

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – Unifal - MG

LUIS FELIPE CUNHA DOS REIS

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS FOLHAS DE
***Talinum patens* (L.) Willd (Talinaceae)**

Alfenas/MG

2014

LUIS FELIPE CUNHA DOS REIS

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS FOLHAS DE
Talinum patens (L.) Willd (Talinaceae)

Dissertação apresentada em defesa como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva
Co-orientador: Amanda Latercia Tranches Dias

Alfenas/MG

2014

Reis, Felipe Cunha dos.

Estudo farmacognóstico das folhas de *Talinum patens* (L.) Willd(Talinaceae).
/ Luis Felipe Cunha dos Reis. - 2014.
70 f. –

Orientador: Geraldo Alves da Silva..

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal
de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Extratos vegetais. 2. Ação antimicrobiana. 3. *Talinum patens*.
4. Estudo farmacognóstico. 5. *Candida albicans*.. I. Silva, Geraldo Alves da.
- II. Título.

CDD 615.321

LUIS FELIPE CUNHA DOS REIS

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS FOLHAS DE *Talinum patens* (L.)
Willd. (Talinaceae)

Aprovado em: 31 / 04 / 2014

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

Prof. Dr. André Santos Gonzaga Assinatura: _____

Instituição: Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Prof. Dr. Marcos José Marques Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

Alfenas/MG

2014

AGRADECIMENTOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - Unifal-MG

CAPES

Professores Dr. Geraldo Alves da Silva, Dr. Marcelo Aparecido da Silva, Dr. Jorge Kleber Chavasco, Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques e demais

Técnicos Administrativos dos Laboratórios de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e de Microbiologia

Discentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG

RESUMO

As plantas têm sido utilizadas para fins terapêuticos desde a antiguidade, sendo que atualmente, através de estudos de segurança, de eficácia e de qualidade, são alternativas como possíveis fitoterápicos, ou através de triagens prospectivas, promissoras fontes de moléculas-protótipo candidatas a fármacos. Nos últimos anos, o surgimento de micro-organismos multi-resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis na prática médica tem sido razão de constante preocupação por parte da comunidade científica, direcionando a busca por novos antimicrobianos. *Talinum patens* (L.) Willd (Talinaceae) uma planta encontrada na flora brasileira é amplamente utilizada na culinária e com finalidades terapêuticas na medicina popular. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi realizar o estudo farmacognóstico de *T. patens*, incluindo a avaliação das atividades antibacteriana, antifúngica, anti-micobacteriana, leishmanicida e sequestrante de radicais do extrato hidroetanólico seco das folhas, e suas frações: hexânica, acetato-etílica, butanólica e aquosa, além da citotoxicidade. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através dos métodos de difusão em agar e microdiluição em caldo, com obtenção através deste último da concentração inibitória mínima (CIM). O extrato seco apresentou CIM de 250 e 500 µg/ml contra *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus* respectivamente; a fração hexânica, por sua vez, mostrou-se mais eficaz contra bactérias Gram-positivas e leveduras com CIM de 31,2 µg/ml para *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* e a fração acetato-etílica, contra bactérias Gram-negativas, CIM de 31,2 µg/ml para *Escherichia coli*. Adicionalmente, na triagem fitoquímica, o extrato seco mostrou reação positiva para saponinas, esteroides e taninos, a fração hexânica mostrou reação positiva para esteroides e a acetato-etílica para saponinas e esteroides. Portanto, as frações hexânica e acetato-etílica das folhas de *T. patens* apresentaram promissora atividade antimicrobiana, sendo candidatas a estudos futuros na busca de substâncias com ação antimicrobiana, na busca por novos fármacos com atividade frente a bactérias Gram negativas, positivas e fungos patogênicos. Adicionalmente, o extrato seco demonstrou boa atividade sequestrante de radicais DPPH e quantidade significativa de polifenóis (17,4 mg GAE/g de extrato). O extrato seco e as frações com melhor ação antimicrobiana mostraram baixa citotoxicidade. Foram propostos, por espectrometria

de massas, os esteroides estigmasterol, β -sitosterol e campesterol como metabólitos presentes nas folhas de *T. patens*.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Ação antimicrobiana. *Talinum patens*. Estudo farmacognóstico. *Candida albicans*.

ABSTRACT

Plants have been used for therapeutic purposes since ancient times, and currently, through studies of safety, efficacy and quality they become possible alternatives as herbal medicines, or through prospective trials, promising sources of molecules prototype drug candidates. In recent years, the emergence of multi-resistant microorganisms to antimicrobial agents available in medical practice has been the reason for continued concern by the scientific community, directing search for new antimicrobials. *Talinum patens* (L.) Willd (Talinaceae) is a plant widely used in cooking and for therapeutic purposes in folk medicine. In this context, the objective of this research was to carry out a pharmacognostic study of *T. patens*, including the evaluation of antibacterial, antifungal, anti-mycobacteria, leishmanicidal and radical scavenger from dry leaves hydroethanolic extract and its fractions: hexane, ethyl acetate, butanol and water. Evaluation of the antimicrobial activity was performed by the methods of agar diffusion and broth microdilution, getting through the minimum inhibitory concentration (MIC). Dried extract showed MIC of 250 and 500 µg/ml against *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* respectively, and the hexane fraction was more effective against Gram-positive bacteria and yeasts with MIC of 31.2 µg /ml for *Micrococcus luteus* and *Candida albicans*. Ethyl acetate fraction was active against Gram-negative bacteria with MIC of 31.2 µg/ml for *Escherichia coli*. In addition, at phytochemical screening, dried extract showed a positive reaction for saponins, steroids and tannins. The hexane fraction showed a positive reaction for steroids and ethyl acetate to saponins and steroids. Therefore, hexane and ethyl acetate fractions from *T. patens* leaves showed promising antimicrobial activity, being candidates for future studies in research for substances with antimicrobial activity and new drug candidates against Gram-negative and positive bacteria and pathogenic fungi. Additionally, dried extract showed good scavenging activity of DPPH radicals and significant concentration of polyphenols (17.4 mg GAE/g extract). It was proposed by mass spectrometry, as secondary metabolites, the steroids stigmasterol, kaempsterol and β -sitosterol.

Keywords: Plant extracts, antimicrobial activity; *Talinum patens*; pharmacognostic study, *Candida albicans*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotografia de <i>Talinum patens</i> L. Willd.	13
Figura 2 - Microplaca para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
Figura 3- Avaliação da atividade anti-micobacteriana	36
Figura 4- Percentual de atividade das frações provenientes da folha de <i>Talinum patens</i> (L.) Willd. com CIM inferiores a 100 µg/ml	41
Figura 5- Índice de susceptibilidade microbiano (ISM, %) frente às frações provenientes da folha de <i>Talinum patens</i> (L.) Willd. com CIM inferiores a 100 µg/ml	41
Figura 6- Curva de calibração de ácido gálico para cálculo do teor de polifenóis	46
Figura 7- Porcentagem de atividade antioxidante do extrato seco das folhas de <i>T. patens</i>	47
Figura 8- CC50 e CC90 do extrato seco e frações hexânica e acetato-etílica das folhas de <i>T. patens</i> (L.) Willd.....	48
Figura 9- Espectro de massas full scan do extrato seco de <i>T. patens</i>	49
Figura 10- Espectro de massas full scan da fração acetato etílica de <i>T. patens</i>	50
Figura 11- Espectro de massas full scan da fração hexânica de <i>T. patens</i>	50
Figura 12 - Espectro de segunda ordem obtido a partir de m/z 400	51
Figura 13- Fragmentação a partir do composto de m/z 400	51
Figura 14- Fragmentação de esteroides segundo Djerassi (1978)	52
Figura 15- Fragmentação de esteroides segundo Djerassi (1978)	52
Figura 16- Fragmentação de esteroides segundo Galli & Maroni (1967)	53
Figura 17- Espectro de segunda ordem obtido a partir de m/z 413	54
Figura 18- Fragmentação a partir do composto de m/z 413	54
Figura 19- Espectro de segunda ordem obtido a partir de m/z 415	55
Figura 20- Fragmentação a partir do composto de m/z 415	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hierarquia taxonômica de <i>T. patens</i> (L.) Willd.	12
Tabela 2 - Diâmetros das malhas escolhidas para realização da granulometria do pó das folhas de.....	20
Tabela 3 - Reações de identificação	23
Tabela 4 - Granulometria do pó das folhas de <i>T. patens</i>	28
Tabela 5 - Resultados dos ensaios fitoquímicos para a droga e extrato seco de <i>Talinum patens</i> (L.) Willd.	31
Tabela 6 - Resultados dos ensaios fitoquímicos para as frações provenientes do extrato seco das folhas de <i>Talinum patens</i> (L.) Willd.	33
Tabela 7 - Intervalo (I) e média (M) ¹ dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento microbiano(em mm) e valores de CIM (em µg/ml) do extrato proveniente das folhas de <i>Talinum patens</i> L. Willd e suas frações contra diferentes micro-organismos de importância médica.	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO LITERÁRIA	12
2.1	ASPECTOS FARMACOBOTÂNICOS DE TALINUM PATENS (L.) WILLD....	12
2.2	PLANTAS E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	14
2.3	ALEISHMANIOSE E A ATIVIDADE LEISHMANICIDA	15
2.4	POLIFENÓIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	17
2.5	OBJETIVOS	17
2.5.1	Geral.....	17
2.5.2	Específicos	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	19
3.2	IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	19
3.2.1	Secagem	19
3.2.2	Granulometria	20
3.2.3	Perda por dessecação	20
3.2.4	Cinzas totais e insolúveis em ácido	21
3.2.6	Substâncias extrativas por etanol	21
3.2.7	Obtenção do extrato seco e suas frações.....	22
3.3	TRIAGEM FITOQUÍMICA	22
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	23
3.4.1	Micro-organismos avaliados	23
3.4.2	Avaliação da atividade antimicrobiana	24
3.4.2.1	Difusão em agar	24
3.4.2.2	Determinação da concentração inibitória mínima (cim) por microdiluição	25
	em caldo.....	25
3.5	VALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	26
3.6	AVALIAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO DE T. PATENS	26
3.7	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO SECO E FRAÇÕES	27
3.8	SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	27

3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1	GRANULOMETRIA.....	28
4.2	PERDA POR DESSECAÇÃO.....	29
4.3	CINZAS TOTAIS E CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO	29
4.4	SUBSTÂNCIAS EXTRATIVAS POR ETANOL.....	30
4.5	TRIAGEM FITOQUÍMICA	31
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	34
4.6.1	Avaliação da atividade antimicobacteriana.....	45
4.6.2	Atividade leishmanicida.....	46
4.7	AVALIAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO DE T. PATENS	46
4.8	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO SECO E FRAÇÕES	48
4.9	SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	49
5	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

As plantas com propriedades medicinais foram observadas pelo homem quando da procura por alimentos de fonte vegetal, e desde então, foram utilizadas empiricamente para o tratamento de patologias. Num primeiro momento, os medicamentos à base de plantas, em geral, eram utilizados oralmente na forma de pó, de infusão (chá) ou de decocto e via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo (WAGNER; WISENAUER, 2006). Atualmente, aproximadamente 25% dos fármacos empregados nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores. No entanto, durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são, em proporção majoritária, oriundo de pesquisas realizadas na China, na Coreia e no Japão, sendo que a contribuição dos países ocidentais neste período foi bem menor (LOSOYA, 1997).

A principal matéria médica utilizada pelas chamadas medicinas tradicionais, ou não ocidentais, em suas práticas terapêuticas, advém das plantas, sendo a medicina popular a que utiliza o maior número de espécies (HAMILTON, 2003). Em geral, o conhecimento popular é desenvolvido por grupamentos culturais que ainda convivem intimamente com a natureza, observando-a de perto no seu dia-a-dia e explorando suas potencialidades, mantendo vivo e crescente esse patrimônio pela experimentação sistemática e constante (ELISABETSKY, 1997).

O panorama da fitoquímica é muito mais importante e decisivo para o Brasil, num futuro próximo, ao considerarmos sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo e as possibilidades que observamos para o desenvolvimento de novos medicamentos (YUNES, 2001).

Adicionalmente, plantas são promissoras fontes de moléculas protótipo, na busca por substâncias com atividade biológica e de novos medicamentos para tratar as doenças infecto-parasitárias (DIP) e crônico-degenerativas (DCD). Assim, a triagem da bioatividade de plantas representa um importante passo, seja para obtenção de novos fitoterápicos, ou para o isolamento de substâncias que possam tornar-se novos medicamentos (POWLES; MEHTA, 1996; BUTLER, 2005; MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007, CHANDRA, 2010). Além disso, a alternativa terapêutica propiciada pelo estudo de plantas poderia contribuir para o acesso da população mais pobre ao tratamento de doenças infecto-parasitárias, principalmente aquelas que são frequentemente

referidas como negligenciadas pela grande indústria farmacêutica (CHANDRA, 2010; NAVARRO et al., 2010).

Neste contexto, o Brasil é sempre um país privilegiado devido a sua vasta biodiversidade disponível para ser pesquisada, com pouco menos de um quarto já efetivamente explorado para tal finalidade, destacando-se seu racional uso para fins medicinais (MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006).

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 ASPECTOS FARMACOBOTÂNICOS DE *TALINUM PATENS* (L.) WILLD

Talinaceae é uma pequena família de plantas dicotiledôneas dentro da ordem cariofilales, compreendendo os gêneros *Talinella* e *Talinum*, sendo ao todo 27 espécies distribuídas na América e África (STEVENS, 2001). Anteriormente estes dois gêneros eram dispostos em Portulacaceae, porém a análise filogenética de dados moleculares indica que se deve considerá-los como uma família independente (APPLEQUIST et al., 2006).

A posição hierárquica da família Talinaceae e da espécie *Talinum patens* (L.) Willd. pode ser observada pela tabela taxonômica abaixo:

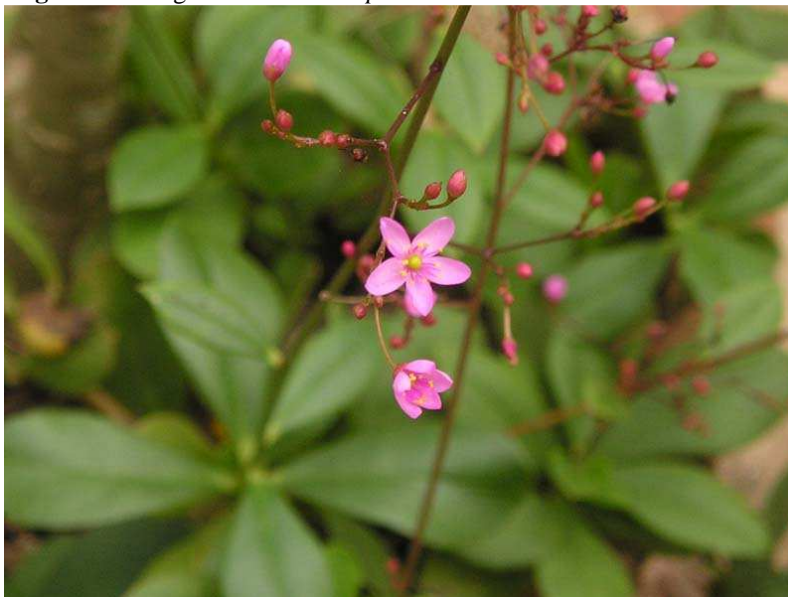
Tabela 1 - Hierarquia taxonômica de *T. patens* (L.) Willd.

Reino	<i>Plantae</i>	Ordem	<i>Caryophyllales</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>	Subordem	<i>Portulacineae</i>
Subdivisão	<i>Magnoliophytina</i>	Família	<i>Talinaceae</i>
Classe	<i>Rosopsida</i>	Gênero	<i>Talinum</i>
Subclasse	<i>Caryophyllidae</i>	Espécie	<i>Talinum patens</i> (L.) Willd.
Super Ordem	<i>Caryophyllanae</i>		

Fonte: SOARES (2005).

A planta *T. patens* pode alcançar até 60 cm de altura, apresenta a raiz carnosa e suculenta. As folhas são opostas pecioladas bem carnosas e suculentas de bordo liso. As flores são pequenas, aparecendo nas extremidades da haste floral, de coloração amarela ou rósea e, somente com a luz do sol, podem se abrir. O fruto é uma cápsula globosa e pequena que contém as sementes. Sua origem é na América Tropical, com ampla distribuição em todos os estados brasileiros. Reproduz-se através das sementes, de preferência em solos úmidos, sombrios e com matéria orgânica, crescendo espontaneamente em todo Brasil, principalmente em pomares, cafezais, beira de matas e terrenos baldios. Em outros países, como Estados Unidos, é conhecida e comercializada como planta ornamental. É uma planta invasora e a colheita ocorre a qualquer época do ano (RAMOS et al., 2010). Possui como principais constituintes: água, mucilagem, taninos, sais minerais, ácido fólico e pigmentos como caroteno (PANIZZA, 1998).

