



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Análise fitoquímica e avaliação do efeito antioxidante do
extrato metanólico das flores de *Alternanthera
paronichioides***

Autora: Tarcila Aparecida Sandim

Orientador: Dr. Cristiano Marcelo Espínola de Carvalho

Co-orientadora: Dra. Mami Yano

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Março- 2014



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Análise fitoquímica e avaliação do efeito antioxidante do
extrato metanólico das flores de *Alternanthera
paronichioides***

Autora: Tarcila Aparecida Sandim

Orientador: Dr. Cristiano Marcelo Espínola de Carvalho

Co-orientadora: Dra. Mami Yano

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde”.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul

Ficha catalográfica

Sandim, Tarcila Aparecida

S217a Análise fitoquímica e avaliação do efeito antioxidante do extrato metanólico das flores de *Alternanthera paronichioides* / Tarcila Aparecida Sandim; orientação Cristiano Marcelo Espinola de Carvalho. 2014
57 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2014.

1. Biotecnologia 2. Medicina popular 3. Compostos fenólicos
I. Carvalho, Cristiano Marcelo Espinola de I. Título

CDD – 616.024



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Valorizando talentos

**Análise Fitoquímica e Avaliação do Efeito Antioxidante do Extrato
Metanólico das Flores de *Alternanthera Paronichioides***

Autora: Tarcila Aparecida Sandim

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espinola Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Mami Yano

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

APROVADA em 31 de março de 2014.

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espinola Carvalho - UCDB
(orientador)

Profa. Dra. Josimara Nolasco Rondon - UCDB

Profa. Dra. Maria Carolina Silva Marques - UCDB

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em primeiro lugar, à minha família, pai e mãe por estarem sempre ao meu lado e tornar este sonho uma realidade.

O meu muito obrigada aos meus avós, pelo apoio e carinho nos momentos mais difíceis.

A querida amiga e companheira de laboratório Suellen Soares, pelo apoio em todos os momentos, pela ajuda na realização dos meus testes.

A amiga e também companheira de laboratório Regilene Fátima de Oliveira, pelo apoio técnico sempre que solicitada e ao apoio psicológico, meu muito obrigada querida.

A professora Josimara Nolasco Rondon por todo apoio, uma excelente profissional, na qual tenho muito orgulho de tê-la ao meu lado neste trabalho.

E por fim e não menos importante ao Henrique Nunes pelo carinho e paciência na finalização deste trabalho.

Ao meu orientador e a minha co-orientadora, meu muito obrigada.

As minhas filhas Ana Clara e Maria Luiza, mamãe ama muito vocês.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Tarcila Aparecida Sandim, filha de Josmar Gomes Sandim e Marta Gomes Sandim, nascida em 16 de agosto de 1989.

Bacharel em Enfermagem pela Universidade Católica Dom Bosco no ano de 2011.

Iniciou o Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia em fevereiro de 2012.

Submeteu-se em 18 de dezembro de 2013 à banca de qualificação.

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XI
Resumo	XII
Abstract	XIII
1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	03
2.1 Plantas Medicinais	03
2.2. Metabólitos Secundários	04
2.2.1 Compostos Fenólicos	04
2.2.2 Terpeno e Esteróides	06
2.2.3 Considerações Gerais sobre a Família Amaranthaceae e o gênero <i>Alternanthera</i> .	08
2.4 Espécies reativas do oxigênio	09
2.4.1 Defesas Antioxidantes	12
2.4.2 Estresse Oxidativo	12
2.5 Métodos de avaliação antioxidante	13
3. Objetivos	16
3.1 Objetivos Gerais	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal	17
4.2 Preparo do Material Vegetal e do Extrato Bruto Metanólico	17
4.3 Análise Fitoquímica	17
4.3.1 Fenóis e Taninos	17
4.3.2 Atocianidinas, Antocianinas, Flavonóides	17
4.3.3 Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas	18
4.3.4 Flavonóis, Flavanonas, Flavanóis, Xantonas e Flavonóis	18
4.3.5 Saponinas	18
4.3.6 Quinonas	18

4.3.7 Esteróides e Triterpenóides	18
4.4 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH	18
4.4.1 Preparo do Reagente DPPH 0,3Mm	19
4.4.2 Preparo do Extrato Bruto Metanólico e do Padrão rutina	19
4.4.3 Realização do Ensaio de Seqüestro de Radicais DPPH	19
4.5.Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Fosfomolibdênio	19
4.5.1 Preparo da Solução Reagente de Fosfomolibdênio	19
4.5.2 Preparo da Amostra e do Padrão Rutina	20
4.5.3 Realização do Teste	20
4.6 . Avaliação do Conteúdo Total de Flavonóides	21
4.7. Avaliação do Conteúdo Total de Fenóis	21
5. Resultados e Discussão	22
5.1. Rendimento do Material Vegetal	22
5.2. Estudo Fitoquímico Preliminar	22
5.3 .Avaliação da Atividade Antioxidante	24
5.3.1. Atividade Antioxidante pelo método do DPPH	24
5.3.2.Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Complexo Fosfomolibdênio	27
5.4. Determinação do Conteúdo Total de Flavonóides	29
5.5. Avaliação do Conteúdo Total de Fenóis	30
6. Conclusão	31
7. Referências	32

LISTA DE TABELAS

Páginas

- Tabela 1.** Principais terpenóides encontrados nas plantas. Os terpenóides são precursores de quatro classes hormonais: as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs) e os brassinoesteróides (BR). 05
- Tabela 2.** Análise fitoquímica preliminar. 25
- Tabela 3.** Valores da média (M) e desvio padrão (DP) do conteúdo total de flavonóides, do Extrato Metanólico (EM) e da Rutina. 32
- Tabela 4.** Valores da média (M) e desvio padrão (DP) do conteúdo total de fenóis, do Extrato Metanólico (EM) e do Ácido Gálico. 34

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Metabolismo da Glicose	05
Figura 2. Núcleo básico dos flavonóides	07
Figura 3. Locais dentro da célula onde as ERO's são produzidas	15
Figura 4. Estresse oxidativo e implicações fisiológicas	18

RESUMO

O presente estudo analisou fitoquimicamente a presença de composto majoritários do extrato bruto metanólico das flores de *Alternanthera paronichioides*, bem como sua atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e a solução reagente de fosfomolibdênio. No extrato mostrou-se a presença de compostos fenólicos como: flavonóides, flavonas, flavonóis, flavanonas. Ao estudo da atividade antioxidante, o mesmo mostrou-se possuir capacidade antioxidante. O conteúdo total de flavonóides e de fenóis pode estar relacionado a capacidade antioxidante do extrato. Os resultados indicam que flores de *A. parochinioides* possui os mesmos constituintes químicos encontrados em partes vegetativas dessa espécie, o que pode justificar sua capacidade antioxidante e o amplo uso de outros exemplares do gênero na medicina popular.

Palavras-chave: medicina popular, compostos fenólicos, DPPH.

ABSTRACT

The present study examined the presence of fitoquimicamente majority composed of the methanol crude extract of flowers of *Alternanthera paronichioides*, and their antioxidant activity against DPPH free radical and the reactant solution phosphomolybdenum. In the extract showed the presence of phenolic compounds such as flavonoids, flavones, flavonols, flavanones. The study of antioxidant activity, it was shown to possess antioxidant capacity. The total content of flavonoids and phenols may be related to antioxidant activity of the extract. The results indicate that *A. parochinioides* flowers have the same chemical constituents found in vegetative parts of this species, which may explain their antioxidant capacity and extensive use of other examples of the genre in folk medicine.

Keywords: medicina popular, compostos fenólicos, DPPH.

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais têm sido a base de sofisticados sistemas de medicina tradicionais que já existem há milhares de anos e continuam a dar à humanidade novos remédios. Embora algumas das propriedades terapêuticas atribuídas às plantas não têm sido comprovadas, a terapia com plantas medicinais é baseada nos resultados empíricos de centenas e milhares de anos. A grande maioria das pessoas no planeta ainda depende do uso de plantas medicinais para os seus cuidados de saúde primários, sendo que um quarto de todas as prescrições médicas são formulações à base de substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados de plantas (Fakim, 2006). Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL & YUNES, 1997).

As substâncias químicas caracterizadas como princípio ativo são, em sua maioria, oriundas do metabolismo secundário das plantas, tendo sua função relacionada com a atuação desta com o meio ambiente que a envolve (Maia, 2008). Os compostos provenientes do metabolismo secundário apresentam importante atividade ecológica, pois atuam como protetores da ação dos raios ultravioletas, bem como defesa contra predadores (Simões, 2001).

A família Amaranthaceae compreende 71 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies descritas, originárias de zonas tropicais, sub-tropicais e temperadas da África, América de Sul e Sudeste Asiático. No Brasil, está representada por 15 gêneros e 100 espécies, ocorrendo nos mais diversos ecossistemas, incluindo nosso cerrado brasileiro (SIQUEIRA, 1983/1987). O uso popular da família tem as mais diferentes finalidades, como estados febris e processos inflamatórios (SALVADOR et al., 2004; CAI, SUN e CORKE, 2005; SALVADOR et al., 2002; GORINSTEIN et al., 1991; SIQUEIRA, 1987).

Objeto deste estudo, *Alternanthera paronichioides* foi em 2013 descrito por Wu et al. por seu potencial antioxidante e efeitos glucotóxicos frente as células beta-

pancreáticas. Dos extratos estudados o etanólico mostrou excelente resposta, tanto para a atividade antioxidante como para determinação de flavonóides e substâncias fenólicas. Ainda neste estudo, da grande classe dos polifenóis foram isolados pelo método do HPLC a quercetina e ácido ferúlico.

Muitas evidências bioquímicas, biológicas e clínicas sugerem o envolvimento do estresse oxidativo induzido por radicais livres na patogênese de várias doenças e no envelhecimento acelerado (Halliwell and Gutteridge, 2007). Espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidas como subproduto do metabolismo celular aeróbico (Cui et al., 2004). As células possuem muitas maneiras de controlar a produção de EROs, através de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase) e não-enzimáticos (ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e glutathione). Uma condição de estresse oxidativo ocorre quando a célula acumula um excesso de EROs. Isso ocorre quando a produção de EROs excede as defesas celulares, podendo danificar as células através da oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Covarrubias et al., 2008). Por esta razão, mais atenção tem se dado aos antioxidantes naturais que podem servir como uma medicina preventiva para proteger o organismo humano contra os radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas (Krishnaiah et al., 2011).

