UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo biofarmacognóstico de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze Asteraceae

Roberto Tsuyoshi Adati

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro

São Paulo

2006

Roberto Tsuyoshi Adati

Estudo biofarmacognóstico
de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze
Asteraceae

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de
Doutor

Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro
Orientador/Presidente

Prof. Dra. Elizabeth Igne Ferreira
1°. Examinador

Prof. Dra. Adriana Lenita Meyer Albiero
2°. Examinador

Prof. Dra. Ivana Barbosa Suffredini
3°. Examinador

Prof. Dra. Helena Onishi Ferraz
4°. Examinador

São Paulo, 21 de fevereiro de 2006.

À Toshie!

Obrigado por sua bravura e o orgulho, que possibilitaram que eu e meus irmãos tivéssemos a chance de estudarmos, e por provar a todos nós, que podemos viver nesta sociedade com dignidade e respeito.

Obrigado por ter semeado em nossos corações o espírito de união entre irmãos e por mostrar que a vida pode ser muito bela, mesmo estando diante de inúmeras dificuldades.

Meus eternos agradecimentos a você, por ter tido muito amor, fé em Deus e por ter acreditado e confiado na medicina popular, quando os profissionais da saúde já não criam mais em minha sobrevivência.

Este trabalho é, portanto, dedicado a você, minha mãe, pois a você eu devo todo meu crescimento e a minha vida!

Agradecimentos	i
Figuras	iii
Tabelas	vii
Abreviaturas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1 – Introdução	1
2 – Objetivos	7
3 – Revisão Bibliográfica	9
3.1 – Revisão da família Asteraceae	10
3.1.1 – Distribuição	13
3.1.2 – Morfologia externa	13
3.1.3 – Importância	14
3.1.4 – Substâncias do metabolismo secundário das Asteraceae	15
3.2 – Revisão do gênero *Acanthospermum*	23
3.3 – A espécie *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze	23
3.3.1 – Estudos botânicos	24
3.3.1.1 – Posição taxonômica	24
3.3.1.2 – Denominação vulgar e científica	24
3.3.1.3 – Características morfológicas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze	25
3.3.1.4 – Propriedades medicinais de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze	25
3.3.1.5 – Componentes isolados e ações farmacológicas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze	26
3.3.1.6 – Distribuição geográfica de *Acanthospermum*	27

australe (Loefl.) O. Kuntze	
3.3.1.7- Agentes antimaláricos de origem vegetal	27
4 – Material e Métodos	31
4.1 – Aspectos botânicos	33
4.1.1 – Coleta e identificação	33
4.1.2 – Caracterização macroscópica de folha	33
4.1.3 – Caracterização microscópica de folha e caule	33
4.2 – Aspectos químicos	34
4.2.1 – Triagem fitoquímica	34
4.2.2- Ensaios para o óleo essencial	36
4.2.3- Preparação dos extratos	38
4.2.3.1- Extratos aquosos	38
4.2.3.2- Extrato hidroetanólico 70% e Extrato Hidroetanólico Liofilizado (EHL)	38
4.2.3.3- Extratos hexânico e clorofórmico	38
4.2.3.4- Extrato acetona:água	39
4.2.4- Aplicação dos extratos em CCD	39
4.2.5- Isolamento do componente comum a todos os extratos por CCD preparativa	40
4.2.6- Isolamento de um componente comum aos extratos clorofórmico e hexânico por CCD preparativa	40
4.2.7- Doseamento de taninos na droga vegetal e no extrato hidroetanólico liofilizado (EHL)	41
4.2.8- Determinação de água no pó da droga e no EHL	43
4.3- Aspectos farmacológicos	43

4.3.1- Atividade antimalárica e antileishmania dos extratos hidroetanólico liofilizado (EHL) e clorofórmico	43
4.3.2- Atividade antiúlcera aguda	46
4.3.3- Atividade antimicrobiana do EHL em bactérias, leveduras e Bolor	47
5- Resultados	50
5.1- Aspectos botânicos	52
5.1.1- Caracterização macroscópica de folhas	52
5.1.2 – Caracterização microscópica de folhas e caule	53
5.1.2.1- Folha	53
5.1.2.2- Caule	57
5.2- Aspectos químicos	60
5.2.1- Triagem fitoquímica	60
5.2.2- Rendimento do óleo essencial	61
5.2.2.1- Cromatografia em fase gasosa do óleo essencial	61
5.2.2.2- Composição química do óleo essencial	63
5.2.2.3- Espectro de massas dos componentes majoritários identificados no óleo essencial de *A. australe* de diferentes coletas da região de Iacri – SP.	65
5.2.3- Comparação dos rendimentos de diferentes extratos de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze	68
5.2.4- Perfil cromatográfico dos extratos clorofórmico e hexânico	68
5.2.5- Isolamento da fração F4 $CHCl_3$ por CCD preparativa e identificação por CG/EM	69
5.2.6- Perfil cromatográfico dos extratos aquoso, acetona:água, clorofórmico e hidroetanólico 70% e isolamento da substância F3.	71
5.2.7- CG/EM dos extratos acetona:água, etanol 70%, clorofórmico	72

e da fração isolada F3	
5.2.8- Doseamento de taninos no pó da droga e no EHL	82
5.2.9- Determinação de água no pó da droga e no EHL	82
5.3- Aspectos farmacológicos	83
5.3.1- Atividade antimalárica e antileishmania do EHL e do extrato clorofórmico	83
5.3.2- Atividade antiúlcera aguda	84
5.3.3- Atividade antimicrobiana do EHL em bactérias, leveduras e Bolor	90
6- Discussão	91
7- Conclusões	109
8- Referências bibliográficas	113

Agradecimentos

A Deus, pelo fato de estar sempre me acompanhando, dando-me forças para lutar e, principalmente, para vencer.

