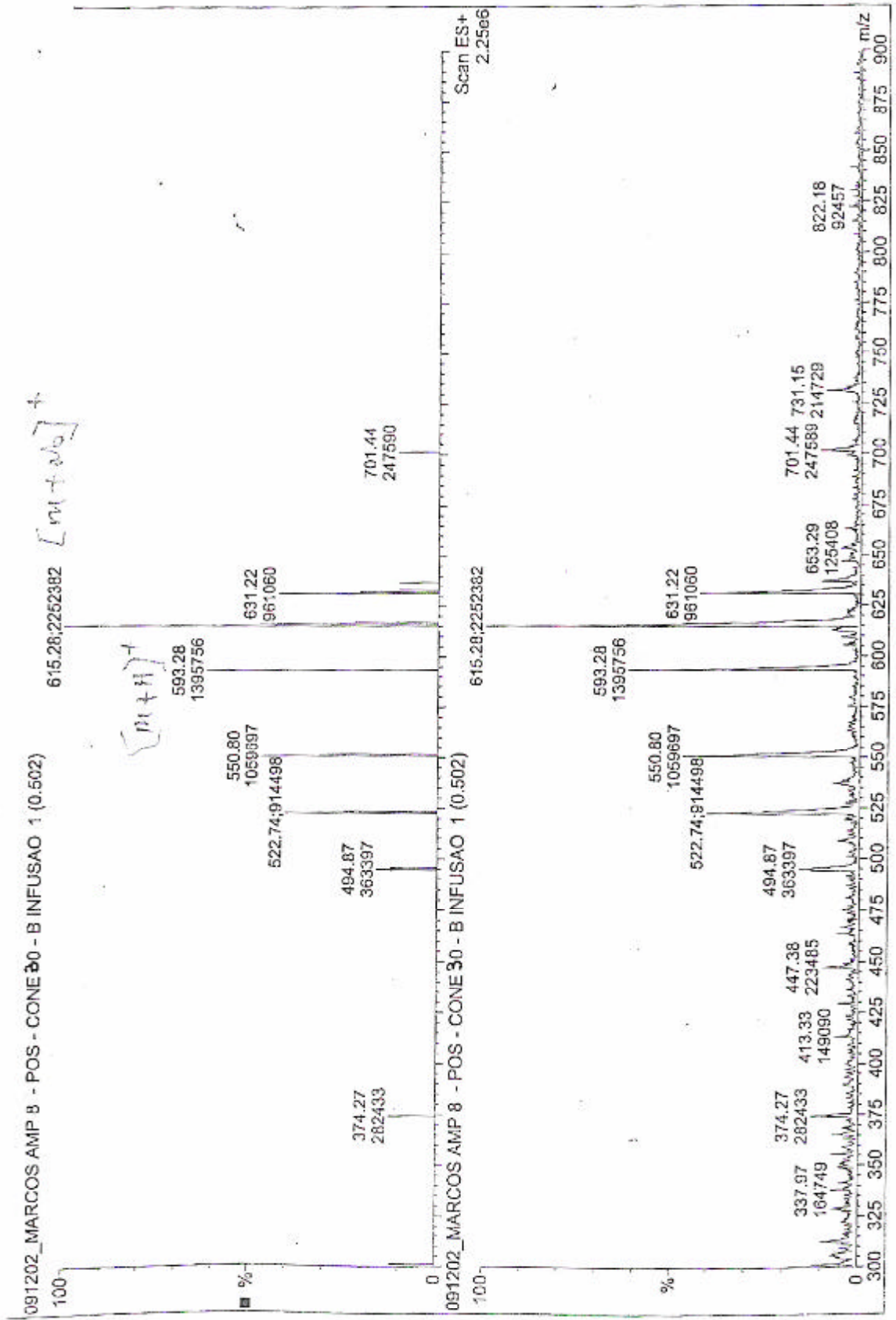


Figura 24: Espectro de massa de A21, IES -EM, módulo positivo, 30V.

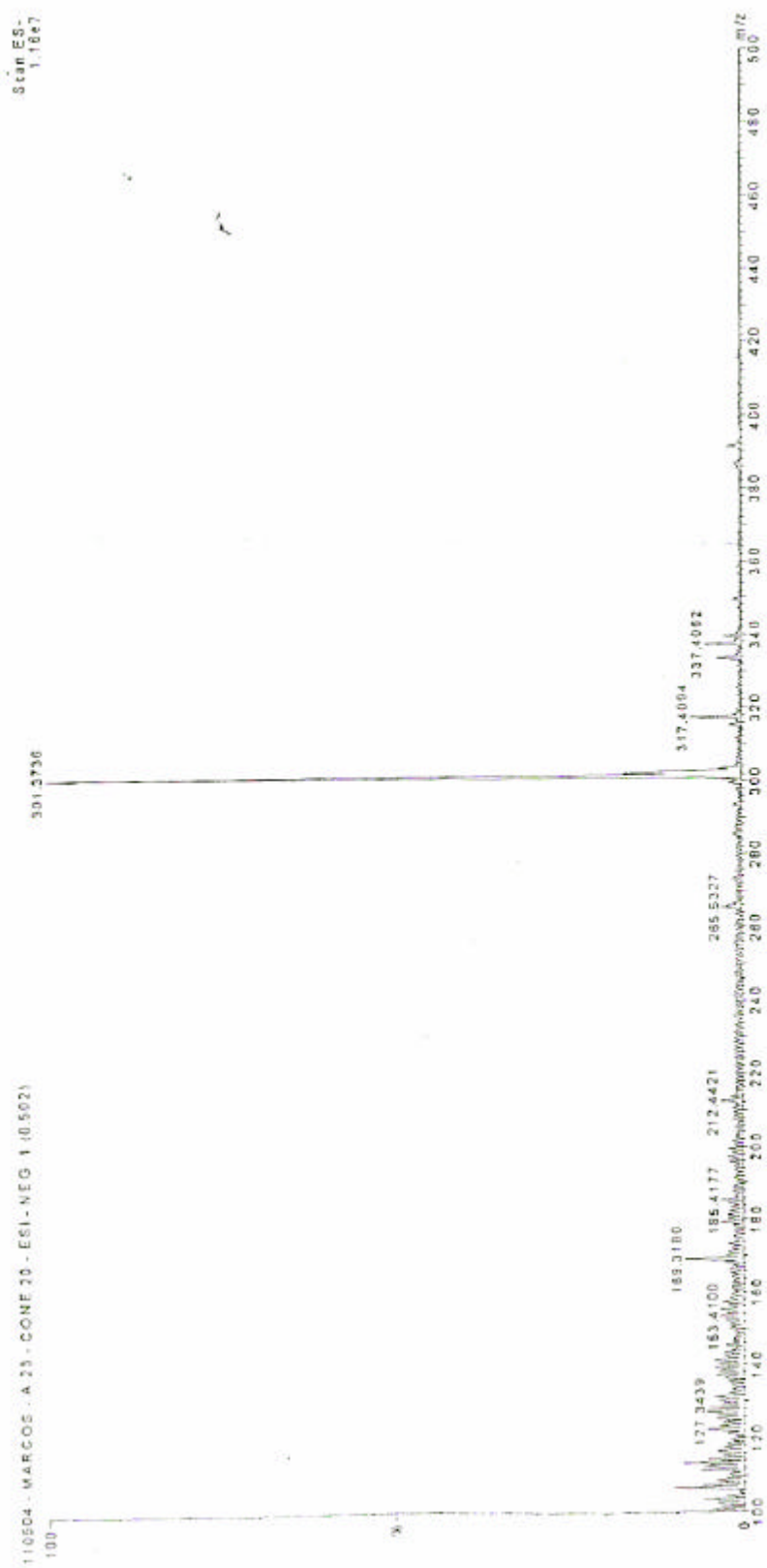


Figura 25: Espectro de massa de A23, IES -EM, módulo negativo, 30V.

5.2 Análise comparativa: planta *in natura* e obtida por cultura de células

Para as culturas de células de *Alternanthera maritima* (cultura de calos) nos meios T11 e T43 foram também preparados os extratos brutos. A massa obtida de extrato (extração com hexano, clorofórmio e metanol e reunidos), partindo-se de 1,0g do pó de células (meio de cultura semi-sólido, 30,0g/L de sacarose, 30 dias de cultivo) foi: Am T43 = 32,54mg; Am T11 = 94,64mg. Nos ensaios antioxidantes, da mesma forma que na planta *in natura*, os extratos orgânicos mantiveram-se ativos. Portanto, obteve-se o perfil químico via CLAE dos extratos ativos das culturas de calos de *A. maritima* (Am T11 e Am T43), empregando-se as mesmas condições de análise visando a comparação de seus perfis cromatográficos (Figura 26). A análise dos cromatogramas possibilitou verificar que o perfil cromatográfico dos extratos das culturas em T11 e T43 foi similar, diferindo apenas na intensidade de alguns picos. Já quando se comparou o perfil dos extratos da planta *in natura* com o dos extratos das culturas de calos observou-se uma semelhança, porém diferindo em abundância e intensidade dos picos observados (Figura 27). Comparando-se o tempo de retenção dos flavonóides padrão (Tabela 5, p. 60) com os picos presentes nos cromatogramas dos extratos das culturas de calos pode-se sugerir a possibilidade da presença destes flavonóides também nos extratos das culturas de células (Am T11 e Am T43).

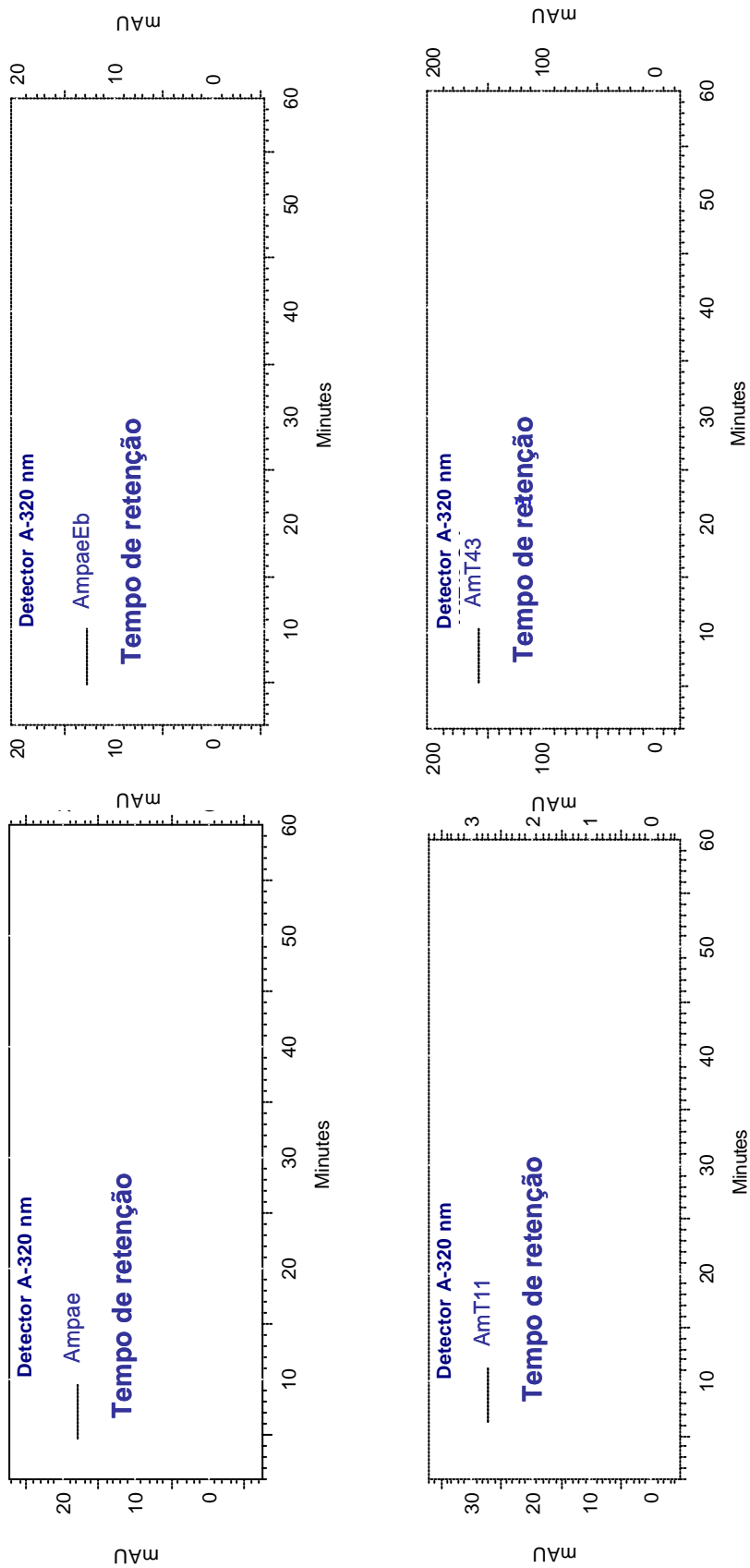


Figura 27 Cromatogramas obtidos por CLAEUV/DAD (coluna C18, spe, Altech) do extrato etanólico (Ampae) e da fração butanólica (AmpaeEb) das partes aéreas de *Alternanthera maritima* in natura X extratos obtidos por cultura de células nos meios T11 e T43 (AmT11 e AmT43).