As plantas possuem uma larga variedade de moléculas capturadoras de radicais livres, como flavonóides, antocianinas, carotenóides e vitaminas (Choi et al., 2002). Diversas são as espécies de *Alternanthera* na qual encontraram-se estes compostos, como *A. brasiliana*, *A. marítima*, *A. pugens*, *A. tenella Colla*, *A. sessilis*, *A. philoxeróides* (Dogra & Ojba, 1978; Ruiz et al., 1996; Kapundu & Lami & Delaude, 1986; Salvador & Dias, 2002).

Devido a esta espécie estar distribuída em variadas localizações, incluindo o cerrado brasileiro, esta foi objeto de estudo para a avaliação da atividade antioxidante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Desde tempos imemoriais o homem utiliza as plantas com fins terapêuticos. O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. Estes trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, para o conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais/insetos-planta (Viegas et al., 2004).

Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possam sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada (Barreiro & Bolzani, 2009). Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (Cechinel & Yunes, 1997). São inúmeros os compostos extraídos de plantas empregados na preparação de agentes medicamentosos que já se encontram disponíveis no mercado farmacêutico (BRESOLIN & CECHINEL, 2003).

As substâncias químicas caracterizadas como princípio ativo são, em sua maioria, oriundas do metabolismo secundário das plantas, tendo sua função relacionada com a atuação desta com o meio ambiente que a envolve (Maia, 2008). Os compostos provenientes do metabolismo secundário apresentam importante atividade ecológica, pois atuam como protetores da ação dos raios ultravioletas, bem como defesa contra predadores (Simões, 2001). A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1). O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do

acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008).

A maior parte desta diversidade estrutural dos metabólitos secundários é gerada por modificações na cadeia carbônica principal da estrutura, modificações estas que podem alterar a atividade biológica do composto derivado em relação a sua estrutura inicial (Kliebestein, 2004). De acordo com a rota biossintética, os metabólitos secundários são classificados em três grandes famílias: substâncias fenólicas, terpenos/esteróides e alcalóides (BOURGARD, et al., 2001).

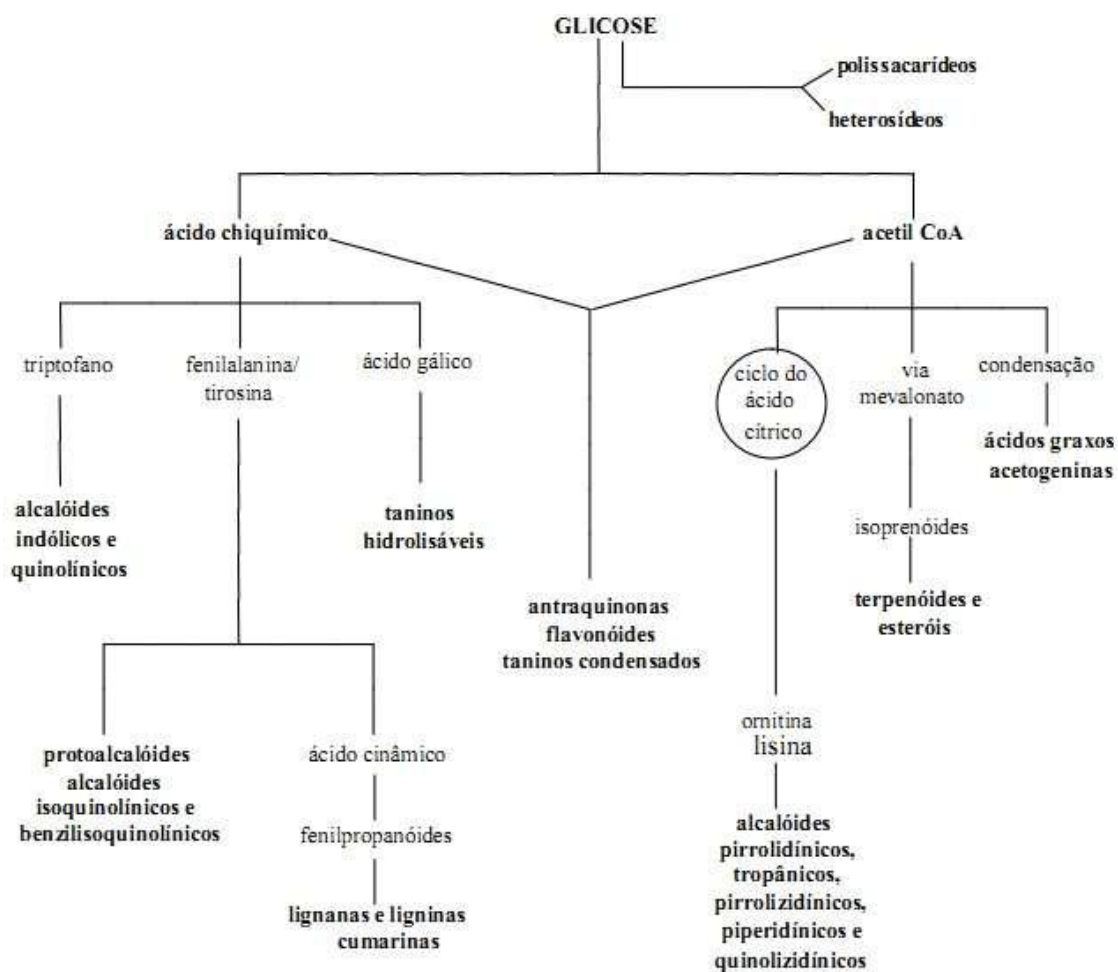


Figura 1. Metabolismo da Glicose. FONTE: Simões et al., 2001.

2.2 Metabólitos Secundários

2.2.1 Compostos Fenólicos

Dentre os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, os compostos fenólicos são os mais difundidos no reino vegetal. São caracterizados por ter pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila, sendo biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, freqüentemente conjugados com açúcares, outros fenólicos e poliamidas (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012).

Os flavonóides apresentam a estrutura química descrita como C6-C3-C6. Já os denominados de não flavonóides são classificados como: (MELO & GUERRA, 2002; BURNS et al., 2001)

- os derivados das estruturas químicas C6-C1 específicas dos ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico;
- os derivados das estruturas químicas C6-C3 específicas dos ácidos caféico e p-cumáricohidroxicinamatos e
- os derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do transresveratrol, cis-resveratrole trans-resveratrol-glucosídeo.

Sua distribuição no reino vegetal depende de diversos fatores, como filo/ordem/família e variações das espécies (Aherne & O'Brien, 2002). Os flavonóides, por exemplo, possuem uma diversidade de funções biológicas, exibindo tais propriedades: antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (CLAVINE al., 2007; IBRAHIM et al., 2012; PELZER et al., 1998).

Estes são classificados de acordo com suas estruturas químicas, sendo as maiores classes os: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas, sendo distribuídos largamente nas folhas, sementes, raízes e flores das plantas (TAKAHASHI & OHINISHI, 2004).

Segundo Agati et al., 2012, mais de 10.000 estruturas de flavonóides já foram descobertas. Nas plantas, estes têm a função de absorver a radiação UV prejudicial que pode induzir um dano celular (Takahashi & Ohnishi, 2004). Nos seres humanos, estes foram descritos por exercer efeitos benéficos em diversas doenças como o câncer, desordens neurodegenerativas e doenças cardiovasculares. Estas ações biológicas têm sido atribuídas pelas suas propriedades antioxidantes, através da capacidade de redução, doação de hidrogênio e influência no estado redox intracelular (WILLIAMS et al., 2004).

O grupo dos flavonóides compreende compostos polifenólicos de baixo peso molecular contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental (Simões et al., 2001). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (Figura 2.).

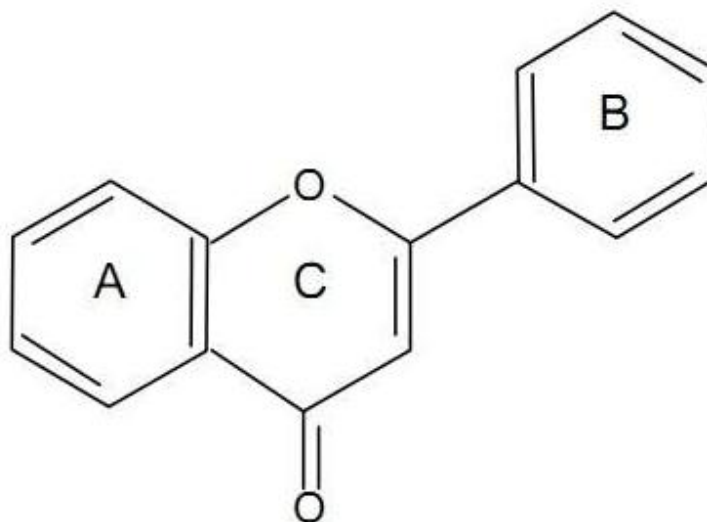


Figura 2. Núcleo básico dos flavonóides. FONTE: Simões et al.,2001.

Contudo, estudos especulam que não somente a atividade antioxidante seja a única explicação para estes efeitos celulares dos flavonóides, uma vez que estes são intensamente metabolizados *in vivo*, resultando numa alteração no seu potencial redox. Ainda nesta linha de pesquisa, estudos têm demonstrado que os flavonóides atuam também na cascata de sinalização de diversas proteínas quinases e lipídios quinases, podendo estar relacionado aos efeitos benéficos destes compostos (SPENCER et al., 2001, WILLIANS et al., 2004).

Embora com destaque aos flavonóides, outros compostos fenólicos não-flavonóides têm-se destacado com importante atividade biológica, como por exemplo o ácido gálico (constituente dos taninos hidrolisáveis), que demonstrou ter boa atividade antioxidante (Kim et al., 2002), anti-inflamatória (Kroes et al., 1992), anti-mutagênica (Gichner et al., 1987) e cardioprotetora (Priscilla and Prince, 2009).