À minha Karina, esposa fiel, amiga e companheira que, com inteligência, conduziu o meu sonho a transformar-se em realidade.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho, assim como para o desenvolvimento de uma fase da minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro que, por duas vezes orientou-me, compreendeu minhas dificuldades e passou seus conhecimentos, ajudando-me, desta forma, a obter mais uma valiosa conquista.

Aos meus eternos mestres, Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro, Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi, Prof. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato, Prof. Dra. Dominique Corinne Fischer e Prof. Dr. Paulo Chanel Deodato de Freitas que, primeiramente, tão bem me acolheram a este departamento, que tanto me ensinaram, e apoiaram em todos os momentos da minha vida científica, como também fora dela.

A todos os professores do curso de pós-graduação que me prepararam, cada um à sua maneira, para desvendar os verdadeiros “mistérios” que estariam por vir.

Ao Dr. André Gustavo Tempone do departamento de Parasitologia, Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, pela valiosa contribuição na avaliação antimalárica e antileishmania dos extratos.

Ao Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz, da Área de Tecnologia Químico- Farmacêutica, pelo imenso auxílio prestado na liofilização dos extratos.

Ao Prof. Dr. José Abrahão Neto, que gentilmente se propôs a me ajudar no manuseio do espectrofotômetro, no ensaio de quantificação de taninos.

Ao Prof. Dr. Paulo Minami, por ceder o aparelho de fotomicrografia para o estudo botânico da espécie.

À Prof. Dra. Maria Inês de Almeida Gonçalves, pelas sugestões e auxílio na interpretação dos espectros de cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

À Prof. Dra. Telma Mary Kaneko pela gentileza em ajudar nos ensaios de atividade antimicrobiana.

À minha amiga Helena Yano pelo apoio e amizade.

Agradecimentos

Aos colegas pós-graduandos da Universidade de São Paulo, Elisângela Severina de Melo, do laboratório de fitoquímica, pela sua atenção, carinho e competência cedidas na realização do ensaio de atividade antiúlcera aguda e Elissa Arantes Ostrosky, do laboratório de microbiologia, pelo grande auxílio na realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao Sr. Toyota, de Iacri – SP, agricultor e proprietário do sítio no qual foram coletadas amostras do vegetal em estudo, e que, com prazer, contribuiu para o desenvolvimento da pesquisa científica.

Aos meus queridos primos Diego Hideki Ichikawa, Aldo Likito Nakashima e Daniel Massami Ishikawa que, com alegria e muita disposição, ajudaram-me nas coletas da espécie vegetal em estudo.

À secretária do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Elisabete Claro de Souza Paiva pelo carinho e amizade.

A todos os funcionários do bloco 15 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo que de uma maneira ou de outra participaram na realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos e cunhadas que tanto me ajudaram, seja com palavras de estímulo, seja com palavras de conforto ou apenas com um sorriso, mas que estiveram sempre presentes.

Figuras

Figura 1: Rotas principais de produtos naturais de Asteraceae. 18

Figura 2: Classes estruturais de lactonas sesquiterpênicas encontradas em Asteraceae. 19

Figura 3: Lactonas sesquiterpênicas de Asteraceae. 20

Figura 4: Algumas estruturas triterpênicas de Asteraceae. 20

Figura 5: Alguns componentes do óleo essencial de Asteraceae. 22

Figura 6: Alguns componentes fenólicos, fenilpropanóides de Asteraceae. 22

Figura 7: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. 23

Figura 8: Distribuição geográfica de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. 27

Figura 9: *Acanthospermum australe*: A: folhas frescas; B: droga vegetal. 52

Figura 10: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Folha. 54

Figura 11: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Folha. 55

Figura 12: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Nervura mediana. 56

Figura 13: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Pecíolo. 58

Figura 14: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Caule. 59

Figura 15: Cromatografia gasosa do óleo essencial da droga constituída de folhas e caules de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletada em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação. 62

Figura 16: Cromatografia gasosa do óleo essencial da droga constituída de caules de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletada em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação. 62

Figura 17: Cromatografia gasosa do óleo essencial de folhas frescas de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletadas em outubro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase de floração. 62

Figura 18: Cromatografia gasosa do óleo essencial de folhas frescas de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletadas em novembro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase inicial de frutificação. 62

Figura 19: Perfil cromatográfico dos extratos clorofórmico (A) e hexânico (B), mostrando a presença da fração 4. 69

Figura 20: A. Cromatografia gasosa da fração F4 $CHCl_3$, isolada por cromatografia em camada delgada preparativa; B. Cromatograma ampliado da fração F4 $CHCl_3$, mostrando a fração F4 (pico 1) e todas as impurezas presentes nesta fração (picos 2, 3, 4 e 5); C. Espectro de massa da fração F4 (pico 1 com tempo de retenção = 7.608). 70

Figura 21: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa que permitiram identificar a fração F4 isolada do extrato clorofórmico por cromatografia em camada delgada preparativa como sendo o globulol. 71

Figura 22: Cromatografia em camada delgada dos diferentes extratos de *Acantospermum australe* (Loefl) O. Kuntze e da fração F3 no sistema cromatográfico 2 [Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26); revelador NP e observação à luz ultravioleta de ondas longas (366 nm)]. 72

Figura 23: A. Cromatografia gasosa da substância XS; B. pico ampliado da substância XS (tempo de retenção = 6.492); C. Espectro de massa da substância padrão XS (tempo de retenção = 6.492). 73

Figura 24: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa que mostram que a substância padrão XS (tempo de retenção = 6.492) é o 4-hidroxi- 4-metil -2-pentanona. 74

Figura 25: A. Cromatografia gasosa do extrato acetona:água; B. pico ampliado de uma das substâncias presente no extrato (tempo de retenção = 6.983); C. Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.983. 75