Condições de análise: coluna supelco RP-18, 5µm e fase móvel, a 1,0 mL/min, MeOH:H2O com 0,1% de ácido acético-eluição por gradiente: [0 a 15 min (10 a 30% de metanol), 15 a 25 min (30% metanol), 25 a 50 min (30 a 100% metanol), 50 a 55 min (100 a 10% metanol), 55 a 60 min (10% metanol)]. Substâncias caracterizadas pelo tempo de retenção e espectro na região do ultravioleta.

5.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

5.3.1 Ensaio de redução do β -caroteno em CCDC

O ensaio de redução do β -caroteno em CCDC avaliou a capacidade dos extratos e frações em impedir a autoxidação do β -caroteno. Após a revelação da cromatoplaça com o β -caroteno foi observado a presença de manchas amareladas em algumas regiões da corrida cromatográfica tanto do extrato Ampae quanto da fração AmpaeEb. A presença destas manchas deve-se ao fato de que nestas regiões podem estar presentes substâncias antioxidantes, as quais impediram a autoxidação do β -caroteno.

5.3.2 Ensaio de redução do radical DPPH

Através deste ensaio foi avaliada a capacidade dos extratos, frações e substâncias isoladas em reduzir o radical DPPH. Para isso primeiramente foi analisado o comportamento destas amostras em função do tempo (5 a 45 minutos) a fim de se estabelecer o tempo ideal para a realização dos ensaios. Foram avaliados então o Trolox (substância padrão, controle positivo), o extrato etanólico bruto (Ampae) e sua fração butanólica (AmpaeEb) todos na mesma concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27).

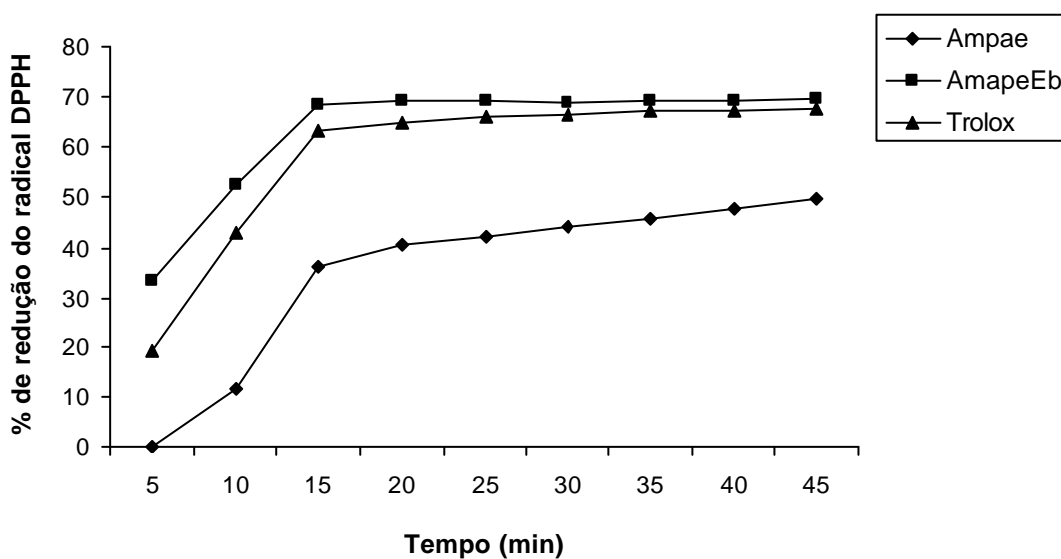


Figura 27: Comportamento cinético das amostras Ampae, AmpaeEb e Trolox na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (percentagem de redução do radical DPPH em função do tempo em minutos)

Observou-se pela análise destes resultados que para todas as amostras houve um aumento na porcentagem de redução do radical em função do tempo, porém foi constatado que entre os tempos de 25 a 30 minutos ocorreu uma otimização da atividade redutora dos extratos seguida por uma tendência de estabilização. Portanto para a continuidade dos ensaios padronizou-se a leitura das amostras no tempo de 30 minutos.

O extrato etanólico bruto (Ampae) e sua fração butanólica (AmpaeEb) foram avaliados nas concentrações de 3,125 a 100 $\mu\text{g/mL}$ juntamente com os controles positivos Quercetina (flavonóide) e Trolox (substância análoga da vitamina E) nas mesmas concentrações. Analisando-se os resultados deste ensaio pode-se observar que o Ampae apresentou-se bastante ativo atingindo na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ pouco mais de 68% de redução do radical. Já a fração AmpaeEb foi capaz de apresentar um melhor comportamento em relação ao seu extrato bruto (81,76% de redução na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$). Tanto o extrato como sua fração apresentou maiores porcentagens de redução do que o flavonóide quercetina padrão, porém menores que o padrão Trolox (Figura 28, Tabela 7).

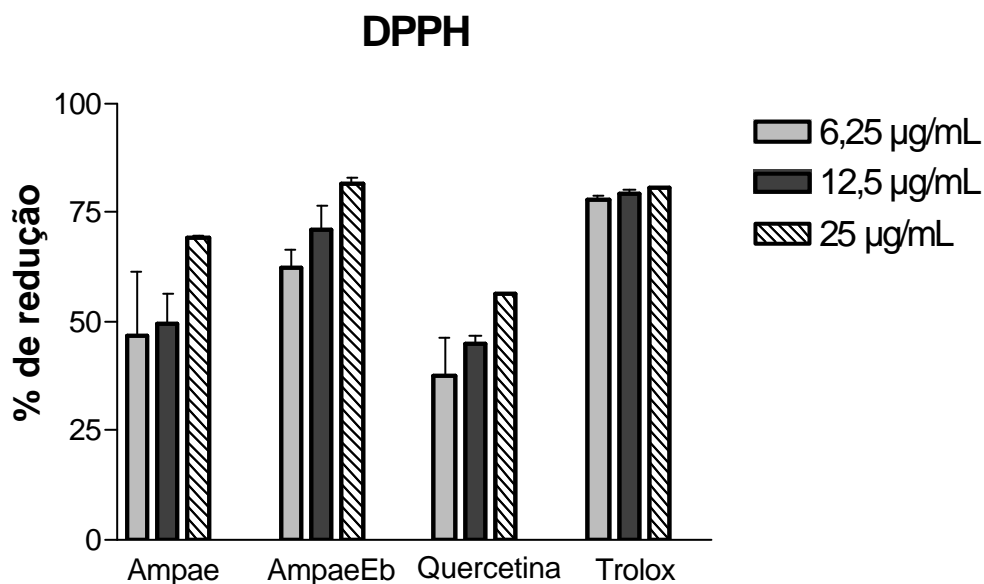


Figura 28: Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH (em porcentagem, %) do extrato Ampae, da fração AmpaeEb e dos controles positivos quercetina e trolox

Tabela 7: Porcentagem de redução do radical DPPH do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Alternanthera maritima* (Ampae), fração butanólica (AmpaeEb) e controles positivos (quercetina e Trolox).

Amostras	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL
Extrato etanólico bruto (Ampae)	46,54 (8,52)	49,65 (2,28)	68,92 (4,34)
Fração butanólica (AmpaeEb)	62,11 (20,20)	71,06 (3,16)	81,76 (10,29)
Quercetina*	36,98 (4,12)	45,62 (3,38)	57,39 (1,29)
Trolox*	77,75 (11,53)	79,04 (13,70)	80,50 (2,60)

Dados expressos como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata; *: controles positivos

Os flavonóides isolados do extrato etanólico de *A. maritima* (partes aéreas) também foram avaliados nas concentrações de 1,5625 a 50 µg/mL juntamente com o padrão Trolox. Neste ensaio observou-se que os flavonóides A14, A18, A19, A20 (C-glicosilados) e os flavonóides A16 e A20 (O-glicosilados) não apresentaram atividade redutora do radical. Porém os flavonóides A11 e A23 (agliconas) e o flavonóide O-glicosilado A17 apresentaram-se bastante ativos nos ensaios (Figura 29, Tabela 8).

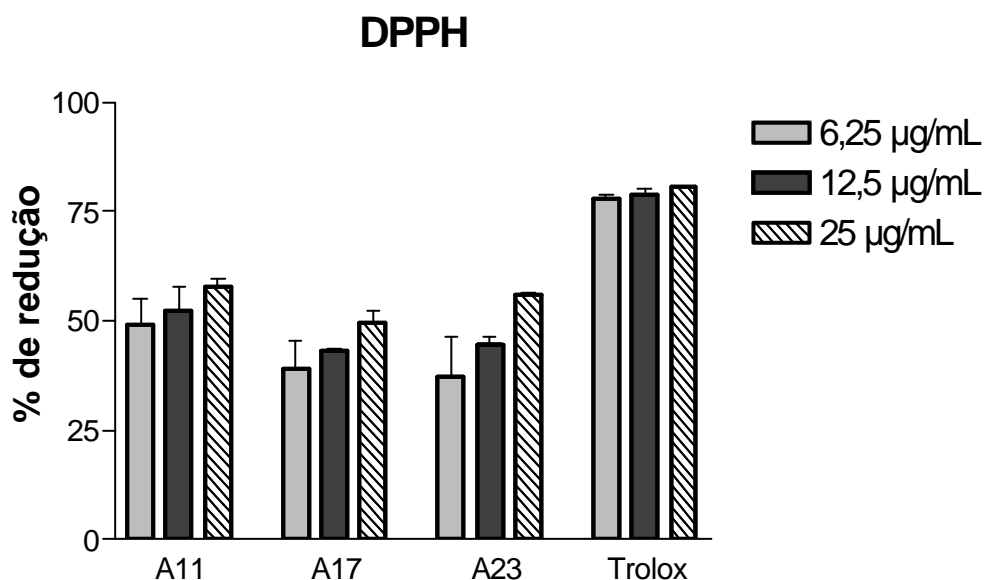


Figura 29: Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH (em porcentagem, %) dos flavonóides isolados de *Alternanthera maritima*.

Tabela 8: Porcentagem de redução do radical DPPH dos flavonóides isolados de *Alternanthera maritima*

Flavonóides	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL
-------------	------------	------------	----------

A11	49,22 (20,31)	52,28 (20,99)	58,01 (7,42)
A14	-	-	-
A16	-	-	-
A17	39,83 (17,65)	43,54 (2,11)	52,14 (10,56)
A18	-	-	-
A19	-	-	-
A20	-	-	-
A21	-	-	-
A23	37,45 (4,73)	44,77 (5,38)	56,23 (1,03)
Trolox*	77,75 (11,53)	79,04 (13,70)	80,50 (2,60)

Dados expressos como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata; -: não ativo; *: controle positivo

Os extratos etanólicos das culturas de células obtidas em dois meios de cultura (AmT11 e AmT43) também foram avaliados quanto a atividade frente ao radical DPPH, juntamente com o extrato etanólico (Ampae) da planta *in natura*. Comparando-se a atividade antioxidante dos extratos AmT11 e AmT43, observou-se que ambos apresentaram atividade redutora do radical DPPH, porém o extrato AmT11 foi um pouco mais ativo. Quando os extratos das culturas foram comparados com o da planta *in natura* observou-se uma maior atividade do extrato Ampae (Figura 30, Tabela 9).

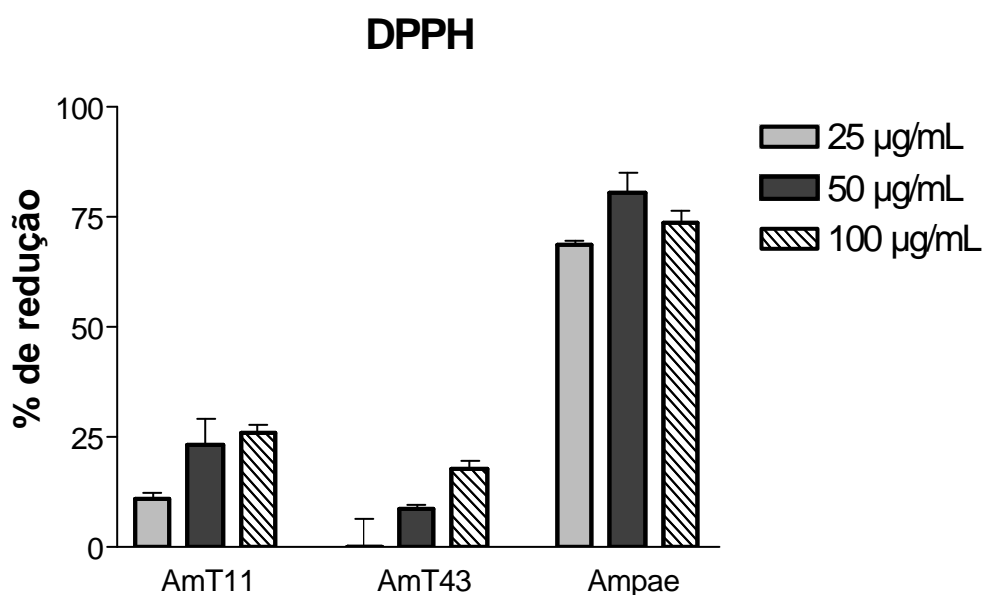


Figura 30: Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH dos extratos das culturas de células (AmT11 e AmT43) e do extrato etanólico (Ampae) de *Alternanthera maritima* planta *in natura*.

