



Instituto Federal de Brasília
Campus Gama
Licenciatura em Química

MAÍRA DE SOUSA FREIRE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DE
ALTERNANTHERA BRASILIANA (L) KUNTZE (AMARANTHACEAE)**

Brasília-DF
Julho/2023



Instituto Federal de Brasília
Campus Gama
Licenciatura em Química

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DE
ALTERNANTHERA BRASILIANA (L) KUNTZE (AMARANTHACEAE)**

Maíra de Sousa Freire

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alves da Silva

Brasília-DF
Julho/2023



**INSTITUTO
FEDERAL**
Brasília

Instituto Federal de Brasília
Campus Gama

MAÍRA DE SOUSA FREIRE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DE
ALTERNANTHERA BRASILIANA (L) KUNTZE (AMARANTHACEAE)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília, Campus Gama, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciatura em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alves da Silva

Brasília-DF
Julho/2023

FREIRE, MAIRA DE SOUSA .

Avaliação da atividade antimicrobiana e toxicidade de *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze. / MAIRA DE SOUSA FREIRE ; orientação Rodrigo Alves da Silva. — Gama, DF: 2023.

63 f. : 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) — Instituto Federal de Brasília, Campus Gama, Gama, DF, 2023.

Orientador(a): Rodrigo Alves da Silva.

1. *Alternanthera Brasiliana*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. *Artêmia salina*. 4. Toxicidade. 5. IFB. I. Silva, Rodrigo Alves da , orient. II. Instituto Federal de Brasília. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SISTEMA DE BIBLIOTECAS DO INSTITUTO FEDERAL DE BRASÍLIA

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Primordialmente minha mais pura gratidão está direcionada a Deus por manter-me sempre sã, forte e perseverante, mesmo diante dos momentos mais difíceis que encontrei nesta longa jornada em busca de um sonho, que em diversas ocasiões afigurou-se como algo tão semoto quanto inalcançável e quimérico.

Sou grata à minha família que sempre me dedicou amor, confiança, cuidados, educação, carinho, segurança, afeto, compreensão e tolerância. Ao meu querido pai Fernando Freire pelo seu exemplo de inteligência, o gosto pela leitura e pelo estudo, por sua dedicação e incentivo durante toda a minha vida. À minha amada mãe Dulcinete Pereira de Sousa lhe devo não somente o dom da vida, mas o reconhecimento por todo o esforço em proporcionar-me educação, amor, carinho e incentivos, mesmo diante de situações adversas e também por seu exemplo como mulher, mãe e professora. Ao meu adorado avô Antônio Alves, minha gratidão será eterna, pois sua presença, amor e exemplo de conduta sempre estarão comigo, até o fim de minha vida. Ao meu companheiro de vida e amor, Gladston D. Magalhães, por me encorajar mesmo diante de desafios e contratemplos que foram surgindo no decorrer da produção deste trabalho e também por me proporcionar amor, compreensão, afeto e alento nos dias mais exaustivos que enfrentei. Ao meu amado e inestimável Loki Freire, dedico uma infinda gratidão por todos os anos em que permaneceu ao meu lado como um fiel anjo da guarda, sem jamais me abandonar, demonstrando a cada ato contínuo seu amor incondicional e por todos os incontáveis momentos felizes que sua existência foi capaz de me proporcionar. A todos, meu mais profundo amor incondicional e gratidão.

Ao meu orientador o Dr. Rodrigo Alves, dedico muita admiração e agradecimento, por mostrar-se sempre solícito, profundamente compreensivo e generoso ao ofertar e compartilhar um pouco de seu vasto conhecimento acadêmico e experiência de vida, mas principalmente pelo seu acolhimento, crucial, no início desta empreitada, sem ele nada disso seria possível.

Ao meu querido professor, mentor e amigo o Dr. Elvis Böes, sou grata por suas importantes palavras de incentivo quando, em determinadas etapas do curso pensei em desistir, por ser o melhor professor que tive, por sua imensa generosidade em sempre compartilhar com os afoitos por conhecimento um pouco da bagagem de sua brilhante mente em formato de ensinamentos, conselhos e conversas, um ser fonte de inspiração para mim e para tantos outros.

Minha gratidão se estende ainda para a querida professora Dra. Luciene Pinheiro Lopes que demonstrou sua fé e confiança em minhas habilidades e que com dedicação e carinho sempre se dispôs a me ajudar e ao perspicaz professor Me. Rafael Machado de Sousa por sua indiscutível disponibilidade, orientação primorosa e constante luta pelos direitos do corpo discente do curso de Química.

Por fim, agradeço aos meus colegas, professores, em especial a professora Dra. Luciene Pinheiro, técnicos de laboratório, em especial à Elaine e aos demais profissionais do IFB que de alguma forma participaram e contribuíram diretamente para minha formação.

RESUMO

A espécie vegetal *Alternanthera brasiliana*(L) Kuntze, conhecida como Terramicina e Penicilina, é utilizada na medicina tradicional para tratar de diversas enfermidades, os relatos acerca de suas propriedades terapêuticas são inúmeros, destacam-se as propriedades anti-inflamatória, analgésica, antisséptica e antimicrobiana. Tais propriedades fomentam o crescente interesse da comunidade científica. A necessidade de novos antibióticos é o foco de inúmeras linhas de pesquisa das mais diversas áreas, entre elas a química de produtos naturais. A demanda específica por novos antibióticos surge ante a necessidade de combater bactérias que já não respondem como esperado aos tratamentos com os fármacos tradicionais. O uso indiscriminado desse tipo de medicamento, seja pela automedicação ou pela sua incorreta prescrição por parte dos profissionais de saúde, propicia o ambiente ideal para que surjam os chamados mecanismos de resistência bacteriana, um problema sério de saúde pública, que coloca em risco o bem estar e a vida de milhões de pessoas. A pesquisa que originou este trabalho teve como objetivo produzir extratos metanólicos de *Alternanthera brasiliana*, avaliar a suposta atividade antimicrobiana e o nível de toxicidade desses extratos frente à *Artêmia salina*. Para avaliar a atividade antimicrobiana realizou-se um estudo *in vitro* visando testar a capacidade inibitória dos extratos vegetais em duas diferentes concentrações frente às cepas das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A metodologia utilizada para avaliar a toxicidade dos extratos foi a realização do cálculo da sua DL₅₀ após o contato destes com o microcrustáceo marinho, *Artêmia salina*. No que se refere à atividade antimicrobiana, o extrato metanólico de *Alternanthera brasiliana* não demonstrou qualquer nível dessa atividade frente às cepas testadas, nas condições experimentais adotadas. Quanto à toxicidade, sua DL₅₀ foi calculada em 1,8% (m/m), deste modo podemos concluir que à medida que a concentração do extrato aumenta sua gradiente de toxicidade também se eleva. Estes resultados confirmam a necessidade em realizar mais estudos sobre a suposta atividade antimicrobiana da espécie, para se confirmar ou refutar sua eficiência no combate aos agentes patológicos que foram testados nesta pesquisa. No âmbito educacional a seguinte pesquisa trouxe inúmeras possibilidades para serem exploradas dentro de sala aula, como os procedimentos para a fabricação de extratos, a importância da pesquisa científica para a sociedade, a interdisciplinaridade entre as diversas áreas de conhecimento humano, como a biologia, microbiologia, bioquímica, farmacologia,

medicina e ecologia. Esta contextualização proporciona ao estudante uma visão mais ampla da química e como esta está intimamente ligada a diversos setores da nossa sociedade e ao seu cotidiano.

Palavras-chave: *Alternanthera Brasiliiana*; Atividade antimicrobiana; *Artêmia salina*; Toxicidade; IFB.

ABSTRACT

The plant species *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze, known as Terramycin and Penicillin, is used in traditional medicine to treat various diseases, the reports about its therapeutic properties are numerous, highlighting the anti-inflammatory, analgesic, antiseptic and antimicrobial. These properties foment the growing interest of the scientific community. The need for new antibiotics is the focus of numerous lines of research in the most diverse areas, including the chemistry of natural products. The specific demand for new antibiotics arises from the need to combat bacteria that no longer respond as expected to treatment with traditional drugs. The indiscriminate use of this type of medicine, either through self-medication or incorrect prescription by health professionals, provides the ideal environment for the emergence of so-called bacterial resistance mechanisms, a serious public health problem that jeopardizes the well-being of the population and puts millions of lives at risk. The research that led to this work aimed to produce methanolic extracts of *Alternanthera brasiliana*, evaluate the supposed antimicrobial activity and the level of toxicity of these extracts against *Artemia salina*. To evaluate the antimicrobial activity, an *in vitro* study was carried out to test the inhibitory capacity of the plant extracts in two different concentrations against the bacterial strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The methodology used to evaluate the toxicity of the extracts was to calculate their LD₅₀ after their contact with the marine microcrustacean, *Artemia salina*. Regarding antimicrobial activity, the methanolic extract of *Alternanthera brasiliana* did not demonstrate any level of this activity against the strains tested, under the experimental conditions adopted. As for toxicity, its LD₅₀ was calculated at 1.8% (m/m), so we can conclude that as the concentration of the extract increases, its toxicity gradient also increases. These results confirm the need to carry out further studies into the supposed antimicrobial activity of the species, in order to confirm or refute its efficiency in combating the pathological agents that were tested in this research. In the educational sphere, the following research has brought countless possibilities to be explored in the classroom, such as the procedures for making extracts, the importance of scientific research for society, the interdisciplinarity between the various areas of human knowledge, such as biology, microbiology, biochemistry, pharmacology, medicine and ecology. This contextualization provides the student with a broader view of chemistry and how it is closely linked to different sectors of our society and their daily lives.

Keywords: *Alternanthera brasiliana*; *Artemia salina*; Antimicrobial activity; Toxicity; IFB.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Artêmia salina</i> Leach vista em Microscópio.	24
Figura 2 - Fluxograma das etapas dos procedimentos experimentais para a obtenção do extrato e dos resultados dos testes.	30
Figura 3 - Parte do material vegetal coletado em Goiânia-GO	31
Figura 4 - Material vegetal após a coleta e separação das folhas para a secagem.	31
Figura 5 - (A) Material vegetal pulverizado. (B) Material vegetal pulverizado sendo transferido para o frasco de vidro âmbar antes da adição do solvente Álcool Metílico.	32
Figura 6 - Extrato submetido ao evaporador rotativo sob baixa pressão para eliminação do metanol.	32
Figura 7 - (A) Ovos de <i>A. salina</i> durante o processo de eclosão. (B) Náuplios de <i>A. salina</i> após a eclosão dos ovos.	33
Figura 8 - Soluções de extrato de <i>A. brasiliiana</i> em quatro diferentes concentrações e a solução controle.	34
Figura 9 - (A) Materiais utilizados para a coleta dos náuplios: vidro de relógio, tubo capilar e microplaca de PCR de 96 poços. (B) Tubo capilar contendo 5 náuplios de artêmias.	34
Figura 10 - Microplaca de PCR de 96 poços preenchida com as soluções de extrato de <i>A. brasiliiana</i> e com os náuplios de <i>A. salina</i>	35
Figura 11 - (A) materiais para o ensaio biológico dentro da autoclave.(B) Autoclave fechada e em processo de esterilização dos materiais.	37
Figura 12 - (A) Procedimento de raspagem do cultivo puro de bactérias. (B) Procedimento de inoculação das bactérias.	38
Figura 13 - Comparação do inóculo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com a suspensão de McFarland.	38
Figura 14 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de <i>A. brasiliiana</i> e a mortalidade dos náuplios.	44
Figura 15 - Resultados dos testes de Friedman para cada uma das microplacas.	44
Figura 16 - Comparação entre as médias de mortalidade dos náuplios nas duas microplacas.	45
Figura 17 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de <i>A. brasiliiana</i> e a mortalidade dos náuplios nas duas microplacas.	45
Figura 18 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de <i>A. brasiliiana</i> e a mortalidade dos náuplios apresenta na microplaca A.	46
Figura 19 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de <i>A. brasiliiana</i> e a mortalidade dos náuplios apresenta na microplaca B.	46
Figura 20 – Placas de petri do antimicrobiano após 16h de incubação em estufa bacteriológica.	48
Figura 21 – Placas de petri com os inóculos da bactéria <i>S. aureus</i>	49
Figura 22 - Placas de petri com os inóculos da bactéria <i>P. aeruginosa</i>	49
Figura 23 - Medição do halo de inibição da Penicilina em uma placa com o inóculo do <i>S.Aureus</i>	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Materiais e reagente utilizados na primeira etapa do antimicrobiano.	36
Tabela 2 – Contagem dos náuplios da microplaca A.	41
Tabela 3 - Contagem dos náuplios da microplaca B.	41
Tabela 4 - Teste de Friedman	42
Tabela 5 - Tabela de comparações Múltiplas (Durbin-Conover) das duas placas de PCR.	42
Tabela 6 - Tabela de comparação das médias de mortalidade das 10 repetições nas duas bateladas de teste.	43
Tabela 7 - Medidas das circunferências dos halos de inibição do antibiótico Geantamicina nas placas contendo as bactérias <i>P. aeruginosa</i>	50
Tabela 8 - Medidas das circunferências dos halos de inibição do antibiótico Penicilina nas placas contendo a bactéria <i>S. aureus</i>	50
Quadro 1 - Componentes do antibiograma com a bactéria <i>P. aeruginosa</i>	39
Quadro 2 - Componentes do antibiograma com a bactéria <i>S. aureus</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>A.BRASILIANA</i>	<i>Alternanthera brasiliana</i>
<i>A. SALINA</i>	<i>Artêmia salina</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
MHA	Ágar de Mueller Hinton
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCN'S	Parâmetros curriculares nacionais.
PCNEM	Parâmetros Curriculares Nacionais do Ensino Médio
<i>P.AERUGINOSA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S.AUREUS</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. ALTERNANTHERA BRASILIANA	16
1.1.1. Família, gênero e espécie.....	16
1.2. PESQUISAS COM ERVAS MEDICINAIS.....	18
1.2.1.1. Bactérias causadoras de doenças infecciosas: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>.	21
1.2.2. Mecanismo de resistência bacteriana e a necessidade de novos antibióticos.....	22
1.3. ALTERNANTHERA BRASILIANA E SUAS ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA, ANALGÉSICA E ANTIMICROBIANA.....	23
1.5. O ENSINO DE QUÍMICA E AS ATIVIDADES DE PESQUISAS E EXPERIMENTAÇÃO COMO FERRAMENTAS PEDAGÓGICAS PARA UMA APRENDIZAGEM SIGNIFICATIVA.	25
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	30
3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE ALTERNANTHERA BRASILIANA	31
3.3. TESTE DE TOXICIDADE COM <i>ARTÊMIA SALINA</i> LEACH.....	33
3.4. ENSAIO BIOLÓGICO: ANTIMICROBIANO	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE COM <i>ARTÊMIA SALINA</i>	41
4.2. RESULTADOS DO ENSAIO BIOLÓGICO ANTIMICROBIANO	48
4.3. OS RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE PESQUISA EXPERIMENTAIS COMO FERRAMENTA PEDAGÓGICA DENTRO DO CONTEXTO EDUCACIONAL.	52
5. CONCLUSÃO.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. ALTERNANTHERA BRASILIANA