Figura 26: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa referente ao extrato acetona:água que permitiram identificar a substância com tempo de retenção 6.983, como sendo o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona. 76

Figura 27: A. Cromatografia gasosa da fração F3; B. pico ampliado da substância majoritária presente na fração F3 (tempo de retenção = 6.767); C. Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.767. 77

Figura 28: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa que permitiram comprovar que a substância F3 isolada por cromatografia em camada delgada preparativa (tempo de retenção = 6.767) é o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona. 78

Figura 29: A. Cromatografia gasosa do extrato clorofórmico; B. pico ampliado de uma das substâncias presente no extrato clorofórmico (tempo de retenção = 6.458); C. Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.458. 79

Figura 30: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa referente ao extrato clorofórmico que permitiram identificar a substância com tempo de retenção 6.458, como sendo o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona. 80

Figura 31: A. Cromatografia gasosa do extrato etanol 70%; B. pico ampliado de uma das substâncias presente no extrato etanol 70% (tempo de retenção = 6.475); C. Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.475. 81

Figura 32: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa referente ao extrato etanol 70% que permitiram identificar a substância com tempo de retenção 6.475, como sendo o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona. 82

Figura 33: Atividade antimalárica do extrato hidroetanólico liofilizado (100μg/mL) e clorofórmico (100μg/mL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze. A atividade foi verificada em *Plasmodium chabaudi* AJ e determinada através da incorporação de 1μCi de [^{3}H] hipoxantina, após incubação por 24 h. Cloroquina (16 μg/mL) foi utilizada como fármaco padrão. 83

Figura 34: Avaliação da atividade antileishmania do extrato hidroetanólico liofilizado (100 μg/mL) e clorofórmico (100 μg/mL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze. A atividade foi verificada em promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* e a viabilidade celular determinada através do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo). 84

Figura 35: Estômagos do grupo de ratos controles tratados com água, por via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol. 85

Figura 36: Estômagos do grupo de ratos tratados com uma dose de 400 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol. 86

Figura 37: Estômagos do grupo de ratos tratados com cloridrato de ranitidina na dose de 100 µg/kg, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol. 87

Figura 38: Avaliação da Área Total de Lesão (ATL) no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico (0,3M) e etanol (60%) após a administração, via oral, de água (controle), 400 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze e 100 µg/kg de cloridrato de ranitidina. O gráfico representa a média da Área Total de Lesão e seu respectivo erro padrão (*p < 0,05; ANOVA, Teste de Tukey). O número de animais utilizado em cada grupo experimental está representado entre parênteses; *p < 0,05 = resultado significativo em relação ao controle; ns = resultado não-significativo em relação ao controle. 88

Figura 39: Avaliação da Área Relativa de Lesão (ARL) no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico (0,3M) e etanol (60%) após a administração, via oral, de água (controle), 400 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze e 100 µg/kg de cloridrato de ranitidina. O gráfico representa a média da Área Relativa de Lesão e seu respectivo erro padrão (*p < 0,05; ANOVA, Teste de Tukey). O número de animais utilizado em cada grupo experimental está representado entre parênteses; *p < 0,05 = resultado significativo em relação ao controle; ns = resultado não significativo em relação ao controle. 89

Figura 40: Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze frente ao bolor *Aspergillus niger* (ATCC 16404), nas concentrações de 10 mg/mL e 20 mg/mL. O fármaco padrão utilizado foi a nistatina dissolvida em água destilada na concentração de 1 mg/mL. A absorbância foi medida em espectrofotômetro, com detector de Elisa a 630 nm. Cc. controle de crescimento; Cs. controle do solvente; C+. controle positivo. 90

Tabela 1: Classificação de Asteraceae, segundo Bentham e Hoffmann. 11

Tabela 2: Classificação de Asteraceae, com número de subtribos, gêneros e espécies. 12

Tabela 3: Ensaios para detecção de grupos de princípios ativos em partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. 35

Tabela 4: Grupos de princípios ativos em partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. 60

Tabela 5: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação da droga, constituída de folhas e caules coletadas em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação. 63

Tabela 6: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação da droga, constituída de caules coletadas em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação. 63

Tabela 7: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação de folhas frescas, coletadas em outubro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase de floração. 64

Tabela 8: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação de folhas frescas, coletadas em novembro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase inicial de frutificação. 64

Tabela 9: Composição percentual do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze coletado em diferentes épocas do ano. 67

Tabela 10: Comparação dos diferentes métodos de extração e rendimento dos extratos de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. 68

Tabela 11: Comparação da área total do estômago, área total da lesão e área relativa da lesão do grupo de ratos controles tratados com água, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol. 85

Tabela 12: Comparação da área total do estômago, área total da lesão e área relativa da lesão do grupo de ratos tratados com uma dose de 400 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado (EHL), via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol. 86

Tabela 13: Comparação da área total do estômago, área total da lesão e área relativa da lesão do grupo de ratos tratados com cloridrato de ranitidina na dose de 100 µg/kg, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol. 87