2.2.2 Terpeno e Esteróides

Dentre as classes de produtos naturais presentes em plantas superiores e de ampla ocorrência estão os terpenos. Esses compostos podem ser encontrados, ainda, em organismos marinhos, algas, microrganismos e em menor extensão em fungos.

Deriva da junção cabeça-cauda de unidades de cinco átomos de carbonos chamadas de unidades isoprênicas. As estruturas químicas formadas através da junção de duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades isoprênicas são chamadas de mono, sesqui, di, sester, tri e tetraterpenos, respectivamente (Coloma et al., 2011, Hill & Conolly, 2005). Na tabela 2, podemos observar que muitos dos compostos vegetais de importância derivam da classe dos terpenos ou são terpenos.

Dentro dos triterpenos está uma importante classe de substâncias tanto para vegetais quanto para animais, os esteróides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos (testosterona, progesterona), plantas (brassinosteróides) e insetos (ecdisteróides) (Peres, 2004). Outras importantes classes de terpenos são as saponinas e os carotenóides.

Tabela 1. Principais terpenóides encontrados nas plantas. Os terpenóides são precursores de quatro classes hormonais: as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs) e os brassinosteróides (BR).

Nº de IPP	Nº de carbonos	Nome	Exemplos
1	5	Isopreno	Cadeia lateral das Cks
2	10	Monoterpeno	Piretróides e óleos essenciais
3	15	Sesquiterpeno	ABA, lactonas
4	20	Diterpeno	GAs, taxol
6	30	Triterpeno	Esteróides (BR), saponinas
8	40	Tetraterpeno	Carotenóides
N	N	Polisopreno	Borracha

As saponinas são compostos que apresentam propriedades detergentes e surfactantes. Nas plantas que as produzem, estas apresentam funções como

regulação do crescimento, defesa contra insetos e patógenos, o que revelam a importância desses compostos na adaptação e sobrevivência vegetal. Dentre seus efeitos no organismo humano destacam-se os antioxidantes, em que se ligam a sais biliares e colesterol no tubo digestivo, impedindo sua absorção, além disso, possuem ação citotóxica atuando contra células tumorais (SCHENKEL et al., 2007).

Muitas saponinas isoladas a partir de fontes de plantas produzem uma inibição na inflamação em camundongo no ensaio de indução de edema por carragenina (Just et al., 1998; Sparg et al., 2004). Em um estudo realizado por Just et al., (1998), a saponina Fruticesaponina B isolada da espécie *Bupleurumfruticescens*L. (Apiaceae), mostrou ter elevada atividade anti-inflamatória entre todas as saponinas testadas no ensaio de edema em camundongos. Além da atividade antiinflamatória, algumas saponinas também já mostraram ter propriedades antimicrobiana (El Sohly et al., 1999), antiviral (Simões et al., 2001) e antitumor (Xu et al., 2012). Os principais alimentos em que são encontradas saponinas são soja e alimentos derivados desta, outras leguminosas, alfafa, espinafre, beterraba, aspargos, açafrão, amendoim, nozes e folhas de chás (SPARGET al., 2004).

Dos carotenóides, cerca de 600 substâncias já foram descobertas, sendo que mais de 50 destas, têm atividade biológica significativa como provitamina A. O beta-caroteno recebe maior atenção por possuir maior atividade de vitamina A, no entanto muitos carotenóides, com pouca ou nenhuma atividade de vitamina A (beta-caroteno, licopeno), são estudados por seu potencial anticarcinogênico, devido a sua ação antioxidante. Estão presentes em frutas, ou em vegetais amarelos, alaranjados e vegetais folhosos verde escuros (ARAÚJO, 2008).

2.3 Considerações Gerais sobre a Família Amaranthaceae e o gênero *Alternanthera*.

A família Amaranthaceae compreende 71 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies descritas, originárias de zonas tropicais, sub-tropicais e temperadas da África, América de Sul e Sudeste Asiático. Os espécimes são de ocorrência anual e

perennial, seu porte varia entre herbáceo, arbustos e algumas árvores e tem como membro de maior destaque o ginseng (*Pfaffiapaniculata*) (Siqueira, 1987).

Subdivide-se em quatro tribos: Celosieae, Achyrantheae, Braylineae e Gomphreneae (Siqueira, 1994/1995), onde com exceção da tribo Braylineae, todas estão presentes em território brasileiro.

No Brasil, está representada por 15 gêneros e 100 espécies, ocorrendo nos mais diversos ecossistemas, como cerrado, campos rupestres, caatingas, restingas, matas, desertos e litoral (SIQUEIRA,1987).

A sabedoria popular descreve o uso de plantas da família Amaranthaceae com finalidade curadora para estados febris e processos inflamatórios (Salvador et al., 2004; Cai, Sun e Corke, 2005; Salvador et al., 2002; Gorinstein et al., 1991; Siqueira, 1987). Para o gênero o uso popular envolve tratamento de processos infecciosos, atividade antiviral (Lagrotta et al., 1994), hepatoprotetora (Lin et al., 1994), antibacteriana, antifúngica, inibidor da ativação linfocitária (Morais et al., 1999), antinociceptiva, analgésica (Macedo et al., 1999) e diurética, além de efetiva contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* (SALVADOR et al., 2004; SALVADOR e DIAS, 2004; BROCHADO et al., 2003; ZHOU et al., 1988).

Em um estudo realizado com as populações nativas e indígenas das Guianas, revelou o uso das folhas de *A. brasiliiana* no combate a diarreia e como adstringente, bem como o macerado da planta inteira é utilizado com antidiarréico (Grenand & Moretti & Jacquemin, 1987). Há relatos de que a *A. brasiliiana* tem o poder diurético, digestiva e depurativa, sendo empregada nas moléstias do fígado e bexiga.

O chá das folhas de *Alternanthera tenella Colla* é popularmente utilizado em casos de infecções, febres, machucados, coceiras e também como diurético e antiinflamatório (Salvador et al., 2004; Morais et al., 2009; Siqueira & Guimarães, 1984; Rego, 1995). Seu uso tópico é descrito para picadas de insetos e inchaço (SOUZA et al., 1998).

Para o gênero o uso popular envolve tratamento de processos infecciosos, atividade antiviral (Lagrotta et al., 1994), hepatoprotetora (Lin et al., 1994), antibacteriana, antifúngica, inibidor da ativação linfocitária (Morais et al., 1994), antinociceptiva, analgésica (Macedo et al., 1999) e diurética, além de efetiva contra *Leishmania*

amazonensis e *Trypanosoma cruzi* (SALVADOR et al., 2004; SALVADOR e DIAS, 2004; BROCHADO et al., 2003; ZHOU et al., 1988).

Objeto deste estudo, *Alternanthera paronichioides* foi em 2013 descrito por Wu et al. por seu potencial antioxidante e efeitos glucotóxicos frente as células beta-pancreáticas. Dos extratos estudados o etanólico mostrou excelente resposta, tanto para a atividade antioxidante como para determinação de flavonóides e substâncias fenólicas. Ainda neste estudo, da grande classe dos polifenóis foram isolados pelo método do HPLC a quercetina e ácido ferúlico.

Resultados como este, demonstram a importância do estudo da espécie em questão, avaliando novos métodos de atividade antioxidante, comparando-os entre si, sob uma nova perspectiva bem como utilizando uma planta, embora sendo a mesma espécie, mas de localização distinta do estudo anterior. Além do que há trabalhos sugerindo relação, por exemplo, entre a ocorrência de polifenóis, propriedades farmacológicas (antiinflamatória e imunomodulatória) e a capacidade de seqüestrar radicais livres, todos comprovadamente presentes na espécie *A. paronichioides*.

2.4 Espécies reativas do oxigênio

O termo radical livre existe desde os primórdios da química de Lavoisier, onde foi usado para designar “um grupo de substâncias que mantinha sua identidade através de uma série de reações”, como por exemplo o radical metila (Felipe Jr & Percário, 1991). Atualmente, os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada ocupando um único orbital atômico ou molecular (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

A presença de um elétron desemparelhado confere a estas espécies duas propriedades características: o paramagnetismo, uma vez que produzem facilmente um campo magnético; e alta reatividade, relacionada com o tempo de meia vida da reação que é de microssegundos. São formados por absorção de radiação (ultra-violeta ou visível): por reações redox (reações de transferência de elétrons não-

enzimáticos e reações não catalisadas por metais); ou processos de catálise-enzimática (SLATER, 1984).

Várias substâncias são definidas como radicais livres, porém as substâncias de maior interesse são as espécies reativas do oxigênio (ERO), produzidas em geral de forma endógena ou exógena. As fontes exógenas das ERO's incluem a radiação, fumo, estresse e alguns medicamentos (HALLIWELL, 1987).

No organismo, as ERO's são produzidas na fagocitose e como consequência do metabolismo celular normal. Cerca de 95 a 98% do oxigênio consumido durante a respiração celular é para a produção de energia, o restante (2 a 5% do oxigênio metabolizado), produz ERO.

Diversos locais dentro da célula podem gerar ERO's (Figura 4). As mitocôndrias são consideradas como a fonte da maioria das EROs, especificamente do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). As reações que geram ATP na mitocôndria requerem elétrons de substratos reduzidos para serem passados ao longo da cadeia de transporte de elétrons. Elétrons que vazam deste processo reagem com o oxigênio molecular (O_2) gerando o radical ânion superóxido. Esse radical é um mediador importante em inúmeras reações oxidativas em cadeia e também é um precursor para muitas outras ERO. Outras fontes importantes de ERO intracelular são: NADPH oxidases (gera ânion superóxido), óxido nítrico sintases (gera óxido nítrico) e lipoxigenases (gera hidroperóxidos de ácidos graxos).