Figura 1- Fotografia de *Talinum patens* L. Willd.



Fonte: <http://www.mytho-fleurs.com>

A espécie *T. patens*, no Brasil conhecida popularmente como erva-gorda, língua-de-vaca e, em outros países, como “java ginseng” e “jewels of opar” apresenta propriedades terapêuticas principalmente como emolientes. As folhas e as sementes são indicadas no tratamento tópico de feridas e cortes favorecendo a regressão e a cicatrização (CARIBÉ; CAMPOS, 1991). Tem sido observado o uso popular de *T. patens* no tratamento de problemas gastrintestinais, de urinas com mau cheiro, de edemas, de infecções intestinais, de fraqueza em geral como as fadigas, de cansaço físico e mental, debilidade orgânica e afecções da pele como os pruridos intensos, as coceiras, os eczemas, e a erisipela. O decocto das raízes é indicado no tratamento de escorbuto e as folhas da planta são mencionadas como hortaliça para a alimentação humana (MARTINS et al., 2000). Na China, leste da Ásia e alguns países da América do Sul, as raízes desta planta são usadas como tônico para os homens e na cura da pneumonia. Soares (2005) mostrou que sua ingestão *in-natura* pode trazer mais riscos à saúde do que o chá ou decocto, devido às diferenças nas concentrações dos extratos e a possibilidade de complexos biológicos estarem ligados aos metabólitos desta erva. A toxicidade pode ser devido à elevada concentração de cromo nas folhas. É popularmente utilizada em saladas no norte e no nordeste brasileiro e conhecida por algumas propriedades medicinais, também é conhecida como erva daninha em algumas situações (KISSMANN; GROTH, 1995).

A morfologia da planta “java ginseng” é a mesma do ginseng coreano apresentando compostos ativos das classes de esteróides, saponinas e taninos. Pelo menos dois compostos

ativos similares aos do ginseng coreano foram encontrados, um terpenoide e outro esteróide (WIENTARSIH & RAZIEF, 2006).

Segundo Widiyani (2006), a “java ginseng”, usada comumente como erva afrodisíaca, mostrou efeito anti-fertilidade em ratos machos da espécie *Mus musculus* L., inibindo a espermatogênese e diminuindo a qualidade do líquido espermático, com a diminuição da motilidade dos espermatozoides. Winarni et al. (2007) mostraram sua propriedade de recuperar os níveis de testosterona até níveis normais, aos quais não sobrepujou. Neste estudo, o extrato metanólico se mostrou mais efetivo que o extrato hexânico e o beta-sitosterol padrão. Cruz (2009) mostrou que o extrato diclorometano das folhas de *Talinum triangulare*, planta pertencente ao mesmo gênero que *T. patens*, apresentou a inibição de 95 % do crescimento de *Leishmania amazonensis* na concentração de 100 µg/ml com um IC₅₀ de 31 µg/ml enquanto que o extrato hexânico apresentou um IC₅₀ de 56 µg/ml.

2.2 PLANTAS E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Atualmente, a resistência aos agentes antimicrobianos é oriunda em parte pela habilidade dos micro-organismos em adquirir e transmitir genes relacionados à resistência através de plasmídeos, complementados pelo uso indiscriminado desta classe terapêutica, o que impõe a necessidade permanente de pesquisas e desenvolvimento de novas substâncias necessárias ao tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos multi-resistentes. A busca de antimicrobianos tem sido respaldada na natureza, cuja fonte de novas substâncias faz desta de um grande potencial para a bioprospecção, principalmente no Brasil, um país que oferece uma potencial fonte, em sua maior parte inexplorada, para tal finalidade (MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; ZHANG et al., 2006; KRISTIANSOON et al., 2011).

Desde a antiguidade, as plantas são usadas como uma terapia alternativa ou adjuvante frente a processos patológicos infecciosos com o intuito de desfrutar de seus efeitos antimicrobianos (BIAVATTI et al., 2001). Vários estudos têm sido realizados com produtos do metabolismo vegetal secundário, visando encontrar substâncias com atividade antimicrobiana que possam servir como alternativas terapêuticas efetivas contra as infecções por micro-organismos resistentes aos antibióticos (ACOSTA et al., 2003).

O estudo de novos agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Além disso, estudos de triagem na descoberta da atividade farmacológica de plantas podem representar um primeiro passo na obtenção de novos agentes antimicrobianos, sendo de extrema importância, principalmente no Brasil onde existe uma enorme biodiversidade, embora pouco explorada (STOB, 2000; MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006). Assim, as pesquisas de novas substâncias com ação antimicrobiana podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na disputa contra a resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

Embora a triagem possa representar uma importante ferramenta, alguns problemas dificultam o seu emprego para o desenvolvimento de medicamentos como a complexidade molecular de produtos naturais e o longo tempo necessário para o descobrimento de moléculas até o seu uso, sendo consideráveis obstáculos para emprego em larga escala (STOB, 2000).

Nos últimos anos, pesquisas têm mostrado que diferentes classes de metabolitos secundários podem estar relacionadas à ação antimicrobiana, incluindo, taninos, saponinas, esteróides, triterpenos, flavonoides e ácidos fenólicos e seus ésteres (MARCUCCI et al., 2001; MÜLLER, 2006). Apesar dos mecanismos de ação para compostos complexos como extratos vegetais estarem pobremente caracterizados, alguns autores sugerem que o mecanismo de ação possa estar associado ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células (SIKKEMA et al., 1995). Além disso, o rompimento da membrana celular alterando sua permeabilidade ou a formação de complexos com proteínas-enzimas ou íons metálicos vitais ao microrganismo, inibindo estes e alterando o metabolismo microbiano, são relatados em estudos *in vitro* (SCALBERT, 1991; BRUNETON, 1999; COWAN, 1999; SCHENKEL et al., 2001; VERDI et al., 2005).

2.3 A LEISHMANIOSE E A ATIVIDADE LEISHMANICIDA

A Leishmaniose é uma doença causada por pelo menos 17 espécies de protozoário do gênero *Leishmania* (CROFT; COOMBS, 2003). As formas da doença estão relacionadas à espécie do parasito, e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros e vetores envolvidos,

taxas de incidência e de mortalidade (ASHFORD et al., 1992). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 88 países são afetados, compreendendo 12 milhões de pessoas infectadas, colocando em risco de contaminação outras 350 milhões de pessoas (OSÓRIO et al., 2007).

A quimioterapia utilizada no tratamento da leishmaniose é baseada na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos, conhecidos como antimônios, entre eles os mais usados são o antimônio de meglumina (Glucantime®) e o stibogluconato de sódio (Pentostan®). Quando este tipo de tratamento não é efetivo, outros medicamentos como Pentamidina e Anfotericina B também são utilizados. Todos esses medicamentos são de administração injetável e requerem supervisão clínica ou hospitalização devido à severidade dos efeitos colaterais (CHAN-BACAB; PENARODRIGUEZ, 2001). Assim, o tratamento da leishmaniose não é satisfatório em termos de efetividade e toxicidade, a resistência a drogas já existentes e a sensibilidade de diferentes cepas às drogas existentes também dificultam o tratamento (OSÓRIO et al., 2007; NAVARRO et al., 2010).

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (CARVALHO; FERREIRA, 2001). Plantas que são usadas tradicionalmente para o tratamento de doenças causadas por protozoários vêm recebendo considerável atenção em pesquisas na procura de novas drogas com atividade antiparasitária (TEMPONE et al., 2005), e os extratos oriundos de plantas podem prover uma imensa fonte de agentes medicinais (ROCHA et al., 2005). Em locais endêmicos, devido à dificuldade de acesso aos medicamentos, vários pacientes acabam utilizando tratamentos populares para aliviar os sintomas, muitas vezes esses tratamentos também são utilizados juntamente como o tratamento tradicional (CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUEZ, 2001). Alguns metabólitos secundários encontrados em plantas vêm sendo estudados no tratamento de doenças parasitárias, incluindo alcalóides e acetogeninas presentes em plantas da família das Annonaceae (TEMPONE et al., 2005; OSÓRIO et al., 2007).

2.4 POLIFENÓIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Polifenóis são compostos que possuem um ou mais anéis aromáticos e um ou mais grupos hidroxila ligados a estes anéis, e tem como principais rotas de síntese as vias do chiquimato e do acetato-ácido mevalônico (OBOH; ROCHA, 2007). Fenóis de origem vegetal incluem, dentre outros, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos.

Radicais livres incluem os superóxidos, óxido nítrico, dióxido nítrico, peroxilas e peroxilas lipídicas. Incluem ainda peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos. Radicais livres biológicos são moléculas altamente instáveis, que possuem elétrons livres para reagir com vários substratos orgânicos como lipídeos, proteínas, DNA e, eventualmente, dar início ao estresse oxidativo (KAUR; KAPOOR, 2001; AMIC et al., 2003). A geração de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo de um sistema biológico dá origem ao estresse oxidativo, que tem um papel importante na geração de doenças cardíacas, neurodegenerativas, câncer e envelhecimento e os antioxidantes obtidos na dieta vão em direção oposta a este efeito, diminuindo o risco de doenças.

A ideia de atividade antioxidante de compostos fenólicos não é nova (BORS et al., 1990), compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, estão diretamente relacionados com a eficácia na proteção contra a peroxidação lipídica nas membranas biológicas, e, conseqüentemente, na sua atividade antioxidante (BARREIRA et al., 2008).

2.5 OBJETIVOS

2.5.1 Geral

O foco desta pesquisa foi à obtenção e padronização da droga vegetal obtida a partir das folhas de *Talinum patens*, paralelamente ao conhecimento do seu perfil fitoquímico. Adicionalmente, foram avaliadas as atividades antimicrobiana, antiparasitária do extrato seco destas folhas e suas frações: hexânica, acetato-etílica, butanólica e aquosa.

2.5.2 Específicos

- Padronização da droga vegetal;
- Prospecção fitoquímica
- Avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas, Gram negativas, aos fungos e às micobactérias;
- Avaliação da atividade leishmanicida.
- Avaliação do teor de polifenóis e atividade sequestrante de radicais DPPH
- Avaliação da citotoxicidade do extato seco e frações
- Identificação de metabólitos secundários por Espectrometria de massas (EM)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas de *T. patens* foi realizada na Fazenda Ponte Alta, próxima ao município de Fama, cujos dados geográficos são: S. 21° 24' 53.4"; O. 45° 52' 15.8".

3.2 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A identificação da espécie *Talinum patens* (L.) Willd (Talinaceae) foi realizada pelos métodos farmacobotânicos preconizados, tendo sido depositada no Herbário UALF da Universidade Federal de Alfenas, e depois de identificada, recebeu o número de exsicata 2338.

3.2.1 Secagem

As partes coletadas da espécie vegetal foram pesadas, previamente divididas, separadas e dispostas em camadas finas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 40 °C durante onze dias, tempo necessário para a completa secagem. A temperatura da estufa foi controlada por um termostato e um termômetro, os quais garantiram uma homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem. Uma quantidade de 100 g das folhas foi utilizada como controle para peso constante. O tempo de secagem das folhas de *T. patens* foi de 250 h até a obtenção de peso constante. A percentagem final de massa seca foi de 5,26 %, indicando que há 94,74 % de água nas folhas.

3.2.2 Granulometria

As metodologias utilizadas para reduzir o tamanho do material vegetal foram escolhidas conforme suas características. A princípio, o material passou por uma divisão grosseira seguida por uma pulverização obtida em moinho de facas. O pó obtido foi armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados. Para a padronização do tamanho das partículas do pó da espécie foi utilizado o procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Os pós após a moagem foram submetidos a tamises de malhas diferentes, providos de tampas e recipiente para a coleta do pó. A agitação, em movimento horizontal rotativo e movimento vertical foram de no mínimo 20 minutos ou o tempo necessário para que a operação fosse completada. Após essa etapa, o tamanho das partículas foi mensurado, tendo como referências as descrições feitas pela WHO (1998). As malhas utilizadas e seus respectivos diâmetros estão relacionados na **Tabela 2**.

Tabela 2- Diâmetros das malhas escolhidas para realização da granulometria do pó das folhas de *T. patens* (L.) Willd.

Malha (nº)	Diâmetro (µm)
20	850
25	710
35	500
45	355
60	250

Fonte : Do autor

3.2.3 Perda por dessecação

Transferiu-se cerca de 5,0 g, exatamente pesados, da droga preparada conforme instruções anteriores, para pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. Dessecou-se a droga a 100-105 °C durante 5 horas, até peso constante. Posteriormente, foi feito o cálculo da porcentagem de perda em relação ao peso inicial (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

3.2.4 Cinzas totais e insolúveis em ácido

Foram pesados exatamente de 5,0 g da amostra pulverizada e transferidos para cadinho de silício previamente pesado. A seguir, a amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e a incineração ocorreu aumentando-se gradativamente a temperatura até um máximo, 600 ± 25 °C, quando todo o carvão foi eliminado. Após resfriado em dessecador, as cinzas foram pesadas e o percentual calculado em relação ao peso total (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os resíduos obtidos na determinação de cinzas totais foram fervidos durante 5 minutos com 25 ml de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 ml de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sobre papel de filtro, isento de cinzas, em seguida o lavando com água quente até que o filtrado tivesse se mostrado neutro. Após, o papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, e seco sobre chapa quente e novamente incinerado a cerca de 500 °C até peso constante. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar foi calculada em relação ao peso inicial, do método anterior, de 5,0 g (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

3.2.6 Substâncias extrativas por etanol

Método de extração a frio: Para um erlenmeyer de 250 ml, foram transferidos cerca de 2,0 g da droga vegetal seca, finamente pulverizada. Macerou-se com 50 ml de etanol, durante 6 h, sendo agitado frequentemente, e deixado em repouso por 18 h. Em seguida, filtrou-se rapidamente sem perder qualquer quantidade de solvente e transferiu-se 25 ml do filtrado para uma cápsula de porcelana tarada sendo em seguida o conteúdo evaporado até secura em banho de água. Secou-se a 105 °C por 6 h, depois de esfriado em dessecador por 30 minutos, foi imediatamente pesado. O cálculo da porcentagem de materiais extraídos em mg/g de material vegetal seco foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), sendo que uma porção de 25 ml equivale a 1,0 g da droga, portanto, a massa do resíduo em gramas multiplicada por 100 equivale ao percentual de material extraído.

3.2.7 Obtenção do extrato seco e suas frações

O extrato foi obtido através do método de extração exaustivo de percolação simples (PRISTA et al., 1995). O processo teve início com o intumescimento prévio de 200 g do pó com o líquido extrator durante 2 horas, fora do percolado. Após esse período, o percolador (álcool: água 7:3 v/v) foi empacotado com a mistura. O empacotamento foi feito de uma forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A vazão do percolado foi de 1,0 ml/min/Kg de droga vegetal.

Extratos secos são preparações sólidas que foram obtidas pela evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Apresentaram, no mínimo, 95% de resíduo seco, calculados como percentagem de massa. Os extratos secos podem ser adicionados de materiais inertes adequados. Os extratos secos padronizados têm o teor de seus constituintes ajustado pela adição de materiais inertes.

Após a extração, o extrato fluído foi rotoevaporado sob pressão reduzida, em temperatura 45° C. Os extratos foram transferidos para vidros tarados e posteriormente liofilizados para completa remoção da água e obtenção do extrato seco (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Para obtenção das frações, extrato seco foi submetido à partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila, e butanol, sendo obtidas as frações hexânica, acetato-etílica e butanólica e um resíduo denominado fração aquosa como descrito previamente por Silva et al. (2004).

3.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA

A droga, o extrato seco e as frações obtidas da espécie *Talinum patens* (L.) Willd. foram utilizados nos testes analíticos qualitativos para detectar os metabólitos secundários. A extração a partir da droga foi feita de acordo com as classes pesquisadas; o extrato seco e as frações foram solubilizados em água ou solvente orgânico para melhor visualização dos resultados. Os metabólitos abaixo descritos foram pesquisados de acordo com a metodologia descrita por Costa, (1982).

Tabela 3 - Reações de identificação

Grupo fitoquímico	Reagentes de identificação
Alcaloides	Mayer Dragendorff Bertrand Bouchardat
Antraquinonas	Borntraeger direto e indireto
Esteroides	Liebermann-Buchard
Flavonoides	Shinoda Cloreto de Alumínio Cloreto de Ferro
Glicosídeos cardiotônicos	Acido acético glacial/H ₂ SO ₄ Keller-Killiane
Saponinas	Espuma Espuma ácido-resistente
Taninos	Cloreto de Ferro Precipitação de gelatina Precipitação alcaloídica Acetato de Cobre

Fonte: Do autor

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.4.1 Micro-organismos avaliados

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizados os micro-organismos provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) e provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LMI) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sendo estes, os fungos: *Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601; as bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; as bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* LMI-UNIFAL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* LMI-UNIFAL e as

micobacterias: *Mycobacterium bovis* (cepa BCG) ATCC 27289 e *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Ra) ATCC 27294.