ARL – Área Relativa da Lesão

AT – Área Total do Estômago

ATL – Área Total da Lesão

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG – Cromatografia Gasosa

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

EHL – Extrato Hidroetanólico Liofilizado

EM – Espectro de Massas

I.I – Índice de Intumescimento

PM – Peso molecular

UFC – Unidade Formadora de Colônia

USP – Universidade de São Paulo

WHO – World Health Organization

Acanthospermum australe (Loefl.) O. Kuntze, conhecido popularmente no Brasil como carrapichinho pertence à família Asteraceae e é utilizado na medicina popular como hepatoprotetora, diaforética, antiblenorrágica, antimalárica, entre outras funções. O objetivo do presente trabalho foi estudar a espécie sob o aspecto botânico, químico e farmacológico. Assim, folhas e caules foram analisados macro e microscopicamente, contribuindo no auxílio da diagnose da espécie. Os órgãos em estudo foram submetidos a ensaios preliminares para a pesquisa dos principais grupos de princípios ativos provenientes do metabolismo secundário dos vegetais. Diferentes extratos foram obtidos por percolação e por decocção, sendo alguns de seus componentes isolados por CCD preparativa e identificadas por CG/EM. O óleo essencial do vegetal, coletado em diferentes épocas do ano e variados estágios de desenvolvimento, foi obtido em aparelho de Clevenger modificado, sendo que sua composição também foi analisada por CG/EM. O extrato clorofórmico e o extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) foram avaliados quanto à atividade antimalárica e antileishmania. Com o EHL foi realizado também ensaio de atividade antiúlcera em ratos Wistar Hannover fêmeas e atividade antimicrobiana em bactérias e fungos. A espécie em estudo, nas condições deste trabalho, apresentou flavonóides, taninos, saponinas, óleo essencial e mucilagens. O extrato clorofórmico e hidroetanólico liofilizado, nas concentrações de 100 µg/mL, provocaram 100% de morte dos protozoários de *Plasmodium chabaudi* AJ, porém ambos não apresentaram atividade em promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi* nesta concentração. O EHL na concentração de 10 mg/mL demonstrou significativa atividade antifúngica contra o *Aspergillus niger*, não apresentando nenhuma atividade para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. O mesmo extrato, na concentração de 400 mg/kg, administrada por via oral, mostrou-se com atividade antiúlcera aguda significativa, reduzindo a Área Total de Lesão (ATL) em 49,13% em relação ao controle. O óleo essencial, nas condições do experimento, apresentou diferenças qualitativas e quantitativas quando comparado a estudos já realizados, sendo constituído em sua maioria por sesquiterpenos dos grupos cadinano (α-cadinol e δ-cadineno), cariofilano (β-cariofileno) e, principalmente, germacrano (globulol). As análises permitiram concluir ainda que o isômero do espatulenol é o componente exclusivo e majoritário do óleo essencial de caule e o isômero do globulol, o componente presente em maior quantidade no óleo quando o vegetal encontra-se em fase de floração.

Acanthospermum australe (Loefl.) O. Kuntze, known popularly in Brazil as carrapichinho belongs to the family Asteraceae and it is used in the tradicional medicine as hepatic protector, diaforetic, blenorragic activity, antimalarial activity among others. The objective of the present work was to study this species under the aspect botanical, chemical and pharmacological. Thus, leaves and stems were analyzed macro and microscopic contributing in the aid of the diagnosis of species. The aerial parts in study were submitted to preliminary phytochemical screening for the research of the main groups of secondary metabolites of plants. Different extracts were obtained by percolation and for decoction being some of their components, isolated for TLC preparative and identified for GC/MS. The essential oil of the plants, collected at different seasons of the year and different development stadiums, it was obtained in a Clevenger apparatus, and it composition, was also analyzed by GC/MS. The chloroformic extract and liofilized hidroethanolic extract (LHE) were assayed for the antimalarial and antileishmania activities. Using LHE it was also assayed for the anti ulcer activity in mice Wistar Hannover females and antimicrobial activity in bacteria and fungi. The species in study, in conditions of this work, presented flavonoids, tannins, saponnins, essential oil and mucilages. The chloroformic extract and LHE in the concentrations of 100 µg/mL caused 100% of death in the blood forms of *Plasmodium chabaudi* AJ, however none of them presented activity in blood forms of *Leishmania (L.) chagasi* in this concentration. LHE in the concentration of 10 mg/mL presented significant antifungal activity against the *Aspergillus niger*, and no activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The same extract, in the concentration of 400 mg/kg, administered orally, presented significant antiulcerogenic activity, reducing the Total Area of Lesion (TAL) in 49,13% in relation to the control. The essential oil, in the conditions of the experiment, presented qualitative and quantitative differences when compared to previous studies and constituted in its majority by sesquiterpenes of the cadinano groups (α-cadinol and δ-cadinene), caryophyllano (β-caryophyllene) and mainly, germacrano (globulol). The analyses still permit to conclude that the isomer of the spathulenol is the exclusive and mayor component of the essential oil in the stem. Isomer of the globulol is the representative present in mayor amount in the oil when the plant is in flower stadium.

Introdução

Doenças infecciosas causam grande sofrimento a milhões de pessoas em todo mundo, principalmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, incluindo um forte impacto na economia e problemas à Saúde Pública (TROUILLER *et al.*, 2001). Dentre as principais doenças tropicais, as causadas por protozoários apresentam alta morbidade e/ou mortalidade, sendo representadas pela Leishmaniose, Doença de Chagas e Malária (REMME *et al.,* 1993). Afetam grandes populações marginais ao processo econômico globalizado e, desta forma, não são vistas como mercados potenciais para indústrias farmacêuticas (PECOUL *et al.*, 1999).

O uso de compostos naturais extraídos de plantas como matéria-prima para síntese de novas substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem-se em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL & WANI, 1996).

De forma similar aos microorganismos, as plantas produzem uma grande diversidade de compostos químicos. Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Além disso, como produtos de organismos que possuem muitas similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais às antimicrobianas a eles associadas (NISBET, 1997).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma (SIMÕES *et al.*, 2004).

Informações obtidas junto à população constituem estratégias para investigação de plantas medicinais, que permitem combinar dados adquiridos junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal, com estudo químico e farmacológico realizados em laboratórios especializados. A seleção de espécies vegetais para pesquisa e desenvolvimento de fármacos baseada na alegação de um dado efeito terapêutico em humanos, pode se constituir num valioso atalho para a

descoberta de fármacos, já que seu uso tradicional permite que seja encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos.

