

**CÍNTIA SORANDRA OLIVEIRA MENDES**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE  
AMARANTHACEAE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Flaviano Oliveira Silvério

Montes Claros

2012

**M538c**  
**2012**      **Mendes, Cíntia Sorandra Oliveira.**  
            **Caracterização da composição química e atividade biológica de extratos de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze Amarnathaceae / Cíntia Sorandra Oliveira Mendes. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2012. 100 f.: il.**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.**

**Orientador: Flaviano Oliveira Silvério.**

**Banca examinadora: Francisco Frederico Arantes, Paulo Sérgio Lopes, Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos, Gevany Paulino de Pinho, Flaviano Oliveira Silvério.**

**Inclui bibliografia: f. 87-100.**

**1. Plantas medicinais. 2. *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze Amarnathaceae. Composição química. I. Silvério, Flaviano Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.**

**CDU: 633.88**

**Elaborada pela BIBLIOTECA COMUNITÁRIA DO ICA/UFMG**

**CÍNTIA SORANDRA OLIVEIRA MENDES**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* (L.) KUNTZE  
AMARANTHACEAE**

---

Prof. Francisco Frederico P. Arantes  
(IFNMG)

---

Prof. Paulo Sérgio N. Lopes  
(ICA/UFMG)

---

Prof. Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos  
(ICA/UFMG)

---

Prof.<sup>a</sup> Gevany Paulino de Pinho  
(Coorientador – ICA/UFMG)

---

Prof. Flaviano Oliveira Silvério  
(Orientador – ICA/UFMG)

Aprovada em 16 de fevereiro 2012.

Montes Claros  
2012

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela força diária na caminhada e pela companhia e proteção.

Aos meus pais, Dalcy e Laurindo, pelo amor, apoio e dedicação. Enfim, por tudo.

Ao meu parceiro, companheiro, amigo e marido Dan, pela compreensão, incentivo e amor.

Aos meus irmãos Joicy, Leila e Divesley e aos demais familiares que sempre estiveram ao meu lado.

À madrinha Lauzinha, meu anjo da guarda e companheira das horas difíceis e diversão nas horas boas!

À Kau e Dê por muitas coisas, mas em especial pela amizade verdadeira e compreensão! Aprendi muito com vocês.

Ao Prof. Flaviano Oliveira e à Prof.<sup>a</sup> Gevany Paulino pelas orientações e ensinamentos.

A todos os membros do Laboratório de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Colegas de ontem de hoje e de sempre, que me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos. Em especial à Joice, Clara, Layla, Juliana, Ane, Gabi e ao Thiago.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões, que contribuíram para a melhoria dessa pesquisa.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da UFMG pela oportunidade de estudar este curso

Ao Professor Josafá Carlos de Siqueira (PUC / RJ) pela identificação botânica da espécie e ao Professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa (UFV/MG) pelas análises cromatográficas.

A todos os professores do Mestrado do ICA/UFMG pela contribuição para a minha formação intelectual.

Aos colegas, funcionários e alunos do ICA/UFMG, por todo o carinho e apoio durante este período de convivência. Enfim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado e que me incentivaram nesta conquista e que de alguma maneira fizeram parte da minha vida. Essa história é nossa!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO

- FIGURA 1 -** Fotos da *Alternanthera brasiliana*. A) Porte herbáceo; B) Excicata depositada no Herbário Montes Claros da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES).....17
- FIGURA 2 -** Exemplos de estruturas químicas de esteróis, terpenóides, taninos, quinonas e cumarinas.....20

### CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES

- GRÁFICO 1 -** A) Determinação do tempo de extração e B) Porcentagens de extrativos da *A. brasiliana* obtidas em quatro solventes através da extração sólido-líquido.....35
- FIGURA 1 -** Figura 2 - Cromatograma de íons totais dos extratos da *A. brasiliana* obtidos por Extração sólido-líquido por maceração. A: hexano; B: acetato de etila; C: etanol 98%; D: etanol 70% (v/v). Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 2. TR: tempo de retenção.....39
- GRÁFICO 2 -** Principais classes de compostos presentes nos extratos de *A. brasiliana* produzido com quatro solventes (hexano, acetato de etila, etanol e etanol:água 70% v/v). AG: ácidos graxos, HI: hidrocarbonetos, ES: esteróides, AL: alcoóis, CA: carboidratos e NI: não identificados.....40

### CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DA *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDA UTILIZANDO-SE ULTRASSOM

- GRÁFICO 1 -** A) Determinação do tempo de extração e B) Porcentagens de extrativos da *A. brasiliana* obtidas em quatro solventes através da extração sólido-líquida.....52
- FIGURA 1 -** Cromatograma de íons totais dos extratos da *A. brasiliana* obtidos por Extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom. A: hexano; B: acetato de etila; C: etanol 98%; D: etanol 70% (v/v). Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 2. TR: tempo de retenção.....53

**GRÁFICO 2 -** Principais classes de compostos presentes nos extratos de *A. brasiliana* produzido com quatro solventes (hexano, acetato de etila, etanol e etanol:água 70% v/v) e dois adsorventes (sílica e C18). CA: carboidratos, ES: esteróides, ALD: aldeídos, AL: alcoóis, HI: hidrocarbonetos e CA: carboidratos.....58

#### **CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DA *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA**

**FIGURA 1 -** Coloração dos extratos de *A. brasiliana* produzidos por Dispersão da Matriz em Fase Sólida. Amarelo: extrato hexânico, verde escuro: acetato de etila, verde claro: etanol 98% e vermelho: etanol:água 70% v/v.....71

**GRÁFICO 1 -** Percentagens de extração da *A. brasiliana* obtidos em quatro solventes e dois adsorventes na DMFS.....72

**FIGURA 2 -** Cromatograma de íons totais dos extratos da *A. brasiliana* obtidos por Dispersão da Matriz em Fase Sólida utilizando sílica e C18 como adsorvente. A: hexano (sílica); B: Hexano (C18); C: acetato de etila (sílica); D: acetato de etila (C18); E: etanol 98% (sílica); F: etanol (C18); G: etanol 70% (v/v) (sílica) e H: etanol 70% (v/v) (C18). Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 2. TR: tempo de retenção.....79

**GRÁFICO 2 -** Principais classes de compostos presentes nos extratos de *A. brasiliana* produzido com quatro solventes (hexano, acetato de etila, etanol e etanol:água 70% v/v) e dois adsorventes (sílica e C18). CA: carboidratos, AG: ácidos graxos, AL: alcoóis, HI: hidrocarbonetos, ES: esteróides e NI: não identificados.....80

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES**

- 1- Constituintes químicos detectados nos extratos de *A. brasiliana* em quatro solventes obtidos através da extração sólido-líquida convencional. Os números referem-se aos picos dos cromatogramas da Figura 2.....37
- 2- Tamanho dos halos de inibição, em centímetros, obtidos por extratos de *A. brasiliana* sobre seis microorganismos.....42

### **CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DA *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDA UTILIZANDO-SE ULTRASSOM**

- 1- Constituintes químicos identificados nos extratos de *A. brasiliana* em quatro solventes obtidos através da extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom.....55
- 2- Diâmetros dos halos de inibição, em centímetro, de extratos de *A. brasiliana* produzidos pela extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom sobre seis micro-organismos.....61

### **CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DA *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA**

- 1- Constituintes químicos identificados nos extratos de *A. brasiliana* em quatro solventes obtidos através da extração por DMFS. Os números referem-se aos picos do cromatograma da Figura 3.....74
- 2- Diâmetros dos halos de inibição, em centímetro, de extratos de *A. brasiliana* produzidos pela extração por Dispersão da Matriz em Fase Sólida sobre seis micro-organismos.....83

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DMFS** – Dispersão da matriz em fase sólida

**CG/EM** – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

**NCCLS** - National committee for clinical laboratory standards.



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	14
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1	Plantas Medicinais.....	15
3.2	<i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze.....	15
3.3	Atividade Antibacteriana.....	17
3.4	Parâmetros de Avaliação em Métodos de Extração.....	21
3.5	Análises Químicas.....	22

### CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES

	<b>RESUMO</b> .....	27
	<b>ABSTRACT</b> .....	28
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	29
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
2.1	Preparação do Material Vegetal.....	32
2.2	Extração Sólido-Líquido Convencional.....	32
2.2.1	Avaliação do Tempo de Extração.....	32
2.3	Análise Química.....	32
2.3.1	Derivatização.....	32
2.3.2	Análise por CG-EM.....	33
2.4	Ensaio Biológico.....	33
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
3.1	Determinação do Tempo de Extração e Rendimento pelo Método Convencional.....	35
3.2	Análise Química por CG-EM dos Extratos.....	36
3.3	Ensaio Biológico.....	42
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	44

### CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO ULTRASSOM

	<b>RESUMO</b> .....	<b>45</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>46</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
2.1	Preparação do Material Vegetal.....	49
2.2	Extração Sólido-líquido Utilizando Ultrassom.....	49
2.3	Análise Química.....	49
2.3.1	Derivatização.....	49
2.3.2	Análise por CG-EM.....	50
2.4	Ensaio Biológico.....	50
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
3.1	Extração Sólido-líquido Utilizando Ultrassom.....	52
3.2	Análise Química.....	53
3.3	Ensaio Biológico.....	60
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
	<b>CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DA <i>Alternanthera brasiliana</i> OBTIDOS POR DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA</b>	
	<b>RESUMO</b> .....	<b>64</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>65</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>68</b>
2.1	Preparação do Material Vegetal.....	68
2.2	Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS).....	68
2.3	Análise Química.....	68
2.3.1	Derivatização.....	68
2.3.2	Análise por CG-EM.....	69
2.4	Ensaio Biológico.....	69
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>71</b>
3.1	Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS).....	71
3.2	Composição Química.....	73
3.3	Atividade Biológica.....	82
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>



## CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 INTRODUÇÃO

*Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) é uma planta medicinal utilizada no tratamento de inflamações, dores e processos infecciosos (BROCHADO *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004). Extratos polares desta planta têm revelado a presença de carboidratos e pigmentos da classe das betalaínas (SILVA *et al.*, 2005, GASPARETTO *et al.*, 2010). Já os extratos lipofílicos têm apresentado quantidades significativas de ácidos e ésteres graxos, esteróides, alcoóis graxos e hidrocarbonetos (PEREIRA, 2007).

Trabalhos recentes, envolvendo outras plantas medicinais têm mostrado que o teor de extrativos varia de acordo com método de extração e o solvente empregado (WEINHOLD *et al.*, 2008; BIMAKRA *et al.*, 2011). Nesses trabalhos, procedimentos convencionais baseados na extração sólido-líquida apresentam menores teores de extrativos que aqueles obtidos por metodologias mais elaboradas como extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom e a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) (XIAO *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2009; JADHAV *et al.*, 2009; BIMAKRA *et al.*, 2011).

Consoante Hemwimol *et al.* (2006), a extração sólido-líquida com ultrassom baseia-se na utilização de ondas ultrassônicas para promover maior penetração do solvente na matriz vegetal, permitindo interação mais eficiente entre os constituintes da planta e o solvente. Já a dispersão da matriz em fase sólida baseia-se na interação entre o material vegetal e um adsorvente (florisil, sílica, C<sub>18</sub>, etc.), resultando no rompimento da parede celular e facilitando a extração das substâncias químicas (BARKER, 2007). A dispersão da matriz em fase sólida é uma técnica comumente utilizada no estudo de contaminantes orgânicos em diversas matrizes ambientais (BING *et al.*, 2005; PENA *et al.*, 2008), no entanto, são raros os trabalhos que descrevem o uso em extratos vegetais (CAPRIOTTI *et al.* 2010). Ressalta-se ainda, que metabólitos vegetais da classe dos ácidos fenólicos (ZIAKOVÁ *et al.*, 2003) e isoflavonóides (VISNEVSCHI-NECRASOVA *et al.*, 2009) já foram extraídos com sucesso a partir desta técnica.

Tais técnicas de extração utilizam diversos tipos de solventes, sendo empregados, por exemplo, a água, etanol, diclorometano, acetato de etila e hexano (BARWICK, 1997; ZHAO *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2010). O hexano, apesar de ser mais vantajoso por extrair somente compostos lipofílicos, apresenta algumas deficiências na remoção de compostos parcialmente polares (OKOLI *et al.*, 2007; LAI *et al.*, 2009; ORHAN *et al.*, 2009; MONSÁLVEZ *et al.*, 2010). Cechinel Filho e Yunes (1998) salientam que o diclorometano e acetato de etila são empregados para remoção de extrativos em plantas medicinais, visando obter os compostos com polaridades intermediárias. Contudo, devido à toxicidade do diclorometano, o método de extração com este solvente tem sido utilizado de forma restrita (JABER-VAZDEKIZ *et al.*, 2006). A água e o etanol extraem maior quantidade de componentes hidrofílicos como carboidratos e compostos fenólicos (MARKOM *et al.*, 2007), porém, elevados teores de carboidratos favorecem o desenvolvimento de microrganismos (BIELLA *et al.*, 2008).

Apesar desses relatos na literatura, nenhum estudo sistemático foi realizado visando comparar diferentes metodologias de extração e solventes para a determinação do teor de extrativos em *A. brasiliensis*. A comparação entre métodos de extração pode proporcionar a obtenção de elevada quantidade de princípio ativo em menor tempo, com redução no consumo de reagente e maior preservação da composição química.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de diferentes métodos de extração e solventes na determinação do teor, composição química e atividade biológica de extratos da *A. brasíliana*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Plantas Medicinais

O uso dos recursos vegetais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade (PINTO *et al.* 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005; LEONTI *et al.* 2003 ), sendo que os primeiros relatos sobre a utilização de plantas medicinais são oriundos da China e Egito. No princípio, o homem utilizava as plantas de forma aleatória, descobrindo posteriormente suas utilidades ou seu potencial tóxico (FÁVERO; PAVAN, 1997). A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas possibilitaram a divulgação dos efeitos benéficos produzidos por muitas espécies de plantas, ainda que sua composição química permanecesse desconhecida (VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2006).

Embora o uso de medicamentos sintéticos desde a evolução da medicina alopática seja muito recorrente, a utilização de plantas para fins medicinais nunca foi extinta. A facilidade de obtenção e a tradição do uso contribuem para a permanência desta prática pela população, em especial por povos de países em desenvolvimento (VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2006). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento depende das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Além disso, sabe-se que aproximadamente 60% da população do mundo depende, quase que inteiramente, de vegetais como recurso para a medicação (FUNARI; FERRO, 2005). Em comprovação a isso, estudos relatam que dos 520 novos medicamentos aprovados entre 1983 e 2010; 39% eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais e cerca de 60 a 80% das drogas antibacterianas e anticancerígenas foram obtidas a partir de espécies vegetais (NEWMAN; CRAGG, 2010).

Neste contexto, os produtos naturais, em especial os de origem vegetal, apresentam também grande importância na indústria farmacêutica seja como fonte principal, ou como modelo molecular de novos padrões bioativos (ARNOUS *et al.*, 2005). Conforme Biella *et al.*, (2008), as indústrias farmacêuticas têm buscado princípios ativos para a obtenção de novos

medicamentos a partir das plantas medicinais. Nesse sentido, para a formulação de medicamentos a partir de plantas medicinais (fitoterápicos), faz-se necessária a realização de um trabalho multidisciplinar, o qual abarque estudos na seleção e cultivo da espécie vegetal, avaliação dos teores dos princípios ativos além da manipulação e aplicação na clínica médica (LAMEIRA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2008).

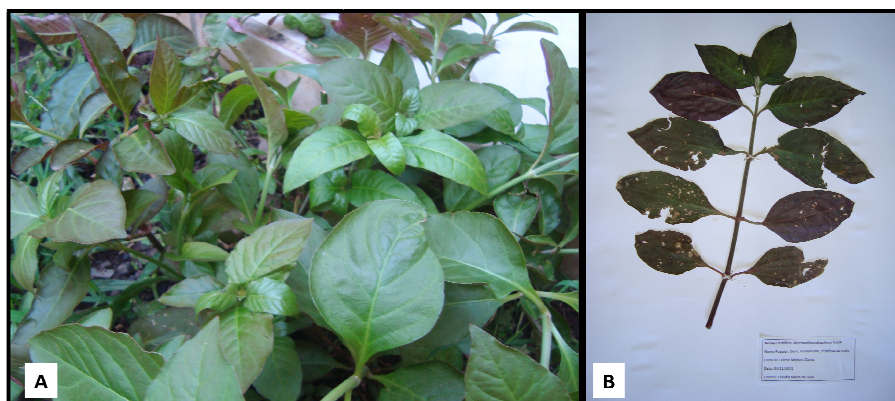
Entre a grande diversidade de espécies medicinais, inúmeras encontram-se presentes no território brasileiro, o qual é composto por biomas ricos em diversidade vegetal, (ALMEIDA *et al.*, 1998) como por exemplo o ecossistema do cerrado, com área de 204 milhões de hectares, 22% do território nacional, este é um dos biomas brasileiros mais ameaçados apesar de abrigar a segunda maior biodiversidade do planeta e possuir inúmeras espécies medicinais de composição química desconhecida cientificamente (ALMEIDA *et al.*, 1998; BORBA; MACEDO, 2006). A química de produtos naturais representa um ponto de grande importância e destaque no estudo de plantas medicinais, uma vez que somente por meio dos métodos utilizados nessa área, pode-se obter o isolamento, purificação, identificação e síntese de novos compostos que podem ser incorporados a três modalidades de aplicações: incorporação direta em formulações farmacêuticas; conversão a um derivado que será incorporado a uma fórmula farmacêutica; provisão de modelos estruturais para a síntese de fármacos (YUNES *et al.*, 2001). Os avanços nos estudos de plantas medicinais são enormes e o futuro das descobertas de novos medicamentos passa obrigatoriamente por diversos campos da ciência (YUNES, 2001a).

#### 4.2. *Alternanthera brasiliana*

*Alternanthera brasiliana*, popularmente conhecida como “terramicina” ou “perpétua do mato”, é uma planta herbácea que possui hastes semieretas e inflorescências terminais (SALVADOR *et al.*, 2003). Na Figura 1 está representado o porte herbáceo de *A. brasiliana* juntamente com a exsiccata utilizada para a identificação da espécie. É uma planta medicinal presente desde o sul ao sudeste brasileiro, sendo pertencente à família *Amaranthaceae* que possui representantes amplamente utilizados na



medicina popular no tratamento de inflamações, dores e processos infecciosos (GUERRA *et al.*, 2003).



**FIGURA 1** - Fotos da *Alternanthera brasiliana*. A) Porte herbáceo; B) Exsicata depositada no Herbário Montes Claros da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES).

Fonte: Arquivo pessoal.

Plantas do gênero *Althernanthera* são conhecidas por possuírem propriedades antimicrobianas e antivirais e em algumas espécies deste gênero tem sido reportada a inibição da atividade linfocitária, hepatoprotetoras e atividade analgésica (DELAPORTE *et al.*, 2002; BIELLA *et al.*, 2008). A família *Amaranthaceae* compreende 170 gêneros, com aproximadamente 2.000 espécies, as quais são pouco estudadas sob o ponto de vista químico. O gênero *Alternanthera* é formado por 80 espécies, amplamente distribuídas pelo mundo, sendo que 25% delas são encontradas no Brasil. O pigmento vermelho extraído das folhas é denominado de betacianinas, que são pigmentos da classe de betalaínas muito utilizado para tratar de lesões da pele. Estes pigmentos conferem a cor vermelho-violeta (ou púrpura) para os caules e as folhas dessa planta e, menos frequentemente, para flores e frutos (SILVA *et al.*, 2005).