O Brasil é detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo, liderando o ranking internacional, seja no reino animal quanto no vegetal. Essa característica favorece a existência de inúmeras formulações terapêuticas derivadas das espécies vegetais encontradas aqui. Existem aproximadamente 500 mil espécies vegetais em todo o planeta, sendo 55mil dessas espécies no Brasil. Todavia, embora a flora brasileira seja vasta e muito diversificada existem estimativas que mostram que não mais que 15% dessas espécies vegetais foram devidamente analisadas para fins medicinais. (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2010). Estima-se que ao menos uma parcela significativa das espécies vegetais brasileiras possa dispor de algum tipo de propriedade terapêutica sendo, portanto, valiosas se revertidas em formulações que possam atender as demandas da população em busca de cura ou alívio de problemas de saúde. (MARTINS et al, 1994). Dentre as plantas medicinais com interesse científico podemos salientar a Terramicina, como é popularmente conhecida a *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze.

A *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze é uma planta medicinal popularmente conhecida como Terramicina, Penicilina, Perpétua do mato, Perpétua do Brasil, Doril, dentre outras denominações. Ela é largamente utilizada na medicina popular brasileira por aqueles que buscam seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, antivirais e antibacterianos. (DELAPORTE et al, 2005; ARAÚJO;ONOFRE, 2011). No Brasil a espécie ocorre em diversas regiões do país e sua versatilidade proporciona seu desenvolvimento em solos tipicamente encharcados ou drenados, o que facilita sua proliferação inter-regional abundante (TRACZ; CRUZ-SILVA; LUZ, 2014).

1.1.1. Família, gênero e espécie.

A *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze, pertence à família Amaranthaceae e ao gênero Alternanthera. É uma espécie que se desenvolve em todas as regiões do Brasil, sendo muito comum nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, porém sua incidência também se dá no Centro-Oeste e Norte (DELAPORTE et al, 2002).

A família denominada Amaranthaceae, pertence a um gigantesco grupo denominado de Angiosperma. O nome angiosperma origina-se da língua grega e chama

atenção para a presença de frutos envolvendo as sementes (FORZZA et al., 2010). As plantas pertencentes à família Amaranthaceae englobam aproximadamente 174 gêneros e compreendem cerca de 2.000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). Uma das características marcantes da família Amaranthaceae é que são de origem e ocorrência tropical e subtropical (MARCHIORETTO et al, 2008). São plantas que ocorrem em praticamente todo o planeta, sendo somente as regiões mais gélidas do Hemisfério Norte uma exceção, elas são encontradas com facilidade nos continentes Americanos e Africano (VASCONCELLOS, 1982; SIQUEIRA, 2004).

De acordo com Siqueira (2002) e Souza; Lorenzi (2005), os exemplares pertencentes a esta família podem se exteriorizar como ervas, arbustos, ou trepadeiras e podem ser encontrados em variados tipos de ambientes como cerrados, florestas, campos rupestres, terrenos baldios, plantações particulares e campos de cultivo, sendo que alguns exemplares são facilmente encontrados em ambientes predominantemente abertos, enquanto que algumas espécies costumam ser encontradas apenas em matas fechadas ou densas florestas. Durante a década de 1990, Siqueira (1994/1995), produziu estudos de grande relevância sobre a família Amaranthaceae no Brasil e a sua fitogeografia. A fitogeografia é o estudo da distribuição geográfica de uma determinada flora, os fatores biológicos e históricos que a corroboram e permitem uma melhor interpretação dos padrões de distribuição geográfica das espécies (SIQUEIRA, 2005).

O gênero *Alternanthera*, ao qual pertence à espécie, tem incidência global e com uso popular na medicina tradicional de diversos países, onde costumam ser encontrados com certa facilidade, seus usos medicinais são profusos e incluem o tratamento de infecções causadas por vírus, distúrbios hepáticos, renais e gástricos, distúrbios do aparelho respiratório (asma, bronquite, etc.), uso como anti-inflamatório, antimicrobiano e analgésico (SOUZA et al, 1998). Em um estudo sobre a morfologia das folhas da *Alternanthera brasiliana*, Pereira et al (2008), destacam algumas características das espécies do gênero *Alternanthera*, como a sua ocorrência preferencialmente na forma herbáceas, suas folhas antagônicas, flores andróginas e inflorescências em espigas.

No que se refere à espécie, são contabilizadas mais de 100 espécies nativas brasileiras, sendo que algumas delas são popularmente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades. As espécies nativas podem ser encontradas em ambientes abertos, ou como ocorre em alguns casos, apenas no interior

de nossas florestas e matas. (SOUZA; LORENZI, 2005). Uma das características predominantes na *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze, são a sua origem herbácea perene e suas folhas de cor vermelho-arroxeadas (TRACZ; CRUZ-SILVA, LUZ, 2014).

1.2. PESQUISAS COM ERVAS MEDICINAIS.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pode-se entender que uma planta ou erva medicinal é aquela considerada apta para ser utilizada para aliviar, tratar ou curar determinada doença, sendo tradicionalmente manuseada e aplicada pela população como remédio (ANVISA, 2022).

O uso de ervas medicinais, para o tratamento de diversas enfermidades e na busca por amenizar sintomas e efeitos colaterais, tem sido uma realidade na medicina tradicional por séculos em inúmeros países ao redor do mundo. Por conseguinte, a busca pelo conhecimento científico a cerca dessas ervas medicinais, seus níveis de toxicidade, seus constituintes químicos e seus efeitos comprovados importantes para a comunidade científica e para a sociedade, pois, podem se tornar base para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos novos e com maior eficácia (NEWMAN et al, 2003)

Na última década a comunidade científica e a indústria farmacêutica ampliaram o número de pesquisas realizadas com espécies vegetais e o aumento do interesse se dá devido ao crescente uso destes para o tratamento de doenças sob a forma de medicamentos fitoterápicos. O interesse nas pesquisas com espécies vegetais também é focado na composição química dos exemplares (LOPES et al, 2002).

Embora os estudos com produtos naturais sejam importantes durante a década de 1990, a indústria farmacêutica infelizmente apresentou um significativo declínio em pesquisas com este foco, isso ocorreu mesmo que os dados mostrassem que entre os anos de 1981 e 2002 foram utilizadas por empresas novas entidades químicas de pequenas moléculas para a produção de produtos naturais ou compostos sintéticos e semissintéticos, fundamentados em compostos químicos derivados de plantas e animais (KOEN; CARTER, 2005). De acordo com Koen; Carter (2005), esse declínio nas pesquisas com foco em produtos naturais pode ter ocorrido devido a uma série de fatores, como por exemplo, as novas abordagens com ênfase na triagem de alto rendimento contra alvos moleculares bem delimitados, o que fez com que a indústria investisse preferencialmente em bibliotecas químicas sintéticas no lugar das bibliotecas de extratos de produtos naturais. Outro fator apontado pelos autores foi à evolução da

área da química combinatória, o que tornou mais simples o processo de triagem e possibilitou uma biblioteca de triagem com uma maior diversidade química. E não menos importante, temos os avanços nos campos da biologia celular, do genoma humano e da biologia molecular, levando a um significativo aumento de novos alvos moleculares, além de simplificar e encurtar os cronogramas para a descoberta de novos medicamentos, gerando uma apreciável economia de custos.

Em um estudo realizado por Calixto (2005) para analisar as pesquisas realizadas com plantas medicinais nos últimos 25 anos na América Latina, foram feitos avanços significativos no que se refere às produções científicas relacionadas com o estudo dessas ervas medicinais, nos últimos anos houve um crescente empenho nas discussões acadêmicas e científicas sobre a produção de novos medicamentos fitoterápicos com maior controle de qualidade, segurança e garantias de eficiência. A indústria farmacêutica voltou a investir na produção de medicamentos naturais para o tratamento de determinadas doenças, algumas com nível de complexidade alto. Isso ocorre porque muitos produtos naturais tem demonstrado serem fontes valiosas para o estudo e produção de novas estruturas químicas, devido a estes possuírem compostos e estruturas químicas que foram se aperfeiçoando no decorrer de milhões de anos através de seus mecanismos evolutivos próprios. Conforme os estudos de Koen; Carter (2005), existe também uma nova onda de interesse na pesquisa com produtos naturais, essa renovação de interesse se dá principalmente por conta da indústria enxergar nessa matéria prima, uma importante fonte de diversidade química para produção de novos fitoterápicos mais eficientes.

De acordo com Patrício et al (2022), através de estudos sobre o uso de ervas medicinais é possível enriquecer o cuidado na atenção primária à saúde e prestigiar a cultura popular, principalmente no que se refere ao uso de medicamentos fitoterápicos, o que valoriza o autocuidado da população.

Em um estudo realizado por Yunes (2001), cerca de 65% a 80% da população mundial faz uso de ervas medicinais para fins terapêuticos, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Estes dados nos mostram a real dimensão que as plantas medicinais alcançam, sendo uma alternativa para aqueles que não possuem acesso aos medicamentos comerciais ou para aqueles que buscam um tratamento alternativo, seja concomitantemente com o que é prescrito pelo médico ou como escolha própria. A parcela da população que mais se destaca no uso de ervas medicinais, são mulheres idosas e de baixa renda, isso no Brasil e em alguns outros países, sendo que o perigo no

uso dessa alternativa está muitas vezes na falha ao identificar corretamente essas espécies, na sua origem, no preparo e nas doses utilizadas (PATRÍCIO et al, 2022).

Sabendo que parte da população utiliza-se de plantas medicinais e produtos naturais como o único recurso disponível para o tratamento de diversas enfermidades, estudos na área para prover o devido conhecimento científico acerca das espécies, as diferentes posologias utilizadas e até mesmo o possível uso industrial em forma de fitoterápicos, é essencial, tendo em vista também que, por ser uma alternativa mais viável financeiramente ela é acessível a um número maior de pessoas (PATRÍCIO et al, 2022). Reconhecendo a importância das plantas medicinais em 1978, a OMS, passou a legitimar a utilização dessas ervas medicinais e dos fitoterápicos como ferramentas importantes no tratamento de doenças e corroborou a existência de possíveis propriedades curativas, profiláticas e até mesmo paliativas dessas espécies vegetais (IBIAPINA et al, 2014).

1.2.1. Infecções bacterianas.

As últimas décadas foram muito importantes para o desenvolvimento de fármacos eficientes para o tratamento de diversas infecções bacterianas, dando novas perspectivas para a medicina e para a indústria farmacêutica e ocasionando uma redução extremamente significativa nas taxas de mortalidade relacionadas a doenças microbianas (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Uma infecção pode ocorrer devida a ação de diferentes tipos de microrganismos, como vírus, fungos e bactérias. Embora, exista uma infinidade de microrganismos causadores de infecções um grupo se destaca, as bactérias, em especial aquelas que compõem a flora humana, que em situações normais não costumam representar um risco real para pessoas saudáveis, todavia quando um indivíduo se encontra com o sistema imunológico comprometido elas representam um perigo real, por isso são denominadas bactérias oportunistas (BRASIL, 2004).

Existem alguns fatores que facilitam a aquisição de uma infecção em um indivíduo, como: o status imunológico vulnerável, a faixa etária do indivíduo, sendo que os idosos e recém-nascidos estão mais propensos, procedimentos médicos invasivos, imunossupressão, procedimentos de controle de infecções falhos e o uso incorreto e abusivo de antibióticos (BRASIL, 2004).