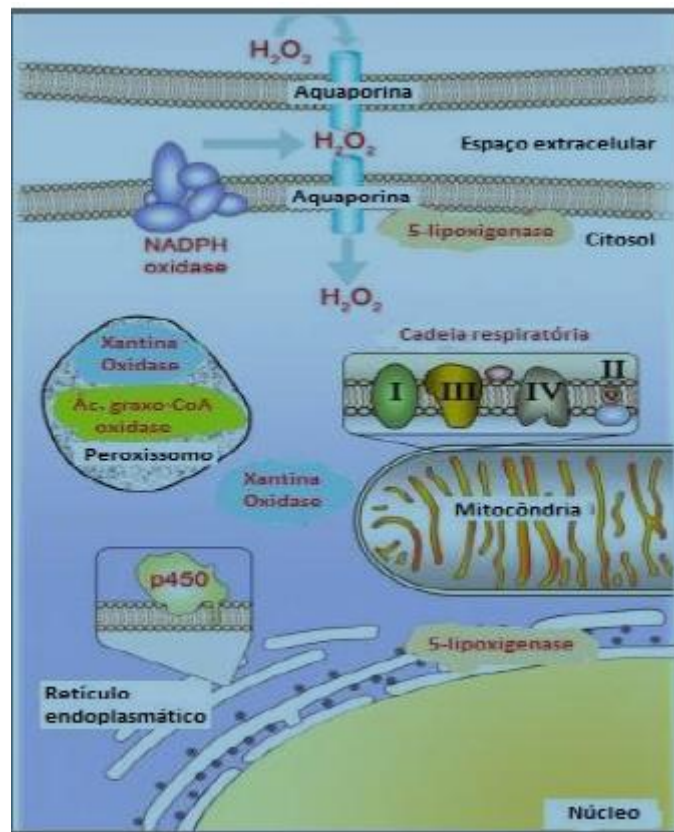


Figura 4. Locais dentro da célula onde as EROs são produzidas. (Modificado de Covarrubias et.al, 2008).

As ERO em baixos níveis e em condições normais possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio, geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Entretanto, devido a sua elevada reatividade, o acúmulo de ERO além das necessidades imediatas da célula pode afetar a estrutura celular e a integridade funcional, ao provocar a degradação oxidativa de moléculas críticas, tais como o DNA, proteínas e lipídios (CUI et al., 2004).

Devido a sua alta reatividade, o radical $OH\bullet$ é provavelmente o radical capaz de causar mais danos aos sistemas biológicos do que qualquer outra ERO. Ele reage rapidamente com a maioria das biomoléculas presentes em uma célula viva: açúcares aminoácidos, fosfolipídios, DNA e ácidos orgânicos. O radical é formado

pelo H_2O_2 na reação catalisada por íons metálicos (Fe^{+2} e Cu^{+}), muitas vezes ligados em complexos com diferentes proteínas ou outras moléculas.

As reações do OH^\bullet podem ser classificadas em três tipos: abstração de hidrogênio, adição ou transferência de elétrons. A reação deste radical com biomoléculas normalmente produz outro radical de menor reatividade, o qual também pode atacar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Um exemplo é o radical peróxil (RO_2^\bullet) que é formado pelo ataque do OH^\bullet a compostos orgânicos. A capacidade do OH^\bullet em lesar as células é superior às demais EROs, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra a ele. Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é evitar que o mesmo seja gerado. Por esta razão as células mantêm um rígido controle sobre a homeostase metálica (FRIDOVICH, 1975; HALLIWELL, 1996; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2007).

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é formado a partir do oxigênio pela adição de um elétron e, apesar de ser um radical, não é altamente reativo. A formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ acontece especialmente em ambientes aeróbios ricos em elétrons, como a cadeia de transporte de elétrons, que parece ser a fonte mais importante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em muitas células aeróbicas. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ também é gerado por algumas enzimas como a xantina oxidase e flavoproteínas. As taxas de reação com DNA, lipídios, aminoácidos e muitos outros metabólitos são muito lentas, e podem ser zero. O dano biológico direto causado pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ é altamente seletivo e freqüentemente envolve reações com outros radicais (ex. NO^\bullet) ou com íons de ferro em proteínas ferro-enxofre (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2007; KUMMER et al. 2002; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Apesar de não ser um radical livre, o H_2O_2 atua como subproduto na formação de radicais reativos via oxidação com metais de transição. O H_2O_2 pode atravessar rapidamente as membranas celulares, e uma vez dentro, pode reagir com íons de ferro e cobre gerando o OH^\bullet que é altamente reativo. Esse composto é produzido por enzimas como: xantina, urato e D-aminoácido oxidases. Além disso, todo sistema biológico que gera $\text{O}_2^{\bullet-}$ também gera H_2O_2 através da dismutação de duas moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2007; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

2.4.1 Defesas Antioxidantes

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Os antioxidantes produzidos pelo organismo agem em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-peroxidase (GPx). A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pela vitamina C, vitamina E, pela glutathiona-redutase (GR) e pela glutathiona-S-transferase (GST), entre outros. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, os demais agentes antioxidantes estão no meio intracelular (ROSS, 1991; HEBBEL, 1986).

2.4.2 Estresse Oxidativo

Uma condição de estresse oxidativo é gerada quando a célula acumula um excesso de ERO. Isso ocorre quando a produção de ERO excede as defesas celulares. Todas as células ativas produzem certa quantidade de ERO, mas o sistema antioxidante mantém os níveis baixos. Como um efeito passivo, as ERO podem danificar as células através do dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA (COVARRUBIAS et al., 2008).

Quando ocorre um desequilíbrio na relação ERO e defesas antioxidantes, duas situações são esperadas. A primeira ocorre quando as defesas antioxidantes naturais e as moléculas antioxidantes ingeridas pela dieta encontram-se em maior número do que as espécies reativas produzidas pelo organismo. Nesse caso acontece uma redução nos níveis normais de ERO, resultando em uma incapacidade de sinalização celular, culminando em perda da capacidade proliferativa da célula. Na segunda probabilidade, as defesas e moléculas

antioxidantes são insuficientes para neutralizar o excesso de espécies reativas formadas, ocasionando lesões em organelas, membranas, tecidos, enzimas, culminando em perda de função celular e/ou tecidual, gerando uma patologia específica (Figura 5).

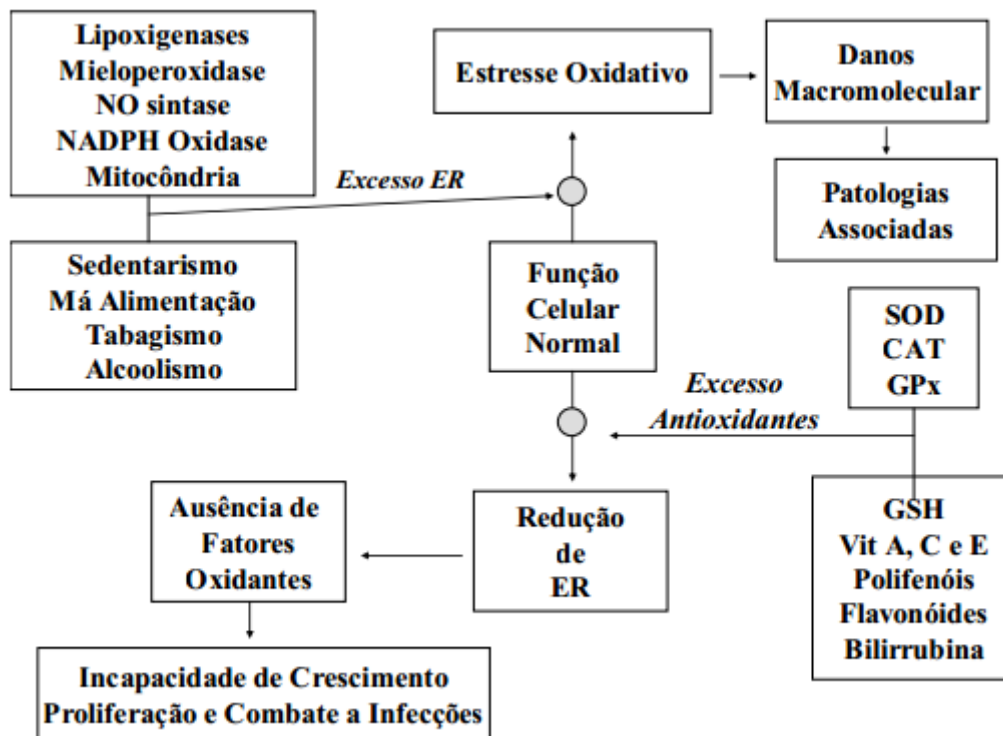


Figura 5. Estresse oxidativo e implicações fisiológicas (SEIFRIED, 2006).

2.5 Métodos de avaliação antioxidante

Os efeitos antioxidantes de uma substância são medidos indiretamente, pelos de seus efeitos em um sistema ou substrato ou sistema biológico onde tais efeitos possam ser monitorados. A maioria desses métodos usa processos oxidativos, que envolvem a adição de um agente “starter”, como a temperatura, agitação ou uma pressão parcial de oxigênio, um metal de transição ou mesmo a exposição à luz, para acelerar o processo, e uma fonte de radicais livres específica. Esses radicais

são então, oxidados sob condições padronizadas e o grau de oxidação, ou sua extensão medidas (ANTOLOVICH et al., 2002).

De modo geral, os métodos de avaliação da atividade antioxidante avaliam o efeito de diferentes concentrações de substâncias antioxidantes em concentrações conhecidas de radicais livres ou comparam a ação de diversos agentes oxidantes em sistemas celulares, usando sempre substâncias de referência como vitaminas C e E, BHT, quercitina, rutina entre outros (PIETRO; PINEDA; AGUIAR, 1999; ARBOS, 2004).

Dos métodos *in vitro* pesquisados, um em particular destaca-se pela sua simplicidade e capacidade de avaliar a atividade antioxidante de determinadas substâncias, em condições de temperatura ambiente, usando um radical livre estável. Tal metodologia foi desenvolvida por BLOIS (1958), e utiliza o radical DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidrazil) e tem sido amplamente utilizado como um método químico para a investigação do potencial antioxidante de produtos naturais, particularmente para extratos de plantas medicinais (BRACA et al., 2001; BRACA et al., 2002; SILVA, 2005).

O DPPH é um radical livre estável que, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil-picril-hidrazina (KOLEVA et al., 2002).

Esta redução pode ser verificada mediante espectrofotometria a 518 nm, pela diminuição da absorbância, com simultânea mudança de coloração violeta escura original, para amarela clara (KOLEVA et al., 2002). Ou seja, quanto mais DPPH for reduzido, menor a coloração violácea, conseqüentemente maior a atividade antioxidante da solução testada. Este método é muito popular, pois utiliza reagentes e equipamentos de custo não muito elevados, e a análise é realizada à temperatura ambiente, sendo que o tempo de reação varia entre 10 a 30 minutos.

