

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



TESE

**Estudos fisiológicos e purificação de amarantina em plantas do gênero
*Alternanthera***

Alícia Moraes Kleinowski

Pelotas, Janeiro de 2015

ALÍTICA MORAES KLEINOWSKI

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E PURIFICAÇÃO DE AMARANTINA EM PLANTAS
DO GÊNERO *Alternanthera***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de
Pelotas como requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Coorientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

K64e

Kleinowski, Alitcia Moraes

Estudos fisiológicos e purificação de amarantina em plantas do gênero *Alternanthera* / Alitcia Moraes Kleinowski. – 107f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientadora Eugenia Jacira Bolacel Braga; coorientadores Luciano do Amarante, José Antonio Peters.

1.Fisiologia vegetal. 2.Plantas medicinais. 3.Cromatografia-líquida de alta eficiência. 4.Metabólitos secundários. 5.Elicitação. 6.Betacianinas. 7.Betalaínas. 8.Atividade antibacteriana. I.Braga, Eugenia Jacira Bolacel. II.Amarante, Luciano do. III.Peters, José Antonio. IV.Título.

CDD: 581.634

Banca Examinadora:

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Orientadora)

Dr. Valmor João Bianchi

Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

Dr^a. Juliana de Magalhães Bandeira

Dr^a. Márcia Vaz Ribeiro

"Ideias não foram feitas para serem “respeitadas”, elas foram feitas para serem debatidas, questionadas, copiadas, circuladas, disseminadas, combatidas, defendidas, parodiadas, aceitas e criticadas. De preferência com argumentos”.

(Idelber Avelar)

Dedico

Para ti paizinho com carinho e gratidão;

Agradecimentos

No final de mais uma etapa da minha vida, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a percorrer esta caminhada, lembrando, sempre, que o importante é **a partida** e não a chegada.

Aos meus irmãos Clarissa e Vinícius e aos meus pais, Marco Antonio e Rosinha (*in memoriam*), aos quais serei eternamente grata;

A uma pessoa maravilhosa, com um coração quase tão grande quanto o sorriso, que me encantou no primeiro olhar, linda tanto por dentro quanto por fora, que esteve ao meu lado me apoiando, ajudando, aguentando e acima de tudo enfeitando minha vida com Rosas y Lírios.

A minha Orientadora e Amiga, Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga, não só pela competente orientação, mas pela sinceridade, paciência, confiança e por estar sempre ao meu lado acreditando no meu potencial.

A mi *gran* tutor y *jefe*, Dr Fernando Gandía-Herrero, que aceitou o desafio de coorientar nosso trabalho no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidad de Murcia - Espanha. Fazendo tudo que estava ao seu alcance para aperfeiçoar a minha formação profissional e aprimorar essa tese com toda sua paciência, sabedoria e experiência, me ensinando a *manejar* equipamentos, instrumentos e cálculos.

A todos os professores do Curso de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, especialmente aos meus Coorientadores, Prof. Luciano do Amarante pela ajuda nas análises espectrofotométricas e conversas bioquímicas e ao Prof. José Antonio Peters pelos ensinamentos em cultura de tecidos e nutrição mineral.

À Amiga e eterna Orientadora Dr^a Beatriz Rocha, pela paciência, incentivo, força e momentos de descontração.

Ao Pós-doutorando Dr Marcelo Mendonça do laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Biotecnologia que me auxiliou de análises microbiológicas.

A todos bolsistas de iniciação científica que estiveram, comigo, nessa caminhada, aqui representados por Anderson Einhardt, Renata Trevizan e Priscila Auler.

Todos os colegas do curso de Doutorado, pela agradável convivência momentos de alegria e ansiedade, especialmente, Ilda Castro, Cristina Cuchiara, Cristina Moll Huther, Andersom Schock, Elisia Corrêa e outros.

Às amigas, Andressa Reis, Camila Junkes, Márcia Ribeiro, Janete Adamiski, Isabel Brandão, algumas estão fisicamente longe, mas sempre farão parte da minha vida e saibam que guardarei vocês no meu coração.

Às colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas por todo apoio, incondicional, dedicado a mim desde o meu ingresso no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

À Universidade Federal de Pelotas por me acolher desde a Graduação em Ciências Biológicas até aqui.

Finalmente, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por concessão da bolsa de estudo que me oportunizou concretizar o sonho de participar do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e também por subsidiar a *beca* de Doutorado sanduíche na Espanha, que possibilitou aprimorar meu trabalho para a obtenção do grau de Doutor em Fisiologia Vegetal.

RESUMO

KLEINOWSKI, Alírcia Moraes. Estudos fisiológicos e purificação de amarantina em plantas do gênero *Alternanthera*. 2015. 107 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

Algumas espécies do gênero *Alternanthera* são utilizadas na medicina popular devido a sua conhecida atividade terapêutica. O estudo de novos produtos a partir de pesquisas com plantas medicinais vem provando ser a estratégia mais bem-sucedida para a descoberta de novas drogas com etapas fundamentais e complementares entre si, como extração, identificação e isolamento do composto. O objetivo desse trabalho foi a identificação dos principais pigmentos betalâmicos e flavonoides presentes nas espécies *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera tenella*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE/EM-EM), além de investigar a influência do metil jasmonato (MeJa) como elicitor na produção de betacianina, flavonoides e na atividade da fenilalanina amônia liase (FAL), nessas espécies, bem como, isolar e purificar a betacianina majoritária, para verificar sua atividade antibacteriana. Constatou-se, pela primeira vez por CLAE/EM-EM, a presença da betacianina amarantina nos extratos hidroalcoólicos dessas plantas, porém, nenhum padrão de flavonoide usado, foi encontrado nestes extratos. Com a exposição ao MeJa em *A. brasiliana* constatou-se, comparando ao controle, que os maiores teores de amarantina estão presentes nos caules, e que o elicitor não influenciou significativamente no aumento dos teores deste pigmento. A atividade da enzima FAL apresentou diferenças entre os órgãos, sendo que no caule a maior atividade foi observada no tratamento controle. Em *A. tenella* aos sete dias de tratamento não houve diferença no teor de amarantina entre caules e folhas, somente aos 14 dias, após a aplicação do MeJa, as folhas incrementaram a produção deste metabólito diferindo-se dos caules, enquanto a FAL obteve aumento significativo somente aos 14 dias, no caule. Foi utilizada a técnica de cromatografia de troca iônica, pela primeira vez, para isolar e purificar a amarantina, uma betacianina de *A. brasiliana*, para realizar os testes de sensibilidade bacteriana em três cepas de bactérias (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp.), as quais, não foram sensíveis aos tratamentos (amarantina pura, extratos de folha e caule de *A. brasiliana*). Com este estudo foi possível identificar a amarantina como principal betacianina nas espécies *A. brasiliana* e *A. tenella*, verificar seu comportamento fisiológico e o da enzima FAL, sob eliciação de MeJa, e principalmente desenvolver novos protocolos para extração e purificação, deste pigmento, nestas espécies de *Alternanthera*.

Palavras-chave: plantas medicinais, cromatografia-líquida de alta eficiência, metabólitos secundários, eliciação, betacianinas, betalaínas, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

KLEINOWSKI, Alírcia Moraes. 2015. Physiological and purification the amarantin in plants of *Alternanthera* 107 p. Thesis (Doctoral degree) – Graduation Program in Vegetal Physiology. Federal University of Pelotas.

Some species of the genus *Alternanthera* are used in folk medicine because of its known therapeutic activity and because they are producers and accumulators of secondary metabolites such as betalaines. The approach of new products from research on medicinal plants has been proven to be the most simple and successful strategy for the discovery of new drugs, and contains essential and complementary steps, such as extraction, identification and isolation of the compound. The aim of this study was to identify the presence of the main betalainic pigments and flavonoids in species *Alternanthera brasiliiana* and *Alternanthera tenella*, using liquid chromatography coupled to high performance mass spectrometry (HPLC/MS-MS) and investigate the influence of methyl jasmonate as elicitor to the production of betacyanin, flavonoids and phenylalanine ammonia lyase activity (PAL) in these species, as well as isolate and purify the majority betacyanin to check for antibacterial activity. It was found, for the first time by HPLC/MS-MS, the presence of amarantin betacyanin in hydroalcoholic extracts of these plants, but no standard of flavonoid used was found in these extracts. With exposure to MeJa in *A. brasiliiana* it was found, on control that the largest amarantin levels are present in the stems and the elicitor significantly influenced the increased levels of this pigment. The PAL enzyme showed difference in activity between the organs, and the stem showed higher activity of this enzyme in control. In *A. tenella* after seven days of treatment there was no difference in content of amarantin between stems and leaves, and only at 14 days after application of MeJa, the leaves presented increased production of this metabolite differing from the stems, while a significant increase in PAL was obtained only at 14 days on the stem. We performed the purification of amarantin by ion exchange chromatography and after we used the isolate on bacterial sensitivity test with three strains of bacteria: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella sp.* to which they were not sensitive to treatments (pure amarantin extracts of leaves and stem of *A. brasiliiana*). However, this work is the first report of the successful use of ion exchange chromatography technique to isolate and purify the amarantin - a betacyanin from *A. brasiliiana*. With this study was possible to identify the main Amarantin betacyanin in species *A. brasiliiana* and *A. tenella*, check their physiological behavior and the PAL enzyme under MeJa elicitation and develop new protocols for extraction and purification of this pigment in these *Alternanthera* species.

Keywords: medicinal plant, high performance liquid chromatography, secondary metabolites, elicitation, betacyanins, betalains, antibacterial activity

SUMÁRIO

1. Introdução geral	13
2. Revisão de literatura	15
2.1 Plantas medicinais	15
2.2 Estudos com gênero <i>Alternanthera</i>	16
2.3 Betalaínas	17
2.4 Flavonoides	19
2.5 Elicitores	20
2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massa (CLAE/EM-EM)	21
2.7 Atividade Antibacteriana	23
3. Referências bibliográfica	24
Artigo 1- Identificação de pigmentos betalâmicos e flavonoides por CLAE/EM-EM em plantas de <i>Alternanthera</i>	33
Resumo	33
Abstract	34
1 Introdução	35
2 Material e métodos	37
3 Resultados e Discussão	41
4 Conclusões	52
5 Referências bibliográfica	52
Artigo 2 – Metil jasmonato na síntese de amarantina e compostos flavonoídicos em duas espécies de <i>Alternanthera</i>	58
Resumo	58
Abstract	59

1 Introdução	60
2 Material e métodos	62
3 Resultados e Discussão	65
4 Conclusões	75
5 Referências bibliográfica	75
6 Apêndices	82
Artigo 3 – Purificação e atividade antibacteriana de amarantina extraída de <i>Alternanthera brasiliana</i>	84
Resumo	84
Abstract	85
Introdução	86
Parte experimental	87
Resultados e Discussão	91
Conclusão	100
Referências bibliográficas	100
4. Considerações finais	106

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os produtos naturais obtidos de plantas são investigados e utilizados pelo homem muitas vezes, empiricamente, para aliviar suas enfermidades, desde o início de sua história. Antes da “era da síntese em 1950”, 80% de todos os remédios utilizados eram obtidos de raízes, caules e folhas das plantas (MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Os conhecimentos adquiridos pela medicina popular sobre os metabólitos ativos das plantas associados à biodiversidade e a biotecnologia, ainda são utilizados para a cura de enfermidades e constituem a matéria prima para as novas descobertas da indústria farmacêutica (RITTHIWIGROM; LAPHOOKHIEO; PYNE, 2013).

Algumas espécies da família *Amarantaceae*, caracterizadas pela presença de betalaínas e flavonoides, pertencentes ao gênero *Alternanthera*, já estão sendo utilizadas como modelos biológicos para estudos sobre a fisiologia do seu metabolismo secundário tanto na produção como no armazenamento e aproveitamento dessas moléculas naturais (KLEINOWSKI et al., 2014).

Dentro deste gênero podemos destacar *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, popularmente conhecida como penicilina e empregada para o tratamento de infecções (DELAPORTE et al., 2005, BROCHADO et al., 2003) e, a espécie *Alternanthera tenella* Colla, uma planta medicinal conhecida como sempre-viva ou apaga-fogo (SOUZA; LORENZI, 2012).

A sabedoria popular, aliada aos estudos etnobotânicos e fitoquímicos de plantas medicinais, tem provado ser uma estratégia bem sucedida para a descoberta de novas moléculas com atividades biológicas. No entanto, essa busca envolve várias etapas fundamentais e complementares entre si que devem ser respeitadas (VUORELA et al., 2004).

Dentre essas etapas, destacam-se principalmente, a determinação do melhor tipo de extração para determinados compostos, análises fitoquímicas utilizando métodos analíticos mais modernos e confiáveis, como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa, visando amplificar o caráter analítico da mesma (COLLINS, 2006) e, finalmente, o isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos com

a comprovação de uma atividade biológica (CECHINEL; YUNES, 1998, CALIXTO, 2005).

Valorizando a utilização empírica das espécies medicinais de *A. brasiliiana* e *A. tenella* no Brasil e para aumentar o embasamento e melhor aproveitamento dos produtos naturais produzidos por essas plantas foi realizado um convênio entre o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas na pessoa da Dr^a Eugenia Jacira Bolacel Braga com o Dr Fernando Gandía-Herrero, investigador do Laboratório de Bioquímica e Biología Molecular da Universidade de Murcia – Espanha. O pesquisador é especialista em bioprospecção de betalaínas, produtos naturais e enzimas de plantas, e, a partir deste consórcio, tornando-se possível desenvolver este estudo, que buscou identificar os pigmentos betalâmicos, flavonoides e atividade da enzima Fenilalanina amônia liase destas plantas. Para isso, a presente tese está dividida em três artigos: o primeiro visou identificar os principais pigmentos betalâmicos e flavonoides presentes nas espécies *A. brasiliiana* e *A. tenella*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE/EM-EM). O segundo investigou a influência do metil jasmonato como elicitor na produção de betacianina, flavonoides e na atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) de *A. brasiliiana* e *A. tenella*. Finalmente, o terceiro artigo objetivou isolar e purificar a betacianina majoritária em *A. brasiliiana* para verificar se esta possui atividade antibacteriana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O uso das plantas medicinais para prevenção, tratamento e/ou cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (ULRICH-MERZENICH, 2014). Primeiramente, foi somente por meio de observações que o homem passou a conhecer seus efeitos benéficos ou maléficos, catalogando essas plantas medicinais de acordo com sua eficácia e modo de administrar, sem ao menos conhecer suas propriedades, constituição e composição química (ENECHI; ODO; WUAVE, 2013).

Posteriormente, foi postulado que essas plantas terapêuticas possuíam um arsenal químico natural, que possibilitaria a descoberta de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo, desenvolvendo várias ciências, incluindo a química dos produtos naturais (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Esses produtos naturais, também chamados de metabólitos secundários presente nas plantas, possuem uma biossíntese complexa que os difere dos metabólitos primários, pela baixa produção e heterogenidade dentro das plantas. Ainda, estão sujeita a influência de diferentes variáveis ambientais (TAIZ; ZEIGER, 2009) e representam uma interface química entre os vegetais e o ambiente circundante onde fatores bióticos e abióticos interferem na qualidade e na quantidade de produtos secundários de uma planta, em um determinado momento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Além disso, esses produtos naturais não apresentam distribuição universal no reino vegetal, sendo comuns entre certos grupos taxonômicos, ou exclusivos para outros. Possivelmente, seriam as pressões adaptativas e as possibilidades biossintéticas de cada tribo de plantas que modularam ao longo do tempo a formação dessa infinidade de moléculas com diferentes funções dentro das plantas (BERKOV; MUTAFOVA; CHRISTEN, 2014).

É importante mencionar que o uso de plantas medicinais, simboliza muitas vezes, o único recurso terapêutico em algumas comunidades e/ou grupos étnico. Em todas as regiões do Brasil, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e algumas delas usadas

com sucesso na atenção primária a saúde e distribuídas para a população, reconhecidas inclusive pelo Sistema Único de Saúde do País (SOUZA et al., 2008, BRASIL, 2009).

No entanto, esta realidade representa apenas a ponta do *iceberg* na importância das plantas medicinais, já que os produtos naturais extraídos dessas plantas fornecem uma diversidade estrutural única, que aliada com o padrão da química combinatória e sintética proporciona oportunidades para a descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2014).

Para explicitar a importância dos estudos fitoquímicos e bioprospecção de plantas medicinais aproximadamente metade de todos os medicamentos licenciados e registrados em todo o mundo no período anterior ao ano de 2010, foram produtos naturais ou seus derivados sintéticos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). No entanto, levando em consideração a vasta Biodiversidade Brasileira e a heterogeneidade dos metabolitos ativos dessas plantas, muitas moléculas ainda precisam ser reveladas e melhores identificadas.

2. 2 Estudos com o gênero *Alternanthera*

O gênero *Alternanthera* pertence à família Amaranaceae, ordem das Caryophyllales, sendo formado por 80 espécies, amplamente distribuídas pelo mundo e estima-se que 25% delas são encontradas no Brasil (SIQUEIRA, 1995).

Algumas espécies, como a *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera tenella*, já estão sendo utilizadas como modelos biológicos para estudos sobre a fisiologia do metabolismo secundário tanto na produção como no armazenamento e aproveitamento de moléculas naturais como betalaínas e flavonoides (SILVA et al., 2005, PEROTTI et al., 2010, KLEINOWSKI et al., 2014).

A espécie *A. brasiliana* é conhecida como “doril”, “perpétua-do-Brasil”, “penicilina” e “tetraciclina”, sendo uma espécie frequentemente empregada na fitoterapia para tratar febre, dores e processos infecciosos (JANDREY; ONOFRE, 2009). Nos seus extratos já foram identificados flavonoides

(kaempferol 3-O-robinobiosídeo, kaempferol 3-O-rutinosídeo e quercetina), betacianinas totais e amarantina (BROCHADO et al., 2003, SILVA et al., 2005).

A espécie *A. tenella*, conhecida popularmente como “apaga-fogo” e “sempre viva” é utilizada em casos de infecções, febres e também como diurético (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

Os principais metabólitos secundários encontrados nesta espécie foram betacianinas totais (KLEINOWSKI et al., 2014, RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014) e flavonoides glicosídeos e heterosídeos como a vitexina, quercetina, kaempferol (SALVADOR et al., 2006, BIELLA et al., 2008).

2.3 Betalaínas

As betalaínas ou pigmentos betalâmicos são moléculas nitrogenadas, solúveis em água, derivadas do aminoácido tirosina pela ação da enzima tirosinase (Figura 1), sendo sintetizados no citoplasma e armazenados nos vacúolos dos vegetais (GROTEWOLD, 2006, SANT'ANNA et al., 2013).

Esses pigmentos são encontrados em apenas 13 das 15 famílias de plantas da ordem Caryophyllales, no entanto, existem duas exceções: as famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae que acumulam antocianinas (DELGARDO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Há dois tipos de betalaínas: betaxantinas, que são derivados de ácido betalâmico condensado a diferentes aminas e aminoácidos apresentando coloração amarela e com espectro de absorção em um comprimento de onda máximo de cerca de 480 nm (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

O outro tipo é conhecido como betacianinas, onde independentemente da natureza de aminoácidos, o ácido betalâmico aparece condensado com ciclo-dihidroxifenilalanina-(ciclo-DOPA), conferindo a essas moléculas a coloração violeta e com um espectro de absorbância centrado em 536 nm (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA, 2013). Essas últimas podem ser classificadas por sua estrutura química em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina. Até o momento são descritos aproximadamente 50 tipos de betacianinas (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

As espécies da família Amaranthaceae, dos gêneros, *Beta*, *Mirabilis*, *Bougainvillea*, *Celosia*, *Gomphrena*, *Portulaca* acumulam betacianinas (CAI;

SUN; CORKE, 2005) e já existe uma gama de estudos para o aproveitamento medicinal e farmacológico destas espécies. Além de elas serem usadas como fonte natural para extração e purificação dos pigmentos betalâmicos, são muito importantes comercialmente, como corantes naturais e antioxidantes (STINTZING; CARLE, 2007, PAVOKOVI; KRSNIK-RASOL, 2011).

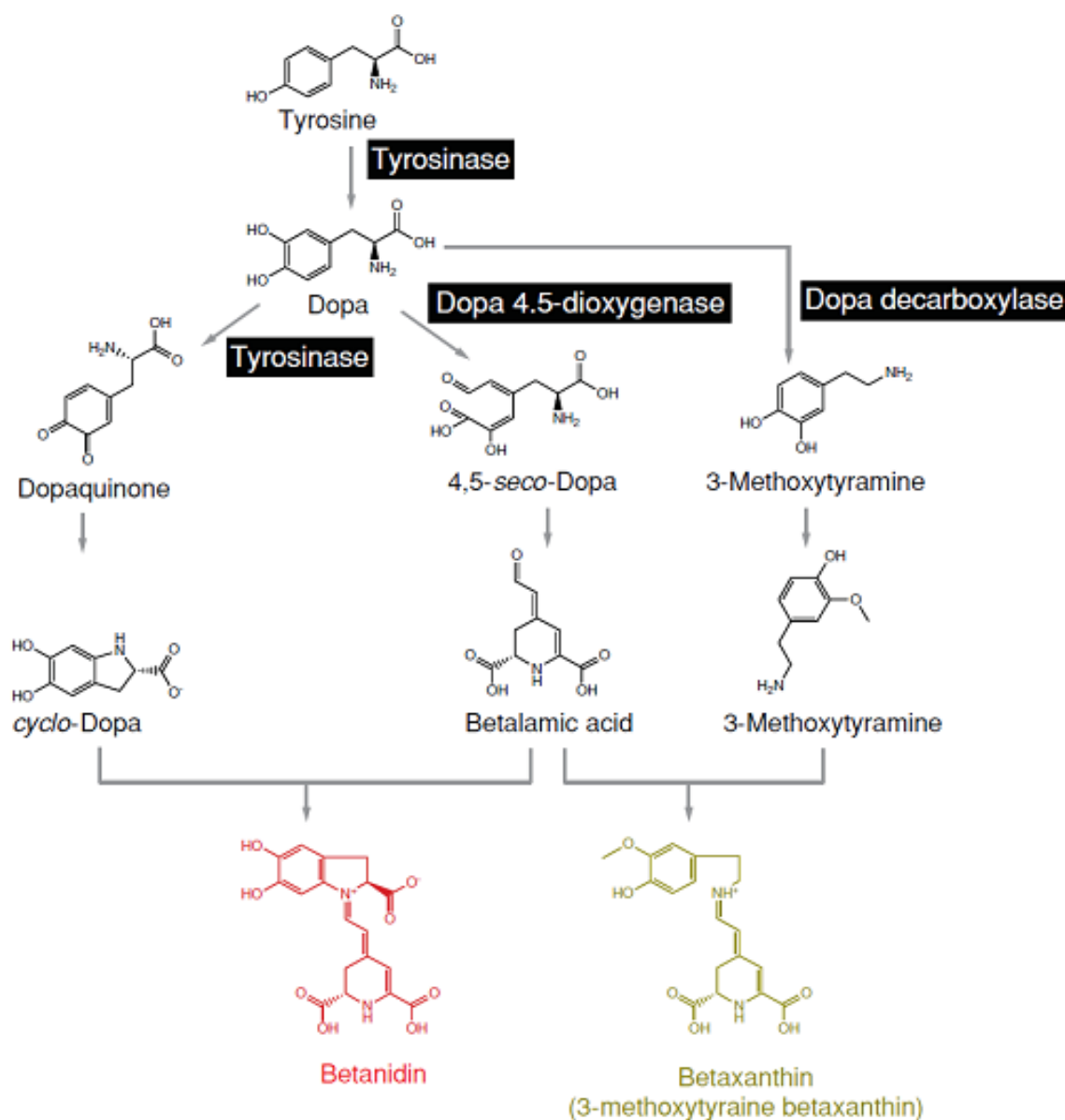


FIGURA 1- Representação esquemática da rota biossintética de algumas betalaínas (GROTEWOLD, 2006).