1.2.1.1. Bactérias causadoras de doenças infecciosas: *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

A bactéria chamada de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) pertence ao grupo das bactérias gram-positivas, uma bactéria de formato esférico e comumente encontrada na microbiota da pele humana e também nas fossas nasais de indivíduos saudáveis. Contudo, ela pode provocar uma série de infecções que vão de um nível simples até mesmo infecções mais graves. A ela é atribuída desde o surgimento de espinhas e celulites até infecções mais preocupantes como a meningite, pneumonia, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia (SANTOS et al, 2007). De acordo com Ministério da Saúde (MS), o *S. aureus* é considerado um dos agentes etiológicos causadores de doenças, mais frequentes. Não é raro também que ocorra a intoxicação alimentar decorrente da intensa proliferação de um microrganismo patogênico em um determinado alimento, e um exemplo clássico é a intoxicação alimentar causada por *S. aureus* (BRASIL, 2006). O MS alerta para o perigo das doenças causadas por esta bactéria em alguns grupos da população, como crianças, idosos e indivíduos debilitados, que por possuírem o sistema imunológico mais suscetível às infecções podem sofrer consequências graves e até mesmo serem levados a óbito (BRASIL, 2006).

Na década de 1930 houve a implantação da terapia antimicrobiana, um avanço no tratamento de pacientes com infecções desta natureza, o que sinalizava um controle de algumas doenças infecciosas. Todavia, poucos anos depois da implementação da antimicrobianoterapia, foram descobertas as primeiras cepas de *S. aureus* com resistência aos antimicrobianos. A versatilidade e adaptabilidade desta cepa é tamanha que, até os dias de hoje a cada novo antibiótico utilizado no tratamento de enfermidades causadas por elas, novas cepas surgem com um novo mecanismo de resistência a estes novos antibióticos (SANTOS et al, 2007).

Entre os tipos de bactérias comumente encontradas no ambiente, temos as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, bactérias consideradas oportunistas e que com frequência são responsáveis por acometerem os seres humanos com graves infecções. A *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é uma espécie do gênero *Pseudomonas* e são apontadas como responsáveis por infecções com maior nível de severidade, como as que acometem o trato urinário, respiratório e a corrente sanguínea (PITTEN et al., 2001).

Em um estudo feito por Favero et al (1971), verificou-se que a *P. aeruginosa* possui uma excelente capacidade de adaptação, pois foi capaz de proliferar-se em água

com baixos níveis de compostos orgânicos e sólidos, não sendo necessário um ambiente com alto nível nutricional. O que mais preocupou sobre a capacidade de adaptar-se da *P. aeruginosa* é que ela foi apta para desenvolver-se em água destilada utilizada para diluição de medicamentos administrados por via intravenosa.

1.2.2. Mecanismo de resistência bacteriana e a necessidade de novos antibióticos.

As ciências médicas enfrentam um problema muito sério relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos, este fato contribui para criar o chamado mecanismo de resistência bacteriana, sendo o seu impacto ainda mais relevante quando se trata de infecções bacterianas em ambiente hospitalar (MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016). O recorrente uso de antibióticos de forma equivocada e indiscriminada tem gerado um significativo aumento da aquisição de mecanismos de resistência e mutação, e isto produz um impacto em todo o sistema de saúde, o que piora o prognóstico do tratamento de uma infecção hospitalar (SANTOS, 2004).

As bactérias desenvolvem essa chamada resistência bacteriana, ao entrarem em contato com antibióticos, é um mecanismo de defesa que as permite tolerar o tratamento a bases desses remédios e aos agentes antibacterianos presentes neles, as convertendo em resistentes. Ressalta-se que esta resistência é transferida geneticamente para as cepas futuras de uma maneira muito rápida. Os principais fatores que contribuem para a existência do mecanismo de resistência bacteriana é o uso de antibióticos de forma leviana, sem prescrição médica adequada e ainda o uso em ambientes hospitalares sem uma prévia análise de eficácia e sem a utilização correta dos antibiogramas (SANTOS, 2004). O fenômeno da resistência bacteriana a um grande número de antibióticos existentes no mercado representa uma ameaça factual para a saúde pública e limita seriamente o tratamento das infecções bacterianas (MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016).

Os estudos acerca de novos antimicrobianos provindos de ervas medicinais se dão principalmente devido a resistência crescente das bactérias aos antibióticos comerciais já existentes, o que dificulta e muito a o tratamento de diversas infecções, este é um problema de saúde pública que precisa ser sanado (YUNES, 2001).

1.3. ALTERNANTHERA BRASILIANA E SUAS ATIVIDADES

ANTIINFLAMATÓRIA, ANALGÉSICA E ANTIMICROBIANA.

De acordo com Lorenzi (2002), a espécie *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze, é indicado na medicinal tradicional no tratamento para diarreia, cistite, infecções de garganta, infecções do trato urinário, dentre outras. A infusão feita com as folhas da planta, o chá, tem efeito diurético, digestivo e depurativo, sendo utilizada tradicionalmente para o tratamento de enfermidades do trato urinário e do fígado. Existem estudos que demonstram o uso da *A. brasiliana* para tratar diversas enfermidades por meio de seus efeitos analgésicos (DE SOUZA et al. 1998; MACEDO et al, 1999), efeito anti-inflamatório (DELAPORTE et al, 2001), a atividade antiedematogênica (DELAPORTE et al, 2001) e a atividade antimicrobiana (CAETANO et al, 2002; PEREIRA et al, 2007; COUTINHO et al, 2018). A espécie foi analisada morfo-anatomicamente por Delaporte et al,(2002) e teve sua composição química explorada por Macedo et al,(1999), isso facilitou a identificação correta da planta para estudos futuros e também a identificação de seus componentes químicos.

1.4. TESTE DE TOXICIDADE COM *ARTÊMIA SALINA* LEACH

A *Artêmia salina* Leach pertence ao filo Arthropoda, classe Crustácea, subclasse Branquiopoda, sendo, portanto, uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, pertencente à família Artemidae e o Gênero Artemia (PIZZOLOTTO, 2010). Esse microcrustáceo tem como seu ambiente originário a água salgada e tem a capacidade de produzir o que chamamos de náuplios após a eclosão de seus ovos. Resumidamente o seu ciclo de vida se caracteriza da seguinte maneira: cistos (ovos), náuplios (após a eclosão), artêmia jovem e artêmia adulta. O período de vida deste microcrustáceo pode atingir até um ano e a sua utilização como alimento vivo para a criação de peixes se destaca, pois, é uma ótima fonte proteica em qualquer fase de seu ciclo de vida (NASCIMENTO et al, 2008).

O uso experimental da *A. salina* ocorre por uma série de fatores, entre eles, a facilidade de acesso a elas, uma vez que os cistos podem ser adquiridos em lojas especializadas em criação de peixes e aquarismo, sendo o preço também considerado acessível. Outro ponto importante é que o procedimento para obter os náuplios é considerado incompleto, pois os cistos precisam apenas ser colocados em água salgada, com o pH controlado, uma simples oxigenação, iluminação artificial e em cerca de 48h

haverá uma quantidade significativa de náuplios para ser utilizada (MCLAUGHLIN;ROGERS, 1998; NASCIMENTO et al, 2008).

Sabe-se que a *A. salina* possui outra notável característica que a torna extremamente viável para utilização tanto em experimentos científicos como para fonte de alimento para peixes, seus cistos são como embriões que estão encapsulados e sem atividade metabólica, podendo perdurar neste estado por um longo tempo, se mantidos em um ambiente livre de umidade. Somente ao serem hidratados os cistos eclodirão e retomam o processo natural de desenvolvimento (GOMES, 1986).

De acordo com Igarashi (2008), a *A. salina* possui uma variação de tamanhos de acordo com o seu ciclo de vida, na forma de cistos elas possuem um diâmetro médio de 250 μm , como náuplios possuem em média 450 μm de comprimento e no que se refere a uma *A. salina* em fase adulta, por possuir um corpo mais alongado elas apresentam cerca de 10 mm de comprimento. Na figura 1 é possível por meio de um microscópio visualizar a estrutura de uma *A. salina* em fase adulta.

Figura 1 - *Artêmia salina* Leach vista em Microscópio.



Fonte: Pizzolotto (2010).

De acordo com Rahman; Choudhary; Thomson (2001), é comum que os compostos orgânicos bioativos apresentem certo nível de toxicidade para os náuplios de *A. salina*, portanto a sensibilidade desta espécie e consequentemente a mortalidade apresentada por ela podem ser utilizadas como ferramentas para avaliação da toxicidade de extratos vegetais.

A principal metodologia utilizada nos testes de sensibilidade e toxicidade com *A. salina* é a que foi proposta por Meyer no ano de 1982, sendo uma das metodologias mais citadas e adaptadas atualmente.

No trabalho de Meyer et al (1982), é demonstrada e discutida uma forte correlação entre o que chamam de Dose Letal Média (DL_{50}) e o nível de toxicidade

apresentada em extratos vegetais quando estes entram em contato com os naúplios de *A. salina* .

1.5. O ENSINO DE QUÍMICA E AS ATIVIDADES DE PESQUISAS E EXPERIMENTAÇÃO COMO FERRAMENTAS PEDAGÓGICAS PARA UMA APRENDIZAGEM SIGNIFICATIVA.

O currículo escolar teve a disciplina Química incluída para ser uma ferramenta utilizada para construir o conhecimento científico dos estudantes e assim viabilizar o entendimento dos fenômenos naturais, científicos e tecnológicos que fazem parte do cotidiano desses jovens (BRASIL, 2002). Ainda de acordo com os Parâmetros Curriculares Nacionais do Ensino Médio (PCNEM), o ensino de Química no ensino médio deve ser pautado em oferecer aos estudantes os meios necessários para que possam compreender os processos químicos envolvidos nos fenômenos naturais, para a construção do conhecimento científico e para o estreitamento desse tipo de conhecimento com as novas tecnologias e também suas consequências ambientais, econômicas, políticas e sociais.

No que diz respeito ao ensino de Química na educação básica ainda existem métodos engessados e totalmente voltados para as práticas tradicionais, onde o estudante é um mero ouvinte e o papel do professor é basear suas aulas em explicações repletas de cálculos e fórmulas químicas (CHASSOT, 2004; GUIMARÃES, 2009).

De acordo com Guimarães (2009), a disciplina Química está fortemente entrelaçada com o ensino tradicional e para ele existem inúmeras críticas, em especial à forma como o estudante é reiteradamente tratado, um ouvinte passivo que está presente apenas para receber as informações trazidas pelo professor. Tal visão de ensino limita o desenvolvimento do estudante, uma vez que ele tão-só deve absorver os dados trazidos pelo docente, sem construir o seu próprio senso crítico. Outro fator que pode dificultar o ensino de Química, é a ausência de contextualização dos conceitos passados em sala de aula com o cotidiano do estudante e principalmente com o seu conhecimento prévio. A não existência dessas conexões pode ser um fator crucial para o fracasso na busca por uma aprendizagem significativa.

Partindo da mesma ideia de correlação entre a realidade do estudante e os conteúdos lecionados em sala de aula pelo docente, Libâneo (1998), é categórico ao dizer que a escola deve saber articular, receber, interpretar e produzir o conhecimento sempre com o foco no aluno como um indivíduo responsável pelo seu próprio saber.

Portanto, o PCNEM é claro quando diz que no contexto educacional atual é crucial que o docente saiba dominar os métodos educacionais para poder trazer aos estudantes novas possibilidades que os permitam aprimorar, criar e exercitar suas competências e habilidades criativas, críticas e investigativas e assim atingir uma aprendizagem significativa (BRASIL, 2002).

A Teoria da Aprendizagem Significativa foi proposta pelo teórico David Ausubel em meados de 1963 em sua obra intitulada *The Psychology of Meaningful Verbal Learning*, trata-se de uma teoria inerentemente cognitivista, com a preocupação genuína com o processo de compreensão, armazenamento, transformação e utilização das informações vinculadas no processo de cognição. É uma teoria que tem como foco principal identificar os já estruturados padrões da transformação das informações envolvidas na cognição humana. Nesta teoria a cognição possui uma estrutura que pode ser assimilada como um agrupamento de conteúdos, conceitos, pensamentos e ideias e como eles se organizam dentro da mente de um indivíduo (MOREIRA; MASINI, 2006). Na teoria de Ausubel existe um fator crucial para o aprendiz durante o processo de aprendizagem, que é o conhecimento prévio já adquirido por ele e a sua experiência de vida. Embora seja um fator isolado, é relevante, pois o indivíduo deve ter este saber aproveitado e o professor deve explorar esse conhecimento ensinando de acordo com ele (MOREIRA; OSTERMANN, 1999).

A teoria da aprendizagem significativa trouxe um novo horizonte pelo qual se pode ver a escola como um local onde é possível exercer o processo de ensino-aprendizagem de modo a compreender e atribuir significados a ele (MASINI, 2011). De acordo com Moreira (2009), o professor que busca utilizar a teoria de Ausubel deve nortear seu trabalho com o aprendiz (aluno), centrado no saber que este carrega e utilizar-se disto como ponto de partida para o que pode ser ensinado.