Estudos fitoquímicos de partes aéreas de *A. brasiliana* revelaram a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos, sendo o  $\beta$ -sitosterol o constituinte mais abundante. Esses compostos possuem diversas

propriedades farmacológicas, tais como ação antitumoral, antivirais, anti-hemorrágicos, hormonais, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes (DELAPORTE *et al.*, 2002). Entretanto, não há na literatura nenhum estudo detalhado da composição química dos extratos desta planta. Estudos farmacológicos de *A. brasiliana* têm revelado a significativa atividade analgésica, antiedematogênica (DELAPORTE *et al.*, 2002) e atividade antiproliferativa de linfócitos (BROCHADO *et al.*, 2003). Além disso, destaca-se a atividade antiviral contra imunodeficiência humana - HIV (SI-MAN *et al.*, 1988) e vírus da herpes simplex vírus - HSV (LAGROTA *et al.*, 1994).

Apesar do apreciável potencial biológico, que se deve, sobretudo, ao grande número de espécies de princípios ativos presentes nesta planta, muitos deles ainda não foram identificados. Essa lacuna amplia a área da pesquisa para que novos estudos sejam realizados, já que muitas espécies deste gênero têm sido comprovadamente eficazes no tratamento de diversas doenças. Como exemplo pode ser citada a utilização de *A. repens* no tratamento de doenças gastrointestinais e a comprovada ação antifúngica de extratos de *A. marítima* (ASTUDILLO-VÁZQUEZ *et al.*, 2008; GASPARETTO *et al.*, 2010).

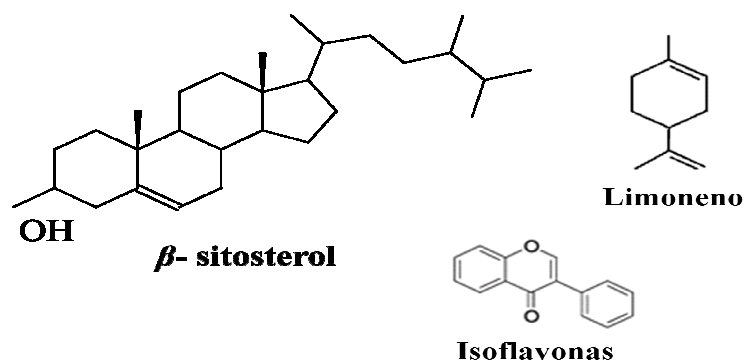
#### 4.3. Atividade Antibacteriana

Os antimicrobianos são substâncias que provocam morte ou inibição do crescimento de micro-organismos e agem por meio da interferência em processos metabólicos, como na replicação cromossômica e na inibição da síntese protéica, ou causam danos nas estruturas celulares dos micro-organismos, como parede celular e membrana citoplasmática (BARROS *et al.*, 2001). Nascimento *et al.*, (2000) revelam que embora as indústrias farmacêuticas tenham produzido um grande número de antibióticos, a resistência aos antimicrobianos tem aumentado. Por esse motivo é preciso sempre que se busquem novas fontes terapêuticas que sejam mais eficientes para o tratamento de infecções bacterianas (SILVA *et al.*, 2007). Além disso, a busca por novos agentes antimicrobianos se faz necessária não somente pelo aumento da resistência bacteriana, como também pelo surgimento de infecções oportunistas fatais, associadas a doenças que suprimem a ação do

sistema imunológico (PENNA *et al.*, 2001). Essas infecções são ocasionadas por micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são patógenos os quais apresentam linhagens multirresistentes e são de grande importância clínica, uma vez que se encontram entre os agentes mais comuns de infecções oportunistas em humanos (TRABULSI *et al.*, 2005; TAVARES, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001).

Baseado em sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas (SOUZA *et al.*, 2004; SCHNITZLER *et al.*, 2007; FROELICH *et al.*, 2008) cuja estrutura química, com raras exceções, apresenta grandes diferenças na estrutura química em relação aos antibióticos convencionais e, portanto, são apontados como uma alternativa para a resolução de problemas ocasionados pela resistência microbiana (JOHANN *et al.*, 2007; USHIMARU *et al.*, 2008; LAMEIRA *et al.*, 2008; JUNIOR *et al.*, 2009). Tais agentes antimicrobianos, isolados de plantas superiores, podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (LOBO; LOURENÇO, 2007). Entretanto, a grande maioria das plantas que possuem compostos com potencial antibiótico e são normalmente empregadas como fitoterápicos populares, não tiveram efetivamente estudadas as suas potencialidades terapêuticas e composição química (CARDOSO, 2001).

São exemplos de grupos de substâncias com propriedades antimicrobianas extraídos de plantas: esteróides, terpenóides e óleos essenciais (PASSOS *et al.*, 2009); alcalóides; lectinas e polipeptídios, substâncias fenólicas e polifenóis, que são fenóis simples; ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, taninos e cumarinas (CAETANO *et al.*, 2002; BROCHADO *et al.*, 2003; ZAMPINI *et al.*, 2007; SCHNITZLER *et al.*, 2007; FROELICH *et al.*, 2008; LAMEIRA *et al.*, 2008). Exemplos de estruturas químicas destes princípios ativos são apresentados na Figura 2.



**FIGURA 2** - Exemplos de estruturas químicas de esteróis, terpenóides, taninos, quinonas e cumarinas.

Fonte: Arquivo pessoal.

As proporções relativas destes princípios ativos em plantas podem sofrer variações, seja pelas produções diferenciadas nas diferentes partes da planta, bem como em amostras coletadas em diferentes regiões (SIMÓN *et al.*, 1999; LARCHER, 2000). Além disso, apesar da existência de um controle genético, a produção destes compostos pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, tal como variações na composição química ocasionadas por mudanças sazonais (DELAPORTE *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008). Em muitas espécies vegetais a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza destes constituintes não é fixa durante o ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). O estudo dessas variáveis, em especial as provocadas por variações sazonais, torna-se relevante ao passo que a estabilidade da composição química dos princípios ativos fornece dados para a padronização na produção de fitoterápicos.

O conhecimento da produção dos princípios ativos pelos vegetais contribui, por exemplo, na obtenção segura de substâncias com potencial antimicrobiano, o que favorece significativamente o desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, uma vez que essas substâncias são mais eficazes e menos tóxicas do que os antimicrobianos sintéticos, além de

ajudar na corrida contra a resistência dos micro-organismos patogênicos (CARTAXO *et al.*, 2010).

#### 4.4. Parâmetros de Avaliação em Métodos de Extração

Relatos de extração de princípios ativos de fontes vegetais são datados antes do período da mesopotâmia, quando a obtenção de substâncias aromáticas, óleos e graxas medicinais eram realizados por povos antigos para a comercialização (BART, 2011). A extração de princípios ativos vegetais pode ser realizada com o uso de diversas partes da planta como em folhas, caules, raízes e flores (MACIEL *et al.*, 2002). O material vegetal é comumente seco e pulverizado ou ainda pode ser triturado em adsorvente sólido com intuito de se permitir a máxima transferência de massa do soluto com solvente (SINGH, 2008). A maceração e utilização de ultrassom podem ser citadas como exemplos de método de extração sólido-líquido e entre aqueles que são realizados em fase sólida, destaca-se a extração por dispersão da matriz em fase sólida (WANG; WELLER, 2006).

Entre os diversos métodos de extração avaliados, a extração sólido-líquida por maceração é uma técnica tradicional na produção de extratos vegetais e apresenta como vantagens o seu baixo custo, fácil realização, além de não utilizar aquecimento, o que previne a degradação dos compostos (SINGH, 2008). Em contrapartida, todo o processo extrator demanda maior tempo para a finalização quando comparado a outras técnicas, como por exemplo, a extração em fluido supercrítico e utilização de ultrassom (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002).

A extração assistida por ultrassom é um método de extração sólido-líquido em que os efeitos das ondas ultrassônicas possibilitam uma maior penetração do solvente no interior das células vegetais favorecendo, assim, a redução do tempo e o aumento do rendimento dos extratos produzidos (FILGUEIRAS *et al.*, 2000; CUOCO *et al.*, 2009). Esta técnica é cada vez mais utilizada na extração de compostos como flavonóides (SUN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011), esteróis (SUN *et al.*, 2010), terpenos (PÉRES *et al.*, 2006), taninos e fenólicos totais (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011).

A dispersão da matriz em fase sólida baseia-se na fricção entre o material vegetal e um adsorvente (sílica, C<sub>18</sub>, etc.), resultando no rompimento da parede celular e exposição das substâncias que serão extraídas com a eluição de um solvente (BARKER, 2007). A dispersão da matriz em fase sólida é utilizada no estudo de contaminantes orgânicos em diversas matrizes ambientais (BING *et al.*, 2005; PENA *et al.*, 2008), sendo descrita como uma técnica flexível já que pode-se variar adsorvente e solvente de acordo com as características dos compostos de interesse. Salienta-se ainda, sua rápida reprodução e economia, visto que são gastos pequenas quantidades de solvente, amostra e adsorvente. Apesar dessas vantagens, são raros os trabalhos que descrevem o uso para extração de ativos em plantas medicinais (CAPRIOTTI *et al.*, 2010). Metabólitos vegetais da classe dos ácidos fenólicos (ZIAKOVA *et al.*, 2003) e isoflavonóides (VISNEVSCHINECRASOVA *et al.*, 2009), por exemplo, já foram extraídos com sucesso por meio desta técnica.

Além do método empregado, o tipo de solvente é outra variável estudada para composição química e rendimento dos extratos obtidos. Em muitos sistemas de extração os solventes são empregados puros, no entanto, pode ser conveniente o uso de misturas visando a melhoraria do poder extrator de compostos (MARKOM *et al.*, 2007). Com base neste princípio, estudos são realizados utilizando-se solventes de polaridade variada sobre matrizes vegetais, com o objetivo de identificar diferentes classes químicas presentes nos extratos produzidos a partir de diferentes solventes (LAPORNIK *et al.*, 2005; POMPEU *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos relatam potenciais atividades biológicas de extratos obtidos pela extração com etanol a partir de diferentes matérias-primas vegetais (SCHINTZLER *et al.*, 2008; SHUKLA *et al.*, 2009; KHADER *et al.*, 2010; FIGUEREDO *et al.*, 2011; GUNADHARINI *et al.*, 2011). O etanol é um solvente polar efetivo na extração de flavonóides e seus glicosídeos, catecóis, taninos, carboidratos, compostos fenólicos, entre outros (YANG *et al.*, 2009). O solvente orgânico acetato de etila apresenta uma provável extração das seguintes classes químicas: flavonóides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral. (CECHINEL

FILHO, 1998). Este fato foi corroborado em estudo realizado com sementes de uva, em que, entre os solventes empregados, o acetato de etila foi relatado com o maior rendimento na extração de polifenóis, com destaque para o desenvolvimento de extração seletiva de proantocianidinas (PEKÍC *et al.*, 1998)

Muitos estudos de caracterização de extratos lipofílicos que utilizam hexano como solvente extrator relatam a presença de terpenos, sesquiterpenos, óleos essenciais entre outros grupos apolares na composição dos extratos (OKOLI *et al.*, 2007; LAI *et al.*, 2009; ORHAN *et al.*, 2009; MONSÁLVEZ *et al.*, 2010).

Além do tipo de solvente a ser empregado, é necessário também conhecer o tempo ótimo de extração dos princípios ativos, pois esta informação faz com que o processo de extração seja suficiente para obter o máximo de compostos presentes sem que perdure por um período de extração desnecessário (LAPORNIK *et al.*, 2005). A determinação do tempo ideal de extração pode evitar a degradação dos compostos pela exposição prolongada a fatores como luz e oxidação (CHIRINOS *et al.*, 2007; CHAN *et al.*, 2009, CHEW *et al.*, 2011). A avaliação de todas estas variáveis é importante na produção de extratos vegetais e deste modo são cada vez mais estudadas (LAPORNIK *et al.*, 2005; ASPÉ; FERNADEZ, 2011).

#### 4.5. Análises Químicas

De acordo com Rodrigues (2001), mais de 248 mil espécies de plantas já tiveram a composição química estudada e destas, 12 mil plantas são conhecidas por terem propriedades medicinais. No entanto, menos de 10% de todas elas foram investigadas no que concerne ao ponto de vista fitoquímico e / ou farmacológico (CARDOSO, 2001). A partir desta pequena percentagem de espécies vegetais estudadas, inúmeros compostos terapeuticamente indispensáveis já foram isolados, como alcalóides (o quinino a partir da casca peruana e a morfina da cápsula da papoula); glicosídeos cardiotônicos diferentes, produzidos a partir de *Digitalis* sp., aplicado amplamente na síndrome de insuficiência cardíaca; esteróides vegetais que constituem a base de anticoncepcionais modernos, flavonóides,

e uma grande variedade de antibióticos (RISHTON, 2008). Ainda assim, noventa por cento de todas as espécies de plantas conhecidas ainda aguardam investigação e mesmo no caso dos 10% de espécies já investigadas, sabe-se que muitas dessas tiveram somente os principais compostos estudados (CARDOSO, 2001).

O desenvolvimento de novos fármacos, a partir de moléculas naturais, é uma atividade de caráter multidisciplinar em que uma das etapas iniciais do processo de descoberta de novos protótipos é realizada por grupos de pesquisa em química de produtos naturais. Para isso, extratos com solventes orgânicos são preparados a partir da espécie selecionada e então são avaliados por ensaios biológicos *in vitro* e submetidos a processos de fracionamento biomonitorado (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Em relação ao fracionamento, diferentes técnicas cromatográficas, bem como uma combinação delas, podem ser utilizadas. As técnicas cromatográficas empregadas podem apresentar diferentes graus de inovação tecnológica, desde colunas abertas com suportes cromatográficos diversos até técnicas instrumentais, como cromatografia gasosa. (CG) (MENDHAM *et al.*, 2002). Podem ainda ser divididas em cromatografia analítica e preparativa de modo que a primeira baseia-se na identificação e análises de misturas e substâncias isoladas, enquanto que a cromatografia preparativa fundamenta-se apenas no isolamento de compostos (NOVÁKOVÁ; VICKOVÁ, 2009).

A cromatografia líquida é um método ideal para separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico, bem como uma imensa variedade de outros compostos de alta massa molecular e/ou baixa estabilidade térmica, como por exemplo, metabólicos vegetais, pigmentos de plantas e produtos farmacêuticos (BOYSEN; HEARN, 2010), o que determina maior aplicabilidade na pesquisa sobre plantas medicinais. A cromatografia líquida em coluna se divide em dois grupos: O primeiro refere-se à cromatografia líquida clássica, realizada em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo estabelecido pela força da gravidade; enquanto o segundo refere-se à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (MENDHAM *et al.*, 2002).



Na cromatografia gasosa ocorre a separação de misturas em seus respectivos componentes, através de um gás sobre um adsorvente estacionário sendo, portanto, semelhante à cromatografia líquida, exceto que a fase líquida móvel é substituída por um gás, fazendo com que a fase estacionária se resume em um líquido ou um sólido, limitando os mecanismos de separação à adsorção e à partição, o que dividia a cromatografia gasosa em seu início em duas categorias principais: cromatografia gás-líquido e cromatografia gás-sólido. Todavia, como a grande maioria das aplicações atuais é de cromatografia gás-líquido, essas terminologias foram abandonadas, empregando-se apenas cromatografia gasosa (CG) (MENDHAM *et al.*, 2002).

Esta técnica é utilizada na separação de compostos voláteis ou volatilizáveis, o que restringe a utilização na avaliação de muitas amostras. Além de o caráter volátil ser um requisito obrigatório à amostra, há outras características como instabilidade térmica e alta polaridade, que podem impedir a injeção direta de uma amostra em um cromatógrafo a gás. Isso pode ser resolvido com o uso da derivatização, estendendo, assim, a versatilidade e a utilidade da cromatografia gasosa (DEWULF e LANGENHOVE, 2002; BLACK; MUIR, 2003). Em estudos de metabólitos secundários vegetais, a CG é ideal para análises de amostras complexas como as encontradas em óleos essenciais, (HEUSKIN *et al.*, 2009) bem como permite avaliar a composição química de extratos vegetais brutos contendo compostos como flavonóides e rotenóides (PEREIRA *et al.*, 2002). A possibilidade de se analisar extratos brutos sem a necessidade de derivatização e, em vários casos, sem procedimentos de *clean up*, pode ser extremamente útil para o estudo sistemático de plantas medicinais e outras fontes de amostras biologicamente ativas, como um método de análise rápida, que pode guiar o trabalho fitoquímico subsequente (PEREIRA; NETO, 2000).

Após o isolamento das substâncias constituintes do extrato vegetal, o trabalho fitoquímico prossegue com a elucidação da estrutura química das moléculas. Para tanto, são empregados métodos espectrométricos como ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de

massas (EM). Na atualidade, o desenvolvimento das técnicas cromatográficas hífenadas possibilita identificar os constituintes de extrato vegetal, sem que seja necessário isolar as substâncias (COLLINS *et al.*, 2006). O termo “técnicas hífenadas”, refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter-se uma ferramenta mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais (LANÇAS, 2009).

As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações diferentes, ou seja, serem ortogonais. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), com técnicas espectroscópicas como espectrofotômetro de UV-Vis, ressonância magnética nuclear (RMN) e também espectrômetro de massas (EM e EM-EM), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores. A escolha do detector torna-se fundamental quando o analito se encontra em nível de traços, necessitando-se de baixos limites de detecção (LANÇAS, 2009).

O número de informações obtidas é muito grande, tornando-se necessária a utilização de computadores para a obtenção e tratamento dos dados e, frequentemente, o uso da quimiometria para sua interpretação (NOVÁKOVÁ; VICKOVÁ, 2009). Uma variedade de compostos como saponinas, flavonóides, alcalóides, fenóis, terpenos entre outros, já foram identificados com a utilização de diferentes técnicas hífenadas as quais vêm se demonstrando ser de grande valia, pois fornecem informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento, acelerando o estudo químico de muitas espécies que podem conter novos compostos de aplicabilidade fitofarmacêutica (BRANCO; PIZZOLATTI, 2002; BARTRAM *et al.*, 2006; EISENREICH, 2007).

## CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM DIFERENTES SOLVENTES

### Resumo

Os metabólitos vegetais que apresentam ação antibiótica são apontados como uma alternativa para a resolução de problemas ocasionados pela resistência microbiana. *Alternanthera brasiliana* é uma Amaranthaceae que possui ação antimicrobiana reconhecida. Com interesse na obtenção destes princípios ativos, estudos de métodos de extração são cada vez mais frequentes. Desta forma, o presente trabalho visa avaliar a influência do tempo e de diferentes solventes sobre o rendimento, composição química e atividade biológica dos extratos de *Alternanthera brasiliana* obtidos pela técnica de extração sólido-líquida por maceração. A extração sólido-líquida por maceração apresentou maior teor de extrativos utilizando a mistura etanol:água 70:30 (v/v) e etanol 98% (v/v), 20,52% e 6,09% (m/m), respectivamente. Dez dias foram suficientes para extrair 80% do teor de extrativos para os quatro solventes. A análise cromatográfica dos extratos obtidos por extração sólido-líquida por maceração revelou a presença de 34 compostos pertencendo a cinco principais classes: ácidos graxos, esteróides, carboidratos, alcoóis e hidrocarbonetos, com destaque para os esteróides e ácidos graxos que estiveram em maior teor no extrato hexânico e carboidratos mais abundantes nos extratos polares. O crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foi inibido pelo extrato hexânico. Entre os compostos presentes neste extrato os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol são descritos na literatura pelo potencial antimicrobiano. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022) não foram sensíveis aos extratos de *A. brasiliana*. Foi necessário um tempo de extração maior do que aquele convencionalmente utilizado na técnica de extração sólido-líquida por maceração para obtenção da maior parte dos extrativos disponível em *A. brasiliana*. Além disso, o uso de diferentes solventes influenciou o rendimento, composição química e atividade biológica dos extratos. A atividade biológica desenvolvida pelo extrato hexânico sugere que os compostos com potencial antimicrobiano possuem características lipofílicas e, por este motivo, podem ter sido melhor extraídos por este solvente. Estudos futuros de isolamento e elucidação da fração ativa deverão ser realizados para confirmar os compostos que estão envolvidos na ação biológica deste extrato.

**Palavras-chave:** Tempo de extração. Análise Cromatográfica. Solventes.

## CHAPTER 2 - DESCRIPTION OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE EXTRACTS *Alternanthera brasiliana* OBTAINED WITH DIFFERENT EXTRACTION SOLVENTS

### ABSTRACT

The metabolites vegetables that have antibiotic action are mentioned as an alternative to solving problems caused by microbial resistance. *Alternanthera brasiliana* is an Amaranthaceae that has antimicrobial recognized. With interest in obtaining these active principles, studies of extraction methods are increasingly frequent. Thus, this study aims to evaluate the influence of the time and of different solvents on the yield, chemical composition and biological activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* obtained by the technique of solid-liquid extraction by maceration. The solid-liquid extraction by maceration showed higher content of extractives using a mixture ethanol: water 70:30 (v / v) and ethanol 98% (v / v), 20.52% and 6.09% (w / w), respectively. Ten days were sufficient to extract 80% of the extractives content for the four solvents. Chromatographic analysis of the extracts obtained by solid-liquid extraction by maceration revealed the presence of 34 compounds belonging to five main classes: fatty acids, steroids, carbohydrates, alcohols and hydrocarbons with emphasis on steroids and fatty acids that were in higher content in the hexane extract and most abundant in the carbohydrates in the polar extracts. The growth of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) was inhibited by hexane extract. Among the compounds present in this extract  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol the steroids are described in the literature for antimicrobial potential. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) and *Shigella flexneri* (ATCC 12022) were not sensitive to the extracts of *A. brasiliana*. It was necessary time of extraction larger than that conventionally used in the art of solid-liquid extraction for maceration to obtain the biggest part of the available extractives in *A. brasiliana*. Besides, the use of different solvents has influenced the yield, chemical composition and biological activity of the extracts. The biological activity developed by the hexane extract suggests that compounds with antimicrobial potential have lipophilic characteristics, and for this reason they may have been better extracted by this solvent. Future studies of isolation and elucidation of the active fraction should be conducted to confirm the compounds that are involved in the biological action of this extract.

**Keywords:** Time of extraction. Chromatographic analysis. Solvents.

## 1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos vegetais que apresentam ação antibiótica são apontados como uma alternativa para a resolução de problemas ocasionados pela resistência microbiana. Isso, porque estes biocompostos apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos sintéticos (JOHANN *et al.*, 2007; USHIMARU *et al.*, 2008; LAMEIRA *et al.*, 2008; JUNIOR *et al.*, 2009). Verifica-se descrita na literatura a potencial atividade biológica desenvolvida por extratos de espécies da família Amaranthaceae (SOUZA *et al.*, 2004; SCHNITZLER *et al.*, 2007; FROELICH *et al.*, 2008). *Alternanthera brasiliana* é uma Amaranthaceae conhecida popularmente como doril ou perpétua do mato e que possui ação antimicrobiana reconhecida (PEREIRA, 2007; JANDREY; ONOFRE, 2009). Com interesse na obtenção destes princípios ativos, estudos de otimização de métodos de extração são cada vez mais frequentes, já que a matriz vegetal é bastante complexa e os metabólitos, com algumas exceções, ocorrem em montantes inferiores em relação ao peso seco da planta (WANG; WELLER, 2006, JADHAV *et al.*, 2009, BIMAKRA *et al.*, 2011).

Nessa medida, diferentes técnicas, solventes e tempo de extração são testados com objetivo de se avaliar a influência dessas variáveis no teor e composição química dos extratos (SPIGNO *et al.*, 2007, ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011). Entre os diversos métodos de extração avaliados, a extração sólido-líquida por maceração apresenta-se como uma técnica tradicional na produção de extratos vegetais que possui vantagens como baixo custo, fácil realização, além de não utilizar aquecimento, o que previne a degradação dos compostos (SINGH, 2008). Em contrapartida, todo o processo extrator demanda maior tempo para a finalização quando comparado a outras técnicas como extração em fluido supercrítico ou utilizando-se ultrassom (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002). Apesar disso, a produção de extratos por maceração é estudada uma vez que reproduz o modo como a medicina tradicional elabora grande parte dos extratos vegetais.

Com intuito de avaliar o poder extrator de diferentes compostos, solventes de polaridades variadas são empregados puros ou combinados entre si em extratos vegetais (MARKOM *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2010). O etanol, por exemplo, é um solvente polar descrito como efetivo na extração de flavonóides e seus glicosídeos, catecóis, taninos, carboidratos, compostos fenólicos entre outros (YANG *et al.*, 2009). Diversos trabalhos relatam potenciais atividades biológicas de extratos obtidos pela extração com etanol (SCHINTZLER *et al.*, 2008; SHUKLA *et al.*, 2009; KHADER *et al.*, 2010; FIGUEREDO *et al.*, 2011; GUNADHARINI *et al.*, 2011), bem como da combinação deste solvente com água, em que extratos hidroalcolócos de *A. brasiliensis* apresentaram ação antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, inibindo o crescimento destes micro-organismos (JANDREY; ONOFRE, 2009).

Em extratos de *A. aspera* produzidos com o solvente orgânico acetato de etila, verificou-se a presença de compostos saponínicos que possuem potencial ação larvicida contra *Aedes aegypti* (BAGAVAN *et al.*, 2008). A caracterização de extratos lipofílicos, que utilizam hexano como solvente extrator, apontou a presença de terpenos, sesquiterpenos, óleos essenciais, entre outros grupos apolares na composição dos extratos (OKOLI *et al.*, 2007; LAI *et al.*, 2009; ORHAN *et al.*, 2009; MONSÁLVEZ *et al.*, 2010).

Além do tipo de solvente a ser empregado, é necessário também conhecer o tempo ótimo de extração dos princípios ativos, em virtude de que esta informação faz com que o processo de extração seja suficiente para obter o máximo de compostos presentes sem que perca por um período de extração desnecessário (LAPORNIK *et al.*, 2005). A determinação do tempo ideal de extração pode evitar a degradação dos compostos pela exposição prolongada a fatores como luz e oxidação (CHIRINOS *et al.*, 2007; CHAN *et al.*, 2009; CHEW *et al.*, 2011).

Apesar da importância de todas estas variáveis no estudo de produção de extratos vegetais, nenhuma avaliação sistemática foi realizada com intuito de verificar-se a influência do tipo de solvente e tempo de extração no teor, composição química e atividade biológica de extratos de *A. brasiliensis*. Nesse contexto, o presente trabalho visa avaliar a influência do

uso de diferentes solventes na composição química e atividade biológica dos extratos de *Alternanthera brasiliana*, bem como otimizar o tempo de extração para produzi-los pela técnica de extração sólido-líquida por maceração.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação do material vegetal

Caules e folhas de *A. brasiliiana* foram coletados em Montes Claros, norte do estado de Minas Gerais, Brasil. O material foi lavado em água corrente, seco em temperatura ambiente por cinco dias e pulverizado para aproximadamente 60 *mesh*.

Exsicatas foram confeccionadas e identificadas pelo especialista em *Alternanthera*, professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ) e depositadas no Herbário Montes Claros da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) sob o número de registro 2405.

### 2.2 Extração sólido-líquido convencional

#### 2.2.1 Avaliação do tempo de extração

Quatro amostras de 10,000 g do material vegetal (caule e folha) foram submetidas à extração com 45,00 mL de quatro solventes diferentes (hexano, acetato de etila, etanol 98 % (v/v) e mistura de etanol:água 70:30 (v/v), sendo um para cada amostra, por 24 horas. Em seguida, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Quimis) a 50 °C e a massa do resíduo obtida foi determinada. Todo o procedimento foi repetido sucessivas vezes e o extrato obtido coletado em intervalos de 24 em 24 horas, até o tempo total de 20 dias de extração. Todo o procedimento foi realizado em triplicatas e o valor de rendimento final de extração calculado (em g/Kg material vegetal analisado).

### 2.3 Análise química

#### 2.3.1 Derivatização

Alíquota (2,000 mg) do extrato foi adicionada em frasco de vidro para microrreação e, em seguida, solubilizado em 60  $\mu$ L de piridina e 100  $\mu$ L de BSTFA ((N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) contendo 1% de clorotrimetilsilano. A mistura reacional foi aquecida a 70 °C por 30 min. Da



solução obtida, apenas 1  $\mu\text{L}$  foi injetado no CG-EM, sendo o procedimento realizado em triplicata.

### 2.3.2 Análise por CG-EM

As análises foram realizadas no aparelho GC-MS PQ5050A da marca Shimadzu, utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25  $\mu\text{m}$  e hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas foram as seguintes: a temperatura do injetor foi de 290  $^{\circ}\text{C}$  iniciando com 80  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, aumentando de 80  $^{\circ}\text{C}$  a 290  $^{\circ}\text{C}$  na razão de 4  $^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ . A temperatura final permaneceu em 290  $^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema CG-EM foi de 290  $^{\circ}\text{C}$  (MICHIELIN *et al.*, 2009; SILVESTRE *et al.*, 1999). O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas de 30 a 600  $m/z$ .

A identificação dos componentes dos extratos foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho (Wiley 330.000) e com dados da literatura.

### 2.4 Ensaio biológico

Parte dos extratos obtidos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração igual a 75  $\text{mg mL}^{-1}$ . O teste de inibição do crescimento bacteriano foi realizado com as cepas padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). O ensaio de difusão do extrato em disco seguiu a Norma M2-A8 do NCCLS (2003). As suspensões dos micro-organismos de testes foram preparadas em solução salina NaCl 0,98% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 (108 UFC/mL) segundo NCCLS (2003). Os micro-organismos foram inoculados com auxílio de *swab* estéril em placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton. Foram utilizados discos Blank estéreis de 6 mm de diâmetro, embebidos com 10  $\mu\text{L}$  de amostra. As placas foram incubadas a 35  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Após a incubação, foram mensurados os halos de inibição formados em torno dos discos. As culturas bacterianas que apresentaram halos iguais ou maiores que 7 mm foram considerados suscetíveis aos extratos utilizados. Discos de cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ) foram utilizados como controle positivo para *S. aureus*, *S. faecalis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. flexneri*. Para *P. aeruginosa* discos de tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ). Para o controle negativo foram utilizados discos estéreis impregnados com 10  $\mu\text{L}$  de DMSO.

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Determinações do tempo de extração e rendimento pelo método convencional

A extração sólido-líquida por maceração é uma técnica convencional para a extração dos constituintes químicos de produtos naturais (SINGH *et.al.*, 2008). Os resultados de tempo de extração e porcentagem de extrativos obtidos empregando solventes de diferentes polaridades estão apresentados na Figura 1 (A e B). A mistura etanol:água 70:30 (v/v) e etanol 98% extraíram os maiores teores de extrativos em qualquer tempo.

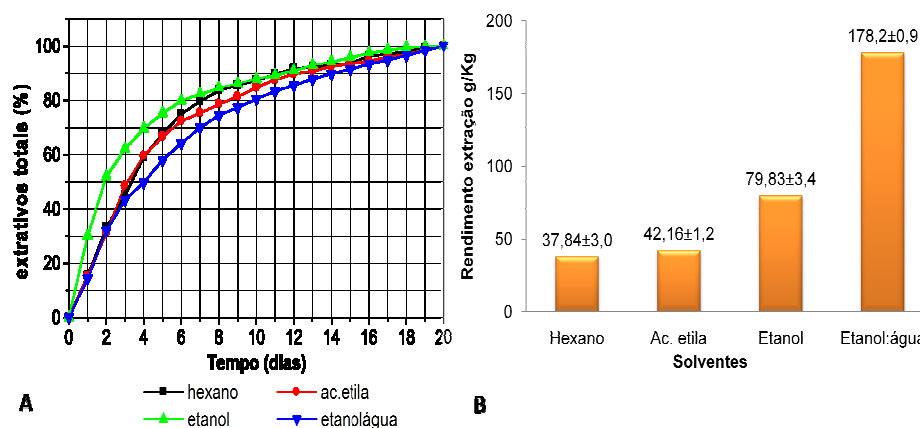


GRÁFICO 1 - A) Determinação do tempo de extração e B) Porcentagens de extrativos da *A. brasiliiana* obtidas em quatro solventes através da extração sólido-líquido.

A análise do Gráfico 1A indica que nos primeiros 12 dias de extração o acetato de etila e etanol 98% (v/v) extraíram valores superiores a 90,0% do extrato total e, após 15 dias, etanol:água 70:30 (v/v) e hexano extraíram percentagens semelhantes. Através da Figura 1A foi possível verificar que 10 dias de extração apresentaram valores acima de 80% de extrativos em todos os solventes, sugerindo ser um tempo adequado para a extração. Os rendimentos de extração, neste período, são apresentados em porcentagem de área relativa no Gráfico 1B.

Esses resultados ressaltam a importância da otimização das condições de extração que permitem obter o máximo rendimento. Frequentemente, trabalhos que produzem extratos vegetais não avaliam o tempo ideal para extração, deixando o material em contato com o solvente de 24 a 72 horas, resultando em rendimento de extração abaixo daquele que realmente é possível obter da droga vegetal (SILVA *et al.*, 2009). Além disso, durante a avaliação do tempo de extração o solvente foi trocado diariamente, permitindo a contínua extração, uma vez que as trocas evitam a saturação, (equilíbrio entre soluto e solvente) e, conseqüentemente, a interrupção da extração (SOUZA *et al.*, 2010).

Solventes mais polares, como a mistura etanol:água 70:30 (v/v), favorecem a extração de maior quantidade de componentes da amostra (178,20±0,87), sugerindo a predominância de compostos de semelhante polaridade em *A. brasiliiana* (Gráfico 1B). Resultados inferiores foram obtidos empregando-se a extração sólido-líquida de outra planta do mesmo gênero (*A. marítima*), extraindo-se 86,77g/2,3kg utilizando etanol como solvente extrator (TOMEI, 2008).

### 3.2 Análise química por CG-EM dos extratos

A atividade farmacológica do extrato de uma planta é produto das substâncias químicas presentes, denominadas de princípios ativos (RATES, 2001; RIOS *et al.*, 2005). Este fato justifica o crescente interesse em estudos que avaliem solventes e condições de processos capazes de extrair o maior número possível de compostos que, ao serem elucidados, possibilitem conhecer aqueles que apresentam efetiva ação farmacológica (MIRON *et al.*, 2010). Com base nesta ideia, os extratos de *A. brasiliiana* produzidos com diferentes solventes foram analisados quimicamente. Todos os compostos identificados e suas respectivas percentagens relativas encontram-se dispostos na Tabela 1.

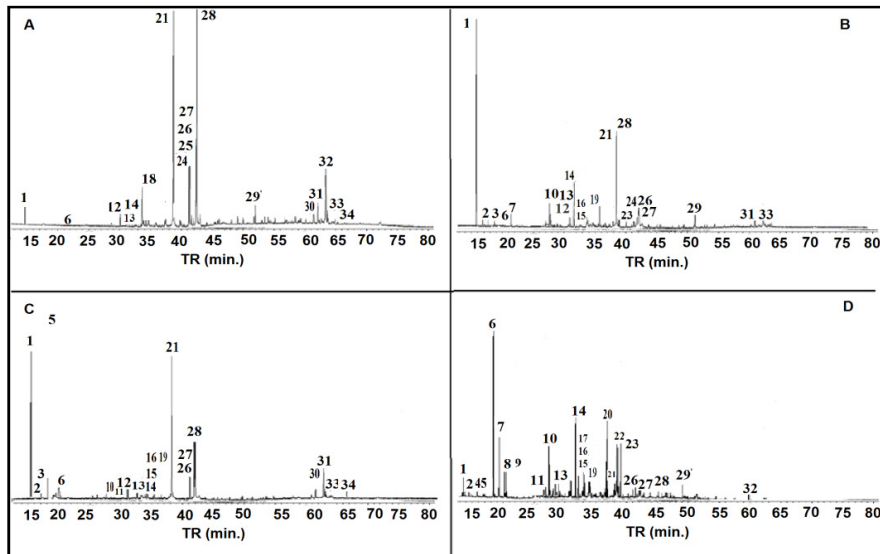
TABELA 1

Constituintes químicos detectados nos extratos de *A. brasiliiana* em quatro solventes obtidos através da extração sólido-líquido por maceração. Os números referem-se aos picos dos cromatogramas da Figura 2.

Nº	TR*	Área Relativa (%)				Identificação
		Hexano	Ac. Etila	Etanol	Etanol:água	
1	13,40	2,47	17,72	30,73	12,05	Glicerol
2	14,52		2,12	1,16	2,86	ácido butanodióico
3	15,39		5,82	0,73		n.i.
4	15,42				3,36	ácido 2,3-diidroxiopropanóico
5	15,67				1,81	ácido 2-butenodióico
6	20,74	0,37	0,41	0,45	13,89	ácido butenodióico
7	21,42			2,89	6,65	ácido piroglutâmico
8	22,71				1,30	n.i.
9	23,95				1,21	ácido 2,3-diidroxiбутanodióico
10	28,04		0,95	4,94	4,65	Xilitol
11	29,57		0,65		1,74	carboidrato n.i.
12	30,24	3,15	3,00	1,63		n.i.
13	30,33	0,60	1,07	1,95	2,85	carboidrato n.i.
14	30,56	0,59	0,89	8,18	7,60	Frutose
15	32,35		0,36		2,73	carboidrato n.i.