2.4 Flavonoides

Os flavonoides são os compostos fenólicos naturais, mais comum e amplamente distribuídos nas plantas. A grande maioria destes compostos é derivada do aminoácido fenilalanina, via eliminação de uma molécula de amônia com subsequente formação de ácido cinâmico e p-cumárico.

Esta reação é, principalmente, catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (FAL) situada num ponto chave entre o metabolismo primário e secundário (MYUNG-MIN et al., 2008) essencial para a biossíntese desses compostos (ANDRÉS-LACUEVA et al., 2008). Mais de 8.000 entidades flavonoídicas, já foram identificadas e sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental (Figura 2), constituído de quinze átomos de carbono, arrançados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C), acoplado ao anel A (ESCARPA; GONZALEZ, 2001).

Os flavonoides que ocorrem na natureza foram classificados a partir de sua estrutura química e se distribuem nos seguintes grupos: flavonas, flavonóis, dihidroflavonoides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonoides, auronas, neoflavonoides, biflavonoides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas, podendo ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados em diversas famílias de plantas (LOPES et al., 2000).

Todos estes flavonoides podem ser isolados mediante diferentes técnicas cromatográficas (cromatografia em coluna aberta, cromatografia líquida de alta eficiência, e cromatografia fina de alta eficiência) e identificados por espectrofotometria de massa e ressonância magnética nuclear (SHAOHAIB et al., 2011).

Na espécie *A. brasiliiana* já foram identificados alguns flavonoides como o kaempferol 3-O-robinobiosídeo, kaempferol 3-O-rutinosídeo e quercetina (BROCHADO et al., 2003) e na espécie *A. tenella*, já foram encontrados flavonoides glicosídeos e heterosídeos como a vitexina, quercetina, kaempferol (SALVADOR et al., 2006, BIELLA et al., 2008).

Essas moléculas apresentam inúmeras funções dentro das plantas dentre elas, podem-se citar: proteções dos vegetais contra a incidência de raios

ultravioleta, proteção contra insetos e patógenos além de participarem da conformação estrutural da parede celular das plantas (OSORIO-ESQUIVEL et al., 2011). Entretanto, são os seus benefícios para a saúde humana que despertam atenção especial, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já estabelecidas (VERARDO et al., 2010).

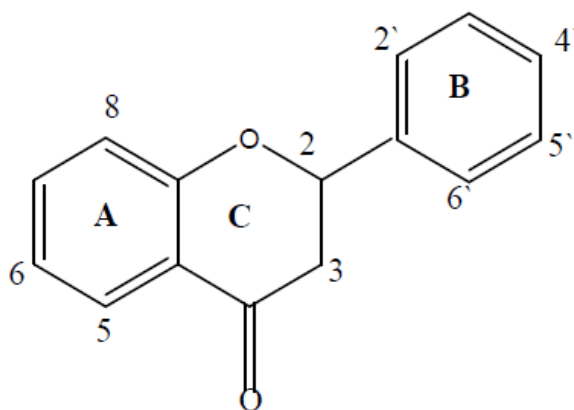


FIGURA 2 - Estrutura química dos flavonoides (ESCARPA; GONZALEZ, 2001).

2.5 Elicitores

Os elicitores são compostos ou tratamentos que simulam condições que alterem rotas metabólicas e fisiológicas de plantas, afetando qualitativamente e/ou quantitativamente a síntese de moléculas bioativas do metabolismo secundário ou primário dos vegetais (SIRCAR; MITRA, 2009). Além disso, os elicitores podem aumentar a produção de moléculas com interesses farmacológicos em plantas, sendo elas medicinais ou não. Eles são classificados como bióticos e abióticos, os primeiros têm origem biológica, sendo derivados de patógenos ou da própria planta e os elicitores abióticos não têm origem biológica e são agrupados em fatores físicos e compostos químicos que podem ser moléculas componentes do metabolismo da planta como fitohormônios, aminoácidos e outras (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

O aumento de metabólitos secundários por elicitação é uma das estratégias encontradas para atender a demanda comercial de compostos de interesse industrial (RAMAKRISHNA; RAVISHANKA, 2011). Estes indutores que podem ser físicos e/ou químicos ao entrar em contato com as plantas

desencadeariam um estresse celular, (ZHAO; VERPOORTE, 2007) induzindo um aumento dos metabólitos secundários tais como os pigmentos betalâmicos, flavonoides e outros compostos (GEORGIEV et al., 2008).

Entre as diferentes estratégias utilizadas com este objetivo umas das que têm obtido maior êxito é a eliciação química com uso de moléculas como o metil jasmonato (MeJa), um composto bioativo ligado a mecanismos de defesa dos vegetais, cuja aplicação exógena pode afetar fisiologicamente o metabolismo secundário das plantas (LÓPEZ-NICOLAS et al. 2013).

Além disso, segundo o incremento dos níveis de composto fenólicos e nitrogenados com o uso de elicitores como o MeJa, dependem também do rápido aumento na atividade de enzima de fenilalanina amônia liase (MANDAL, 2012) e podem levar a biossíntese de moléculas com alto valor farmacológico, inclusive de betacianinas e flavonoides em cultivos celulares e outros (BHUIYAN; ADACHI, 2003).

2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massa (CLAE/EM-EM)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e utilizada nos laboratórios de análises químicas e de bioprospecção de plantas medicinais (LÜ et al., 2012). A CLAE utiliza suporte com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas (DEGANI et al., 1998).

A grande sensibilidade de técnicas cromatográficas possibilitou o seu uso de forma rotineira em análise de substâncias em baixa concentração, como em plantas medicinais, contaminação ambiental, entre muitas outras aplicações (XU et al., 2012). Devido à utilização de colunas com grande capacidade de separação a realização da CLAE requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para eluição da fase móvel (PERES, 2002). Na Cromatografia líquida de alta eficiência, a fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem que qualquer interação química ocorra entre ambas. A fase estacionária deve ser compatível com o detector, possuindo polaridade

adequada para permitir a separação adequada dos componentes da amostra (PERES, 2002).

Esta técnica pode ser utilizada para identificar e isolar componentes medicinais de plantas (LÜ et al., 2012), além de auxiliar em estudos de farmacocinética (AMORIM et al., 2008; GIORGI et al., 2009) e validar técnicas de purificações de compostos naturais em plantas medicinais entre inúmeros outros usos.

A CLAE pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas, obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Para que o acoplamento seja possível em estudo de bioprospecção de plantas, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas (VÉKEY, 2001), para isso nos estudos de fitoquímica e bioprospecção é necessário testar uma série de metodologias levando em conta a polaridade da coluna, os eluentes da fase móvel e os metabólitos a serem analisados (COLLINS, 2006).

Em plantas do gênero *Alternanthera* alguns trabalhos já foram publicados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência como ferramenta de prospecção bioquímica (BROCHADO et al., 2003, SALVADOR et al., 2006, BIELLA et al., 2008, FACUNDO et al., 2012, KANNAN et al., 2014). No entanto, este trabalho utilizará a CLAE acoplada a espectrometria de massas para revelar pela primeira vez a existência do pigmento amaranthina nas plantas do gênero *Alternanthera*.

2.7 Atividade antibacteriana

Muito antes de a humanidade descobrir a existência dos microrganismos, a idéia de que certas plantas tinham potencial de cura para infecções já eram conhecidos. Na verdade, o que elas continham é o que atualmente se caracteriza como princípios antimicrobianos e desde a antiguidade, até hoje o homem utiliza essas plantas para tratar as doenças causadas por bactérias (RIOS; RECIO, 2005).

No entanto, foi a partir de 1929 com a descoberta da penicilina, e depois de 1970, que o consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas a esses compostos (DUARTE, 2006).

Essa resistência a drogas pelos microrganismos patogênicos é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (SILVA, 2006).

Por isso a busca de novas alternativas que possam substituir ou melhorar os antimicrobianos disponíveis é fundamental, uma das fontes de pesquisa é representada pelos produtos de origem natural (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014). Grande parte dos antimicrobianos em uso (penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, entre outros) é derivada de metabólitos secundários de fungos e bactérias, no entanto, as propriedades antimicrobianas desses metabólitos, presentes em extratos e óleos essenciais de plantas, futuramente podem substituir os medicamentos outrora eficientes, derivados de microrganismos (SCHENKEL et al., 2004).

Desta forma, a investigação de moléculas com potencial antibacteriano no gênero *Alternanthera* é bastante relevante já que essas espécies possuem uma enorme diversidade estrutural de seus produtos naturais, além disso, foram realizados alguns estudos promissores na busca de moléculas com esta atividade biológica (JALALPURI; GRAWAL; PATIL, 2008, JANDREY; ONOFRE, 2009, FACUNDO et al., 2012, KANNAN et al., 2014).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, R.; GALHARDO, A.; VALADÃO, C. A. A.; PECCININI, R. G.
Determinação de cetamina em plasma por HPLC: aplicação em um estudo de farmacocinética de associação medicamentosa em cães. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2008.
- ANDRES-LACUEVA, C.; MONAGAS, M.; KHAN, N.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; URPI-SARDA, M.; PERMANYER, J.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3111-3117, 2008.
- BERKOV, S.; MUTAFOVA, B.; CHRISTEN, P. Molecular Biodiversity And Recent Analytical Developments: a marriage of convenience. **Biotechnology advances**, v. 32, p. 1102-1110, 2014.
- BHUIYAN, N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin syntesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 1117-1124, 2003.
- BIELLA, C. A.; SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A.; DIAS-BARUFFI, M.; PEREIRA-CROTT, L. S. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 569-577. 2008.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em Janeiro de 2015.

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

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

CALIXTO, J. B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.131-134, 2005.

CECHINEL, F. V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

COLLINS, C. H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. **Química Nova**, v. 29, p. 889-890, 2006.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.31, p. 623-636, 2008.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 703-723, 2014.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 1-17, 2014.

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

DELGARDO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, p. 173–289, 2000.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova**, v 24, p. 21-25, 1998.

DESHMUCK, N. I. K.; BARKER, J.; PETROCZI, A.; NAUGHTON, D. P. Detection of testosterone and epistestosterone in human hair using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 67, p. 154-158, 2012.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A. Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, v. 7, p.10-14, 2006.

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

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 57-139, 2001.

FACUNDO, V. A.; M. S.; AZEVEDO, R. V.; RODRIGUES, L. F.; DO NASCIMENTO, J. S. L. T.; MILITÃO, G.; DA SILVA, V. J.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1134-1139, 2012.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 334-343, 2013.

GIORGI, M.; SACCOMANI, G.; LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; KOWALSKI, C. Pharmacokinetic evaluation of tramadol and its major metabolites after single oral sustained tablet administration in the dog: a pilot study. **Veterinary Journal**, v. 180, p. 253-255, 2009.

GEORGIEV, V.; MLADENKA, I.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant in vitro systems. **Acta physiologic plant**, v. 30, p. 581-593, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GROTEWOLD, E. The Genetics and chemistry of Floral Pigments. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57 p. 761-780, 2006.

JALALPURE, S. S.; GRAWAL, N.; PATIL, M. B.; CHIMKODE, R.; TRIPATHI, A. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternanthera sessilis* Linn. **International Journal of Grenn Pharmacy**, v. 2, p. 140-142, 2008.

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

KANNAN, M.; CHANDRAN, R.; PRATI, P.; MANJU, S. Preliminary phytochemical and antibacterial studies on leaf extracts of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical**, v.6, p.626-628, 2014.

KLEINOWSKI, A. M.; RODRIGUES, I. C. S.; RIBEIRO, M. V.; EINHARDT, A. M.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 57, p. 253-260, 2014.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonoides: farmacologia de flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, 2000.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; CAMPS, M. E.; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; GARCÍA-CARMONA, F. Physicochemical and thermodynamic Characterization of the Encapsulation of Methyl Jasmonate by Natural and Modified Cyclodextrins Using Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11347–11354, 2013.

LÜ, H. T.; LIU, J.; DENG, R.; SONG, J. Y. Preparative Isolation and Purification of Indigo and Indirubin from *Folium isatidis* by High-speed Counter current Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.23, p. 637-641.2012.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal Biotechnology**, v. 47, p. 8038-8047, 2012.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015–2022, 2007.

MYUNG – MIN, M. H.; HAROLD, N.; TRICK, C. B.; RAJASHAKA, R. Secondary metabolisms and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **Journal Plant Physiology**, v. 5, p. 1-11, 2008.

OSORIO-ESQUIVEL, O.; ORTIZ - MORENO, A.; ÁLVAREZ, V. B.; DORANTES –ÁLVAREZ, L.; GIUSTI, M. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. **Food Research International**, v. 44 p. 2160–2168, 2011.

PAVOKOVIC, D.; KRSNIK-RASOL, M. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 145–155, 2011.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v. 64, p. 227-229, 2002.

PEROTTI, J. C.; RODRIGUES, I. C. S.; KLEINOWSKI, A. M.; RIBEIRO, M. V.; EINHARDT, A. M.; PETERS, J. A.; BACARIN, M. A.; BRAGA, E. J. B. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1874-1880, 2010.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKA, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6 p. 1720-1731, 2011.

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

RITTHIWIGROM, T.; LAPHOOKHIEO, S.; PYNE, S. G. Chemical constituents and biological activities of *Garcinia cowa* Roxb. Maejo. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 7, p. 212-231, 2013.

RODRIGUES-BRANDÃO, I.; KLEINOWSKI, A. M.; EINHARDT, A. M.; LIMA, M. C.; AMARANTE, L. D.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Salicylic acid on

antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1893-1898, 2014.

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

SANT'ANNA, V. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods e a review. **Dyes and Pigments**, v. 98, p. 601-608, 2013.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5° ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 371-379p.

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

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 138, 2006.

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

SIRCAR, D.; MITRA, A. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1370- 1380, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3. ed. Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum. **Botânica Sistemática**, p. 768, 2012.

SHAOHAIB, T.; SHAFIQUE, M.; DHANYA, N.; DIVAKAR, M. C. Importance of Flavonoids in Therapeutics. **Journal of Drugs and Medicines**, v.3, p. 1- 18, 2011.

STINTZING, F.; CARLE, R. Betalains- Emerging Prospects for Food. **Trends in Food Science Technology**, v. 18, p. 514–525, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al. 4. ed. UFV, p.220, 2009.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733–749, 2008.

ULRICH-MERZENICH, G. S. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products–Potential and challenges for drug development Review paper. **Synergy**, v. 1, p. 59-69, 2014.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 861-875, 2007.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. **Iheringia**, v. 61, p. 83-103, 2006.

VERARDO, V.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; MARCONI, E.; FERNÁNDEZ, G. A.; CABONI, M. F. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography–electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC–ESI-TOFMS). **Journal of Cereal Science**, v. 52, p. 170–176, 2010.

VÉKEY, K. J. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography**, v, 921, p.227-36, 2001.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; WENNBERG, T.; VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, p.1375-389, 2004.

XU, X. M.; YU, S.; LI, R.; FAN, J.; CHEN, S. H.; SHEN, H. T.; HAN, J. L.; HUANG, B. F.; REN, Y. P. Distribution and migration study of pesticides between peel and pulp in grape by online gel permeation chromatography-gas chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 161- 169, 2012.

ZHAO, J.; VERPOORTE, R. Manipulating indole alkaloid product ion by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. **Phytochemistry**, v. 6, p. 435-457, 2007.

ARTIGO 1- PHYTOCHEMISTRY LETTERS

Identificação de pigmentos betalâmicos e flavonoides por CLAE/EM-EM em plantas de *Alternanthera*

Resumo

O gênero *Alternanthera* compreende algumas espécies utilizadas na medicina popular devido à atividade terapêutica e por serem produtoras e acumuladoras de metabólitos secundários. Com isso, as pesquisas com plantas medicinais vêm provando ser a estratégia mais bem-sucedida para a descoberta de novas drogas com etapas fundamentais e complementares entre si, como extração, identificação e isolamento do composto. O objetivo desse trabalho foi a identificação dos principais pigmentos betalâmicos e flavonoides presentes nas espécies *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera tenella*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE/EM-EM). Esta técnica permitiu pela primeira vez por constatar, a presença da betacianina amarantina nos extratos hidroalcoólicos dessas plantas, porém, nenhum flavonoide testado foi encontrado nestes extratos. A espécie *A. brasiliana* acumulou 87,71 μmol de amarantina g^{-1} MS com base no extrato fresco da parte aérea, enquanto a *A. tenella* acumulou 11,89 μmol de amarantina g^{-1} MS, entretanto, houve um decréscimo dessa concentração, em 70%, após sete dias de maceração. Este estudo mostrou que para ambas as espécies a maior concentração de pigmentos está no extrato hidroalcoólico fresco. Não foi encontrado nenhum flavonoide testado nos extratos hidroalcoólicos de *A. tenella* e *A. brasiliana*, no entanto, a presença de amarantina pode justificar as atribuições farmacológicas dadas pela medicina popular para essas espécies medicinais.

Palavras-chave: plantas medicinais, cromatografia-líquida de alta eficiência, metabólitos secundários, betalaínas, amarantina, flavonoides.

Indentification of betalamics pigments and flavonoids using (HPLC / MS-MS) in species of *Alternanthera*.

Abstract

The genus *Alternanthera* have some species are used in folk medicine because of its known therapeutic activity and because they are producers and accumulators of secondary metabolites such as betalaines. The approach of new products from research on medicinal plants has been proven to be the most simple and successful strategy for the discovery of new drugs, and contains essential and complementary steps, such as extraction, identification and isolation of the compound. The aim of this study was to identify the presence of the main betalamics pigments and flavonoids in species *Alternanthera brasiliiana* and *Alternanthera tenella*, using liquid chromatography coupled to high performance mass spectrometry (HPLC / MS-MS). It was found, for the first time by HPLC/MS-MS, the presence of amarantin betacyanin in hydroalcoholic extracts of these plants, but no standard of flavonoid used was found in these extracts. The specie *A. brasiliiana* accumulated 87.71 μmol of amarantin g^{-1} of dry weight based on fresh weight of shoots, while *A. tenella* accumulated 11.89 μmol of amarantin g^{-1} , dry weight, however, there was a decrease of this concentration by 70% after seven days for maceration. Have found no flavonoid tested in hydroalcoholic extracts of *A. tenella* and *A. brasiliiana* however, the presence of amarantin can justify the pharmacological assignments given by folk medicine for these medicinal species.

Keywords: medicinal plants, high performance liquid chromatography (HPLC), secondary metabolites, betalains, amarantin, flavonoids

1 Introdução

Os compostos naturais fornecidos pelas plantas medicinais são utilizados em escala global para o tratamento paliativo ou curativo de diversas doenças desde os primórdios da humanidade, demonstrando-se como uma das primeiras manifestações do homem em compreender e aproveitar a natureza (Cragg e Newman, 2013). Tal conhecimento, acumulado durante séculos, continua sendo valioso para as gerações atuais fornecendo pistas sobre este aglomerado excepcional de produtos naturais (Halabalaki et al., 2014).

As moléculas extraídas das plantas fornecem uma diversidade estrutural única que, aliada com o padrão da química combinatória, proporciona oportunidades para a descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos. Aproximadamente metade de todos os medicamentos licenciados e registrados em todo o mundo, no período anterior ao ano de 2010, foram produtos naturais ou seus derivados sintéticos (Dias et al., 2012).

Outra característica dessas moléculas naturais é que elas são comuns entre certos grupos taxonômicos, ou exclusivos para outros, oferecendo vantagens para a manutenção do crescimento e desenvolvimento ou simplesmente por uma questão adaptativa das espécies que as sintetizam (Berkov et al., 2014). Por exemplo, nas plantas da ordem Caryophyllales as moléculas de antocianina, responsável pela coloração na maioria das espécies, pode ser substituída por outros pigmentos, as betalaínas, N-heterocíclicos e derivados da tirosina. Essas duas classes distintas de pigmentos, até o momento não foram encontradas juntas em uma mesma espécie (Gandia-Herrero e Garcia-Carmona, 2013).

As betalaínas são classificadas em dois subgrupos: betaxantinas (amarelas) e betacianinas (vermelhas), essas podem ainda ser classificadas quimicamente em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina (Volp et al., 2009).

Na família Amaranthaceae (ordem Caryophyllales), as betacianinas foram identificadas nos gêneros *Amaranthus*, *Chenopodium* e *Celosia* (Cai et al., 2003) apresentando propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

Outro gênero desta família vem recebendo a atenção de pesquisadores nesse aspecto e já foram registrados na literatura à existência de mais de 60

espécies de *Alternanthera*, distribuídas nas zonas tropicais e temperadas, no entanto, poucas espécies foram estudadas em seus aspectos químicos e biológicos (Silveira e Olea, 2009).

Algumas espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular devido à atividade terapêutica proporcionada por compostos bioativos e por serem produtoras e acumuladoras de metabólitos secundários como as saponinas, betaínas e flavonoides. Estudos etnofarmacológicos relataram a atividade antibiótica, hepatoprotetora e analgésica nos extratos dessas plantas, como a *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera tenella* Colla (Hundiwale et al., 2012).

A espécie *A. brasiliana* conhecida como “penicilina”, “doril” ou “perpétuo-do-Brasil”, é uma espécie frequentemente empregada em fitoterapia sendo suas folhas utilizadas para tratar várias patologias como febre, dores e processos infecciosos (Jandrey e Onofre, 2009). Nas suas plantas já foram identificados flavonoides (kaempferol 3-O-robinobiosídeo, kaempferol 3-O-rutinosídeo e quercetina), betacianinas totais e amarantina (Brochado et al., 2003, Silva et al., 2005, Reis, 2013, Klein, 2014).

A espécie *A. tenella*, conhecida popularmente como “apaga-fogo,” sempre viva, é utilizada em casos de infecções, febres e também como diurético (Vendruscolo e Mentz, 2006). Alguns estudos com extrato aquoso dessa planta, comprovam sua atividade imunomodulatória (Guerra et al., 2003) e atividade antibiótica *in vitro* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Silveira e Olea, 2009). Os principais metabólitos secundários encontrados nesta espécie foram betacianinas totais (Kleinowski et al., 2014, Rodrigues-Brandão et al., 2014) e flavonoides glicosídeos e heterosídeos como a vitexina, quercetina, kaempferol (Salvador et al., 2006, Biella et al., 2008).

Os flavonoides são entidades químicas que possuem funções nas plantas como antibióticos naturais, podendo ser utilizados como antifúngicos e bactericidas, além de agentes para proteção contra a radiação ultravioleta (UV) além de participarem da conformação estrutural da parede celular das plantas entre outras funções biológicas (Osorio-esquivel et al., 2011). Entretanto, são os seus benefícios para a saúde humana que despertam atenção especial, devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já estabelecidas (Verardo et al., 2010).

A identificação de novos produtos a partir de pesquisas com plantas medicinais vem provando ser a estratégia mais bem-sucedida para a descoberta de novas drogas (Vuorela et al., 2004), porém a busca envolve várias etapas fundamentais e complementares entre si que devem ser respeitadas. Dentre essas etapas destaca-se principalmente, a determinação do melhor tipo de extração para determinados compostos, análises fitoquímicas utilizando métodos analíticos modernos e mais confiáveis, como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM), visando amplificar o caráter analítico da mesma (Collins, 2006) e, finalmente, o isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos com a comprovação de sua atividade farmacológica (Cechinel e Yunes, 1998, Maciel et al., 2002).

Em relação às espécies, *A. brasiliiana* e *A. tenella*, não foram encontrados relatos precisos na literatura, utilizando CLAE/EM-EM, acerca do perfil dos pigmentos betalâmicos em plantas inteiras e tampouco os parâmetros referentes ao tempo de extração e degradação para betalaínas e flavonoides.

Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi identificar os principais pigmentos betalâmicos e flavonoides presentes nas espécies de *A. brasiliiana* e *A. tenella* utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e avaliar a degradação desses metabólitos ao longo de sete dias.