Tabela 9: Porcentagem de redução do radical DPPH do extrato Ampae de *Alternanthera maritima* e dos extratos obtidos das culturas de células (meios de cultura T11 e T43)

Amostras	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Extrato etanólico bruto (Ampae)	68,92 (4,34)	80,78 (9,73)	73,78 (17,67)
Am T11	10,94 (2,65)	23,20 (14,10)	26,31 (3,66)
Am T43	-	8,990 (1,70)	17,94 (3,92)
Quercetina*	36,98 (4,12)	45,62 (3,38)	57,39 (1,29)
Trolox*	77,75 (11,53)	79,04 (13,70)	80,50 (2,60)

Dados expressos como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata; -: não ativo; *:controles positivos

Os resultados obtidos pelo ensaio de redução do radical DPPH permitiram encontrar valores IC₅₀ (concentração da amostra capaz de reduzir o radical DPPH em 50%) para os extratos, frações e substâncias isoladas de *A. maritima* (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de concentração inibitória (IC₅₀) para os extratos, frações e flavonóides obtidos de *Alternanthera maritima* frente ao ensaio DPPH

Dados expressos como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata; IC₅₀= Concentração que reduz em 50% o radical DPPH. Estatísticas: (α ? β) e (a ? b ? c), P<0,001. (ANOVA e *Tukey's post-hoc test*)

* : Controles positivos.

Amostras	IC₅₀ (µg/mL)
Ampae	9,99 (18,02) ^α
AmpaeEb	3,45 (15,49) ^β
Am T11	>100
Am T43	>100
Flavonóides	IC₅₀ (µg/mL)
A11	8,42 (4,29) ^a
A14	>50
A16	>50
A17	18,93 (8,95) ^b
A18	>50
A19	>50
A20	>50
A21	>50
A23	13,89 (9,14) ^a
Quercetina *	13,06 (9,14) ^a
Trolox *	2,22 (7,45) ^c

5.3.3 Ensaio de fenóis totais solúveis por Folin-Ciocalteu

Através deste ensaio foi avaliada a quantidade de fenóis totais solúveis contida nas amostras (extratos e frações) a fim de se estabelecer uma correlação entre o conteúdo fenólico e atividade antioxidante destas amostras. Os resultados foram apresentados em termos de miligramas de ácido gálico equivalente por grama de extrato ou fração em base seca (Tabela 11).

Tabela 11: Conteúdo de fenóis solúveis totais do extrato Ampae, fração AmpaeEb obtidos de *Alternanthera maritima* planta *in natura* e dos extratos obtidos das culturas de células (meios de cultura T11 e T43)

Amostras	Conteúdo fenólico (mg de AGE/g de extrato ou fração)
Extrato etanólico bruto (Ampae)	305,05 (1,60)
Fração butanólica (AmpaeEb)	390,00 (0,76)
Extrato em T11 (AmT11)	154,88 (7,07)
Extrato em T43 (AmT43)	111,44 (0,89)

Dados apresentados como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata. Os resultados estão expressos como miligramas de ácido gálico equivalente por grama de extrato ou fração em base seca

Através deste ensaio pode-se verificar o teor de substâncias fenólicas no extrato etanólico bruto (Ampae) de *A. maritima*. Observou-se também que a fração butanólica deste extrato foi capaz de concentrar tais substâncias visto que o seu valor de AGE (ácido gálico equivalente) foi de 390,00, enquanto que para Ampae foi de 305,05. Quanto aos extratos das culturas de células ambos apresentaram menor conteúdo fenólico do que o extrato da planta *in natura*. Por outro lado, o extrato AmT11 apresentou valor maior de substâncias fenólicas do que o extrato AmT43 possivelmente devido a diferença de composição entre os meios.

5.3.4 Ensaio ORAC

Através deste ensaio foram avaliadas a capacidade dos extratos, frações e substâncias isoladas em seqüestrar radicais peróxido gerados por uma fonte radicalar. Para monitoramento da reação foi utilizado a Fluoresceína (FL) como sonda fluorescente. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 2,5; 5; 25; 50 e 250 µg/mL. As frações em 0,25; 0,5; 2,5; 5 e 25 µg/mL e as substâncias puras isoladas em 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µM.

Nas figuras 31 e 32 são apresentadas as curvas de decaimento da fluorescência da FL. O primeiro gráfico mostra o comportamento do padrão Trolox no ensaio em diferentes concentrações. O segundo gráfico mostra a atividade do extrato Ampae, da fração AmpaeEb e do padrão Trolox.

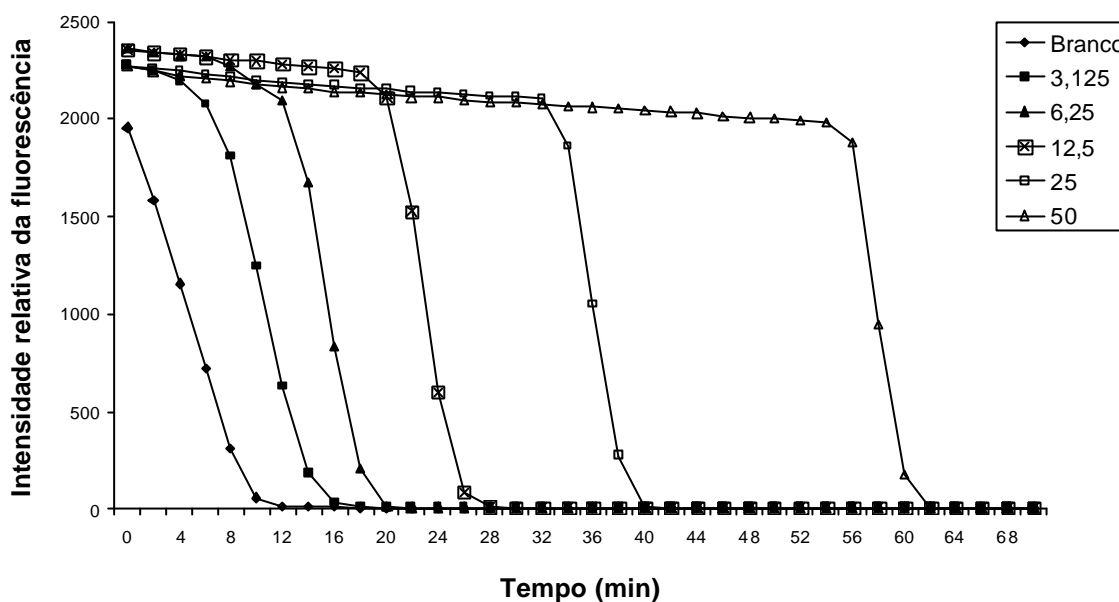


Figura 31: Efeito da concentração do Trolox na curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína

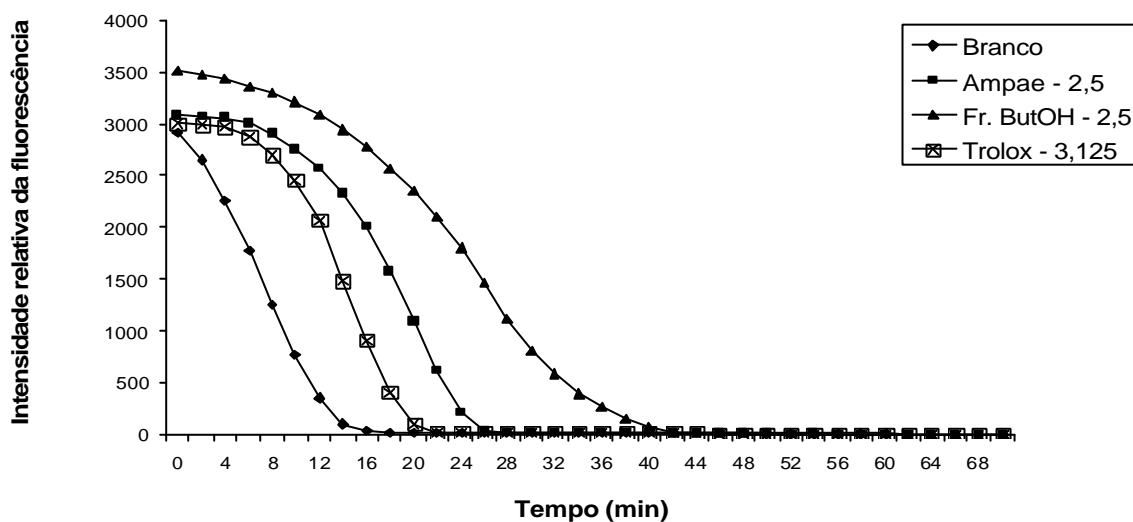


Figura 32: Curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína frente as seguintes amostras: extrato Ampae e fração AmpaeEb de *Alternanthera maritima*, branco e Trolox

Analisando-se a Figura 32 pode-se concluir que a fração butanólica foi a que apresentou maior atividade seqüestradora do radical, uma vez que inibiu por um tempo maior o decaimento da fluorescência da FL. O extrato etanólico bruto também apresentou uma boa atividade, sendo que ambos na concentração de 2,5 µg/mL foram mais ativos, neste ensaio, do que o padrão Trolox na concentração de 3,125 µg/mL.

Na Tabela 12 são apresentados os resultados da atividade antioxidante do extrato Ampae e da fração AmpaeEb no ensaio ORAC_{FL}. Os dados estão expressos em μmol de trolox equivalente por grama de extrato ou fração em base seca (μmol de TE/g).

Tabela 12: Valores de Trolox equivalente para os extratos obtidos de *Alternanthera maritima* frente ao ensaio ORAC

Amostras	Ensaio ORAC (μmol de TE/g de extrato ou fração)
Extrato etanólico bruto (Ampae)	2560,94 (0,55)
Fração butanólica (AmpaeEb)	4855,20 (3,40)
Extrato em T11 (AmT11)	-
Extrato em T43 (AmT43)	-

-: Experimento não realizado. Dados apresentados como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata. Os resultados estão expressos como micromols de Trolox equivalente por grama de extrato ou fração em base seca.

Os resultados da atividade antioxidante no ensaio ORAC dos flavonóides isolados foram expressos como Trolox Equivalente (TE) e estão sumarizados na tabela 13.

Tabela 13: Valores Trolox equivalente para os flavonóides isolados de *Alternanthera maritima* no ensaio ORAC

Amostras	Ensaio ORAC (TE – Trolox Equivalente)
A11	5,02 (0,78)
A14	0,96 (1,38)
A16	-
A17	4,85 (1,50)
A18	1,41 (1,08)
A19	1,92 (1,25)
A20	-
A21	0,65 (1,95)
A23	5,40 (0,78)
Ácido Gálico*	2,90 (2,19)
Ácido Clorogênico*	2,60 (1,84)
Quercetina*	5,62 (0,89)

-: Experimento não realizado. Dados apresentados como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata. Os resultados estão expressos como Trolox equivalente relativo, média (coeficiente de variação) dos ensaios em triplicata; *: Controles positivos

Estes resultados mostram que todos os flavonóides analisados apresentaram atividade antioxidante com destaque para as substâncias A11, A23 e A17, as quais demonstraram-se cerca de cinco vezes mais ativas que o padrão Trolox.

5.3.5 Ensaio de quimiluminescência

Através deste ensaio foram avaliadas a capacidade dos extratos, frações e substâncias isoladas de *A. marítima* em inibir a quimiluminescência gerada em sistema livre de células e em sistema celular. Os extratos e frações foram avaliados nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, enquanto que os flavonóides isolados foram avaliados nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL.

Os resultados para os extratos e frações, expressos em IC₅₀ (concentração necessária para inibir em 50% a quimiluminescência gerada pelos radicais formados) estão relacionados na tabela 14.