Aproximadamente 2000 espécies com ocorrência no Brasil são empregadas na medicina popular (DI STASI, 2002), sendo que muitas delas pertencem à família Asteraceae.

As espécies pertencentes a esta família são do tipo cosmopolita, encontradas especialmente em regiões montanhosas temperadas ou tropicais e em campos abertos e/ou secos (JUDD, 1999). É uma das mais importantes famílias de plantas vasculares florescentes no mundo, compreendendo 1535 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies (JUDD, 1999). No Brasil ocorrem mais de 180 gêneros (BARROSO, 1991).

Por mais de 10 anos, HEGNAUER (1964) resumiu a química da Asteraceae e discutiu as implicações sistemáticas gerando conclusões muito importantes. Segundo Hegnauer, a família Asteraceae é quimicamente muito distinta, possuindo substâncias como frutose, óleo em sementes, algumas contendo ácidos graxos, lactonas sesquiterpênicas, alcoóis triterpênicos pentacíclicos, derivados do ácido caféico, flavonas, flavonóis metilados, óleo essencial, flavonóides, alcalóides e heterosídeos cianogênicos.

Um estudo realizado por HEYWOOD, HARBORNE & TURNER (1977) comprovou as informações geradas por HEGNAUER (1964), concluindo que Asteraceae compreende uma família com variedades de plantas com propriedades medicinais. Alguns exemplos podem ser citados, tais como a *Taraxacum officinalis*, *Arnica montana* L., *Artemisia absinthium* L. (HEYWOOD, 1977) e *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze, popularmente chamada de carrapichinho. Esta última é muito comum em nosso país, conhecida pela medicina tradicional brasileira que utiliza o extrato, proveniente de partes aéreas ou mesmo da planta inteira, visando obtenção de várias atividades como antimalárica, antianêmica, anti-séptica do trato urinário (MORS, 2000), antiblenorrágica e às vezes em caso de irisipela (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2000; MORS, 2000).

A referida espécie é explorada ainda por sua propriedade tônica, diaforética, mucilaginosa, aromática e antidiarréica (PENNA, 1941, CORRÊA, 1984; LORENZI, 2000; MORS, 2000), em casos de febres palustres e intermitentes (CORRÊA, 1984;

LORENZI, 2000) e no tratamento da tosse, bronquite, distúrbios do fígado e como expectorante (PENNA, 1941).

Dentre todos os usos populares desta espécie citados anteriormente, a ação antimalárica chama atenção, devido ao fato da doença ser ainda um problema médico-sanitário com repercussões sociais e econômicas muito importantes (FERREIRA, 2002), aliado ao fato que para esta doença não estão disponíveis ainda, vacinas.

A malária é uma importante causa de doença e morte de crianças e adultos em países tropicais (WHO, 2006). Esta parasitose é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo que o maior obstáculo à quimioterapia antimalárica é o aumento da incidência de cepas resistentes de *Plasmodium* (BABIKER *et al.,* 2005, BARNES *et al.*, 2005; WHO, 2006).

Até o final de 2004, 107 países e territórios apresentavam áreas de riscos para a transmissão desta doença. Aproximadamente 350 a 500 milhões de episódios clínicos de malária ocorrem anualmente, sendo que a maior parte das infecções é causada por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (WHO, 2005).

A malária causada por *P. falciparum*, concomitante a outras infecções e doenças, leva a mais de um milhão de mortes por ano, principalmente, em crianças. Dentre os 60% dos casos de malária mundial, aproximadamente 75% é causado por *P. falciparum*, sendo que mais de 80% de mortes por malária, ocorrem na África Sul, no Sahara. Esta doença é a maior causadora de anemia em crianças e mulheres gestantes, assim como também pelo baixo peso infantil, partos precoces e mortalidade infantil (WHO, 2005).

A atual resistência do *Plasmodium falciparum,* principalmente aos medicamentos mais utilizados na clínica como a cloroquina ou associações como sulfadoxina-pirimetamina, vem provocando preocupação e atenção especial por parte dos pesquisadores (BABIKER *et al.,* 2005, BARNES *et al.*, 2005; WHO, 2006).

A descoberta e desenvolvimento de derivados de artemisinina na China e sua avaliação no sudeste da Ásia e outras regiões originaram uma nova classe de antimalárico altamente efetivo, que mudou a quimioterapia desta doença no sudeste da Ásia. As terapias combinadas baseadas em artemisinina são, atualmente,

consideradas as melhores no tratamento para a descomplicada malária falcipariana (WHO, 2006).

Estudos dos extratos de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze, *in vivo*, utilizando camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium berghei*, apresentaram considerável atividade antimalárica (CARVALHO *et al.*, 1991), porém nenhum estudo foi realizado até o momento contra o clone AJ de *Plasmodium chabaudi,* o qual se apresenta usualmente mais resistente a drogas que outros modelos (MARTINELLI *et al.*, 2005).

Através de análises genéticas, vem sendo demonstrado que o *Plasmodium chabaudi* pode ser considerado o modelo de malária de roedor para a malária humana, com características importantes, como resistência a drogas e imunidade (MARTINELLI *et al.*, 2005).

Devido ao fato dos dois principais agentes antimaláricos (quinina e artemisinina), serem de origem vegetal, a busca por componentes ativos oriundos de plantas têm sido uma constante mundial (SAXENA, *et al.*, 2003).

No presente trabalho, a atividade contra cepas da *Leishmania (L) chagasi* foi testada devido ao fato de um membro da família, *Jasonia glutinosa*, ter apresentado esta atividade, devido a um sesquiterpeno (VILLAESCUSA-CASTILLO *et. al.*, 2000).