2 Material e Métodos

2.1 Material Vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas de *A. brasiliiana* e *A. tenella* pertencentes ao Banco de Plantas *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

As plantas foram micropropagadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), sem regulador de crescimento, com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 100 mg L⁻¹ de inositol, e mantidas em câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h de fotoperíodo e temperatura de 25°C \pm 2, por 30 dias. Posteriormente, foram retiradas do meio de cultura e

suas raízes lavadas em água, para retirada dos resíduos de meio de cultura, sendo transferidas para bandejas plásticas (20 x 7 x 3 cm), uma para cada espécie, contendo como substrato vermiculita. A irrigação das plantas foi realizada todos os dias com água e a cada três dias foi acrescentada a solução nutritiva de Hoagland meia força (Hoagland; Arnon, 1938) até que elas completassem 60 dias em casa de vegetação (Figura 1).

2.2 Armazenamento e liofilização

Após 60 dias, o material vegetal foi coletado e sua massa aferida antes de ser armazenado em ultra-freezer (-80°C) e liofilizado (Liofilizador L101, LioTop), resultando num produto final com uma estrutura porosa, livre de umidade e capaz de ser reconstituído pela simples adição de água, sem perda das propriedades químicas dos metabólitos secundários e das enzimas.

2.3 Preparo dos extratos hidroalcoólicos

A preparação dos extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliiana* e de *A. tenella*, foram feitas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Murcia-Espanha, onde foram homogeneizadas em temperatura ambiente, 0,25 g de parte aérea liofilizada em 7 mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 10mM, contendo ácido ascórbico 10 mM, acrescido de 3 mL de metanol P.A. grau HPLC, totalizando 10 mL de solvente extrator por amostra, utilizando-se tubos para centrífuga tipo Falcon® de 15 mL. A homogeneização das amostras foi obtida por meio de um Polytron® (Kinematica AG, Suíça), em dois pulsos de 10 segundos.

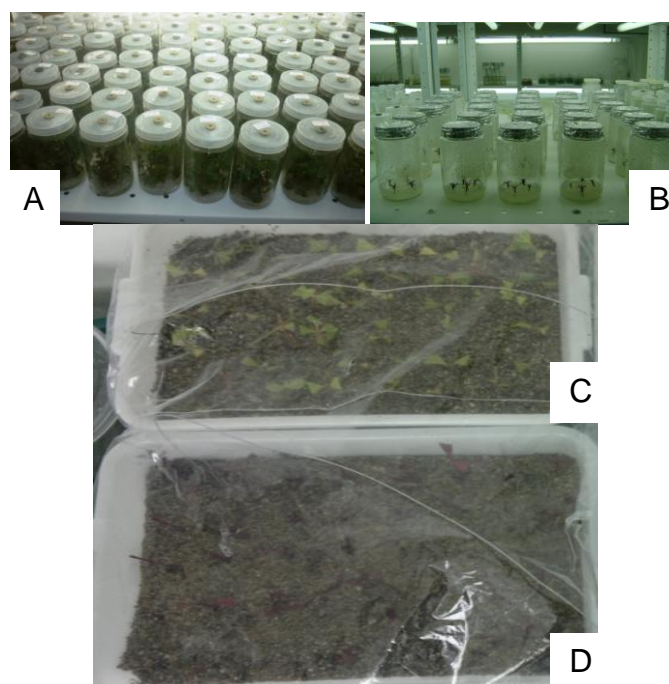


Figura 1- Plantas de *Alternanthera tenella* (A), e *Alternanthera brasiliana* (B), cultivadas *in vitro*. Depois de 30 dias foram colocadas em bandejas com vermiculita estéril, *Alternanthera tenella* (C) e *Alternanthera brasiliana* (D), por 60 dias em casa de vegetação.

2.4 Identificação dos pigmentos betalâmicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos foram filtrados em gaze e centrifugados a 120.000 g, por 40 min. Os sobrenadantes foram passados em membrana Centriplus® YM-10 (Milipore), para remover as proteínas e as impurezas. Os padrões de betacianinas testados, amarantina, betanidina e betanina na concentração de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ até $5\mu\text{g mL}^{-1}$ cada, foram obtidos por purificação no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Murcia,.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi realizada de acordo com Gandia-Herrero et al. (2007), em um aparelho Shimadzu LC-10A, acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M10A (Shimadzu, Quioto, Japão). Foram utilizados 25 μL de extratos, de cada espécie vegetal, em uma coluna empacotada Kromasil 100 C-18 (250 x 4,6 mm), com partículas de 5 μm (Tecnokroma, Barcelona, Espanha). A fase móvel foi composta por água ultrapura, acidificada com 0,05 % de ácido

trifluoroacético (solvente A) e acetonitrila acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente B), com fluxo de 1 mL min⁻¹. As leituras de absorbância foram realizadas em 536 nm para betacianinas e 480 nm para a betaxantina (Gandía-Herrero et al., 2005), utilizando-se duas repetições técnicas. Todas as análises cromatográficas, espectrofotométricas e espectrométricas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Murcia a-Espanha.

2.5 CLAE- Espectrometria de massas (EM/EM)

As análises foram conduzidas em um espectrômetro Agilent VL 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). As condições de eluição empregadas foram as mesmas da análise anterior. A interface entre o CLAE e o espectrômetro de massas consistiu de uma fonte de ionização por eletrospray, a 3,5 kV, com uma taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo de ionização, com varredura completa na faixa de 60-1000 m/z. Para a detecção a tensão multiplicadora de elétrons foi de 1350V, segundo Gandia-Herrero et al. (2007).

2.6 Identificação de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos previamente preparados de *A. brasiliensis* e de *A. tenella*, foram filtrados em gaze e centrifugados a 120.000 g, por 40 min. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana Centriplus® YM-10 (Milipore), para remoção das proteínas e de impurezas. Posteriormente, os filtrados foram usados para a análise dos flavonoides, empregando os padrões apigenina, quercetina-3-glicosídeo, genisteína, rutina, vitexina e kaempferol (Sigma Aldrich®).

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi realizada de acordo com o método de Gandia-Herrero et al. (2007), em um aparelho Shimadzu LC-10A, acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAF) SPD-M10A (Shimadzu, Quioto, Japão). Foram utilizados 25 µL de extrato, em uma coluna empacotada Kromasil 100 C-18 (250 x 4,6mm), com partículas de 5 µm (Tecnokroma, Barcelona, Espanha).

Os gradientes foram formados por solventes, tendo fase móvel composta por água ultrapura, acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente A) e a acetonitrila acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente B), com fluxo de 1 mL min⁻¹, sendo a leitura de absorvância realizada em 280 nm, segundo a metodologia de Salvador et al. (2006). Todas as leituras foram feitas em duplicatas.

2.7 Avaliação da degradação de betalainas e flavonoides em extratos de hidroalcoólicos plantas de *Alternanthera*

Os mesmos tubos de Falcon® utilizados para homogeneizar a massa de plantas citados na metodologia anterior (item 2. 3), foram colocados em uma câmara com uma plataforma de agitação orbital (Shaker) com velocidade de 100 rpm e temperatura constante de 20 °C.

Duas alíquotas destes extratos, de cada espécie, foram retiradas diariamente no mesmo horário, por um período de sete dias de extração com intuito de verificar o conteúdo de metabólitos e degradação destes compostos identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3 Resultados e Discussão

3.1 Identificação dos pigmentos betalâmicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos hidroalcoólico das partes aéreas das espécies *A. brasiliiana* e *A. tenella* foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência a 536 nm e 480 nm para avaliar o perfil dos pigmentos betalâmicos: betacianinas e betaxantinas, respectivamente.

Os perfis cromatográficos destes extratos, em 536 nm, revelaram a presença de dois picos predominantes com tempo de retenção (T_r) de 15 min na análise cromatográfica. Nas condições cromatográficas já descritas e quando comparados aos padrões de betalainas, este T_r é característico do pigmento amarantina (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma isoamarantina (isobetanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) (Cai et al., 1998).

É importante ressaltar que nos extratos das duas espécies (536 nm) foram visualizados outros picos, com tempos de retenção diferentes, porém os

picos de maior intensidade e destacados aqui são os que possuem o mesmo tempo de retenção do padrão purificado do pigmento amarantina, determinando a presença desta molécula nos extratos hidroalcoólicos destas plantas (Figura 2, 3 e 4).

Outras betacianinas como a betanidina, com T_r de 18 min e isobetanidina com T_r de 19,7 min, também apareceram em algumas leituras dos extratos a 536 nm de *A. brasiliiana* e *A. tenella*, porém, devido à pequena quantidade e instabilidade não foi possível monitoramento e a quantificação destes compostos. Em estudo do perfil cromatográfico de extratos hidroalcoólicos de calos de *A. brasiliiana* por CLAE, Reis (2013) relatou a presença de picos referentes a estes compostos betalâmicos, porém, não houve quantificação ou uma melhor caracterização destas moléculas.

Os extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliiana* e *A. tenella* nesse trabalho, foram utilizados para buscar a identificação de betaxantinas, porém, quando comparados ao padrão sintético de betaxantina, em 480 nm, não houve nenhum pico no mesmo T_r do padrão utilizado que pudesse caracterizar a presença deste pigmento nos extratos, por meio da metodologia descrita.

As betalaínas, incluindo as betaxantinas, devido a sua polaridade e localização dentro das células são facilmente extraídas com extratos alcoólicos ou polares, utilizados nesta pesquisa, porém sua detecção e estabilidade depende do pH, ausência de luz e oxigênio, segundo Reshmi et al. (2012). Salienta-se que, no presente trabalho, esses fatores foram respeitados com utilização de tampões com pH adequados e vedação das amostras com tampa e papel pardo em todas as análises.

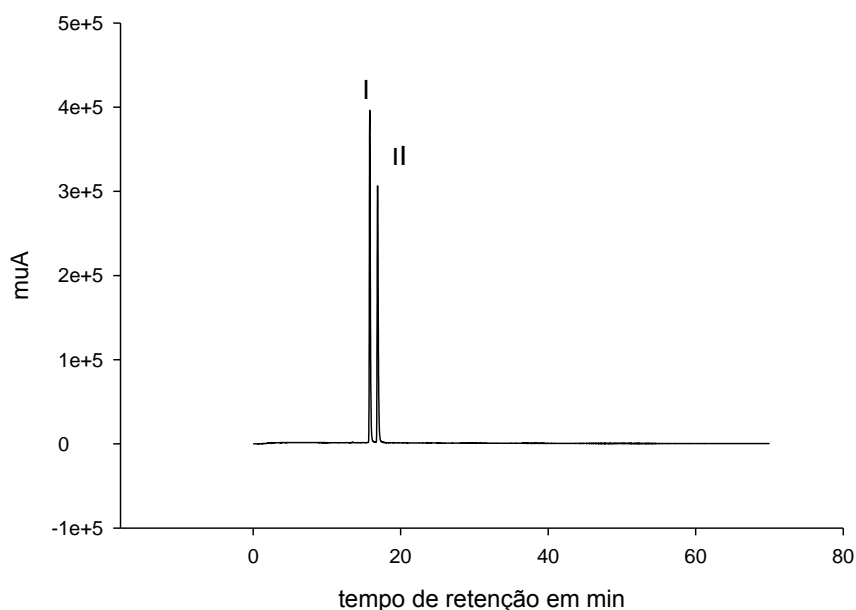


Figura 2 – Cromatograma em 536 nm, I- molécula purificada de amarantina (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma II- isoamarantina (isobetanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo), medidos em mili unidades de absorbância (muA).

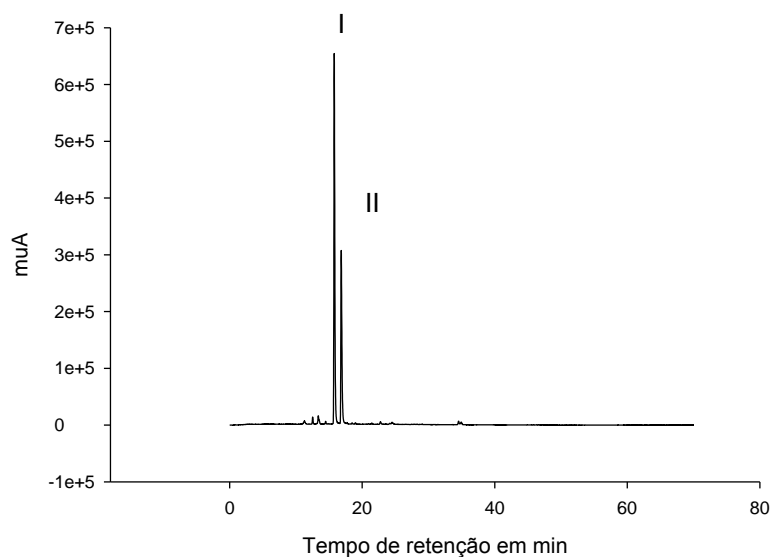


Figura 3- Cromatograma do extrato hidroalcoólico fresco das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* com a presença de: I- amarantina (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma II- isoamarantina (isobetanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo), medidos em mili unidades de absorbância (muA).

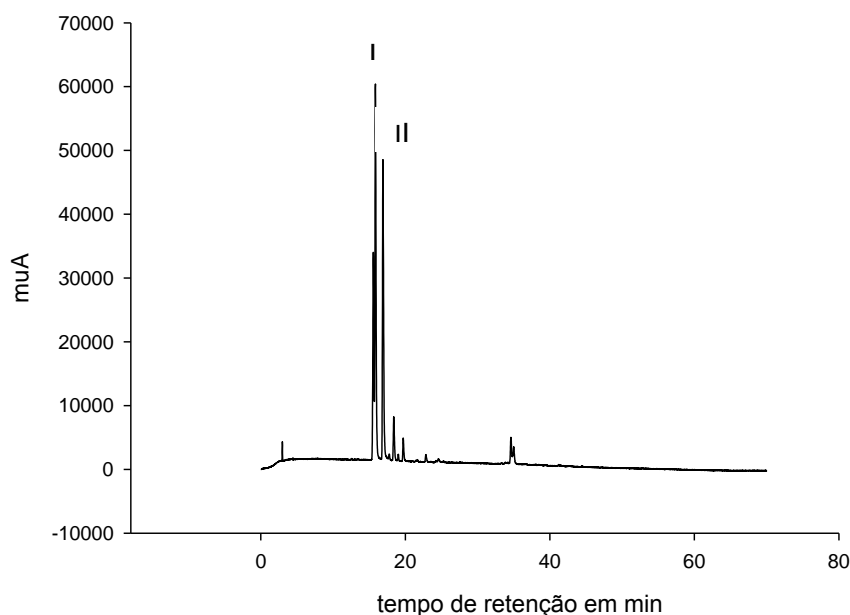


Figura 4 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Alternanthera tenella* com a presença de: I- amarantina (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma II- isoamarantina (isobetanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo), medidos em mili unidades de absorvância (muA).

3.2 CLAE- Espectrometria de massas (EM/EM)

Para uma confirmação mais direta e confiável da presença do pigmento amarantina, nos extratos hidroalcoólicos das plantas de *Alternanthera* foi realizada a espectrometria de massas com ionização positiva da molécula purificada deste pigmento de *Beta vulgaris* L. e dos extratos hidroalcoólicos de ambas as espécies.

A molécula purificada de amarantina possui seu íon molecular de 727,3 m/z e tempo de retenção de aproximadamente 18 min, devido à taxa de fluxo mais lenta, obrigatória deste aparelho de espectrometria de massa. A primeira fragmentação dessa molécula resultou em um íon protonado em 551,1 m/z e o segundo choque resultou em um íon de 389 m/z (Figura 5).

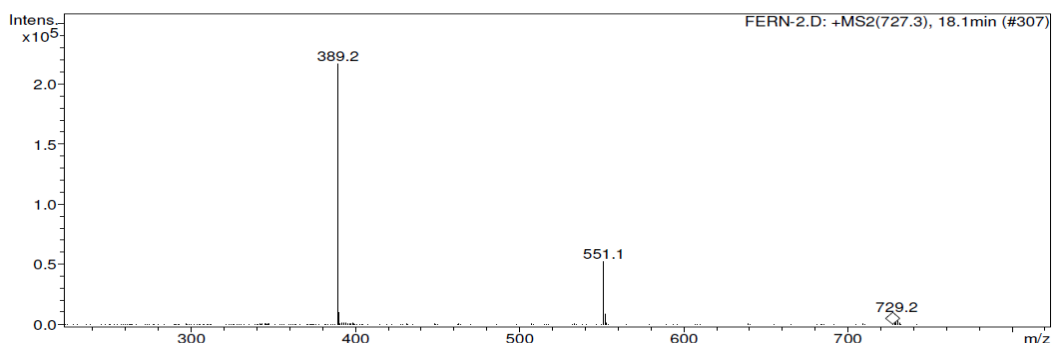


Figura 5 – Espectro de massa da molécula de amarantina, mostrando a fragmentação positiva de seus íons protonados.

Como a amarantina possui duas moléculas de glicose como substituintes, essas fragmentações ocorreram provavelmente devido ao desprendimento dessas, a cada choque com a molécula principal de amarantina (Figura 6).

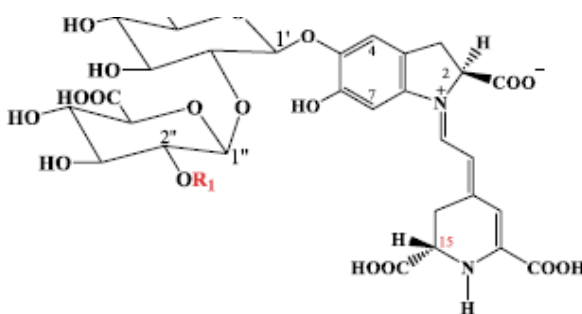


Figura 6 - Molécula de amarantina com íon molecular de 727,3 m/z. Figura adaptada de Cai et al. (2005).

O mesmo padrão de fragmentação, no mesmo tempo de retenção, foi encontrado nos extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliensis* e *A. tenella*, caracterizando o comparecimento deste íon molecular de 727,3 m/z, o que confirma também por espectrometria de massa a presença de amarantina nos extratos hidroalcoólicos destas plantas (Figura 7A e 7B).

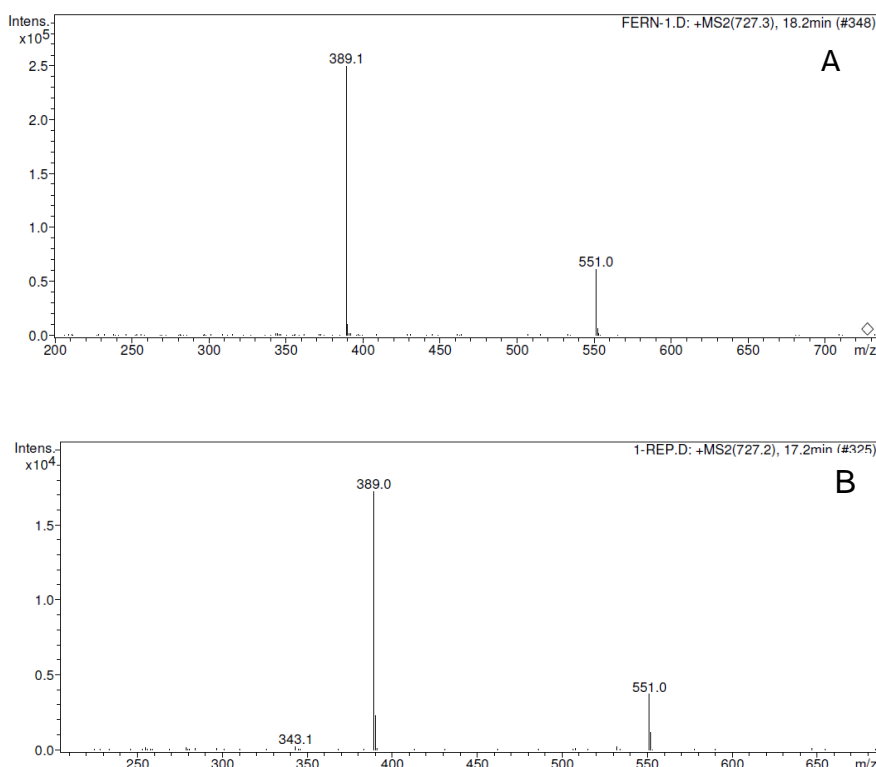


Figura 7 – Espectro de massa do extrato hidroalcoólico de *Alternanthera brasiliana* (A) e espectro de massa do extrato hidroalcoólico de *Alternanthera tenella* (B).

As betalaínas são encontradas em 13 famílias de plantas da ordem Caryophyllales, no entanto, existem duas exceções: as famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae que acumulam antocianinas. Em que momento ou em que circunstâncias durante a evolução que essas famílias perderam a capacidade de produzir antocianinas e acumularem betalaínas ainda é um mistério, relatam Khan et al . (2011).

As espécies dos gêneros de *Beta*, *Mirabilis*, *Bougainvillea*, *Celosia*, *Gomphrena*, *Portulaca* e a maioria das *Amaranthaceae* acumulam betacianinas e já existe uma gama de estudos para o aproveitamento medicinal e farmacológico destas espécies, além delas serem usadas como fonte natural para extração e purificação dos pigmentos betalâmicos, muito importantes comercialmente, como corantes naturais e antioxidantes (Stintzing e Carle, 2007, Pavokovi; Krsnik-RasoL, 2011).

No entanto, pela primeira vez está sendo reportada a presença da betacianina amarantina (Figura 4) em plantas de *A. brasiliana* e *A. tenella*, por meio de CLAE/EM-EM um dos métodos mais confiáveis dentro da química

analítica segundo, Collins (2006), o que torna os estudos com estas espécies ainda mais importantes e promissores visto o potencial medicinal deste pigmento como antioxidante e eliminador de radicais livres (Cai et al., 1998, Khan et al., 2012).

3.3 Identificação de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos hidroalcoólicos das partes aéreas foram analisados a 280 nm por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa CLAE/EM-EM, com a finalidade de identificar e quantificar os flavonoides já descritos e outros ainda não relatados nas espécies *A. brasiliiana* e *A. tenella*.

Os cromatogramas destes extratos não revelaram a presença de nenhum pico predominante (Figura 8), que pudesse ser comparado com os picos nos tempo de retenção dos padrões para os flavonoides utilizados.

Investigando o perfil fitoquímico de folhas de *A. brasiliiana*, Brochado et al. (2003) encontraram pelo menos seis flavonoides nos extratos etanólicos desta espécie com CLAE, resultado que influenciou na busca para identificação e quantificação dessas entidades químicas em *A. brasiliiana*, porém, nas condições já descritas, nenhum destes flavonoides foi encontrado no presente trabalho.

Algumas Investigações fitoquímicas preliminares realizadas por Souza et al. (1998) com extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliiana* indicaram a presença de terpenos, esteroides e, principalmente, o β -sitosterol, molécula descrita por desenvolver significativo efeito de analgesia bem como ação antimicrobiana (Virtuoso et al., 2005).

Com intuito de isolar os compostos com ação antimicrobiana, Pereira (2007) realizou trabalho de triagem dos princípios ativos de *A. brasiliiana* e ao final encontrou também a predominância de uma mistura de esteróis representados principalmente por β -sitosterol, estigmasterol e espimasterol, cujo efeito analgésico determinado por estes compostos, é equivalente ao medicamento “doril”, a qual a medicina popular designa como nome usual da espécie *A. brasiliiana*.

Os resultados obtidos para os extratos de *A. tenella* também divergem dos relatados por Salvador et al. (2006) que encontraram nos extratos etanólicos de *A. tenella* vários flavonoides como vitexina, quercetina e kaempferol, estes autores alegam que o potencial farmacológico desta espécie como antioxidante e anti-inflamatória está relacionado a presença destes flavonoides. No entanto, como já confirmado no presente trabalho e por Kleinowski et al. (2014), os extratos de *A. tenella* possuem betacianinas, compostos que apresentam propriedades farmacológicas semelhantes às dos flavonoides, conforme relatado por Azeredo (2009) e Khan et al. (2011).

Para extrair e quantificar mais fidedignamente os metabólitos secundários das espécies medicinais deve ser levado em consideração, de acordo com Bimakra et al. (2011) o tipo de solvente extrator, órgão e estágio de desenvolvimento dessas plantas.