Outro método, bastante utilizado é o do fosfomolibdênio que é uma maneira simples para avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas e suas frações. Este método, descrito por Prieto et al. (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo entre fosfato/molibdênio

(V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente. Esse complexo possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (BALESTRIN, 2006), sendo mais intensa quando maior for a atividade antioxidante da amostra (BORA et al., 2005).

Contudo, para uma confirmação mais precisa sobre a atividade antioxidante de um extrato vegetal, a necessidade de realizar mais de uma análise, *in vitro* que utilizem mecanismos de reação diversos, pois como verificado em trabalhos que compararam a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos vegetais, alguns deles apresentaram pouca atividade antioxidante quando avaliados por um método *in vitro*, e uma atividade antioxidante elevada quando utilizado um método *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho avaliou a atividade antioxidante *in vitro* de extratos preparados a partir das flores de *Alternanthera paronichioides*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar atividade antioxidante *in vitro* dos extratos, pelos métodos do DPPH e pelo método do Fosfomolibdênio.
- Analisar o conteúdo total de compostos fenólicos e flavonóides nos extratos.
- Realizar análise fitoquímica preliminar

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal:

As flores de *Alternanthera paronichoides* foram coletadas em doze de junho de 2010, numa área de cerrado, em Fátima do Sul (MS), no distrito de Culturama. Uma amostra do material vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HMS), sob o número de registro 29009.

4.2 Preparo do Material Vegetal e do Extrato Bruto Metanólico:

Após a coleta, as flores foram secadas em estufa de circulação forçada de ar durante três dias, com uma temperatura de aproximadamente 40°C. Em seguida o material vegetal foi extraído, inicialmente com hexano e posteriormente com metanol por maceração a frio até o esgotamento e secos em evaporador rotatório.

4.3 Análise Fitoquímica, segundo Mattos et al, 2007:

A análise fitoquímica foi realizada buscando-se verificar alteração de coloração ou formação de precipitado como resposta de resultado positivo. Para isso, utilizaram-se alíquotas do extrato bruto metanólico das flores (EBMF) de *Alternanthera paronichoides* para detecção dos seguintes grupos dos metabólitos secundários dos vegetais: fenóis, taninos, antocianidinas, antocianinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, xantonas, saponinas, quinonas, esteróides e triterpenóides.

4.3.1 Fenóis e Taninos

Utilizou-se uma alíquota do EBMF (3mL) e adicionaram-se 3 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%.

4.3.2 Atocianidinas, Antocianinas, Flavonóides

Utilizou-se três alíquotas do EBMF (3mL) separados em tubos de ensaio distintos. O primeiro tubo foi acidulado a pH 3, o segundo tubo alcalinizado ao pH 8,5 e o terceiro tubo até o pH 11. Verificou-se a mudança na coloração do material.

4.3.3 Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas

Utilizou-se os tubos alcalinizados anteriormente acidulando o primeiro por adição de HCL até o pH 3, e o segundo alcalinizado com NaOH até o pH 11. Posteriormente os tubos foram aquecidos, observando-se após 3 minutos a modificação na coloração.

4.3.4 Flavonóis, Flavanonas, Flavanóis, Xantonas e Flavonóis

Utilizou-se um alíquota do EBMF (3mL) e acrescentou-se algumas miligramas de Magnésio granulado e 0,5 mL de HCL concentrado. Aguardou-se o término da reação e observou-se a mudança de cor, comparando os resultados com os dois tubos anteriores.

4.3.5 Saponinas

Utilizou-se um alíquota do EBMF (3mL) e acrescentou-se 5 ml de água destilada. Posteriormente agitou-se o tubo a espera da formação de espuma persistente e abundante.

4.3.6 Quinonas

Utilizou-se um alíquota do EBMF (3mL) e acrescentou-se 1mL de NaOH diluído, agitou-se o tubo de ensaio esperando por cinco minutos o findar da reação e a mudança de coloração.

4.3.7 Esteróides e Triterpenóides

Utilizou-se 15 mL do EBMF em um funil de separação e mais 15 mL de água destilada, formando-se uma solução hidroalcoólica, fazendo-se a extração líquido:líquido com o diclorometano, por três vezes e após adicionando-se 1mL de anidrido acético e posteriormente três gotas de H₂SO₄. Aguardou-se a mudança de coloração.

4.4 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH, segundo Sies, 1987.

4.4.1 Preparo do Reagente DPPH 0,3Mm

Pesou-se 6,0 mg do reagente 2,2 – difenil – 1 – picril – hidrazila e o diluiu com 50 mL de Metanol em balão volumétrico de 50 mL.

4.4.2 Preparo do Extrato Bruto Metanólico e do Padrão rutina

Para o preparo do extrato metanólico da flor e do padrão rutina, foram adicionados 100 mL de metanol à 25 mg de cada um das amostras, de maneira a se obter uma concentração final de 250 µ/mL.

Após o preparo das soluções, procedeu-se a diluição das amostras e do padrão com metanol de modo que resultou nas concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 125 µ/mL.

4.4.3 Realização do Ensaio de Seqüestro de Radicais DPPH

Seguindo este modelo, foram adicionados 1,0 mL de solução metanólica de DPPH 0,3 mM à solução metanólica da amostra e do padrão rutina. (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µ/mL).

As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 517 nm, após 30 minutos de incubação.

A capacidade de reduzir o radical DPPH (% de Atividade Antioxidante) foi calculada utilizando a média das absorbâncias e a equação:

$$\text{Porcentagem de Inibição (\%)} = \frac{100 - [(\text{Abs da amostra} - \text{Abs do branco}) \times 100]}{\text{Abs do controle negativo}}$$

Onde:

Abs da amostra: amostra do extrato bruto e ou controle positivo com DPPH.

Abs do branco: amostra do extrato bruto e ou controle positivo sem o DPPH.

Abs do controle negativo: solução de DPPH em metanol

4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Fosfomolibdênio

4.5.1 Preparo da Solução Reagente de Fosfomolibdênio

Pipetou-se 1,6 mL de H_2SO_4 e diluiu-se em 50 mL de água destilada em balão volumétrico de 50 mL. Pesou-se 0,1679g de NaH_2PO_4 e diluiu-se em 50 mL de água destilada em balão volumétrico de 50 mL. Pesou-se 0,2471g de molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ e diluiu-se em água em balão volumétrico de 50 mL. Misturou-se todos os reagentes e aguardou-se em ambiente escuro.

4.5.2 Preparo da Amostra e do Padrão Rutina

Para o preparo do extrato metanólico da flor e do padrão rutina, foram adicionados 100 mL de metanol à 25 mg de cada um das amostras, de maneira a se obter uma concentração final de 250 $\mu\text{g/mL}$ (solução-mãe).

Após o preparo das soluções, procedeu-se a diluição das amostras e do padrão com metanol de modo que resultou nas concentrações finais de 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.3 Realização do Teste

Foram adicionadas 2,7 mL de solução reagente de fosfomolibdênio à amostra e ao padrão. Incubou-se a 95° C por cerca de 1h e 30 min. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 695 nm.

A capacidade de redução do fosfomolibdênio (% de Atividade Antioxidante) foi calculada utilizando a média das absorbâncias e a equação:

$$\text{Porcentagem de Inibição (\%)} = \frac{100 - [(\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}) \times 100]}{\text{Abs do controle}}$$

Onde:

Abs da amostra: amostra do extrato bruto e ou controle positivo com a solução reagente de fosfomolibdênio.

Abs do controle: padrão positivo com a solução reagente de fosfomolibdênio.

4.6 Avaliação do Conteúdo Total de Flavonóides

Pesou-se 25 mg do EBMF e diluiu-se em balão volumétrico de 100 mL com Metanol. Desta solução-mãe uma alíquota de 10 mL foi transferido para um tubo de ensaio e a ela acrescentou-se 1 mL de NaNO_2 , aguardando-se 6 minutos. Após foram acrescentados 1mL de AlCl_3 aguardando-se 6 minutos. Em seguida acrescentou-se 10mL de NaOH , aguardando-se o tempo de 15 minutos. O teste foi realizado em triplicata e as leituras feitas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm. As análises foram feitas em triplicatas e os valores calculados à média e o desvio padrão. O mesmo foi feito com o controle positivo, neste caso a rutina.

4.7 Avaliação do Conteúdo Total de Fenóis

Preparou-se uma alíquota de 5,0 mL do EBMF e a ele adicionados 5,0 mL do reativo Folin-Ciocalteu. A mistura foi mantida em repouso por 8 minutos, em ambiente escuro. Em seguida foram acrescentados 4,0mL de solução de carbonato de sódio 1%. As amostras foram incubadas à temperatura de 50°C por cinco minutos, e a absorbância medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. As análises foram feitas em triplicatas e os valores calculados à média e o desvio padrão. O mesmo foi feito com o controle positivo, neste caso o ácido gálico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do Material Vegetal

O rendimento do extrato bruto metanólico (EBMF) das flores de *A. paronichoides* var. *Bioliviana* foi de 0,12% para massa vegetal de 1.784g.

5.2 Estudo Fitoquímico Preliminar

O resultado da análise fitoquímica do extrato bruto metanólico das flores de *A. paronichoides* indicou a presença de fenóis, taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas e triterpenóides (Tabela 1).

Tabela 2. Análise fitoquímica preliminar.

Grupos Avaliados	Resultados Positivos	Resultado Observado
Saponina	Espuma persistente e abundante	Negativo
Quinonas	Coloração em rosa a vermelho	Negativo
Esteróides	Coloração Parda até vermelho	Positivo
Leucoantocianidinas	Coloração Vermelha	Negativo
Catequinas	Coloração Pardo-amarelada	Negativo
Flavanonas	Coloração Vermelha-laranja	Positivo
Antocianidinas	Coloração Vermelha/Lilás/Azul púrpura	Negativo
Flavonas	Coloração Amarela	Positivo
Flavonóis	Coloração Amarela	Positivo
Xantonas	Coloração Amarela	Positivo
Chalconas	Coloração Vermelha púrpura	Negativo
Auronas	Coloração Vermelha púrpura	Negativo
Fenóis	Coloração Variável de azul à vermelho	Positivo
Taninos	Coloração Variável de azul à vermelho	Positivo

Anitha & Kanimozhi (2012), relataram em seu estudo com folhas e brotos *A. sessilis* encontrada na Índia, a presença de fenóis, flavonóides, taninos e saponinas, mesmo perfil fitoquímico encontrado em *A. paronichoides*.