Publicações relacionadas à química dos compostos de Asteraceae, assim como a do seu exemplar, *Acanthospermum australe* têm sido relatadas, porém investigações envolvendo os aspectos botânicos não existem na literatura. A importância em se caracterizar botanicamente uma espécie vegetal através de estudos morfológicos e anatômicos de seus órgãos constitui uma ferramenta de suma importância na diagnose de drogas vegetais, influenciando também o controle de qualidade de produtos a partir dela preparados.

As descrições de morfologia e anatomia de uma determinada espécie vegetal permitem aos pesquisadores descobrirem se a mesma produz ou não certos grupos de substâncias, dentre eles, o óleo essencial. Este grupo de princípio ativo é uma mistura complexa de muitas substâncias simples, geralmente monoterpenos e sesquiterpenos, onde cada um desses constituintes contribui para um efeito benéfico ou adverso do óleo.

Os óleos essenciais são produtos naturais de grande valor, usados como materiais brutos em muitos campos, incluindo perfumes, cosméticos, aromaterapia, fitoterapia e alimentos (BUCHBAUER, 2000). Muitos estudos sobre as atividades biológicas dos óleos essenciais têm sido publicados, relacionando as alterações de composição química, qualitativas e/ou quantitativas que ocorrem quando seus respectivos vegetais produtores são provenientes de regiões e estágios de desenvolvimento diferentes, o que implica em ações biológicas discordantes para os óleos da mesma espécie (PANIZZI, *et al.*, 1993).

Apresentando esta comunicação, deseja-se tornar bem conhecida esta espécie da família Asteraceae, uma planta medicinal pouco estudada e facilmente adquirida em pastos e pomares ou ainda à beira de trilhos de trem e que, selecionada e cultivada poderá ter grande aplicação industrial, pelo seu valor medicinal.

Objetivos

Constituem objetivos desta tese:

- Estudar a espécie vegetal *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze, sob o aspecto botânico, químico e farmacológico.

Sob o aspecto botânico:

- Caracterizar macro e microscopicamente as partes aéreas, constituídas de folhas e caules da espécie em estudo.

Sob o aspecto químico:

- Realizar a triagem fitoquímica com a droga constituída de partes aéreas deste vegetal para os mais importantes grupos de princípios ativos;

- Descobrir por métodos cromatográficos, baseado no seu uso popular, a substância presente no extrato aquoso, obtido por decocção, que oferece ação antimalárica;

- Isolar alguns componentes dos extratos obtidos por percolação e identificá-los por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

- Extrair, identificar e comparar a composição química do óleo essencial de amostras do vegetal coletado em diferentes épocas e estágios de desenvolvimento;

- Dosear o teor de taninos no pó da droga e no extrato hidroetanólico liofilizado do vegetal em estudo.

Sob o aspecto farmacológico:

- Avaliar os extratos hidroetanólico liofilizado e clorofórmico quanto às atividades antimalárica e antileishmania;

- Avaliar o extrato hidroetanólico liofilizado quanto às atividades antiúlcera aguda e antimicrobiana.

Revisão Bibliográfica

3- Revisão Bibliográfica

3.1- Revisão da família Asteraceae
3.1.1- Distribuição
3.1.2- Morfologia externa
3.1.3- Importância
3.1.4- Substâncias do metabolismo secundário de Asteraceae
3.2- Revisão do gênero *Acanthospermum*
3.3- A espécie *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze
3.3.1- Estudos botânicos
3.3.1.1- Posição taxonômica
3.3.1.2- Denominação vulgar e científica
3.3.1.3- Características morfológicas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze
3.3.1.4- Propriedades medicinais de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze
3.3.1.5- Componentes isolados e ações farmacológicas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze
3.3.1.6- Distribuição geográfica de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze
3.3.1.7- Agentes antimaláricos de origem vegetal

3.1- Revisão da família Asteraceae

Segundo BREMER (1994), o botânico francês Henri Cassini foi muito importante por definir a classificação da Asteraceae. Demonstrou habilidade em examinar o material da família, descrever numerosos gêneros e mostrar muitas tribos que são reconhecidas hoje. Estes resultados foram publicados em jornais franceses e dicionários, e devido a este modo de publicação, o impacto de seu trabalho foi severamente reduzido, apesar de que, muito do que ele propôs, é aceito hoje, na classificação desta família. Em 1816, publicou um diagrama mostrando as inter-relações das 19 tribos desta família.

O primeiro livro publicado sobre Asteraceae foi no ano de 1832, por Lessing que apresentou uma classificação muito diferente de Cassini; incluía sete tribos, algumas com circunscrições bastante amplas e artificiais. Um esquema similar foi adotado por De Candolle, em 1836.

Uma revisão substancial sobre a classificação das tribos foi providenciada por BENTHAM em *Genera Plantarum* (1873). Bentham desenvolveu um sistema, e posteriormente, descobriu ser semelhante ao de Cassini. Por sua insistência,

Bentham realizou algumas alterações consideráveis, descobrindo ainda, algumas associações errôneas das tribos.

Em 1890, HOFFMANN mostrou em *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* uma classificação mais atualizada e com pequenos diagnósticos sobre todos os gêneros; seu esquema foi utilizado como referência geral por mais de 100 anos (tabela 1).

Atualmente, a família Asteraceae compreende 3 subfamílias e 17 tribos, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 1: Classificação de Asteraceae, segundo Bentham e Hoffmann.

Bentham 1873	**Hoffmann 1890**
Vernoniaceae	Vernonieae
Eupatoriaceae	Eupatorieae
Asteroideae	Astereae
Inuloideae	Inuleae
Helianthoideae	Heliantheae
Helenioideae	Helenieae
Anthemideae	Anthemideae
Senecionideae	Senecioneae
Calendulaceae	Calenduleae
Arctotideae	Arctotideae
Cynaroideae	Cynareae
Mustisiaceae	Mutisieae
Cichoriaceae	Cichorieae

Tabela 2: Classificação de Asteraceae, com número de subtribos, gêneros e espécies (JUDD, 1999).