Por isso, é importante salientar, que nesse trabalho, as plantas de *A. brasiliiana* e *A. tenella* analisadas foram cultivadas *in vitro* e segundo Udomsuk et al. (2011), pode ocorrer uma instabilidade no acúmulo dos metabólitos secundários nessas plantas micropropagadas por sofrerem algum tipo de estresse e dessa maneira, modificar a capacidade e/ou o padrão de produção dos compostos naturais.

Além disso, as etapas de cultivo, coleta, armazenamento e secagem são muito importantes e conforme afirmam Gobbo-Neto e Lopes (2007) estes fatores podem afetar ou modificar o conteúdo final de metabólitos secundários, causando distorções e impedindo a padronização dos perfis fitoquímicos em plantas medicinais.

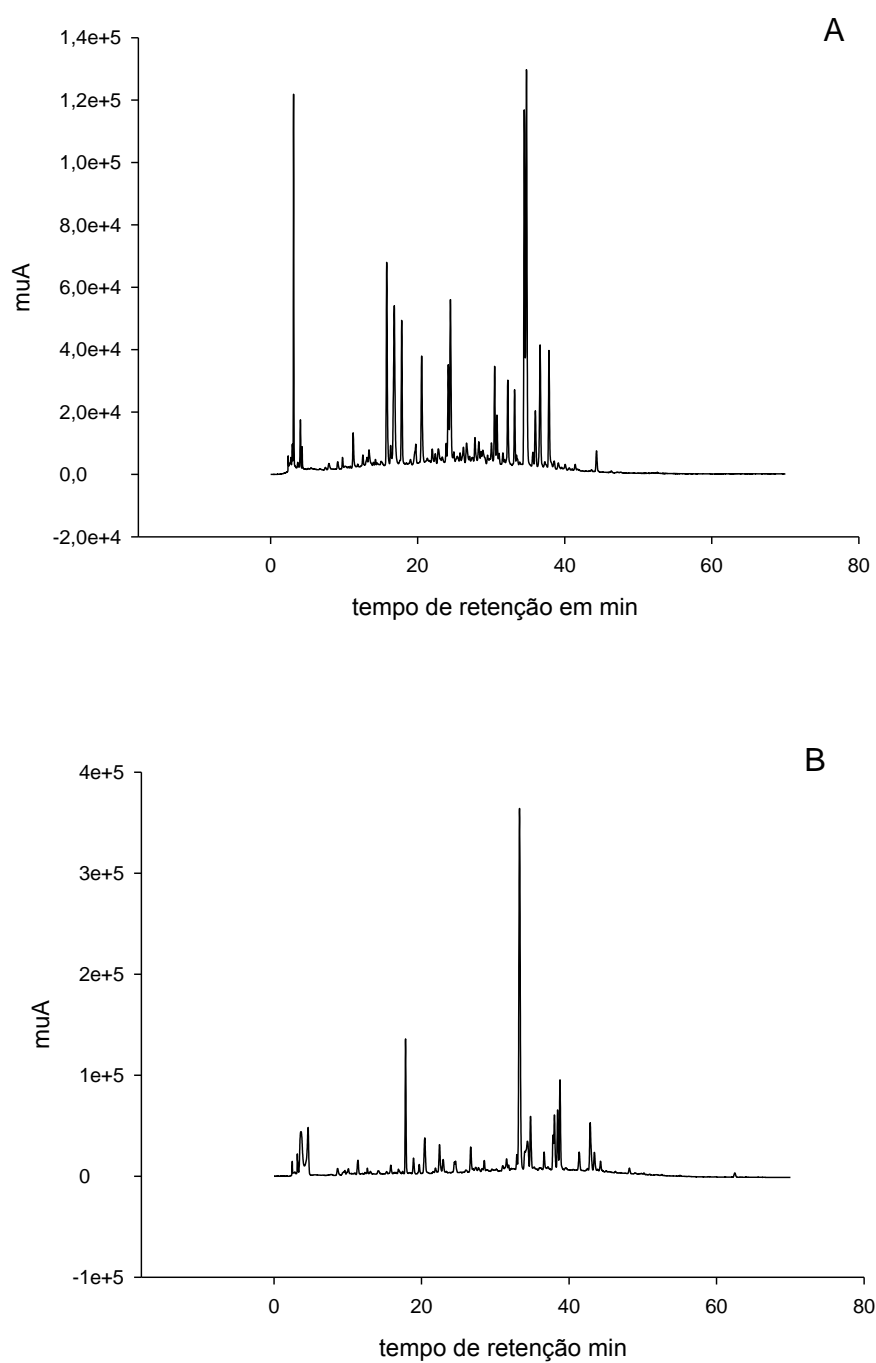


Figura 8– Cromatogramas, monitorado em 280 nm o perfil de picos do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* (A) e do extrato hidroalcoólico fresco das partes aéreas de *Alternanthera tenella* (B) medidos em mili unidades de absorvância (muA).

3.4 Avaliação da degradação de betalaínas em extratos hidroalcoólicos de plantas de *Alternanthera*

Como já relatado ao longo deste trabalho o pigmento amarantina foi o único composto caracterizado pelo método analítico de CLAE/EM-EM, nos extratos hidroalcoólicos das espécies de *A. brasiliana* e *A. tenella*.

Por meio do isolamento do pigmento amarantina, foi possível realizar a curva padrão deste composto e assim, quantificar e determinar o seu perfil químico, nos extratos de *A. brasiliana* e *A. tenella*, quando submetido à agitação e maceração contínua, a 20 °C, no período de sete dias.

Constatou-se que o extrato de *A. brasiliana* continha em média 87,71 μmol de amarantina g^{-1} MS, valor relativamente menor quando comparado a extratos frescos de calos de *A. brasiliana*, avaliados por Reis (2013) que possuíam em média 262 μmol de amarantina g^{-1} MS, destacando o potencial uso de calos, desta espécie, na produção em larga escala deste pigmento.

Após as primeiras 24 h, o extrato destas plantas já possuía 81,7 μmol de amarantina g^{-1} MS, quase 7% a menos de conteúdo de amarantina inicial. E ao final das 168 h de maceração sob agitação ocorreu uma perda de aproximadamente 71 % do conteúdo inicial do pigmento no extrato, restando apenas 23,61 μmol de amarantina g^{-1} MS.

Quando verificados os extratos de *A. tenella*, determinou-se em média 11,89 μmol de amarantina g^{-1} MS, e ao passar as primeiras 24 h, este conteúdo diminuiu para 9,64 μmol de amarantina g^{-1} MS, com um prejuízo de cerca de 20% na detecção deste pigmento. Após uma semana de maceração a perda de concentração de amarantina chegou a média a 73 % a menos que no extrato inicial, resultando em 3,13 μmol de amarantina g^{-1} MS ao final do processo (Figura 9), ratificando o afirmado por Reshmi et al. (2012), que estes compostos são extremamente sensíveis a mudanças de pH e oxidação.

Verificou-se que o conteúdo do pigmento betalâmico do extrato de *A. tenella* foi bem menor quando comparado ao extrato de *A. brasiliana*, corroborando os relatos de Reis (2013).

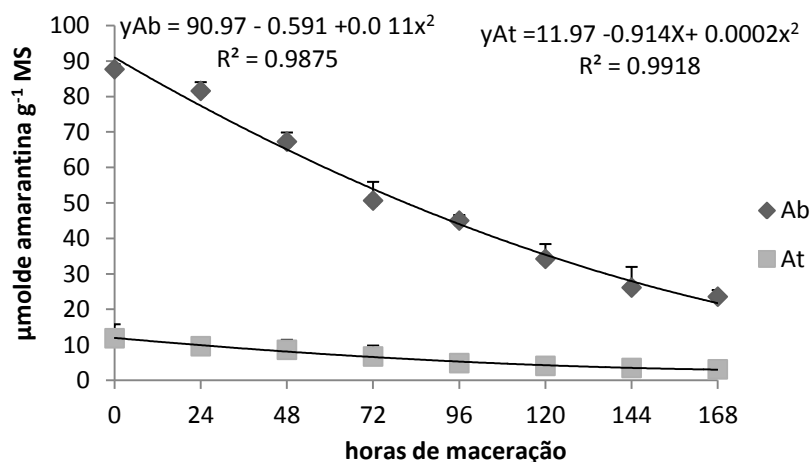


Figura 9- Concentração de amarantina no extrato hidroalcoólico de plantas de *Alternanthera brasiliana* (Ab) e *Alternanthera tenella* (At) em relação ao período de maceração em extrato hidroalcoólico. Os experimentos foram realizados em duplicata sendo plotados a média e desvio padrão.

A busca de betacianinas dentro do gênero *Alternanthera* já vem sendo realizada por diversos pesquisadores em vários trabalhos científicos como os de Silva et al. (2005), Perotti et al. (2010) e Kleinowski et al. (2014). Porém, ainda não haviam sido realizadas análises cromatográficas específicas, para identificar quais e quantas betacianinas existem nos extratos hidroalcoólicos dessas plantas, assim como o perfil de degradação destes pigmentos em um tempo determinado.

Este pigmento, que até o momento só havia sido encontrado por CLAE/EM nas espécies do gênero *Amaranthus* (Pavokovi; Krsnik-rasol, 2011) é ainda pouco explorado, porém, apresenta diversas aplicações, principalmente, como antioxidante e colorante natural. No entanto, o aproveitamento farmacológico dessa molécula, depende de seu isolamento, purificação e verificação de suas atividades biológicas etapas que já podem ser realizadas utilizando plantas de *A. brasiliana* como modelos biológicos.

4 Conclusão

Nesse estudo, ficou comprovado, por meio de CLAE-EM, que a betacianina predominante, tanto em *A. tenella* quanto em *A. brasiliiana*, é a amarantina e que a melhor forma de identificação e quantificação deste pigmento, nessas plantas, é a partir de maceração com o extrato hidroalcoólico fresco. Não foi encontrado nenhum flavonoide nos extratos hidroalcoólicos de *A. tenella* e *A. brasiliiana* testados, no entanto, a presença de amarantina pode justificar as atribuições farmacológicas dadas pela medicina popular para essas espécies medicinais.

5 Referências

- Berkov, S., Mutafova, B., Christen, P., 2014. Molecular Biodiversity And Recent Analytical Developments: a marriage of convenience. *Biotechnol Adv.* 32, 1102-1110.
- Biella, C.A., Salvador, M.J., Dias, D.A., Baruffi, D.M., Crott, P.S.L., 2008. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) Aqueous Extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103 , 569-577.
- Bimakra, M., Rahmana, R.A., Taipa, F.S., Ganjloob, A., Salleha, L.M., Selamatc, J., Zaidulc, I.S.M., 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod Process.* 89, 67-72.
- Brochado, C.O., Almeida, A.P., Barreto, B.P., Costa, L.P., Ribeiro, L.S., Pereira, R.L., Gonçalves-Koatz, V.L., Costa, S.S., 2003. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliiana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 449-451.
- Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H., 2003. Antioxidant activity of betalains from plants in the Amaranthaceae. *J Agr Food Chem.* 51, 2288–2294.

Cechinel, F.V., Yunes, R.A., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Quím. Nova. 21,99-105.

COLLINS, C.H., 2006. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. Quím.Nova. 29, 889-890.

Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural Products: A Continuing Source of Nove Drug Leads. Biochim Biophys Acta. 1830, 3670–3695.

Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U.A., 2012. Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. Metabolites. 2, 303-336.

Facundo, V.A., M.S., Azevedo, R.V., Rodrigues, L.F., do Nascimento, J.S.L.T., Militão, G. V.J., da Silva, Braz-Filho, R., 2012. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. Rev. Bras. Farmacogn. 22, 1134-1139.

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., 2005. Betaxanthins as substrates for tyrosinase an approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. Plant Physiol. 138, 421-432.

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., 2007. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. J Agric Food Chem. 55,1546-1551.

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., 2010. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. Planta. 232, 449–460.

Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., 2013. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. Trends Plant Sc. 18, 334–343.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos secundários. Quím. Nova. 30, 374-381.

Guerra, R.N.M., Pereira, A.W., Silveira, L.M.S., Olea, R.S.G., 2003. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* colla aqueous extracts in mice. Braz J Med Biol Res. 36,1215-1219.

Halabalaki, M., Vougianniopoulou, K., Mikros, E., Skaltsounis, A., 2014. Recent advances and new strategies in the nmr-based identification of natural products. Curr. Opin. Biotechnol. 25, 1–7.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricult. Experimen. 347.

Hundiwale, J.C., Patil, A.V., Kulkarni, M., Patil, D A., Mali, R.G.A., 2012 current update on phyto pharmacology of the genus *Alternanthera*. Journal of Pharmacy Research. 5, 1924-1929.

Jandrey, H.C.M., Onofre, S.B., 2009. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt. (amaranthaceae) sobre bactérias patogênicas. Biology & Health Journal. 31, 51-57.

Khan, M.I., Harsha, P.S.C., Giridhar, S.P., Ravishankar, G.A., 2011. Pigment identification, antioxidant activity, and nutrient composition of *Tinospora cordifolia* (willd.) Miers ex hook. F e thoms fruit. Int J Food Sci Nutr. 62, 239–249.

Klein, F.R.S. Dissertação Mestrado Programa De Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Brasil , 2014.

Kleinowski, A.M., Rodrigues, I.C.S., Ribeiro, M.V., Einhardt, A.M., Peters, J.A., Braga, E.J.B., 2014. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured in vitro in the presence of tyrosine. Braz Arch Biol Technol. 57, 253-260.

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr, V.F., Echevarria, A., Grynberg, N.F., 2002. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. Quím.Nova. 25, 429-438.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15, 473-497.

Osorio-Esquivel, O., Ortiz - Moreno, A., Álvarez, V.B., Dorantes Álvarez, L., Giusti, M., 2011. Phenolics, Betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia Joconostle* Fruits Food Res Int. 44, 2160–2168.

Pavokovi, D., Krsnik-Rasol, M., 2011. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. Food Technol Biotech. 49,145–155.

Pereira, D.F. Dissertação Mestrado Em Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil 2007.

Perotti, J.C., Rodrigues, I.C.S., Kleinowski, A.M., Ribeiro, M.V., Einhardt, A.M., Peters, J.A., Bacarin, M.A., Braga, E.J.B., 2010. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. Ciên. Rural. 40, 9, 1874-1880.

Reis, A. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

Reshmi, S.K., Aravindhan, K.M., Suganya D.P., 2012. The effect of light, temperature, pH on stability of betacyanin pigments in *Basella alba* fruit. Asian J Pharm Clin Res. 5,107-110.

Rodrigues-Brandão, I., Kleinowski, A.M., Einhardt, A.M., Lima, M.C., Amarante, L.D., Peters, J.A., Braga E.J.B., 2014. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. Cienc. Rural. 44, 1893-1898.

Sakuta, M., 2014. Diversity in Plant Red Pigments: Anthocyanins and Betacyanins. *Plant Biotechnol Rep.* 8, 37–48.

Salvador, M.J., Ferreira, E.O., Mertens-Talcott, S.U., Whocely, V.C., Butterweck, V., Derendorf, H., Dias, D.A., 2006. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Naturforschung.* 61,19-25.

Silva, N.C.B., Macedo, A.F., Lage, C.L.S., Esquibel, M.A., Sato, A., 2005. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured in vitro. *Braz Arch Biol Technol.* 48, 779-786.

Silveira, L.M.S., Olea, R.S.G., 2009. Isolamento de compostos com atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 90, 2, 148-153.

Souza, M.M., Floriani, P., Kern, A., Cechinel-Filho, V., 1998. Analgesic properties of hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. *Phytother Res.* 12, 279-281.

Stintzing, F., Carle, R., 2007. Betalains-Emerging Prospects for Food Scientists *Trends Food Sci Tech.* 18, 514–525.

Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H., Putalun, W., 2011. Improved isoflavonoid production in *pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol Letters.* 33, 369–374.

Vélez-Jiménez, E., Tenbergen, K., Santiago, P.D., Cardador-Martínez, M.A., 2014. Functional attributes of *amaranth*. *Asian J Pharm Clin Res.* 2, 1-6.

Vendruscolo, G.S., Mentz, L.A., 2006. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia*. 61, 83-103.

Verardo, V., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Marconi, E., Fernández-Gutiérrez, A., Caboni, M. F., 2010. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography e electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLCEESI-TOF-MS). *J Cereal Sci*. 52, 170–176.

Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J.F.G., Cunico, M.M., Miguel, M.D., Oliveira, A.B., Miguel, O.G., 2005. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *erythrina velutina* willd, fabaceae (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn*. 15,137-142.

Volp, A.C.P., Renhe, I.R.T., Stringueta, P.C., 2009. Pigmentos Naturais Bioativos. *Alimentos e nutrição*. 20,157-166.

Vuorela, P., Leinonen, M., Saikku, P., Tammela, P., Wennberg, T., Vuorela, H., 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr. Med. Chem*. 11, 1375-389.

ARTIGO 2 – PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

Metil jasmonato na síntese de amarantina e compostos flavonoídicos em duas espécies de *Alternanthera*

RESUMO A elicitação de plantas com uso de moléculas como o metil jasmonato (MeJa) tem apresentado êxito na busca de pigmentos naturais. No presente estudo, duas plantas medicinais *Alternanthera tenella* e *Alternanthera brasiliana* foram submetidas a tratamento com 100 μ M de metil jasmonato (MeJa) em zero, sete e 14 dias, com o objetivo de investigar a influência deste, como elicitor, na produção de amarantina, flavonoides e na atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) em folhas e caules de ambas as espécies. Em *A. brasiliana* constatou-se, pelo controle, que os maiores teores de amarantina estão presentes nos caules, e que a exposição ao MeJa não influenciou significativamente no aumento dos teores deste pigmento. Para os compostos flavonoídicos não houve nesta espécie, influência positiva da ação do MeJa. Já a enzima FAL apresenta diferenças na sua atividade entre os órgãos, sendo que o caule apresenta maior atividade desta enzima no tratamento sem exposição ao MeJa. Em *A. tenella*, aos sete dias de tratamento, não houve diferença no teor de amarantina entre caules e folhas, porém, aos 14 dias após a aplicação do MeJa, as folhas incrementaram a produção deste metabólito, diferindo-se dos caules. Os compostos visualizados a 280 nm, na folha, obtiveram uma elevação significativa dos seus picos já aos sete dias de exposição ao MeJa enquanto a FAL obteve aumento significativo somente aos 14 dias, no caule. *A. brasiliana* e *A. tenella* submetidas a sistema hidropônico de raiz flutuante com 100 μ M com MeJa são capazes de alterar o seu metabolismo secundário, nos diferentes órgãos, aumentando o fluxo de produção de moléculas, como a amarantina e enzimas como a FAL. É possível monitorar o comportamento de compostos flavonoídicos através de CLAE, nestas plantas, porém esta metodologia não possibilita a identificação de quais flavonoides estão presentes nos extratos hidroalcoólicos.

Palavras-chave: plantas medicinais, metabólitos secundários, betalaínas, Fenilalanina amônia liase (FAL), elicitação.

Influence of methyl jasmonate in the production of amarantin and flavonoids in two species of *Alternanthera* genus

ABSTRACT The elicitation of plant metabolites using molecules like methyl jasmonate (MeJa) has been proved as success in the search for natural pigments. On this study, two medicinal plants, *Alternanthera brasiliana* and *Alternanthera tenella*, were undergoing to treatment with 100 μ M methyl jasmonate (MeJa) by zero, seven, and 14 days in order to investigate its influence as elicitor in the production of amarantin, flavonoids and in the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) in leaves and stems of both species. In *A. brasiliana* it was found, on the control, which the largest amarantin levels are present in stems, and the exposure to MeJa significantly influenced the increased levels of this pigment. For flavonoid compounds, there was no positive influence of MeJa action. The PAL enzyme presented difference on its activity among the organs, wherein the stem has higher activity of this enzyme in the treatment without exposure to MeJa. In *A. tenella* after seven days of treatment there was no difference in content of amarantin between stems and leaves, just at 14 days after application of MeJa, the leaves showed increased in the production of this metabolite, differing of the stems. In leaves the compounds observed at 280 nm, presented a significant increase in its peak as early as seven days of exposure to MeJa, while PAL had significant increase just at 14 days, on stem. *A. brasiliana* e *A. tenella* submitted to floating root hydroponic system with 100 μ M in MeJa are able to change their secondary metabolism in different organs, increasing the production flow of molecules like Amarantin, such as FAL enzymes. Is possible to monitor the behavior of flavonoid compounds by HPLC, in these plants, but this method does not allow the identification of flavonoids which are present in this hydroalcoholic extracts.

Keywords: medicinal plants, secondary metabolites, betalains, phenylalanine ammonia lyase PAL, elicitation.

1 Introdução

Os conhecimentos adquiridos pela medicina popular sobre os metabólitos ativos das plantas, associados à biodiversidade e à biotecnologia, ainda são utilizados para a cura de enfermidades e constituem a matéria prima para as novas descobertas da indústria farmacêutica (Ritthiwigrom et al., 2013).

Recentemente, a preferência pelo uso de pigmentos oriundos dos vegetais como colorantes naturais, na formulação de alimentos e medicamentos, aumentou muito devido à desconfiança dos consumidores para com os corantes fabricados sinteticamente, além de uma clara preferência da população pelos possíveis benefícios dos produtos naturais (Sakuta, 2014).

As antocianinas e betalaínas, duas famílias de pigmentos produzidos naturalmente pelas plantas, estão no topo desta incansável busca por substâncias que cumpram tanto a função de corante atóxico quanto que possuam outras atividades farmacológicas (Christensen et al., 2012). As primeiras e mais conhecidas, compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas, possuindo inúmeras atividades biológicas *in vitro* e *ex vitro* (Stintzing et al., 2005; Fracassetti et al., 2013, Li et al., 2013), já as betalaínas, notavelmente estão ligadas ao sequestro/eliminação de radicais livres e ação antioxidante, no entanto, ainda pouco investigadas e exploradas (Gandía-Herrero e García-Carmona, 2013).

Cabe salientar, que esses dois tipos de pigmentos não são encontrados juntos em uma mesma planta. As razões evolutivas para a exclusão mútua não foram devidamente explicadas; porém, ao nível bioquímico, sabe-se que as enzimas relevantes para a produção das antocianinas não têm seus genes expressos em plantas produtoras de betalaínas (Gandía-Herrero e García-Carmona, 2013).

Os pigmentos betalâmicos são nitrogenados, solúveis em água, derivadas do aminoácido tirosina sendo, nas plantas, sintetizados no citoplasma e armazenados nos vacúolos (Sant'anna et al., 2013). Há dois tipos de betalaínas, as betaxanthinas, que são derivados de ácido betalâmico condensado a diferentes amins e aminoácidos apresentando coloração

amarela e com espectro de absorção em um comprimento de onda máximo de cerca de 480 nm.

Já as betacianina se formam quando o ácido betalâmico aparece condensado com ciclo-dihidroxifenilalanina-(ciclo-DOPA) conferindo a essas moléculas a coloração violeta e com um espectro de absorbância centrado em 536 nm (Gandía-Herrero e García-Carmona, 2013).

Algumas espécies da família *Amaranthaceae*, caracterizadas pela presença de betalaínas e flavonoides, pertencentes ao gênero *Alternanthera*, já estão sendo utilizadas como modelos biológicos para estudos sobre a fisiologia do seu metabolismo secundário, tanto na produção como no armazenamento e aproveitamento dessas moléculas naturais (Silva et al., 2005, Perotti et al., 2010, Kleinowski et al., 2014).

Dentro deste gênero podemos destacar *Alternanthera tenella* Colla uma planta medicinal conhecida como sempre-viva ou apaga-fogo (Siqueira, 1995) e a espécie *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, popularmente conhecida como penicilina (Delaporte et al., 2005), empregada popularmente para o tratamento de infecções (Brochado et al., 2003).