A Química muitas vezes é vista como uma disciplina difícil e fastidiosa pelos estudantes, mas nem sempre é deixado claro para eles que esta possui duas facetas: a experimental e a teórica. A atividade teórica na maior parte das vezes é a única que é apresentada aos estudantes, centralizada em explicar a estrutura da matéria, em níveis microscópicos. Já a faceta geralmente deixada de lado é a experimental, onde temos a manipulação e os processos de transformações de substâncias dentro dos laboratórios químicos (BUENO et al, 2008). Cada vez mais os especialistas em Química e em educação buscam desenvolver novos experimentos que possibilitem aos professores complementarem o ensino teórico com a utilização de aulas práticas, isso pode

favorecer o processo de ensino-aprendizagem de Química. Portanto, a realização de experimentos articulados aos conteúdos teóricos é defendida como sendo uma excelente ferramenta didática para oportunizar e enriquecer todo o processo de ensino-aprendizagem dos estudantes (PENAFORTE; SANTOS, 2014).

Conforme os Parâmetros Curriculares Nacionais(PCN's), a experimentação, as aulas práticas e as atividade de pesquisa são fundamentais e desejáveis já que elas podem promover aos estudantes uma visão daquilo que antes ficava apenas no campo teórico(BRASIL, 2002). Para Penaforte; Santos (2014), a notoriedade das aulas práticas, da experimentação e das atividades de pesquisa em sala de aula se dá principalmente pelo fato de que estas são capazes de despertar nos estudantes um forte interesse pelo conteúdo da disciplina, uma vez que esse tipo de abordagem pedagógica traz o embasamento teórico adaptado à realidade dos alunos e isto gera uma maior possibilidade de se alcançar uma aprendizagem significativa.

A Química é uma ciência com áreas de pesquisas muito amplas e entre as várias subáreas temos a química de produtos naturais, responsável pela análise e estudo de diversas substâncias originárias da natureza (LIMA et al, 2022). O panorama traçado a respeito da pesquisa química com produtos naturais no Brasil ainda é incompleto, todavia o século XXI foi um marco no que se refere ao avanço e a diversidade de pesquisas realizadas nessa área e em especial as novas fontes de biomoléculas. A Química de produtos naturais tem expandido o seu prisma, atualmente temos pesquisas muito importantes com enfoque em micro-organismos, em especial os fungos e há ainda estudos os organismos marinhos, embora esse crescimento seja mais lento devido à dificuldade encontrada na coleta e extração dos materiais desses biomas marinho, sem falar do alto custo envolvido. Contudo, é inegável que a química de produtos naturais ainda é predominantemente centrada em plantas (BERLINCK et al., 2017).

Para Lima et al. (2022), a Química de produtos naturais é uma subárea da Química que pode favorecer e possibilitar um aperfeiçoamento do ensino de química em conteúdos como as reações químicas em cadeia, o isolamento de substâncias químicas e os processos metabólicos e ainda a utilização de ervas medicinais para tratamento de enfermidades, sendo estas possibilidades de baixo custo para se trabalhar em sala de aula com os estudantes.

A química de produtos naturais ainda pode ser utilizada para se trabalhar a interdisciplinaridade como outras áreas de conhecimento como a biologia, microbiologia, bioquímica, farmacologia, medicina e ecologia. Tem-se dentro dessa

subárea uma infinidade de possibilidades e pode-se salientar ainda a sua correlação com a síntese orgânica e a química medicinal, onde moléculas bioativas são estudadas e se tornam fundamentais para o preparo de novas funcionalidades químicas bioativas. Uma boa parte dos produtos naturais é isolada em quantidades relativamente pequenas, o que faz com que a síntese deles seja essencial para uma melhor caracterização química, biológica e bioquímica. Desta forma é axiomático a relevância e o prestígio que a Química de produtos naturais possui, principalmente quando está aliada a outras áreas de conhecimento (BERLINCK et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial toxicológico e o potencial antimicrobiano *in vitro* de extratos metanólicos e das subfrações das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar os extratos metanólicos das folhas da *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze;

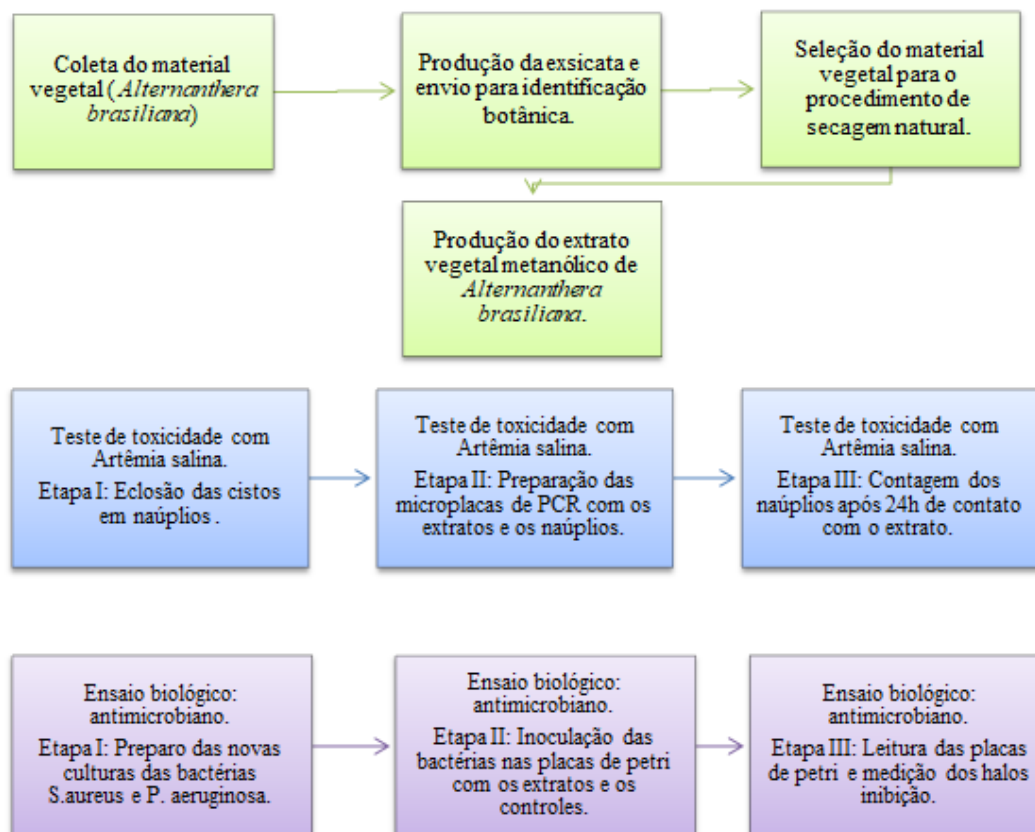
Avaliar a toxicidade por meio de *Artêmia salina* Leach do extrato das folhas de *A. brasiliana* (L) Kuntze e;

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze contra as cepas das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Na figura 2 se apresenta um fluxograma com as principais estratégias utilizadas para condução dos experimentos e obtenção final dos resultados.

Figura 2 - Fluxograma das etapas dos procedimentos experimentais para a obtenção do extrato e dos resultados dos testes.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas da planta *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze foram coletadas na cidade de Goiânia, capital do estado de Goiás. Depois de coletadas, as amostras foram levadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Brasília – *campus* Gama (IFB/Gama). Partes da planta (galho, folha e enfloração) foram enviadas como exsicatas para o herbário central da Universidade Federal de Goiás (UFG), para serem devidamente identificadas. A identificação confirmou a espécie *Alternanthera brasiliana* (L) Kuntze (Amarantheceae) e foi registrada como AM-UFG-235870-6. Na figura 3 podemos observar parte do material coletado.

Figura 3- Parte do material vegetal coletado em Goiânia-GO .



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Para a etapa de processamento do material vegetal, as folhas foram armazenadas em uma caixa de papelão no laboratório de Produtos Naturais para que ocorresse a secagem em temperatura ambiente durante o período de 15 dias, na figura 4 temos as folhas de *A. brasiliana* que foram selecionadas para a secagem.

Figura 4 - Material vegetal após a coleta e separação das folhas para a secagem.

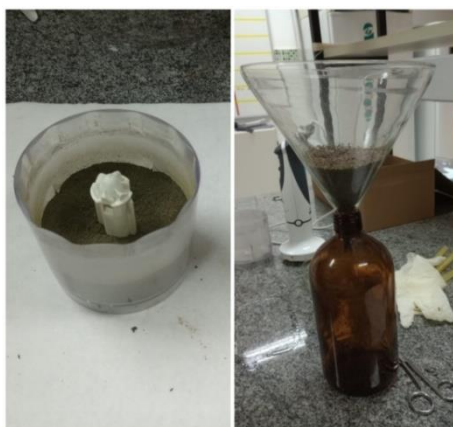


Fonte: Arquivo pessoal da autora.

3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE ALTERNANTHERA BRASILIANA

Para obter o extrato bruto da planta foi necessário utilizar o material vegetal seco e pulverizado (folhas), ao qual foi adicionado em metanol P.A e reservado por cinco dias em dois frascos de vidro âmbar de 1L. A quantidade de solvente está diretamente ligada à quantidade de material vegetal seco e pulverizado. Na figura 5 é possível visualizar as etapas de pulverização das folhas secas e a transferência do material já pulverizado para a adição do metanol.

Figura 5 - (A) Material vegetal pulverizado. (B) Material vegetal pulverizado sendo transferido para o frasco de vidro âmbar antes da adição do solvente Álcool Metílico.



(A)

(B)

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após os cinco dias de repouso para a obtenção do extrato bruto, a solução apresentou-se com um tom verde bandeira forte e com alta pigmentação. O material foi filtrado e submetido ao evaporador rotativo sob baixa pressão até que houvesse a total eliminação do Metanol. Na figura 6 é possível ver o processo de eliminação de parte do solvente durante a rotaevaporação.

Figura 6 - Extrato submetido ao evaporador rotativo sob baixa pressão para eliminação do metanol.



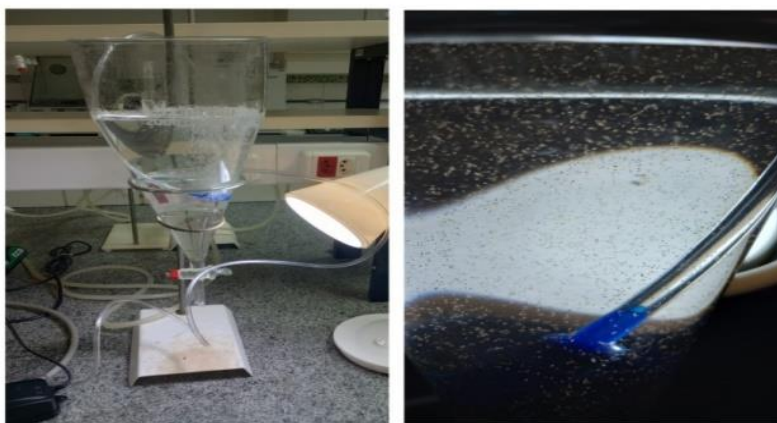
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

3.3. TESTE DE TOXICIDADE COM *ARTÊMIA SALINA* LEACH

O procedimento iniciou-se no preparo de uma solução com água acrescida de sal marinho em uma concentração de 32 g/L. Após o preparo da solução foi feita a medição de seu pH garantindo que este estivesse na faixa entre pH=8 ou pH=9, considerada ideal para o eclosão dos náuplios, para isso foi utilizado o bicarbonato de sódio como alcalinizante. Reservou-se 1 L desta solução para a eclosão dos ovos e a outra parte foi armazenada para ser utilizada no preparo e nas diluições das amostras que seriam analisadas.

Em seguida foram pesados aproximadamente 100 mg dos ovos de *A. salina* e estes foram colocados para eclodirem em um recipiente de vidro com 1L da solução salina durante 48h, onde ficaram, durante todo este tempo, recebendo a oxigenação necessária por meio de uma bomba submersa para aquário e a iluminação artificial com lâmpada de LED branca de 60 W através de uma luminária posicionada ao lado do recipiente transparente contendo os ovos. Após 48h houve a eclosão satisfatória dos ovos, pois a maior parte deles se tornaram náuplios. Na figura 7 é possível observar o esquema feito para possibilitar a eclosão dos ovos de *A. salina* e também os náuplios recém-eclodidos.

Figura 7- (A) Ovos de *A. salina* durante o processo de eclosão. (B) Náuplios de *A. salina* após a eclosão dos ovos.



(A)

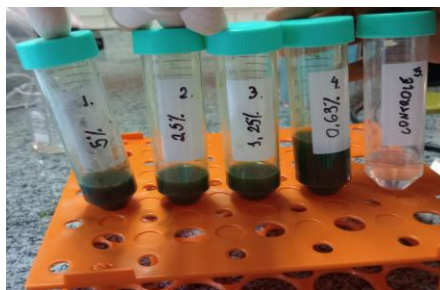
(B)

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após a eclosão dos ovos, iniciou-se o preparo das soluções para serem analisadas. Foram preparadas quatro novas soluções do extrato de *A. brasiliensis* através

do método de diluição para se alcançar as subseqüentes concentrações: 5%, 2,5%, 1,25% e 0,63% sendo a concentração percentual em (m/m). Depois as soluções foram transferidas para tubos tipo Falcon de 50 mL e em cada uma foram adicionados 0,5mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Já a solução usada para ser o controle representa uma concentração de 0% de extrato sendo, portanto, apenas uma amostra da solução salina preparada para a eclosão dos ovos acrescida de 0,5mL do reagente DMSO. Logo abaixo na figura 8, temos o registro das soluções de *A. brasiliiana* em diferentes concentrações (m/m) e do controle já preparadas.