Tribo	Subfamília	Gênero/Espécie	Gêneros representativos
1- Barnadesieae	Barnadesioideae	9/92	*Barnadesia, Chuquiraga, Dasyphyllum*
2- Mutisieae	"Cichorioideae"	76/970	*Chaptalia, Gerbera, Gochnatia, Mutisia, Trixis*
3- Cardueae (= Cynareae)	"Cichorioideae"	83/2500	*Carduus, Centaurea, Cirsium, Cynara, Echinops*
4- Lactuceae (= Cichorieae)	"Cichorioideae"	98/1550	*Cichorium, Crepis, Hieracium, Krigia, Lactuca, Pyrrhopappus, Sonchus, Taraxacum, Tragopogon, Youngia*
5- Vernonieae	"Cichorioideae"	98/1300	*Elephantopus, Vernonia*
6- Liabeae	"Cichorioideae"	14/160	*Liabum*
7- Arctoteae	"Cichorioideae"	16/200	*Arctotis, Berkheya*
8- Inuleae	Asteroideae	38/480	*Inula, Pulicaria, Telekia*
9- Plucheae	Asteroideae	28/220	*Pluchea, Sphaeranthus*
10- Gnaphalieae	Asteroideae	162/2000	*Anaphalis, Antennaria, Gamochaeta, Gnaphalium, Leontopodium*
11- Calenduleae	Asteroideae	8/110	*Calendula, Osteospermum*
12- Astereae	Asteroideae	174/2800	*Áster, Baccharis, Conyza, Erigeron, Haplopappus, Solidago*
13- Anthemideae	Asteroideae	109/1740	*Achillea, Anthemis, Argyranthemum, Artemisia, Chrysanthemum, Tanacetum Leucanthemum, Seriphidium,*
14- Senecioneae	Asteroideae	120/3200	*Erechtites, Senecio*
15- "Helenieae"	Asteroideae	110/830	*Arnica, Flaveria, Gaillardia, Helenium, Pectis, Tagetes*
16- Heliantheae	Asteroideae	189/2500	*Ambrosia, Bidens, Calea, Coreopsis, Cosmos, Dahlia, Helianthus, Iva, Rudbeckia, Verbesina, Viguiera, Zinnia*
17- Eupatorieae	Asteroideae	174/2400	*Ageratum, Carphephorus, Eupatorium, Garberia, Liatris, Mikania*

3.1.1- Distribuição

A família Asteraceae, conhecida como "a família do girassol", distribui-se por quase toda terra, envolvendo os mais variados ecossistemas, sendo, portanto, cosmopolita (JUDD, 1999; BREMER, 1994; CRONQUIST, 1981; HEYWOOD, 1977).

Sua diversidade máxima está associada a áreas abertas, freqüentemente temperadas, como pradarias e savanas das Américas; estepes e gramados da África, Ásia, Austrália e da Nova Zelândia. As mesmas ascendem muito nas montanhas (por exemplo, *Achillea*, alquemilas típicas dos Alpes) e crescem também em desertos, praias, solos salgados e inóspitos, contando sempre que a luz lhes seja oferecida em toda sua plenitude (BREMER, 1994; CRONQUIST, 1981; HEYWOOD, 1977).

De acordo com JUDD (1999), a família compreende 1535 gêneros e cerca de 23000 espécies. Os maiores gêneros estão representados por *Senecio* (1500 espécies), *Vernonia* (1000), *Cousinia* (600), *Eupatorium* (600), *Centaurea* (600), *Hieracium* (500), *Helichrysum* (500), *Artemisia* (400), *Baccharis* (400), *Saussurea* (300), *Mikania* (300), *Cirsium* (270), *Aster* (250), *Jurinea* (250), *Bidens* (200), *Gnaphalium* (150) e *Solidago* (100).

Muitos gêneros ocorrem nos Estados Unidos e Canadá, sendo especialmente importantes os gêneros *Ambrosia, Antennaria, Artemisia, Aster, Baccharis, Bidens, Coreopsis, Erigeron, Senecio, Centaurea, Chrysothamnus, Cirsium, Eupatorium, Elephantopus, Gaillardia, Gamochaeta, Gnaphalium, Haplopappus, Helianthus, Hieracium, Liatris, Lactuca, Rudbeckia, Solidago, Verbesina* e *Vernonia* (JUDD, 1999).

3.1.2- Morfologia externa

As tribos e os gêneros em que os botânicos subdividem esta família são unicamente determinados pelo estudo de sua estrutura floral; suas folhas são muito variadas, sejam inteiras ou fendidas, de disposição alterna ou oposta, podendo ser latescentes ou não (JOLY, 1966).

A grande maioria dos gêneros (aproximadamente 98%) é constituída por plantas de pequeno porte (ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente

árvores). As flores são sempre reunidas em inflorescência característica, o capítulo e as flores são de simetria radial ou zigomorfas, até bilabiadas.

Os capítulos podem conter só flores hermafroditas, só femininas nos bordos e hermafroditas nos discos ou femininas nos bordos e masculinas nos discos ou então, só contêm flores masculinas ou só femininas em plantas dióicas, além da presença de brácteas externas, também bractéolas para cada flor, como é o caso, por exemplo, em *Calea*, e aí dizemos que o receptáculo é paleáceo (JOLY, 1966). As flores ainda são do tipo pentâmeras com cálice profundamente modificado, transformado no papilho (*Pappus*) e servindo à disseminação do fruto.