Destaca-se também, nestas espécies, a presença de compostos fenólicos, grupo heterogêneo de entidades químicas que somam aproximadamente 10.000 compostos que possuem uma ampla gama de aplicações biológicas, incluindo a capacidade de atuar como antioxidantes adjuvantes em cura dos processos inflamatórios e modular genes de importantes enzimas, tanto de plantas como em animais (McKay et al., 2015).

A grande maioria destes compostos é derivada do aminoácido fenilalanina, via eliminação de uma molécula de amônia com subsequente formação de ácido cinâmico e p-cumárico. Esta reação é, principalmente, catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (FAL) situada num ponto chave entre o metabolismo primário e secundário (Myung-Min et al., 2008, Sheng et al., 2009), essencial para a biossíntese de compostos como os fenilpropanoides e outros derivados fenólicos funcionais como os flavonoides (Andrés - Lacueva et al., 2008).

Como já mencionado, o crescente interesse no uso de pigmentos naturais para a coloração de alimentos e a descoberta de novas moléculas com potencial farmacológico impulsionam a busca de técnicas para aumentar a

produção destes compostos na própria planta (Georgiev et al., 2008, Ramakrishna e Ravishanka, 2011).

Para tanto, segundo López-Nicolas et al. (2013), entre as diferentes estratégias utilizadas com este objetivo a que tem obtido maior êxito é a elicitação de plantas com uso de moléculas como o metil jasmonato, um composto bioativo, ligado a mecanismos de defesa dos vegetais, cuja aplicação exógena pode afetar fisiologicamente o metabolismo secundário das plantas e causar a biossíntese de moléculas com alto valor farmacológico inclusive de betacianinas e flavonoides em suspensão celular (Bhuiyan e Adachi, 2003).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência do metil jasmonato (MeJa), como elicitor, na produção de betacianina, flavonoides e na atividade da fenilalanina amônia liase em caules e folhas de *A. tenella* e *A. brasiliiana*.

2 Material e Métodos

2.1 Material Vegetal e condições de cultivo

Como material vegetal, foram utilizadas plantas das espécies, *A. brasiliiana* e *A. tenella*, pertencentes ao Banco de Plantas *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Pelotas, Brasil, as quais foram micropropagadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de Agar e 100 mg L⁻¹ de inositol. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h de fotoperíodo e temperatura de 25°C \pm 2, por 30 dias.

Após este período, foram retiradas cerca de 120 plantas micropropagadas de cada espécie e aclimatizadas em bandejas com vermiculita esterilizada, durante quinze dias em sala de crescimento, sob densidade de fluxo de fótons de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Posteriormente, as plantas foram transferidas para um sistema de hidroponico de fluxo contínuo com raízes flutuante e cultivadas com solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1938), como tratamento controle e a mesma solução adicionada de 100 μM de metil jasmonato como tratamento adicional, permanecendo nessas mesmas condições de densidade de fluxo de

fótons e fotoperíodo, por sete e 14 dias. As soluções foram renovadas a cada três dias.

A unidade experimental foi composta de cinco vasos contendo quatro plantas de *A. brasiliiana* e *A. tenella*, separadamente (Fig. 1). Os tratamentos foram relacionados ao tempo de exposição dessas plantas (zero, sete e 14 dias) a 100 μ M do fitohormônio MeJa. O experimento foi inteiramente casualizado, para cada espécie, em esquema fatorial 2 X 3 (dois órgãos x três tempos de exposição). As coletas, de caule e folha, foram realizadas ao término do tempo de exposição.

Os dados biométricos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado e Conceição, 2002).



FIGURA 1 - Plantas de *Alternanthera brasiliiana* e *Alternanthera tenella* submetidas ao sistema hidropônico de fluxo contínuo com raiz flutuante, na presença de 100 μ M de Metil jasmonato.

2. 2 Armazenamento e liofilização

Todo o material vegetal coletado foi armazenado em ultra-freezer (-80°C) e, posteriormente liofilizado (Liofilizador L101, LioTop). Este processo físico permite que o material vegetal congelado, seja submetido a uma pressão muito baixa (alto vácuo), fazendo com que a água que foi transformada em gelo seja sublimada, ou seja, passará diretamente do estado sólido para o estado gasoso, resultando num produto final com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituída pela simples adição de água, sem perda das propriedades químicas dos metabólitos e enzimas dos vegetais (Wanderley et al., 2011).

2.3 Quantificação de amarantina e flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A extração de amarantina e flavonoides foi realizada a partir de 0,25 g de caules e folhas, liofilizadas, de *A. brasiliiana* e *A. tenella* com tampão acetato de sódio 10 mM e pH 5,0, acrescido de Ácido Ascórbico 10 mM. Estes foram homogeneizados em Polytron® (Kinematica AG, Suíça), em dois pulsos de 10s, em velocidade média. O extrato foi passado em gaze e centrifugado a 120.000 g, por 40 min e o sobrenadante resultante foi filtrado em membrana Centriplus YM-10 (Milipore), para remover as proteínas e assim ser usado para a análise dos pigmentos. Todas as análises cromatográficas e espectrofotométricas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Murcia-Espanha.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi realizada de acordo com o método de Gandia-Herrero et al. (2007), em um aparelho Shimadzu LC-10A, acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M10A (Shimadzu, Quioto, Japão). Foi utilizado 25 µL de extrato, em uma coluna empacotada Kromasil 100 C-18 (250x 4,6mm), com partículas de 5 µm (Tecnokroma, Barcelona, Espanha). Os gradientes foram formados por solventes, tendo fase móvel composta por água ultrapura, acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente A) e acetonitrila acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente B), com fluxo de 1 mL min⁻¹ e a leitura de absorbância para amarantina foi realizada em 536 nm e para flavonoides em 280 nm, conforme metodologia de Salvador et al. (2006).

2. 4 Quantificação da enzima Fenilalanina amônia liase por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A quantificação da enzima fenilalanina amônia liase (FAL EC 4.3.1.5.) foi feita através da metodologia de Kovácik e Klejdus (2012), modificada para essa espécie (Cromatogramas no apêndice 1) e as análises realizadas no laboratório de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade de Murcia-Espanha. Para tanto, a extração foi realizada a partir de 0,1 g de caules e folhas de plantas de *A. tenella* e *A. brasiliiana*, liofilizadas, maceradas com

polytron com 2 mL de tampão borato a, 50 mM e pH 8,8, centrifugados a 13,000 g, por 15 min a 4°C.

A reação foi realizada com adição de 250 µL de tampão borato com 175 µL de extrato e depois acrescido de fenilalanina 50 mM. Após uma hora, para parar a reação, foi adicionado ao homogeneizado, 25 µL de ácido clorídrico 2N.

A quantificação da FAL foi através de cromatografia líquida de fase reversa, onde foi usada uma coluna de fase reversa C-18 (250 X 4,6mm) com 5 µm de tamanho de partícula. Em gradiente linear de 25 min onde a fase móvel foi composta por água ultrapura, acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente A) e acetonitrila, acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente B), com fluxo de 1 mL min⁻¹ com a taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹, e o volume de injeção de 20 µL do homogeneizado. Foram utilizados como padrões a fenilalanina 50 mM e o ácido cinâmico (1 mg 100 mL⁻¹), analisadas nas mesmas condições descritas acima. Os resultados foram expressos em µmol de ácido cinâmico por grama de massa seca de planta.

3 Resultados e Discussão

3. 1 Quantificação do pigmento amarantina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Observou-se que o teor de amarantina na espécie *A. brasiliiana* é maior nos caules do que em folha no tempo zero (controle) e que a exposição ao MeJa por 7 e 14 dias não influenciou significativamente para aumento dos teores deste pigmento, neste órgão. Por outro lado, em folhas, notou-se um incremento significativo do teor de amarantina após sete dias em contato com MeJa (Fig. 2A). As maiores médias alcançadas foram de 287,62 µmol de amarantina g⁻¹ MS em caules e 280 µmol de amarantina g⁻¹ MS em folhas aos sete dias.

O fitohormônio metil jasmonato já foi utilizado com sucesso em *A. philoxeroides* para aumentar a síntese de amarantina. Perotti (2010), testou diferentes concentrações (0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µM) de MeJa nessas plantas cultivadas *in vitro*, por 35 dias e constatou que a concentração de 100 µM de MeJa quadruplicou os teores deste pigmento em caules desta espécie.

As diferenças entre a ação do elicitor e os teores de amarantina, entre os órgãos na mesma planta, pode ser explicada por Vasconsuelo e Boland (2007) que preconizam que a percepção do vegetal para o sinal do elicitor é a primeira etapa para que se inicie uma cascata de transdução de sinais ligados ao seu metabolismo. Porém, esta resposta não depende somente do tecido vegetal ou órgão em perceber o estímulo exógeno e aumentar a produção de seus compostos de defesa. Para as plantas medicinais, outros fatores bioquímicos têm de ser levados em consideração. Segundo Verpoorte e Maraschi (2001), por exemplo, se o metabólito em questão, possui uma única via biossintética e também se este composto tem utilidade perante o estresse que a planta foi submetida.

Sabe-se que a amarantina é uma betacianina sintetizada a partir da junção espontânea do ciclo-dopa ao ácido betalâmico, sendo essa via biossintética bastante complexa e ramificada capaz de produzir inúmeros tipos de betacianinas, porém, frente ao estresse provocado por um elicitor como o MeJa, moléculas, como a amarantina, são de extrema importância, pois atuam como protetores celulares, capturando os radicais livres (Xiong-Wei et al., 2013). Essa hipótese é corroborada pelos resultados do presente trabalho, devido ao aumento da síntese desse pigmento nas folhas, conforme o aumento dos dias de tratamento com o elicitor.

Verificando o acúmulo de betacianina em *A. philoxeroides in vitro*, sob elicitação de tirosina, Kleinowski et al. (2014) também encontraram diferenças significativas nos teores desses pigmentos entre caules e folhas, constatando um expressivo acúmulo de betacianina nos caules. Os autores desse trabalho ponderam, que a capacidade de síntese de amarantina por uma planta não é bem elucidada até o presente momento, no entanto é esperado haver um limite celular de produção e acúmulo desse composto. Teoria que foi evidenciado em *A. brasiliiana* com a diminuição da produtividade do pigmento de amarantina nos caules com o passar dos dias de contato com elicitor.

No presente trabalho, quando analisado os teores de amarantina na espécie *A. tenella*, sem aplicação exógena do MeJa, e aos sete dias de tratamento, percebe-se que não há diferença significativa do teor deste pigmento entre caules e folhas e que somente aos 14 dias após a aplicação do

Meja as folhas incrementam a produção deste metabólito diferindo-se dos caules (Fig. 2B).

A eficácia do uso de elicitores como uma ferramenta para aumentar a síntese de produtos naturais, nos vegetais, depende de uma complexa rede de interação fisiológica entre a molécula utilizada e o metabolismo secundário da planta (Zao et al., 2005). É importante salientar que de acordo com Vasconsuelo e Boland (2007), a espécie, o estágio de desenvolvimento e o órgão vegetal a ser analisado apresentam nítida influência sobre a resposta ao elicitor.

Além disso, a resposta a um determinado agente elicitor pode variar de espécie para espécie e é crucial determinar as concentrações adequadas para aperfeiçoar a produção (Namdeo, 2007).

O tratamento de plantas com elicitores abióticos é muito utilizado como estratégia para a produção de metabólitos secundários, sendo esta produção relacionada à indução de genes responsáveis pela resposta de defesa, ativando a via dos metabólitos secundários (Qian et al., 2006).

Em estudo realizado por Kleinowski et al. (2014) usando tirosina como elicitor, no meio de cultivo da espécie *A. tenella*, constataram que 50 μM deste aminoácido foi suficiente para incrementar a produção cerca 14% a mais que o controle. Também em plantas de *A. tenella* cultivadas *in vitro*, a aplicação exógena do fitohormônio ácido salicílico foi testada por Rodrigues-Brandão et al. (2014), relataram que esta molécula na concentração de 300 μM é capaz de induzir resposta positivas na produção de amarantina com um aumento de em média 10% em relação ao controle.

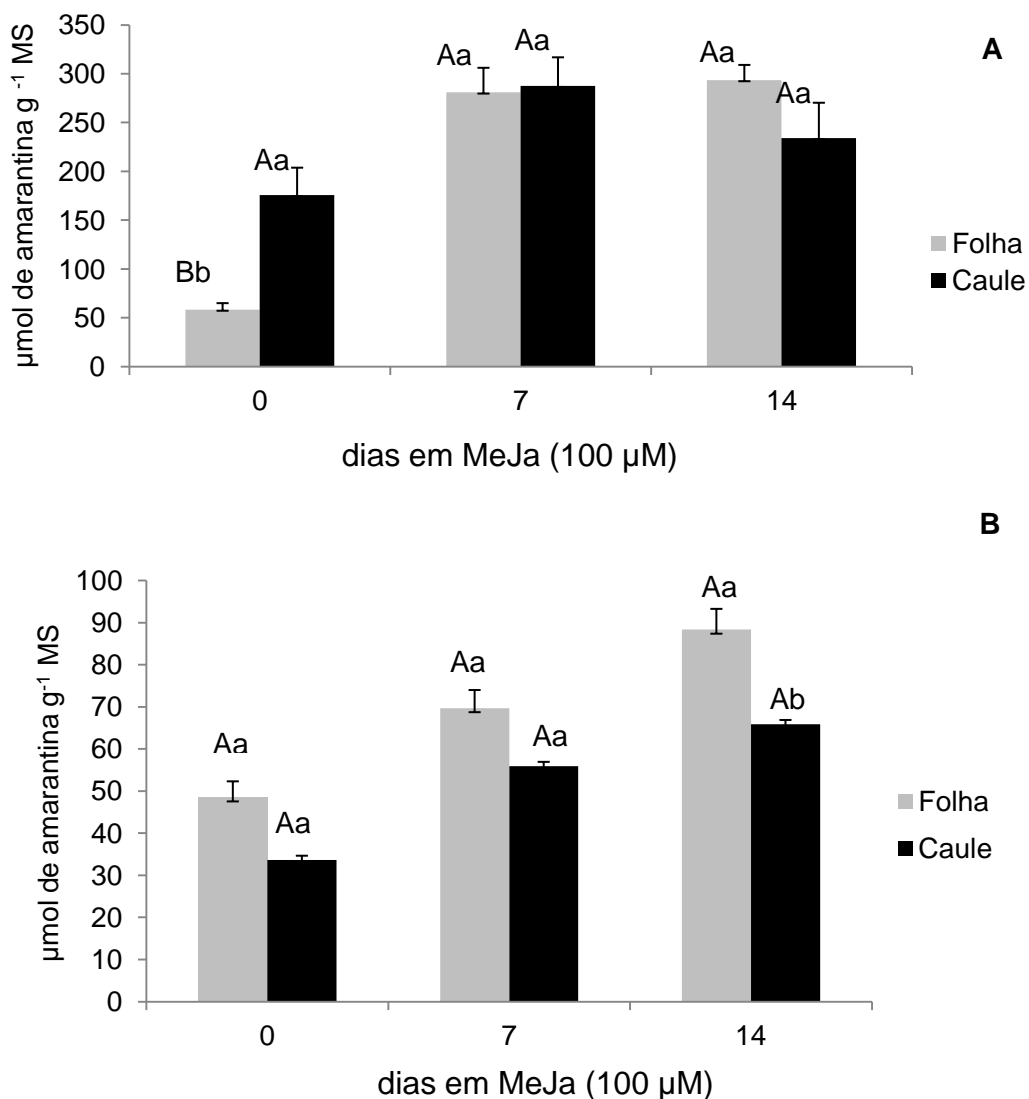


FIGURA 2- Teores de amarantina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (A) e *Alternanthera tenella* (B), submetidas a sistema hidropônico com raiz flutuante, com 100 μM de metil jasmonato (MeJa) aos zero, sete e 14 dias. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas para cada órgão dentro do mesmo tempo e maiúscula em cada órgão nos diferentes tempos, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). MS= Massa Seca.

De acordo com Cheong e Choi (2003) o MeJa é um regulador de crescimento endógeno responsável por processos de inibição de crescimento e acúmulo de biomassa e até mesmo considerado um acelerador do envelhecimento celular. Por isso, segundo Bhuiyan e Adachi (2003), essa característica torna o MeJa um elicitor arriscado em cultura de tecidos e células

vegetais, já que o contato permanente com o tecido vegetal, por um tempo prolongado pode causar uma toxidez na planta, atrapalhando o crescimento/desenvolvimento do vegetal e o acúmulo de moléculas de interesse.

Uma alternativa para amenizar este tipo de problema na estratégia de elicitação de betacianinas, através do MeJa, é recorrer a outras formas de cultivo, como o utilizado neste trabalho, com sistemas hidropônicos com raízes flutuantes em plantas inteiras, ou com biorreatores de imersão temporária, onde o meio de cultivo com a molécula elicitora, não ficam permanentemente em contato com as plantas, evitando assim maiores prejuízos no crescimento e desenvolvimento das mesma (Pavokovi e Krsnik-Rasol, 2011).

3.2 Identificação de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Não foram identificados neste estudo, com a metodologia citada, nenhum flavonoide conhecido e relatado em espécies do gênero *Alternanthera*, porém alguns picos visualizados com leitura no comprimento de onda de 280 nm em CLAE apresentaram perfil semelhante àqueles relatados para as *Alternanthera Brasiliana* (Facundo et al., 2012) e *Alternanthera tenella* (Salvador et al., 2006, Kumar et al., 2011). Em razão disso, foi definido referir-se a esses como “compostos flavonoídicos”.

Na espécie *A. brasiliana*, foi visualizado um pico (I) (Cromatograma no apêndice 3), com tempo de retenção de 20,53 min, com características flavonoídicas e foi identificado em caules e folhas, sendo que no tempo zero não houve diferença em sua absorbância nestes órgãos. Com a exposição de sete e 14 dias ocorreu uma queda da sua absorbância no caule sendo que a folha manteve os níveis deste composto iguais ao controle (Fig. 3A). O pico dois (II), com características semelhantes identificadas nestes extratos, apresentam tempo de retenção de 24,45 (Cromatograma no apêndice 3), com perfil análogo o para as folhas, conservando os seus teores ao longo dos tratamentos e diferindo significativamente do apresentado pelos caules. Porém, aos 14 dias de exposição ao MeJa, ocorreu acúmulo maior desta molécula nos caule, que se equiparou aos teores deste metabólito as folhas (Fig. 3B).

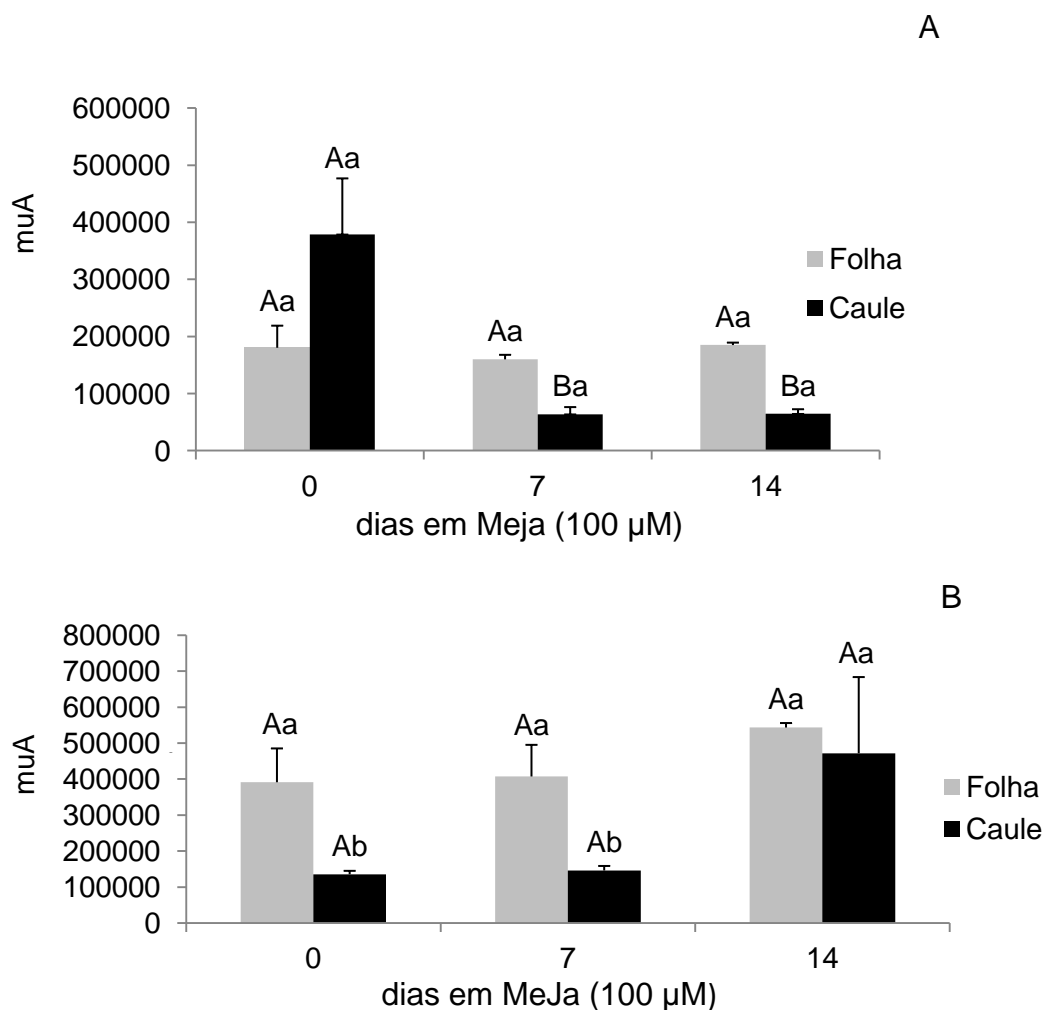


FIGURA 3 – Absorbância de compostos flavonoídicos não identificados I (A) e compostos flavonoídicos não identificados II (B) em plantas de *Alternanthera brasiliana* submetidas a sistema hidropônico com raiz flutuante, na presença de 100 μ M de metil jasmonato aos zero, sete e 14 dias. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas para cada órgão dentro do mesmo tempo e maiúscula em cada órgão nos diferentes tempos, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). muA= mili unidades de absorbância

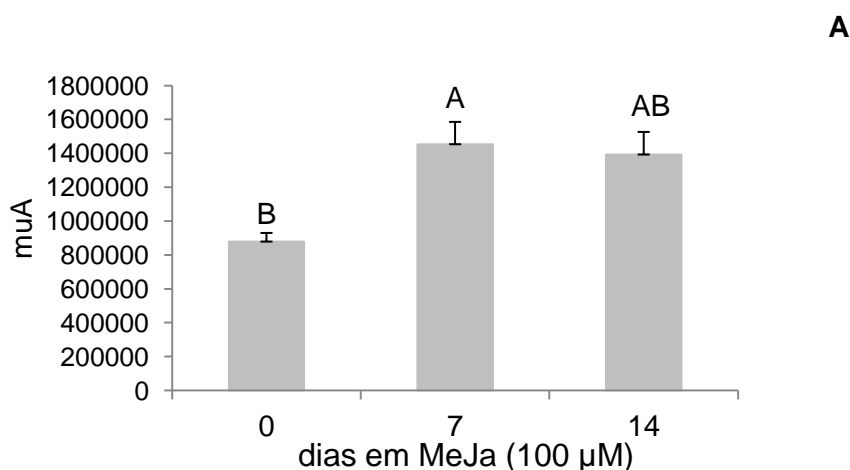
Nas plantas da ordem Caryophyllales, como as espécies em estudo, alguns flavonoides como as antocianinas, podem ser substituídos pelas betalaínas, por exemplo, amarantina, que apresentou incremento ao longo dos tratamentos. Além disso, como sugerem Rodrigues-Brandão et al. (2014), o aumento do tempo de exposição ao elicitor pode ser desfavorável para o aumento dos flavonoides e benéfico para a formação de betacianina, podendo

ter ocorrido uma rota preferencial para este composto, a partir da tirosina, que pode ser precursor comum entre ambos.