3.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A triagem da atividade antimicrobiana do extrato seco e das frações foi a princípio avaliada pelo método de difusão em agar seguido da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as metodologias constantes nos documentos M7A6 (CLSI, 2003) para bactérias aeróbias de crescimento rápido, M24A2 (CLSI, 2008) para Micobacterias e M44A2 (CLSI, 2009) e M27A3 (CLSI, 2008) para fungos.

3.4.2.1 Difusão em agar

Na utilização do método de difusão em agar para avaliar a atividade dos extratos e frações contra bactérias e fungos, optou-se por utilizar a técnica de perfuração em agar, segundo o documento CLSI (2008; 2009) com modificações segundo Silva et al. (2010). Primeiramente, os meios de cultivo, Ágar Mueller Hinton para bactérias e Mueller Hinton adicionado de 2% de glicose para os fungos foram preparados e vertidos em placas de Petri, onde, em seguida, foram confeccionados poços de 4 mm de diâmetro na superfície do agar. A seguir, suspensões dos micro-organismos em solução salina (NaCl a 0,9%) com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland foram preparadas e inoculadas na superfície do meio de cultura das placas. Em seguida, os extratos secos da folha a uma concentração de 40 mg/ml e as frações hexânica, acetato-etílica, butanólica e aquosa a uma concentração de 10 mg/ml foram adicionados aos poços num volume de 40 µL. Clorexidina a 0,12% e água destilada foram utilizados como controle positivo e negativo respectivamente. Finalmente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, sendo que após este período ocorreu à leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano. Para *M. bovis* e *M. tuberculosis* (H37) a avaliação antimicrobiana foi determinada pela técnica de difusão em meio Agar Middlebrook 7H10 em garrafas de cultivo celular. Primeiramente, extrato seco e frações foram impregnados por absorção em discos de papel de filtro tipo

xarope de 10 mm de diâmetro e posteriormente secos em estufa a 37°C seguindo as mesmas concentrações na avaliação pelo método do poço. A seguir, suspensões de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland, desagregados com auxílio de pérolas de vidro, foram inoculados na superfície do agar. Como controle positivo utilizou-se Rifampicina 30 µg e água destilada como controle negativo. As garrafas foram incubadas por 28 dias a 37°C, quando em seguida os halos de inibição foram mensurados. Os testes foram realizados em triplicata.

3.4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (cim) por microdiluição em caldo

Posteriormente a realização do método de difusão em agar, foi obtida a CIM para o extrato seco e suas frações, através do método de microdiluição em caldo conforme metodologia proposta nos documentos M7A6, M27A3 do CLSI, (2003; 2008). Por intermédio deste método, o extrato e as frações provenientes de *T. patens* foram avaliados frente aos micro-organismos supracitados. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços estéreis. Inicialmente, 100 µl de caldo Mueller Hinton foram dispensados dentro dos poços. A seguir, os extratos foram serialmente diluídos dentro dos poços com concentração abrangendo de 4 até 0,0312 mg/ml. Em seguida, a partir do cultivo por 16 h dos micro-organismos, foram preparadas as suspensões com turbidez ajustada de acordo com a escala de Mac Farland em solução salina, quando em seguida foram adicionados em cada poço a um volume de 10 µl. As colunas 11 e 12 e linha H da microplaca foram reservadas aos controles. O controle de promoção de crescimento (H) foi composto de 100 µl de caldo Mueller Hinton mais 10 µl de cada inóculo, o controle de extrato foi composto de 100 µl de caldo Mueller Hinton mais 100 µl de cada extrato ou fração (11), e o controle de esterilidade foi composto apenas por 100 µl de caldo Mueller Hinton (12). Finalmente as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Optou-se pela leitura visual, como o preconizado pelo CLSI, principalmente sendo cabível a este experimento, onde devido à complexidade química do extrato seco e frações e do grande número de micro-organismos utilizados e suas peculiaridades quanto à sensibilidade aos corantes, torna-se limitado ou até mesmo inviabilizado a utilização de tais substâncias para a leitura espectrofotométrica. Assim, a mais baixa concentração que produziu inibição do crescimento do microrganismo, detectada visualmente, foi determinada como o valor de CIM.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram cultivadas em uma placa de 24 poços em meio *Schneider's Drosophila* suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado e 1% de penicilina (10000 µL/ml) e estreptomicina (10mg/ml). Os parasitas foram coletados, re-suspendidos em meio alcalino, contados em câmara de Neubauer e ajustados a uma concentração de 1×10^6 células/ml. O extrato seco, na faixa de 0,05 a 100 µg/ml, foi adicionado às culturas de promastigotas, a 1×10^6 células/ml, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (a concentração utilizada foi de 0,6%, v/v em todos os poços) e incubados a 25°C. Após 72h de incubação, os parasitas sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer e comparados com os controles, com apenas DMSO na concentração de 0,6% v/v, para a determinação da concentração inibitória de 50% de crescimento (IC₅₀). Todos os testes foram realizados em triplicata em três diferentes ocasiões e Anfotericina B foi utilizada como controle positivo

3.6 AVALIAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO DE T. PATENS

O método Folin-Ciocalteu foi utilizado para determinar os polifenóis totais de acordo com os procedimentos adotados por Monteiro et al. (2005). A absorbância da solução obtida foi lida em 760 nm. Como padrão utilizou-se o ácido gálico para construção da curva de calibração.

O extrato seco de *T. patens* foi solubilizado com etanol para a pesquisa de atividade antioxidante, de acordo com Vicente et al. (2006). A capacidade sequestrante de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi determinada utilizando-se o método de Brand-Williams et al. (1995). A leitura foi realizada após 30 min. em comprimento de onda de 515 nm. A porcentagem de inibição da formação de radicais DPPH foi calculada a partir da fórmula: $[1 - (A_{amostra} - A_{branco}) / (A_{controle} - A_{branco})] \times 100$.

3.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO SECO E FRAÇÕES

O ensaio de citotoxicidade foi feito pelo método de microcultura MTT de acordo com Dias et al. (2012). Foram utilizadas células BHK-21, fornecidas pelo Departamento De Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG. A partir desta metodologia foram determinadas as concentrações citotóxicas para 50 e 90% das células em microcultura (CC50 e CC90).

3.8 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise fitoquímica do extrato seco e frações foi realizada utilizando a técnica de EM por injeção direta. Foi utilizado o Espectrometro de massas Shimadzu LCMS8030 e a energia de fragmentação selecionada foi de – 20 eV. Os compostos foram analisados no extrato seco e nas frações hexânica e acetato-etílica, sendo os de maior intensidade selecionados para fragmentação posterior e identificação. As análises foram feitas no Laboratório de Análises Toxicológicas (UNIFAL-MG) com a colaboração da Professora Vanessa Bergamin Boralli Marques.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise da atividade antimicrobiana por difusão em agar, a fim de comparar as médias dos experimentos, feitos em triplicata, foram realizadas análises estatísticas por Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Scott & Knott (1974) como um posterior teste para comparação múltipla de médias, onde a diferença entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. O software Sisvar Versão 5.3/DEX-UFLA (COPYRIGHT, 1999-2010) foi utilizado nas análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 GRANULOMETRIA

A partir das malhas escolhidas realizou-se a granulometria do pó das folhas secas e moídas de *T. patens*. Segundo a literatura (LIST; SCHMIDT, 2000), o tamanho das partículas da droga pulverizada representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo, pois para aqueles que envolvem percolação, o pó muito fino (abaixo de 0, 125 μm) pode favorecer o entupimento do percolador, enquanto o pó muito grosso diminui a quantidade de compostos extraídos.

Tabela 4 - Granulometria do pó das folhas de *T. patens*

Malha	Diâmetro médio (μm)	Massa (g)	Porcentagem (%)
20	850	0,56	0,46
25	710	2,33	1,94
35	500	28,46	23,57
45	355	28,38	23,50
60	250	35,66	29,52
0	-	25,38	21,01
Total		120,77	

Fonte: Do autor

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) quando não mais que 40 % do conteúdo do pó passam pela malha de 250 μm de espessura considera-se como moderadamente grosso, classificação em que se encaixa a granulometria do pó da droga de *T. patens*, visto que apenas 21,01 % (**Tabela 4**) do pó passaram pela malha com abertura nominal de 250 μm .

4.2 PERDA POR DESSECAÇÃO

Este tipo de análise é importante uma vez que pode fornecer informações com referência ao armazenamento da droga vegetal. A água residual encontrada na droga vegetal seca está diretamente relacionada com o seu correto armazenamento, que pode acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos por ação enzimática.

A perda por dessecação da droga foi de 9,3%, visto que a perda média foi de 0,465 g, o que corresponde à umidade presente na droga, em 5,0 g pesados em triplicata. Pode-se afirmar que os valores característicos da perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de controle de qualidade da droga obtida das folhas de *T. patens*. O limite máximo recomendado de umidade para drogas vegetais é de 14% (SIMÕES et al., 2004) e por isso constatou-se que o valor encontrado na análise da droga apresentou resultado satisfatório.

4.3 CINZAS TOTAIS E CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO

Cinzas totais de uma planta é o nome dado aos resíduos inorgânicos que permanecem após a queima da matéria orgânica, entre 550 – 570°C, a qual é transformada em CO₂, H₂O e NO₂, assim sendo, a cinza de um material é o ponto de partida para a análise de minerais específicos. Estes minerais são analisados tanto para fins nutricionais como também para segurança e controle de qualidade (CECCHI, 2001).

Considerando-se que foi utilizado um total de 3,0 g, a média percentual de cinzas totais em relação à droga vegetal foi de 13,00 %.

A partir dos resíduos das cinzas totais foram feitos os testes para cinzas insolúveis em ácido.

O percentual médio de cinzas insolúveis em ácido na droga vegetal foi de 4,1 %%. Neste teste são esperados, na maioria das drogas vegetais, valores pequenos, devido ao fato de que este tipo de cinzas corresponde às cinzas não-fisiológicas, provenientes de material estranho, especialmente areia e terra. Sabe-se, no entanto que algumas espécies, apresentam

valores altos de cinzas sem que isto represente contaminação, sendo uma característica do gênero ou da espécie (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

Em se tratando de drogas vegetais, o principal objetivo destes tipos de ensaio é a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes, um maior percentual de cinzas pode significar um alto índice de impurezas na droga vegetal, sendo valor de referência para cinzas totais de até 14 % e para cinzas insolúveis em ácido entre 2,0 e 6,0 % (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998). Um alto teor de cinzas pode indicar a presença de elementos químicos estranhos na droga vegetal como metais pesados, areia ou pedra, sendo importante à realização destes ensaios para o controle da qualidade das drogas vegetais. O conteúdo de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido constituem, dentro de certo limite, um índice de identificação e pureza da droga vegetal (FARIAS, 2004).

Os resultados mostraram, desta forma, que a droga está com percentuais de cinzas totais e insolúveis em ácido dentro dos valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira (1998).

4.4 SUBSTÂNCIAS EXTRATIVAS POR ETANOL

A determinação do de substâncias extrativas tem a finalidade de conhecer o quanto pode ser extraído por um determinado solvente a partir de um material vegetal (SILVÉRIO et al., 2006).

Os resultados mostraram que, utilizando-se uma solução extrativa etanol, há uma extração de 17,0 % do conteúdo da droga vegetal de *T. patens*. Isto significa que, ao utilizar como líquido extrator o etanol 70°, para 100 g da droga vegetal são esperados 17 g de sólidos solúveis. O resultado do ensaio de substâncias extrativas depende de fatores como características químicas da droga vegetal (polaridade dos constituintes), seletividade do solvente e também da granulometria, sendo os pós mais finos com maior eficiência de extração. Considerando que o processo de extração ocorre pela difusão das substâncias da droga para o solvente, o estado de divisão das partículas (granulometria) tem influência significativa, pois aumentando o grau de tenuidade do pó (fino e moderadamente fino) tem-se aumentada a difusão e o contato entre o solvente e a droga, devendo ser levado em conta, porém, que o aumento da tenuidade do pó também pode facilitar o aparecimento aglomerados,

que serão prejudiciais ao processo de extração (FONSÊCA, 2005). Adicionalmente, o processo extrativo pode influenciar na atividade biológica (antimicrobiana, por exemplo), devido à interferência deste processo na concentração final dos bioativos (ELOFF, 1998; ELOFF, 2004; OSTROSKY et al., 2008).

4.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Primeiramente, o processo de triagem fitoquímica é baseado no princípio de que toda e qualquer substância encontrada na planta, independente da sua concentração, pode ser um princípio ativo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Embora uma planta possa produzir centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos de maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. As plantas produzem uma ampla variedade de compostos como alcalóides, terpenos, fenóis, entre outros, no intuito de defesa contra herbívoros, micro-organismos e raios UV, bem como atração de polinizadores e animais dispersores de sementes (WINK, 1990). A análise dos compostos ativos é muito mais complexa e longa, já que, geralmente, estão presentes em menor proporção na planta e apresentam os melhores efeitos biológicos (CECHINEL FILHO et al., 2001). Com o objetivo de analisar os compostos presentes em *T. patens* foram feitas as pesquisas para verificar a presença das principais classes de compostos bioativos em vegetais (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Resultados dos ensaios fitoquímicos para a droga e extrato seco de *Talinum patens* (L.) Willd.

Classe Fitoquímica	Droga	Extrato seco	Classe Fitoquímica	Droga	Extrato seco
Alcaloides	-	-	Flavonoides	-	-
Antraquinonas	-	-	Taninos	+	+
Cardioativos	-	-	Saponinas	+	+
Esteroides	+	+			

Legenda: (+) reação positiva; (-) reação negativa

Fonte: Do autor

Na triagem fitoquímica da droga e do extrato seco verificou-se a presença de três classes farmacognósticas principais: taninos, esteroides, triterpenos e saponinas (**Tabela 5**). A confirmação dos taninos foi feita através das reações com acetato de cobre, cloreto férrico, gelatina e solução alcaloídica. Pela formação de precipitado nestas reações pode-se confirmar a presença de compostos da classe dos taninos tanto na droga vegetal quanto no extrato seco. A reação negativa com a vanilina sulfúrica (**Tabela 5**) confirmou a ausência de taninos condensados no extrato seco e na droga vegetal. Logo, conclui-se que há apenas taninos hidrolisáveis em ambos. A presença de taninos em um extrato pode ser responsável pela atividade antimicrobiana da planta (DJIPA et al., 2000), esta atividade pode ser devida a três características gerais comuns aos dois grupos de taninos (hidrolisáveis e condensados): complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres; habilidade de se complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos (MELLO et al., 2001). A inibição de enzimas por taninos foi demonstrada por Hattori et al. (1990) frente a glucosiltransferases produzidas por *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, isolados da cavidade oral humana. Andarwulan et al. (2010) encontrou concentração média de 64,5 mg/100g de fenóis, nos quais se incluem os taninos, nas folhas de *Talinum triangulare*, planta pertencente ao mesmo gênero de *Talinum patens* (L.) Willd.. Soares (2005) confirmou a presença de taninos nas folhas “in natura” de *T. patens*, forma mais comum de consumo, através da reação de precipitação com cloreto férrico.

As saponinas foram confirmadas pelos testes de espuma e espuma ácido resistente, a persistência da espuma por mais de 15 minutos, juntamente com sua permanência após a adição de HCl diluído, indicaram a presença de saponinas na droga vegetal e no extrato seco (**Tabela 5**). As saponinas podem ser encontradas nos extratos aquosos de *T. triangulare* (ADEYEMI et al., 2011), bem como na droga vegetal liofilizada (OLAJIRE & AZEEZ, 2011). Aja et al. (2010) encontrou concentrações de 1,48 mg/100 g na droga seca de *T. triangulare*, após extração com HCl 1N por 4 h sob fervura, sendo também identificados e quantificados taninos (1,44 mg/100 g), alcalóides (55,5 mg/100 g) e flavonóides (69,8 mg/100 g). As saponinas triterpênicas estão associadas à atividade antibacteriana, antifúngica e espermicida apresentada por uma diversidade de plantas (LACAILLE-DUBOIS & WAGNER, 1996). Além da atividade antimicrobiana, as saponinas triterpênicas apresentam atividade contra vírus (CHAKRABORTY et al., 2002) e protozoários como *Leishmania infantum* (GERMONPREZ et al., 2005).

A reação de Liebermann-Buchard positiva (coloração esverdeada) indicou a presença compostos com estrutura esteroidal (esteróides/triterpenos), como pode ser visto na **Tabela 5**

acima. Thanamool et al. (2013) isolou e identificou cinco compostos do extrato metanólico das folhas e raízes de *T. patens* pertencentes aos esteroides, dentre estes o β -sitosterol e o estigmasterol, também isolados e identificados por Ramos et al. (2010). Os esteróis podem estar associados à atividade estrogênica dose-dependente, podendo ser uma fonte natural de reposição hormonal em mulheres durante a menopausa (THANAMOOL et al., 2013).