Tabela 14: Valores de concentração inibitória (IC₅₀) para extrato etanólico bruto de *Alternanthera marítima* planta *in natura* e sua fração butanólica e para os extratos obtidos das culturas de células (meios de cultura T11 e T43) no ensaio de quimioluminescência do luminol em sistemas livre de células e celular.

Extrato e fração (µg/mL)	Livre de células [‡] IC ₅₀	Sistema celular [†] IC ₅₀
Extrato etanólico bruto (Ampae)	11,90 (0,44) ^β	57,09 (4,27) ^β
Fração butanólica (AmpaeEb)	1,880 (0,05) ^γ	30,45 (5,42) ^γ
Extrato Am T11	62,14 (1,21) ^α	>100
Extrato Am T43	>100	>100

Dados expressos em µg/mL, como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata; [‡]Quimioluminescência produzida pela reação luminol-HPR-H₂O₂ (n=3); [†]Quimioluminescência produzida por neutrófilos humanos estimulados pelo zimosan (n = 4-6). IC₅₀: concentração que inibe 50% da quimioluminescência. Estatísticas: (β ? γ ? α), P<0,001. (ANOVA e Tukey's post-hoc test)

Também neste ensaio a fração butanólica apresentou maior atividade quando comparada ao extrato bruto Ampae. Quanto às culturas de células estas apresentaram pouca atividade sendo observado que o extrato em T11 mostrou-se mais ativo que o extrato em T43.

Observou-se também que no sistema celular todas amostras apresentaram menor atividade em relação ao sistema livre de células.

As figuras 33 e 34 sumarizam o efeito do extrato e fração em diferentes concentrações na inibição da quimioluminescência gerada em sistema livre de células e em sistema celular, respectivamente.

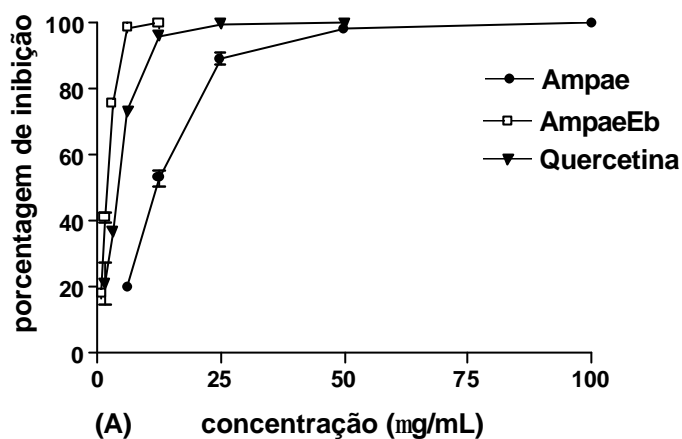


Figura 33: Efeito do extrato etanólico bruto de *Alternanthera maritima* (Ampae) e de sua fração butanólica (AmpaeEb) na quimioluminescência gerada em sistema livre de células. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência *versus* concentração final das amostras na reação.

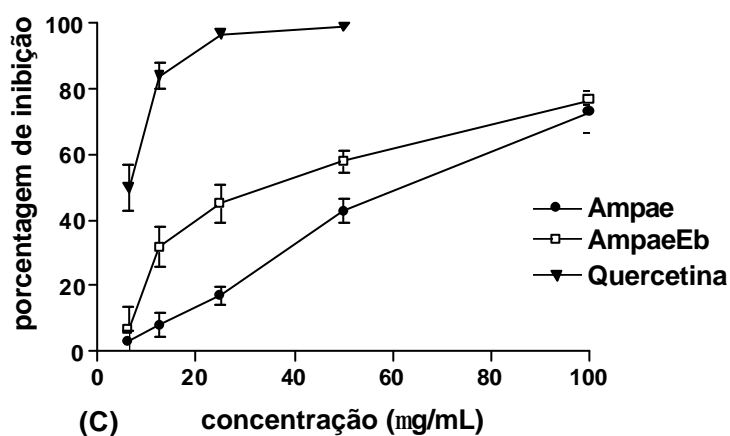


Figura 34: Efeito do extrato etanólico bruto de *Alternanthera maritima* (Ampae) e de sua fração butanólica (AmpaeEb) na quimioluminescência gerada em sistema celular. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência *versus* concentração final das amostras na reação.

Os flavonóides isolados de *A. maritima* também foram avaliados neste modelo experimental frente aos dois sistemas (livre de células e celular). Para ambos sistemas foram obtidos os valores de IC₅₀ dos flavonóides estudados (Tabela 15).

Tabela 15: Valores de concentração inibitória (IC₅₀) para os flavonóides isolados de *Alternanthera maritima* no ensaio de quimioluminescência do luminol em sistemas livre de células e celular.

Flavonóides (µmol/L)	Livre de células [‡] IC ₅₀	Sistema celular [†] IC ₅₀
A11	7,310 (0,11) ^a	8,720 (0,78) ^a
A14	-	-
A16	21,15 (0,45) ^e	32,19 (4,36) ^d
A17	5,220 (0,07) ^c	43,41 (1,46) ^d
A18	>50	>50
A19	>50	>50
A20	4,820 (0,12) ^c	37,41 (1,96) ^d
A21	>50	>50
A23	4,170 (0,13) ^b	6,320 (0,79) ^a

-: Experimento não realizado; Dados expressos em µmol/L como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata; [‡]Quimioluminescência produzida pela reação luminol-HPR-H₂O₂ (n=3); [†]Quimioluminescência produzida por neutrófilos humanos estimulados pelo zimosan (n = 4-6). IC₅₀: concentração que inibe 50% da quimioluminescência. Estatísticas: (a ? b ? c ? d ? e), P<0,001. (ANOVA e Tukey's post-hoc test)

Através destes resultados foi possível observar que os flavonóides A11 e A23 apresentaram as maiores atividades. Os flavonóides A16, A17 e A20 também apresentaram-se ativos, porém com valores reduzidos. Os flavonóides A18, A19 e A20 não apresentaram atividade antioxidante neste protocolo experimental. O efeito dos flavonóides isolados de *A. maritima* na quimiluminescência gerada em sistemas livre de células e celular pode visualizado nas figuras 35 e 36, respectivamente.

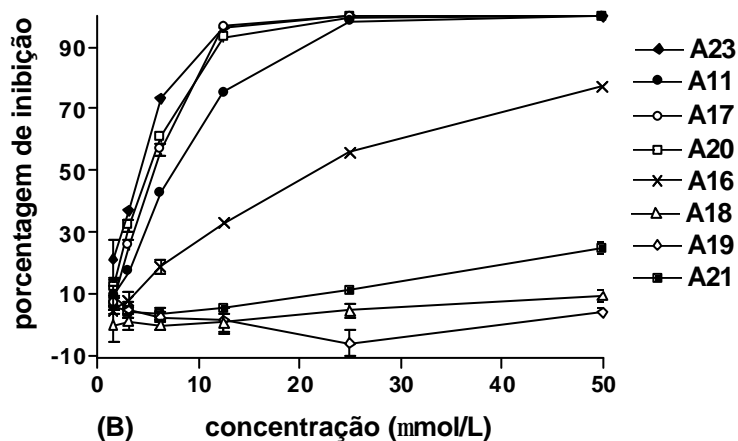


Figura 35: Efeito dos flavonóides isolados de *Alternanthera maritima* na quimioluminescência gerada em sistema livre de células. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência *versus* concentração final das amostras na reação.

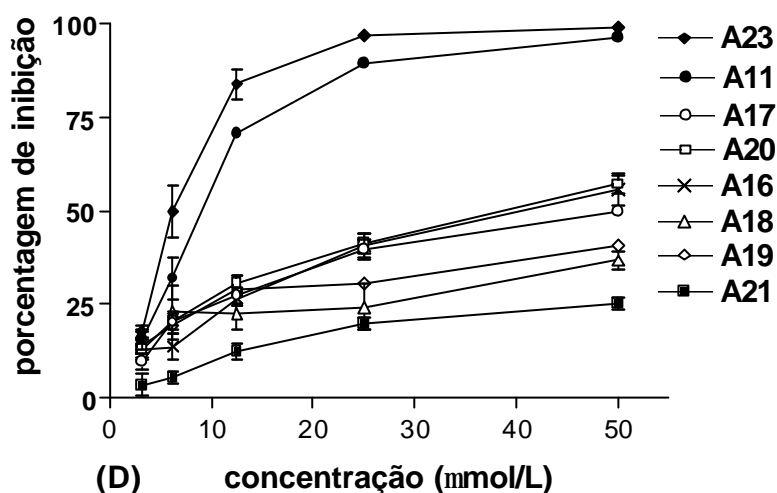


Figura 36: Efeito dos flavonóides isolados de *Alternanthera maritima* na quimioluminescência gerada em sistema celular. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da quimioluminescência *versus* concentração final das amostras na reação.

O efeito citotóxico das amostras frente a polimorfonucleares também foi investigado, uma vez que este pode ser um dos mecanismos que envolvem a inibição da quimioluminescência no sistema celular. A citotoxicidade foi avaliada pela viabilidade celular através do método de exclusão com Azul de Tripán e através da avaliação da atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH). Nenhuma amostra apresentou efeito citotóxico neste ensaio, uma vez que verificou-se alta viabilidade celular e baixa atividade da LDH para todas as amostras analisadas (Tabela 16).

Tabela 16: Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos, frações e flavonóides isolados de *Alternanthera maritima* frente a polimorfos nucleares.

Amostras	Viabilidade celular[†] (%)	Atividade da LDH[†] (IU x 1000)
Triton X-100*	0,0	117,60 (6.02)
DMSO a 1%**	91,50 (3,39)	6,49 (1.11)
Extrato etanólico bruto (Ampae) (100 µg/mL)	78,50 (1,50)	1,39 (0.07)
Fração butanólica (AmpaeEb) (100 µg/mL)	82,00 (1,00)	0,76 (0.17)
Extrato Am T11	80,50 (6,36)	0,93 (0,17)
Extrato Am T43	78,50 (0,71)	1,27 (0,35)
Flavonóides (50 µmol/L)		
A11	97,75 (0,35)	5,22 (0,27)
A14	-	-
A16	95,75 (2,47)	3,08 (0,11)
A17	94,50 (0,71)	5,63 (1,01)
A18	87,50 (0,71)	5,81 (1,64)
A19	91,50 (3,54)	4,08 (1,93)
A20	87,00 (2,83)	4,13 (1,46)
A21	93,50 (1,41)	5,74 (2,27)
A23	91,25 (1,77)	6,29 (3,20)

:- Experimento não realizado; Dados expressos com média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata.

[†]Viabilidade celular avaliada pelo teste de exclusão com Azul de Tripán, baseado na contagem de 200 células (neutrófilos); [†]Atividade da LDH liberada no sobrenadante após 15min. de incubação com as amostras a 37°C.

*: Triton X-100 (0,2%, v/v) promoveu lise total dos 1×10^6 polimorfos nucleares, usado como controle positivo.

** : Controle negativo

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos têm-se verificado a ocorrência de um grande número de doenças que apresentam sua etiologia relacionada ao estresse oxidativo e este fato tem despertado o interesse no estudo de alimentos e produtos naturais ricos em antioxidantes visando a quimioprevenção devido a sua capacidade de seqüestrar radicais livres. Assim, o estudo com produtos naturais faz-se necessário uma vez que o Brasil possui uma vasta biodiversidade muito pouco estudada em termos químicos e biológicos.

A família Amaranthaceae possui plantas promissoras quanto à atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, tripanocida, leishmanicida, antiinflamatória, imunomodulatória etc.) e algumas são utilizadas na medicina popular e como alimento (SIQUEIRA, 1987), apresentando-se, portanto, como matrizes potenciais para a busca de antioxidantes naturais uma vez que há trabalhos (KIM et al., 2004; HAVSTEEN, 2002) sugerindo relação, por exemplo, entre a ocorrência de polifenóis, propriedades farmacológicas (antiinflamatória e imunomodulatória) e a capacidade de seqüestrar radicais livres. Apesar disto, poucas espécies de Amaranthaceae têm sido estudadas explorando este potencial (SOUZA et al., 2007; SALVADOR et al., 2006; CAI et al., 2003).

A espécie *A. maritima* pertence ao gênero *Alternanthera* que tem se mostrado rico em espécies promissoras quanto à atividade biológica como antineoplásica (*A. brasiliana*), antiinflamatória (*A. brasiliana*, *A. tenella* e *A. maritima*) e antiviral (*A. philoxeroides*). Algumas são usadas na medicina popular para uma variedade de fins como: *A. brasiliana* (infusão das flores) empregada no combate à tosse; *A. pogens* (planta total) empregada no tratamento de sífilis e moléstias cutâneas; *A. tenella* (infusão das folhas) usada como diurético e *A. bettzichiana* (planta total) empregada como analgésico e anti-pirético (SIQUEIRA; GUIMARÃES, 1984; SIQUEIRA, 1987).