Em outro trabalho, buscando elicitação dos compostos secundários realizado com uma planta medicinal asiática, *Lemna paucicostata* Hegelm. Suh et al. (2013) sugeriram que a elicitação por metil jasmonato, nesta planta, estimula a via dos fitoesteroides em detrimento das vias fenólicas e ainda constataram que essas duas vias, possuem enzimas em comum como a cumarato 3-hidroxilase e hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMGR).

É importante ressaltar que o MeJa é um fitormônio conhecido por induzir a cascata do ácido octadecanoide que leva a expressão de genes relacionados à resistência a pragas e doenças (Thomma et al., 2000) e na produção de moléculas secundárias de defesa, que vão além dos compostos fenólicos. Incluindo terpenos, alcaloides e outros.

Nas plantas de *A. tenella* só foram visualizados no comprimento de onda 280 nm, picos salientes nas folhas, sendo o pico I visualizado no tempo de retenção de 33,43 min e observou-se elevação significativa deste pico no tempo de sete dias de exposição ao MeJa (Fig. 4A). Já o pico II, visualizado com tempo de retenção de 38,47 min (Cromatograma no apêndice 4), se mostrou mais responsivo ao tratamento e elevou seus valores ao longo do tratamento (Fig. 4 B).



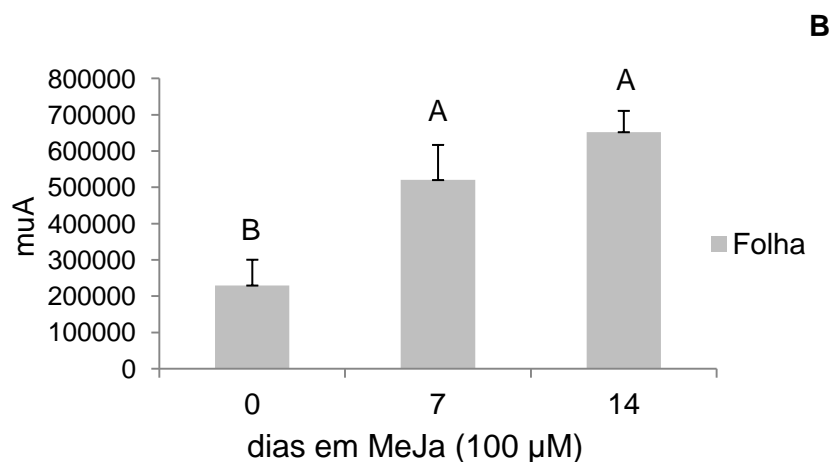


FIGURA 4 – Absorbância de compostos flavonoídicos não identificados I (A) e compostos flavonoídicos não identificados II (B) em folhas de *Alternanthera tenella* submetidas ao sistema hidropônico com raiz flutuante, na presença de 100 μM de metil jasmonato aos zero, sete e 14 dias. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). muA= mili unidades de absorbância

Segundo Vasconsuelo e Boland (2007), não é fácil estabelecer uma diferença entre indução de metabólitos secundários por elicitação ou incremento destes compostos secundários constitutivos por ação elicitora, no entanto, percebe-se neste trabalho, que a aplicação exógena do metil jasmonato alterou a síntese destes produtos.

Sabe-se ainda que a indução de metabólitos secundários pela via de sinalização do MeJa não se limita a certos tipos de compostos, mas inclui uma vasta variedade de produtos secundários de plantas, incluindo flavonoides, alcaloides, e fenilpropanoides, além de muitos outros tipos de metabólitos secundários na maioria das plantas (Zao et al., 2005). Como por exemplo: o 4-cumaril-putrescina em, folhas de cevada (Lee et al., 1997), o alcaloide pilocarpina nas folhas de *Pilocarpus jaborandi* Holms. (Avancini et al., 2003) a artemisina em folhas de *Artemisia annua* L. (Wang et al., 2010). Cabe salientar que como não foi identificado, neste trabalho, um composto flavonoídico conhecido, houve um prejuízo no acompanhamento do perfil dessas entidades nas espécies em estudo, tornando-se muito difícil relacionar o seu incremento ao estresse causado pelo metil jasmonato.

3.3 Quantificação da enzima fenilalanina amônia liase por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Com relação à quantificação da enzima fenilalanina amônia liase (FAL), na espécie *A. brasiliiana*, nota-se diferenças na atividade desta enzima entre os órgãos, caules e folhas, sendo que o caule apresenta maior atividade desta enzima produzindo em média 0,105 μmol de ácido cinâmico g^{-1} MS, nas plantas sem a presença do elicitor.

Observa-se que nas folhas ao longo da exposição ao MeJa interferem na atividade da FAL, sendo que aos 14 dias ocorreu um significativo aumento de 0,089 μmol g^{-1} MS no acúmulo de ácido cinâmico, produto imediato da ação desta enzima na planta (Fig. 5A). Já na espécie *A. tenella* a atividade da enzima não diferiu significativamente entre os órgãos e os tempos de exposição de zero e sete dias avaliados, porém a atividade da FAL aumentou no caule no maior período de exposição ao MeJa, medidos neste trabalho (Fig. 5B).

A enzima FAL transforma L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico com a remoção da molécula de amônia, sendo este o primeiro passo na biossíntese dos fenilpropanoides. Cabe a ela também a função na regulação entre o metabolismo primário e secundário devido ao seu papel na síntese de grupos de outros metabólitos secundários também de interesse farmacológico como fenóis e flavonoides presente nas espécies de *Alternanthera* investigadas nesse trabalho (Salvador et al., 2006, Kumar et al., 2011, Facundo et al., 2012).

Compete aqui frisar que na mesma espécie ocorre variação do conteúdo desta enzima em diferentes partes da planta que reage inibindo ou ativando a atividade dessas, dependendo da situação de estresse e o tempo ao qual a planta está exposta (Janas et al., 2010). Nas plantas de *Alternanthera* deste estudo, somente aos 14 dias de contato com o MeJa houve aumento da atividade da FAL, diferentemente entre os órgãos, evidenciando esta situação.

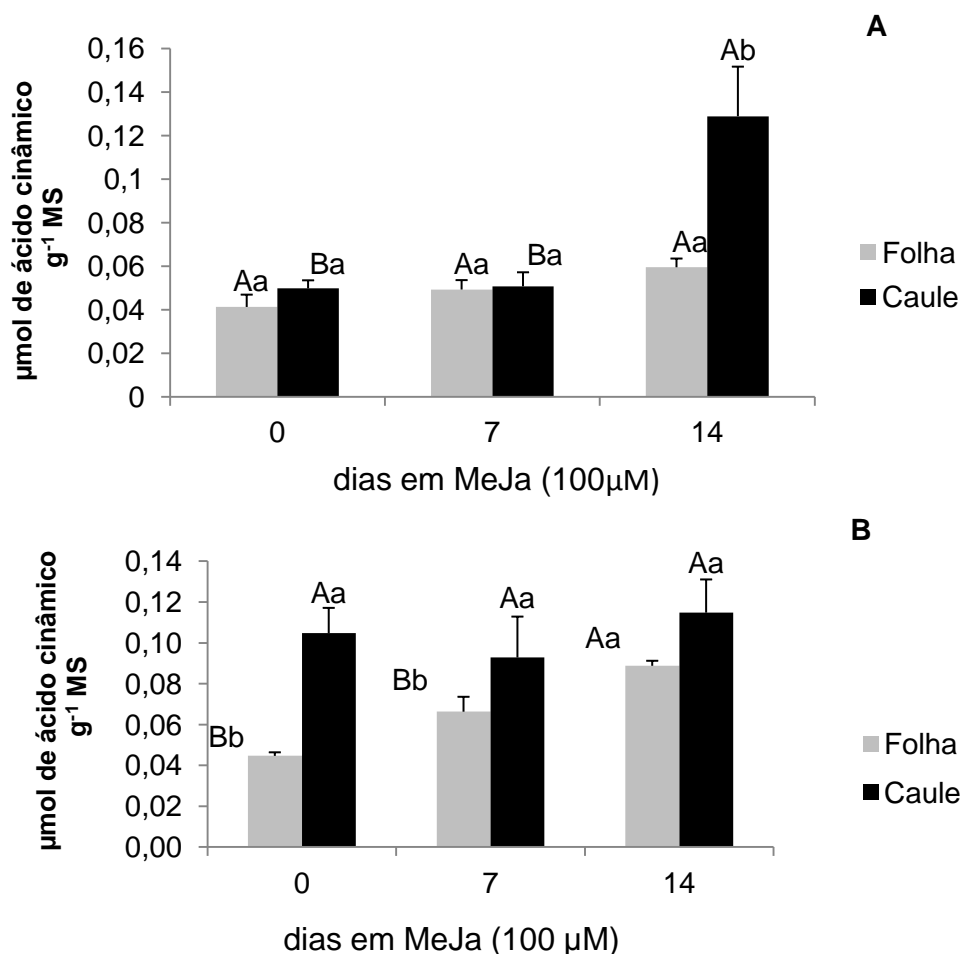


FIGURA 5 – Atividade da enzima fenil alanina amônia liase em plantas de *Alternanthera brasiliensis* (A) e *Alternanthera tenella* (B), submetidas ao sistema hidropônico com raiz flutuante, na presença de 100 μ M de metil jasmonato (MeJa) por zero sete e 14 dias. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas para cada órgão dentro do mesmo tempo e maiúscula em cada órgão nos diferentes tempos, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Em plantas de *Matricaria chamomilla* L, cultivadas em hidroponia e expostas a 60 μ mol de Cobre, por 24 horas, Kovacik e Klejdus, (2012) não encontraram variação no conteúdo desta enzima nos diferentes órgãos testados e justificaram que seria necessário um tempo maior de exposição a este elicitador para que ocorresse alguma alteração significativa na atividade da FAL.

Outro fator pertinente a esta enzima é que sua atividade é dependente de suas cinco isoformas, em muitos organismos a FAL tem apresentado condições ótimas de atividade, diferentes para cada espécie, tecido ou órgão (Bagal et al., 2012). Sabe-se também, que a síntese e a atividades das isoformas de enzimas como a FAL presentes nas plantas de acordo com Gerasimova et al., 2005, variam quantitativa e qualitativamente de acordo o estágio fisiológico e a influência do ambiente, por fatores como incidência de luz, temperatura, pH ou qualquer outro tipo de estresse.

A baixa resposta desta enzima ao elicitor MeJa, nas espécies testadas, pode estar associada ao caráter constitutivo da FAL, ficando essa compartimentalizada nos vacúolos, sendo necessários outros fatores de ativação na planta como aumento do nível de aminoácido L-fenilalanina, por exemplo (Ferrer et al., 2008).

4 Conclusões

Plantas de *A. brasiliiana* e *A. tenella* submetidas a sistema hidropônico de raiz flutuante com 100 μ M do fitohormônio metil jasmonato são capazes de alterar o seu metabolismo secundário, nos diferentes órgãos, aumentando o fluxo de produção de moléculas, como a amarantina e enzimas como a FAL. É possível monitorar o comportamento de compostos flavonoídicos através de CLAE, nestas plantas, porém esta metodologia não possibilita a identificação de quais flavonoides estão presentes nos extratos hidroalcoólicos.

5 Referências

- Andres-Lacueva, C., Monagas, M., Khan, N.; Izquierdo-Pulido, M., Urpi-Sarda, M., Permanyer, J., Lamuela-Raventos, R. M, 2008. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. J Agric Food Chem. 56, 3111-3117.
- Avancini, G., Abreu, I.N., Saldaña, M.D.A., Mohamed, R.S., Mazzafera, P., 2003. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. Phytochemistry. 63, 171–175.

- Bagal, U.R., Leebens-Mack J.H., Lorenz, W.W., Dean, J.F.D., 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *Genomics*. 13, 2-9.
- Bhuiyan, N. H., Adachi, T., 2003. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *J Plant Physiol*. 160, 1117-1124.
- Biella, C.A., Salvador M.J., Dias, D.A., Baruffi, D.M., Crott, P.S.L., 2008. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* . 103, 569-577.
- Brochado, C.O., Almeida, A.P., Barreto, B.P., Costa, L.P., Ribeiro, L.S., Pereira, R. L. C., Gonçalves-Koatz, V. L., Costa, S. S., 2003. Flavonol robinobiosides and rutosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. *J. Braz. Chem. Soc*. 14, 449-451.
- Cheong, J.J., Choi, Y.D., 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet*. 19, 409-413.
- Christensen, K.Y., Naidu, A., Parent, M.E., Pintos, J., Abrahamowicz, M., Siemiatycki, J., Koushik, A., 2012. The risk of lung cancer related to dietary intake of flavonoids. *Nutr Cancer*. 64, 964–974.
- De Sousa, E.E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T.B., Pizzolatti M, G., Szpoganicz, B., Silva, F.M.B., 2004. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O- (α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves *J.Nat.Products*. 67, 829-832.
- Delaporte, R.H., Guzen, K.P., Takemura, O.S., Mello, J.C.P., 2005. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. *Rev. Bras. Farmacogn* . 15, 133-136.
- Facundo, V.A., M.S., Azevedo, R.V., Rodrigues, L.F., do Nascimento, J.S.L.T., Militão, G. V.J., da Silva, R. Braz-Filho., 2012. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. *Rev. Bras. Farmacogn*. 22, 1134-1139.

Ferrer, J.L., Austin, M.B., Steward, J.R., Noel, J.P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant. Physiol Biochem.* 48, 356-370.

Fracassetti, D., Del, Bo'.C., Simonetti, P., Gardana, C., Klimis-Zacas, D., Ciappellano, S., 2013. Effect of time and storage temperature on anthocyanin decay and antioxidant activity in wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) powder *J Agric Food Chem.* 27, 2999–3005.

Gandia-Herrero, F., Escribano, J., Garcia-Carmona, F., 2007. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *J Agric Food Chem.* 55, 1546-1551.

Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., 2013. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci.* 18, 334–343.

Georgiev, V., Mladenka, I., Bley, T., Pavlov, A., 2008. Betalain production in plant in vitro systems. *Acta physiologic plant.* 30, 581-593.

Gerasimova, N.G., Pridvorova, S.M., Ozeretskovskaya, O.L., 2005. Role of L-phenylalanine ammonia-lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. *Appli. Biochemi and Microbi.* 41, 103-105.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricult. Experiment* 347.

Janas, K.M., Zielińska-Tomaszewska, J., Rybaczek, D., Maszewski, J., Posmyk, M.M., Aramowicz, R., 2010. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation as well as phenolic compounds accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *J Plant Physiol.* 167, 270–6.

Kováčik, J., Borivoj, K., 2012. Tissue and method specificities of phenylalanine ammonia-lyase assay. *J Plant Physiol.* 169, 1317– 1320.

Kumar, S., Singh, P., Mishra, G., Srivasta, S., Jha, K.K, Khosa, R.L., 2011. Phytopharmacological review of *Alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae). *Asian J Plant Sci Res.* 1, 41-7

- Kleinowski, A.M., Rodrigues, I.C.S., Ribeiro, M.V., Einhardt, A.M., Peters, J.A., Braga, E.J.B., 2014. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. *Braz Arch Biol Technol.* 57, 253-260.
- Lee, J., Vogt, T., Schmidt, J., Parthier, B., Löbner, M., 1997. Methyl jasmonate-induced accumulation of coumaroyl conjugates in barley leaf segments. *Phytochemistry.* 44, 582–592.
- Li, C., Feng, J., Huang, W.Y., 2013. An XT Composition of polyphenols and antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. *J Agric Food Chem.* 23, 523–531.
- López-Nicolás, J. M., Camps, M. E., Pérez-Sánchez, H., García-Carmona, F., 2013. Physicochemical and thermodynamic Characterization of the Encapsulation of Methyl Jasmonate by Natural and Modified Cyclodextrins Using Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem.* 61, 11347–11354.
- Machado, A., Conceição, A. R., 2002. Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows, versão 2.0. Pelotas, RS.
- Mandal, S., 2012. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *Afr J Biotechnol.* 47, 8038-8047.
- McKay, D. L., Oliver, C., Zampariello, C.Y., Carly, A. J.B., 2015. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry.* 168, 233–240
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15, 473- 479.
- Myung – Min, M. H., Harold, N., Trick, C. B., Rajashaka, R., 2008. Secondary metabolisms and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *J Plant Physiol.* 5, 1-11.

Namdeo, A.G., 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmaco. Reviews.* 1, 1-10.

Pavokovi, D., Rusak, G., Besendorfer, V., Krsnik-Rasol, M., 2009. Light-dependent betanin production by transformed cells of sugar beet. *Food Technol and Biotechnol.* 47, 153–158.

Perotti, J.C., Rodrigues, I.C.S., Kleinowski, A.M., Ribeiro, M.V., Einhardt, A.M., Peters, J.A., Bacarin, M.A., Braga, E.J.B., 2010. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. *Ciênc. Rural.* 40, 1874-1880.

Perotti, J.C. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Brasil 2010.

Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants Review. *Plant Signal Behav.* 11, 1720-31.

Ritthiwigrom, T., Laphookhieo, S., Pyne, S.G., 2013. Chemical constituents and biological activities of *Garcinia cowa* Roxb. Maejo. *Int. J. Food Sci. Technol.* 7, 212-231.

Rodrigues-Brandão, I., Kleinowski, A.M., Einhardt, A.M., Lima, M.C., Amarante, L., Peters, J.A., Braga, E.J.B., 2014. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. *Cienc. Rural.* 44, 1893-1898.

Sakuta, M., 2014. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins *Plant Biotechnol Rep.* 8, 37–48.

Salvador, M.J., Ferreira, E.O., Mertens-Talcott, S.U., Whocely, V.C., Butterweck V., Derendorf, H., Dias, D.A., 2006. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Naturforschung.* 61, 19-25.

Sant'Anna, V., 2013. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods e a review. *Dyes and Pigments.* 98, 601-608.

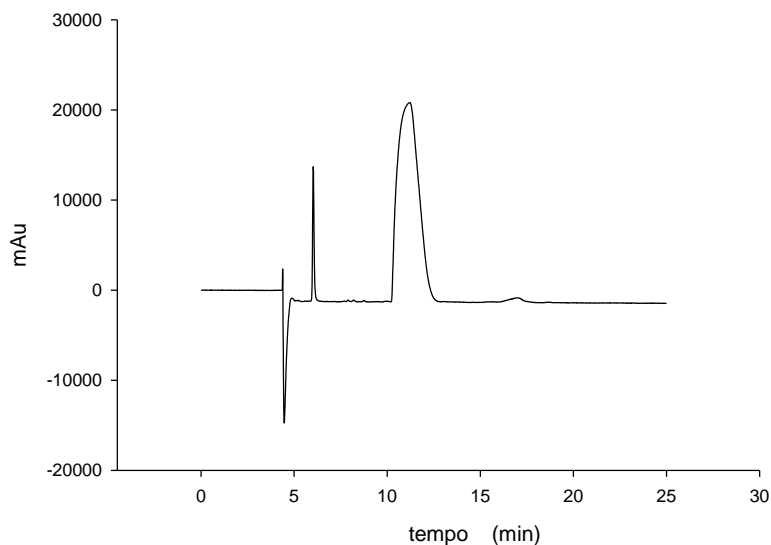
- Silva, N.C.B., Macedo, A.F., Lage, C.L.S., Esquibel, M.A, Sato, A., 2005. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. Braz Arch Biol Technol. 48, 779-786.
- Siqueira, J.C., 1995. Phytogeography of brasilian Amaranthaceae. Pesquisa Botânica. 45, 5-21.
- Stintzing, F.C., Carle, R., 2005. Betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear clones (*Opuntia* spp.). J Agric Food Chem. 53, 442–45.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W., 2003. Recent advances in betalain research. Phytochemistry. 62, 247-269.
- Suh, H.W., Hyun, A.U., Kim, A.U., So-Hyun, A.U., Seok, Y., 2013. Metabolic profiling and enhanced production of phytosterols by elicitation with methyl jasmonate and silver nitrate in whole plant cultures of *Lemna paucicostata*. Process Biochemistry. 48, 1581–1586.
- Tesoriere, L., Fazzari, M., Angileri, F., Gentile, C., Livrea, M.A., 2008. In vitro digestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta. J Agric Food Chem. 56, 10487–10492.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., 2000. Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. Plant Physiol Biochem. 38, 421-427.
- Vasconsuelo, A., Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci. 172, 861-875.
- Verpoorte, R., Maraschi, M., 2001. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: Yunes, R. A., Calixto, J.B. (org.) Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Argos, Chapecó, Brasil, pp.381-432.
- Wanderley, M.D., Neves, E., Andrade, C.J., 2011. Aspecto da produção industrial de enzimas. Rev. Citino. 1, 30-36.

Wang, H., Ma, C., Li, Z., Ma, L., Wang, H., Ye, H., Xu, G., Liu, B., 2010. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. *Ind. Crops Prod.* 31, 214–218.

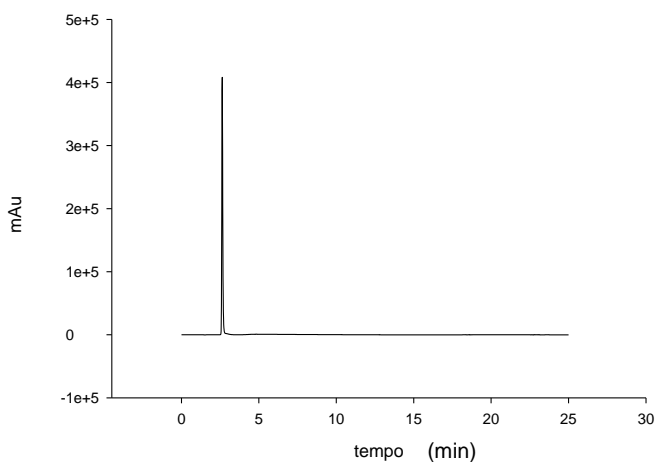
Xiong-Wei, C., Shao, L., Li-Ying, S., Che, Y., Peng, C., Qiang, Z., 2013. Amaranthine Plays an Important Role in Photoprotection for *Alternanthera Sessilis* Under Photooxidative Stress. *Biotechnology and Biotechnological Equipment.* 27, 3791-3797.

Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology.* 23, 283–333.

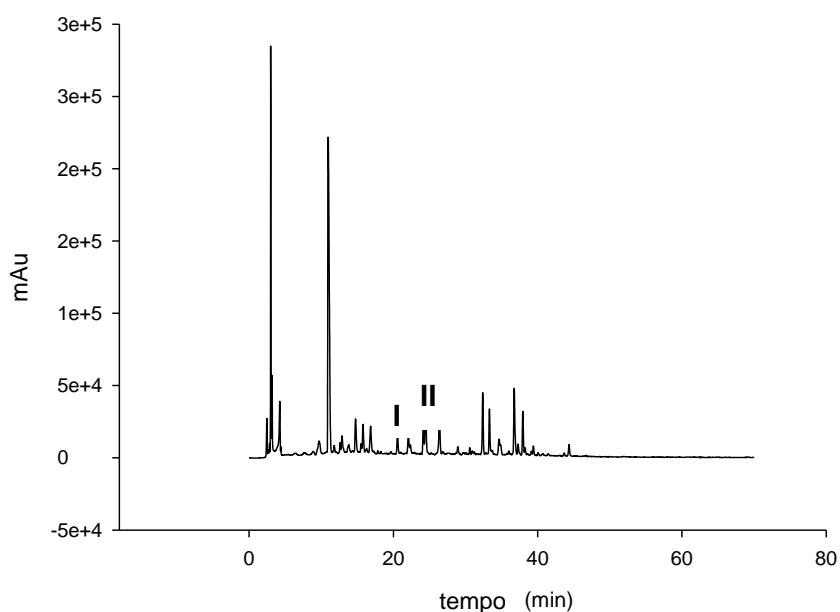
6. Apêndices



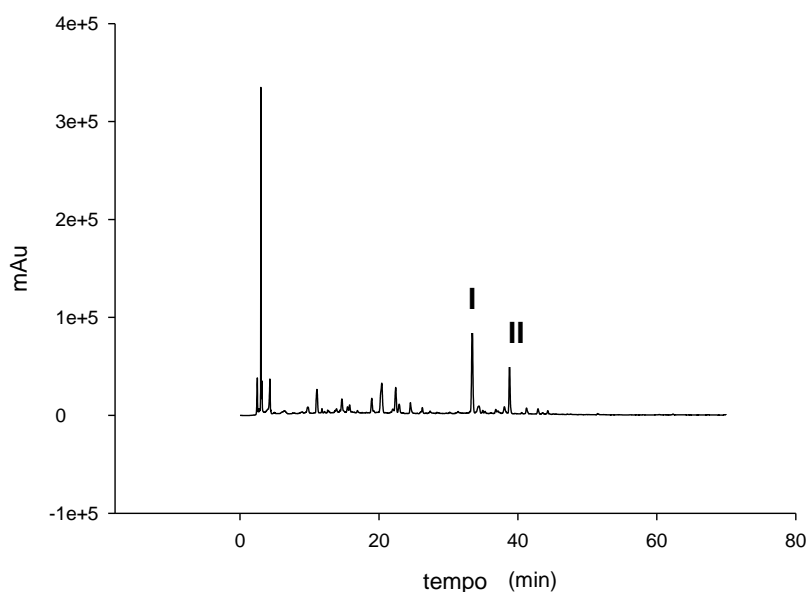
Apêndice 1- Cromatograma do padrão de ácido cinâmico no modo isocrático de acordo com Kovácik e Borivoj (2012), medidos em mili unidade de Absorbância (mAu).