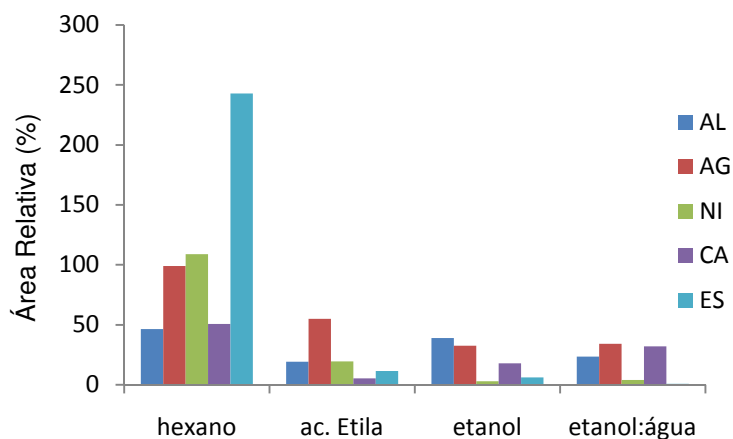
16	32,58		0,59	2,61	2,52	D-galactose
17	33,62			1,57	2,00	D-glucitol
18	34,25	4,21				n.i.
19	35,02		0,25	2,31	2,37	Glucose
20	35,45				8,70	carboidrato n.i.
21	35,60	19,78	19,88	13,41	2,52	ácido hexadecanóico
22	36,05				4,13	Inositol
23	37,38			0,62	2,83	n.i.
24	38,20	5,32		0,24		octadecan-1-ol
25	38,38	8,64				n.i.
26	38,66	0,68	2,40	2,41	0,63	Fitol
27	39,39	8,27	7,43	2,23	0,62	ácido (9Z,12Z)-octadec-9,12-enóico
28	39,55	24,32	20,42	12,29	1,34	ácido (Z)-octadec-9-enóico
29	49,52	1,52		2,89	3,64	Sacarose
30	59,44	1,18	0,72			esterol n.i.
31	60,14	2,38	1,47	0,86		Estigmasterol
32	61,51	6,85	6,77	4,45	0,70	β- sitosterol
33	61,77	1,18	1,52	0,75		β- sitostanol
34	63,05	1,98	1,32			n.i.

---



**FIGURA 2** - Cromatograma de íons totais dos extratos da *A. brasiliensis* obtidos por Extração sólido-líquida por maceração. A: hexano; B: acetato de etila; C: etanol 98%; D: etanol 70% (v/v). Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 2. TR: tempo de retenção.

A análise por CG-EM dos extratos de *A. brasiliensis* revelou a presença de compostos que podem ser distribuídos em quatro principais classes: esteróis, ácido carboxílico, alcoóis e carboidratos. Estes extratos apresentaram porcentagens relativas distintas de compostos de mesma classe. Deste modo, fitol, ácido butenodióico e ácido hexadecanóico apesar estarem presentes nos quatro extratos avaliados, foram encontrados em maior concentração nos solventes etanol, etanol:água e hexano respectivamente. Tais resultados demonstram que a escolha do solvente interfere no sucesso do rendimento de extração do composto desejado o que explica os diferentes rendimentos obtidos nos extratos em estudo tal como descrito na literatura (GIERONI; PIEMONTE, 2010). Esta tendência está representada no Gráfico 2 no qual está exposto as principais classes presentes nos extratos produzidos representadas a importância em valores de porcentagem de área relativa.



**GRÁFICO 2** – Principais classes de compostos presentes nos extratos de *A. brasiliana* extraídos com quatro solventes (hexano, acetato de etila, etanol e etanol:água 70% v/v). AG: ácidos graxos, HI: hidrocarbonetos, ES: esteróides, AL: alcoóis, CA: carboidratos e NI: não identificados.

A classe dos ácidos graxos foi mais representativa no extrato hexânico sendo composto principalmente pelos ácidos (9Z, 12Z)-octadecanóico, ácido (Z)-octadec-9-enóico e ácido hexadecanóico, de modo que, juntos, representaram mais de 50% da percentagem de área relativa total obtida para este extrato. Estes mesmos ácidos graxos e o ácido hidroxibutanodióico foram comuns aos quatro solventes estudados, porém sem a mesma representatividade. Outros ácidos como ácido 2,3-diidroxiopropanóico, ácido piroglutâmico e ácido 2-butenodióico estiveram presentes somente no extrato produzido com o solvente etanol:água 70% (v/v).

Os esteróis também estiveram em maior percentagem no extrato hexânico, em que se destaca a presença de estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitostanol presentes em maior quantidade que nos outros extratos, representando área relativa igual a 242,86%. A identificação destes compostos foi principalmente baseada no espectro de massas com perfil característico que os esteróides possuem em que são frequentes os sinais 486 (íon molecular),  $m/z$  396,  $m/z$  357 e  $m/z$  129 (SILVÉRIO, 2008). A



presença de esteróis como  $\beta$ -sitosterol em extratos de *A. brasilana*, já foi relatada na literatura (MACEDO *et al.*, 2004; PEREIRA, 2007) bem como em extratos de outras alternantheras como *A. marítima* (GASPARETTO *et al.*, 2010).

Fitoesteróis, como os identificados no extrato lipofílico deste estudo, são comumente produzidos pelos vegetais e apresentam capacidade analgésica e antimicrobiana descritas tal como em trabalho realizado com extratos de *Phyllanthus sellowianus*, produzidos com hexano e acetato de etila, de modo que o efeito analgésico equivalente a aspirina foi descrito devido a presença de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Pereira (2007) ao isolar os compostos com ação antimicrobiana em *A. brasiliana* encontrou uma mistura de três esteróis ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e espinasterol) tal como aqueles descritos no presente estudo.

Em relação à classe química dos alcoóis, destaca-se os solventes etanol e hexano uma vez que esses compostos representaram área relativa igual 38,89 e 46,45% respectivamente da composição química total do extrato analisado. Os alcoóis foram frequentes também para o extrato produzido com etanol:água 70% (v/v). O xilitol, mais abundante nesses dois extratos, é um poliálcool com aplicação no tratamento de diabetes e lesões renais, além de utilizado na prevenção de cáries dentárias (MUSSATO; ROBERTO, 2002).

Carboidratos e ácidos graxos hidroxilados foram frequentes na composição do extrato produzido com o solvente mais polar (etanol:água 70%) em que evidencia-se a frutose com percentagem de área relativa igual a 7,6%. Entre os compostos presentes nos quatro extratos, apenas sete não puderam ser identificados já que o perfil de fragmentação não era semelhante a nenhuma das cinco classes avaliadas. Esses compostos são alvo de estudos futuros à medida que podem ser fonte de novos biocompostos com potencial aplicação terapêutica.

### 3.3 Ensaio biológico

A Tabela 1 mostra os resultados do ensaio de difusão em agar em termos de tamanho de zona de inibição (mm) para os extratos testados contra os micro-organismos *S. aureus*, *S. faecalis*, *S. flexneri*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.

**TABELA 2**

Tamanho dos halos de inibição, em centímetros, obtidos por extratos de *A. brasiliiana* sobre seis micro-organismos.

Cepas	(-)*	(+)**	Hexano	Ac. etila	Etanol	Etanol:água
<i>S. aureus</i>	-	2,3	0,9	-	-	-
<i>S. faecalis</i>	-	2,5	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	-	2,1	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	1,8	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	1,7	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	2,3	-	-	-	-

\*\* Controle positivo: cloranfenicol para *S. aureus* e *S. faecalis*; Tetraciclina para *P. aeruginosa*.

\* Controle negativo: dimetilssulfóxido (DMSO).

Entre os extratos avaliados, o extrato hexânico apresentou ação biológica efetiva contra a cepa de *S. aureus*. Em estudo de composição química de *A. brasiliiana*, Pereira (2007) descreve a presença de esteróis como o  $\beta$ - sitosterol e estigmasterol em extratos diclorometânicos e os relacionam com a potencial atividade antibacteriana presente nestes extratos. Todavia, resultado contrário foi obtido por Jandrey e Onofre (2009), em que os extratos polares de *A. brasiliiana* foram mais eficientes na inibição do crescimento bacteriano que os extratos apolares. Tais diferenças de resultados podem estar relacionadas a outros fatores, como local de cultivo, o qual pode interferir na composição química da espécie e conseqüentemente na ação biológica que os extratos desta planta produzem. Em comprovação a isso, Bezerra *et al.* (2008) atribui à ação biológica contra *E. coli*, presente em extratos metanólicos de *A. brasiliiana*, as substâncias betacianínicas isoladas destes extratos e Silva *et al.* (2005) descreve a variação na produção destes

compostos por *A. brasiliensis* de acordo com a incidência de radiação ultravioleta e diferentes doses hormonais. Os outros extratos não apresentaram atividade contra *S. aureus* nem aos outros micro-organismos avaliados.

#### 4 CONCLUSÃO

A avaliação do tempo de extração demonstrou que extratos de *A. brasiliiana* produzidos por maceração necessitam maior tempo de extração (10 dias) do que é convencionalmente usado para este método (1 a 3 dias). Além disso, o tipo de solvente interferiu nos valores de rendimento de extração e composição química e, deste modo, também na atividade biológica. Os esteróides estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitostanol estiveram presentes no extrato lipofílico em maior teor que nos outros extratos e podem estar relacionados à potencial atividade que este mesmo extrato desenvolveu. No entanto, somente estudos de isolamento químico poderão identificar os compostos de potencial farmacológico do extrato hexânico.

### CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDA UTILIZANDO-SE ULTRASSOM

#### RESUMO

*Alternanthera brasiliana* (L.) Kutze é uma Amaranthaceae em que os extratos apresentam ação antimicrobiana, antifúngica e antiviral. Entre os estudos que descrevem a ação farmacológica de extratos de *A. brasiliana*, nenhum descreve a influência do tipo de solvente e tempo de extração sobre o rendimento, composição química e atividade biológica do extrato produzido. Diante deste fato, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do solvente e tempo de extração sobre o rendimento, composição química e atividade biológica de extratos de *A. brasiliana* produzidos pelo método de extração assistido por ultrassom. Amostras de caule e folhas de *A. brasiliana* foram submetidas à extração por ultrassom com solventes de polaridade variada (hexano, acetato de etila, etanol 98% e etanol:água 70%). Os extratos foram secos e encaminhados aos ensaios biológicos pelo teste de difusão em disco e análises químicas por CG/EM. A técnica de extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom conseguiu obter 90% dos extrativos em 5 horas, sendo este o tempo descrito como ideal para a produção de extratos de *A. brasiliana* por esta técnica e com esses solventes. O tempo ideal de extração é considerado reduzido quando comparado a outras técnicas, o que a torna promissora na produção de extratos. Solventes polares obtiveram os maiores rendimentos e foram compostos principalmente por carboidratos. O extrato hexânico apresentou maior teor de ácidos graxos e esteróis, comprovando a influência do tipo de solvente sobre a composição química. Hidrocarbonetos e alcoóis também foram identificados nos extratos. O extrato hexânico apresentou atividade frente à cepa de *Staphylococcus aureus*. Entre os compostos identificados, os esteróis são descritos na literatura por apresentarem ação antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Tempo de Extração. Ultrassom. Plantas Medicinais. Princípios Ativos.

### CHAPTER 3: CHARACTERIZATION OF CHEMICAL COMPOSITION OF THE EXTRACTS *Alternanthera brasiliana* OBTAINED BY LIQUID-SOLID EXTRACTION USING ULTRASOUND

#### ABSTRACT

*Alternanthera brasiliana* (L.) Kutze is an Amaranthaceae in which the extracts show antimicrobial, antifungal and antiviral action. Among the studies that describe the pharmacological action of extracts of *A. brasiliana*, none describes the influence of type of solvent and time of extraction on the yield, chemical composition and biological activity of the extract produced. On this fact, this study aimed to evaluate the influence of the solvent and the time of extraction on the yield, chemical composition and biological activity of extracts of *A. brasiliana* produced by extraction method assisted by ultrasound. Samples of stems and leaves of *A. brasiliana* were submitted to ultrasound extraction by with solvents of varying polarities (hexane, ethyl acetate, ethanol and 98% ethanol: water 70%). The extracts were dried and submitted to biological tests by disk diffusion test and chemical analysis by GC / MS. The technique of solid-liquid extraction using ultrasound has achieved 90% of the extractives in 5 hours being this time described as ideal for the production of extracts of *A. brasiliana* by this technique and with these solvents. The ideal time of extraction is considered low when compared to other techniques, which makes it promising in the production of extracts. Polar solvents obtained the highest yields and were composed mainly of carbohydrates. The hexane extract showed a higher content of fatty acids and sterols proving the influence of type of solvent on the chemical composition. Hydrocarbons and alcohols were also identified in the extracts. The hexane extract showed activity against strains of *Staphylococcus aureus*. Among the compounds identified sterols are described in the literature by presenting antimicrobial.

**Keywords:** Time Extraction. Ultrasound. Medicinal plants. Active principles.

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos dos princípios ativos vegetais podem resultar no descobrimento de novas drogas de alto valor terapêutico. Espécies da família Amaranthaceae, por exemplo, são descritas como potenciais fontes de substâncias antimicrobianas, anti-inflamatórias e antivirais (DELAPORTE *et al.*, 2002; BIELLA *et al.*, 2008). *Alternanthera brasiliana* (L.) (Kuntze) é uma Amaranthaceae em que os extratos apresentaram ação antimicrobiana, antifúngica e antiviral. Trata-se de uma espécie nativa do Brasil que é caracterizada pela cor violeta dos caules e folhas (SILVA *et al.*, 2005). Extratos hidroalcoólicos de partes aéreas de *A. brasiliana* revelaram a presença de terpenos, compostos fenólicos, e esteróides como o  $\beta$ -sitosterol (DELAPORTE *et al.*, 2002).

Diante do grande potencial farmacológico de plantas medicinais como *A. brasiliana*, estudos que avaliam a influência de variações no método de extração sobre a qualidade e teor dos extratos produzidos são cada vez mais frequentes (WANG *et al.*, 2011). Com isso, métodos clássicos de extração, como por maceração (EM) e por soxhlet (ES), são comparados a técnicas como extração assistida por ultrassom (EAU), dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e extração acelerada por solventes (EAS) (XIAO *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2009; JADHAV *et al.*, 2009; BIMAKRA *et al.*, 2011).

A extração assistida por ultrassom é um método de extração sólido-líquido em que os efeitos das ondas ultrassônicas possibilitam maior penetração do solvente no interior das células vegetais, o que favorece a redução do tempo e aumento do rendimento dos extratos produzidos (FILGUEIRAS *et al.*, 2000; CUOCO *et al.*, 2009; JERMAN *et al.*, 2010). Esta técnica é cada vez mais utilizada na extração de compostos como flavonóides (SUN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011), esteróis (SUN *et al.*, 2010), terpenos (PÉRES *et al.*, 2006), taninos e fenólicos totais (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011).

A escolha adequada do solvente é uma variável que interfere no bom desempenho da extração assistida por ultrassom, já que a solubilidade de diferentes princípios ativos vegetais é diferente para cada tipo de eluente

empregado (GARCIA *et al.*, 2010). Nesse contexto, estudos que visam à caracterização química utilizam solventes de polaridade variada sobre matrizes vegetais, com o objetivo de extrair compostos de diferentes classes químicas (LAPORNIK *et al.*, 2005; POMPEU *et al.*, 2009). A partir deste princípio, solventes são empregados puros ou são misturados com o intuito de se avaliar o poder extrator de compostos (GARCIA *et al.*, 2010).

Outra variável que deve ser analisada no estudo de método de extração assistida por ultrassom é o tempo, dado que tal consideração evita que os compostos fiquem expostos por período desnecessário ao efeito das ondas ultrassônicas, o que aumentam as chances de degradação dos metabólitos devido ao efeito das próprias ondas geradas pelo método (VINATORU, 2001). A maioria dos trabalhos descreve 30 minutos como o tempo ideal de extração por esta técnica, contudo este tempo pode variar de acordo com a matriz vegetal, temperatura de extração, granulometria da matriz vegetal e, como descrito anteriormente, pelo solvente empregado (ZHANG *et al.*, 2011, SUN *et al.*, 2011).

Entre os estudos que descrevem a ação farmacológica de extratos de *A. brasiliiana*, nenhum descreve a influência do tipo de solvente e tempo de extração sobre o rendimento, composição química e atividade biológica do extrato produzido. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do solvente e tempo de extração sobre o rendimento, composição química e atividade biológica de extratos de *A. brasiliiana* produzidos pelo método de extração assistido por ultrassom.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação do material vegetal

Caules e folhas de *A. brasiliiana* foram coletados em Montes Claros, norte de Minas Gerais, Brasil. O material foi lavado em água corrente, foi seco em temperatura ambiente por cinco dias e pulverizado para aproximadamente 60 *mesh*.

Exsicatas foram confeccionadas e identificadas pelo especialista em *Alternanthera*, professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ) e depositadas no Herbário Montes Claros da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) sobre o número de registro 2405.

### 2.2 Extração sólido-líquido utilizando ultrassom

Quatro amostras de 10,000 g do material vegetal (caule e folha) foram submetidas à extração com 45,00 mL de quatro solventes diferentes (hexano, acetato de etila, etanol 98 % (v/v) e mistura de etanol:água 70:30 (v/v)), sendo um para cada amostra, por meia hora em banho ultrassônico (Unique). Em seguida, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Quimis) a 50 °C e a massa do resíduo obtida foi determinada. Todo o procedimento foi repetido por 15 vezes, de modo que o extrato obtido foi coletado em intervalos de meia em meia hora, até o tempo total de 7,5 horas de extração. Todo o procedimento foi realizado em triplicatas.

### 2.3 Análise química

#### 2.3.1 Derivatização

Alíquota (2,000 mg) do extrato foi adicionada em frasco de vidro para microrreação e, em seguida, solubilizado em 60  $\mu$ L de piridina e 100  $\mu$ L de BSTFA ((N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) contendo 1% de clorotrimetilsilano. A mistura reacional foi aquecida a 70 °C por 30 min. Da

solução obtida, apenas 1  $\mu\text{L}$  foi injetado no CG-EM, sendo o procedimento realizado em triplicata.

### 2.3.2 Análise por CG-EM

As análises foram realizadas no aparelho GC-MS PQ5050A da marca Shimadzu, utilizando-se coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25  $\mu\text{m}$  e hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas foram as seguintes: a temperatura do injetor foi de 290  $^{\circ}\text{C}$  iniciando com 80  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, aumentando de 80  $^{\circ}\text{C}$  a 290  $^{\circ}\text{C}$  na razão de 4  $^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ . A temperatura final permaneceu em 290  $^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema CG-EM foi de 290  $^{\circ}\text{C}$ . O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas de 30 a 600  $m/z$  (MICHIELIN *et al.*, 2009; SILVESTRE *et al.*, 1999).

A identificação dos componentes dos extratos foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho (Wiley 330.000) e com dados da literatura.