Outro aspecto relevante é que, apesar de *A. maritima* não ser utilizada na medicina popular, em trabalhos prévios seus extratos apresentaram atividade antibacteriana, antifúngica, tripanocida, leishmanicida e imunomodulatória, sendo verificada a ocorrência de flavonóides, alcalóides e saponinas nos extratos bioativos (SALVADOR, 2005; SALVADOR; DIAS, 2004). Culturas de células deste vegetal também foram estabelecidas (meios T11 e T43), verificando-se que os extratos obtidos das culturas de células mantiveram

se ativos frente a bactérias, fungos e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (SALVADOR, 2005; SALVADOR et al., 2003). Em *screening* preliminar o extrato etanólico das partes aéreas da planta *in natura* apresentou considerável atividade antioxidante *in vitro* e esta espécie, amplamente distribuída nas restingas e cordões arenosos do litoral brasileiro, está sujeita e adaptada a diferentes fatores edáficos como salinidade, altas taxas de luminosidade e variação de temperatura que podem ser desencadeadores de estresse oxidativo. Assim estes fatos incentivaram o presente estudo para investigação da composição química de *A. maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células) de maneira a isolar e caracterizar substâncias com atividade antioxidante em estudo guiado por ensaios antioxidantes com modelo experimental *in vitro*.

6.1 Estudo fitoquímico – fracionamento monitorado pela atividade antioxidante

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram isolar e identificar nove flavonóides como constituintes majoritários dos extratos ativos de *A. maritima*, sendo: dois agliconas (A11 e A23), quatro C-glicosilados (A14, A18, A19 e A21) e três O-glicosilados (A16, A17 e A20).

A investigação fitoquímica monitorada pela atividade antioxidante mostrou-se efetiva, obtendo-se bons resultados no fracionamento direcionado pelos ensaios antioxidantes. Por exemplo, já na primeira etapa do fracionamento, com o processo de extração líquido-líquido (Figura 4, p.47) na fase butanólica (AmpaeEb) conseguiu-se melhores resultados tanto na atividade antioxidante, quanto no valor de conteúdo fenólico. Verificou-se também uma coerência em termos de substâncias ativas encontradas visto que foram identificados, como substâncias majoritárias, tanto no extrato bruto Ampae, quanto em sua fração AmpaeEb, flavonóides que são substâncias fenólicas e que também apresentam atividade antioxidante (SOARES, 2002; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; 1996).

Com a intenção de verificar a identidade dos flavonóides isolados estes foram analisados via CLAE-UV/DAD, juntamente amostras-padrão e também por espectrometria de massas (IES-EM). As análises dos espectros obtidos por IES-EM forneceram informações importantes para a identificação dos flavonóides isolados. Através das análises em módulo negativo foi possível identificar os íons *quasi-molecular* formados, os quais apresentavam 1

u.m.a. a menos em seu peso molecular, devido a perda de um H⁺ [M – H⁺]. Já em módulo positivo foi possível identificar os adultos formados com o íon Na⁺, os quais apresentavam 23 u. m. a. a mais devido a adição do Na⁺ na molécula [M – Na⁺].

Desta forma foram confirmadas então a identidade dos flavonóides presentes nos extratos ativos de *A. maritima*. São eles: duas agliconas (*quercetina* –A23 e *3-metoxi quercetina* –A11); três O-glicosídeos (*Isoramnetina 3-O-a-L-ramnosil (1®6)-b-D-galactopiranosídeo* –A16; *Isoramnetina 3-O-a-L-ramnosil (1®6)-b-D-glucopiranosídeo* –A20 e *Quercetina 3-O-a-L-ramnosil (1®6)-b-D-glucopiranosídeo* –A17); e quatro C-glicosídeos (*vitexina* –A14; *2''-O-a-L-ramnopiranosilvitexina* –A18; *2''-O-a-L-glucopiranosilvitexina* –A19; *5,7 diidroxí-4'-metoxiflavona-8- O-a-L-ramnosil (1®2)-C-b-D-glucopiranosídeo* –A21).

Quanto as substâncias identificadas nos extratos ativos de *A. maritima*, pode-se dizer que estão em coerência com a literatura, uma vez que em estudos fitoquímicos de algumas espécies do gênero *Alternanthera* há relatos da presença de flavonóides (agliconas, C e O-glicosilados): Zhou, Blasko e Coedell (1988) relataram a presença de um flavonóide C-glicosilado (*alternantina*) em *A. philoxeroides*, Ruiz et al. (1991) documentaram a presença de flavonóides nos extratos de *A. pungens*, Sahu e Chakrabarty (1993) isolaram de *A. sessilis* um flavonóide C-glicosilado, Brochado et al. (2003) identificaram no extrato etanólico das folhas de *A. brasiliiana* seis flavonóides (derivados O-glicosilados de *kampferol* e *quercetina*). Da mesma forma, foram isolados de *A. tenella* e *A. maritima* flavonóides agliconas, C e O-glicosilados (SALVADOR et al., 2004; SALVADOR; DIAS, 2004; SALVADOR et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

Segundo Harbone et al. (1975) os flavonóides são derivados dos fenilpropanóides e da via do acetato e são bastante disseminados em plantas nas formas agliconas ou de glicosídeos. Dentre os açúcares mais comumente encontrados nos flavonóides estão a glicose, galactose, ramnose podendo também ocorrer ligações com xilose e arabinose. Segundo Rice-Evans, Miller e Paganga (1997) estas variações nas estruturas dos flavonóides são derivadas de uma rota biossintética comum (via fenilpropanóides ou acetato) sendo que no decorrer de seu desenvolvimento podem ocorrer modificações em sua estrutura como: hidroxilações, metilações, isoprenilações, dimerizações e glicosilações (O ou C-glicosídeos).

Quanto aos flavonóides isolados de *A. maritima* tratam-se de cinco flavonols (A11, A16, A17, A20 e A23) e quatro flavonas (A14, A18, A19 e A21) tendo como açúcares glicose, ramnose e galactose, apresentando coerência também em termos de biogênese, uma vez que são substâncias quimicamente semelhantes (flavonóides agliconas, O e C-glicosilados), derivadas de rota biossintética comum.

6.2 Atividade biológica – avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Até o presente momento não foram encontrados trabalhos que relatassem a atividade antioxidante de *A. maritima*. Porém, dentro do gênero *Alternanthera* encontram-se na literatura dois trabalhos com atividade antioxidante: Shyamala et al. (2005) avaliou a capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *A. sessilis* através do método DPPH. O extrato mostrou-se ativo e esta atividade pareceu estar relacionada ao seu conteúdo de polifenóis (não especificado). Salvador et al. (2006) avaliaram o potencial antioxidante do extrato etanólico de *A. tenella* empregando o ensaio ORAC_{FL}. Tanto o extrato bruto quanto sua fração butanólica apresentaram atividade antioxidante, a qual estava relacionada seu conteúdo fenólico. Foram identificados seis flavonóides com atividade antioxidante como constituintes majoritários sendo, duas agliconas e quatro C-glicosilados.

Visando a busca de antioxidantes em *A. maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células), os extratos brutos, frações e substâncias isoladas foram submetidos a avaliação de sua capacidade antioxidante utilizando-se para isto ensaios com metodologias indiretas (Ensaio de fenóis total por Folin-Ciocalteu; ensaio de redução do radical DPPH) e ensaios com metodologias diretas (Ensaio de redução do β-caroteno; ensaio ORAC e ensaios de quimiluminescência). O estudo fitoquímico monitorado pela atividade antioxidante mostrou-se efetivo, sendo possível isolar e identificar dos extratos ativos nove flavonóides (dois agliconas, três O-glicosilados e quatro C-glicosilados). Os flavonóides agliconas isolados foram os que apresentaram melhor atividade antioxidante na maioria dos ensaios empregados, enquanto os flavonóides O-glicosilados mostraram-se consideravelmente ativos nos métodos DPPH, ORAC_{FL} e quimiluminescência livre de células. Os flavonóides C-glicosilados apresentaram-se pouco ativos (ORAC_{FL}) ou sem atividade (DPPH e quimiluminescência). Quanto aos extratos das culturas de células, tanto o extrato AmT11, quanto o AmT43 demonstraram atividade antioxidante, porém com menor intensidade que o

extrato da planta *in natura*, sendo possível identificar também nestes extratos substâncias fenólicas, por exemplo flavonóides.

As substâncias de natureza polifenólica vêm sendo intensamente relatadas como responsáveis pela atividade antioxidante de diversos produtos naturais (PICCINELLI et al., 2004; AQUINO et al., 2001). Sua atividade esta relacionada principalmente à sua capacidade em seqüestrar radicais livres, doar elétrons ou átomos de hidrogênio e quelar cátions metálicos (SOARES, 2002; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; 1996). Desta forma, pode-se observar que as atividades antioxidante encontradas no extrato etanólico bruto e em sua fração butanólica podem estar relacionada ao conteúdo fenólico destes extratos.

Quanto ao ensaio de redução do radical DPPH o extrato Ampae demonstrou-se ativo, apresentando um comportamento linear, ou seja, concentração-dependente, até a concentração de 50 µg/mL. Na primeira concentração avaliada (3,125 µg/mL) o extrato já apresentou cerca de 20% de redução, a qual chegou a pouco mais de 80% na concentração de 50 µg/mL. Porém, a partir desta concentração a porcentagem de redução iniciou um leve declíneo, passando na maior concentração (100 µg/mL) a apresentar uma redução de 73% do radical DPPH. A fração AmpaeEb apresentou comportamento semelhante, porém com uma maior atividade. Na concentração de 3,125 µg/mL a fração mostrou uma capacidade de redução do radical de cerca de 44% a qual seguiu-se linear até a concentração de 25 µg/mL, quando apresentou pouco mais de 81% de redução. A partir desta observou-se da mesma forma um declínio na porcentagem de redução (78% em 50 µg/mL e 71% em 100 µg/mL).

Segundo Bondet, Brand-Williams e Berset (1997) a reação do DPPH com as substâncias antioxidantes presentes na amostra é uma reação um pouco mais lenta do que a envolvida em mecanismos mais complexos como o seqüestro de radicais peroxil, porém esta velocidade de reação pode variar de acordo com as substâncias presentes e a concentração das mesmas. A fração butanólica apresentou uma atividade mais forte/rápida do que seu extrato Ampae, provavelmente por AmpaeEb apresentar uma maior concentração de flavonóides.

Segundo também Bondet, Brand-Williams e Berset (1997) a redução do radical DPPH é proporcional a concentração do antioxidante presente na amostra, fato este que esta de acordo com estes resultados obtidos uma vez que quanto maior a concentração do extrato, maior foi sua capacidade de redução. Porém em 100 µg/mL para o extrato e 50 µg/mL para a

fração isto não foi observado, este fato pode ter ocorrido pois uma alta concentração de flavonóides em alguns casos pode gerar um efeito pró-oxidante. Desta forma a fração butanólica, com uma maior concentração de flavonóides teve uma ação mais rápida frente aos radicais, porém em altas concentrações começou a apresentar efeito pró-oxidante.

Quanto ao ensaio ORAC as amostras Ampae e AmpaeEb apresentaram ativas, com uma maior atividade antioxidante para AmpaeEb. Os resultados foram expressos como micromol de Trolox equivalente por grama de extrato ou fração seca, sendo que o extrato apresentou valor de 2560,94 μmol de TE/g e a fração 4855,20 μmol de TE/g. Este resultado foi também observado quando analisada a curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína, FL (Figura 32, p. 89).

Uma vez que o decaimento da fluorescência da FL é atingido pelo ataque dos radicais peroxil gerados por uma fonte de radicais (AAPH) pode-se dizer que a proteção de uma amostra contendo antioxidantes frente a fluorescência da FL é refletida na manutenção desta fluorescência uma vez que os antioxidantes seqüestrarão os radicais gerados impedindo a reação destes com a sonda FL (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001). Substâncias com atividade antioxidante, como os flavonóides, são capazes de seqüestrar radicais livres, dentre eles o radical peroxil. Portanto os resultados obtidos por esta metodologia também apresentam-se coerentes visto que a fração butanólica (AmpaeEb), por apresentar um maior conteúdo fenólico e uma maior concentração de flavonóides, apresentou uma maior proteção da sonda.

No ensaio de quimiluminescência do luminol foi avaliado o efeito do extrato e fração sobre a quimiluminescência gerada pela produção de radicais de oxigênio em dois sistemas, um celular e outro livre de células. Em ambos os sistemas o extrato bruto mostrou-se ativo e a fração butanólica foi capaz de potencializar esta atividade. No sistema celular tanto o extrato Ampae como sua fração AmpaeEb apresentaram menor atividade em relação ao sistema livre de células.