Apêndice 2- Cromatograma do padrão de ácido cinâmico em gradiente linear de 25 min com 100% de A (Água e 0,05% de TFA - ácido trifluor acético) a 57% de A e 43% de B (acetonitrila e TFA 0,05%), medidos em mili unidade de Absorbância (mAu). Metodologia de Kovácik e Borivoj (2012) adaptada neste trabalho.



Apêndice 3 – Cromatograma à 280nm, do extrato hidroalcoólico de folhas de *Alternanthera brasiliana* submetidas ao sistema hidropônico com raiz flutuante, na presença de 100 μ M de metil jasmonato, medidos em mili unidade de Absorbância (muA).



Apêndice 4 – Cromatograma à 280nm, do extrato hidroalcoólico de folhas de *Alternanthera tenella* submetidas ao sistema hidropônico com raiz flutuante, na presença de 100 μ M de metil jasmonato, medidos em mili unidade de Absorbância (muA).

PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AMARANTINA EXTRAÍDA DE *Alternanthera brasiliana*

RESUMO *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) conhecida popularmente como penicilina ou doril é uma planta utilizada com frequência na medicina popular. A fração polar do extrato desta planta apresenta pigmentos da classe das betalaínas: corantes alimentícios, com vasta gama de atividades biológicas desejáveis. No entanto, mesmo já tendo sido comprovada a atividade antibiótica dos pigmentos betalâmicos, ainda há uma carência de estudos para verificar a eficácia desses pigmentos naturais isoladas de *A. brasiliana*. O objetivo do presente trabalho foi determinar as betalaínas existentes no extrato hidroalcoólico de *A. brasiliana*, purificar a principal betacianina e testar sua atividade antibacteriana. A presença da amarantina foi verificada no extrato hidroalcoólico de *A. brasiliana* e confirmada por com cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa, enquanto a purificação foi realizada pela cromatografia de troca iônica e comparada à amarantina padrão. O uso deste pigmento purificado e dos extratos aquosos de caule e folha de *A. brasiliana* não inibe o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. no entanto, outros testes biológicos podem ser realizados com essa molécula purificada, para elucidar melhor, sua importância farmacológica e possível aplicação na indústria nutracêutica.

Palavras-chaves: Betalaínas, amaranthaceae, betacianinas, purificação de amarantina

PURIFICATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AMARANTIN ISOLATE FROM *Alternanthera brasiliana*.

ABSTRACT *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) is popularly known as penicillin or Doril and is often used in folk medicine. The polar fraction of this extracto this plant has metabolic such as the betalains class, used as food dye, and with a wide range of desirable biological activities. However, even having already been proven antibiotic activity of betalamic pigments, there is still a lack of studies to verify the effectiveness of these natural pigments isolated from *A. Brasiliana*. The objective of this study was to determine the betalains existing in the hydroalcoholic extract of *A. brasiliana*, purify the main betacyanin and test its antibacterial activity. The presence of amarantin was verified in the hydroalcoholic extract of *A. brasiliana* and confirmad by high performance liquid chromatography linked to mass spectrometry, while this pigment was purified by ion exchange chromatography and compared to pure amarantin. The use of this purified pigment and aqueous extracts of the stem and leaves of *A. Brasiliana* sheet does not inhibit growth of the bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonela* sp. however, other biological assays may be performed with the purified molecule, to elucidate better, pharmacological significance and possible of the application in the nutraceutical industry.

Keywords: betalains, amaranthaceae, betacyanins, pigment purification,

INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos as plantas medicinais são uma inexorável fonte de recursos para tratar diversas doenças, onde, diferentes partes e moléculas desses vegetais são utilizadas para amenizar e curar enfermidades¹. Nesse contexto se insere a espécie *Alternanthera brasiliana* L. Kuntze (Amaranthaceae), uma planta medicinal herbácea, popularmente utilizada para o tratamento de inflamações, dores e processos infecciosos².

Os ensaios farmacológicos, com essa planta, provaram a atividade antibiótica semelhante a da tetraciclina³ e é assim que *A. brasiliana* é popularmente conhecida no Brasil, como "tetraciclina" e/ou "penicilina". Consoante a isso, muitos trabalhos já confirmam a ação inibitória, de diversos extratos dessa planta, em bactérias gram-positivas e negativas o que a torna de vital importância no *screening* de moléculas que possam substituir ou melhorar os antimicrobianos disponíveis⁴.

Estudos fitoquímicos das frações polares desses extratos têm revelado além de outras moléculas, a presença de pigmentos da classe das betalaínas⁵, pigmentos nitrogenados característicos da família Amaranthaceae e que são empregados como corantes alimentícios, exibindo vasta gama de atividades biológicas desejáveis, incluindo atividade bactericida⁶.

As betalaínas são pigmentos hidrossolúveis, quimicamente estáveis em um intervalo amplo de pH e possuem uma fórmula geral que contém a estrutura do ácido betalâmico acompanhado de um substituinte que pode ser de um simples hidrogênio a uma complexa molécula glicosilada^{7,8}.

Desta forma, as betalaínas podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo) sendo que as betacianinas podem ser classificadas por sua estrutura química em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina. Até o momento são descritos aproximadamente 50 tipos de betacianinas (vermelhos) e 20 tipos de betaxantinas (amarelos)⁹.

O fato é que muitos desses pigmentos naturais, além de atribuir cor ao produto, possuem propriedades benéficas à saúde humana¹⁰ como antioxidantes, antibióticas, dentre outras, os que o tornam muito mais conveniente e interessante, para o fabricante e para o próprio consumidor, pois ajuda a

melhorar a aparência dos insumos e podem ajudar a equilibrar a saúde de quem os consome¹¹. Além do interesse medicinal, o aumento da utilização desses e outros pigmentos naturais são de notável relevância econômica, com aplicação em vários setores, desde alimentício quanto farmacêutico, pertencendo a uma indústria multimilionária com crescimento anual em torno de 10% ao ano¹².

No entanto, mesmo já tendo sido comprovada a atividade antibiótica dos pigmentos betalâmicos¹³, ainda há uma carência de estudos para verificar a eficácia desses pigmentos naturais isolados e purificados de plantas medicinais¹⁴. Algumas espécies do gênero *Alternanthera* já estão sendo utilizadas como modelos biológicos para estudos sobre a fisiologia do seu metabolismo secundário e, possível, aproveitamento dessas moléculas naturais¹⁵⁻¹⁷. No entanto, não foram encontrados relatos, na literatura, de betalaínas isoladas de *A. brasiliana* e tampouco de sua possível atividade antibacteriana.

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi determinar as betalaínas existentes no extrato hidroalcoólico de *A. brasiliana*, extrair e purificar a betacianina principal, além de verificar sua atividade antibacteriana.

PARTE EXPERIMENTAL

Material Vegetal

Foram utilizadas plantas de *A. brasiliana* pertencentes ao Banco de Plantas *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Pelotas, Brasil. As plantas foram micropropagadas em meio Murashige e Skoog (MS)¹⁸, sem regulador de crescimento, com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 100 mg L⁻¹ de inositol, mantidas em câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h de fotoperíodo e temperatura de 25 °C \pm 2, por 30 dias. Posteriormente, foram retiradas do meio de cultura e suas raízes lavadas em água corrente, para retirada dos resíduos de meio de cultura, sendo transferidas para bandejas de plástico (20 x 7 x 3 cm), contendo como substrato vermiculita, as quais foram mantidas sob densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e

fotoperíodo de 16 horas. A irrigação das plantas foi todos os dias e dia e era acrescida solução nutritiva de Hoagland¹⁹, meia força, a cada três até que elas completassem 60 dias.

Armazenamento e liofilização

Após 60 dias, foi realizada a coleta do material vegetal, aferição de sua massa, manutenção por 48 horas em ultra-freezer (-80°C) e posterior liofilização (Liofilizador L101, LioTop), o produto final resultou em uma estrutura porosa, livre de umidade e capaz de ser reconstituído pela simples adição de água²⁰, sem perda das propriedades químicas dos metabólitos secundários, principalmente seu conteúdo de betacianinas. Após esse procedimento o material foi armazenado em freezer (-20° C).

Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Para o preparo do extrato hidroalcoólico de *A. brasiliiana* foram homogeneizadas 0,25 g de parte aérea liofilizada em 7 mL de tampão acetato de sódio (pH 5,0 e 10 mM) contendo ácido ascórbico 10 mM, acrescido de 3 mL de metanol P.A., grau HPLC, totalizando 10 mL de solvente extrator por amostra, utilizando-se tubos para centrífuga tipo Falcon® de 15 mL. A homogeneização das amostras foi realizada por meio de um Polytron® (Kinematica AG, Suíça), com dois pulsos de 10 segundos.

Identificação dos pigmentos betalâmicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O extrato obtido foi filtrado em gaze e centrifugado a 120.000g, por 40 min. Os sobrenadantes foram passados em membrana Centriplus® YM-10 (Milipore), para remover as proteínas e as impurezas. Os padrões de betacianinas testados foram amarantina, betanidina e betanina na concentração de 1 µg mL⁻¹ até 5 µg mL⁻¹, para cada. Todas as análises cromatográficas e espectrométricas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Murcia-Espanha.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi realizada de acordo com a metodologia de Gandía-Herrero ²¹ em um aparelho Shimadzu LC-10A, acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M10A (Shimadzu, Quioto, Japão). Foram utilizados 25 µL de extrato hidroalcoólico de *A. brasiliiana* em uma coluna empacotada Kromasil 100 C-18 (250 x 4,6 mm), com partículas de 5 µm (Tecnokroma, Barcelona, Espanha). A fase móvel foi composta por água ultrapura, acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente A) e acetonitrila, acidificada com 0,05 % de ácido trifluoroacético (solvente B), com fluxo de 1 mL min⁻¹. As leituras de absorbância foram realizadas em 536 nm, em triplicata.

Espectrometria de massa por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (EM/EM)

As análises foram conduzidas em um espectrômetro Agilent VL 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). As condições de eluição empregadas foram as mesmas da análise anterior. A interface entre o CLAE e o espectrômetro de massas consistiu de uma fonte de ionização por eletrospray, a 3,5 kV, com uma taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo de ionização, com varredura completa na faixa de 60-1000 m/z. Para a detecção, a tensão multiplicadora de elétrons foi de 1350 V ²¹.

Preparo do extrato para cromatografia líquida rápida de proteínas (CLRP)

Com o intuito de isolar e purificar a betacianina majoritária de *A. brasiliiana* foi preparado um extrato com maior quantidade de massa/volume de extrato hidroalcoólico de *A. brasiliiana*. Esse extrato foi dividido em 6 tubos de centrifuga, tipo Falcon® com 30 mL e 0,75 g de massa de plantas em cada, totalizando 4,5 g em 180 mL do extrator tampão (m/v). A metodologia de homogeneização e centrifugação foi às mesmas já relatadas anteriormente. Posteriormente o extrato foi levado a resíduo em evaporador a vácuo, a temperatura ambiente, e redissolvido em 50 mL de água ultrapura. Esse extrato foi desproteínezado com célula de Amicon 8400® e após foi filtrado em uma coluna C18 com água acidificada e 15% de metanol em um volume de 35 mL,

onde foi recoletada 80 mL da fração filtrada em C18. Esta fração foi neutralizada, evaporado a vácuo até o volume final de 12 mL.

Purificação de amarantina por cromatografia líquida rápida de proteínas (CLRP)

A purificação de amarantina foi realizada pela cromatografia de troca iônica com o aparelho de Cromatografia líquida rápida de proteínas, Akta Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). O aparelho é operado pelo software Unicorn versão 3.00 e a CLRP foi realizada de acordo com Gandía-Herrero ²², porém com modificações no pH do solventes. Foi utilizada uma coluna de 5 mL Q-Sepharose, de fluxo rápido, com agarose reticulada com grupos de amônio quaternário como permutador e tamanho de partícula de 90 µm, adquirido de *Amersham Biosciences*. Os eluentes utilizados foram Tampão fosfato 100 mM pH 6,0 (solvente A) e Cloreto de Sódio 2 M (solvente B) filtrados e sonicados para retirar impurezas e diminuir os gases, respectivamente. Depois da injeção do extrato descrito na metodologia anterior, o processo de eluição em gradiente linear onde 0% de B em 10 min até 60% de B por 5 min, retornando a 100% de A por 10 min em uma taxa de fluxo de 2 mL min⁻¹ à 280 e 536 nm.

O volume de *looping* injetado foi de 2 mL, por corrida, e foram coletados 2,5 mL de cada fração para posterior filtragem em coluna C18, para retirada do Cloreto de Sódio, neutralizado e analisado para comparar com o padrão de amarantina em CLAE.

Teste de sensibilidade bacteriana pelo método de contagem de colônias

Foram utilizadas linhagens bacterianas padrões das espécies *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp., todas mantidas em estoque no Laboratório de Imunologia aplicada, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

Por ocasião dos experimentos, as linhagens eram inoculadas em *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 35°C/18-24 horas. Antes de serem utilizadas para os tratamentos as colônias das três espécies de bactérias receberam, cada

uma, três lavagens com tampão fosfato salino pH 7,0 PBS (PBS = 0,01 M K_2PO_4 + KPO_4 , + NaCl 0,85%) e foram ajustadas em espectrofotômetro até a densidade óptica (DO) de 1,0.

Para os testes de sensibilidade bacteriana foram utilizadas microplacas com fundo em "U" esterilizadas, com 96 poços (TPP®). Para cada bactéria foi utilizado um total de 15 orifícios, que receberam a proporção de 100 µL de bactéria e 100 µL, dos respectivos tratamentos, em triplicata: extrato aquoso de folha de *A. brasiliiana*, extrato aquoso de caule de *A. brasiliiana* e amarantina purificada de *A. brasiliiana*, como controle positivo (gentamicina), controle negativo (soro PBS).

As microplacas foram incubadas por 2 horas a 35°C. Em seguida foram coletados alíquotas de 100 µL dos poços, de todos os tratamentos, das três cepas bacterianas, para realizar as diluições seriadas de, em tubos de 1 mL contendo 900 µL de solução salina estéril e 100 µL de cada um dos tratamentos. Dessas, foram semeadas 100 µL da diluição $1,0 \times 10^{-6}$ até $1,0 \times 10^{-8}$, em quatro repetições, em placas de Petri contendo BHI, para posterior contagem das colônias²³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos pigmentos betalâmicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os extratos hidroalcoólico da parte aérea da espécie *A. brasiliiana* foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar o perfil das betacianinas a 536 nm. E os perfis cromatográficos destes extratos, revelaram a presença de dois picos predominantes com tempo de retenção (T_r) de 15 min., pela análise cromatográfica. Nas condições cromatográficas já descritas e quando comparados aos padrões de betacianinas, este T_r é característico do pigmento amarantina (betanidina-5-O-β-glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma isoamarantina (Figura 1).

Cabe ressaltar que nesses extratos de *A. brasiliiana* (536 nm) foram visualizados outros picos, com tempos de retenção diferentes, porém os picos de maior intensidade e abundância destacados aqui são os que possuem o

mesmo tempo de retenção do padrão purificado do pigmento amaranтина, determinando a presença desta molécula nos extratos hidroalcoólicos destas plantas (Figura 2).

Outros tipos de betacianinas como a betanidina, com T_r de 18 min e isobetanidina com T_r de 19,7 min, também apareceram em algumas corridas dos extratos de *A. brasiliiana* a 536 nm, porém, devido a pouca intensidade de pico e baixa repetibilidade não foi possível o monitoramento e a quantificação destes compostos. Estes fatores, como baixa repetibilidade e pouca intensidade de outros picos de betacianinas também ocorreu em um estudo do perfil cromatográfico de extratos hidroalcoólicos de calos de *A. brasiliiana* por CLAE, onde foi relatada e confirmada a presença de picos referentes a estes compostos²⁴, porém, igual a esse trabalho, não houve quantificação ou uma melhor caracterização destas outras moléculas de betacianinas.

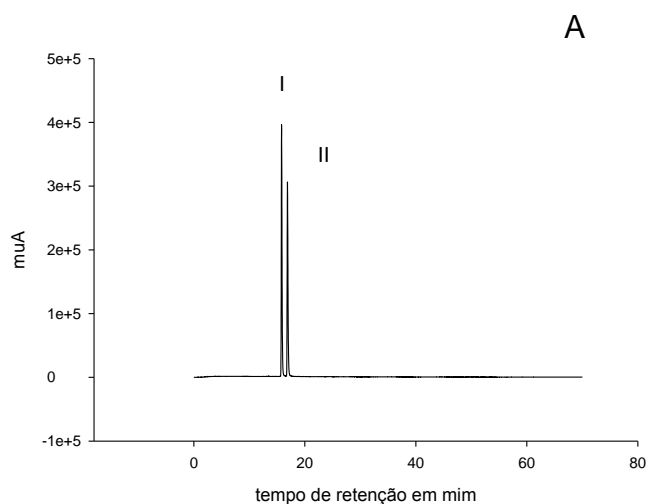


Figura 1 – Cromatogramas monitorado em 536 nm. (A), I- molécula purificada de amaranтина (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma II- isoamarantina (isobetanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) muA = mili unidades de absorbância

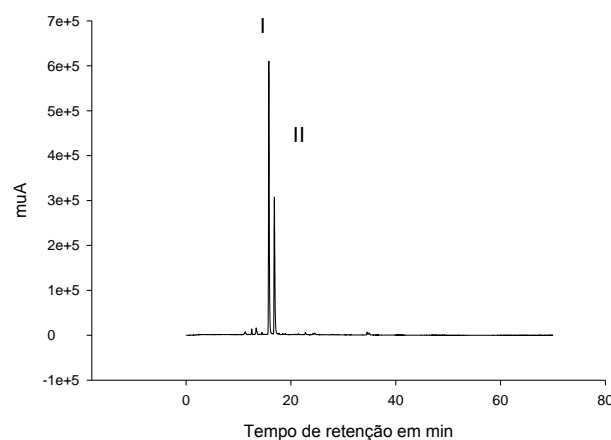


Figura 2 – Cromatograma do extrato hidroalcoólico fresco das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* com a presença de: I- amarantina (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma II- isoamarantina (isobetanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo). Medidos em muA = mili unidades de absorbância

Espectrometria de massas por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (EM/EM)

Para uma confirmação mais direta e confiável da presença do pigmento amarantina, nos extratos hidroalcoólicos das plantas de *Alternanthera* foi realizada a espectrometria de massas com ionização positiva da molécula purificada deste pigmento de *Beta vulgaris* L. e dos extratos hidroalcoólicos de ambas as espécies.

A molécula purificada de amarantina possui seu íon molecular de 727,3 m/z e tempo de retenção de aproximadamente 18 min, devido à taxa de fluxo mais lenta, obrigatória deste aparelho de espectrometria de massa. A primeira fragmentação dessa molécula resultou em um íon protonado em 551,1 m/z e o segundo choque resultou em um íon de 389 m/z (Figura 3)

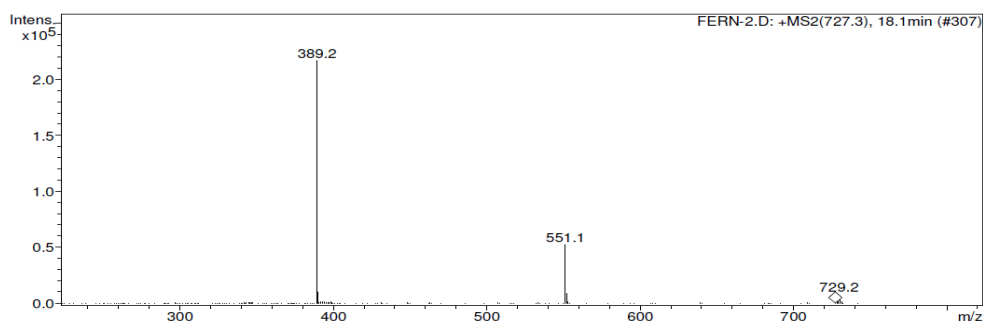


Figura 3 – Espectro de massa de amarantina, mostrando a fragmentação positiva de seus íons protonados.

Como a amarantina possui duas moléculas de glicose como substituintes, essas fragmentações ocorreram provavelmente devido ao desprendimento dessas, a cada choque, na molécula principal de amarantina (Figura 4).

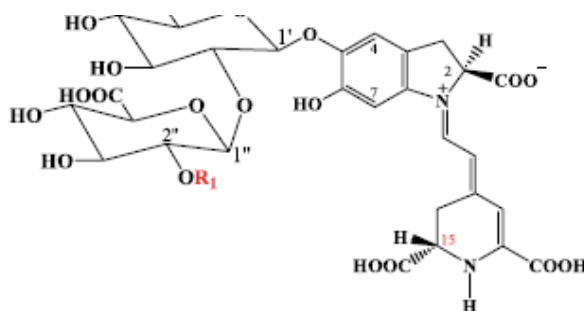


Figura 4 - Molécula de amarantina com íon molecular de 727,3 m/z. Adaptada de Cai et al. (2005).

O mesmo padrão de fragmentação, no mesmo tempo de retenção, foi encontrado nos extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliensis*, caracterizando o comparecimento deste íon molecular de 727,3 m/z o que confirma também por espectrometria de massa a presença de amarantina no extrato hidroalcoólicos dessa espécie (Figura 5).

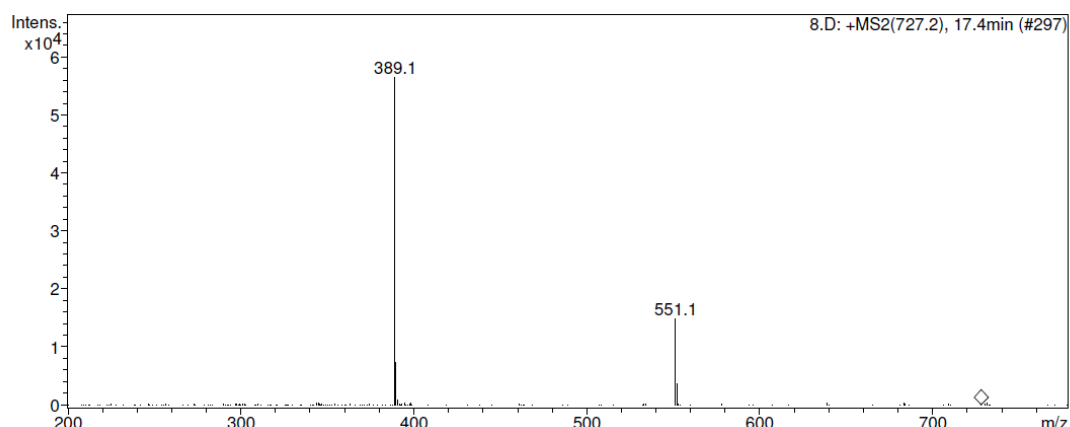


Figura 5 - Espectro de massa do extrato hidroalcoólico de *Alternanthera brasiliana* mostrando o mesmo padrão de fragmentação positiva de íons.