A. sessilis é muito utilizada na medicina popular para diversos fins como no tratamento de feridas, hemostático, queimaduras, erisipela, conjuntivite, tosse, bronquite, anti-hipertensivo e doenças do trato digestivo, como náuseas, vômitos, diarreia, desintéria (ANITHA & KANIMOZHI, 2012).

Shil et al. 2014, divulgaram um estudo sobre o conhecimento acerca de plantas utilizadas como medicamentos pela população indígena da Índia, e neste destacaram a presença de quatro espécies do gênero *Amaranthaceae*, incluindo as folhas de *A. paronichioides*, utilizada pela comunidade para cura de feridas e cortes.

Compostos fenólicos são produzidos para defesa contra herbivoria, atração para polinizadores, interação hormonal, fitoalexinas de defesa, interação alelopática, dentre outros (HARBORNNE, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2002). Para esses tipos de ações protetoras, muitos compostos fenólicos podem apresentar efeito mutagênico por atuarem como “venenos” da DNA-topoisomerase, enzima que realiza quebras no DNA para distorcer a cadeia importante para os processos de replicação, transcrição, recombinação, segregação e condensação do DNA, reparando possíveis mutações, sendo que tal efeito interfere no processo de religação da dupla cadeia e induz estresse oxidativo (FERGUSON, 2001). Esse efeito pode ser maléfico em casos de uso indiscriminado dessas substâncias, entretanto, a inibição da DNA-topoisomerase pode também atuar impedindo a proliferação descontrolada de células tumorais (NEUKAM et al., 2008).

Outros compostos, ao contrário, apresentam atividade antioxidante por seqüestrarem as EROs e que podem atuarem indiretamente como agentes anticâncer (FERGUSON, 2001; SALEEM et al., 2002; SINGH et al., 2007).

Dentre os fenólicos encontrados no EBM das flores de *A. paronichioides* estão os taninos que apresentam atividade anti-câncer, anti-HIV (JASSIM; GURIB-FAKIM, 2006; NEUKAM et al., 2008), antiulcerogênica e antioxidantes (CARVALHO, 2006).

Outras propriedades dos taninos são antidiarréica, antireumática, antihemorrágico, hipotensora arterial, antibactericida, antifúngica, moluscida,

tratamento de queimaduras, feridas, problemas renais e estomacais (SANTOS; MELLO, 2004).

Os esteróides são derivados de triterpenos e compõem membranas celulares, sendo estabilizados pela interação com fosfolípídeos (TAIZ; ZEIGER, 2002). Na área terapêutica, as substâncias esteroidais possuem relação com os hormônios sexuais, compondo pílulas anticoncepcionais.

Sanoko et al. (1999), ao estudar *A. repens*, na África, muito utilizado pela população como diurético, vermífugo e para distúrbios do trato digestivo, isolou além de quatro saponinas, um triterpeno das partes aéreas da planta.

Comparando-se o resultado obtido na avaliação fitoquímica de *Alternanthera paronichoides* em relação a outras espécies já estudadas, compostos como os fenóis, taninos, flavonóis, flavanonas, esteróides e triterpenóides, também foram identificadas em *A. brasiliana*, *A. pugens*, *A. marítima*, entre outras.

Recentemente Wu et al. (2013), em um estudo com *A. paronichoides*, relatou a presença dos polifenóis ácido ferúlico e a quercetina em extratos metanólicos e etanólicos.

5.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

5.3.1 Atividade Antioxidante pelo método do DPPH

De acordo com a figura 1 verificou-se a presença de atividade antioxidante do EBM pelo método do DPPH, corroborado pelo grau de descoloração do extrato (cor amarela). As amostras do extrato e do padrão, nas concentrações 10 e 50 µg/ mL, comportaram-se de maneira inesperada, uma vez que quanto maiores as concentrações, maior é a atividade antioxidante (modelo dose-dependente).

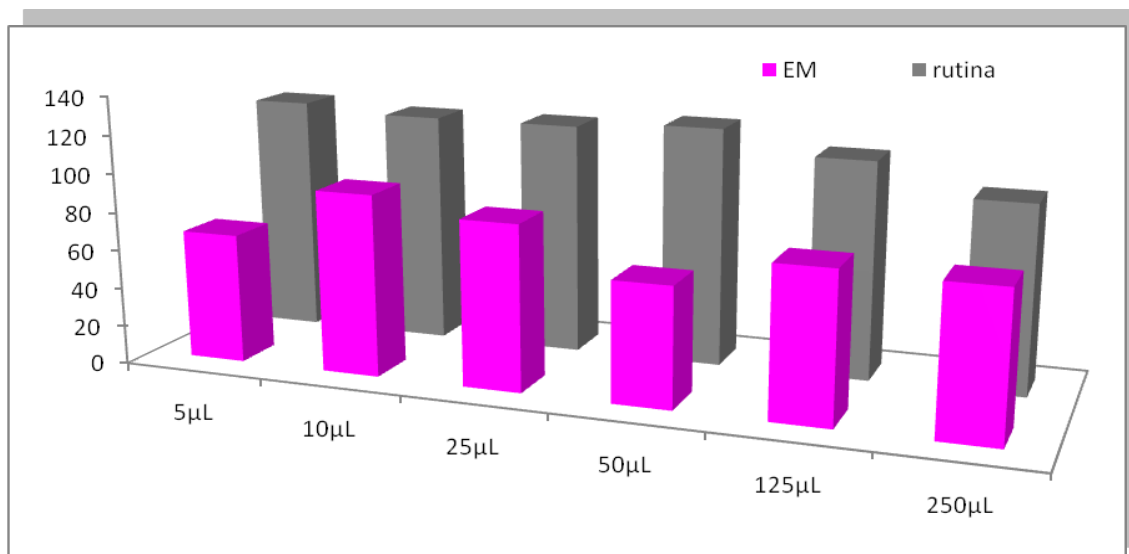


Figura 6. Porcentagem de atividade antioxidante do extrato metanólico das flores comparadas com o controle rutina – Método do DPPH.

Considerando-se a rutina como atividade antioxidante de 100% e levando-se em consideração apenas a porcentagem de inibição dos extratos, a concentração de 25 µg/ mL (com atividade de 86,15%) e a concentração de 250 µg/ mL (com atividade de 76,33%) destacaram-se nos testes quando comparadas ao padrão (120,94% e 97,75% respectivamente). Segundo Brand-Willians et al., (1995), a interação do antioxidante com o DPPH depende de suas conformações estruturais.

O resultado encontrado neste teste serve como complemento e como futura comparação ao resultado obtido por Wu et al.(2013), com *A. paronychioides*, coletada em Taiwan, avaliando seu potencial antioxidante, anti- apoptótico e secretadora de insulina. Em seu trabalho, Wu et al., (2013) avaliou a atividade antioxidante dos extratos metanólico, etanólico e aquoso da espécie, e seus potenciais componentes ativos pelo método do HPLC.

Como resultados foram identificados compostos polifenólicos, exceto no extrato aquoso, da mesma maneira que estes apresentaram boa atividade antioxidante avaliado pelo método do ABTS, sugerindo que esta atividade de *A. paronychioides* pode estar relacionada aos componentes encontrados, quercetina e ácido ferúlico.

Outras espécies do gênero têm sido estudada quanto a sua atividade antioxidante. Shymala et al. (2005) testou folhas da *A. sessilis* frente ao radical DPPH e seu poder de inibição da lipoperoxidação, encontrando resultado positivo e o justificando devido a grandes concentrações de fenólicas presente no extrato. Salvador et al. (2004), em seu estudo com folhas de *A. tenella* e utilizando-se do método ORAC, encontrou resultado positivo e o atribuiu a presença de flavonóides no extrato estudado.

Enechi & Odo & Wuave (2013), em estudo com o extrato etanólico das folhas de *A. brasiliiana*, também se utilizando do método do DPPH, obteve excelentes resultados, justificando como sendo a planta rica em antioxidantes naturais, utilizadas em desordens mediadas por radicais livres.

Estruturalmente, os compostos polifenólicos consistem em anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, ocorrendo desde simples fenólicos até moléculas altamente polimerizadas (Bravo, 1998). A estrutura dos compostos fenólicos é fator determinante para a atividade anti-radical livre e quelante de metais, assim conhecido como relação estrutura-atividade (Balasundram et al., 2006). A ação antioxidante dos compostos fenólicos ácidos aumenta com o grau de hidroxilação, ou diminui quando há substituição de um grupo hidroxila no anel aromático por grupo metoxil, o que ocorre no ácido ferúlico. Van Acker et al. (1996) relataram que o grau de hidroxilação, bem como a posição dos grupos hidroxilas influenciam na atividade antioxidante dos flavonóides. Além disso, uma dupla ligação combinada com um radical-OH no anel central aumenta a ação antioxidante. Por esse motivo, a quercetina em *A. paronychioides* destacada no estudo de WU et al. (2013), possui significativamente maior atividade antioxidante, principalmente quando comparada à rutina.

A composição e a concentração dos componentes secundários, de uma planta da mesma espécie, podem variar devido a fatores ecológicos e as condições edafoclimáticas (Yin, 1991). Assim, estas diferenças químicas existentes entre estes podem refletir diretamente nas propriedades funcionais, como a atividade antioxidante. Há relatos, com outras espécies vegetais, onde verificou-se a diferença entre componentes presentes na mesma espécie, bem como em quantidades

diferenciadas, por mera influência regional, época de coleta e espaçamento entre as plantas (Marco et al., 2007).