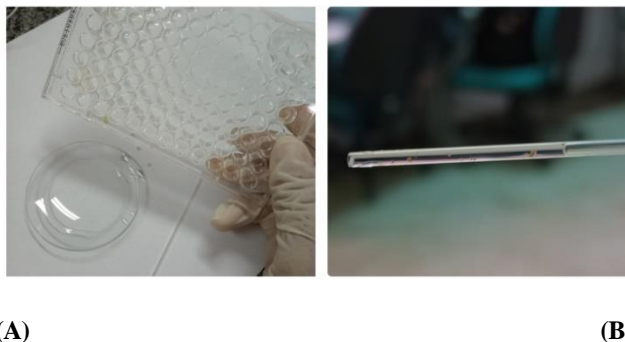
Figura 8 - Soluções de extrato de *A. brasiliiana* em quatro diferentes concentrações e a solução controle.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Então transferiu-se um pequeno volume da solução contendo os náuplios de *A. salina* para um Becker de 150 mL. Com o auxílio de tubos capilares, foi realizada a coleta de 10 náuplios de *A. salina* que logo depois foram transferidos para os poços selecionados de uma microplaca de PCR de 96 poços (placa de Elisa). A figura 9 tem o registro dos materiais utilizados nesta etapa do procedimento e do momento em que alguns náuplios estavam sendo transferidos para a placa de Elisa.

Figura 9 - (A) Materiais utilizados para a coleta dos náuplios: vidro de relógio, tubo capilar e microplaca de PCR de 96 poços. (B) Tubo capilar contendo 5 náuplios de artêmias.



(A)

(B)

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

O procedimento de transferência dos náuplios de *A. salina* ocorreu da seguinte forma, primeiro foram escolhidas cinco colunas de poços da micro placa de PCR, e em cada uma das colunas foram adicionados 10 náuplios em 5 poços de cada coluna. Logo após a inserção de todos os indivíduos, cada coluna recebeu a adição do extrato com uma concentração específica em cinco poços, a primeira coluna da esquerda para a direita teve os cinco poços preenchidos com o extrato em concentração de 5% (m/m), a segunda com o extrato em concentração de 2,5%(m/m), a terceira recebeu o extrato a 1,25%(m/m), e na quarta coluna adicionou-se o extrato a 0,63%(m/m). Já a solução controle foi adicionada na quinta e última coluna. Todos os cinco poços de todas as cinco colunas foram devidamente preenchidos com suas soluções correspondentes. Na figura 10 é possível observar o procedimento já concluído.

Figura 10 - Microplaca de PCR de 96 poços preenchida com as soluções de extrato de *A. brasiliense* e com os náuplios de *A. salina*.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Decorrido o período de incubação de 24 horas, os náuplios sobreviventes foram devidamente contados com o auxílio de estereoscópio Lyca®. Foi encontrada uma grande dificuldade para visualizar os náuplios sobreviventes devido à altíssima pigmentação verde do extrato vegetal, principalmente nas concentrações mais elevadas de 2,5% e 5%. Após a contagem dos náuplios, os dados puderam ser analisados e expressos como DL₅₀ (Dose letal média).

3.4. ENSAIO BIOLÓGICO: ANTIMICROBIANO

Os materiais utilizados durante o antimicrobiano constam na tabela 1.

Tabela 1 - Materiais e reagente utilizados na primeira etapa do antimicrobiano.

Água deionizada	Estante para tubos
Água peptonada	Alça para microbiologia
Ágar Mueller Hinton	Microtubos Eppendorf
Solução de DMSO 20%	Caixa de ponteiras
Ágar Mueller Hinton	Pinças
Placas de petri de vidro	Papeis filtro
Tubos com rosca (02 por bactéria)	Pérolas de vidro

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a preparação dos materiais, estes foram encaminhados para passarem pelo procedimento de esterilização na autoclave. Seguiu-se então para o preparo do meio de cultura Ágar Mueller Hinton (MHA), foi feita a pesagem de 11,4g do pó MHA em um vidro de relógio. Logo em seguida o pó foi transferido para um béquer de 500 mL, foi então a este foi adicionado 300 mL de água deionizada e colocado sob agitação em um agitador magnético em uma temperatura de 74°C. Seguiu-se para a verificação do seu pH, inicialmente em 6,7. Foi necessário ajusta-lo, tendo em vista que a faixa de pH ideal para o meio de cultura Ágar Mueller Hinton deve ser pH=7,2 - 7,4. No ajuste foi utilizado o Hidróxido de sódio(NaOH)1mol/L até se alcançar o pH= 7,3. Seguidamente o meio foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL e inserido na autoclave juntamente com os demais materiais. A figura 11 mostra o procedimento de esterilização dos materiais na autoclave.

Figura 11 - (A) materiais para o ensaio biológico dentro da autoclave.(B) Autoclave fechada e em processo de esterilização dos materiais.



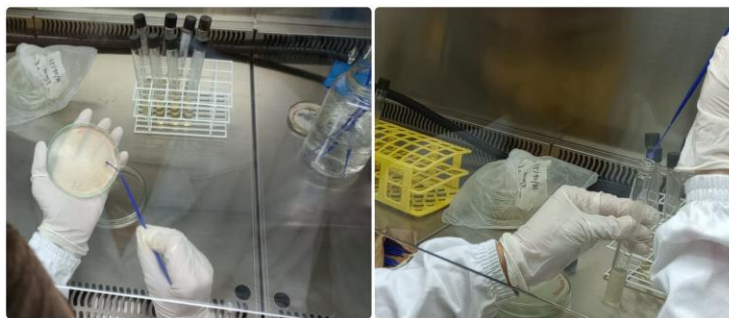
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após o processo de esterilização o MHA foi colocado na estufa para ser utilizado no dia seguinte.

O segundo dia começou com a esterilização da cabine de segurança biológica com etanol a 70% (C₂H₅O) e com a luz Ultravioleta (UV) durante 15 minutos. Seguiu-se então para o procedimento de preenchimento das placas de Petri, que já estavam devidamente esterilizadas. As placas foram colocadas na cabine para que o MHA fosse vertido, após isso enquanto ocorria o resfriamento a luz UV foi ligada por 5 minutos. Com as placas de petri prontas, estas foram levadas para a geladeira.

A etapa seguinte foi o preparo das colônias das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e a *Staphylococcus aureus*. Todos os equipamentos, as vidrarias, a água peptonada e o etanol foram colocados dentro da cabine de segurança biológica juntamente com as placas petri preparadas para serem submetidos à luz UV por 15 minutos. Iniciou-se o procedimento de coleta das bactérias, o preparo do inóculo a partir das colônias do cultivo puro por meio da raspagem das placas onde estavam cultivadas e armazenadas no laboratório. Raspou-se o material biológico do cultivo de bactérias com o auxílio de uma alça de microbiologia e transferiu-se o material para os tubos de ensaio com água peptonada. Esse procedimento repetiu-se individualmente para cada uma das duas bactérias, a primeira foi a *P. aeruginosa* e a segunda a *S. aureus*. Terminada a transferência das bactérias para os tubos de ensaio, estes foram parcialmente tampados, devidamente identificados e levados para a estufa a uma temperatura de 37°C onde permaneceram por 12 horas para que pudessem apresentar uma solução em suspensão com o nível de turvação moderado. O procedimento de preparação de novas colônias de bactérias está registrado na figura 12.

Figura 12 - (A) Procedimento de raspagem do cultivo puro de bactérias. (B) Procedimento de inoculação das bactérias.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Transcorridas aproximadamente 12 horas para o crescimento adequado das bactérias os tubos de ensaio foram retirados da estufa para que fosse feita a comparação com a suspensão de McFarland 0,5% (BaSO_4), para isso o meio líquido foi colocado sob forte agitação em um agitador Vortex. Não foi necessário adicionar a solução salina de 0,9% pois o meio líquido (inóculo) apresentou o nível de turbidez adequado quando comparado com a suspensão padrão de turbidez, McFarland, essa comparação é mostrada na figura 13.

Figura 13 - Comparação do inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* com a suspensão de McFarland.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Foi realizada a preparação dos extratos de *A. brasiliensis* a serem utilizados no antibiograma, primeiramente foi feita a diluição do extrato com água, em 4,5mL de água destilada foi adicionado 0,5 mL de extrato bruto, resultando em um extrato a 10% e seguidamente foi preparada outra amostra do extrato agora com concentração de 1%. Nos extratos foram utilizados a solução de DMSO a 20%.

Para a etapa de inoculação das bactérias no meio sólido foram utilizadas as duas amostras do extrato preparadas com o controle negativo (DMSO) e o controle positivo (antibiótico). No quadro 1 temos as informações de qual antibiótico padrão foi utilizado no antibiograma referente as placas preparadas com a bactéria *P. aeruginosa* e o quadro 2, por sua vez, mostra os componentes utilizados no antibiograma com a bactéria *S. aureus*.

Quadro 1 - Componentes do antibiograma com a bactéria *P. aeruginosa*.

Bactéria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Extrato à 1% de <i>Alternanthera brasiliana</i>	Extrato à 10% de <i>Alternanthera brasiliana</i>	Controle negativo: Dimetilsulfóxido (DMSO)	Controle positivo: Geantamicina (Antibiótico comercial)

Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 2 - Componentes do antibiograma com a bactéria *S. aureus*.

Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Extrato à 1% de <i>Alternanthera brasiliana</i>	Extrato à 10% de <i>Alternanthera brasiliana</i>	Controle negativo: Dimetilsulfóxido (DMSO)	Controle positivo: Penicilina (Antibiótico comercial)

Fonte: Elaborado pela autora.

Foi feita a esterilização da cabine de segurança biológica com etanol 70% e depois a esterilização padrão por luz Ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

Para a inoculação os tubos com as bactérias foram trazidos e posicionados na cabine juntamente com o resto do material, a primeira bactéria a ser utilizada foi a *P. aeruginosa* e depois todo o procedimento se repetiu com *S. aureus*. Em três placas de Petri com o ágar de Mueller Hinton utilizando-se de uma micropipeta foram colocados 200µL da solução com a bactéria, para ajudar na melhor homogeneização da superfície da placa foram utilizadas algumas unidades de pérolas de vidro, elas ajudaram a deixar a superfície mais homogênea. Logo depois com uma pinça foram adicionados os papeis filtros cortados em formas circulares, eles foram posicionados de modo que houvesse

espaço suficiente para ocorrer o halo de reação em cada um deles, foram colocados três papeis e reservado o espaço para o antibiótico (a ser inserido depois).

Após o devido posicionamento dos papeis filtro e com auxílio de micropipetas, em um círculo de papel de cada uma das placas foram colocados 10 μ L de DMSO (controle negativo), depois em outros filtros de papel, também de cada uma das placas, foram adicionados 10 μ L de extrato de *A. brasiliiana* a 1% e depois adicionados 10 μ L de extrato de *A. brasiliiana* a 10% nos papeis restantes de cada placa. Só então foi inserido o controle positivo, o antibiótico comercial. Ao final as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C pelo período recomendado de 16 – 18 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE COM ARTÊMIA SALINA

Após o período de 24h de contato dos náuplios de *A. salina* com os extratos de *A. brasiliensis* e com o controle, foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos e esse procedimento foi feito em cada um dos poços preenchidos das duas placas de Elisa. O parâmetro utilizado para considerar o náuplio vivo foi a sua movimentação, aqueles que continuavam se movimentando foram considerados com vida e aqueles com ausência de movimentos foram considerados mortos. A tabela 2 mostra os resultados da contagem da primeira microplaca (microplaca A) e na tabela 3 estão os resultados da contagem da segunda microplaca (microplaca B). Os dados obtidos e contidos nestas tabelas foram submetidos a um tratamento estatístico para que pudessem ser interpretados

Tabela 2 – Contagem dos náuplios da microplaca A.

Fileira	Extrato 5%		Extrato 2,5%		Extrato 1,25%		Extrato 0,63%		Controle	
A	0	10	0	9	3	7	9	1	9	1
	Vivos	mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	vivos	morto	vivos	Morto
B	0	9	0	8	4	6	9	1	9	0
	Vivos	mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	vivos	Morto	vivos	Mortos
C	0	10	0	9	3	6	8	2	10	0
	Vivos	mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	vivos	mortos	vivos	Mortos
D	0	10	0	10	1	8	8	2	10	0
	Vivos	mortos	vivos	mortos	Vivo	mortos	vivos	mortos	vivos	mortos
E	0	10	0	10	3	5	6	2	10	0
	Vivos	mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	vivos	mortos	vivos	Mortos

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 - Contagem dos náuplios da microplaca B.