### 2.4 Ensaio biológico

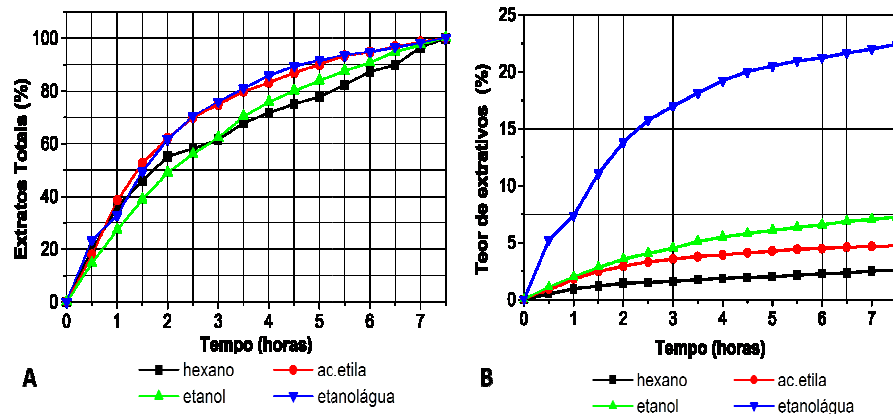
Parte dos extratos obtidos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração igual a 75  $\text{mg mL}^{-1}$ . O teste de inibição do crescimento bacteriano foi realizado com as cepas padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). O ensaio de difusão do extrato em disco seguiu a Norma M2-A8 do NCCLS (2003). As suspensões dos micro-organismos de testes foram preparadas em solução salina NaCl 0,98% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 (108 UFC/mL) segundo NCCLS (2003). Os micro-organismos foram inoculados com auxílio de *swab* estéril em placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton. Foram utilizados discos Blank estéreis de 6 mm de diâmetro, embebidos com 10  $\mu\text{L}$  de amostra. As placas foram incubadas a 35  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Após a incubação, foram mensurados os halos de inibição formados em torno dos discos. As culturas bacterianas que apresentaram halos iguais ou maiores que 7 mm foram consideradas suscetíveis aos extratos utilizados. Discos de cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ) foram utilizados como controle positivo para *S. aureus*, *S. faecalis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. flexneri*. Para *P. aeruginosa* foram utilizados discos de tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ). Para o controle negativo foram utilizados discos estéreis impregnados com 10  $\mu\text{L}$  de DMSO.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Extração sólido-líquido utilizando ultrassom

Os resultados das porcentagens de extrativos em função do tempo de extração empregando solventes de diferentes polaridades e ultrassom estão apresentados nos Gráficos 1 (A e B).



**GRÁFICO 1-** A) Determinação do tempo de extração e B) Percentagens de extrativos da *A. brasiliiana* obtidas em quatro solventes através da extração sólido-líquida.

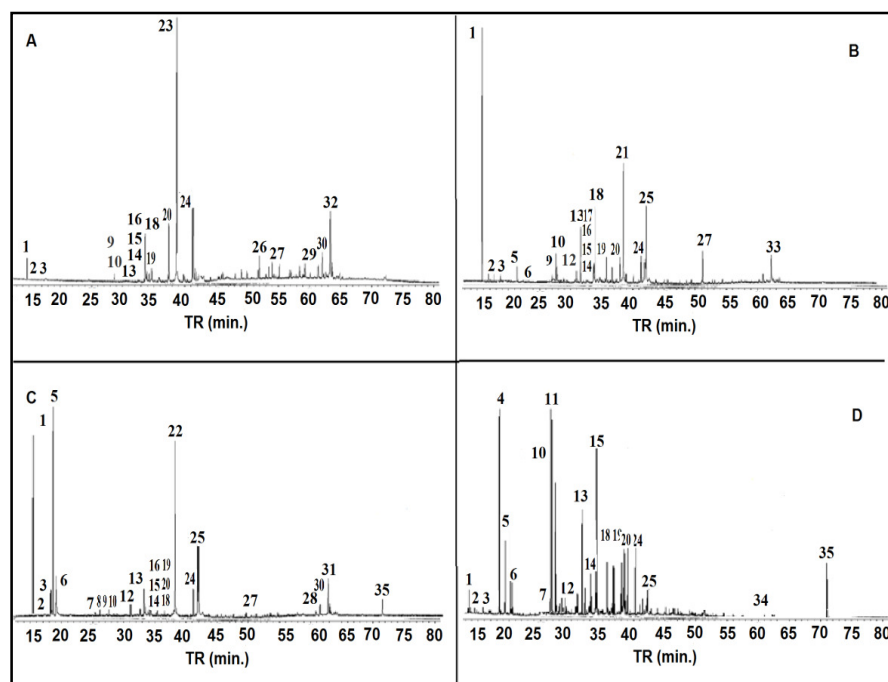
De acordo com os resultados expostos no Gráfico 1A, em cinco horas de extração, acetato de etila e a mistura etanol:água 70:30 (v/v) extraíram valores acima de 90,0% do extrato total e, após 6,5 horas, o etanol 98% e o hexano extraíram valores similares. Pode-se observar que cinco horas de extração foram suficientes para remover mais de 80% do extrato total presente na planta para todos os solventes. Os valores das porcentagens de extração obtidos em cada período são mostrados no Gráfico 1B.

Neste método, o poder extrator do solvente foi potencializado pelas ondas ultrassônicas, que possibilitaram uma maior penetração do eluente na matriz vegetal, resultando na redução do tempo de extração e no aumento do rendimento (SIVAKUMAR *et al.*, 2011). Toma *et al.* (2001) descreveu em revisão a ação das ondas ultrassônicas sobre os tecidos vegetais e relacionou os elevados rendimentos obtidos a efeitos como intensificação de

transferência de massas entre soluto e solvente e ruptura da parede celular, que facilita o acesso do solvente ao conteúdo da célula vegetal. A redução no tempo de extração e o aumento no rendimento foram observados também em estudos com terpenos (PÉRES *et al.*, 2006), esteróis (SCHINOR *et al.*, 2004), flavonóides (SUN *et al.*, 2011), taninos e fenólicos totais (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011). Diante do aumento do rendimento obtido pelo uso desta técnica é possível ressaltar a importância destes resultados, uma vez que entre os estudos de *A. brasiliense* não foi observada a utilização da extração assistida por ultrassom para produção dos extratos.

### 3.2 Análise química

No presente estudo os extratos obtidos foram submetidos à análise de cromatografia gasosa e espectrometria de massas com intuito de se conhecer a composição química presente em cada extrato. Os cromatogramas obtidos encontram-se expostos na Figura 1 em que os números referem-se aos compostos dispostos na Tabela 1.



**FIGURA 1** - Cromatograma de íons totais dos extratos da *A. brasiliana* obtidos por Extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom. A: hexano; B: acetato de etila; C: etanol 98%; D: etanol 70% (v/v). Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 2. TR: tempo de retenção.

Os compostos detectados nos extratos de *A. brasiliana* produzidos com quatro solventes por extração sólido- líquida utilizando-se ultrassom estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1

Constituintes químicos identificados nos extratos de *A. brasiliiana* em quatro solventes obtidos através da extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom. Os números referem-se aos compostos apontados na Figura 2.

Nº	TR*	Área Relativa (%)				Identificação
		Hexano	Ac. Etila	Etanol	Etanol:água	
1	13,43	2,05	11,47	18,24	8,90	Glicerol
2	14,51	0,16	1,05	0,99	1,49	ácido butanodiólico
3	15,41	0,14	1,13	1,38	1,74	ácido 2,3-diidroxiopropanóico
4	20,86				13,84	ácido butenodiólico
5	21,40		0,91	5,60	3,14	ácido piroglutâmico
6	22,71		0,26	0,65	1,42	ácido tetrônico
7	28,05		1,63		1,71	Adonitol
8	29,59		2,46			$\beta$ -D-galactofuranose
9	30,23	2,20	2,46	0,99		Octadecanal
10	30,39	1,26	5,48	10,59	11,86	ácido 2-ceto-D-glucônico
11	30,68				16,27	Frutose
12	31,47		0,35	1,02	1,89	$\beta$ -D-galactofuranose
13	32,60	0,87	3,13	7,53	11,21	D-galactose
14	33,63	0,26	0,34	1,60	1,43	D-glucitol

15	35,05	0,10	2,69	9,76	14,15	$\beta$ -D-glucopiranoose
16	35,39	2,35	1,87			ácido octen-3-oico
17	35,43			1,84		ácido D-glucônico
18	35,63	26,51	15,55	12,28	2,07	ácido hexadecanóico
19	38,67	1,58	2,73	1,48	0,11	fitol
20	39,40	16,99	9,09	6,69	0,90	ácido (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienóico
21	39,60			9,37		ácido Z-octadec-9-enóico
22	39,65		12,14			ácido octadecanóico
23	39,67	20,37				ácido 11-octadecanóico
24	40,14	3,56	2,35	1,56	0,79	ácido octadecanóico
25	49,56		2,96	7,92	3,92	sacarose
26	51,71	1,56				farnesol
27	51,92	1,71	1,32	0,52		ácido tetracosanóico
28	60,20		2,08			esterol n.i.
29	60,22	4,05				estigmasterol
30	61,38	1,50	1,22			ácido eicosanonanóico
31	61,65		7,55			esterol n.i.
32	61,69	12,80				$\beta$ - sitosterol
33	61,87		1,67			estigmastanol

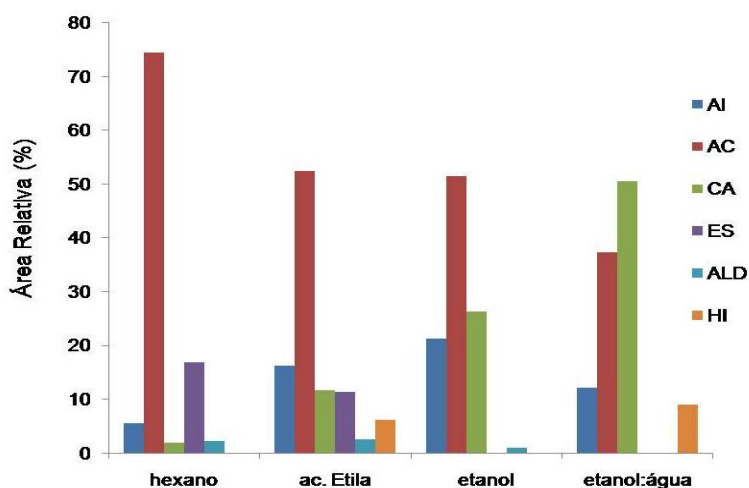


---

34	66,39		3,18	carboidrato n.i.
35	70,93	6,12	8,90	hidrocarboneto n.i.

---

Foram identificados 35 compostos os quais foram agrupados em cinco classes principais de acordo com as estruturas químicas (ácido carboxílico, carboidratos, esterol, hidrocarbonetos e alcoóis) de forma que 26 deles foram encontrados no extrato eluído com acetato de etila. A composição química e o teor dos compostos extraídos variaram de acordo com o solvente empregado. Estes resultados encontram-se sumarizados no Gráfico 2.



**GRÁFICO 2** - Principais classes de compostos presentes nos extratos de *A. brasiliiana* produzido com quatro solventes (hexano, acetato de etila, etanol e etanol:água 70% v/v) e dois adsorventes (sílica e C18). CA: carboidratos, ES: esteróides, ALD: aldeídos, AI: alcoóis, HI: hidrocarbonetos e AC: ácidos Carboxílicos.

O extrato hexânico é composto em sua maioria por ácidos carboxílicos, com destaque aos de cadeia longa como ácido 11-cis-octadecanóico, ácido tetracosanóico e eicosanonanóico. Além desses, estiveram presentes outros ácidos como (9Z)-9-octadecenóico, encontrado no extrato etanólico o qual participa do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios. (SANGIOVANNI; CHEW 2005). Os ácidos carboxílicos identificados nos extratos hidrofílicos foram, em maior frequência, ácidos hidroxilados como o ácido 2,3-dihidroxiopropanóico ou ainda ácidos graxos de cadeia curta como ácido butanodióico e butenodióico.

Outra classe representativa, principalmente ao extrato produzido com hexano, foi a dos esteróis com destaque ao  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol exclusivos ao extrato. Esteróis, como o  $\beta$ -sitosterol, são abundantes em espécies da família Amaranthaceae (PATERSSON *et al.*, 1991). A obtenção de bons rendimentos de extração de esteróis pelo uso da extração por ultrassom utilizando-se hexano foi também descrita por SCHINOR *et al.* (2004) no que tange aos extratos de três espécies de *Chresta*. A importância na otimização da extração destes compostos está principalmente relacionada à ação anti-inflamatória e antimicrobiana reconhecida que eles possuem (JU *et al.*, 2004; SCHINOR *et al.*, 2004). Estigmastanol foi outro esterol identificado mas esteve presente no extrato eluído com acetato de etila. Nos extratos etanólico e hidroalcolico não foram identificados esteróis.

O composto octadecanal foi o único aldeído identificado, estando presente em todos os extratos, exceto no hidroalcolico. Neste extrato hidrofílico, o qual apresentou maior rendimento de extração, foram identificados principalmente compostos da classe dos carboidratos tais como frutose,  $\beta$ -D-galactofuranose,  $\beta$ -D-glucopirranose, sacarose e D-galactose. Alcoóis como fitol, farnesol, adonitol e D-glucitol foram identificados nos extratos analisados por CG-EM (Tabela 1), através do perfil de fragmentação desses compostos e de dados da literatura (SILVÉRIO, 2008). Entre estes alcoóis, o farnesol, que esteve presente somente no extrato hexânico, possui ação biológica comprovada contra *Candida albicans* e *S. aureus* (DERENGOWSKI *et al.*, 2009).

A completa identificação de um carboidrato não foi possível, devido ao perfil de fragmentação semelhante de seus isômeros. Dois esteróis e um hidrocarboneto também não foram completamente elucidados, contudo apresentaram perfis de fragmentação característicos a estas classes o que possibilitou defini-los. Os compostos parcialmente identificados poderão ser objetos de estudos futuros.

### 3.3 Ensaio biológico

Os resultados obtidos no ensaio biológico encontram-se apresentados na Tabela 1. Os micro-organismos utilizados são patogênicos e estão envolvidos em problemas de resistência bacteriana. *Staphylococcus aureus* apresentou sensibilidade frente ao extrato hexânico obtido por extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom. Brochado *et al.* (2003) descreveram a potencial ação do extrato bruto de *A. brasiliiana* contra cepas deste micro-organismo.

Jandrey e Onofre (2009) avaliaram, com teste de difusão em disco, a ação de extratos polares e apolares de *A. brasiliiana* contra cepas padrões de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* verificando que tanto a fração polar (extraída com água) quanto a fração apolar (extraída com solvente orgânico), apresentaram capacidade inibitória de crescimento dos três organismos. Os halos de inibição obtidos foram iguais a 8,63mm de diâmetro para *S. aureus* em extrato apolar com concentração inibitória mínima igual a 25%. No entanto, a metodologia utilizada neste trabalho (microdiluição em caldo) foi diferente da empregada no presente estudo (difusão em disco).

Caetano *et al.* (2002) utilizando a mesma metodologia testaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *A. brasiliiana* frente à cepas de *S. aureus* em que resultados equivalentes ao controle positivo foram obtidos a uma concentração de 65mg/mL, que é próxima daquela utilizada neste estudo (75mg/mL). Ainda nesse trabalho, o extrato bruto foi fracionado e a fração apolar (extraída com acetato de etila) permaneceu apresentando potencial atividade biológica, sugerindo-se, desse modo, a maior composição destes compostos em frações apolares.

Os extratos eluídos com acetato de etila, etanol e etanol:água 70% (v/v) não apresentaram ação biológica sobre os seis micro-organismos testados. Salvador *et al.* (2004) também descreve a ineficaz ação de extratos de *A. brasiliiana* e *A. marítima* frente a *E. coli*.

TABELA 2

Diâmetros dos halos de inibição, em centímetros, de extratos de *A. brasiliiana* produzidos pela extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom sobre seis micro-organismos.

Cepas	(-)*	(+)**	Hexano	Ac. etila	Etanol	Etanol:água
<i>S. aureus</i>	-	2,3	0,9	-	-	-
<i>S. faecalis</i>	-	2,5	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	-	2,1	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	1,8	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	1,7	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	2,3	-	-	-	-

\*Dimetilssulfóxido (DMSO).

\*\* Cloranfenicol para *S. aureus* e *S. faecalis*; Tetraciclina para *P. aeruginosa*.

Compostos presentes no extrato hexânico podem ser importantes na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com ação antibiótica frente a micro-organismos como *S. aureus*, já que são cada vez mais frequentes problemas de resistência bacteriana com o uso dos fármacos convencionais. Entre os compostos identificados, os esteróis como o estigmasterol são frequentemente citados em estudos de alternatheras. Pereira (2007) em estudo de isolamento e elucidação química descreveu uma mistura de três esteróides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e espinasterol) como sendo os ativos relacionados com a ação antimicrobiana dos extratos hexânico e acetato de etila. O álcool farnesol e ácidos carboxílicos de cadeia, longa como ácido 11-cis-octadecanóico, também foram identificados no extrato hexânico em que, entre as características farmacológicas descritas para estes compostos, destaca-se a ação antimicrobiana desenvolvida por farnesol (DERENGOWSKI *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos neste ensaio confirmam a importância da escolha do solvente no processo de extração, visto que as substâncias que possivelmente estiveram envolvidas na ação biológica contra a cepa de *S. aureus*, possuem caráter hidrofóbico sendo, portanto, melhor extraídas em hexano. Além do solvente, o método de extração também pode ter

contribuído para a melhor extração dos princípios ativos de forma rápida e eficiente.

#### 4 CONCLUSÃO

O estudo de tempo de extração demonstrou que a técnica de extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom consegue obter 90% dos extrativos em 5 horas. O tempo ideal de extração foi considerado curto quando comparado a outras técnicas como extração sólido-líquida por maceração, que demandam dias para a obtenção de mesmas proporções. Este resultado aponta a técnica utilizada no presente estudo como promissora na produção de extratos. Diferentes percentagens de extração foram obtidas de acordo com o tipo de solvente utilizado, de maneira que os maiores valores foram apresentados com o uso de etanol e etanol:água 70:30 (v/v), o que sugere uma maior abundância de compostos de características polares na composição de *A. brasiliiana*.

A composição química dos extratos baseia-se em cinco principais classes químicas (ácido carboxílico, carboidratos, esterol, hidrocarbonetos e alcoóis) cujos extratos alcóolico e hidroalcóolico foram compostos principalmente por carboidratos e ácidos carboxílicos hidroxilados, ao passo que o extrato hexânico foi composto principalmente por ácidos carboxílicos e esteróis como  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol identificados em maior quantidade. O extrato hexânico de *A. brasiliiana* apresentou atividade frente à cepa padrão de *S. aureus* e os outros micro-organismos não foram sensíveis a este e aos outros extratos avaliados. Compostos presentes no extrato hexânico de *A. brasiliiana* tal como farnesol, solanesol, stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol são relatados na literatura por apresentarem ação antimicrobiana, porém, apenas estudos futuros de isolamento e identificação poderão esclarecer os princípios ativos responsáveis pela ação biológica apresentada. Estes estudos poderão utilizar a extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom, visto que a técnica mostrou-se eficiente na extração rápida e rentável dos compostos de *A. brasiliiana*.