Foram pesquisadas, da mesma forma, as classes de compostos nas frações do extrato seco das folhas de *T. patens*, os resultados constam na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Resultados dos ensaios fitoquímicos para as frações provenientes do extrato seco das folhas de *Talinum patens* (L.) Willd.

CLASSE FITOQUÍMICA	Fração Hexânica	Fração Acetato-etílica	Fração Butanólica	Fração Aquosa
Taninos	-	-	+	+
Saponinas	-	+	+	-
Esteroides	+	+	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-
Cardioativos	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	-

Legenda: (+) reação positiva; (-) reação negativa

Fonte: Do autor

A fração hexânica apresentou reação positiva para a classe de compostos esteróides (reação de Liebermann-Buchard), a coloração esverdeada ao final da reação indicou a presença de compostos esteroidais (**Tabela 6**). Ramos et al. (2010) identificou como principais compostos, no extrato hexânico das folhas de *T. patens*, hentriacontano (C₃₁), tritriacontano (C₃₃) e pentatriacontrano (C₃₅), que são hidrocarbonetos de cadeia longa e altamente lipofílicos como se espera para compostos presentes na fração hexânica. Cruz, (2009) isolou e identificou compostos carotenoides do extrato hexânico das folhas de *T. triangulare*, sendo os dois principais o β -caroteno e a luteína.

A fração acetato-etílica apresentou reação positiva, assim como a fração hexânica, para Liebermann-Buchard, indicando, igualmente, a presença de esteróides devido a coloração esverdeada (**Tabela 6**). As reações de espuma e espuma ácido-resistente positivas também indicaram a presença de saponinas nesta fração. Os compostos 3-O- β -D-glicosil- β -sitosterol (saponina) e estigmasterol (esteróide) foram identificados como principais constituintes da fração acetato-etílica das folhas de *T. patens* (RAMOS et al., 2010).

Como pode ser visto na **Tabela 6**, as frações butanólica e aquosa apresentaram reações positivas para a classe dos taninos enquanto que para as classes esteroides as reações foram negativas para ambas as frações. A fração butanólica também se mostrou positiva para a classe das saponinas. Para as classes de alcalóides, flavonóides, cardioativos e antraquinonas todas as frações apresentaram reação negativa, conforme foi constatado no extrato seco e na droga vegetal.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As doenças infecciosas permanecem como as principais causas de morbidade e mortalidade mundialmente. Adicionalmente, apresentam altas taxas de prevalência entre a população mais pobre (WHO, 2012).

Reforçando esta grave questão, o surgimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos nos últimos anos tem se tornado preocupante e conduzido a altas taxas de morbi-mortalidade associadas às infecções por bactérias e fungos patogênicos em todo mundo e constitui-se em um dos maiores problemas no ambiente hospitalar e o uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos tem contribuído para o aumento da multi-resistência aos antimicrobianos quimioterápicos (DALL'AGNOL et al., 2003). Paralelamente, poucos fármacos antimicrobianos têm sido lançados no mercado e a carência de estratégias visando novas alternativas terapêuticas em contraste com o crescente aumento destes micro-organismos é um grande problema, repercutindo na saúde pública em todo mundo (MORSE, 1995; CHANDRA, 2010).

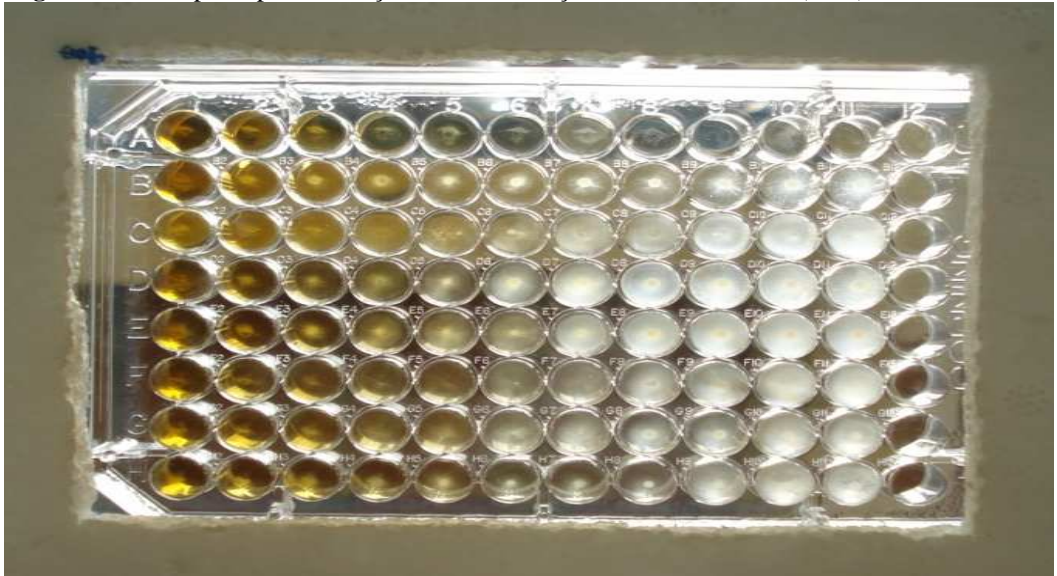
Em razão do grande aumento da resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas, e devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas. O fenômeno da multirresistência aos antimicrobianos disponíveis tem limitado ainda mais o já escasso arsenal terapêutico disponível. Neste contexto, a busca por novos antimicrobianos é uma tarefa urgente e altamente necessária.

Os produtos naturais representam promissoras fontes de compostos bioativos, sendo atrativas quanto à busca por novos antimicrobianos (FABRY et al. 1998; BUTLER, 2005; LEITÃO et al., 2006). As plantas estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos ou por proporcionarem

grandes chances de obterem-se moléculas protótipos devido a sua diversidade de constituintes (MORETTO, 2000; KINGHORN, 2001; NOLDIN et al., 2003).

O presente estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do extrato seco das folhas e frações de *T. patens*, onde os resultados dos testes da avaliação da atividade antimicrobiana para *T. patens*, por difusão em Agar (**Figuras 3**) e microdiluição em caldo (**Figura 2**) são mostrados na tabela abaixo (**Tabela 7**).

Figura 2 - Microplaca para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



Legenda: De A1 a A10: controle dos extratos; De 12A a 12H: controle de esterilidade do meio; de 11^a a 11H: controle de crescimento do microrganismo; e de B1-10 a H1-10 sete diferentes extratos e frações de *T. patens* avaliados em diluições seriadas de B/C/D/E/F/G/H1 a partir de 4 mg/ml até B/C/D/E/F/G/H-10 a 0,0312 mg/ml.

Fonte: Do autor

Figura 3- Avaliação da atividade anti-micobacteriana por disco difuso



Legenda: À esquerda, presença do halo de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* pelo controle positivo, a Rifampicina 30 μg , após aproximadamente 28 dias de cultivo; À direita, ausência de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* pelo extrato seco das folhas de *T. patens*, após o mesmo tempo de cultivo

Fonte: Do autor

Tabela 7- Intervalo (I) e média (M)¹ dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento microbiano (em mm) e valores de CIM (em µg/ml) do extrato proveniente das folhas de *Talinum patens* L. Willd e suas frações contra diferentes micro-organismos de importância médica.

Folha	Frações ⁵										Controles							
	EBH		Hexânica		Acetato étila		Butanólica		Aquosa		Positivos			Negativo				
											Clorexidina 0,12%			Rifampicina 30 µg			Água destilada	
Microorganismos	RESULTADOS DOS TESTES ⁴																Continua	
	I/M ³	CIM	I/M	CIM	I/M	CIM	I/M	CIM	I/M	CIM	I/M	CIM	I/M	CIM	I/M	CIM		
Gram Positivos																		
<i>B. cereus</i>	25-30 (27) ^e	N	0-0 (0) ^a	250	7-7 (7) ^b	500	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	11-14 (12) ^c	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>B. subtilis</i>	20-30 (24) ^e	N	5-8 (7) ^b	250	6-8 (7) ^b	500	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	14-18 (16) ^d	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>M. luteus</i>	14-20 (17) ^d	N	3-10 (5) ^b	31,2	0-0 (0) ^a	500	0-0 (0) ^a	N	3-10 (7) ^b	N	18-18 (18) ^d	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>E. faecalis</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	13-16 (14) ^c	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>S. aureus</i>	15-23 (17) ^d	500	0-0 (0) ^a	250	7-8 (8) ^b	250	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	14-18 (16) ^d	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
Gram Negativos																		
<i>E. aerogenes</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	500	0-0 (0) ^a	70	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	7-11 (9) ^b	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>E. coli</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	500	0-0 (0) ^a	31,2	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	10-9 (9) ^b	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>S. marcescens</i>	0-0 (0) ^a	250	0-0 (0) ^a	250	0-0 (0) ^a	250	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	11-14 (12) ^c	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>P. aeruginosa</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	250	0-0 (0) ^a	500	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	7-9 (8) ^b	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>P. mirabilis</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	500	0-0 (0) ^a	500	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	9-9 (9) ^b	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
<i>S. typhimurium</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	7-9 (8) ^b	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA		
Micobactérias																		
<i>M. bovis</i>	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	NA	NA	26-26 (26) ^e	NA	0-0 (0) ^a	NA		

<i>M. tuberculosis</i>	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	0-0 (0) ^a	NA	NA	NA	26-26 (26) ^e	NA	0-0 (0) ^a	NA
Leveduras																
<i>C. albicans</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	31,2	0-0 (0) ^a	130	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	10-12 (11) ^c	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA
<i>S. cerevisiae</i>	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	0-0 (0) ^a	N	18-20 (19) ^e	NA	NA	NA	0-0 (0) ^a	NA

¹Entre parênteses; ²Testes por difusão em *agar* com o extrato seco e frações a concentrações de 40 e 10 mg/ml respectivamente; ³Médias seguidas com diferentes letras são significativamente diferentes uma das outras de acordo com o teste de Scott & Knott ($\alpha=0.05$); ⁴Experimentos feitos em triplicata; ⁵provenientes do extrato seco da folha; CIM: Concentração inibitória mínima; N = ausência de inibição do crescimento microbiano á máxima concentração utilizada no experimento; NA: não aplicável a esta análise; EBH: Extrato bruto hidroetanólico.

Fonte: Do autor

Quanto à triagem da atividade antimicrobiana por difusão em ágar (**Tabela 7**), o extrato seco foi ativo contra todas as bactérias Gram positivas com exceção de *E. faecalis*, comum intervalo médio dos diâmetros dos halos de inibição abrangendo de 14 a 30 mm. As médias dos diâmetros dos halos de inibição encontrados para este extrato contra *B. subtilis* (24 mm) e *B. cereus* (27 mm) foram estatisticamente iguais no experimento feito em triplicata; portanto, o extrato seco foi igualmente ativo em ambos os casos. Entretanto, o extrato seco não foi ativo para os demais micro-organismos avaliados no teste de difusão em ágar (Gram negativos, fungos e micobactérias). No que tange a atividade das frações por difusão em ágar, apenas a fração butanólica não apresentou atividade inibitória contra os micro-organismos testados. A fração hexânica apresentou média dos diâmetros de halos de inibição que variaram de 3 a 10 mm, tendo sido ativa frente *M. luteus* e *B. subtilis*. A fração acetato-etílica foi ativa contra *B. subtilis* e *S. aureus* com diâmetro médio dos halos variando de 6 a 8 mm. Por outro lado, a fração aquosa mostrou atividade em ágar apenas contra *M. luteus* com média do diâmetro de halos do experimento em triplicata de 7 mm. Nenhuma fração foi ativa frente às bactérias Gram negativas, fungos e micobactérias, avaliadas por difusão em ágar.

Com relação à atividade antimicrobiana para membros da família Talinaceae ou famílias correlatas, pelo método de difusão em ágar, em estudos recentes de Londonkar & Nayaka (2011); e Savithramma et al., (2012) foram evidenciados atividade antimicrobiana para membros da família Portulacaceae frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos de importância médica, entretanto, fatores relacionados à diferença entre os constituintes químicos das plantas, falta de reprodutividade deste método e aos micro-organismos torna as comparações inviáveis.

Na determinação da CIM (**Tabela 7**), por microdiluição em caldo, o extrato seco (EBH) foi ativo contra *S. marcescens* (Gram negativa) e *S. aureus* (Gram positivo), e as frações hexânica e acetato-etílica apresentaram considerável atividade inibitória, com valores de CIM abrangendo de 31,2 a 500 µg/ml contra algumas bactérias Gram positivas, Gram negativas e contra *C. albicans*.

Embora tenha sido observado em alguns casos que o extrato seco e suas frações não apresentaram atividade por difusão em ágar (sólido) com posterior inibição do crescimento do respectivo microrganismo por microdiluição em caldo, tal fato se justifica pelas características peculiares dos dois métodos utilizados. A difusão em ágar (meio sólido, altamente polar) apresenta barreiras físico-químicas mais significativas na atividade biológica final, como a polaridade dos compostos envolvidos, causando difusão diferenciada dos bioativos presentes no extrato ou frações, afetando a inibição ou não do microrganismo em questão.

Por outro lado, o método de microdiluição em caldo permite o contato direto entre o extrato ou frações e o microrganismo desafiado, sofrendo mínimas interferências do meio (caldo) (HADACEK; GREGER, 2000). No caso da inibição por difusão em ágar com posterior ausência de inibição por microdiluição em caldo, isto pode ser explicado, ao menos em parte, pelas diferenças nas concentrações empregadas, pois no método por difusão em ágar utilizou-se concentrações de 40 e 25 mg/ml e na avaliação da CIM as diluições partiram-se de 4 mg/ml.

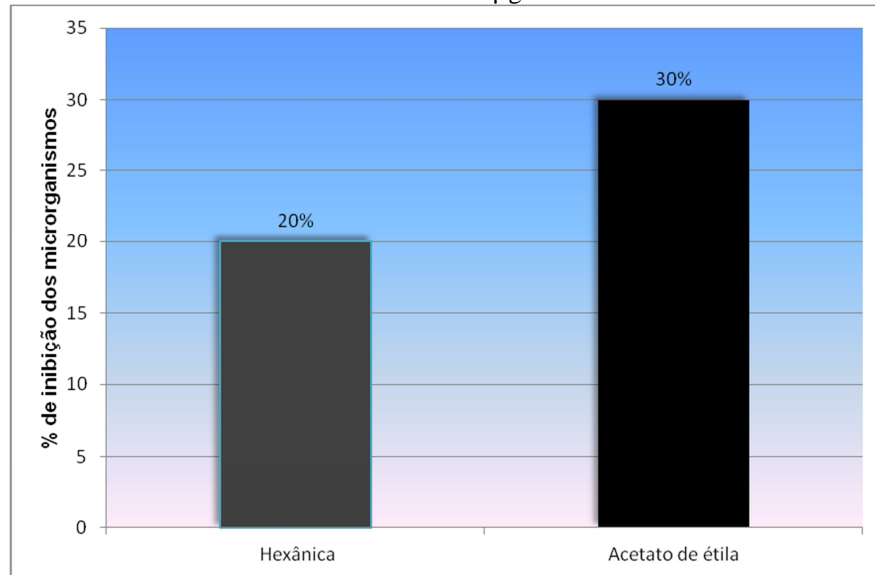
Segundo Fabry et al. (1998); Dall'Angol et al. (2003); e Tanaka et al. (2005) os extratos de plantas na avaliação por microdiluição em caldo são considerados com potencial inibitório promissor se demonstrarem atividade antimicrobiana em concentrações de até 0,1 mg/ml, atividade inibitória moderada de 0,1-0,5 mg/ml, atividade fraca de 0,5 a 1 mg/ml, e inativos acima de 1 mg/ml. Portanto, segundo tal premissa, o extrato seco apresentou atividade moderada (250 e 500 µg) e as frações hexânicas e acetato-etílica foram consideradas altamente promissoras na busca por novas substâncias com ação antimicrobiana. Aligiannis et al. (2001), também tentou estabelecer um critério ao considerar atividade de CIM menores que 1 mg/ml como aceitáveis quanto ao potencial inibitório. Entretanto, segundo Ostrosky et al. (2008), devido à complexidade de extratos, torna-se praticamente impossível a comparação ou julgamentos concretos quanto ao desempenho destes, nos quais a padronização é praticamente inexistente.

Neste campo, tomando como base os resultados preliminares neste estudo, as frações hexânica e acetato-etílica mostraram maior potencial para posteriores estudos de sub-fraçionamentos, e adicional avaliação da atividade antimicrobiana guiada contra os microrganismos inibidos anteriormente, visando o isolamento de molécula(s) líder(es) candidata(s) a estudos posteriores na busca de um fármaco antimicrobiano (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001; BUTLER, 2005; LÓPES et al., 2007), sendo que, segundo Eloff (1998; 2004), tais estudos são mais bem direcionados quando tomados como base na luz da racionalidade, sendo uma das formas mais pragmáticas de considerar os resultados obtidos frente as possibilidades que permeiam.