Fileira	Extrato 5%		Extrato 2,5%		Extrato 1,25%		Extrato 0,63%		Controle	
A	0	8	0	10	4	6	7	3	9	0
	Vivos	Mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	Vivos	mortos	vivos	Mortos
B	0	8	0	10	3	6	6	3	10	0
	Vivos	Mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	Vivos	mortos	vivos	Mortos
C	0	9	0	9	8	3	9	1	10	0
	Vivos	Mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	Vivos	morto	vivos	Mortos
D	0	10	0	9	7	3	8	2	10	0
	Vivos	mortos	vivos	mortos	Vivos	mortos	Vivos	mortos	vivos	mortos
E	0	10	0	8	3	5	7	3	9	0
	Vivos	Mortos	vivos	Mortos	Vivos	Mortos	Vivos	mortos	vivos	Mortos

Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento estatístico foi realizado utilizando-se o software gratuito Jamovi®. Para realizar o tratamento estatístico primeiro utilizou-se o teste de Friedman com as informações colhidas no teste de toxicidade. O teste de Friedman foi utilizado porque havia três grupos pareados avaliados por uma variável quantitativa não paramétrica, que não obedece aos parâmetros normais de distribuição (distribuição normal). O resultado do teste de Friedman com a contagem geral das duas microplacas consta na tabela 4.

Tabela 4 - Teste de Friedman

Friedman		
χ^2	gl	p
38.6	4	< .001

Fonte: Elaborado pela autora.

Com o valor de p descoberto seguiu-se então para o teste de comparações múltiplas de Durbin-Conover, onde é feita a comparação de uma concentração específica com todas as outras. Na tabela 5 temos os dados das comparações múltiplas (Durbin-Conover) das duas bateladas de teste, a microplaca A e a microplaca B, observe que $p < 0.05$, estes resultados possuem o grau de confiança de 95%.

Tabela 5 - Tabela de comparações Múltiplas (Durbin-Conover) das duas placas de PCR.

Comparações Múltiplas (Durbin-Conover)				
		Estatística	p	
C 5%	- C 2,5	2.15	0.038	
C 5%	- C 1,25 %	11.83	< .001	
C 5%	- C 0,63%	19.36	< .001	
C 5%	- controle	25.82	< .001	
C 2,5	- C 1,25 %	9.68	< .001	
C 2,5	- C 0,63%	17.21	< .001	
C 2,5	- controle	23.67	< .001	
C 1,25 %	- C 0,63%	7.53	< .001	
C 1,25 %	- controle	13.98	< .001	
C 0,63%	- controle	6.45	< .001	

Fonte: Elaborado pela autora.

Com o valor de $p < 0.05$ temos a indicação de que existem diferenças estatísticas significativas na comparação dos grupos, no caso a concentração dos extratos. Caso fosse o valor de $p > 0.05$ não existiria uma diferença significativa na comparação dos grupos.

Já na comparação entre as médias das 10 repetições totais do teste podemos observar pela tabela 6, que a diferença na média de mortalidade dos náuplios entre as concentrações mais baixas do extrato vegetal são significativas, por exemplo, a comparação entre a média de mortalidade dos microcrustáceos na solução controle com a média de mortalidade no extrato de 0,63%, existe um aumento considerável dessa taxa.

Todavia, no que se refere à comparação entre as médias de mortalidade nos dois extratos de mais elevada concentração, a diferença não é significativa, indicando alto grau de toxicidade do extrato quando sua concentração é maior que 2,5%.

Tabela 6 - Tabela de comparação das médias de mortalidade das 10 repetições nas duas bateladas de teste.

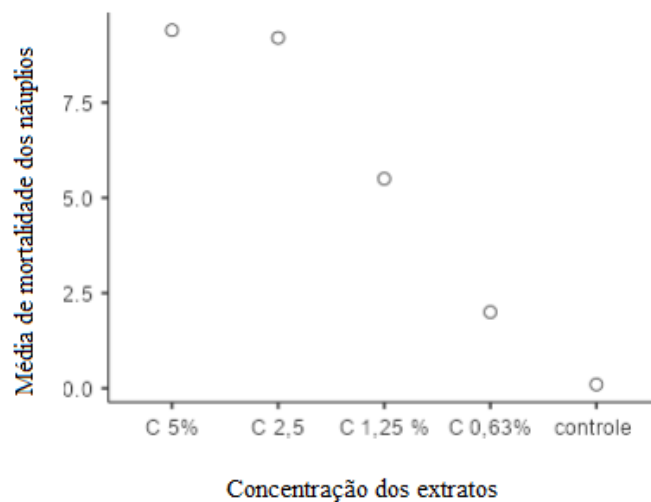
Estatística Descritiva		
Concentração das soluções	Média de mortalidade	Comparação de médias*
C 5%	9.400	A
C 2,5%	9.200	A
C 1,25%	5.500	B
C 0,63%	2.000	C
Controle	0.100	D

*As letras repetidas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Durbin-Conover com $p < 0.05$ e com o grau de confiança de 95%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 14 temos o gráfico correlacionando à taxa de mortalidade dos náuplios de *A. salina* com a concentração (m/m) do extrato de *A. brasiliiana*. Através dele pode-se concluir que a taxa de mortalidade aumenta à medida que a concentração do extrato vegetal também se eleva. Sendo assim, para os náuplios quanto maior a concentração do extrato vegetal mais letal este se torna, aumentando sua gradiente de toxicidade.

Figura 14 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de *A. brasiliensis* e a mortalidade dos náuplios.



Fonte: Elaborado pela autora.

O teste de toxicidade foi realizado em bateladas diferentes para viabilizar a avaliação da repetitividade do protocolo utilizado. Com os resultados dos dois foi possível dizer que não há diferença significativa na repetitividade, uma vez que, os índices encontrados na microplaca A são muito semelhantes aos encontrados na microplaca B. Como não houve discrepância significativa na repetitividade do protocolo, o tratamento estatístico dos dados das duas bateladas foi realizado junto, e foram consideradas 10 repetições ao total.

Observe na figura 15 os resultados do tratamento estatístico realizado individualmente em cada uma das placas aplicando o teste de Friedman.

Figura 15 - Resultados dos testes de Friedman para cada uma das microplacas.

Teste de Friedman Microplaca A			Teste de Friedman Microplaca B		
Friedman			Friedman		
χ^2	gl	p	χ^2	gl	p
19.6	4	< .001	19.2	4	< .001

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 16, observe as tabelas que contem as médias de mortalidade referentes o tratamento individual de cada microplaca, a semelhança dos resultados confirma a repetitividade viável.

Figura 16 - Comparação entre as médias de mortalidade dos náuplios nas duas microplacas.

Médias de mortalidade dos náuplios em cada uma das concentrações do extrato - Microplaca A

Estatística Descritiva		
	Média	Mediana
C 5%	9.400	10.00
C 2,5	9.200	9.00
C 1,25 %	5.500	6.00
C 0,63%	2.000	2.00
controle	0.100	0.00

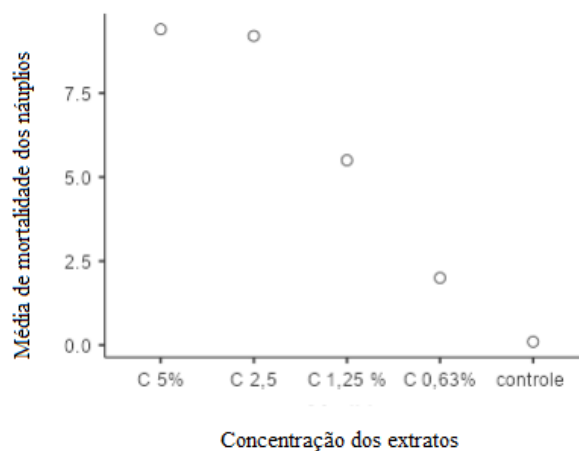
Médias de mortalidade dos náuplios em cada uma das concentrações do extrato - Microplaca B

Estatística Descritiva		
	Média	Mediana
C 5%	9.00	9
C 2,5	9.20	9
C 1,25 %	4.60	5
C 0,63%	2.40	3
controle	0.00	0

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 17 temos o gráfico correlacionando à taxa de mortalidade dos náuplios de *A.salina* com a concentração (m/m) do extrato de *A.brasiliana*, através dele pode-se concluir que a taxa de mortalidade aumenta à medida que a concentração do extrato vegetal também se eleva. Sendo assim, para os náuplios quanto maior a concentração do extrato vegetal mais letal este se torna, aumentando sua gradiente de toxicidade.

Figura 17 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de *A. brasiliana* e a mortalidade dos náuplios nas duas microplacas.



Fonte: Elaborada pela autora.

As figuras 18 e 19, respectivamente, trazem os gráficos descritivos referentes ao tratamento individual de cada microplaca, observe a semelhança entre ambos.

Figura 18 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de *A. brasiliana* e a mortalidade dos náuplios apresenta na microplaca A.

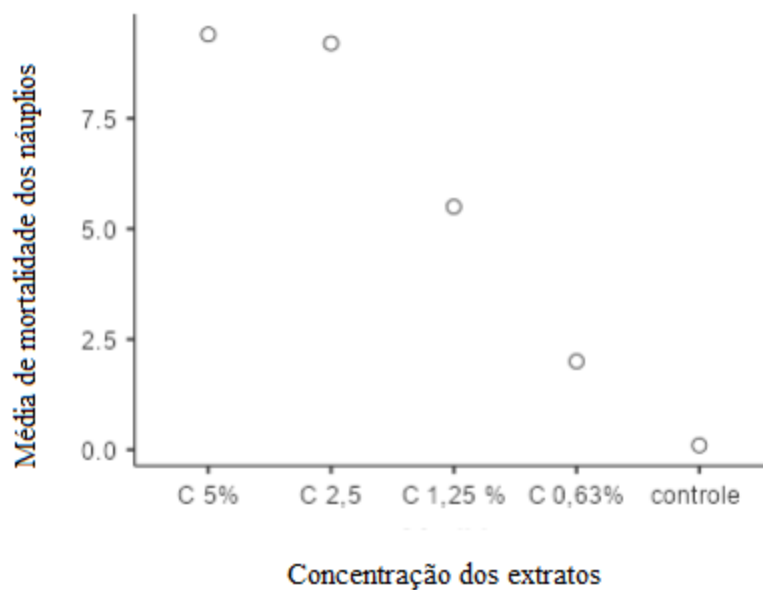
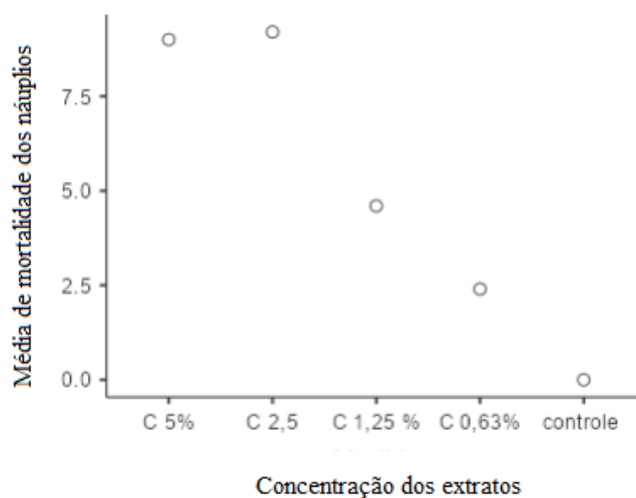


Figura 19 - Gráfico descritivo da correlação entre a concentração do extrato de *A. brasiliana* e a mortalidade dos náuplios apresenta na microplaca B.



Fonte: Elaborada pela autora.

Seguindo a metodologia proposta por Meyer et al(1982), os resultados presentes neste ensaio mostraram que os extratos vegetais testados, nas concentrações de 2,5% e 5% apresentaram uma alta taxa de toxicidade, sendo calculada a $DL_{50}=1,8\%$, indicando que os extratos acima dessa concentração são tóxicos para os náuplios de *A. salina*. A DL_{50} obtida valida as já calculadas médias de mortalidade nestas mesmas concentrações de 2,5% e 5%, chegando a uma porcentagem de mortalidade de 92% e 94%, respectivamente.

O procedimento aqui adotado para fazer a análise acerca da toxicidade dos extratos vegetais de *A. brasiliiana* foi semelhante ao adotado por Lima et al(2011) em seu trabalho onde analisou-se a toxicidade frente à *A. salina* dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. Em ambos os casos foi utilizada uma adaptação da metodologia proposta por Meyer et al (1982). Nos dois estudos a metodologia foi similar havendo apenas algumas pequenas distinções, como a presença de um controle negativo e um controle positivo no procedimento adotado por Lima et al(2011), enquanto que, nesta pesquisa optou-se apenas por uma solução controle. Todavia, para o tratamento estatístico Lima et al(2011) optou por utilizar o método Probits(Finney 1962) para chegar até a DL_{50} superior a 1000 ppm e também no índice de 0% de mortalidade nas concentrações analisadas em seu trabalho e confirmar a não toxicidade das frações de seu extrato. Por sua vez, no que se refere aos extratos de *A. brasiliiana*, aqui analisados, a DL_{50} foi calculada em 1,8%(m/m)indicando que qualquer extrato vegetal metanólico de *Alternanthera brasiliiana* com concentração acima de possui alto grau de letalidade, o que foi corroborado pelas médias das taxas de mortalidade dos náuplios calculadas utilizando-se o software Jamovi®.