#### **CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DA *Alternanthera brasiliana* OBTIDOS POR DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA**

##### **RESUMO**

Plantas medicinais possuem uma grande variedade de compostos, entre os quais se destacam aqueles que apresentam potencial aplicação terapêutica. Contudo, a obtenção somente dos princípios ativos de interesse é dificultada pela complexidade da própria matriz vegetal. A otimização do método de extração em plantas medicinais pode proporcionar a obtenção de elevada quantidade de princípio ativo em menor tempo, com redução no consumo de reagente e maior preservação da composição química. Apesar dos relatos do promissor uso da dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para produção de extratos, nenhum estudo sistemático foi realizado visando empregar esta técnica com diferentes adsorventes e solventes para a determinação do teor de extrativos e composição química em *A. brasiliana*. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição química e atividade biológica de extratos produzidos pela técnica de DMFS com uso de diferentes solventes e adsorventes. Amostras de caule e folhas de *A. brasiliana* foram submetidas à extração por ultrassom com solventes de polaridade variada (hexano, acetato de etila, etanol 98% e etanol:água 70%). Os extratos foram secos e encaminhados aos ensaios biológicos pelo teste de difusão em disco e análises químicas por CG/EM. Os usos de diferentes adsorventes e eluentes permitiram extrair seletivamente os compostos da *A. brasiliana*. O uso do C<sub>18</sub> como adsorvente resultou em valores maiores de percentagens de extração para os quatro solventes quando comparado à utilização de sílica, em especial para hexano e acetato de etila, em que extraídas duas vezes mais. Foram detectados 71 compostos nos extratos de *A. brasiliana*, sendo que o extrato hexânico resultou em 26 para a extração com o adsorvente C<sub>18</sub> e 40 para extração com sílica. Os compostos identificados podem ser agrupados em cinco classes principais de acordo com as estruturas químicas (ácido carboxílico, carboidratos, esteróis, hidrocarbonetos e alcoóis). Entre os compostos identificados no extrato hexânico os esteróis como  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foram mais abundantes o que corrobora outros trabalhos da literatura que além de descrevê-los como majoritários em extratos eluídos com hexano, foram também relacionados com o potencial biológico desenvolvido por estes extratos. Diante da necessidade de obtenção de novas fontes de substâncias antimicrobianas, compostos presentes nos extratos apolares de *A. brasiliana* deverão ser mais estudados. A extração por dispersão da matriz em fase sólida, diante do seu bom desempenho neste estudo, poderá contribuir para a obtenção destes compostos de forma rápida, com maior rendimento e pureza.

**Palavras-chave:** Dispersão da Matriz em Fase Sólida. Adsorventes. Solventes. Composição Química.



#### CHAPTER 4: CHARACTERIZATION OF CHEMICAL COMPOSITION OF THE EXTRACTS OF THE *Alternanthera brasiliensis* OBTAINED BY DISPERSION OF THE MATRIX IN SOLID PHASE

##### ABSTRACT

Medicinal plants have a large variety of compounds which include those that present potential therapeutic application. However, obtaining only of the active principles of interest is difficult by the complexity of the own matrix vegetation. The optimization of the extraction method in medicinal plants can provide the achievement of high amount of active principle in less time, with a reduction in reagent consumption and higher preservation of chemical composition. Despite of the reports of the promising use of the dispersion of the matrix solid phase (MSPD) for production of extracts, none systematic study was accomplished seeking employ this technique with different adsorbents and solvents for the determination of extractives content and chemical composition in *A. brasiliensis*. In this sense, this study aimed to evaluate the chemical composition and biological activity of extracts produced by the MSPD technique using different solvents and adsorbents. Samples of stems and leaves of *A. brasiliensis* were submitted to extraction by ultrasound with solvents of varying polarities (hexane, ethyl acetate, ethanol and 98% ethanol: water 70%). The extracts were dried and submitted to biological tests by disk diffusion test and chemical analysis by GC / MS. The use of different adsorbents and eluents allowed selectively extract the compounds *A. brasiliensis*. The use of C18 as adsorbent resulted in higher values for the percentage of extraction to the four solvents when compared to the use of silica, in particular for hexane and ethyl acetate which extracted twice more. 71 compounds were detected in extracts of *A. brasiliensis*, being the hexane extract resulted in 26 to the extraction with the adsorbent C18 and 40 to extraction with silica. The identified compounds can be grouped into five main classes according to the chemical structures (carboxylic acid, carbohydrates, sterols, hydrocarbons and alcohols). Among the compounds identified in the hexane extract of sterols as  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol were more abundant, which supports other literature studies which not only describe them as a majority in eluted extracts with hexane were also related to the biological potential developed by these extracts . Faced with the need to obtain new sources of antimicrobial substances, compounds present in the apolar extracts of *A. brasiliensis* should be studied further. The extraction of the dispersion of the matrix in solid phase, in front of its good performance in this study may contribute in obtaining these compounds in a quickly way, with higher yield and purity.

**Keywords:** Dispersion of the matrix on solid phase. Adsorbents. Solvents. Chemical composition.

## 1 INTRODUÇÃO

*Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) é uma planta medicinal utilizada no tratamento de inflamações, dores e processos infecciosos (GUERRA *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004; JANDREY; ONOFRE, 2009). Extratos polares desta planta têm revelado a presença de carboidratos e pigmentos da classe das betalaínas (SILVA *et al.*, 2005, GASPARETTO *et al.*, 2010). Já os extratos lipofílicos têm apresentado quantidades significativas de ácidos e ésteres graxos, esteróis, alcoóis graxos e hidrocarbonetos (PEREIRA, 2007).

Plantas medicinais possuem uma grande variedade de compostos entre os quais se destacam aqueles que apresentam potencial aplicação terapêutica (CROTEAU *et al.*, 2000; RAO; RAVICHANKAR, 2002; NEWMAN; CRAGG, 2010). Contudo, a obtenção somente dos princípios ativos de interesse é dificultada pela complexidade da própria matriz vegetal (STARMANS; NIJHUI, 1996). Por esta razão diversos estudos de extração são realizados com o intuito de que sejam obtidos os metabólitos desejados em maior qualidade e quantidade. Para tanto, técnicas convencionais de extração são comparadas a metodologias modernas como extração sólido-líquida utilizando-se ultrassom e a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) (XIAO *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2009; JADHAV *et al.*, 2009; BIMAKRA *et al.*, 2011).

A dispersão da matriz em fase sólida baseia-se na fricção entre o material vegetal e um adsorvente (sílica, C<sub>18</sub>, etc.), resultando no rompimento da parede celular e exposição das substâncias que serão extraídas com a eluição de um solvente (BARKER, 2007). A dispersão da matriz em fase sólida é utilizada no estudo de contaminantes orgânicos em diversas matrizes ambientais (BING *et al.*, 2005; PENA *et al.*, 2008), sendo descrita como uma técnica flexível, já que pode-se variar adsorvente e solvente de acordo com as características dos compostos de interesse, além de ser de rápida reprodução e economia visto que são gastos pequenas quantidades de solvente, amostra e adsorvente. Apesar destas vantagens, são raros os trabalhos que descrevem o uso para extração de ativos em plantas

medicinais (CAPRIOTTI *et al.* 2010). Metabólitos vegetais da classe dos ácidos fenólicos (ZIAKOVÁ *et al.*, 2003) e isoflavonóides (VISNEVSCHINECRASOVA *et al.*, 2009), por exemplo, já foram extraídos com sucesso por meio desta técnica.

Apesar dos relatos de ação medicinal de *A. brasiliiana* e do promissor uso da DMFS para produção de extratos, nenhum estudo sistemático foi realizado visando empregar a dispersão da matriz em fase sólida com diferentes adsorventes e solventes para a determinação do teor de extrativos e composição química em *A. brasiliiana*. A otimização deste método no estudo de plantas medicinais pode proporcionar a obtenção de elevada quantidade de princípio ativo em menor tempo, com redução no consumo de reagente e maior preservação da composição química. Por conseguinte, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição química e atividade biológica de extratos produzidos pela técnica de DMFS com uso de diferentes solventes e adsorventes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação do material vegetal

Caules e folhas de *A. brasiliiana* foram coletados em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. O material foi lavado em água corrente, seco em temperatura ambiente por cinco dias e pulverizado em moinho de mesa (Tecnal).

Exsicatas foram confeccionadas e identificadas pelo especialista em *Alternanthera*, professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ) e depositadas no Herbário Montes Claros da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) sobre o número de registro 2405.

### 2.2 Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS)

Aproximadamente 1,000 g do material vegetal (caule e folha) foi triturado com 0,500 g de adsorvente (sílica ou octadecil - C<sub>18</sub>). A mistura obtida foi eluída com 30,00 mL de solvente (6 x 5,00 mL) em coluna de vidro, com fluxo de 0,5 mL/min.<sup>-1</sup>. Em seguida, as frações foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C e a massa do resíduo obtida foi determinada. Foram utilizados quatro eluentes (hexano, acetato de etila, etanol 98 % v/v e a mistura etanol:água 70:30 v/v). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

### 2.3 Análise química

#### 2.3.1 Derivatização

Alíquota (2,000 mg) do extrato foi adicionada em frasco de vidro para microrreação e, em seguida, solubilizado em 60 µL de piridina e 100 µL de BSTFA ((N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) contendo 1% de clorotrimetilsilano. A mistura reacional foi aquecida a 70 °C por 30 min. Da solução obtida, apenas 1 µL foi injetado no CG-EM, sendo o procedimento realizado em triplicata.

### 2.3.2 Análise por CG-EM

As análises foram realizadas no aparelho GC-MS PQ5050A da marca Shimadzu, utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25  $\mu\text{m}$  e hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas foram as seguintes: a temperatura do injetor foi de 290 °C iniciando com 80 °C por 5 minutos, aumentando de 80 °C a 290 °C na razão de 4 °C/min<sup>-1</sup>. A temperatura final permaneceu em 290 °C por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema CG-EM foi de 290 °C (Michielin *et al.*, 2009; Silvestre *et al.*, 1999). O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas de 30 a 600  $m/z$ .

A identificação dos componentes dos extratos foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho (Wiley 330.000) e com dados da literatura.

### 2.4 Ensaio biológico

Parte dos extratos obtidos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração igual a 75 mg mL<sup>-1</sup>. O teste de inibição do crescimento bacteriano foi realizado com as cepas padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). O ensaio de difusão do extrato em disco seguiu a Norma M2-A8 do NCCLS (2003). As suspensões dos micro-organismos de testes foram preparadas em solução salina NaCl 0,98% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 (108 UFC/mL) segundo NCCLS (2003). Os micro-organismos foram inoculados com auxílio de *swab* estéril em placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton. Foram utilizados discos Blank estéreis de 6 mm de diâmetro, embebidos com 10  $\mu\text{L}$  de amostra. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Após a incubação, foram mensurados os halos de inibição formados em torno dos discos. As culturas bacterianas que apresentaram halos iguais ou maiores que 7 mm foram consideradas suscetíveis aos extratos utilizados.

Discos de cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ) foram utilizados como controle positivo para *S. aureus*, *S. faecalis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. flexneri*. Para *P. aeruginosa*, foram utilizados discos de tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ). Para o controle negativo foram utilizados discos estéreis impregnados com 10  $\mu\text{L}$  de DMSO.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS)

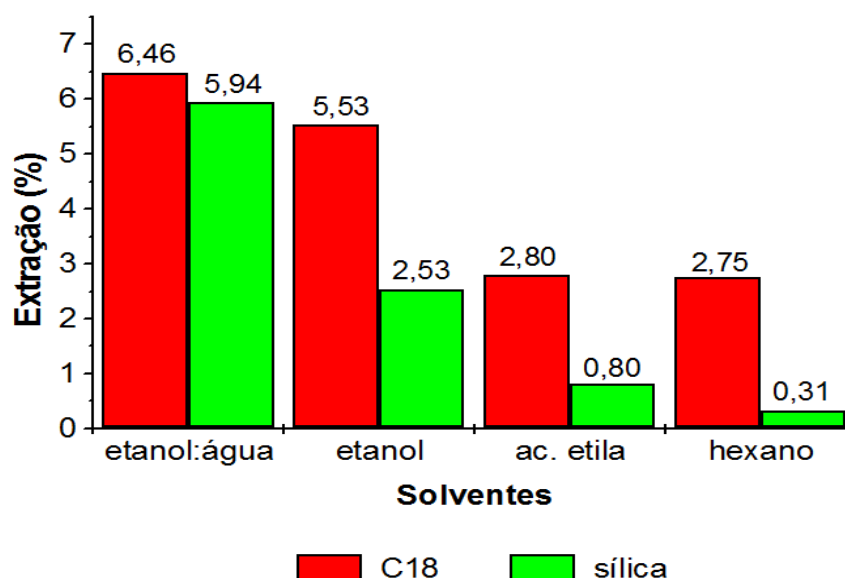
Neste trabalho, a Dispersão da Matriz em Fase sólida foi avaliada como uma técnica de extração de princípios ativos de *A. brasiliiana*. Os usos de diferentes adsorventes e eluentes permitiram extrair seletivamente os compostos da *A. brasiliiana*. Isso pode ser observado a princípio pela coloração dos extratos (Figura 1) no qual hexano, acetato de etila, etanol 98% (v/v) e etanol:água 70:30 v/v apresentaram coloração amarela, verde-escuro, verde-claro e vermelha respectivamente.



**FIGURA 1** – Coloração dos extratos de *A. brasiliiana* produzidos por Dispersão da Matriz em Fase Sólida. Amarelo: extrato hexânico, verde-escuro: acetato de etila, verde-claro: etanol 98% e vermelho: etanol:água 70% v/v.

Fonte: arquivo pessoal.

As percentagens de extração obtidas variaram com o uso de diferentes solventes e adsorventes na produção de extratos de *A. brasiliiana* tal como exposto na Gráfico 1.



**GRÁFICO 1** - Percentagens de extração da *A. brasiliana* obtidos em quatro solventes e dois adsorventes na DMFS.

O uso do C<sub>18</sub> como adsorvente resultou em valores maiores de percentagens de extração para os quatro solventes quando comparado à utilização de sílica (Gráfico 1). Verificou-se que o crescimento mais significativo (aproximadamente oito vezes) ocorreu utilizando o hexano como solvente. O acetato de etila também mostrou um aumento de 245% m/m no teor de extrativos utilizando o C<sub>18</sub>. Esses resultados sugerem a DMFS com uso de C<sub>18</sub> e hexano como uma alternativa importante na extração de compostos lipofílicos de *A. brasiliana* que, neste estudo, foi apontada como a fração detentora dos princípios ativos com ação antimicrobiana.

Barker (2007) ressalta a importância do tipo de adsorvente e a polaridade do solvente como sendo os mais importantes fatores na extração por DMFS uma vez que ambos estão relacionados com a eficácia e pureza dos compostos extraídos. Visnevschi-Necrasova *et al.* (2009) ratificou esta afirmação quando avaliou o poder de recuperação de amostras padrões de flavonóides com o uso de diferentes solvente e adsorventes em que C<sub>18</sub> e metanol:diclorometano foram as condições estabelecidas para extração dos compostos flavônicos com maior rendimento. Além disso, a possibilidade de



adequação do adsorvente e solvente na técnica torna possível a extração de compostos seletivamente, característica esta que permite dizer que a DMFS atua como *clean up*, pois os compostos interferentes ficam retidos no adsorvente, facilitando o estudo de isolamento de princípios ativos de interesse (CAPRIOTTI *et al.*, 2010).

A utilização do material vegetal "*in natura*", sem aquecimento e com rápida extração (aproximadamente 1 hora), foram outras vantagens que a técnica possui e que podem ter contribuído para os valores de rendimentos obtidos. Já que todos estes fatores podem degradar os princípios ativos presentes no vegetal (STAFFORD *et al.*, 2005; SPIGNO *et al.*, 2007). Devido ao rendimento, pureza e preservação da composição química dos extratos produzidos que a DMFS é descrita como uma opção promissora no preparo de amostras para estudos com cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear como uma eficiente combinação no estudo químico de extratos vegetais (SANDVOSS *et al.*, 2001).

### 3.2 Composição química

Os extratos obtidos pelo método de dispersão da matriz em fase sólida utilizando sílica e C<sub>18</sub> foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Todos os compostos identificados encontram-se descritos na Tabela 1.

TABELA 1

Constituintes químicos identificados nos extratos de *A. brasiliiana* em quatro solventes obtidos através da extração por DMFS. Os números referem-se aos picos do cromatograma da Figura 2

Nº	TR*	Área Relativa (%)								Identificação
		Hexano		Acetato de etila		Etanol		Etanol:água		
		C18	Sílica	C18	Sílica	C18	Sílica	C18	Sílica	
1	8,04		0,16		1,22					ácido propanóico
2	8,12		0,07		0,36	0,11	1,86	7,6	6,5	ácido etanodióico
3	9,68			3,33						n.i.
4	10,53		0,1		1,18					ácido butanóico
5	11,56							1,54		n.i.
6	12,11		1,48							dietileno glicol
7	13,39	1,94	4,55	5,12	0,47	1,23	3,27	10,9	48,77	Glicerol
8	14,50	0,42		0,36		1,45				ácido butanodióico
9	15,40			0,48	11,91	1,25		3,88	0,5	ácido 2,3-diidroxipropanóico
10	16,36			2,04						n.i.
11	16,61			1,31	1,02	0,42				3,4-diidroxifuranose
12	20,74					1,04		5,24		ácido hidroxibutanodióico
13	21,38					1,34		0,25		ácido piroglutâmico
14	23,42		0,14		1					hexadecano

15	23,95							1,54		ácido 2,3-diidroxisucínico
16	24,91					0,08		1,23		Trietanoamina
17	25,25		0,02	1,12	1,09	0,57		0,32		Manose
18	26,07		1,78							n.i.
19	26,24	2,51								n.i.
20	27,04			1,63		0,76		0,49		D-xilopiranoze
21	28,03					0,08	0,4	4,13	5,62	Arabitol
22	29,00	0,79				0,14	1,07	2,88		carboidrato n.i.
23	30,33		1,62	1,07		1,48	0,59	0,4		carboidrato n.i.
24	30,58		0,19	0,59		4,48	2,89	0,44		D-frutose
25	32,58		0,43	1,22		4,78	3,08	0,86	0,41	D-galactose
26	32,87				1,36	0,11		0,41		carboidrato n.i.
27	33,13		0,17			0,13		1,19		ácido pentadecanóico
28	33,64							24,67	17,02	D-glucitol
29	35,02		0,2	1,14		6,17	3,91	1,63	0,74	D-glicopiranoze
30	35,58	7,27	11,64	7,55		6,16	24,39	1,66	7,87	ácido hexadecanóico
31	36,03		0,12			0,6	0,35	5,11	1,22	Inositol
32	38,01	3,32	2,41	1,52	11,84	0,47	2,93	0,43	0,56	octadecan-1-ol
33	38,67	2,42		2,03		3,03				Fitol
34	39,06	2,64	1,86	0,91		0,33	1,61	0,28	0,33	Octadecano