No ensaio de quimiluminescência em sistema celular os radicais de oxigênio são gerados pelo processo de fagocitose, estimulado pela presença do zimosan opsonizado (KANASHIRO et al., 2004). Já em sistema livre de células a geração das EROs é iniciada por uma reação enzimática do H_2O_2 com a enzima HRP (*Horseradish peroxidase*) (KROL et al.,

1994). Desta forma os valores mais baixos para o sistema celular podem ser explicados pela presença de barreiras físicas neste sistema (membrana celular, por exemplo), as quais podem dificultar o contato das substâncias presentes nos extratos com os radicais livres gerados. Já em sistema livre de células não existem barreiras físicas, ou seja, as substâncias estão em contato direto com os radicais gerados.

Em todos os ensaios antioxidantes realizados os flavonóides agliconas A11 e A23 e o flavonóide O-glicosilado A17 apresentaram maior atividade em relação aos demais flavonóides.

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono em seu esqueleto principal, compostos do tipo C₆-C₃-C₆, onde os dois anéis C₆ são necessariamente aromáticos (anéis A e B), conectados por uma ponte de geralmente 3 carbonos, que normalmente contém um átomo de oxigênio (anel C). De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides podem ser separados em: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas. Estes flavonóides podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonóides são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns destes grupos hidroxilas podem ser metilados, acetilados ou sulfatados. As ligações glicosídicas ocorrem geralmente nas posições 3 ou 7 e os monossacarídeos mais comumente encontrados são geralmente a ramnose, a glicose, a galactose e arabinose e o dissacarídeo glicoramnose (HAVSTEEN, 2002).

Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer a relação entre a estrutura dos flavonóides e sua atividade de seqüestro de radical. A atividade antioxidante dos flavonóides esta intimamente relacionada a presença, número e posição de hidroxilas, metoxilas e grupos glicosídeos em sua estrutura química (PIETTA, 2000). Segundo Rice-Evans, Miller e Paganga (1996) os principais determinantes para a atividade antioxidante são: a presença do grupo *o*-dihidróxi na posição 3' e 4' do anel B (grupo catecol), o qual favorece a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio bem como os equestro de radicais; uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 conjugada com o grupo 4-oxo no anel C, a qual é responsável pela

delocalização dos elétrons. A presença de um grupo 3-hidroxil no anel C também parece ser favorável ao seqüestro de radicais.

No método de redução do radical DPPH observou-se que as agliconas A11 e A23 apresentaram-se mais ativas, juntamente com o flavonóide O-glicosilado A17. Este fato pode ser explicado pela presença do grupamento catecol nas três substâncias e por se tratarem também de flavonóis (hidroxila em 3). Quanto aos flavonóides A16 e A20 (também flavonóis O-glicosilados) estes não apresentaram atividade redutora do radical DPPH. Este resultado pode ser devido a ausência do grupamento catecol nestes, porém, uma vez que estes flavonóides apresentaram atividade frente ao ensaio de quimiluminescência, este resultado negativo no método de redução do DPPH pode ser justificado. Bondet, Brand-Williams e Berset (1997) relatam que substâncias com o grupamento *o*-metóxfenol (metoxila em 3' e hidroxila em 4') em substituição ao grupamento catecol reagem reversivelmente a redução do radical DPPH podendo gerar resultados falso negativos e isto pode ter ocorrido com A16 e A20. Quanto aos flavonóides C-glicosilados (A14, A18, A19 e A21), nenhum apresentou-se ativo frente a redução do DPPH. Dentre as justificativas plausíveis para este fato podem estar a ausência do grupamento catecol e a ausência de hidroxila na posição 3 (flavonas), além da ligação C-glicosídica.

Também no ensaio ORAC observou-se uma maior atividade para os flavonóides A11, A23 e A17 sendo que estes apresentaram-se cerca de cinco vezes mais ativos que o padrão Trolox (controle positivo) (Tabela 13, p.90). Já os flavonóides C-glicosilados (A14, A18, A19 e A21) apresentaram uma menor atividade em relação aos demais flavonóides.

O ensaio de quimiluminescência do luminol foi realizado em dois sistemas: um sistema livre de células e um sistema celular. No sistema livre de células os flavonóides A11, A23 e A17 apresentaram alta atividade, bem como o flavonóide O-glicosilado A20, todos com valores de IC₅₀ entre 4,17 e 7,31 µmol/L. O flavonóide A16 também apresentou considerável atividade antioxidante (IC₅₀ = 21,15 µmol/L), porém, apesar de ser um O-glicosídeo, sua atividade foi menor que a dos outros flavonóides O-glicosilados (A17 e A20). Em relação ao A17 esta atividade já era esperada uma vez que este contém o grupamento catecol. Quanto aos flavonóides A16 e A20 (ambos com grupamento em 3' e 4' substituídos por *o*-metóxfenol), notou-se que o A16 apresentou menor atividade, este fato pode ser devido a identidade do açúcar, uma vez que em A16 tem-se a ligação galactose-ramnose enquanto em

A20 tem-se glicose-ramnose. Esta diferença na identidade dos açúcares pode dificultar a ação deste flavonóide frente aos radicais gerados em termos de estereoquímica e mesmo pelas diferenças nas propriedades físico-químicas das duas substâncias. Já os flavonóides C-glicosilados, como nos outros métodos, não apresentaram atividade nas concentrações avaliadas.

Quanto ao ensaio em sistema celular os flavonóides agliconas A11 e A23 mantiveram a atividade antioxidante verificada no sistema livre de células. Já os O-glicosilados apresentaram um decréscimo considerável em suas atividades quando comparado ao ensaio livre de células. Este fato pode ser explicado pois em sistema celular a presença das glicosilações nas moléculas pode estar impedindo a ação destes flavonóides com os radicais gerados (provavelmente pela presença de barreiras físicas entre estes e as EROs geradas). Esta hipótese pode ser justificada uma vez que as agliconas não perderam sua atividade neste sistema. Quanto aos flavonóides C-glicosilados, estes continuaram a não apresentar atividade nas concentrações avaliadas.

A diferença de atividade encontrada entre agliconas e glicosídeos pode ser explicado, pelo menos em parte, por suas propriedades físico-químicas. Devido os glicosídeos serem mais hidrofílicos estes não conseguem permear a membrana e desta forma não agem sobre as EROs geradas no meio intracelular. Estudos como de Day et al. (2003) demonstraram que flavonóides glicosilados não foram encontrados no interior de células epiteliais, pois são normalmente convertidos em sua forma aglicona pela microflora intestinal para uma posterior absorção (WALLE, 2004).

Devido ao fato de que um dos mecanismos responsáveis pela inibição da quimiluminescência gerada pela EROs em sistema celular seja o efeito citotóxico das amostras, estas foram então avaliadas quanto a sua toxicidade frente aos neutrófilos isolados (Tabela 16, p.95). Dentre as amostras avaliadas nenhuma apresentou efeito citotóxico em ambos os métodos estudados sendo então excluída a hipótese de morte celular.

Portanto, em relação a atividade antioxidante dos flavonóides isolados de *A. maritima*, os resultados obtidos apresentam concordância com relatos da literatura: Kanashiro et al. (2004) demonstraram que flavonóides com grupamento catecol mostraram maiores atividades antioxidantes frente aos ensaios de quimiluminescência, porém constatou também que a

substituição de uma das hidroxilas por uma metoxila não influencia significativamente na propriedade antioxidante do flavonóide. Rice-Evans, Miller e Paganga (1996) relataram que a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C é fator essencial para atividade de flavonóides em sistemas livre de células. Salvador et al (2006) avaliou a capacidade antioxidante de flavonóides C-glicosilados isolados de *Alternanthera tenella* pelo método ORAC e observou que a substituição de uma hidroxila por uma metoxila em 4' favoreceu o decréscimo da atividade. Picerno et al. (2003) demonstraram que os flavonóides C-glicosilados realmente possuem atividade antioxidante que pode variar de fraca a moderada dependendo do número de hidroxilas livres.

6.3 Estudo biotecnológico – avaliação comparativa entre os extratos obtidos da planta *in natura* e obtida por cultura de células

O estudo com plantas medicinais visando o isolamento e avaliação de atividades biológicas de suas substâncias muitas vezes depara com algumas dificuldades (pequena quantidade do princípio ativo, endemismo de algumas espécies em locais de difícil acesso, entre outras), as quais podem ser minimizadas pelo uso das culturas de células vegetais (RAMAWAT; MERILLON, 1999).

Assim, visando a prospecção de antioxidantes em *A. maritima* via cultura de células, neste estudo avaliou-se comparativamente os extratos obtidos da planta *in natura* e os obtidos por culturas de células em termos fitoquímicos e quanto a suas atividades antioxidantes.

Quanto a atividade antioxidante foi possível observar que os extratos obtidos da cultura de células mantiveram-se ativos, porém com atividade antioxidante menor que a do extrato da planta *in natura*. O extrato Am T11 apresentou-se pouco mais ativo que o Am T43. Resultado semelhante pode ser observado quando analisado o teor de fenóis total destes extratos (Tabela 11, p.88) uma vez que os extratos *in natura* foram capazes de acumular uma maior quantidade de substâncias fenólicas.

Pela análise do cromatogramas obtidos via CLAE-UV/DAD foi possível observar que os perfis cromatográficos dos extratos Am T11 e Am T43 foram bastante semelhantes, diferindo apenas na intensidade de alguns picos. Este fato pode ser devido a diferença na

composição dos meios de cultura, o qual pode favorecer o acúmulo de uma substância em detrimento de outra. Observou-se também que o extrato em T11 apresentou uma maior intensidade de picos na região entre 30 e 45 minutos de retenção (região onde foram identificados os flavonóides na planta *in natura*) o que pode estar refletido em seu maior conteúdo fenólico e maior atividade antioxidante em relação ao extrato em T43. Quando comparados os perfis cromatográficos dos extratos obtidos *in vitro* com os perfis dos extratos Ampae e AmpaeEb foi possível também observar uma similaridade entre eles. Comparando-se os tempos de retenção dos flavonóides identificados nos extratos *in natura* com os tempos de retenção dos picos encontrados nos extratos das culturas foi possível sugerir a presença destes flavonóides também nos extratos das culturas de células.

Deste modo, a partir do presente estudo algumas perspectivas futuras podem aqui ser lançadas, tais como:

- Quantificação destas substâncias antioxidantes nos extratos de *Alternanthera maritima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células);
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos e substâncias isoladas de *A. maritima* utilizando metodologias *in vivo* avaliando o status antioxidante *in vivo*, bem como estudando-se a farmacodinâmica dos flavonóides ativos;
- Uso de precursores exógenos, estimuladores ou indutores (físicos, químicos ou biológicos) nas culturas de células de *A. maritima* a fim de direcionar e modular rotas biossintéticas específicas para o acúmulo de substâncias ativas na biomassa obtida *in vitro*;

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Este estudo possibilitou concluir que:

- ✓ O extrato etanólico obtido das partes aéreas de *A. maritima* apresentou atividade antioxidante *in vitro* em todos os ensaios estudados (ensaios β -caroteno em CCDC, fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, redução do radical DPPH, ORAC_{FL} e quimiluminescência), enquanto os extratos aquosos foram inativos;
- ✓ O estudo fitoquímico monitorado pela atividade antioxidante mostrou-se efetivo, sendo possível isolar e identificar dos extratos ativos nove flavonóides (dois agliconas, três O-glicosilados e quatro C-glicosilados);
- ✓ Os flavonóides agliconas isolados foram os que apresentaram melhor atividade antioxidante na maioria dos ensaios empregados, enquanto os flavonóides O-glicosilados mostraram-se consideravelmente ativos nos métodos DPPH, ORAC_{FL} e quimioluminescência livre de células. Os flavonóides C-glicosilados apresentaram-se pouco ativos (ORAC_{FL}) ou sem atividade (DPPH e quimioluminescência);
- ✓ Os extratos das culturas de células de *A. maritima* (AmT11 e AmT43) demonstraram atividade antioxidante, porém com menor intensidade que o extrato da planta *in natura*;
- ✓ Os extratos da planta *in natura* (Ampae) e obtidos por cultura de células (AmT11 e AmT43) apresentaram similaridade quanto ao perfil químico obtido por CLAE-UV/DAD nas mesmas condições de análise quando comparados os tempos de retenção e os espectros de UV/DAD, sendo possível observar a presença de flavonóides também nos extratos das culturas de células.
- ✓ Em ensaios de citotoxicidade *in vitro* frente a polimorfo nucleares (teste de exclusão com Azul de Tripán e atividade da Lactato Desidrogenase), nenhum dos extratos e flavonóides estudados mostrou-se tóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 4595-4603, 2004.
- AGRAWAL, Y.K.; JAIN, R.K. Chemical analysis of medicinal plant *Alternanthera sessilis*. **Pol. J. Chem** v. 52, p. 2495, 1978.
- AGUIAR, R.M.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochem.** v.66, p. 2388-2392, 2005.
- ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 3112-3115, 2002.
- AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K.I.E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chem.** v.94, p. 47-52, 2006.
- ANAGNOSTOPOULOU, M.A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V.P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chem.** v.94, p. 19-25, 2006.
- AQUINO, R., MORELLI, S., LAURO, M.R., ABDO, S., SAIJA, A., TOMAINO, A. Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. **J. Nat. Prod.** v.64, p.1019-1023, 2001.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.** v.89, p. 27-36, 2005.
- BARCLAY, L.R.S; VINQUIST, M.R. Phenols as antioxidants. In: RAPPOPORT, Z **The chemistry of phenols** .New York: Ed Wiley.2003. p. 839-908.
- BARREIROS. A.L.B.S; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29, p. 113-123, 2006.
- BARUAH, P.; SARMA, G.C. Study of amino acid composition of certain pollen grains. **J. Paly Nol.** v.20, p. 31-36, 1984.
- BATTHA, R.; PAES, T.K. Chemical and amino acid composition of alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*). **Indian Vet. J.** v.73, p. 799-800, 1996.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol.** v.299, p. 15-27, 1999.