Alguns estudos realizados *in vitro*, com prospecções por técnicas espectrofotométricas, já haviam relatado a presença de betacianina do tipo amarantina em plantas do gênero *Alternanthera*^{5, 15, 16, 26}. Inclusive nesses relatos houve, com sucesso, o uso de moléculas elicitoras para aumentar o acúmulo desses pigmentos, haja vista, a importância farmacológica das moléculas de betacianina como sequestradoras de radicais livres e anti-inflamatórias²⁷, para a indústria nutracêutica. Porém não houve a extração e/ou a purificação do pigmento amarantina, com essas espécies, para efetuar outros testes biológicos.

É imprescindível salientar que no nosso estudo a presença de amarantina em *A. brasiliana* foi confirmada pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), um dos métodos mais confiáveis dentro da química analítica²⁸, o que torna os estudos com esta espécie, ainda mais importante e promissores na busca por formas de extração e purificação do pigmento amarantina.

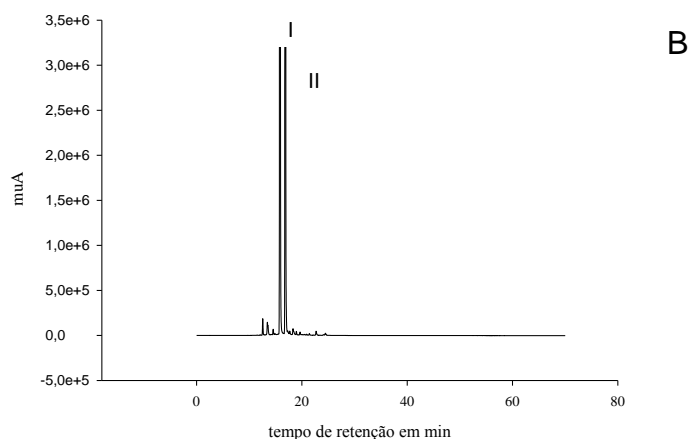
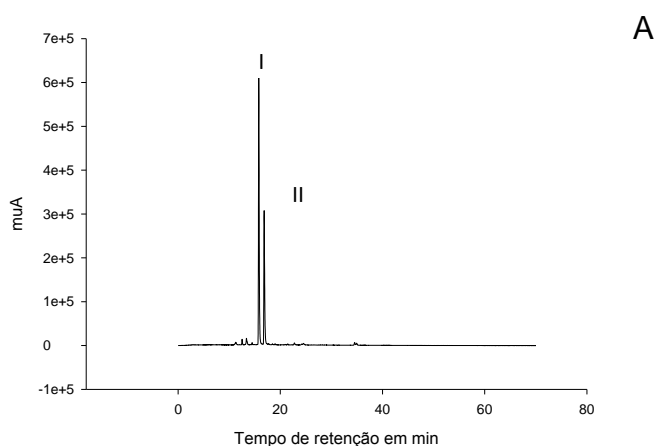
Purificação de amarantina por cromatografia líquida rápida de proteínas (CLRP)

A presença da betacianina amarantina foi verificada nos extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliana*, em cromatografia líquida de alta eficiência, com auxílio do padrão extraído de *Beta vulgaris* L. e com a metodologia, já descrita, a 536 nm.

Em seguida essa análise foi conferida por cromatografia líquida de alta eficiência (EM/EM), onde foram encontrados os mesmos padrões de ionização no extrato e na amarantina utilizada como padrão. Com isso, optou-se por desenvolver uma metodologia de extração e purificação de amarantina a partir desses extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliana*.

Após obter os cromatogramas do extrato hidroalcoólico fresco de *A. brasiliana* (Figura 6 A), o primeiro passo foi à filtragem do extrato fresco em coluna C18 com água ácida e 15% de metanol para retirada de algumas impurezas mais apolares deste extrato, que ficariam retidas nessa coluna. A partir de alíquotas do filtrado percebeu-se que o extrato apresentou um perfil cromatográfico com menor quantidade destas moléculas (Figura 6 B).

Essa fração filtrada anteriormente foi em seguida neutralizado e concentrado em evaporadas a vácuo até 12 mL foi injetado no CLRP, sendo que na fração 8 e 9 desse com 2,5 mL cada, foi encontrada a amarantina pura (Figura 6 C) e os resultados foram confirmado quando comparado alíquotas dessas frações, ao padrão de amarantina (Figura 6 D).



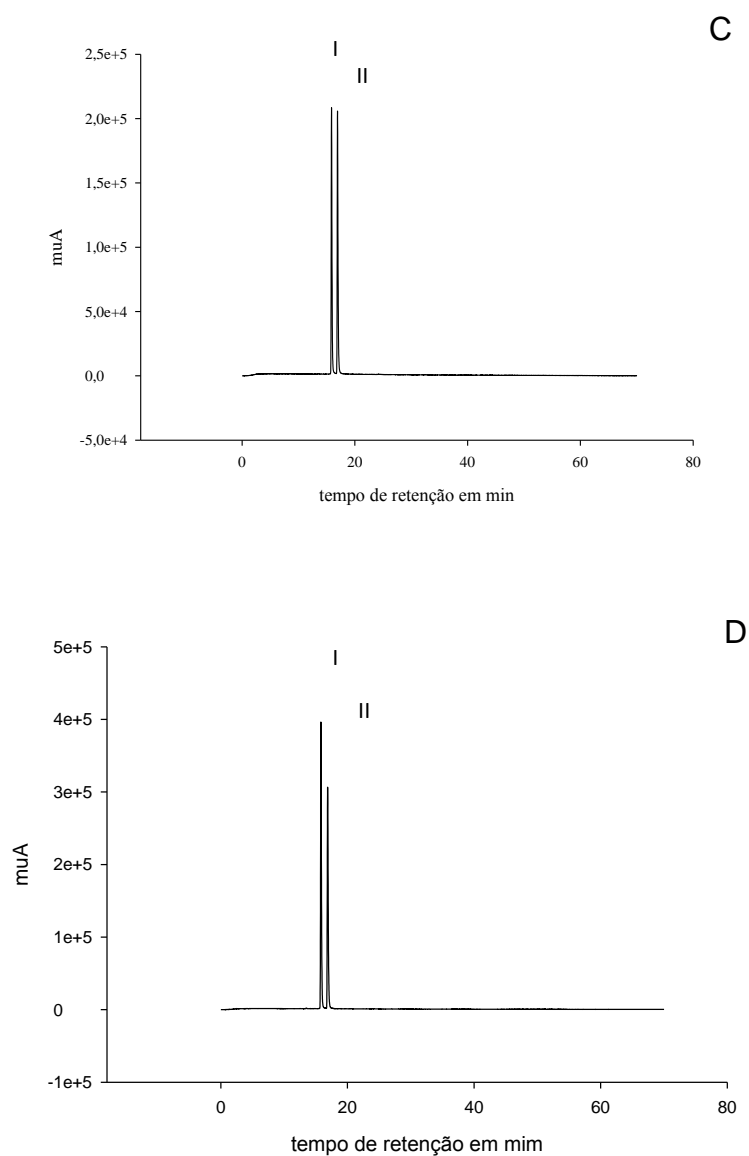


Figura 6 – Cromatograma em 536 nm. Cromatograma do extrato hidroalcoólico fresco das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* (A), cromatograma do extrato hidroalcoólico 15% metanólico das partes aéreas de *Alternanthera brasiliana* (B), cromatograma da fração pura de amarantina após cromatografia de troca iônica com extratos de *Alternanthera brasiliana* (C) e cromatograma da molécula purificada de amarantina I- (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) e sua isoforma II- isoamarantina (D), medidos em mili unidades de absorvância (muA).

A molécula de amarantina e sua isoforma epímera C15 isoamarantina, já foram encontradas em 91,5% em 37 espécies de oito gêneros de plantas da família *Amarantaceae*²⁹. O teor médio de presença de amarantina nessas espécies é de 80,9% e em alguns casos como no gênero *Amaranthus* a amarantina foi a única betacianina encontrada e purificada³⁰. Alguns trabalhos já relataram que a cromatografia por troca iônica é uma técnica eficaz e capaz de separar, com eficiência, as misturas de betalaínas e outras moléculas glicosiladas dos extratos brutos das plantas, extraíndo e purificando as betacianinas majoritárias na espécie em estudo³¹. Com a espécie medicinal *A. brasiliiana*, esse trabalho é o primeiro relato do uso com sucesso desta técnica de cromatografia, para isolar e purificar sua betacianina majoritária - a amarantina, que possui uma vasta gama de aplicações farmacológicas já confirmadas³² e outras ainda a serem investigada, como a sua atividade antibacteriana.

Teste de sensibilidade bacteriana pelo método de contagem de colônias

Os extratos aquosos de caule e folha de *A. brasiliiana* e o pigmento isolado de amarantina, nesse trabalho, não foram eficazes *no controle de crescimento* das colônias bacterianas padrões das espécies *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella sp*, visto que houve considerável número de unidades formadoras de colônias (UFC) em todos os tratamentos, exceto no controle positivo com o antibiótico gentamicina (Figura 6).

Pouco se conhece sobre a atividade antibacteriana das betalaínas, considerando que esta classe de pigmento é pouco estudada do ponto de vista de suas atividades biológicas³³. A partir de extratos de beterraba (*Beta vulgares*), foi comprovada atividade antibacteriana que continham várias betacianinas, que podiam ou não estar atuando em sinergismo, frente a microrganismo como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio parahaemolyticus*, no entanto, não há registros sobre atividade antibacteriana da amarantina isolada³⁴.

Sendo a *A. brasiliiana* uma erva indígena, amplamente utilizado no Brasil como planta medicinal para o tratamento de diversas doenças, inclusive como antibiótica, essa espécie não passou despercebida na busca de

produtos/moléculas que possam substituir ou auxiliar a terapêutica antibacteriana já existente³⁵.

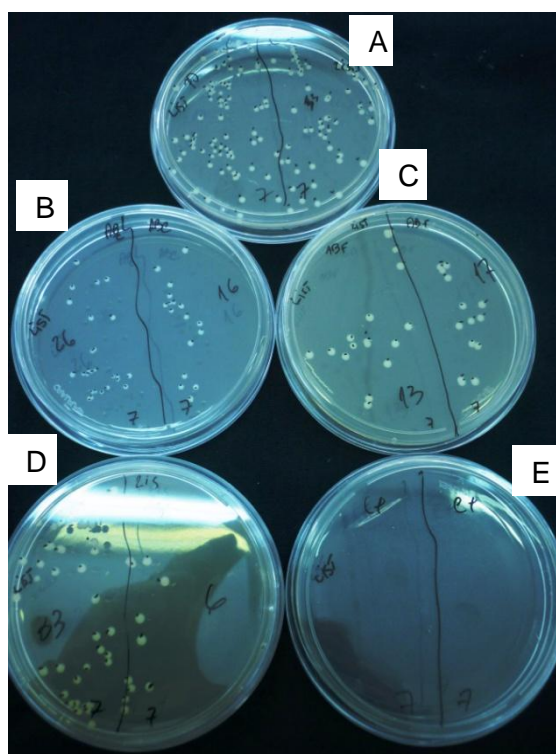


Figura 7 – Amostras do número aproximado de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), em *Listeria monocytogenes* na diluição $1,0 \times 10^{-7}$, cultivadas em controle negativo com soro PBS (A), extrato aquoso de caule de *Alternanthera brasiliiana* (B), extrato aquoso de folha de *Alternanthera brasiliiana* (C), pigmento de amarantina puro (D), controle positivo com gentamicina (E).

Possivelmente terpenos, esteroides e, principalmente, o β -sitosterol são as moléculas mais significativas na atividade de plantas medicinais com atividade antibiótica. Diversos trabalhos afirmam que em *A. brasiliiana*, predominantemente, são essas moléculas as protagonistas na atividade antimicrobiana, atribuída a planta³⁵⁻³⁸.

Por exemplo, em folhas dessa espécie submetidas partição líquido-líquido com diferentes solventes apolares e polares, foi verificada que somente a fração com os solventes apolares, as quais carregam a moléculas anteriormente citadas, possuíam uma ação bacteriostática em cepas de *Staphylococcus*

aureus e *Pseudomonas aeruginosa*³⁹. Corroborando a isso, outra investigação realizada para estudar as propriedades fitoquímicas e antibacterianas de *A. brasiliana*, com extratos de folhas de três diferentes solventes, hexano, clorofórmio e metanol, contra microrganismo patogênico humano (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* e *Bacillus subtilis*) concluiu que o extrato mais apolar de *A. brasiliana* apresentou potencial atividade antibacteriana, contra *E. coli*. Além disso, estudos fitoquímicos desse extrato hexano, indicaram a presença de componentes fitoquímicos como fitoesteróis e saponinas o que, segundo os autores podem ser os responsáveis pela atividade antibacteriana dessa espécie⁴⁰.

Mesmo que *A. brasiliana* seja considerada uma espécie promissora no *screening* de alternativas que possam substituir ou melhorar os antimicrobianos disponíveis, é consolidado que a bioatividade de uma espécie medicinal depende tanto das moléculas que ela possui quanto da capacidade de extração dessas, com as diferentes metodologias e polaridades de solventes⁴¹.

Os extratos mais polares como aquoso utilizado no presente estudo e os metanólicos testados em outros trabalhos^{42, 43} possuem pouca afinidade com essas moléculas, consideradas bactericidas, o que pode explicar a ausência de atividade antibacteriana nesses trabalhos.

CONCLUSÕES

Esse trabalho é o primeiro relato do uso com sucesso da técnica de cromatografia de troca iônica em *Alternanthera brasiliana* para isolar e purificar a sua principal betacianina - a amarantina.

O uso deste pigmento purificado e dos extratos aquosos de caule e folha de *A. brasiliana* não inibe o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. no entanto, outros testes biológicos podem ser realizados com essa molécula purificada, para elucidar melhor, sua importância farmacológica e possível aplicação na indústria nutracêutica.

REFERÊNCIAS

1. Enechi, O. C.; Odo, C. E.; Wuave, C. P. Evaluation of the in vitro anti-oxidant activity of *Alternanthera brasiliana* leaves. *J. Pharm Res* **2013**, 6, 919-924.

2. Kumar, S.; Singh, P.; Mishra, G.; Srivastar, S.; Jha, K. K.; Khosa, R. L. Phytopharmacological review of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). *Asian J Plant Sci Res* **2011**, *1*, 41-47.
3. Caetano, N.; Saraiva, A.; Pereira, R.; Carvalho, D.; Pimentel, M. C. B.; Maia, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. *Rev. Bras. Farmacogn* **2002**, *12*, 132–135.
4. Trapp, M. A.; Kai, M.; Mithöfer, A.; Rodrigues-Filho, E. Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. *Phytochemistry* **(2014)**, doi: /10.1016/j.phytochem 2014.11.005.
5. Silva, N. C. B.; Macedo, A. F.; Lage, C. L. S.; Esquibel, M. A.; Sato, A. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. *Braz Arch Biol Technol* **2005**, *48*, 779-786.
6. Sakuta, M. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins *Plant. Biotechnology Report* **2014**, *8*, 37–48.
7. Tanaka, Y.; Sasaki, N.; Ohmiya, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* **2008**, *54*, 733–749.
8. Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci* **2013**, *18*, 334–343.
9. Volp, A. C. P.; Renhe, I. R. T.; Stringueta, P. C. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e nutrição* **2009**, *20*, 157-166.
10. Chandrasekhar, J.; Sonika, G.; Madhusudhan, M. C.; Raghavarao, K. S. M. S. Differential partitioning of betacyanins and betaxanthins employing aqueous two phase extraction. *J. Food Eng* **2015**, *144*, 156–163

11. Wybraniec, S.; Stalica, P.; Jerz, G.; Klose, B.; Gebers, N.; Winterhalter, P.; Sporna, S. M.; Mizrahi, Y. Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr* **2009**, *1216*, 6890-6899.

12. Prakash, J. M.; Priya, B.; Nivetha, V. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from *Bougainvillea glabra* flowers. *Ind. Crops Prod* **2015**, *63*, 182–189.

13. Vélez-Jiménez, E.; Tenbergen, K.; Santiago, P. D.; Cardador-Martínez, M. A. Functional attributes of *amaranth*. *Austin Journal of Nutrition And Food Sciences* 2014, *2*, 1-6.

14. Kim, J. M.; Park, S. J.; Lee, C. S.; Ren, C.; Kim, S. S.; Shin, M. Functional properties of different Korean sweet potato varieties. *Food Sci. Biotechnol* **2011**, *20*, 1501–1507.

15. Hundiware, J. C.; Patil, A. V.; Kulkarni, M.; Patil, D. A.; Mali, R. G. A current update on phyto pharmacology of the genus *Alternanthera*. *Journal of Pharmacy Research* **2012**, *5*, 1924-1929.

16. Perotti, J. C.; Rodrigues, I. C. S.; Kleinowski, A. M.; Ribeiro, M. V.; Einhardt, A. M.; Peters, J. A.; Bacarin, M. A.; Braga, E. J. B. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. *Cienc. Rural* **2010**, *40*, 1874-1880

17. Kleinowski, A. M.; Rodrigues, I. C. S.; Ribeiro, M. V.; Einhardt, A. M.; Peters, J. A.; Braga, E. J. B. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. *Braz Arch Biol Technol* **2014**, *57*, 253-260.

18. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **1962**, *15*, 473-497.

19. Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricult. Experiment* **1938**, 347.
20. Wanderley, M. D.; Neves, E.; Andrade, C. J. Aspecto da produção industrial de enzimas. *Rev. Citino* **2011**, 1, 30-36.
21. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *J. Agric. Food Chem* **2007**, 55, 1546-1551.
22. Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phyto. Analysis* **2006**, 17, 262–269.
23. Santiago, L. B.; Alves, F. S. F.; Pinheiro, R. R.; dos Santos, V. W. S.; Rodrigues, A. S.; Chapaval, L.; de Brito, I. F.; de Sousa, F.G.C. Avaliação *in vitro* da sensibilidade da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento. *Arq. Inst. Biol* **2010**, 77, 593-600.
24. Reis, A. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Brasil 2013.
25. Strack, D.; Vogt, T.; Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **2003**, 62, 247–269.
26. Rodrigues-Brandão, I.; Kleinowski, A. M.; Einhardt, A. M.; Lima, M. C.; Amarante, L. D.; Peters, J. A.; Braga E. J. B. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyan in production from leaves of *Alternanthera tenella*. *Ciênc. Rural* **2014**, 44, 1893-1898.
27. Erich, G. The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. *Annu. Rev. Plant Biol* **2006**, 57, 761-780.

28. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; Fundamentos de Cromatografia, Ed. Unicamp: Campinas, **2006**.
29. Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem* **1998**, *46*, 2063-2070.
30. Li, H.; Deng, Z.; Liu, R.; Zhu, H.; Draves, J.; Marcone, M. F.; Sun, Y.; Tsao, R. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. *J. Food Compos. Anal* **2015**, *37*, 75–81.
31. Tang, Y.; Li, X.; Zhang, B.; Chen, P. X.; Liu, R.; Tsao, R. Characterization of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd genotypes. *Food Chem* **2015**, *166*, 380–388.
32. Stintzing, F. C.; Carle, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci Tech* **2004**, *15*, 19-38.
33. Boo, H. O.; Hwang, S. J.; Bae, C. S.; Park, S. H.; Heo, B. G.; Gorinstein, S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Ind. Crop Prod* **2012**, *40*, 129–135.
34. Stintzing, F. C.; Carle, R. Betalains e emerging prospects for food scientists. *Trends Food Sci Tech* **2007**, *18*, 514-525.
35. Silva, L. C.; Pegoraro, K. A.; Pereira, A. V.; Esmerino, L. A.; Cass, Q. B.; Barison, A.; Beltrame, F. L. Antimicrobial activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae): a biomonitored study. *Lat. Am. J. Pharm* **2011**, *30*, 147–153.
36. Virtuoso, S.; Davet, A.; Dias, J. F. G.; Cunico, M. M.; Miguel, M. D.; Oliveira, A. B.; Miguel, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas

de *Erythrina velutina* willd, fabaceae (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn* **2005**, 15, 137-142.

37. Avancini, C.; Wiest, J. M.; Agnol, R. D.; Haas, J. S.; Von Poser, G. L.; Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in Southern Brazil. *Lat. Am. J. Pharm* **2008**, 27, 894–899

38. Jalalpure, S, S.; Agrawal, N.; Patil, M. B.; Chimkode, R.; Tripathi, A. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternanthera sessilis* Linn. *Int J Green Pharm* **2008**, 2, 141-144.

39. Pereira, D. F.; Santos, M.; Pozzatti, P.; Alves, S. H.; Campos, M. M. A.; Athayde, M. L. Antimicrobial activity of a crude extract and fractions from *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze leaves. *Lat Am J Pharm* **2007**, 26, 893-896.

40. Kannan, M.; Chandran, R.; Prati, P.; Manju, S. Preliminary phytochemical and antibacterial studies on leaf extracts of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. *Int J Pharm Pharm Sci* **2014**, 6, 626-628.

41. Cechinel, F. V.; Yunes, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. *Quim. Nova* **1998**, 21, 99-105.

42. Coelho de Souza, G.; Haas, A. P. S.; Von Poser, G. L.; Schapoval, E. E. S.; Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol* **2004**, 90, 135-143.

43. Elita, Scio et al. Antimicrobial and antioxidant activities of some plant extracts. Phytochemicals as Nutraceuticals - *Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. (2012), doi: 10.5772/27308.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação de plantas do gênero *Alternanthera* como *A. brasiliana* e *A. tenella* pelo grupo do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da UFPel começou em 2006 com a chegada das primeiras plantas matrizes a esse laboratório. A partir disso foram desenvolvidos vários trabalhos envolvendo a desinfestação, estabelecimento *in vitro* e aclimatização destas plantas para que elas pudessem ser utilizadas como modelos biológicos para ensaios fisiológicos, bioquímicos e busca de metabólitos secundários.

A primeira identificação, com sucesso, de moléculas farmacologicamente ativas começou em 2010 a partir de técnicas espectrofotométricas onde foi constatada a presença de betacianinas nessas plantas e a partir disso outros trabalhos foram desenvolvidos com intuito de estimular a produção dessas moléculas tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. Para extrapolar o que já tinha sido feito em trabalhos anteriores foi necessário fazer um convênio com do Dr. Fernando Gandía-Herrero pesquisador do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular na Universidade de Murcia na Espanha que possuía os conhecimentos e os meios analíticos adequados, para aprofundar os estudos sobre o metabolismo secundário e metabólitos produzidos por esse, nessas espécies e melhor embasar o nosso conhecimento científico sobre elas.

No presente trabalho então, houve a evolução de métodos analíticos usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa e pela primeira vez foi traçado um perfil de pigmentos betalâmicos e confirmada a presença de betacianinas do tipo amarantina nessas espécies. Além disso, foi possível estudar o comportamento da amarantina, compostos flavonoidicos e da enzima fenilalanina amônia liase sobre a influência do metil jasmonato e confirmar que este hormônio em condições hidropônicas gera um estresse na planta que reage ativando o seu metabolismo secundário. Por fim, já com identificação e quantificação de um alto teor de amarantina nos extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliana* foi possível desenvolver uma técnica de cromatografia de troca iônica, inédita para espécie, para isolar este pigmento e testar a sua atividade antibacteriana. Outros testes poderão ser feitos a partir dessa amarantina isolada e futuramente esse pigmento poderá ser aproveitado

como um adjuvante na melhoria da qualidade de vida e saúde de seus consumidores.