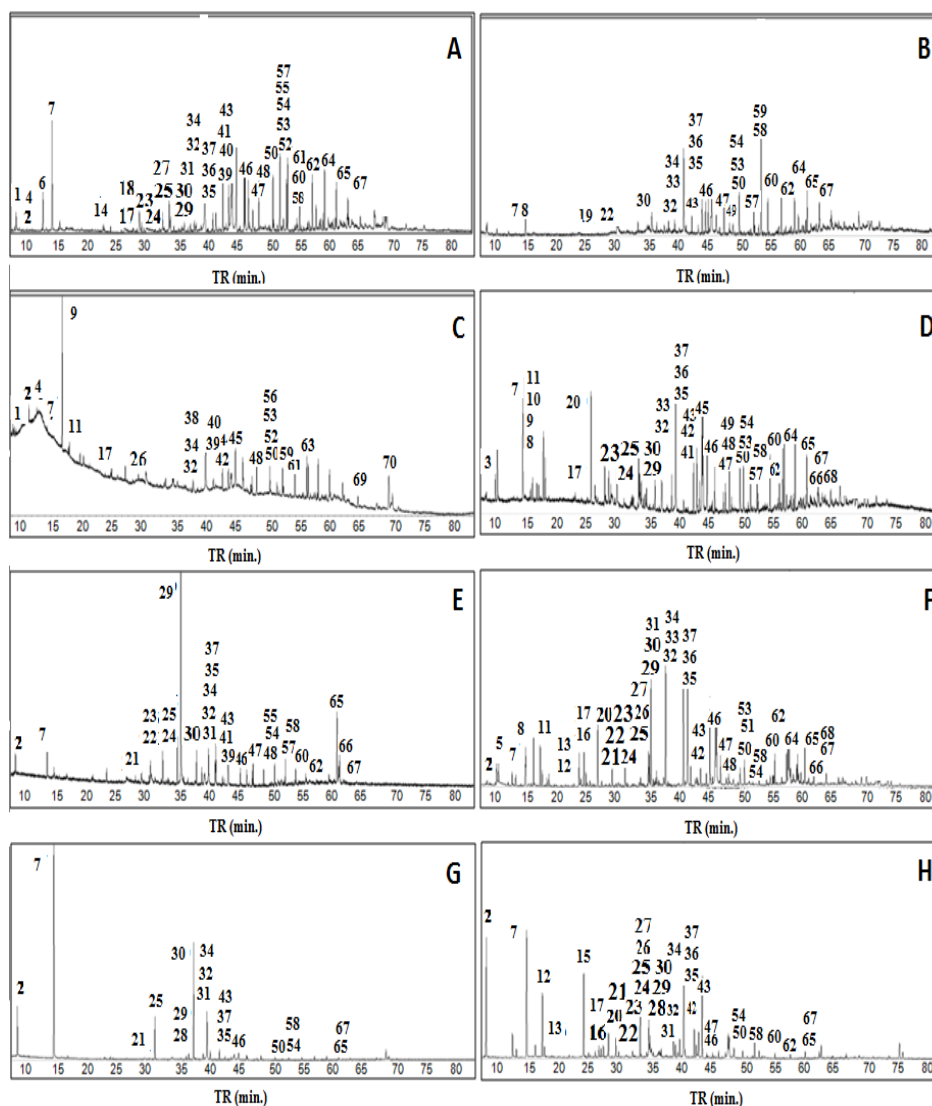
35	39,4	1,83	3,39	3,71		6,43		1,51		ácido (9Z,12Z) octadeca-9,12-dienóico
36	39,52	4,89	4,67	5,54		7,38	2,84	1,95	1,11	ácido (9Z)-octadec-9-enóico
37	40,14	1,67	6,18	2,43		1,18	3,59	0,56	0,98	ácido octadecanóico
38	40,62					2,94				n.i.
39	41,50		2,61			2,03	4,42			tricosano
40	41,89		2,0			1,34				n.i.
41	42,53		0,95	1,23			0,72			eicosan-1-ol
42	42,81			0,89	4	0,71		2,87		carboidrato n.i.
43	43,39	3,73	2,65	1,75		0,95	7,94	0,45	0,49	pentacosano
44	43,77					3,17				n.i.
45	45,21			1,57	1,4					carboidrato n.i.
46	45,43	3,19	1,89	1,49		0,27	1,59	0,32	0,33	octacosano
47	47,40	2,65	1,61	1,6		0,31	1,19	0,26		7-exileicosano
48	47,58		2,31	0,47	2,6	1,02	1,79			ácido 2,3-diidroxiexadecanóico
49	49,00	1,21		1,32						n.i.
50	49,32	2,72	1,68	1,76	1,48	3,08		0,49	0,39	Hidrocarboneto n.i.
51	49,59					12,09				sacarose
52	49,94		0,12			2,57				hidrocarboneto n.i.
53	50,68	0,48	0,4	0,7	1,00	1,45				ácido carboxílico n.i.
54	51,15	2,75	2,09	2,82		0,59	1,72	0,41	0,5	triacontano

55	51,68	1,24				1,57				Farnesol
56	51,87					2,82				hidrocarboneto n.i.
57	52,73	1,04	0,57	0,58		0,12				eneicosilciclopentano
58	52,92	3,47	2,33	2,55		0,48	2,18	0,43	0,46	pentatriacontano
59	53,93		0,25			3,42				11,1-etilpropileneicosano
60	54,63	2,92	2,11	2,21		0,58	0,73	0,19		hexatriacontano
61	55,42		0,1			4,53				tetratetracontano
62	56,29	1,57	1,04	1,29		0,26	0,7	0,13		11-ciclopentileneicosano
63	57,25					3,24				n.i.
64	60,14	2,11	0,87	2,88		1,04				Estigmasterol
65	61,49	10,91	6,08	12,33		3,42	10,15	1,6	2,25	$\beta$ -sitosterol
66	61,78			0,94		0,57	2,53			$\beta$ -sitostanol
67	61,92	3,89	2,89	4,01		0,78	4,6	0,6	0,54	esterol n.i.
68	63,06			1,49		1,17				esterol n.i.
69	66,43					6,79				esterol n.i.
70	67,00					2,23				esterol n.i.

---

\*n.i. não identificados; TR – tempo de retenção.

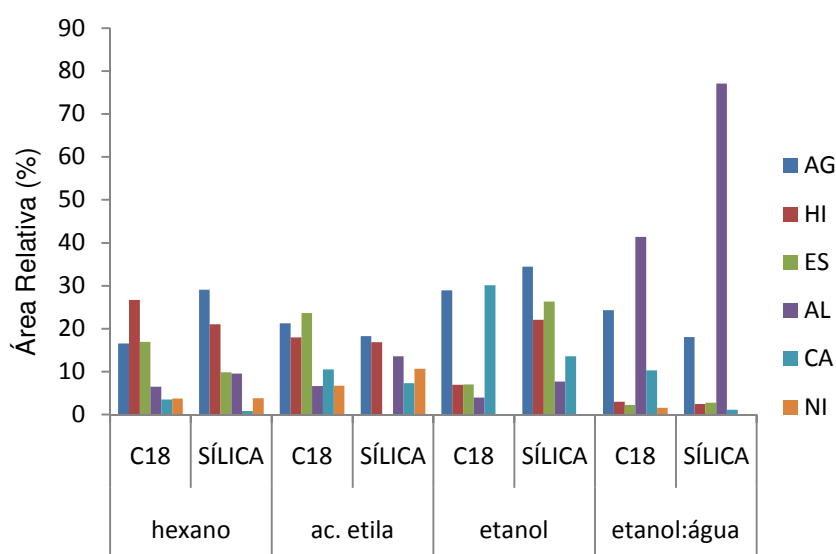
Foram detectados 70 compostos nos extratos de *A. brasiliiana*, sendo que o extrato hexânico resultou em 26 para a extração com o adsorvente C<sub>18</sub> e 40 para extração com sílica. Os compostos identificados podem ser agrupados em cinco classes principais de acordo com as estruturas químicas (ácido carboxílico, carboidratos, esteróis, hidrocarbonetos e alcoóis). Entre estas classes são frequentemente citados na composição química de Amaranthaceas os esteróis, como em estudos realizados com *A. brasiliiana* e *A. marítima* em que nesta última foi descrita também a presença de saponinas, ácidos carboxílicos (ácido vanílico e palmítico) e flavonóides aglicônicos (SALVADOR *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2004; PEREIRA, 2007). Na Figura 3 é apresentado o cromatograma obtido para os extratos de *A. brasiliiana* para os adsorventes sílica e C<sub>18</sub>. Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 1.



**FIGURA 2** – Cromatograma de íons totais dos extratos da *A. brasiliensis* obtidos por Dispersão da Matriz em Fase Sólida utilizando sílica e C18 como adsorvente. A: hexano (sílica); B: Hexano (C18); C: acetato de etila (sílica); D: acetato de etila (C18); E: etanol 98% (sílica); F: etanol (C18); G: etanol 70% (v/v) (sílica) e H: etanol 70% (v/v) (C18). Os números referem-se aos compostos identificados na Tabela 2. TR: tempo de retenção.

Os extratos hidrofílicos apresentaram percentagem elevada de carboidratos com o emprego de C18 como adsorvente quando comparado ao

uso de sílica (Gráfico 2). Este resultado pode ser explicado pelas características estruturais do C18 o qual se trata de uma sílica modificada com radicais octadecil (18 carbonos) que lhe conferem caráter apolar em relação à sílica normal (LANÇAS, 2004). Assim, compostos mais polares como carboidratos foram facilmente eluídos do adsorvente por solventes como etanol e etanol:água 70%v/v devido a maior afinidade com estes eluentes. Este fato também explica a menor representação de compostos como esteróis e hidrocarbonetos nestes extratos que comparados ao extrato hexânico.



**GRÁFICO 2** - Principais classes de compostos presentes nos extratos de *A. brasiliiana* produzido com quatro solventes (hexano, acetato de etila, etanol e etanol:água 70% v/v) e dois adsorventes (sílica e C18). CA: carboidratos, AG: ácidos graxos, AL: alcoóis, HI: hidrocarbonetos, ES: esteróides e NI: não identificados.

Os ácidos graxos foram os compostos presentes nos extratos hexânicos de *A. brasiliiana*. Entre esses, destacam-se o ácido octadecanóico, ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienóico (ácido linoléico) e ácido (9Z)-octadec-9-enóico (ácido oléico) encontrado em quase todos os extratos. Outros ácidos graxos também identificados foram os ácidos pentadecanóico, hexadecanóico e octadecanóico. Ácidos graxos de cadeia curta e



hidroxilados, como o ácido butanodióico, etanodióico, 2,3-diidroxiopropanóico e hidroxibutanodióico foram detectados nos extratos polares (etanol:água 70:30 e etanol 98 % v/v). A presença de ácidos graxos em *alternatheras* foi observada também em trabalho realizado com sementes de *A. triandra* que foram descritas como fonte de ácido ricinoléico com percentagem equivalente a 22% do rendimento total e também dos ácidos (9Z)-octadec-9-enóico (oléico) e ácido (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienóico (linoléico) com percentagens iguais a 26 e 25,2% respectivamente (HOSAMANI *et al.*, 2004).

Os esteróis foram identificados em todos os extratos, em especial o  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol encontrados em maior quantidade. Os esteróis são compostos abundantes em espécies da família Amaranthaceae (PATERSSON *et al.*, 1991). Em triagem fitoquímica prévia realizada por Souza *et al.* (1998) o  $\beta$ -sitosterol foi descrito como o composto majoritário nas frações hexânicas. Este resultado corrobora os obtidos neste estudo em que os esteróis, em geral, representam 13,02% e 6,95 da área total dos extratos hexânicos que utilizaram C18 e sílica respectivamente. Esteróis como o  $\beta$ -sitosterol são descritos por desenvolver significativo efeito de analgesia (JU *et al.*, 2004) bem como ação biológica contra *S. aureus* (VIRTUOSO, *et al.*, 2005). Pereira (2007) realizou trabalho de triagem dos princípios ativos de *A. brasiliiana* com intuito de isolar os compostos com ação antimicrobiana de modo que, ao fim, foi encontrada uma mistura de esteróis representados principalmente por  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e espimasterol. Diante do potencial farmacológico dos esteróis, variações em sua obtenção devem ser consideradas deste modo, o tipo de adsovente utilizado deve ser avaliado já que com o uso de C18 foi possível se obter um teor maior de esteróis que ao se utilizar a sílica para os extratos eluídos com hexano (Gráfico 2).

Alcoóis estiveram presentes nos extratos em destaque ao extrato hidroalcolico com maior fração total dentre os extratos analisados por CG-EM (Tabela 1) como exemplo os álcoois octadecan-1-ol, eicosan-1-ol que foram identificados através do perfil de fragmentação destes compostos e de dados da literatura (SILVÉRIO, 2008) em que o octadecan-1-ol esteve presente em todos os extratos. O álcool fitol foi identificado somente nos

extratos eluídos com hexano, acetato de etila e etanol e extraídos com sílica. Este resultado reafirma a importância dos tipos de adsorventes e solventes utilizados na obtenção seletiva de compostos. O fitol é parte integrante da molécula de clorofila e pode ser responsável por efeitos biológicos, como atividade termogênica e antimicrobiana (RAJAB *et al.*, 1998; LANFER-MARQUEZ, 2003).

A completa identificação de alguns carboidratos não foi possível devido ao perfil de fragmentação semelhante de seus isômeros. Entre os carboidratos identificados e mais abundantes encontra-se a sacarose. Apenas dezessete compostos não foram identificados já que os seus espectros de massas não são característicos a nenhuma das classes de substâncias estudadas neste trabalho. Deste modo, estes compostos serão objetivos de estudos futuros visto que podem ser fontes de novas substâncias.

### 3.3 Atividade Biológica

É cada vez maior o número de micro-organismos que apresentam resistência aos antibióticos usados rotineiramente (TACCONELLI *et al.*, 2008), e uma alternativa valorizada é a busca de substâncias antibióticas em fontes naturais onde os compostos apresentam estruturas químicas diversificadas e, portanto diferentes daquelas que os micro-organismos resistentes já conhecem (RÍOS; RECIO, 2005). A partir desta ideia, seis diferentes espécies (cepas padrão) de bactérias patogênicas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos extratos de *A. brasiliensis*, obtidos com o uso de diferentes solventes e adsorventes. Os resultados obtidos no ensaio biológico encontram-se expostos na Tabela 1.

TABELA 2

Diâmetros dos halos de inibição, em centímetro, de extratos de *A. brasiliiana* produzidos pela extração por Dispersão da Matriz em Fase Sólida sobre seis micro-organismos.

Cepas	(-)*	(+)**	Hexano		Ac. etila		Etanol		Etanol:água	
			Sílica	C18	Sílica	C18	Sílica	C18	Sílica	C18
<i>S. aureus</i>	-	2,3	0,7	0,8	-	-	-	-	-	-
<i>S. faecalis</i>	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Dimetilssulfóxido (DMSO).

\*\* Cloranfenicol para *S. aureus* e *S. faecalis*; Tetraciclina para *P. aeruginosa*.

*S. aureus* apresentou sensibilidade aos extratos hexânicos de *A. brasiliiana* extraídos com sílica e C18 com halos de inibição de crescimento bacteriano inferiores a 1 cm a partir de extratos com concentração igual a 75mg/mL. Já os outros extratos não apresentaram atividade frente a *S. aureus* e as outras cinco espécies. Resultados superiores foram obtidos por Salvador *et al* (2004) demonstrando que extratos hexânico de partes áreas de *A. maritima* em concentração de 5mg/mL determinaram halos com 10mm de diâmetro para *S. aureus*. Já Pereira (2007), descreveu o valor 1250µg/mL como concentração inibitória mínima de extratos apolares de partes aéreas de *A. brasiliiana* contra *S. aureus*, porém as metodologias utilizadas por estes dois últimos autores (microdiluição em caldo) diferem-se daquela utilizada neste estudo (difusão em agar por discos). Caetano *et al.* (2002) utilizando a técnica de difusão em agar por discos, testaram a atividade antimicrobiana de extratos bruto de *A. brasiliiana* frente à cepas de *S. aureus* evidenciando resultados positivos em uma concentração de 65mg/mL comparáveis ao controle positivo (cloridrato de tetraciclina 10mg). Esta concentração do extrato é próxima ao valor utilizado neste estudo, contudo os autores citados obtiveram maiores halos de inibição. Entre os diversos fatores que podem explicar os menores resultados obtidos estão as variações na produção de

compostos por *A. brasiliiana*, de acordo com as condições de cultivo tal como descrito por Silva *et al.* (2005) e Macedo *et al.*, 2004 que descrevem variações na composição química de acordo com a incidência de radiação ultravioleta ou espectros de luz ou por diferentes doses hormonais.

Entre os compostos presentes nos extratos hexânicos de *A. brasiliiana* no presente estudo, os esteróis são os compostos que apresentaram atividade biológica já descrita por outros autores. Salvador *et al.* (2004), por exemplo, no mesmo estudo da atividade antimicrobiana de extratos de *A. marítima*, avaliou os compostos que poderiam estar envolvidos na bioatividade desenvolvida descrevendo os esteróis, saponinas e flavonóides com ação antimicrobiana considerável. Silveira e Olea (2009) também descreveram uma mistura de esteróis como o componente principal de frações ativas contra micro-organismos para extratos de *A. tenella colla*.

A importância da atividade biológica desenvolvida por estes extratos está principalmente relacionada à necessidade de obtenção de novas fontes de substâncias antimicrobianas, visto que no Brasil acima de 80% de isolados da bactéria patogênica *S. aureus* de pacientes hospitalizados e 70% de isolados de pacientes na comunidade apresentam resistência às penicilinas convencionais (GALES *et al.*, 2009). Sendo também que a resistência deste micro-organismo aos antibióticos é amplamente difundida em todo o mundo (TAVARES, 2000; DERESINSKI, 2005).

Os diferentes tipos de adsorventes utilizados não interferiram na atividade biológica desenvolvida pelos extratos hexânicos, corroborando as identificações químicas em que os dois extratos demonstraram composições químicas semelhantes. Entretanto apresentaram rendimentos de extrações distintos, apesar disso os valores de halos de inibição obtidos foram próximos e, por isso, testes de isolamento dos compostos bioativos deste extrato e de concentração inibitória mínima serão os próximos passos para relacionar a bioatividade obtida ao teor do ativo.

#### 4 CONCLUSÃO

A técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida foi eficiente na obtenção de compostos de *A. brasiliensis*, em especial com o uso de C18 como adsorvente, já que possibilitou maior rendimento do extrato hexânico quando comparado ao uso de sílica. A importância deste resultado relaciona-se à atividade biológica contra *S. aureus* desenvolvida por este extrato. Os compostos identificados nos extratos de *A. brasiliensis* são pertencentes a cinco principais classes (ácido carboxílico, carboidratos, esteróis, hidrocarbonetos e alcoóis) de modo que os ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos e esteróis foram mais presentes nos extratos hexânicos, ao passo que álcoois e carboidratos foram abundantes nos extratos alcoólicos e hidroalcoólicos respectivamente. Este resultado demonstra a influência do tipo de solvente sobre a composição química do extrato. Os adsorventes sílica e C18 interferiram principalmente no teor de compostos obtidos, tal como observado na extração de esteróis de maneira que o primeiro extraiu praticamente a metade do valor extraído pelo segundo. Estas diferenças foram relacionadas com as características de polaridade entre estes dois adsorventes e dos solventes utilizados, favorecendo uma maior ou menor eluição dos compostos de acordo com a afinidade pelo eluente ou adsorvente. Entre os compostos identificados no extrato hexânico os esteróis como  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foram mais abundantes, ratificando outros trabalhos da literatura que, além de descrevê-los como majoritários em extratos eluídos com hexano, foram também relacionados com o potencial biológico desenvolvido por estes extratos. Diante da necessidade de obtenção de novas fontes de substâncias antimicrobianas, compostos presentes nos extratos apolares de *A. brasiliensis* deverão ser mais estudados. A extração por dispersão da matriz em fase sólida, diante do seu bom desempenho neste estudo, poderá contribuir na obtenção destes compostos de forma rápida, com maior rendimento e pureza uma vez que se trata de uma técnica que, entre outras vantagens, utiliza menor quantidade de amostra, solventes e atua como “Clean up”. Além disso, com a possibilidade de variação de solvente e adsorvente torna-se possível também a extração

mais seletiva dos compostos de interesse, eliminando-se, dessa forma, os interferentes fazendo com que o estudo dos princípios ativos seja menos oneroso.