5.3.2 Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Os resultados obtidos para avaliação quantitativa estão descritos na figura 2 a seguir:

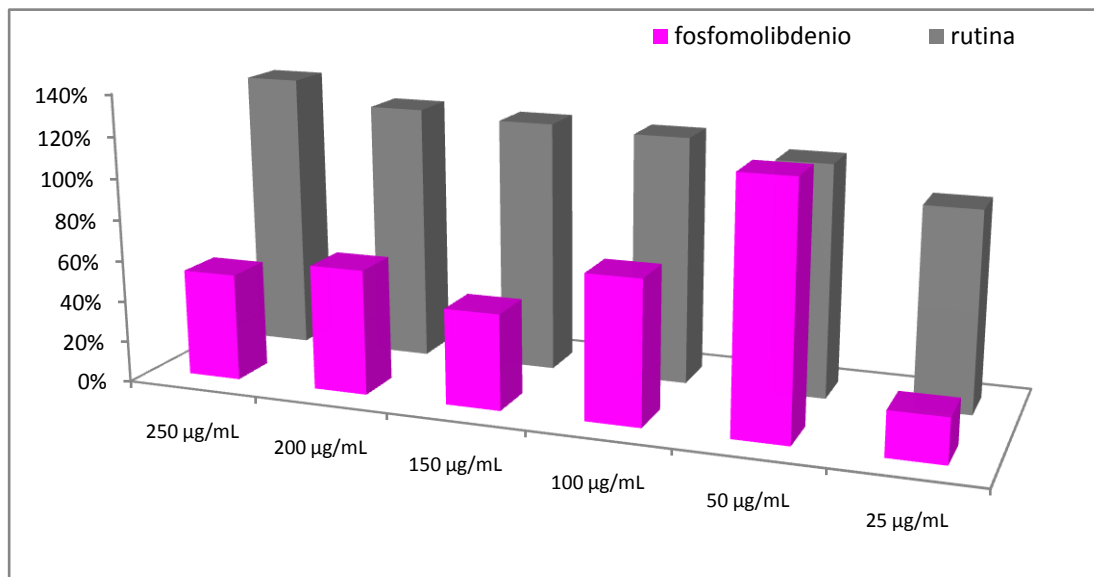


Figura 7. Porcentagem de atividade antioxidante do extrato metanólico de flores de *A. paronichioides* comparadas com o controle rutina – Poder Redutor do Complexo Fosfomolibdênio.

De acordo com o resultado apresentado na figura 2, observa-se que o extrato bruto metanólico de flores de *A. paronichioides* apresentou atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio, adquirindo a coloração verde característica.

A amostra de concentração de 50 µg/mL (com porcentagem de inibição de 120,30%) apresentou-se mais promissora ao comparar-se com o padrão rutina (com

112,30% de inibição). Contudo, a amostra de concentração de 25 µg/mL (com porcentagem de inibição de 21,67%) apresentou baixa porcentagem de inibição antioxidante.

Balestrin et al. (2007), em seu estudo com *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae), avaliou sua atividade antioxidante pelo o método de redução do complexo fosfomolibdênio em extrato bruto, obteve porcentagem média de inibição próxima a 65%, o que justifica-se que, embora não se tenha estudos com outras espécies do gênero *Alternanthera*, em relação ao método de redução do complexo fosfomolibdênio, o resultado obtido neste trabalho torna-se destaque.

Apesar da atividade antioxidante ser obtida pela comparação entre uma substância isolada (rutina) e um extrato composto por diversos tipos de substâncias, não se pode descartar a capacidade antioxidante apresentado por *A. parochinioides*. Esse resultado a torna objeto de estudo para investigações acerca da sua composição e conseqüente atividade antioxidante utilizando outros tipos de testes e frações, principalmente pelo fato do extrato bruto, em análise fitoquímica preliminar quanto à presença de compostos fenólicos totais.

5.4 Determinação do Conteúdo Total de Flavonóides

Compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de compostos atuantes como antioxidantes. Dentre os compostos fenólicos que apresentam essa propriedade, merece destaque o grupo dos flavonóides. Esses compostos possuem diversas propriedades descritas na literatura, sendo considerada a atividade seqüestradora de radicais livres, a principal e mais importante dessa classe de compostos. O conteúdo total de flavonóides pode ser facilmente visualizado pela formação de um complexo flavonóide-alumínio, em meio básico, de coloração rosa.

Por meio da análise fitoquímica preliminar do extrato bruto metanólico de flores de *A. paronichioides* observou-se a presença de flavonóides.

A partir deste resultado, optou-se por determinar, qualitativamente através da média e desvio padrão, o conteúdo total de flavonóides com base na absorbância em espectrofotômetro (tabela 2).

Tabela 3. Valores da média (M) e desvio padrão (DP) do conteúdo total de flavonóides, do Extrato Metanólico (EM) e da Rutina.

Amostras	Conteúdo Total de Flavonóides
EM	0.202 (+) 1.41
Rutina	0.218 (+) 0.022

O valor da absorbância do extrato bruto metanólico das flores de *A. paronichioides* assemelha-se ao valor obtido pelo padrão positivo rutina, corroborando o resultado conquistado na análise fitoquímica preliminar.

Tomei (2008), com base em achados preliminares ao estudo de *A. marítima*, isolou dois compostos de flavonóides, a quercetina e a vitexina, achado parecido com o descrito por Wu et al. 2013, ao encontrar quercetina em extratos de *A. paronichioides*.

Outras espécies de *Alternanthera tenella colla*, *A. sessilis* e *A. pugens*, foram estudadas quanto à presença de flavonóides como compostos majoritários (DOGRA & OJBA, 1987; RUIZ et al., 1996; KAPUNDU & LAMI & DELAUDE, 1986).

Hundiwale et al. (2012) descreve algumas espécies do gênero *Alternanthera* como produtoras e acumuladoras de metabólitos secundários, dentre eles, flavonóides, saponinas, vitaminas e glicosídeos, justificando mais uma vez o resultado na determinação do conteúdo de flavonóide obtido.

5.5 Determinação de Fenóis Totais (Método de Folin-Ciocalteu)

O método mais empregado na determinação de compostos fenólicos é aquele que emprega o reagente Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos foram expressos por média e desvio padrão, com base nos valores de absorbância em espectrofotômetro encontrados das amostras, conforme tabela 3.

Tabela 4. Valores da média (M) e desvio padrão (DP) do conteúdo total de fenóis, do Extrato Metanólico (EM) e do Ácido Gálico.

Amostra	Conteúdo Total de Fenóis M/DP
EBM	206,40 (+-) 2,36
Ácido Gálico	269,54 (+-) 0,65

O resultado encontrado para a média da absorbância para o extrato metanólico é considerado próximo a média da absorbância obtida pelo Ácido Gálico, utilizado como controle positivo. Este dado está de acordo com a análise fitoquímica indicativa para a presença do grupo fenólico nas flores de *A. paronichiodes*.

6. CONCLUSÃO

- A análise fitoquímica do extrato bruto metanólico das flores de *A. paronichioides* detectou a presença de fenóis, taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas e triterpenóides.

- O extrato testado detectou a presença da atividade antioxidante frente aos métodos de redução do radical DPPH e da solução reagente de fosfomolibdênio.

- Quanto a avaliação do conteúdo total de flavonóides e de fenóis totais, os resultados desta espécie também estão presentes na família Amaranthaceae e em outras espécies do gênero *Alternanthera*.

Com larga distribuição e presente em diversas localidades do planeta, é a primeira vez que flores de *A. paronichioides* são retiradas do bioma cerrado e estudado em relação aos seus constituintes químicos e ação antioxidante.

Pode-se afirmar, portanto, que flores de *A. parochinioides* possui os mesmos constituintes químicos encontrados em outras partes vegetativas dessa espécie, o que pode justificar sua capacidade antioxidante.

Muitos estudos já demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo na manifestação de diversas doenças. O estudo desta espécie, pode de certa forma explicar o uso amplo de outros exemplares do gênero na medicina popular.

6. REFERÊNCIAS

AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. 196, 67-76, 2012.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18(1), p75-81, New York 2002.

ANITHA, R.; KANIMOZHI, S. Pharmacognostic Evaluation of *Alternanthera Sessilis* (L.) R.Br.ex.DC. *Pharmacognosy Journal* , v. 4, p. 31-34, 2012.

ANTOLOVICH, M.; PRENZIER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S. Araújo, J. M. *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, p.477, 2008.

ARBOS, K. A. Estudo do Potencial Antioxidante de Vegetais da Família Cruciferae de Diferentes Cultivos. Dissertação de Mestrado do Programa de Ciências Farmacêuticas – UFPR. Curitiba, 2004.

BALASUNDRAM, N. SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v.99, p.191-203, 2006.

BALESTRIN, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fonte Potencial para a Descoberta de Fármacos. *Quím. Nova*. 32(3): 679-688, 2009.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. v.181: p. 1199 – 1200, 1958.

BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSONIACEAE. *Visão Acadêmica*, v 6, n 2, p 6-16, 2005.

BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSONIACEAE. *Visão Acadêmica*, v 6, n 2, p 6-16, 2005.

BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, p 839-51, 2001.

BRACA, A.; DE TOMASI, N.; BARI, L. D.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I..

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30. 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v.56, p.317-33, 1998.

BRESOLIN, T.M.B; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, 2003.

BROCHADO, C. O.; DE ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. da C.; GONÇALVES-KOATZ, V. I.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and

their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. *J. Braz. Chem. Soc.* 14: 449-451, 2003.

BURNS, J. et. al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chemistry*.v.49, p.5797-5808, Chicago, 2001.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Tren. Food Sci. Technol.* v.16, p.370-6, 2005.

CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. *Construindo a História dos Produtos Naturais*, v 7, p 1-18, 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. *Quím. Nova.* 21(1): 99-105, 1997.

CLAVIN, M., GORZALCZANY, S., MACHO, A., MUÑOZ, E., FERRARO, G., ACEVEDO, C., MARTINO, V. Antiinflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Ethnopharmacology* 585-89, 2007.

COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. *Phytochem Ver*, v. 10, p. 245-260, 2011.

COVARRUBIAS, L., HERNÁNDEZ-GARCÍA, D., SCHNABEL, D., SALAS-VIDAL, E., CASTRO-OBREGÓN, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology* 320, 1-11, 2008.

CUI, K.; LUO, X.; XU, L.; VEN, M.R. Progress in neuropsychopharmacology and biological psychiatry v.5, p.771-799, 2004.

DOGRA, J.V.V.; OJBRA, O.P.. Saponin from *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *Comp. Physiol. Ecol.* v.3, p.14-8, 1977.