Considerando os resultados satisfatórios apresentados por Li Lima et al(2011) e os comparando aos dados obtidos nesta pesquisa é possível afirmar que de fato, o teste de toxicidade com *A.salina* é um ensaio eficaz, uma vez que, apresenta sensibilidade diante de diversos tipos de substâncias podendo ser utilizado em diferentes estudos e como um eficaz método alternativo, corroborando o que afirma Utyama et al (2007).

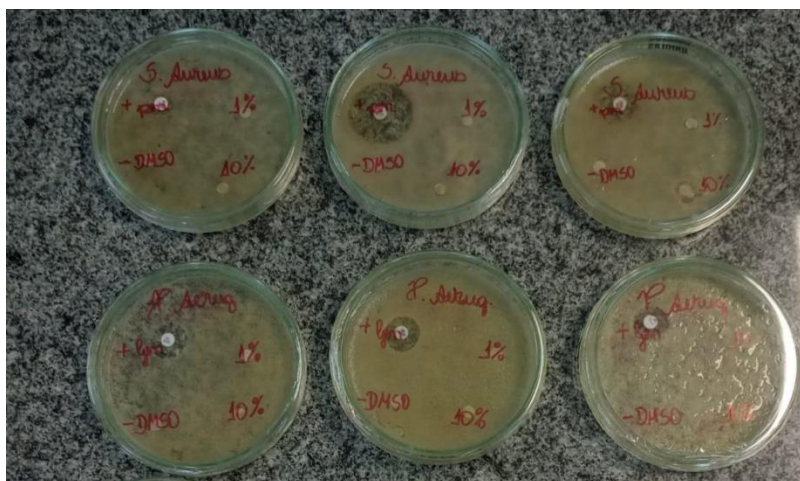
De acordo com Barbieri (2004), os testes físico-químicos não apresentam a eficácia necessária na detecção de diversos compostos químicos com potencial poluente, portanto neste cenário o teste de toxicidade com *Artêmia salina* Leach também é uma escolha válida e inteligente pois, por meio dele é possível verificar e analisar os efeitos ou danos causados a um determinado ecossistema, mostrando então a versatilidade desta metodologia proposta por Meyer et al(1982).

Ainda de acordo com Barbieri (2004), a polivalência desta metodologia é fruto da grande sensibilidade que os invertebrados aquáticos apresentam diante de singelas variações de seus parâmetros ambientais, portanto tal metodologia é amplamente empregada para determinação de toxicidade aguda em diversos estudos e contextos. Um exemplo da ampla versatilidade desta metodologia pode ser observado no trabalho de Harada(2009), quando o bioensaio foi utilizado para tentar correlacionar a citotoxicidade de algumas classes de produtos naturais com suas atividades antineoplásicas.

4.2. RESULTADOS DO ENSAIO BIOLÓGICO ANTIMICROBIANO

Durante o exame das placas de petri foram verificadas as seguintes características, se o crescimento do inóculo em cada placa se apresentava de maneira uniforme, se havia a presença de algum contaminante e se os halos de inibição estavam bem definidos. Em todas as placas o crescimento dos inóculos apresentou-se de maneira uniforme. A figura 20 mostra todas as placas contendo os inóculos das duas bactérias em triplicada após serem retiradas da estufa bacteriológica.

Figura 20 – Placas de petri do antimicrobiano após 16h de incubação em estufa bacteriológica.

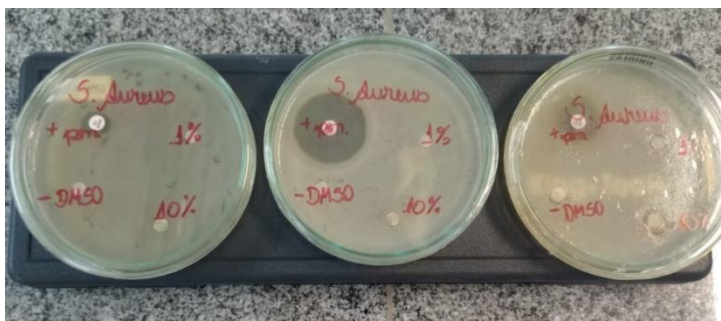


Fonte: Elaborado pela autora.

Durante o exame visual das placas com os inóculos da bactéria *Staphylococcus Aureus* foi possível perceber uma discrepância considerável no tamanho do halos de inibição do antibiótico comercial padrão, a penicilina, tal discrepância sinaliza que pode ter ocorrido algum tipo de contaminação no preparo das placas ou durante a inserção do

disco de papel com o antibiótico . Na figura 21 pode-se observar essa diferença nos halos de inibição do antibiótico com maior clareza.

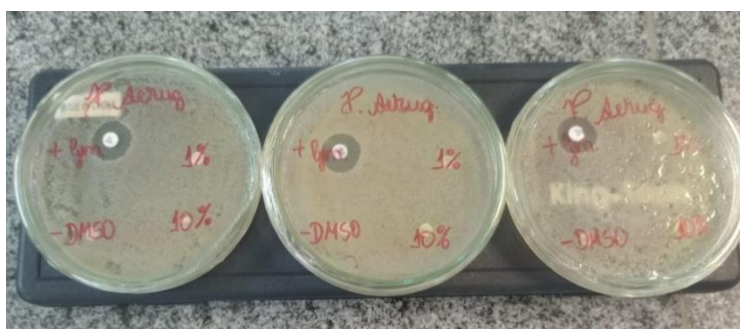
Figura 21 – Placas de petri com os inóculos da bactéria *S. aureus*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Já no exame visual feito nas placas com os inóculos da bactéria *Pseudomonas Aeruginosa*, é possível perceber que os halos de inibição do antibiótico comercial Geantamicina apresentaram semelhanças de diâmetro que depois foi confirmada na medição com o paquímetro. A figura 22 apresenta as placa com os inóculos da *P.Aeruginosa* e se faz possível observar a semelhança de tamanho dos halos de inibição da Geantamicina.

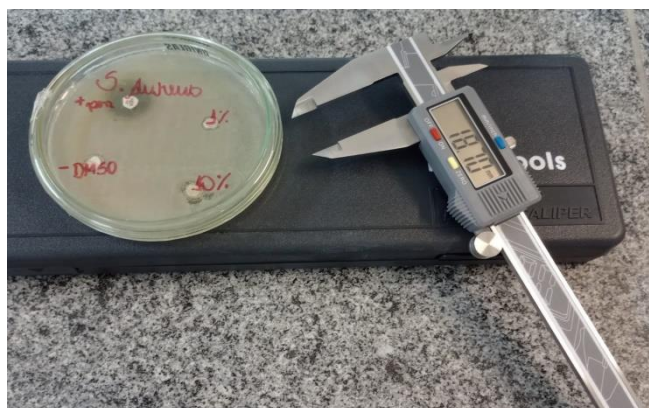
Figura 22 - Placas de petri com os inóculos da bactéria *P. aeruginosa*



Fonte: Elaborado pela autora.

Logo após a primeira averiguação visual, foi realizada a leitura dos halos de inibição de cada placa, para isto, foi utilizado um paquímetro e a placa foi posicionada sobre uma superfície de fundo preto e opaco. A figura 23 mostra uma das placas durante o procedimento de medição do halo inibição do antibiótico.

Figura 23 - Medição do halo de inibição da Penicilina em uma placa com o inoculo do *S.Aureus*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na tabela 7 estão registrados os diâmetros dos halos de inibição da Geantamicina das três placas com o cultivo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e na tabela 8 contém os diâmetros dos halos de inibição da Penicilina das três placas com os cultivos da bactéria *Staphylococcus aureus*.

Tabela 7 - Medidas das circunferências dos halos de inibição do antibiótico Geantamicina nas placas contendo as bactérias *P. aeruginosa*.

<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>		
16,84 mm	16,41 mm	16,38 mm

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8 - Medidas das circunferências dos halos de inibição do antibiótico Penicilina nas placas contendo a bactéria *S. aureus*.

<i>Staphylococcus Aureus</i>		
10,55 mm	29,92 mm	18,70 mm

Fonte: Elaborado pela autora.

O resultado da análise da atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *A. brasiliiana* não apresentou resultados positivos para esta atividade frente às cepas das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*, uma vez que, não houve em qualquer um dos cultivos dessas bactérias a presença de um halo de inibição do extrato de *A. brasiliiana*, seja na concentração de 1% ou na concentração de 10%. Nas figuras 21 e 22 é viável a visualização da ausência dos halos de inibição dos extratos.

Na comparação com a literatura temos o estudo conduzido por Caetano et al (2002), onde foram empregadas duas metodologias para testar a atividade antimicrobiana de extratos de *A. brasiliiana* diante de sete fenótipos da bactéria *Staphylococcus aureus*. Uma das metodologias empregadas foi a técnica de discos por difusão em ágar Müeller Hinton semeado na superfície com os inóculos bacterianos, metodologia semelhante a que foi realizada nesta pesquisa. Todavia o procedimento adotado por Caetano et al(2002) teve como antibiótico padrão escolhido o cloridrato de tetraciclina (solução mãe 1 mg/ml) enquanto que nesta pesquisa foi escolhido a Penicilina.

Em contrapartida aos resultados desta pesquisa, onde não houve comprovação de atividade inibitória dos extratos metanólicos de *A. brasiliiana*, no estudo de Caetano et al(2002) houve comprovação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos obtidos a partir de liofilizados de extratos hidroalcoólicos (1:1) de *A. brasiliiana*, sendo que a concentração testada do extrato aquoso foi de 65mg/ml ($65 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e houve a presença de halos de inibição de até 22 mm em quatro das sete cepas diferentes de *S. aureus*. Caetano e seus colaboradores indicam que o extrato apresentou uma ação semelhante ao antibiótico utilizado como controle, o cloridrato de tetraciclina.

Em outra pesquisa realizada por Pereira et al(2007), houve a análise da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *A. brasiliiana* que foram depois submetidos ao método de partição sucessiva com os solventes diclorometano, acetato de etila e n-butanol, 3 x 100 mL para cada solvente, resultando assim em extratos de diclorometano, acetato de etila e nbutanol. Também houve comprovação da atividade antimicrobiana desses extratos frente a diversas cepas de bactérias, entre elas a *S. aureus* e a *P. aeruginosa*. No entanto vale ressaltar que as concentrações analisadas são potencialmente mais elevadas do que as testadas aqui neste trabalho, por exemplo, o extrato bruto e a fração do extrato de acetato de etila tinham uma concentração de $1250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando apresentaram uma atividade discreta contra as cepas de *S. aureus*. E o extrato de diclorometano também tinha a concentração de $1250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando

apresentou singela atividade contra as cepas da *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos no trabalho de Pereira et al(2007), acerca da atividade antimicrobiana dos extratos da *A. brasiliensis* indicam uma atividade muito mais elevada da planta do que foi relatado no estudo de Caetano et al(2002), embora ambos utilizem métodos diferentes. Outro ponto a destacar é que as concentrações testadas por Pereira e seus colaboradores são superiores as testadas por Caetano e seus parceiros.

Observando-se os resultados obtidos na pesquisa que originou este trabalho e nos outros dois estudos acadêmicos citados, podemos supor que as diferenças de protocolo possam ter influenciado diretamente na ausência de atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos utilizados nesta pesquisa, uma vez que a concentração é inferior a que foi testada por Caetano et al(2002) e muito menor das que foram analisadas por Pereira et al(2007). Estes resultados confirmam a necessidade de realização de outras pesquisas sobre a suposta atividade antimicrobiana da espécie, para se confirmar ou refutar sua eficiência no combate aos agentes patológicos que foram testados nesta pesquisa.

4.3. OS RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE PESQUISA EXPERIMENTAIS COMO FERRAMENTA PEDAGÓGICA DENTRO DO CONTEXTO EDUCACIONAL.

Do ponto de vista educacional a utilização de atividades de pesquisa e de aulas práticas como ferramentas pedagógicas é algo extremamente bem-vindo, uma vez que este tipo de atividade pode despertar no estudante um maior interesse no estudo da química, principalmente quando ela é associada ao seu cotidiano, assim como está sugerido nos PCN'S (Brasil, 2002). Isso acontece porque quando o professor faz a proposta de uma aula diferente, tira o foco unicamente do conteúdo teórico e traz para o estudante elementos do seu cotidiano, ele pode ampliar a participação deste aluno.

A atividade de pesquisa juntamente com as aulas práticas pode despertar no estudante o interesse pela pesquisa e pela elucidação de diferentes problemas da sociedade e isso transforma a forma de pensar desse indivíduo o que deve ser um dos objetivos principais de uma ação educativa, sendo também o resultado uma aprendizagem significativa (Penaforte & Santos, 2014).

Nos dias atuais é necessário que o docente esteja sempre em busca de novos caminhos e conseqüentemente novas metodologias de ensino, e a estimulação a

pesquisa e experimentação em sala de aula podem ser vias a serem seguidas (Brasil, 2002). A necessidade de novas metodologias de ensino não é algo novo, mas algo essencial na busca por uma aprendizagem significativa e na estimulação da criatividade e do senso de protagonismo dos estudantes. Sendo assim, este trabalho também pode contribuir para a formação de estudantes, pois dá a eles novas possibilidades permitindo que exercitem suas competências e habilidades criativas, críticas e investigativas e assim possam alcançar uma aprendizagem significativa (BRASIL, 2002).