Outro índice, útil como classificatório, foi calculado de acordo com Bonjar (2004), assim, calculou-se o percentual de atividade como a razão entre número de micro-organismos susceptíveis aos extratos vegetais e o total de micro-organismos testados e o índice de susceptibilidade microbiano (ISM), como a razão entre o número de extratos efetivos contra cada microrganismo e o total de extratos vegetais testados. Os resultados foram multiplicado

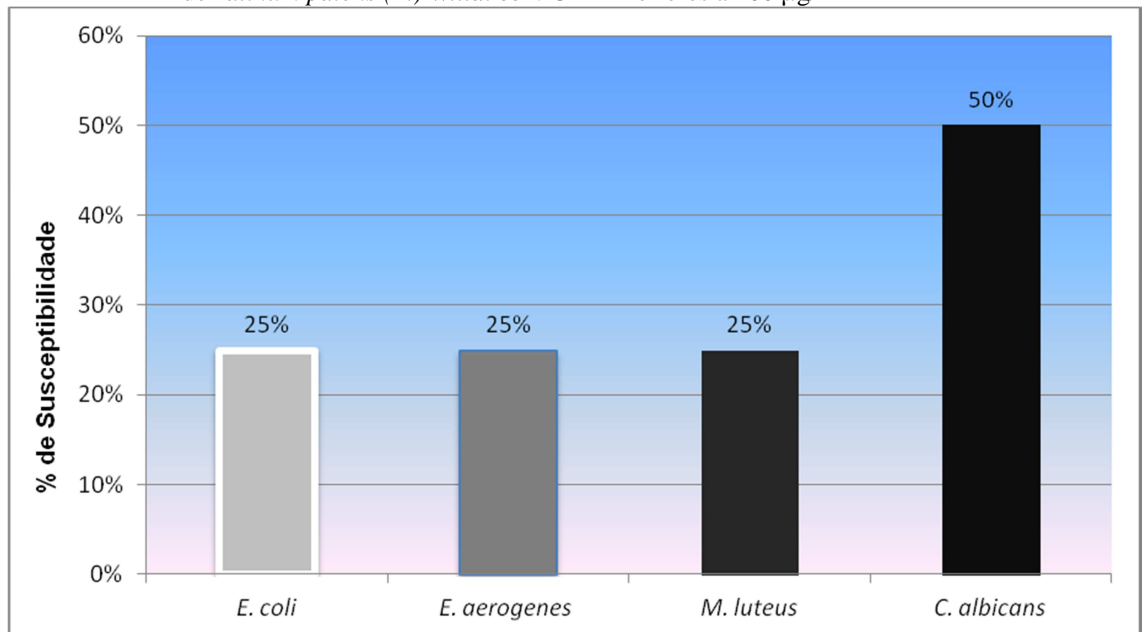
por cem e expressos em porcentagem (**Figuras 4 e 5**). Estes índices foram obtidos para os extratos e/ou frações com CIM inferiores a 100 µg/ml.

Figura 4- Percentual de atividade das frações provenientes da folha de *Talinum patens* (L.) Willd. com CIM inferiores a 100 µg/ml



Fonte: Do autor

Figura 5 - Índice de susceptibilidade microbiano (ISM, %) frente às frações provenientes da folha de *Talinum patens* (L.) Willd. com CIM inferiores a 100 µg/ml



Fonte: Do autor

O percentual de atividade mostrou que a fração acetato-etílica foi a mais ativa, onde 30% dos micro-organismos avaliados tiveram seu crescimento inibidos por esta fração *in vitro*, com CIM inferior a 100 µg/ml. O índice de susceptibilidade microbiano (ISM) demonstrou que *C. albicans* foi inibido pela maioria das frações, sendo que metade das

frações avaliadas (2 em 4) inibiu seu crescimento com CIM inferior a 100 µg/ml. Entretanto, as frações butanólica e aquosa foram inativas frente aos micro-organismos avaliados em nosso estudo por microdiluição em caldo, provavelmente, devido ao fator concentração de bioativos, onde tais frações podem ter concentrado menos os bioativos com a efetiva ação antimicrobiana, isto sendo oriundas da capacidade extrativa de cada solvente empregado, por afinidade dos bioativos as diferentes frações, e no caso da aquosa (resíduo das demais) dependendo da capacidade de extração dos solventes empregados previamente. Em estudos de Luseba et al. (2007); Abdullah et al. (2012) têm sido demonstrado que extratos ou frações aquosas frequentemente são inativas quanto à atividade antimicrobiana, e por outro lado, a utilização de outros solventes, como o álcool metílico, por apresentarem melhor capacidade extrativa, evidenciam boa atividade antimicrobiana em testes *in vitro* (MATTANA et al., 2010).

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que estudos de triagem permitam o descobrimento de compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos (AHMAD & BEG, 2001). As propriedades microbiostáticas e microbicidas a partir de produtos vegetais têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo o mundo. Geralmente, são avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos *in vitro*, como foi realizado no presente trabalho, e a relação entre a atividade e as condições do material vegetal é determinante no sucesso da obtenção de produtos com possível aplicabilidade futura (ELOFF, 1998). Quanto à metodologia aplicada para a avaliação da atividade antimicrobiana, os métodos para microdiluição em caldo empregados, segundo Eloff (1998); Ostrosky et al. (2008), são adaptações dos aplicados as análises clínicas segundo documentos da CLSI para a avaliação do perfil de resistência de bactérias e fungos de importância clínica aos antimicrobianos, geralmente antibióticos já em uso, ou moléculas isoladas em etapas de aprovação (CLSI, 2003; 2008). Portanto, uma das formas de interpretação dos resultados durante a leitura pode ser obtida por uso de corantes ou via espectrofotometria. Entretanto, estes antibióticos usados são conhecidos há décadas, assim como os micro-organismos empregados, portanto a interação durante os testes entre antibiótico-corante-microrganismo é exaustivamente estudada, em extensas literaturas a respeito, logo não havendo, ou ocorrendo mínimas interferências ou viés quando da interpretação do resultado (CIM). Para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato seco e suas frações de *T. patens*, em nosso estudo, optou-se pela técnica visual na interpretação dos resultados, por microdiluição em caldo, para o estabelecimento da CIM, segundo a CLSI (CLSI, 2003; 2008), uma vez que, a complexidade

do extrato e suas frações avaliadas, bem como a diversidade de micro-organismos utilizados e seus diferentes graus de sensibilidade aos corantes, acabam por inviabilizar o uso de corantes para a leitura.

Na triagem fitoquímica preliminar, o extrato seco foi positivo para esteroides/triterpenos, saponinas e taninos, a fração acetato-etílica para esteroides e saponinas e a fração hexânica para esteróides. As frações mais ativas quanto à atividade antimicrobiana, hexânica e acetato-etílica, teoricamente, são aquelas que apresentam a maior concentração de substâncias mais apolares, tais como esteróides e triterpenos, cujo efeito antimicrobiano tem sido exaustivamente citado em literatura, ao longo dos anos (DALLEAU et al., 2008; GALLUCCI et al., 2010). Provavelmente tais ações sejam fruto de mecanismos envolvendo a alteração da membrana celular fúngica ou bacteriana, conduzindo a perda de permeabilidade e acúmulo de substâncias tóxicas disruptoras do metabolismo que ativam vias citolíticas (SHENKELE et al., 2001), já os taninos presente no extrato seco têm sido associado a ruptura de membrana, além da quelação ou precipitação de substâncias essenciais ao microrganismo, como por exemplo as proteínas. (SCALBERT, 1991).

Além disso, destaca-se neste contexto que, segundo os autores Barbosa-Filho et al. (2007; 2008); Saúde-Guimarães et al. (2007), plantas produzem diferentes substâncias químicas, sendo estas produzidas em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características edafoclimáticas (SANTOS et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; BLANK et al., 2007). Adicionalmente, o controle de qualidade durante a obtenção dos extratos e frações deve levar em conta as características que influenciam no produto final do processo extrativo, dessa forma exercendo preponderante efeito sobre a bioatividade do material vegetal (HUBINGER et al., 2009). Entretanto, algumas substâncias químicas são bastantes características e abundantes para um determinado vegetal, e desta forma podem servir até mesmo como parâmetro para sua caracterização e identificação (CÉSAR et al., 2007; MIGLIATO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008). Estudos têm demonstrado que vários membros da família Talinaceae apresentam saponinas, taninos, esteroides e triterpenos, assim como demonstrado nos dados da análise fitoquímica preliminar realizada neste estudo, que confirmou a presença de terpenos nas frações hexânica e acetato-etílica, de acordo com estudos prévios que também apontam para a predominante concentração desta classe de metabólitos em tais frações (SILVA et al, 2004; HURTS et al, 2005).

As frações de *T. patens* mostraram considerável atividade inibitória *in vitro* contra micro-organismos de grande importância médica. Entre estes, *C. albicans* é um fungo

causador de infecções oportunistas, sendo um considerável agente de infecções nosocomial (PERFECT & SCHELL, 1996; PFALLER et al., 2008; HOFER, 2013). No estudo de Dalleau et al. (2008), cujo objetivo foi avaliar o efeito de terpenos na formação de biofilme por espécies de *Candida*, foram observados atividade antibiofilme *in vitro* de diferentes terpenos. O autor explana sobre a possibilidade de estes compostos estarem relacionados a uma disrupção na membrana fúngica com conseqüente alteração de permeabilidade. Neste estudo, contra *C. albicans*, foi observada considerável atividade inibitória da fração hexânica (31,2 µg/ml), sendo que para esta fração foi demonstrada em triagem fitoquímica preliminar presença de terpenos.

S. aureus, um microrganismo Gram positivo pertencente à microbiota humana, é um dos maiores e mais importante agente de infecções oportunistas e nosocomial e atualmente é considerado um expressivo microrganismo causador de infecções na comunidade, cuja multi-resistência aos atuais antimicrobianos em uso têm mundialmente repercutido em altas taxas de morbi-mortalidade nas doenças infecciosas causadas por este microrganismo (BELL & TURNIDGE, 2002; POWELL & WENZEL, 2008). Nos últimos anos, tem sido explorada a triagem de plantas como possíveis fontes de novas alternativas terapêuticas para tratar doenças por *S. aureus* multirresistente (VELASCO et al., 2005; VILAR, 2008; MATTANA et al., 2010). Adicionalmente, Gallucci et al. (2010), evidenciou a atividade inibitória *in vitro* de terpenos contra *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) e contra a formação de biofilmes. Da mesma forma, os resultados de atividade inibitória contra *S. aureus* encontrados neste estudo, foram evidenciados para a fração hexânica e acetato-etílica, frações que foram positivas para terpenos e que, sabidamente, concentra tais metabólitos secundários.

Apresentando a mesma importância clínica-epidemiológica, *E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* são micro-organismos Gram negativos, pertencentes à microbiota intestinal humana, causadores de uma variada gama de infecções. Atualmente, diversas cepas destas bactérias, multi-resistentes aos quimioterápicos em uso, têm preocupado e recebido notória atenção das atuais pesquisas, principalmente pela capacidade destes micro-organismos de disseminação, por intermédio de plasmídeos, de genes de resistência a antibióticos, até mesmo disseminados pelo ambiente (DAVIES & ROWND, 1972; HIGUCHI et al., 2006; FORSBERG et al., 2012). No presente estudo, tais micro-organismos tiveram seu crescimento inibido na avaliação *in vitro* frente a baixas concentrações das frações hexânica e acetato-etílica (31,2 a 500 µg/ml).

Cabe ressaltar que na busca por superar o problema do crescente número de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos em uso, encontrando efetivas alternativas

terapêuticas para o tratamento de doenças produzidas por estes micro-organismos, as associações entre extratos vegetais com antimicrobianos têm providenciado uma viável alternativa (HEMAISWARYA et al., 2008). Estudos posteriores, incluindo estudos de segurança, eficácia e qualidade, podem levar em conta a associação de antibióticos utilizados na clínica com *T. patens*, inclusive pelo fato que esta planta é popularmente utilizada na culinária e na medicina popular, onde o conhecimento do uso prático não deve ser negligenciado (MARTINS et al., 2000; SOARES, 2005). Entretanto, é preciso considerar que os estudos de associação antibiótico-fitoterápico e para obtenção de uma molécula líder estão sob os encargos de percurso, e que os possíveis vieses ou erros produzidos em estudos preliminares (*in vitro*) têm conduzido a baixa correlação com o sucesso obtido em estudos posteriores para futuras aplicações clínicas da bioatividade desejada (BUTLER, 2005; EICHLER et al., 2006; TRIAL-WATCH, 2011; SAVONENKO et al., 2012).

Além disso, a complexidade química de extratos secos e das frações não devem ser negligenciadas, sendo os resultados passíveis de viés interpretativos. Assim, mecanismos como a complexação dos constituintes do extrato com nutrientes essenciais ao crescimento microbiano não podem ser descartados, sendo que neste caso a ação antimicrobiana não seria fruto direto dos componentes do extrato ou fração. Adicionalmente, com relação às diferenças na relação de atividade ou inatividade entre o extrato seco e frações, seus bioativos concentrados podem atuar de diferentes modos na resposta final, podendo ser fruto de sinergismo dos constituintes químicos ou o oposto, ou seja, inativação por algum modo (diferentes mecanismos de interação) das substâncias biologicamente ativas na ação antimicrobiana (VILAR et al., 2008).

4.6.1 Avaliação da atividade antimicobacteriana

A tuberculose, novamente está entre as doenças infecciosas com maior taxa de morbimortalidade em todo mundo, e as estratégias terapêuticas são escassas. O longo período de tratamento, toxicidade do mesmo e falta de efetividade dos quimioterápicos em uso são fatores que intensificam a atual busca por anti-tuberculosos (ZHANG et al., 2006). Entretanto, no presente estudo, não houve ação do extrato seco de *T. patens* frente *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

4.6.2 Atividade leishmanicida

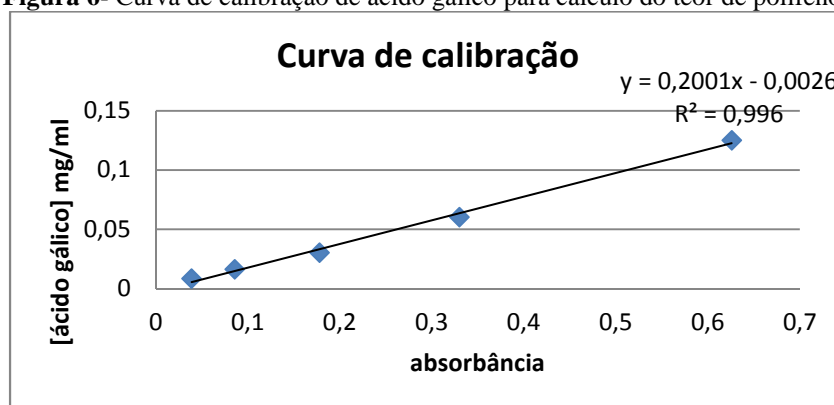
A Leishmaniose continua a ser uma das principais doenças parasitárias, carente de efetivas estratégias terapêuticas, com grave desfecho final quanto às taxas de morbimortalidade mundialmente. Infortunadamente, o extrato seco da folha de *Talinum patens* avaliado neste estudo não apresentou atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* na máxima concentração do extrato utilizada no experimento (100 µg/ml).