BHASKARACHARY, K.; RAO, D.S.S.; DEOSTHALE, Y.G.; REDDY, V. Carotene content of some common and less familiar foods of plants origin. **Food Chem** v.54, p. 189-193, 1995.

BLUNDEN, G.; YANG, M.; JANICSÁK, G., MÁTHÉ, I.; CABAROT-CUERVO, C. Betaine distribution in the Amaranthaceae. **Biochem. Syst. Ecol.** v.27, p. 87-92, 1999.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C.; Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. **Lebensm. Wiss. Technol.** v.30, p. 609-615, 1997.

BROCHADO, C.O.; de ALMEIDA, A.P.; BARRETO, B.P.; COSTA, L.P.; RIBEIRO, L.S.; PEREIRA, R.L. da C.; GONÇALVES-KOATZ, V.L.; COSTA, S.S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, p. 449-451, 2003.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.** v.67, p. 2141-2153, 2004.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Tren. Food Sci. Technol.** v.16, p. 370-376, 2005.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p. 2288-2294, 2003.

CALDERON, C.P.; GARCIA ASEFF, S.B.; FUENTES, L.B. Evaluation of diuretic activity of *Alternanthera pungens* extract in rats. **Phytother. Res.** v.11, p. 606-608, 1997.

CALDERON, C.P.; ASSELF, S.B.G.; FUENTES, L.B.; RUIZ, R.E.L.; RUIZ, S.O. Constituents and purgative activity of fruits from *Alternanthera pungens*. **Acta Farm. Bonaerense**, v.15, p. 153-158, 1996.

CALDWELL, C.R. Oxygen radical absorbance capacity of the phenolic compounds in plant extracts fractionated by High-performance liquid chromatography. **Analytical Biochem.** v.293, p. 232-238, 2001.

CANALES-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-DELGADO, T.; FLORES-ORTIZ, C.; DURÁN-DÍAZ, A.; GARCÍA-BORES, A.M.; AVILA-ACEVEDO, G. Antimicrobial activity of *Alternanthera caracasana*. **Pharm. Biol.** v.43, p. 305-307, 2005.

CAO, G.; PRIOR, R.L. The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods Enzymol.** v.299, p. 50-62, 1999.

CAO, G.; VERDON, C.P.; WU, A.H.B.; WANG, H.; PRIOR, R.L. Automated-assay of oxygen radical absorbency capacity with the COBAS FARA-II. **Clinical Chem.** v.41, p. 1738-1744, 1995.

CAO, G. ALESSIO, C.P.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biol. Med** v.14, p. 303-311, 1993.

- CARDOSO, C.L.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S. New biflavonoid and other flavonoids from the leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activities. **J. Braz. Chem. Soc.** v.16, p. 1353-1359, 2005.
- CASTAÑEDA, J.L.; QUINTERO RUIZ, A. Regulation of phenylalanine-ammonia-lyase (PAL) activity by light in *Gomphrena globosa* tissue culture. **Phyton** v.52, p. 151-154, 1991.
- CAVIN, A.; HOSTETTMAN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta med.** v.64, p. 393-396, 1998.
- CETINUS, S. A.; GOZE, I.; SARAC, B.; VURAL, N. Scavenging effect and antispasmodic activity of the essential oil of *Cyclotrichium niveum*. **Fitoterapia** v.78, p. 129-133, 2007.
- CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **J. Immunol.** v.130, p. 2324-2329, 1983.
- CHITINDINGU, K.; NDHLALA, A.R.; CHAPANO, C.; BENHURA, M.A.; MUCHUWETI, M. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (pigweed), *Brachiaria brizantha* (upright brachiaria) and *Panicum maximum* (guinea grass). **J. Food Biochem.** v.31, p. 206-216, 2007.
- CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova.** v.29, p. 287-292, 2006.
- CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helvetica Chim. Acta.** v.80, p. 1144-1152, 1997.
- DAY, A.J.; GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; JOHNSON, I.T.; WILLIAMSON, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. **Biochem. Pharmacol.** v.65, p. 1199-1206, 2003.
- DE RUTZ, R.E.L.; FUSCO, M.; RUIZ, S.O. Constituents of *Alternanthera pungens*. **Fitoterapia**, v. 64, p. 1-2, 1993.
- DE SOUZA, D.J.F.; ALVES, K.Z.; DA SILVA, J.D.; DA SILVA E SOUZA, P.V.; DE CARVALHO, M.G.; FREIRE, R.B.; FERREIRA, D.T.; FREIRE, M.F. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). **Indian J. Pharmacol.** v.37, p.174-178, 2005.
- DE SOUZA, M.M.; KERN, P.; FLORIANI, A.E.O.; CECHINEL, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytother. Res.** V.12, p. 279-281, 1998.
- DEWANJI, A.; MATAI, S. Nutritional evaluation of leaf protein extracted from three aquatic plants. **J. Agr. Food Chem.** v.44, p. 2162-2166, 1996.

- DI MAMBRO, V.M.; FONSECA, M.J.V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **J. Pharm. Biomed. Analysis** v.37, p. 287-295, 2005.
- DOGRA, J.V.V.; OJBRA, O.P. Saponin from *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. **Comp. Physiol. Ecol.** v.3, p. 5-6, 1978.
- DOGRA, J.V.V.; JHA, O.P.; MISHRA, A. Chemotaxonomy of Amaranthaceae-study of triterpenes. **Plant Biochem J.**, v.4, p. 14-18, 1977.
- DUVE, K. J.; WHITE, P. J. Extraction and identification of antioxidants in oats. **J. Amer. Oil Chem. Society.** v.68, p. 365-370, 1991.
- EHLENFELDT, M.K.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of Highbush Blueberry. **J. Agric. Food Chem.** v.49, p. 2222-2227, 2001.
- FERNANDES, A.C.; CROMARTY, A.D.; ALBRECHT, C.; VAN RENSBURG, C.E.J. The antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens*. **J. Ethnopharmacol.** v.95, p. 1-5, 2004.
- FERREIRA, E.O.; DIAS, D.A. A methylenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*. **Phytochem.** v.53, p. 145-147, 2000.
- FERREIRA, E.O.; DIAS, D.A. Phytochemical investigation of *Gomphrena claussenii* Moq. **Biochem. Syst. Ecol.** v.32, p. 823-827, 2004.
- FERREIRA, E.O.; SALVADOR, M.J.; PRAL, E.M.; ALFIERI, S.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. A new heptasubstituted (*E*)-aurone glucoside and other aromatic compounds of *Gomphrena agrestis* with biological activity. **Zeitsch. für Naturforsch.** v.59, p. 499-505, 2004.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. Tyrosine and tryptophan determinations proteins. **J. Biol. Chem.** v.73, p. 627, 1927.
- GABRIELI, C.N.; KEFALAS, P.G.; KOKKALOU, E.L. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis raeseri*. **J. Ethnopharmacol.** v.96, p. 423-428, 2005.
- GERALD, B.; YANG, M.; JANICSÁK, G.; MÁTHÉ, I.; CARABOT-CUERVO, A. Betaine distribution in the Amaranthaceae. **Biochem. Syst. Ecol.** v.27, p. 87-92, 1999.
- GRIFFITHS, L.A. On the distribution of gentisic acid in green plants. **J. Exp. Biol.** V.10, p. 437-438, 1959.
- GUERRA, R.N.M.; PEREIRA, H.A.W.; SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.36, p. 1215-1219, 2003.
- GUO, C.; CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: relationship to oxygen radical absorbance capacity. **J. Agric. Food Chem.** v.45, p. 1787-1796, 1997.

GUPTA, R.K.; SASCENA, V.K. Volatile constituents from the flowers of *Alternanthera pungens* H. B. K. **Indian Perfum.** v.31, p. 366-369, 1987.

HANDELMAN, G.J.; CAO, G.; WALTER, M.F.; NIGHTINGALE, Z.D.; PAUL, G.L.; PRIOR, R.L.; BLUMBERG, J.B. Antioxidant capacity of oats (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 4888-4893, 1999.

HAQUE, A.S.K.; SEN, D.; BAGCHI, U.B. ; CHAKRABARTY, M.M.; MUKHERJEE, S. Evaluation of total antioxidant capacity of some vegetables, spices and tea. **J. Food Sci. Technol. –Mysore.** v.43, p. 467-469, 2006.

HARBONE, J.B.; MABRY, J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975, 456p.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharm. Ther.** v.96, p. 67-202, 2002.

HE, L.; MENG, Z. Studies on chemical constituents of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. **Zhong. Yaok. Dax. Xueb.** v.26, p. 263-267, 1995.

HENRIQUES, R.P.B.; MEIRELLES, M.L.; HAY, J.D.; Ordenação e distribuição de espécies das comunidades vegetais na praia da restinga de Barra de Maricá, Rio de Janeiro. **R. Bras. Botanica** v.7, p. 27-36, 1984.

HUANG, D; OU, B; PRIOR, R.L The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food. Chem.** v.53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER. E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated cyclodextrin as the solubility enhancer. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p. 1815-1821, 2002.

IWALEWA, E.O.; ADEWUNMI, C.O.; OMISORE, N.O.A.; ADEBANJI, O.A.; AZIKE, C. K.; ADIGUN, A.O.; ADESINA, O.A.; OLOWOYO, O.G. Pro- and antioxidant effects and cytoprotective potentials of nine edible vegetables in Southwest Nigeria. **J. Med. Food** v.8, p. 539-544, 2005.

JACOME, R.L.R.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“Pau-Pereira”). **Quim. Nova.** v.27, p. 897-900, 2004.

JANSZ, E.R.; JEYA RAJ, E.E.; PIERIS, N.; ABEYRATNE, D.J. Cyanide liberation from Linamarin. **J. Natl. Sci. Counc. Sri Lanka**, v.2, p. 57-65, 1974.

JAYAPRAKASHA, G.K.; NEGI, P.S.; JENA, B.S.; RAO, J.M. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **J. Food Comp. Analysis.** v.20, p. 330-336, 2007.

JOU, H.; LIN, Y.-M.; LIN, Y.C.; CHEN, F.C. Constituents of *Alternanthera sessilis* R. B. **Hua Hsueh** v.1, p. 22-25, 1979.

KABEYA, L.M.; KANASHIRO, A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SORIANI, F.M.; LOPES, J.L.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Res. Commun. Molecular Pathol. Pharmacol.** v.111, p. 103-113, 2002.

KALT, W.; McDONALD, J.E.; DONNER, H. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. **J. Food Sci.** v.65, p. 390-393, 2000.

KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 4638-4644, 1999.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; POLIZELLO, A.C.M.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytother. Res.** v.18, p.61-65, 2004.

KAPUNDU, M.; LAMI, N.; DELAUDE, C. A saponin from *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. **Bull. Soc. R. Sci. Liege.** v.55, p. 605-606, 1986.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.** v.96, p. 229-245, 2004.

KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; PACHOLEK, B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. **Nahrung/Food** v.46, p. 184-186, 2002.

KROL, W., CZUBA, Z.; SCHELLER, Z.; SHANI, J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **J. Ethnopharmacol.** v.41, p. 121-126, 1994.

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. **Phytother. Res.** v.8, p. 358-361, 1994.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chim. Acta.** v.295, p. 141-154, 2000.

LI, H.B.; CHENG, K.W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F. JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chem.** v.102, p. 771-776, 2007.

LIN, S.C.; LIN, Y.H.; SHYUU, S.J.; LIN, C.C. Hepatoprotective effects of Taiwan Folk Medicine – *Alternanthera sessilis* on liver-damage induced by various hepatotoxins **Phytother. Res.** v.8, p. 391-398, 1994.