**REFERÊNCIAS**

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Brazilian Journal of Vascular**, v. 3, n. 2, p. 145-54. 2004.

ARAÚJO, D.; ONOFRE, S. B. Ação do extrato hidroalcoólico de *alternanthera brasiliiana* (L.) O. Kunt., (Amaranthaceae) sobre a atividade de antimicrobianos utilizados na terapêutica. **Revista Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p.1-8, jan./abr. 2011

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

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, no prelo, 2011.

ASTUDILLO-VÁZQUEZ, A.; VALLE, H. D.; JESÚS, L.; HERRERA, G.; NAVARRETE, A. Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. **Fitoterapia**, v. 79, p. 577-580. 2008.

BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A. A.; KAMARA, J. C.; GEETHA, K. Larvicidal activity of saponin from *Achyranthes aspera* against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 103, p. 223–229. 2008.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal Biochemical Biophysical Methods**, v. 70, p. 151–162. 2007.

BARROS, E. J. G.; BITTENCOURT, H.; BRUNSTEIN, C.; CARAMORI, M.; MACHADO, A. **Antimicrobianos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 428p.

BART, H. J. Extraction of natural products from plants: an introduction. *In: Industrial Scale Natural Products Extraction*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2011.

BARTRAM, S.; JUX, A.; GLEIXNER, G.; BOLAND, W. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1661-1672. 2006.

BARWICK, V. J. Strategies for solvent selection- a literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 293-309. 1997.

BEZERRA, A. M. E.; MEDEIROS-FILHO, S.; OLIVEIRA, L. D. M.; SILVEIRA, E. R. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura brasileira**, Vitória da Conquista, v. 26, p. 26-29. 2008.

BIELLA, C. A.; SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A.; DIAS-BARUFFI, M.; PEREIRA-CROTT, L. S. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n. 6, p. 569-577. 2008.

BIMAKRA, M.; RAHMANA, R. A.; TAIPA, F. S.; GANJLOOB, A.; SALLEHA, L. M.; SELAMATC, J.; HAMIDC, A.; ZAIDULC, I. S. M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioprocess Processing**, v. 89, p. 67-72, 2011.

BING, S.; YING-XIN, G.; HAO, H.; RONG, Z.; JUAN, M.; GUOHUA, Q. Determination of alkylphenol and bisphenol a in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **Huanjing Huaxue**, v. 24, p. 483-484. 2005.

BLACK, R. M.; MUIR, B. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 253-281. 2003.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT. **Acta Botânica Brasileira**, v. 4, p. 771-782. 2006.

BOYSEN, R. I.; HEARN, M. T. W. High performance liquid chromatographic separation methods. **Comprehensive Natural Products**, v. 2, p. 5-49. 2010.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p.15-19. 2002.

BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C.; KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 449-451. 2003.

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



CAPRIOTTI A. L.; CAVALIERE C.; GIANANTI P.; GUBBIOTTI R.; SAMPERI R.; LAGANA A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 2521–2532. 2010.

CARDOSO, M. G. **Fitoquímica e química de produtos naturais**. Lavras: Gráfica Universitária, 2001. 67p.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326–342. 2010.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105. 1998.

CHAN, E. W. C., LIM, Y. Y., WONG, S. K., LIM, K. K., TAN, S. P., LIANTO, F. S., YONG, M. Y. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**, v. 113, p. 166–172. 2009.

CHEW, K. K.; KHOO, M. Z.; NG, S. Y.; THOO, Y. Y.; WAN AIDA, W. M.; HO, C. W. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of orthosiphon stamineus extracts. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1427-1435. 2011.

CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 2, p. 217-225. 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 456 p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural products: secondary metabolites**, Rockville: Courier Companies Inc, 2000.

CUOCO, G.; MATHE, C.; ARCHIER, P.; MAËTAOUI, M. E.; VIEILLESZAZES, C. Cytological and phytochemical study of madder root extracts obtained by ultrasonic and classical extractions. **Phytochemical Analysis**, v. 20, p. 484-490. 2009.

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

DELAPORTE, R. H.; MILANEZE, M. A.; MELLO, J. C. P.; JACOMASSI, E. Estudo farmacognóstico das folhas de *alternanthera brasiliana* (L.) kuntze (Amaranthaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 169-174. 2002.

DERENGOWSKI, L. S.; DE-SOUZA-SILVA, C.; BRAZ, S. V.; MELLO-DE-SOUSA, T. M.; BÃO, S. N.; KYAW, C. M.; SILVA-PEREIRA, I. Antimicrobial effect of farnesol, a candida albicans quorum sensing molecule, on paracoccidioides brasiliensis growth and morphogenesis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 8-13. 2009.

DERESINSKI, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. **Clinical Infection Diseases**, v. 40, p. 562-73. 2005.

DEWULF, J.; LANGENHOVE, H. V.; WITTMANN, G. Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 637-646. 2002.

EISENREICH, W.; BACHER, A. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2799–2815. 2007.

FÁVERO, O. A.; PAVAN, S. **Botânica econômica**. São Paulo: Catálise, 1997, 175 p.

FIGUEREDO, S. M.; NASCIMENTO, F. P.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; BARROLA, M. C. C.; ARRUA, R. L. D.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. **Journal of Ethnopharmacology**, No prelo. 2011.

FILGUEIRAS, A. V.; CAPELO, J. L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 53, p. 433–441. 2000.

FROELICH, S.; GUPTA, M. P.; SIEMS, K.; JENETT-SIEMS, K. Phenylethanoid glycosides from *stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, p. 517-520. 2008.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.15, p.178-182, 2005.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A. C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the Sentry Program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90-98. 2009.

GARCIA, L. M. Z.; OLIVEIRA, T. F.; SOARES, P. K.; BRUNS, R. B.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design: principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, p. 1–7. 2010.

GASPARETTO, A.; LAPINSKI, T. F.; ZAMUNER, S. R.; KHOURI, S.; ALVES, L. P.; MUNIN, E.; SALVADOR, E. J. Extracts from *alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, v. 99, p. 15-20. 2010.

GIERONI, F., PIEMONTE, V. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree Wood. **Chemical Engineering Research and Design**, No prelo. 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 374-381. 2007.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1215-1219. 2003.

GUNADHARINI, D. N.; ELUMALAI, P.; ARUNKUMAR, R.; SENTHILKUMAR, K.; ARUNAKARAN, J. Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, No prelo. 2011.

HEMWIMOL, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 543–548. 2006.

HEUSKIN, S.; GODIN, B.; LEROY, P.; WATHELET, Q. C. J-P.; VERHEGGEN, F.; HAUBRUGE, E.; LOGNAY, G. Fast gas chromatography characterization of purified semiochemicals from essential oils of *matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *nepete cataria* L. (Lamiaceae). **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2768-2775. 2009.

HOSAMANI, K. M.; GANJIHAL, S. S.; CHAVADI, D. V. *Alternanthera triandra* seed oil: a moderate source of ricinoleic acid and its possible industrial utilization. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 133–136. 2004.

JABER-VAZDEKIS, N.; GUTIERREZ-NICOLÁS, F.; RAVELO, A. G.; ZÁRATE, R. Studies on tropane alkaloid extraction by volatile organic solvents: dichloromethane vs. chloroform. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 107–113. 2006.

JADHAV, D.; REKHA, B. N.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 421–426. 2009.

JANDREY, H. C. M.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *alternanthera brasiliana* (L.) o. kunt., (amaranthaceae) sobre bactérias patogênicas. **Biology & Health Journal**, v. 3, n. 1, p. 51-57. 2009.

JERMAN, T.; TREBŠE, P.; MOZETIC VODOPIVEC, B. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 123, p.175–182. 2010.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 632-637. 2007.

JUNIOR, I. F. S.; FILHO, V. C.; ZACCHINO, S. A.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 191, p. 242-248. 2009.

JU, Y. H.; CLAUSEN, L. M.; ALLRED, K. F.; ALMADA, A. L.; HELFERICH, W. G. Beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside and a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1145-1151. 2004.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 105-113. 2002.

KHADER, M., BRESGEN, N., ECKL, P. M. Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected Palestinian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 319–324. 2010.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGUER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 527p.

LAGROTA, M. H. C.; WIGG, M. D.; SANTOS, M. M. G.; MIRANDA, M. M. F. S.; CAMARA, F. P.; COUCEIRO, J. N. S. S.; COSTA, S. S. Inhibitory activity of extracts of *alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the herpes simplex virus. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 358-361. 1994.

LAI, P.; LI, K. Y.; LU, L.; CHEN, H. H. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. **Food Chemistry**, v. 117, p. 538–544. 2009.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; A. G., SILVA; LAMEIRA, A. P. N.; AMORIM, A. C. L.; LAMEIRA, C. N.; ALCÂNTARA, D. A.; OLIVEIRA, E. C. P.; PAIVA, J. S.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 294p.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96p.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira Ciência Farmacêutica**, Curitiba, v.39, n.3, 2003.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of food Engineering**, v. 71, p. 214-222. 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: Rima, 2000. 531p.

LEONTI, M.; STICHER, O.; HEINRICH, M. Antiquity of medicinal plant usage in two macro-mayan ethnic groups (México). **Journal of ethnopharmacology**, v. 88, p. 119-124. 2003.

LOBO, A. N.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: Editora IST Press, 2007. 272p.

MACEDO, A. F.; LAGE, C. L.; ESQUIBEL, M. A.; SOUZA, M. M.; SILVA, K. L.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *alternanthera brasiliensis* cultured under different spectral quality of lights. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 515-519. 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3. 2002.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-496. 2007.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462p.

MIRON, T. L.; PLAZA, M.; BAHRIM, G.; IBÁÑEZ, E.; HERRERO, M. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of romanian aromatic plants. **Journal of Chromatography A**, No prelo. 2010.

MONSÁLVEZ, M.; ZAPATA, N.; VARGAS, M.; BERTI, M.; BITTNER, M.; HERNÁNDEZ V. Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of *drimys winteri* bark against take-all disease. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 239–244. 2010.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para saúde. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Curitiba, v. 38, n. 4, p. 401-413. 2002.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256. 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada. 8. ed. 2003. 58p.

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

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334. 2003.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p.8–35. 2009.

OKOLI, C. O.; AKAH, P. A.; NWAFOR, S. V.; ANISIOBI, A. I.; IBEGBUNAM, I. N.; EROJIKWE, O. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 219–225. 2007.

ORHAN, I.; DELIORMAN-ORHAN, D.; ÖZÇELİK, B. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. **Food Chemistry**, v. 115, p. 701–705. 2009.

PATTERSON, G. W.; SIHUA, X.; SALT, T. A. Sterols of Caryophyllales with emphasis on Amaranthaceae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 523-526. 1991.

PENA, M. T.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, p. 155–165. 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. S.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial

activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases: isolation of active compounds from *sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 37-40. 2001.

PEREIRA, D. F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *alternanthera brasiliensis* L. kuntze e *alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik**: estudo fitoquímico e biológico de *alternanthera brasiliensis*. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PEREIRA, D. F.; ZANON, R. B.; ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; ATHAYDE, M. L. Morfo-anatomia das Folhas de *alternanthera brasiliensis* e *alternanthera dentata* (Amaranthaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 178-84. 2008.

PEREIRA, A. S.; CARBONELL, S. A.; AQUINO, F. R.; NETO, A. M.; AMARAL, A. C. F.; BARNES, R. A. Hightemperature gas chromatography–mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 255–265. 2000.

PEREIRA, A. S.; NETO, F. R. A. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química nova**, São Paulo, v. 23, p. 370-379. 2000.

PÉRES, V. F.; SAFFI, J.; INÊS, M.; MELECCHI, S.; ABAD, F. C.; JACQUES, R. A.; MARTINEZ, M.; OLIVEIRA, E. C.; CARAMÃO, E. B. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes: fatty acids and vitamin e from *piper gaudichaudianum* kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, p. 115–118. 2006.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais atualidades desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 45-61. 2002.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6076–6082. 2009.

RAJAB, M. S.; CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, I. H. Antimycobacterial activity of (*E*)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. **Planta Med**, v. 64, n.1, p. 2-4. 1998.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101–153. 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613. 2001.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day. **American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 43-49. 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–84. 2005.

ROCHA, F. F.; NEVES, E. M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE, F. A. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, p. 344-349. 2008.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região ao Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciências Agrotécnicas**, v. 25, p. 102-123. 2001.

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

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 adult plants extracts from *alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 131-136. 2003.

SANDVOSS, M.; WELTRING, A.; PREISS, A.; LEVSEN, K.; WUENSCH, G. Combination of matrix solid-phase dispersion extraction and direct on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy–tandem mass spectrometry as a new efficient approach for the rapid screening of natural products: application to the total asterosaponin fraction of the starfish *asterias rubens*. **Journal of Chromatography A**, v. 917, p. 75–86. 2001.

SANGIOVANNI, J. P.; CHEW, E. Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Retinal and Eye Research**, v. 24, p. 87-138. 2005.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; TURATTI, I. C. C.; ZUCCHI, O. L. A. D.; DIAS, D. A. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *chresta* spp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 415–421. 2004.

SCHINTZLER, P. NOLKEMPERA, S.; STINTZINGC, F. C. REICHLING, J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. **Phytomedicine**, v. 15, p. 62–70. 2008.



SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Trans-aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, p. 149-154. 2007.

SHUKLA, S.; MEHTA, A.; BAJPAI, V. K.; SHUKLA, S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2338-2343. 2009.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA JR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn: em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, p. 572-577. 2007.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C. F. S. Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona* Vahl por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 3, p. 776-780. 2009.

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

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G. Isolamento de compostos com atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 90, n. 2, p. 148-153. 2009.

SILVÉRIO, F. O. **Caracterização de extrativos de madeira de *Eucalyptus* e depósito de pitch envolvidos na fabricação de celulose e papel**. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SILVESTRE, A. J. D.; PEREIRA, C. C. L.; NETO, C. P.; EVTUGUIN, D. V.; DUARTE, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; FURTADO, F. P. Chemical composition of pitch deposits from an ECF eucalyptus globules bleached kraft pulp mill: its relationship with wood extractives and additives in process streams. **Appita Journal**, v. 52, n. 5, p. 375-382. 1999.

SI-MAN, Z.; YONG-SHENG, H.; TABBA, H. D.; SMITH, K. M. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides*, **Chinese Medical Journal**, v. 101, p. 816-866. 1988.

SIMÓN, B. F.; CADAHIA, E.; CONDE, E. Evolution of phenolic compounds of Spanish oak wood during natural seasoning: first results. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p. 1687-1694. 1999.

SINGH, J. **Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants in:** extraction technologies for

medicinal and aromatic plants. Triseste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008. 259 p.

SIVAKUMAR, V.; VIJAEESWARRI, J.; ANNA, J. L. Effective natural dye extraction from different plant materials using ultrasound. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 116–122. 2011.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143. 2004.

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

SOUZA; A. P. T. B.; BARNI, S. T.; FERREIRA, R. A.; COUTO, A. G. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas hidroetanólicas das flores de *Calendula officinalis* L: empregando planejamento fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 13-21. 2010.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200–208. 2007.

STAFFORD, G. I.; JAGER, A. K.; STADEN, J. Effect of storage on the chemical composition and biological activity of several popular south African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 9, p. 107–115. 2005.

STARMANS, D. A. J.; NIJHUIS, H. H. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71. 1996.

SUN, Y.; LIU, Z.; WANG, J. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. **Separation and Purification Technology**, v. 78, p. 49–54. 2011.

SUN, Y. J.; MA, G. P.; YE, X. Q.; KAKUDA, Y.; MENG, R. F. **Ultrasonics Sonochemistry**, n. 17, p. 654-661. 2010.

TACCONELLI, E.; ANGELIS, G.; CATALDO, M. A.; POZZI, E.; CAUDA, R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 26–38. 2008.

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

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNYK, L.; MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 137-142. 2001.

TOMEI, R. R. **Prospecção de antioxidantes em alternanthera marítima planta in natura e obtidas por cultura de células**. 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade do Vale do Paraíba, Vale do Paraíba, 2008.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. Staphylococcus aureus. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

USHIMARU, P. I.; SILVA, M. T. N.; STASI, L. C.; BARBOSA, L.; JUNIOR, A. F. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 717-719. 2008.

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

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

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313. 2001.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de erythrina velutina willd, fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 137-142. 2005.

VISNEVSCHI-NECRASOVA, T.; CUNHAB, S. C.; NUNESA, E.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Optimization of matrix solid-phase dispersion extraction method for the analysis of isoflavones in trifolium pretense. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3720–3724. 2009.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 300–312. 2006.

WANG, X.; ZHAO, X.; YANG, B.; DONG, H.; LIUA, D.; HUANGA, L. A combination of ultrasonic-assisted extraction with RRLC-QQQ method for the determination of artemisinin in the chinese herb artemisia annua L. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 280–284. 2011.

WEINHOLD, T. S.; BRESCIANI, L. F. V.; TRIDAPALLI, C. W.; YUNES, R. A.; HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. Polygala cyparissias oleoresin: comparing CO<sub>2</sub> and classical organic solvent extractions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 109-117. 2008.

WHO (World Health Organization). **Regulatory situation of herbal medicines**: a worldwide review. WHO. Geneva: 1998.

XIAO, H. B.; KRUCKER, M.; ALBERT, K.; LIANG, X. M. Determination and identification of isoflavonoids in radix astragali by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 117–124. 2004.

YANG, Z.; TU, Y.; BALDERMANN, S.; DONG, F.; XU, Y.; WATANABE, N. Isolation and identification of compounds from the ethanolic extract of flowers of the tea (*Camellia sinensis*) plant and their contribution to the antioxidant capacity. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1439–1443. 2009.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001a. 500p.

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

ZAMPINI, I. C.; CUDMANI, N.; ISLA, M. I. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. **Acta Bioquímica Clínica Latino Americana**, v. 41, p. 385-393. 2007.

ZHANG, G.; HE, L.; HU, M. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 18–25. 2011.

ZHAO, H.; DONG, J.; LU, J.; CHEN, J.; LI, Y.; SHAN, L.; LIN, Y.; FAN, W.; GU, G. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7277-7286. 2006.

ZIAKOVA, A.; TETEROVA, E. B.; BLAHOVA, E. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *melissa officinalis*. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 271–275. 2003.