El Sohly, H.N., Danner, S., Li, X.-C., Nimrod, A.C., Clark, A.M. New antimycobacterial saponin from *Colubrina retusa*. *Journal of Natural Products* 62, 1341-1342, 1999.

ENECHI, O.C.; ODO, C.E.; WUAPE, C.P. Evaluation of the in vitro anti-oxidant activity of *Alternanthera brasiliana* leaves. *Journal of Pharmacy Research* v.6 p.919-924, 2013.

FAKIM, A.G. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* v.27, p.1-93, 2006.

FELIPPE JR., J.; PERCÁRIO, S. Radicais Livres em Medicina Intensiva. *Rev. Bras. Terap. Intens.* v.3, p.66-72, 1991.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, v 475, p 89–111, 2001.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* v.44, p.147-59, 1975.

GICHNER, T., POSPÍSIL, F., VELEMÍNSKÝ, J., VOLKEOVÁ, V., VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiologica (Praha)* 32, 55-62, 1987.

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

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v 27, p 1-93, 2006.

HALLIWEL, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* v.9, p.1-32, 2000.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, v.16, p.33-50, 1975.

HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J.M.C. Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts- The role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett.* v.128, p.347-52, 2007.

HARBORNNE, J. B. Plant secondary metabolism. In: CRAWLEY, M. J. *Plant Ecology*. 2 ed. Malden: Blackwell, 1997, p 132- 155.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 107, p. 401-404, 1986.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. *Natural Products Report*, v. 28, p. 1087-1117, 2011.

HUNDIWALE, J. C. et al. A current update on phytopharmacology of the genus *Alternanthera*. *Journal of Pharmacy Research*, v. 5, p. 1924 -1929, 2012.

IBRAHIM, B., SOWEMIMO, A., VAN ROOYEN, A., VAN DE VENTER, M. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathulaprostrata*(Linn.) Blume (Amaranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*.282-89, 2012.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, v 95, p 412–427, 2003.

JUST, M.J., RECIO, M.C., GINER, R.M., CUÉLLAR, M.J., MAÑEZ, S., BILIA, A.R., RIOS, J.R. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Medica* 64, 404-407, 1998.

KAPUNDU, M.; LAMI, N.; DELAUDE, C. A saponin from *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. *Bull. Soc. R. Sci. Liege*. V.55, p.605-6, 1986.

KIM, D.O., LEE, K.W., LEE, H.J., LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 3713-3717, 2002.

KLIEBENSTEIN, D.J., Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell and Environment*.p 675-84, 2004.

KOLEVA, I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*, v. 13(1), p. 8-17. 2002.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bio. Proc.* v.58, p.499-504, 1992.

KROES, B.H., VAN DEN BERG, A.J., QUARLES VAN UFFORD, H.C., VAN DIJK H., LABADIE, R.P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Medica*.p.499-504, 1992.

KUMMER, C.L.; COELHO, I.C.R.B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Rev. Bras. Anest.* v.52, p.498-512, 2002.

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

LEITE, J. P. V. *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. 1ª Edição. Ed. Atheneu, São Paulo, p 344, 2008.

LIN, S.C.; LIN, Y.H.; SHYUU, S.J.; LIN, C.C. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine *Alternanthera sessilis* on livery-dange by various hepatotoxins. *Phytother. Res.* v.8, p.391-8, 1994.

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

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, v 613, p1–19, 2008.

MAIA, C.N. *Análise Fitoquímica e Atividade Antibacteriana “in vitro” de Extrato de Planta do Cerrado*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros/MG, 2008.

MARCO, C.A.; INECO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N.S.S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. *Horticultura Brasileira*, v.25, p.429-32, 2007.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA*. 36 (1), p1-11, Campinas, 2002.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O; AGUIAR, L. A. Ação Antioxidante de Chás e Condimentos de Grande Consumo no Brasil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(1B): 315-320, 2009.

NEUKAM, K.; PASTOR, N.; CORTÉS, F. Tea flavanols inhibit cell growth and DNA topoisomerase II activity and induce endoreduplication in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Research*, v 654, p 8–12, 2008.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S. Espécies reativas de oxigênio, atividade antioxidante e do sistema tioredoxina nos mamíferos. *Rad. Biol. Mod.* v.11, p.1287-312, 2001.

PELLETIER, S.W. Alkaloids chemical and biological perspectives, New York, 1988.

PELZER, L.E., GUARDIA, T., JUAREZ, A.O., GUERREIRO, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plants flavonoids. *Il Farmaco* 53, p.421-424, 1998.

PERES, L.E.P. Metabolismo Secundário. Piracicaba - São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz., p. 1-10, 2004.

PERES, L.E.P. Metabolismo Secundário., Piracicaba - São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz., p. 1-10, 2004.

PIETRO, P.; PINEDA, M.; AGUIAR, M.. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytic Biochemistry*, v. 269 (2): p. 337 – 341. 1999.

RAO, V.R.S., SURESH, G., BABU, K.S., RAJU, S.S., VISHNUVARDHAN, M.V.P.S., RAMAKRISHNA, S., RAO, J.M. Novel dimeric amide alkaloids from *Piper chaba* Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. *Tetrahedron* 67, 1885-1892, 2011.

ROBARDS, K.. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. v. 127 (n. 1), p. 183-198, 2002.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO- PELFREY, C. (Ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton: CRC Press, p.151-170, 1991.

RUIZ, R.E.L.; FUSCO, M.R.; RAPISARDA, M.R.; SOSA, A.; RUIZ, S.O. Phytochemical study of yerba dell pollo (*A. pugnans*) *Acta Farm. Bonaerense*, v.10, p.25-7, 1991.

SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HÄRKÖNEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, v 81, p 327-336, 2002.

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

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

SANOKOA, R.; SPERANZAB, G.; PIZZAC, C.; De TOMMASI, N. Triterpene saponins from *Alternanthera repens*. *Phytochemistry*. v.51, p.1043-1047, 1999.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C.P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p 615-656, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. SAPONINAS. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK,

P. R. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p.1104, 2007.

SEIFRIED, H. Oxidative stress and antioxidants link to disease and prevention? The Journal of Nutritional Biochem. v.18, p.168-71, 2007.

SHIL, S.S.; CHOUDHURY, M.D.; DAS, S. Indigenous knowledge of medicinal plants used by the Reang tribe of Tripura state of India. Journal of Ethnopharmacology p.135–14, 2014.

SHYAMALA BN, GUPTA S, LAKSHMI AJ, PRAKASH J. Leafy vegetables extracts antioxidant activity and effects on storage stability of heads oils. Inno. Food Sci. Emerg. Technol.. v.6, p.239-45, 2005.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S., RODRIGUES, V. P.; RENNÓ, M. N.; FALCÃO, D. Q.; CERQUEIRA, D. M.; MINTO, A. B. M.; NOGUEIRA, F. L. P.; QUARESMA, C. H.; SILVA, J. F. M.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. A.. Evaluation of Antioxidant Activity of Brazilian Plants. Pharmacological research. v. 52, p. 229-233, 2005.

SIMÕES, C.M.O., SCHENCKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª Edição. Ed. Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2001

SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Food and Chemical Toxicology, v 45, p 1216–1223, 2007.

SIQUEIRA, J. C. Phytogeography of brasilian Amaranthaceae. *Pesquisa Botânica*. p.5-21, 1994/1995.

SIQUEIRA, J. C.. Importância alimentícia e medicinal das Amaranthaceaes do Brasil. *Acta. Biol. Leopold.* 9: 5-22, 1987.

SLATER, T.F. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.* v.222, p.1-15, 1984.

SOUSA, C.M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v 30, n 2, p 351-355, 2007.

SPARG, S.G., LIGHT, M.E., VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 219-243, 2004.

SPARGET, S. G E LIGHT, M. E.; STANDEN, J. ,Biological activities and distribution of specific application to the determenation of vitamin E. *Analytic Biochemistry*, v. 269 (2): p. 337 – 341. 1999.

SPENCER, J.P.E., SCHROETER, H., CROSSTHWAITHE, A.J., KUHNLE, G., WILLIAMS, R.J., RICE-EVANS, C. Contrasting influences of glucuronidation and o-methylation of epicatechinon hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 1139-1146, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAKAHASHI, A., OHNISHI, T. The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the internal space station. . *Biological Sciences in Space* 18, 255-260, 2004.

TAN, M.A., KITAJIMA, M., KOGURE, N., NONATO, M.G., TAKAYAMA, H..Isolation and total syntheses of two new alkaloids, dubiusamines-A, and -B, from *Pandanusdubius*.*Tetrahedron* 66, p.3353-3359, 2010.

TOMEI, R.R. Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera marítima* (Planta in natura e obtida por cultura de células). Dissertação de Mestrado, São José dos Campos, 2008.

TORRAS-CLAVERIA, L., JÁUREGUI, O., CODINA, C., TIBURCIO, A.S., BASTIDA, J., VILADOMAT, F. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. *Plant Science* p.71-78, 2012.

PRISCILLA, D.H., PRINCE, P.S.M. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiactroponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 179, 118-124, 2009.

VAN ACKER, S.A.B.E.; VAN DEN BERG, D.J.; TROMP, M.N.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, n.3, p.331-42, 1996.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E., Produtos Naturais como Candidatos à Fármacos úteis no Tratamento do Mal de Alzheimer. *Quim. Nova*. 27(4): 655-660, 2004.

WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidant or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine* 36, 838-849, 2004.

WU, C.; HSIEHA, H.; LINA, J.; YEN, G. *Alternanthera paronychioides* protects pancreatic b-cells from glucotoxicity by its antioxidant, antiapoptotic and insulin secretagogue actions. *Food Chemistry* v.139, p.362–370, 2013.

Xu, Q.-M., Shu, Z., He, W.-J., Chen, L.-W., Yanga, S.-L., Yang, G., Liu, Y.-L., Li, X.-R., Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 19, 293-300, 2012.

YIN, H.W. Yield and composition variation of essential oil from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira clones in Taiwan. *Quarterly Journal of Chinese Forestry*, n.24, p.83-104, 1991.

ZHOU, B.; BLASKÒ, G.; GORDELL, G.A. Alternanthin a C-glycosylated flavonoid from *Alternanthera philoxeroides*. *Phytochem.* v.27, p.3633-36, 1988.