Portanto, para a esfera educacional a produção deste trabalho trouxe mais possibilidades para serem exploradas dentro do contexto de ensino-aprendizagem, como por exemplo, os procedimentos para a fabricação de extratos e medicamentos naturais, a pesquisa científica e sua relevância para o desenvolvimento da sociedade, além da grande interdisciplinaridade entre as diversas áreas de conhecimento humano, como a biologia, microbiologia, bioquímica, farmacologia, medicina e ecologia. A contribuição desta pesquisa está também em proporcionar ao corpo de estudantes uma visão mais ampla da Química e como ela está intimamente ligada ao seu cotidiano. Na visão de Patrício et al (2022), através de estudos como este, sobre plantas medicinais de uso popular é possível enriquecer o autocuidado da população, uma vez que traz informações importantes e pode facilitar a prática de tratamento com fitoterápicos sem tanto riscos, isso faz parte da realidade da família de muitos estudantes.

De acordo Lima et al. (2022), a Química de produtos naturais é uma subárea da Química que possui um grande potencial educativo já que ela pode favorecer o ensino de conteúdos como as reações químicas em cadeia, o isolamento de substâncias químicas e os processos metabólicos. Não menos importante ainda favorece a utilização de ervas medicinais para tratamento de doenças por meio da fabricação de extratos e óleos com eficácia comprovada, lembrando que esta possibilidade é considerada de baixo custo e pode ser trabalhada em sala de aula com os estudantes em aulas experimentais.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade da espécie vegetal *Althernanthera brasiliiana* (L) Kuntze, frente os náuplios do microcrustáceo marinho *Artêmia salina*, indicam a existência de toxicidade nos extratos metanólicos com concentração(m/m) de 2,5% e 5%, onde a DL₅₀ calculada foi 1,8%(m/m). O tratamento estatístico aplicado por meio do Software Jamovi®, mostrou que nos extratos com concentração de 2,5% e 5% a taxa de mortalidade dos náuplios chegou a 92% e 94%, respectivamente. De acordo com a DL₅₀ calculada, podemos concluir que qualquer concentração acima de 1,8% do extrato vegetal de *A. brasiliiana* possuirá uma gradiente de toxicidade alta, aumentando seu potencial letal à medida que sua concentração se eleva e conseqüentemente ampliando os índices de mortalidade dos náuplios para próximo de 100%.

Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de *A. brasiliiana*, podemos concluir que nas concentrações testadas nesta pesquisa, não foi encontrada nenhuma evidencia de atividade inibitória frente às cepas das bactérias analisadas, pois houve a ausência de halos de inibição formados ao redor dos discos de papel contendo os extratos, demonstrando que as bactérias inoculadas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, não apresentaram sensibilidade aos extratos nas concentrações definidas de 1% e 10%.

Na esfera educacional o presente trabalho foi relevante para sinalizar a atividade de pesquisa e a experimentação como ferramentas educacionais que podem ser utilizadas em sala de aula, visando dar ao estudante novas perspectivas que ultrapassem os muros do ensino tradicional e de aulas baseadas apenas na teoria. Outra contribuição significativa desta pesquisa foi mostrar a importância da Química como uma ciência de longo alcance e relevância, uma vez que o seu dinamismo permite que ela converse com as mais diferentes áreas de conhecimento humano contribuindo para o desenvolvimento da sociedade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais [Internet]. Brasília: Anvisa. [acessado em 5 de Dez 2022]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>
» <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>

Araújo D, Onofre SB. 2011. Ação do extrato hidroalcoólico *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt., (Amaranthaceae) sobre a atividade de antimicrobianos utilizados na terapêutica. **Rev Saúde e Biol** 6:1-8.

BARBIERI, E. Emprego de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea) para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe, Brasil. 2004. **Biologia Geral e Experimental**, v. 5, n. 1, p. 26-29, 2004.

BERLINCK, Roberto Gomes de Souza et al. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017. Tradução . . Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>. Acesso em: 23 maio 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Programa Nacional de controle de infecção hospitalar. Salvador: ANVISA, 2004. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf
Acesso em: 05 Maio de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos [Internet]. 2006 [acessado 30 Dezembro de 2022]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf
Acesso em: 05 Maio de 2023.

BRASIL. Ministério da Educação – MEC, Secretaria de Educação Média e Tecnológica – Semtec. PCN + Ensino Médio: orientações educacionais complementares aos Parâmetros Curriculares Nacionais – Ciências da Natureza, Matemática e suas Tecnologias. Brasília: MEC/Semtec, 2002 .

BRASIL. Ministério da Educação. Secretária de Educação Básica. Orientações Curriculares para o Ensino Médio: Ciências da Natureza, Matemática e suas Tecnologias. Brasília, 2006.

BUENO, Lígia et al. O ensino de química por meio de atividades experimentais: a realidade do ensino nas escolas. **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente**, p. 34, 2008.

CAETANO, N. et al. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 12, p. 132-135, 2002.

CALIXTO, JB .(2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J. Ethnopharmacol* 100: 131-134

CHASSOT, Attico. Para que(m) é útil o ensino?. 2.ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2004.

CONSERVATION INTERNATIONAL. Biodiversity Hotspots. 2010. Disponível em: < <https://www.conservation.org/priorities/biodiversity-hotspots> > . Acesso em: 10 abr. 2023.

COUTINHO, Henrique Douglas Melo et al. Toxicity against *Drosophila melanogaster* and anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 10353-10361, 2018.

DE SOUZA, Marcia M. et al. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 12, n. 4, p. 279-281, 1998.

DELAPORTE, Rosemeres Horwat et al. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 133-136, 2005.

DELAPORTE, Rosemeres Horwat et al. Estudo farmacognóstico das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 169-74, 2002.

DELAPORTE, Rosemeres HORWAT et al. Controle de qualidade e atividade anti-inflamatória de drogas vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Lei Farmacêutica de Buenos Aires**, v. 20, não. 1 pág. 39-46, 2001.

DE SOUZA, M. M., Kern, P., Floriani, A. E., & Cechinel-Filho, V. (1998). Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(4), 279-281.

FAVERO, M.S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* growth in distilled water from hospitals. **Science**, New York, v. 173, p. 836-838, 1971.

FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Introdução: as angiospermas do Brasil, p. 78-89. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0.

GOMES, LA de O. Cultivo de crustáceos e moluscos. **São Paulo: Nobel**, v. 226, 1986.

GUIMARÃES, C. C. Experimentação no ensino de química: Caminhos e descaminhos rumo à aprendizagem significativa. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 3, p. 198-202, 2009.

HARADA, Thaís Nichikuma. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. 2009.

IBIAPINA, Waléria Viana et al. Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 60-70, 2014.

IGARASHI, M. A. Potencial econômico das Artêmias produzidas em regiões salineiras do Rio Grande do Norte. **PUBVET**, v. 2, n. 31, 2008.

Koehn, F., Carter, G. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 206–220 (2005).

Lagrota, M.H.C., M.D. Vigg, M.M.G. Santos, M.M.F.S. Miranda, F.P. Camara, J.N.S.S. Couceiro & S.S. Costa (1994) *Phytother. Res.* 8: 358- 61.

Libâneo, J.C .Congressos, encontros, seminários de educação: espaços de desenvolvimento profissional ou mercado de entusiasmo?.**Revista de Educação AEC**, 27 (109) (1998), pp. 1-12

LIMA, Cristina Peitz de et al. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. *Acta Botanica Brasilica*, v. 25, p. 331-336, 2011.

LIMA, L. P. et al. A utilização de produtos naturais como alternativa para o ensino de química: Uma revisão. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, 2022.

LOPES, MFG, Almeida M, Nogueira CMD, Morais NMT. 2001. Caracterização físico-química de algumas espécies de plantas medicinais. **Rev Bras Pl Med** 4: 95-98.

Lopes MFG, Almeida MB, Nogueira CMD, Morais NMT, Magalhães CEC 2002. Estudo mineral de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn** 12: 115-116.

- YUNES R.A, CALIXTO JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente. Chapecó: Argos; 2001. (Série didática).
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA. São Paulo, v. 364, 2002.
- MACEDO, A. F. et al. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Die Pharmazie**, v. 54, n. 10, p. 776-777, 1999.
- MARCHIORETTO, Maria Salete et al. Biogeografia da família Amaranthaceae no Rio Grande do Sul. **Pesquisas, Botânica**, v. 59, p. 171-190, 2008.
- MARTINS, E.R., D.M. CASTRO, D.C. CASTELLANI & J.E. DIAS (1994) Plantas medicinais. Viçosa: UFV, 220 p.
- MASINI, E. F. S. Aprendizagem significativa: Condições para ocorrência e lacunas que levam a comprometimentos. **Meaningful Learning Review**, v. 1, s/n, p. 16-24, 2011.
- MCLAUGHLIN, J.L, ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p.513-24, 1998.
- MENEZES, J. M. R., PORTO, M. L. S., & PIMENTA, C. L. R. (2016). Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 15(2), 204-207.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.
- MOREIRA, M. A., & MASINI, E. F. S. (2006). Aprendizagem significativa: a teoria de David Ausubel. 2. ed. São Paulo: Centauro.

Moreira, M. A. (2009). Teorias de aprendizagem. 3. ed. São Paulo: EPU.

Moreira, M. A.. Subsídios teóricos para o professor pesquisador em ensino de ciências: A teoria da aprendizagem significativa. 1º ed. Porto Alegre: não informado, 2009, (compilação de trabalhos publicados).

Moreira, M. A., & Ostermann, F. (1999). A Física na formação de professores do Ensino Médio. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS.

NASCIMENTO, J. E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, 2008.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM(2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod** 66:1022-1037.

PATRÍCIO, Karina Pavão et al. O uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde: revisão integrativa. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, p. 677-686, 2022.

PENAFORTE G.S; SANTOS, V.S. O ensino de química por meio de atividades experimentais: Aplicação de um novo indicador natural de ph como alternativa no processo de construção do conhecimento no ensino de ácidos e bases. **Revista EDUCAmazônia** - Educação Sociedade e Meio Ambiente, Ano 7, V.8, n. 2, p. 8-21, 2014.

PEREIRA, Danielle F. et al. Morfo-anatomia das Folhas de *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata* (Amaranthaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 178, 2008.

Pereira, D. F., Zanon, R. B., Zanetti, G. D., Manfron, M. P., & Athayde, M. L. (2008). Morfo-anatomia das Folhas de *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata* (Amaranthaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, 27(2), 178.

PEREIRA, Danielle F. et al. Antimicrobial activity of a crude extract and fractions from *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze leaves. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 893, 2007.

Pereira DF, Zanon RB, Dos Santos M, et al (2013) Antioxidant activities and triterpenoids isolated from *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze leaves. **Nat Prod Res** 27:1660–1663. doi: 10.1080/14786419.2012.750313

PILAN, H. C. A Experiência como Pedagogia Ativa . *Unifitalo em Pesquisa*. URL: [www. Ítalo.com.br/portal/cepesq/revista eletrônica.html](http://www.Ítalo.com.br/portal/cepesq/revista_eletrônica.html). São Paulo SP, v.6, n.1, p. 192-XXX, jan/2016.

PITTEN, F.-A. et al. Transmission of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain at a German University Hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 47, n. 2, p. 125-130, 2001.

PIZZOLOTTO, G. Avaliação da atividade tóxica e antimicrobiana in vitro dos extratos metanólicos de *calendula officinalis* L. (asteraceae) visitadas e protegidas de insetos. 2010. 52 f. Dissertação (mestrado em Farmácia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2010.

TRACZ, V.; CRUZ-SILVA, C. T. A.; LUZ, M. Z. Produção de mudas de penicilina (*Alternanthera brasiliana* (L.) (Kuntze) via estaquia. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, Campinas, v. 16, n. 3, supl. I, p. 644-648, 2014.

R. Menezes, J. M., Porto, M. L. S., & Pimenta, C. L. R. M. (2016). Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. **Revista De Ciências Médicas E Biológicas**, 15(2), 204–207. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v15i2.15027>

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**, 4ª ed., Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 2001.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I.; THOMSON, W. J. Bioassay techniques for drug development, **Harwood academic publishers**, 2001.

SANTOS, A. L. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Contexto Enfermagem*, Santa Catarina, v. 13, n. 23, p. 64-70, 2004.

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

SIQUEIRA, J.C. 1994/1995. Fitogeografia das Amaranthaceae Brasileiras. **Pesquisas, Botânica** 45: 5-21.

SIQUEIRA, J.C. 2002. Amaranthaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G. & Giulietti, A. M. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo: FAPESP-HUCITEC. p. 11-30.

SIQUEIRA, J.C. 2004. Amaranthaceae: padrões de distribuição geográfica e aspectos comparativos dos gêneros Africanos e Sulamericanos. *Pesquisas, Botânica* 55:177-185.

SIQUEIRA, J.C. Os desafios de uma Fitogeografia Urbana. **Pesquisas, Botânica** nº 56: 229-238 São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 2005.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias dos Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 640 p.

UTYAMA, Iwa KA. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.

VASCONCELLOS, J.M.O. 1982. Estudo taxonômico sobre Amaranthaceae no Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 277p.

YUNES R.A, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente. Chapecó: Argos; 2001. (Série didática).