LIN, S.R.; CHEN, A.H. Constituents of *Alternanthera sessilis*. **T'ai-wan Yoo Hsu. Tsa Chih**, v.27, p. 103-104, 1975.

LINDSEY, K.L.; MOTSEI, M.L.; JAGER, A.K. Screening of South African food plants for antioxidant activity. **J. Food Sci.** v.67, p. 2129-2131, 2002.

LLESUY, S.F. Introducción y especies activas de oxígeno. In: MARRONI, N. P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. Ulbra. 2002. 189p.

LUCISANO-VALIM, Y.M.; KABEYA, L.M.; KANASHIRO, A.; RUSSO-CARBOLANTE, E.M.S.; POLIZELLO, A.C.M.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SILVA, S.C.; LOPES, J.L.C.; OLIVEIRA, C.A.; MANTOVANI, B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**. v.47, p. 53-58, 2002.

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

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNDERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Quim. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chem.** v.100, p. 1409-1418, 2007.

MANCINE, B. Obtenção de princípios ativos vegetais. **Revista Racine**, p. 54-55, 1996.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.L.; FONSECA, M.J.V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Analysis** v.39, p. 455-462, 2005.

MARRONI, N.P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. Ulbra, 2002, 189p.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Modern separation methods. **Nat. Prod. Reports**. v.8, p. 391-413, 1991.

MATHAMS, R.H.; SUTHERLAND, A.K. The oxalate content of some queensland pasture plants. **Queensl. J. Agr. Sci.** V.9 p.317-334, 1952.

MESA, J.; BLAIR, S.; SAEZ, J.; CORREA, A.; CARMONA, J. In vitro antimalarial evaluation of extracts of the plants *Alternanthera lanceolata* and *Pollalesta discolor* **Anal. Quim.-Internat. Ed.** v.94, p. 67-70 1998.

MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p. 519-525, 2002.

MUDALIGE, R.G.; LONGSTRETH, D.J. Effects of salinity on photosynthetic characteristics in photomixotrophic cell-suspension cultures from *Alternanthera philoxeroides*. **Plant Cell Tis. Organ Cult.** v.84, p.301-308, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** v.15, p. 473-497, 1962.

NEWMAN, T.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.** v.17, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, T.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.** v.66, p. 1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, C.A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SILVA, S.C.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; AZEVEDO, A.P.G.B.; GONÇALVES, C.F.F.; CORDEIRO, D.S.; LEITÃO, D.P.S.; GASPAR, L.R.; SOUZA, P.L.V.; VALIM, Y.M.L.; MANTOVANI, B. Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. **Eclét. Quim.** v.27, 2002.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.** v.49, p. 4619-4626, 2001.

PAIVA, S.R.; FONTOURA, L.A.; FIGUEIREDO, M.R.; MAZZEI, J.L.; KAPLAN, M.A.C. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM. **Quim. Nova.** v.25, p. 717-721, 2002.

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

PENDERS, A.; KAPUNDU, M.; DELAUDE, C. Structure of principal saponin of *Alternanthera sessilis*. **Bull. Soc. Chem. Belg.** v.101, p. 227-232, 1992.

PIATTELLI, M.; MINALE, L. Pigments of Centrospermae-II (Distribution of Betacyanins). **Phytochem.** V.3, p. 547-557, 1964.

PICCINELLI, A.L.; De SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (Burríto), a folk paraguayan tea. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 5863-5868, 2004.

PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; LAURO, M. R.; BARBATO, F.; AQUINO, R. Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p. 6423-6428, 2003.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.** v.63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v.25, p. 45-61, 2002.

POMILIO, A.B.; BUSCHI, C.A.; TOMES, C.N.; VIALE, A.A. Antimicrobial constituents of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. **J. Ethnopharmacol.** v.36, p. 155-161, 1992.

PRATT, D.E.; MILLER, E.E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). **J. Amer. Oil Chem. Society** v.61, p. 1064-1067, 1984.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem** v.51, p. 3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L.; CAO, G. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: Implications for altering *in vivo* antioxidant status. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** v.220, p. 255-261, 1999.

QUINTERO RUIZ, A.; VALADEZ, J. M. Effects of different growth factors on *Gomphrena globosa* callus tissue. **J. Nat. Prod.** v.48, p. 976-980, 1985.

RACKOVA, L.; MAJEKOVA, M.; KOSTALOVA, D.; STEFEK, M. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. **Bioorganic & Méd. Chem.** v.12, p. 4709-4715, 2004.

RAGASA, C.Y.; TREMOR, N.; RIDEOUT, J.A. Iodone derivatives from *Alternanthera sessilis*. **J. Asian Nat. Prod. Res.** v.4, p. 109-115, 2002.

RAMAWAT, K.G.; MERILLON, J.M. (eds). **Biotechnology: secondary metabolites**. Enfield: Science Publishers, 1999, 363p.

RIBEIRO, A.B.; BOLZANI, V.S.; YOSHIDA, M.; SANTOS, L.S.; EBERLIN, M. N.; SILVA, D. H. S. A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **J. Braz. Chem. Soc.** v.16, p. 526-530, 2005.

RIBEIRO, A.B.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; Antioxidant flavonol glycosides from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae) **Eclet. Quim.** v.27, p. 000-000, 2002.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Sci.** v.2, p. 152-159, 1997.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.** v.20, p.933-956, 1996.

RIGANO, D.; FORMISANO, C.; GRASSIA, A.; GRASSIA, G.; PERRONE, A.; PIACENTE, S.; VUOTTO, M. L.; SENATORE, F. Antioxidant flavonoids and isoflavonoids from rhizomes of *Iris pseudopumila*. **Planta Med.** v.73, p. 93-96, 2007.

ROGINSKI, V; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.** v.92, p. 235-254, 2005.

RUIZ, R.E.L.; FUSCO, M.R.; SOSA, A.; RUIZ, S.O. Isolation of anthraquinones and flavonoids pigments from fruits of "Yerba del pollo" (*Alternanthera pungens* H. B. K., Amaranthaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.15, p. 63-68, 1996.

RUIZ, R.E.L.; FUSCO, M.R.; RAPISARDA, M.R.; SOSA, A.; RUIZ, S.O. Phytochemical study of yerba del pollo (*Alternanthera pungens* H. B. K. Amaranthaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.10, p. 25-27, 1991.

SAENZ, R.; JOSE, A; NASSAR, C.; MARYSSI, A. Phytochemical screening of Costa Rican plants IV. Alkaloids analysis. **Rev. Biol. Trop.** v.18, p.129-38, 1970.

SAHU, B.R.; CHAKRABARTY, A. A flavone glycoside, robinitin-7-O- β -D-glucopyranoside from *Alternanthera sessilis*. **Asian J. Chem.** v.5, p. 1148-1150, 1993.

SALT, T.A.; XU, S.; PATTERSON, G.W.; ADLER, J.H. Diversity of sterol biosynthetic capacity in the Caryophyllidae. **Lipids.** v. 26, p. 604-613, 1991.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitsch. Für Naturforsch.** v.61, p. 19-25, 2006.

SALVADOR, M.J. **Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera maritima* e *Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae).** 2005. 410f. Tese (Doutorado em Ciências - Área Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochem. Syst. Ecol.** v.32, p. 107-110, 2004.

SALVADOR, M.J.; ZUCCHI, O.L.A.D.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. In vitro antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Pharm. Biol.** v.42, p. 138-148, 2004.

SALVADOR, M.J.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adults plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Braz. J. Microbiol.** v.34, p. 131-136, 2003.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci. Technol. Int.** v.8, p. 121-137, 2002.

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

SASCENA, H.O. Survey of the plants of Orissa (India) for tannins, saponins, flavonoids and alkaloids. **Loydia**, v.38, p. 346-351, 1975.

- SHYMALA, B.N.; GUPTA, S.; LAKSHMI, A.J.; PRAKASH, J. Leafy vegetables extracts – antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** v.6, p. 239-245, 2005.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.** v.82, p. 291-295, 1997.
- 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*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.48, p. 779-786, 2005.
- SILVA, D.H.S.; PEREIRA, F.C.; ZANONI, M.V.B.; YOSHIDA, M. Lipophyllic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. **Phytochem.** v.57, p. 437-442, 2001.
- SIMÕES, C.M.O *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5^a ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** v. 299, p. 152-178, 1999.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetric of total phenols with phosphoromolybdic-phosphotugstic acid reagents. **Amer. J. Enology Viticulture**, v. 20, p. 144-158, 1965.
- SINHA, P.; ARORA, V.K.; WAHI, S.P. Chemical investigation on *Alternanthera sessilis* R. B. **Indian Drugs**, v. 21, p. 139-140, 1984.
- SIQUEIRA, J.C. Phytogeography of brasilian Amaranthaceae. **Pesquisa Botânica**, p. 5-21, 1994/1995.
- SIQUEIRA, J.C. Amaranthaceae de Mata Atlântica. **Acta Biol. Leopold.**, v.12, p. 165-173, 1990.
- SIQUEIRA, J.C. **Flora do estado de Goiás, Amaranthaceae.** Goiânia: CEGRAF-UFG, 1989. 44p. [Colecao Rizzo, v. 12].
- SIQUEIRA, J.C. Importância alimentícia e medicinal das Amaranthaceaes do Brasil. **Acta Biol. Leopold.** v. 9, p. 5-22, 1987.
- SIQUEIRA, J.C.; GUIMARÃES, E.F. Amaranthaceae do Rio de Janeiro – gênero *Alternanthera* Forsskal **Rodriguésia.** v. 36, p. 21-40, 1984.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr. Campinas.** v. 15, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G.M.; AYRES, M.C.C.; da COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova.** v.30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, J.G.; TOMEI, R.R.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; AZZOLINI, A.E.C.S.; DIAS, D.A.; SALVADOR, M.J.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Ethanol crude extract and flavonoids isolated from *Alternanthera maritima*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenging activity. **Zeitsch. für Naturforsch.** v.62c, p. 339-347, 2007.

SRIDHAR, R.; LAKSHMINARAYANA, G. Lipid classes, fatty-acids and tocopherols of leaves of 6 edible plant species. **J. Agr. Food Chem** v. 41, p. 61-63, 1993.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; DENEV, P.; GARGOVA, S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chem.** v. 102, p. 764-770, 2007.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 607-616, 2006.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y.Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chem.** v. 102, p. 938-953, 2007.

TADHANI, M.B.; PATEL, V.H.; SUBHASH, R. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **J. Food Comp. Analysis** v.20, p. 323-329, 2007.

TAKEARA, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P.; JIMENEZ, P.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; LOTUFO, T.M.C. Constituintes químicos da ascídia *didemnum psammatoedes* (sluiter, 1895) coletada na costa cearense. **Quim. Nova.** v. 30, p. 1179-1181, 2007.

TERMENTZI, A.; KEFALAS, P.; KOKKALOU, E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. **Food Chem.** v. 98, p. 599-608, 2006.

TRIANANTIS, T.; STELAKIS, A.; DIMOTIKALI, D.; PAPADOPOULOS, K. Investigations on the antioxidant activity of fruit and vegetable aqueous extracts on superoxide radical anion using chemiluminescence techniques. **Analytica Chim. Acta** v. 536, p. 101-105, 2005.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz. J. Pharm. Sci.** v.42, p. 289-306, 2006.

VEIGA Jr, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova.** v.28, p. 519-528, 2005.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova,** v. 29, p. 326-337, 2006.

VILLAÑO, D.; FERNANDEZ-PACHON, M.S.; MOYA, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta** v.71, p. 230-235, 2007.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Rad. Biol. Med.** v.36, p. 829-37, 2004.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, p. 140-146, 2000.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 304-309, 1997.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, p. 701-705, 1996.

WENLI, Y.; YAPING, Z.; BO, S. The radical scavenging activities of *radix puerariae* isoflavonoids: A chemiluminescence study. **Food Chem.** v.86, p. 525-529, 2004.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic capacities of common foods in the United States. **J. Agric. Food Chem.** v.52, p. 4026-4037, 2004.

WURTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chem. Toxicol.** v.28, p. 743-745, 1990.

YAMADA, C.S.B. Fitoterapia, sua história e importância. **Revista Racine**, p. 50-51, 1998.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, v.24, p. 147-152, 2001.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A., CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. 500p.

ZIELSKE, A.G.; SIMONS, J.N.; SILVERST, R.M. Flavone feeding stimulant in alligatorweed. **Phytochem.** v.11, p. 393-396, 1972.

ZHANG, S.M.; HE, Y.S.; TABBA, H.D.; SMITH, K.M. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides* **Chin. Med. J.** v.101, p. 861-866, 1988.

ZHOU, B.; BLASKÒ, G.; CORDELL, G.A. Alternanthin, a C-glycosylated flavonoid from *Alternanthera philoxeroides*. **Phytochem.** v.27, p. 3633-3636, 1988.