4.7 AVALIAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO DE T. PATENS

A partir da curva de calibração (**Figura 6**), cujo r^2 de 0,996 mostrou linearidade satisfatória para a quantificação, foi determinado o teor de fenóis em equivalente de ácido gálico do extrato seco das folhas de *T. patens* segundo o cálculo da equação da reta:

$$\text{Teor de polifenóis} = 0,200 \cdot [A_{\text{extrato}}] - 0,002$$

Figura 6- Curva de calibração de ácido gálico para cálculo do teor de polifenóis

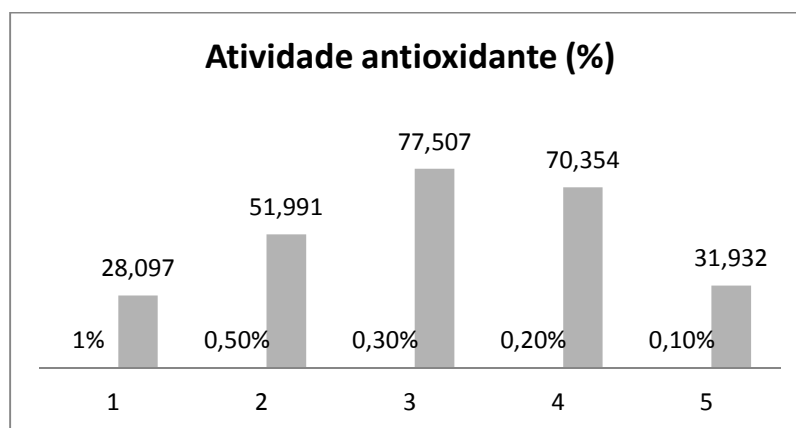


Fonte: Do autor

Folin-Ciocalteu reage com os compostos fenólicos e uma variedade de outros compostos como aminas, purinas e elementos inorgânicos (IKAWA et al., 2003). A absorvância do extrato seco foi de 0,088. Este resultado indica que há uma concentração de 17,4 mg de equivalentes em ácido gálico por grama de extrato. Nos extratos aquoso e

etanólico das folhas de *T. portulacifolium*, Ramesh et al. (2009) encontrou concentrações de 114 e 100 mg/g respectivamente, sendo a propriedade antioxidante dos extratos comprovadas por cromatografia em camada delgada, utilizando como revelador solução de DPPH. Na espécie *T. fruticosum* foi encontrado uma concentração de 13,1 mg/g de extrato em equivalentes de ácido gálico, também associados a uma atividade antioxidante, medida pela capacidade de redução do Fe III ao Fe II (OGUNLADE et al., 2009). Anyasor et al. (2010) encontrou concentrações de 45,6 e 28,8 mg de ácido gálico equivalente por grama de extrato nos extratos aquoso e metanólico de *T. triangulare*, respectivamente, demonstrando como a diferença nos métodos de obtenção do extrato podem influir na concentração dos metabólitos secundários. Segundo o estudo de Anyasor et al. (2010), a maior concentração de compostos fenólicos na fração aquosa não correspondeu a um aumento na atividade inibidora de peroxidação lipídica, indicando uma possível ação de outros tipos de compostos como saponinas e alcaloides, ambos presentes nesta espécie. Contudo, para o ensaio de DPPH, houve correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Figura 7- porcentagem de atividade antioxidante do extrato seco das folhas de *T. patens*



Fonte: Do autor

O ensaio de DPPH avalia a habilidade de seqüestro de radicais livres. A capacidade de doar átomos de hidrogênio é uma característica primária de antioxidantes. Os antioxidantes doam hidrogênio para os radicais livres, convertendo-os em espécies não reativas, evitando a propagação das reações de oxidação (ORDOÑEZ; GOMEZ; VATTUONE & ISLA, 2006). A atividade antioxidante do extrato foi maior na concentração de 0,3% (m/v), com 77,507% de atividade sequestrante (**Figura 7**), em relação às outras 4 concentrações testadas. A menor

concentração testada apresentou 31,932% de capacidade sequestrante, enquanto que na maior concentração obteve-se o menor valor, de 28,097% (**Figura 7**).

A concentração de compostos fenólicos se correlaciona com a atividade antioxidante. Aquino et al. (2001) demonstraram a existência dessa relação em frações extraídas de plantas, frutas e sementes. Polifenóis possuem atividade antioxidante devido a sua propriedade redox, que os permite agir como agentes redutores e doadores de hidrogênio. Nos compostos fenólicos, a presença de substituintes nos anéis diferencia as respostas de grupos de compostos e determinam a capacidade doadora de elétrons, que se relaciona diretamente à atividade antioxidante (AKOND et al., 2011)

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO SECO E FRAÇÕES

Ensaio de viabilidade celular são utilizados no planejamento de fármacos e testes preliminares de substâncias químicas, são baseados em várias funções celulares como atividade enzimática, permeabilidade de membrana, aderência celular, produção de ATP e coenzimas. Testes baseados em atividade enzimática, como o MTT dependem da reação entre uma substância redutora e uma desidrogenase presente em células viáveis, para determinar a viabilidade celular de maneira colorimétrica. Neste método, o MTT é reduzido pela NADH a uma substância roxa (formazan), sendo a medição da cor roxa proporcional à viabilidade celular (DIAS et al., 2012).

Figura 8- CC50 e CC90 do extrato seco e frações hexânica e acetato-etílica das folhas de *T. patens* (L.) Willd.

Amostra	CC50 (mg/ml)	CC90 (mg/ml)
Extrato seco	0,45	1,38
Fração Hexânica	0,23	0,55
Fração Acetato-etílica	0,16	0,30

Fonte: Do autor

O CC50 para o extrato seco de *T. patens* foi de 0,45 mg/ml, já as frações hexânica e acetato-etílica apresentaram CC50 mais baixos, com valores de 0,23 e 0,16 mg/ml, respectivamente (**Tabela 8**). Os valores de CC90 foram de 1,38 mg/ml para o extrato seco e de 0,55 e 0,31 mg/ml para as frações hexânica e acetato-etílica. Como os compostos

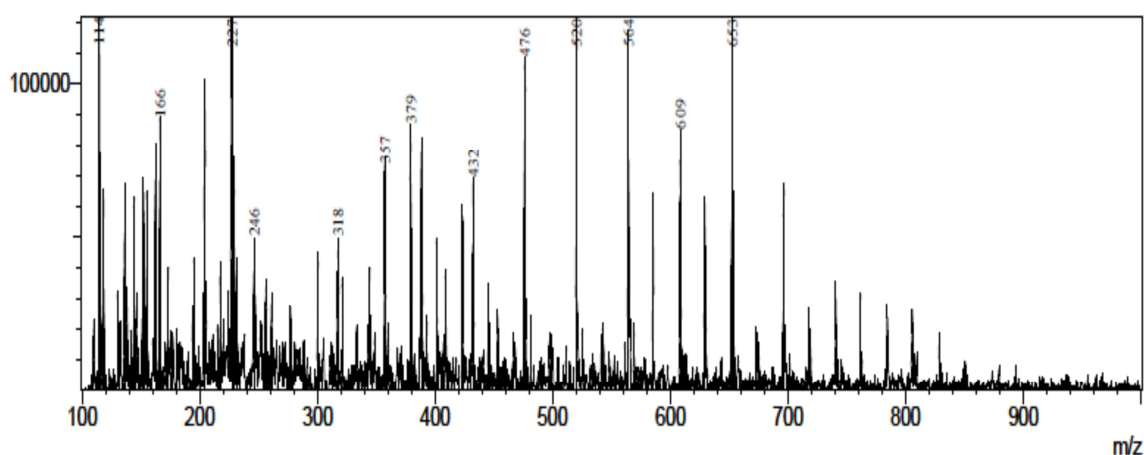
terpênicos podem estar relacionados com a atividade citotóxica de extratos vegetais (SINI et al., 2012), sua maior concentração nas frações hexânica e acetato-etílica pode explicar, em parte, o porque dos mais baixos CC50 e CC90 em relação ao extrato seco, visto que nos testes fitoquímicos realizados neste estudo foram caracterizados terpenos tanto no extrato seco quanto nas frações hexânica e acetato-etílica (**Tabelas 5 e 6**). De acordo com Balantyne (1999), um composto é potencialmente tóxico quando seu CC50 está entre 0,01 e 0,1 mg/ml, visto que extratos e frações são misturas de compostos, pode-se inferir que não há compostos potencialmente tóxicos tanto no extrato seco quanto nas frações das folhas de *T. patens*.

4.9 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

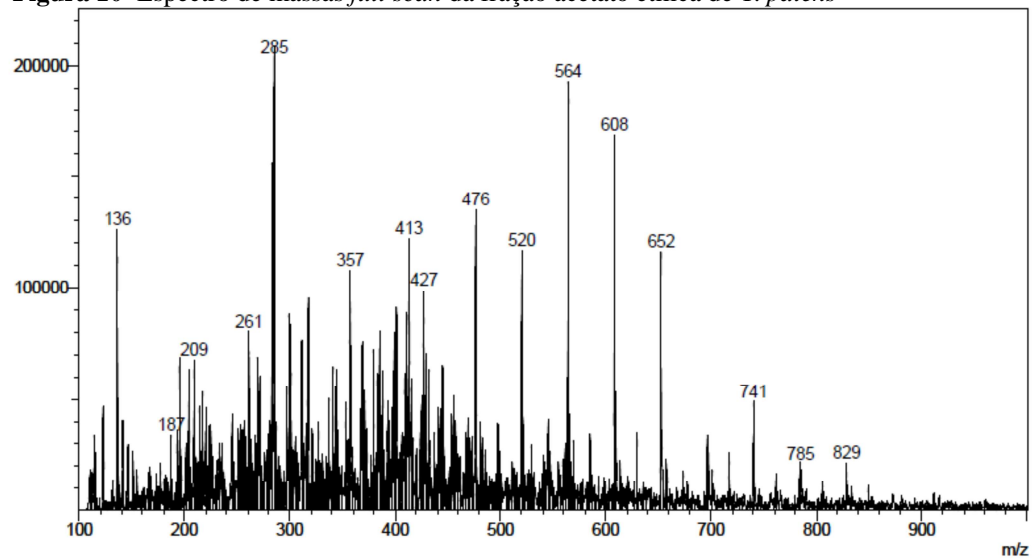
A espectrometria de massas (EM) é uma técnica instrumental de muita abrangência dentro da ciência moderna, com diversas aplicações na área da química, biologia e ciências farmacêuticas. Dentro deste contexto, torna-se imprescindível a análise de compostos naturais por meio desta técnica, de modo a se obterem informações mais completas sobre a espécie estudada e seus metabólitos secundários, que podem ser responsáveis por seus efeitos biológicos (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Primeiramente foram realizadas, no extrato seco e nas frações hexânica e acetato-etílica, varreduras dos compostos presentes, como são mostrados nas **Figuras 12, 13 e 14**.

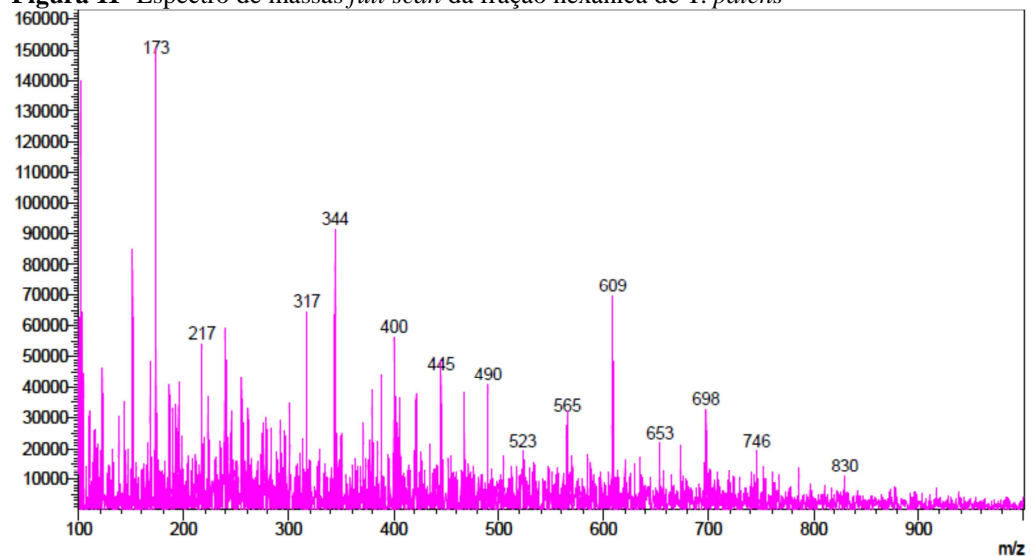
Figura 9- Espectro de massas *full scan* do extrato seco de *T. patens*



Fonte: Do autor

Figura 10- Espectro de massas *full scan* da fração acetato etílica de *T. patens*

Fonte: Do autor

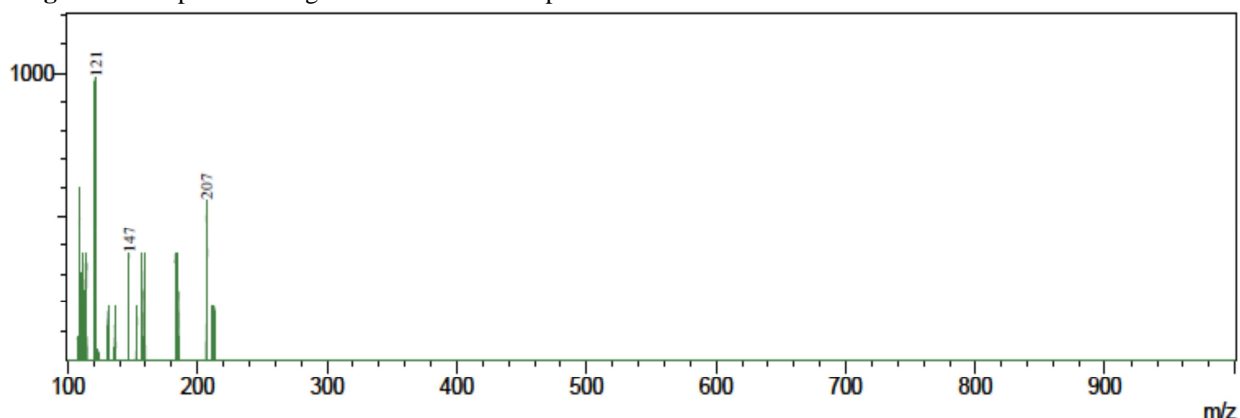
Figura 11- Espectro de massas *full scan* da fração hexânica de *T. patens*

Fonte: Do autor

Os principais picos, tanto no extrato seco quanto nas frações foram os de m/z 400, 413 e 415, que podem corresponder aos compostos esteroides presentes em de *T. patens*. Ramos et al. (2010) relatou que os esteroides campesterol, β -sitosterol e estigmasterol podem ser encontrados nas folhas de *T. patens*.

Desta forma, para melhor estudo destes compostos, foram realizadas as fragmentações de segunda ordem dos picos com m/z de 400, 413, 415.

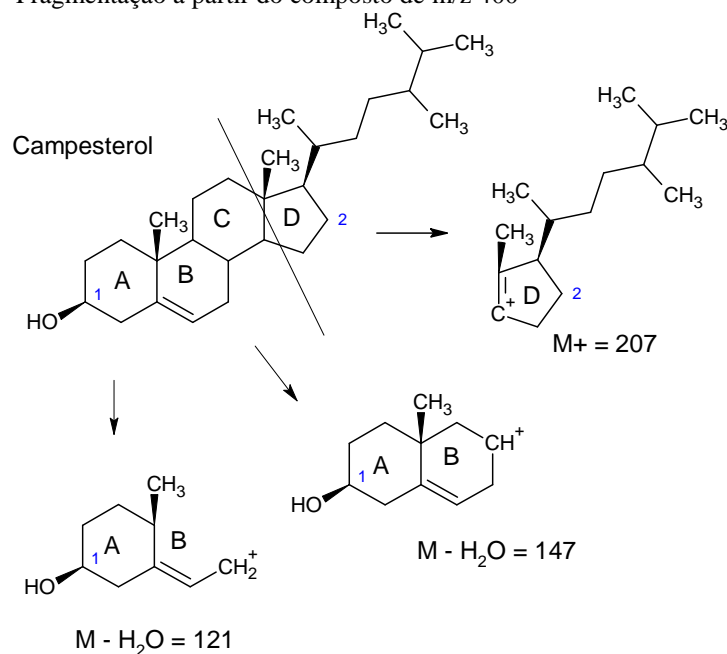
Figura 12 - Espectro de segunda ordem obtido a partir de m/z 400



Fonte: Do autor

Como pode ser visto na **Figura 15**, o pico com m/z de 400, que foi observado tanto no extrato seco quanto nas frações hexânica e acetato-etílica, tem como principais fragmentos os picos com m/z de 207, 147 e 121. O composto esteroide campesterol apresenta massa molecular de 400 Da e está presente nas folhas de *T. patens* (RAMOS et al., 2010) e os fragmentos com m/z de 207, 147 e 121 podem ser propostos a partir de sua estrutura (**Figura 16**).

Figura 13- Fragmentação a partir do composto de m/z 400

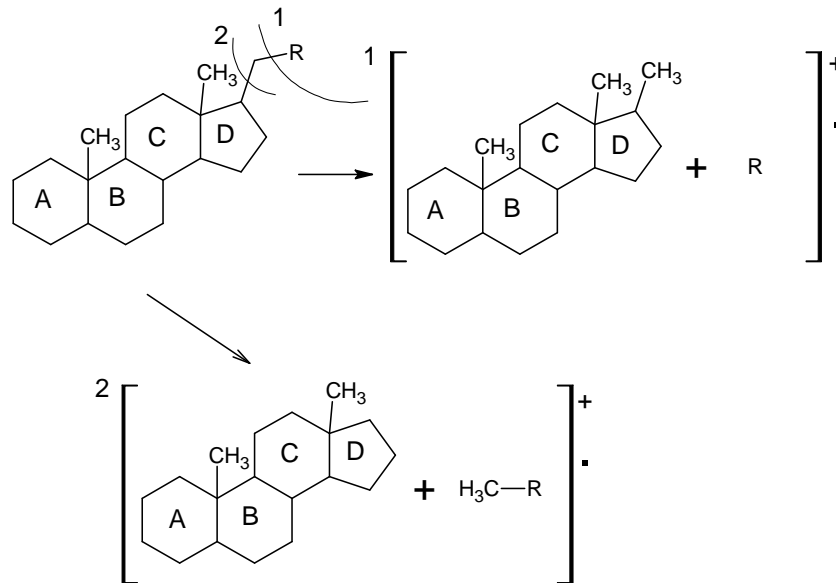


Fonte: Do autor

A partir do campesterol (m/z de 400) pode ser observado que o fragmento m/z 207 é originado pela quebra da ligação C-C do anel esteroidal, como proposto por Djerassi (1978) para a fragmentação de compostos esteroides. Os fragmentos m/z 147 e 121 também são

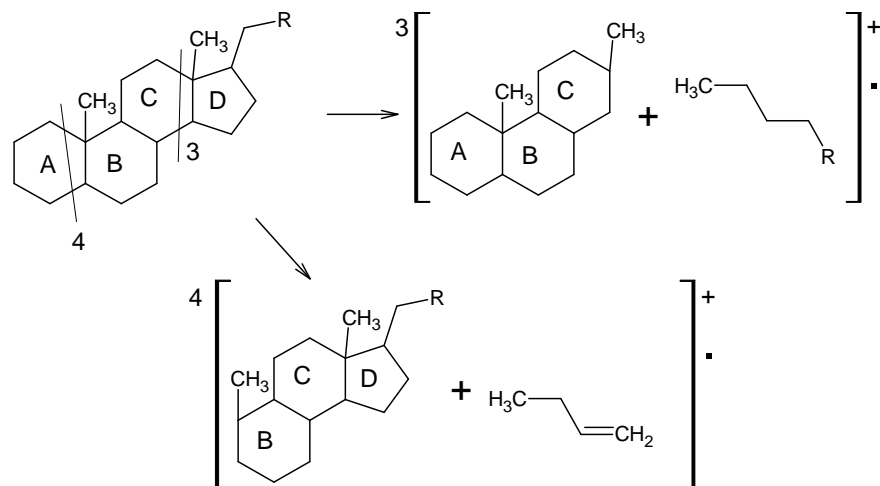
originados pela quebra das ligações C-C dentro do anel esteroidal, entre os anéis B e C, de acordo com o mecanismo descrito por Galli & Maroni (1967). As **Figuras 17, 18 e 19** mostram os mecanismos de fragmentação para compostos esteroides segundo os autores citado acima.

Figura 14- Fragmentação de esteroides segundo Djerassi (1978)



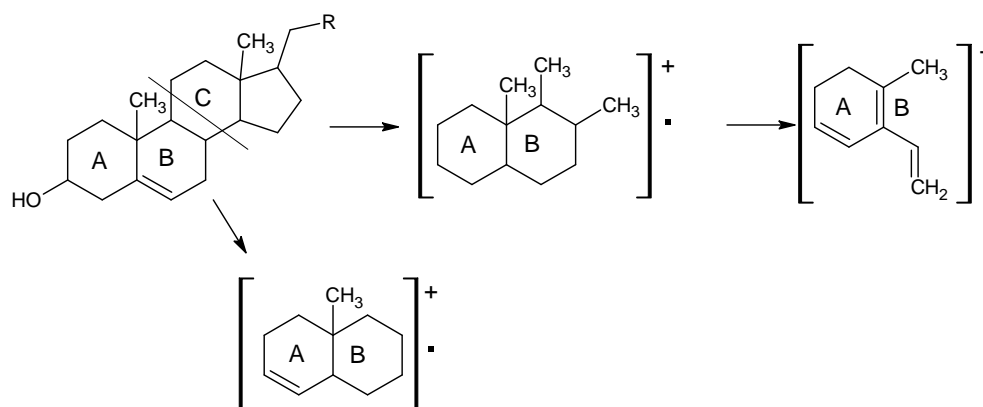
Fonte: Do autor

Figura 15- Fragmentação de esteroides segundo Djerassi (1978)



Fonte: Do autor

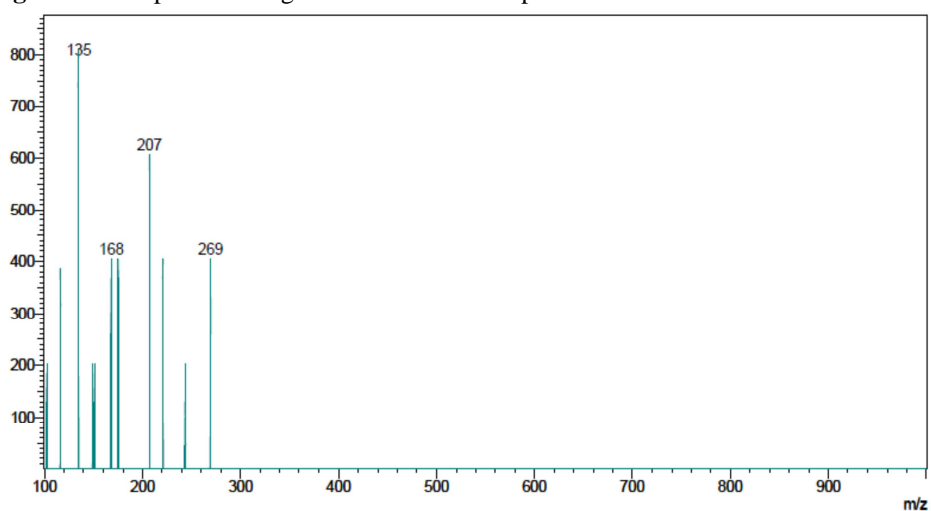
Figura 16- Fragmentação de esteroides segundo Galli & Maroni (1967)



Fonte: Do autor

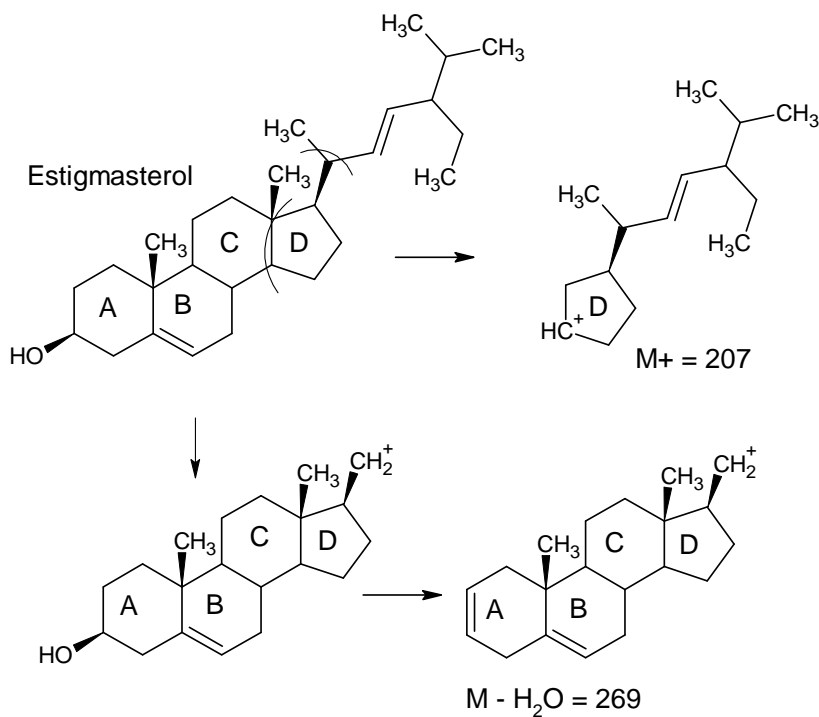
Na **Figura 17** podem ser vistos dois padrões de fragmentação, ambos envolvendo a perda da ramificação do esteroide. No mecanismo representado por 1 pode ser visto a perda de $-R$, e no mecanismo representado por 2 ocorre a perda de CH_3-R . Na **Figura 18** são vistos, da mesma forma, dois padrões de fragmentação propostos por Djerassi (1969). O mecanismo 3 representa uma quebra de ligação C-C dentro do anel esteroidal, o que está associado à formação do pico m/z 207 do campesterol. O mecanismo 4 representa a quebra de outra ligação C-C com a perda do primeiro anel do esteroide (anel A). Na Figura 19 podem ser observadas as fragmentações a partir de um esteroide gerando os picos m/z 121 e 147 através da quebra das ligações C-C entre os anéis B e C.

O composto com m/z de 413 foi proposto como sendo o esteroide estigmasterol (na sua forma $M+1$), que possui massa molecular de 412 Da, também presente nas folhas de *T. patens* (RAMOS et al., 2010; THANAMOOL et al., 2013). Os fragmentos correspondentes são mostrados na **Figura 20**.

Figura 17- Eespectro de segunda ordem obtido a partir de m/z 413

Fonte: Do autor

O pico com m/z de 413, assim como o de 400, foi encontrado tanto no extrato seco como nas frações e apresentou, além do fragmento m/z de 207, o fragmento m/z de 269. Estes fragmentos foram propostos a partir do estigmasterol, como é mostrado na **Figura 21**.

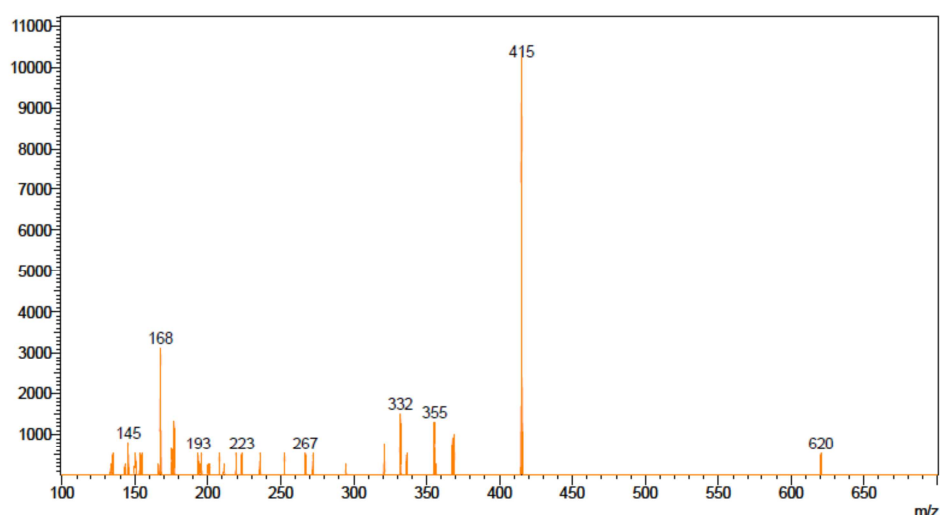
Figura 18- Fragmentação a partir do composto de m/z 413

Fonte: Do autor

Os fragmentos acima (**Figura 21**) podem ser explicados pelo mesmo mecanismo de fragmentação do campesterol, de acordo com as **Figuras 17 e 18**. O mecanismo de quebra 3 (**Figura 18**) corresponde à quebra da ligação C-C entre os anéis C e D, com a formação do pico m/z 207, enquanto que o mecanismo 1 (**Figura 17**) corresponde à quebra da ligação C-C entre a metila do anel D e a ramificação C_9H_{18} com a formação do pico m/z 269, considerando a perda de H_2O ($M - 18$). Segundo Benfenati et al. (1994) o estigmasterol pode produzir o pico m/z 255 no lugar de m/z 269, diferindo na posição da quebra da ligação C-C, o que não foi observado neste experimento.

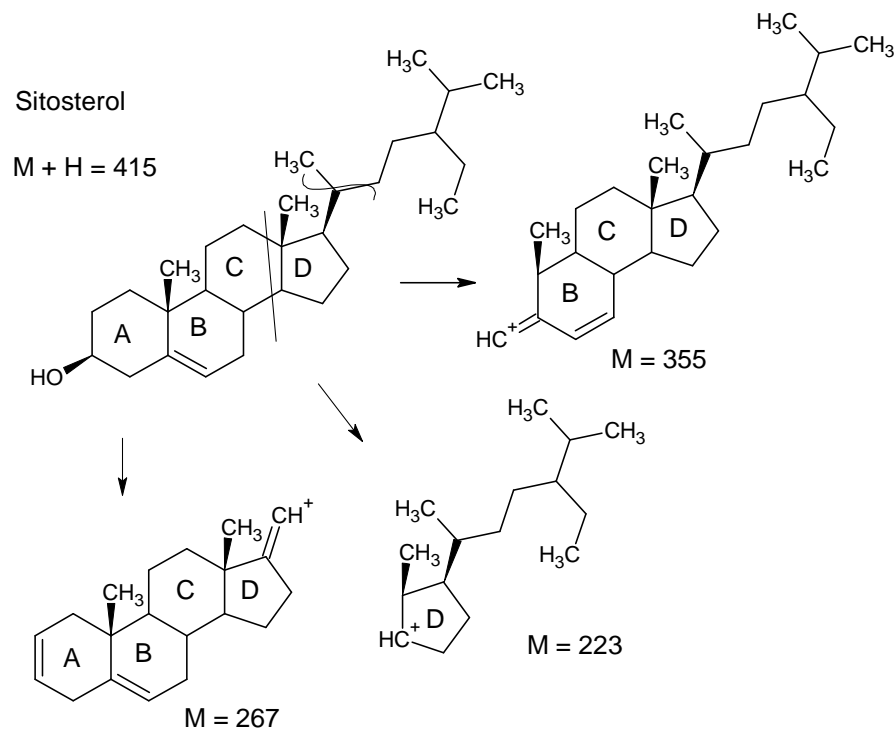
As **Figuras 22 e 23** mostram o espectro e a fragmentação do composto com m/z de 415, que é proposto como sendo o esteroide β -sitosterol, que foi possível ser detectado no extrato seco e nas frações hexânica e acetato-etílica.

Figura 19- Espectro de segunda ordem obtido a partir de m/z 415



Fonte: Do autor

A fragmentação do composto com m/z de 415, com a formação dos picos m/z 355, 223 e 267, pode ser proposta a partir do β -sitosterol (**Figura 23**). Benfenati et al. (1994) evidenciaram que, para o β -sitosterol, as quebras podem ocorrer no anel A, explicando a formação de um pico m/z 355 no espectro acima (**Figura 22**). Também foi possível associar ao β -sitosterol a formação do pico m/z 267, que corresponde à quebra da ligação C-C na ramificação do anel D, e a formação do pico m/z 223, que corresponde à quebra da ligação C-C entre os anéis C e D (Djerassi, 1978).

Figura 20- Fragmentação a partir do composto de m/z 415

Fonte: Do autor

5 CONCLUSÃO

Os ensaios mostraram que a droga obtida das folhas de *T. patens* se encontra dentro dos parâmetros preconizados pela Farmacopeia Brasileira (2010). Os parâmetros de granulometria são característicos de um pó moderadamente grosso. A partir dos testes de perda por dessecação, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido constatou-se que o pó da droga obtido das folhas de *T. patens* se encontra de acordo com os parâmetros de qualidade exigidos pela OMS.

Os estudos fitoquímicos preliminares mostraram a presença de classes de compostos interessantes do ponto de vista medicinal como taninos, saponinas e esteróides tanto no extrato seco e suas frações quanto na droga vegetal. O extrato seco e a droga vegetal evidenciaram a presença das três classes: taninos, saponinas e esteróides. A fração hexânica mostrou-se positiva para esteróides, enquanto que, na fração acetato-etílica, as classes de esteroides e saponinas estão presentes. Na fração butanólica foi constatado a presença de saponinas e taninos, e na fração aquosa, apenas taninos.

O extrato seco da folha de *Talinum patens* apresentou boa atividade inibitória frente *S. marcescens* e *S. aureus*. As frações hexânica e acetato-etílica apresentaram excelente atividade inibitória contra *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*. De acordo com estes resultados, tornam-se viáveis estudos posteriores com objetivo de isolamento e identificação de possíveis compostos com atividade antimicrobiana, visto que, adicionalmente o extrato e as frações com melhor atividade apresentaram baixa citotoxicidade, de acordo com o ensaio MTT.

A partir da técnica de Espectrometria de massas foi possível propor a presença de metabólitos secundários como o campesterol, estigmasterol e β -sitosterol no extrato seco e nas frações hexânica e acetato etílica de *T. patens*, que podem estar associados a sua atividade biológica.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, ERLINA.; RAUS, R. A.; JAMAL, P. Extraction and Evaluation of Antibacterial Activity from Selected Flowering Plants. **American Medical Journal**. n. 3 v. (1). p. 27-32, 2012.

ACOSTA, M. et al. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. **Revista de la Facultad de Farmacia, Mérida**, v. 45, n. 1, p. 19-24, 2003.

ADEYEMI, O.; OYENIYI, O.; MBAGWU, H.; JACKSON, C. Evaluation of the gastrointestinal activity of the aqueous root extracts of *Talinum triangulare*. **Research In Pharmaceutical Biotechnology**. v. 3. n. (6), p. 61-67, Jun. 2011.

AHMAD I.; BEG A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74. p. 113-123. 2001.

AJA P.M.; OKAKA A.N.C.; IBIAM U.A.; URAKU A.J.; ONU P.N. Proximate analysis of *Talinum triangulare* (Water Leaf) leaves and its softening principle. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 9. n. (6). p. 524-526, 2010.

AKOND et al. Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. **American Journal of Food Technology**, Mayville, v. 6, n. 5, p. 385-394, 2011.

ALIGIANNIS, N et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 40, p. 4168–4170, 2001.

AMIC, D.; DUSANKA, D.-A.; BESLO, D.; TRINAJSTIC, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **CCACAA**, v. 76, p. 55-61, 2003.

ANDRADE, C. A. et al.. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17. p. 231-235, 2007.

ANYASOR et al. Comparative Antioxidant, Phytochemical and Proximate Analysis of Aqueous and Methanolic Extracts of *Vernonia amygdalina* and *Talinum triangulare*. **Pakistan Journal of Nutrition.** v. 9. n. 3. p. 259-264, 2010.

AQUINO et al. **Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits.** Food Chemistry, v. 98, p. 569, 2005.

APPLEQUIST, W. L.; WAGNER, W. L.; ZIMMER, E.A.; NEPOKROEFF, M. Molecular Evidence Resolving the Systematic Position of *Hectorella* (Portulacaceae). **Systematic Botany**, v. 31. n. 2. p. 310-31, 2006.

ANDARWULAN, N. et al. **Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia.** Food Chemistry. v. 121, p. 1231-1235, 2010.

ASHFORD, D.A.; DESJEUX, P.; DE RAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8, p. 104-105, 1992.

BALANTYNE, B; CAWLEY, J. M. **Journal of Applied Toxicology**: n. 19. v. 4. p. 291-294, 1999.

BARBOSA-FILHO, J.M. et al.. Natural products with antileprotic activity. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17. p. 141-148. 2007.

BARREIRA, J. C. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; PEREIRA, J. A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1106-1113, 2008.

BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D. High Prevalence of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Hospitalized Patients in Asia-Pacific and South Africa: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-1999. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, p. 879–881, Mar. 2002.

BIAVATTI, M.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17 p. 640-653, 2007.

BLANK, A.F. et al Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Rev Bras Farmacogn** v. 17. p. 557-564, 2007.

BORS, W.; et al. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.**, n. 186 p. 343-355. 1990

BONJAR, G. H. S. New approaches in screening for antibacterials in plants. **Asian Journal of Plant Science.** v. 3, p.55-60, 2004.

BRASIL, FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília: Anvisa, 546 p., 1v/il, 2010. v. 2

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants.** 2. ed. Paris / London: Lavoisier Publishing / Intercept Ltd, 1999.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. The Royal Society of Chemistry, **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, 162–195, 2005.

CARIBE J.; CAMPOS J. M. **Plantas que ajudam o homem.** Guia Prático para Época. 1991.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy: Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia** v. 72 p. 599-618. 2001.

CHAKRABORTY, S. et al. Pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in a center of diversity in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, p.553-562, 2002.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **The Royal Society of Chemistry**, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHANDRA, S. Bacteria: drug resistance spreads, but few new drugs emerge. **Chemistry & Biology**. v. 17, May 28, 2010. DOI 10.1016/J.Chembiol.2010.05.006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts**. Approved Guideline- Second Edition. M44-A2. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard – Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M24- A2. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes**; Approved Standard - Second Edition, 2008

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 12: 564-82. 1999.

COSTA, A. F. Isolation and identification of the vegetables. In: **Pharmacognosy**. Lisbon: Calouste Gulbenkian v. 3, cap. 20, p. 926;62, 1982.

CROFT S; COOMBS, G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol** 19: 502-508, 2003.

CRUZ, E. M. **Avaliação da atividade de extratos de *talinum triangulare* e *sphagneticola trilobata* sobre *leishmania (l.) amazonensis***. Anais do congresso brasileiro de parasitologia: 21º encontro de parasitologia do Mercosul, 2009.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGÈS, T.; BERJEAUD, J-M.; IMBERT, C. **In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms**. International Journal of Antimicrobial Agents 31 572–576, 2008.

DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine** 10: 511-516. 2003.

DAVIES, J. E.; ROWND, R. Transmissible Multiple Drug Resistance in Enterobacteriaceae. **Science** : 758-768, 19 May 1972. [DOI:10.1126/science.176.4036.758]

DIAS et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. **Bioinorganic and medicinal chemistry**: 20(8), 2713 – 2720. 2012.

DJERASSI, C. Recent Advances In The Mass Spectrometry Of Steroids. **Pure & Appl. Chem.**, v. 50, p. 171—184. Pergamon Press. 1978.

DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos*(Myrtaceae). **J Ethnopharmacol.** 71:307-313, 2000.

EICHLER, H. G.; et al. **Why products fail in phase III.** *In Vivo* (1Apr 2006). Disponível em: <<http://sis.windhover.com/buy/abstract.php?id=2006800066>>. Acesso em: 20. Jun. 2013.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: RIBEIRO, D. **Suma etnológica brasileira**. Petrópolis: Vozes, 1997.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med** 64: 711-713, 1998.

ELOFF, J.N. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. **Phytomedicine**, v. 11, p. 370-1, 2004.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environ. Health Persp.** 109 (suppl. 1), 69-75, 2001.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Jornal Ethnopharmacol** 60: 79-84. 1998.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 852 p., 2v/il. 2010. v. 2

FEBRAFARMA. **Fitoterápico atrai investimentos**, 2007. Disponível em: <<http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>>. Acesso em: Mar. de 2012.

FORSBERG, K. J.; et al. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. **Science** : 1107-1111, 31 August 2012. [DOI:10.1126/science.1220761].

FRANCIS, G. The biological action of saponins in animal system: a review. **Br J Nutr**; 88(6):587–605, 2002 doi: 10.1079/BJN2002725.

GALLI, G.; MARONI, S. Mass Spectrometric Investigations Of Some Unsaturated Sterols Biosynthetically Related To Cholesterol. **Steroids**; 10(3):189-97, 1967.

GALLUCCI, N. et al. Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non-producing staphylococci. **Molecular Medicinal Chemistry**. v. 1 21, 132-136, January-April 2010.

GERMONPREZ, N., et al. *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. **J Med Chem** 48, 32–37, 2005.

HADECEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem Anal** v.11: p137-147, 2000.

HAMILTON, A. **Medicinal plants and conservation**: issues and approaches. [s.l.]: International Plants Conservation Unit, 2003.

HATTORI, M.; et al. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chem. Pharm. Bull.** 38(3):717-720, 1990.

HEIL, M.; et al. Extraction and quantification of ‘condensed tannins’ as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. **Naturwissenschaften**. 89:519–524, 2002.

HIGUCHI, C. K.; CORRÊA, C. R.; RALL, V. L. M.; JUNIOR, A. F. Evaluation of the diramic system for urine cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**. 37:221-224, 2006.

HOFER, URSULA. Sugar-coating virulent *Candida albicans*. **Nature Reviews Microbiology**. v.11, p. 360, 2013. doi:10.1038/nrmicro3042.

HEMAISWARYAA, S.; KRUTHIVENTIB, A. K.; DOBLEA, M. **Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases**. *Phytomedicine* 15 639–652, 2008

HOLETZ, F. B.; et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97: 1027-1031, 2002.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(3): 690-696, Jul./Set. 2009.

HURTS, K.K., KEYOMARSI, K. Cyclin e as a Prognostic and Predictive Marker in Breast Cancer. **Siminars in Cancer Biology**. 15, p. 319-326, 2005.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen ompounds. **J Agric Food Chem** 51: 1811-1815, 2003.

JAIN, P. S. & S. BARI, B. Isolation of Lupeol, Stigmasterol and Campesterol from Petroleum Ether Extract of Woody Stem of *Wrightia tinctoria*. **Asian Journal of Plant Sciences**, 9: 163-167, 2010.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables: the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 703-725, 2001

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, v.72, n.7, p. 825-828, 2001.

KINGHORN, A. D. Pharm. **Pharmacol.** 53, 135, 2001.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira S. A., v. 3, 682 p, 1995.

KRISTIANSSON, E. et al. Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. **PLoS ONE** | www.plosone.org. v. 6, Issue 2 e17038, Feb. 2011.

LACAILLE-DUBOIS, M; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**. v. 2 n. 4, p. 363–386, 1996.

LEITÃO, S. G.; et al. Screening of central and south american plant extracts for antimycobacterial activity by the alamar blue test. **Rev Bras Farmacogn** 16: 6-11, 2006.

LIMA JR, J. F.; DIMENSTEIN, M. A. Fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: Visão do odontólogo. **Saúde Rev.** 8:1937-44, 2006.

LONDONKAR, R.; NAYAKA, H. B. **Phytochemical and Antimicrobial Activities of *Portulaca Oleracea* L.** Association of Pharmaceutical Innovators. 2011.

LÓPES, S. N.; et al. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. **PNAS.** v. 104, n. 2, 441– 444, January 9, 2007.

LOZOYA, X. **Invesyigación y Ciência,** 254, p. 4, 1997.

LUSEBA, D. et al. Antibacterial, anti-inflammatory and mutagenic effects of some medicinal plants used in South Africa for treatment of wounds and retained placenta in livestock. **South African Journal of Botany** 73, 378–383, 2007.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. et al. Phenolic compounds from Brazillian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharm.,** v. 74, p.105-112, 2001.

MARTINS, E. R.; et al. **Plantas medicinais.** Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220p

MATTANA, C. M. Antibacterial activity of extracts of *Acacia aroma* against Methicillin-resistant and Methicillin-sensitive *Staphylococcus*. **Brazilian Journal of Microbiology;** v 41: p 581-587, 2010.

MELLO, J. P. C.; et al. *Da Planta ao Medicamento, Farmacognosia:* 3. ed. ORGS ED. UFSC;., 2001.

MICHELIN D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 15(4): 316-320, Out./Dez. 2005.

MORETTO, L. D.; **Pharm. Technol.** v. 4, n. 46, 2000.

MORSE, S.S. **Factors in the emergence of infectious diseases.** **Emerg Infect Dis.** 1995; 1: 715.

MÜLLER, V. D. M. **Triagem antiviral de extratos vegetais: Fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate).** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

NAVARRO, M.; GABBIANI, CHIARA.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**. v. 15, n. 23/24, December 2010.

NOLDIN, V.; FILHO, V.C. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, 331-334, 2003.

OLAJIRE, A. A.; AZEEZ, L. Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. **African Journal of Food Science and Technology** v. 2(2), pp.022-024, Fev. 2011.

OLESZEK, W.; BIALY, Z. Chromatographic determination of plants saponins – An update (2002-2005). **J. Chromat. A**, v.1112, n.1-2, p.78-9, 2006.

OGUNLADE et al. Evaluation of antioxidant activity and Vitamin E profile of some selected indigenous vegetables in Nigerian Diet. **Journal of Food Agriculture and Environment**. v. 7(2), 143 – 145, 2009.

ORDONEZ, A. A. L. **Food Chemistry** 2006, 97, 452–458.

OSTROSKY, E. A.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(2): 301-307, Abr./Jun. 2008.

OSORIO, E. et al. **Antiprotozoal and cytotoxic *in vitro* of Colombian Annonacea.** Journal of Ethnopharmacology, v.111, p. 630-635, 2007.

PANIZZA, S. **Plantas que curam (cheiro de mate)**. 15. ed. São Paulo: IBRASA, 1998. , 279 p

PEREIRA, R. J. & CARDOSO, M. G. J. Biotec. Biodivers. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4. p. 146-152, November 2012 ISSN: 2179-4804.

PERFECT, J. R.; SCHELL, W. A. The new fungal opportunists are coming. **Clin. Infect. Dis.**22:S112–S118., 1996.

PFALLER, M. A. et al. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 30:121–129, 1998.

POWLES, R. L.; MEHTA, J. Systemic fungal infections: major problems in cancer patients. **Indian J. Cancer** 31:180–184, 1996.

POWELL, J. P.; WENZEL, R. P. Antibiotic options for treating community acquired MRSA. **Expert Rev Anti Infect Ther.**; 6: 299–307, 2008.

RAMESH et al. Antihyperglycemic and antioxidant effects of *Talinum portulacifolium* leaf extracts in streptozotocin diabetic rats: A dose-dependent study. **Pharmacognosy Magazine**, v.. 5(19), 1 – 10, 2009.

RAMOS, M. P. O.; et al. Antinociceptive and edematogenic activity and chemical constituents of *Talinum paniculatum* Willd. **J. Chem. Pharm. Res.**, 2(6):265-274. 2010.

ROCHA, L. G.; et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 12: 514-535, 2005.

SANTOS, S. C.; et al, J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Rev Bras Farmacogn** 16: 552-556, 2006.

SANTOS, S. C. et al Evaluation of Antibacterial Activity of *Avicennia schaueriana* extracts. Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. **Rev Bras Farmacogn.** 20:124;9. 2010.

SAÚDE-GUIMARÃES DA, FARIA AR. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma Cruzi*. **Rev Bras Farmacogn** 17: 455-465, 2007.

SAVITHRAMMA, N.; ANKANNA, S.; RAO, M. L.; SARADVATHI, J. Studies on antimicrobial efficacy of medicinal tuberous shrub *Talinum cuneifolium*. **J Environ Biol.** 2012 Jul;33(4):775-80.

SAVONENKO, A. V.; et al. Alzheimer's Therapeutics: Translation of Preclinical Science to Clinical Drug Development. **Neuropsychopharmacology REVIEWS.** 37, 261–277, 2012

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochem.** 30: 3875;83, 1991.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. et al. **Pharmacognosy: from plant to medicine**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC; p.27, p. 597-619, 2001.

SCHENKEL, E. Pet al. **Plantas Tóxicas**. In: Simões, C. M. O.; et al. (eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed., Editora Universidade/UFRGS, 2001.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30: 507-512, 1974.

SIKKEMA J., Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews** 59: 201-222.1995.

SILVA, M.C.; et al. **Acute and Topic Anti-Edematogenic Fractions Isolated from the Seeds of Pterodon Pubescens**. 56, p. 135-141, 2004.

SILVA, R. B.; et al. Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilized hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 20(2): 171-174, Abr./Mai. 2010.

SILVÉRIO, F. O.; et al. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 6, p.1009-1016, 2006.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Porto Alegre: editora UFRGS, 1104p, 2007.

SINI et al. In-vitro Cytotoxic Activity of Orthosiphon thymiflorus Roth.) Sleensen Leaf Extract against Dalton Lymphoma Ascites Cell Line. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 2012, 4(1):917-921

SOARES, D. C. F. **Talinum patens** : Análise por ativação neutrônica instrumental e prospecção fitoquímica. (Dissertação), Universidade federal de Minas Gerais (UFMG). 93 p. Belo Horizonte, 2005.

STEVENS, P.F. 2001. **Angiosperm phylogeny** Website, version 9, June 2008. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em Jul. 2013.

STOB, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**. 5(2):29- 41, 2000.

TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Quim Nova** 5: 834-837, 2005.

TEMPONE, A.G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. **Phytomedicine**, v. 12, p. 382-390, 2005.

THANAMOOL, C.; et al. *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gertn: A medicinal plant with potential estrogenic activity in ovariectomized rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. V. 5, Issue 2, 2013.

TRIAL-WATCH. Phase III and submission failures: 2007–2010. **Nature reviews | Drug Discovery**. volume 10, february 2011

VELASCO et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v 55,p 379–382, 2005.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical, biological and economic aspects. **Quím Nova**. 28: 85;94, 2005.

VILAR et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz. J. Biol**v 68(1): p141-147, 2008.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO V., Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: YUNES, R. A.; Calixto, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó-SC, Argus, 523 p., 2001.

ZHANG, Y.; POST-MARTENS, K.; DENKIN, S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. **DDT**. Volume 11, Number ½, January 2006.

ZUCOLLOTO, T.; APEL M.; RATES, S. M. K. Análise de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 58, n.2, p. 25-31, 1999.

WAGNER, H.; WISENAUER, M. **Fitoterapia** : Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report on infectious diseases**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2012.

WIENARSIH, Y.; RAZIEF I. N. "The Study of Phytochemistry of Java Ginseng Compare to Korean Ginseng". **Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics**. Supplement 88. p. 45-49. 2006.

WIDIYANI, T. Efek antifertilitas ekstrak akar som jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada mencit (*Mus musculus* L.) **JANTAN**. v. 34, n. 3, p. 119-128. 2006.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production—a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 8093–8105. 2005a.

WINA, E.; et al. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect munit structure *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, 121, 159–174. 2005b.

WINARNI, D. Efek ekstrak akar ginseng Jawa dan Korea terhadap libido mencit jantan pada prakondisi testosteron rendah. **Berkala Penelitian Hayati** 12(2):153-159. 2007.

WINK, M. **Physiology of secondary product formation in plants**. Heidelberg: Universität Heidelberg, Institut für Pharmazeutisch Biologie, 1990. p. 23