O papilho pode ser piloso ou às vezes espinhoso. A corola é pentâmera, com 5 lobos iguais ou então ligulada ou bilabiada e o androceu é formado por 5 estames férteis, com filetes livres e anteras, introsas, soldadas em um tubo que é atravessado pelo estilete; o ovário é sempre ínfero, bicarpelar, unilocular, com um único óvulo ereto; o estilete apresenta-se freqüentemente com um anel de tricomas, logo abaixo da bifurcação e o fruto é seco indeiscente, tipo aquênico, disperso pelo vento ou excepcionalmente ficando encerrado no capítulo, que então tem brácteas duras e espinhosas (*Xanthium, Arctium*) (JOLY, 1966).

Exemplos comuns entre nós são as inúmeras espécies de *Vernonia*, *Piptocarpha*, pequenas árvores dos campos; *Elephantopus*, ervas com folhas em rosetas e escapo floral com capítulos brancos; *Helianthus*, o popular girassol, com sementes oleaginosas e enormes capítulos, entre outras (JOLY, 1966).

3.1.3- Importância

A família é de grande importância econômica, incluindo alimentos e plantas agroindustriais (alface, chicória ou escarola, alcachofra, girassol), ornamentais (dália, crisântemo, margarida), ervas medicinais (camomila, taráxaco, picão, artemísia), ervas daninhas importantes (dente-de-leão, cardo) incluindo a espécie venenosa *Senecio jacobaea,* responsável por muitas mortes de animais domésticos. Algumas das poucas árvores maiores como *Montanoa revealii* são cortadas para madeira (JOLY, 1966; BREMER, 1994).

Os gêneros *Tanacetum* e *Pulicaria* contêm espécies com propriedades inseticidas e o gênero *Ambrosia* apresenta as principais espécies causadoras de febres (JUDD, 1999).

3.1.4- Substâncias do metabolismo secundário de Asteraceae

Entende-se como metabolismo o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula, tendo as enzimas específicas papéis importantes no direcionamento dessas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas.

Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas respectivamente são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (SIMÕES, 2001; SIMÕES, 2004). Estas reações visam, primariamente, o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula: energia (derivada basicamente de ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese das substâncias essenciais a sua sobrevivência (macromoléculas celulares).

Substâncias essenciais à vida de um organismo como as macromoléculas de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos têm sido definidas como integrantes do metabolismo primário, constituindo, tradicionalmente, o conteúdo das disciplinas de bioquímica.

Vegetais, microorganismos e, em menor escala, animais, entretanto, apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Neste grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo correspondente, específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (WINK, 1990).

A todo este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o

organismo produtor, garantem vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema.

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, entretanto, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. De fato, já foram reconhecidas como funções de várias substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra os raios ultravioletas, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (WINK, 1990) e em alelopatias (HARBORNE, 1988).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza, segundo RHODES (1994), é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração, principalmente. Assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, freqüentemente, apresentam atividades biológicas interessantes.

Os metabólitos secundários são de grande importância ao homem, pois permitem estudos de rotas biossintéticas que podem trazer novos avanços em conhecimentos técnico-científicos em áreas diversas como de química, física e biociências. Favorecem ainda pesquisas de sínteses de novos fármacos, baseados em estruturas e atividades biológicas.

Quimicamente, a família Asteraceae apresenta uma diversidade ampla de metabólitos secundários, despertando assim um grande interesse econômico mundial em seu estudo. Os flavonóides, as lactonas sesquiterpênicas baseadas em terpenóides, os poliacetilenos derivados de ácidos graxos e os frutanos polissacarídeos são alguns compostos que podem ser mencionados, característicos desta família (HEYWOOD, 1977). Estes últimos são distintivos na bioquímica de Asteraceae, pois são polissacarídeos incomuns que se baseiam em frutose em vez de glicose, que é mais comum em outras famílias de plantas; são conhecidos também como inulinas.

Os poliacetilenos correspondem a um amplo grupo de metabólitos secundários não nitrogenados. Esses compostos estão relacionados a algumas famílias como Asteraceae, Apiaceae, Pittosporaceae, Campanulaceae, Goodeniaceae e Caprifoliaceae (JUDD, 1999).

Os terpenóides também correspondem a um amplo grupo de compostos secundários de importância em numerosas interações bióticas. São amplamente distribuídos e muitos têm funções fisiológicas primárias, podendo ser originados a partir de pigmentos carotenóides e hormônios, como ácido giberélico e ácido abcísico (JUDD, 1999).

A distribuição de alguns tipos de terpenóides é taxonomicamente importante. Assim, monoterpenóides e sesquiterpenóides constituem os maiores componentes do óleo essencial, característicos de algumas espécies das famílias, Myrtaceae, Rutaceae, Apiaceae, Lamiaceae, Verbenaceae e Asteraceae, que não ocorrem somente em tecidos vegetais (em cavidades ou canais no tecido parenquimático), mas também em glândulas florais onde funcionam como atrativos para insetos (JUDD, 1999).

Entende-se como lactonas sesquiterpênicas, os terpenóides com 15 átomos de carbono, distinguíveis quimicamente de outros sesquiterpenóides pela presença de um sistema α-metileno γ-lactônico (SEAMAN, 1982; IVIE e WITZEL, 1983; HARBORNE e TURNER, 1984). Primariamente, são classificados de acordo com o tipo de esqueleto carbocíclico em: germacranólidos, pseudoguaianólidos, eudesmanólidos e guaianólidos (PICMAN, 1986).

A estes terpenóides, atribuem-se várias atividades biológicas, tais como: antiinflamatória, citotóxica, antitumoral, bactericida, fungincida e antiúlcera (RODRIGUEZ, 1977; PICMAN, 1986; ROBLES *et al.*, 1995; HEINRICH *et al.*, 1998).

As lactonas sesquiterpênicas são bastante conhecidas em Asteraceae (onde são diversas e taxonomicamente úteis) e podem ocorrer em outras famílias como as Apiaceae, Magnoliaceae e Lauraceae (JUDD, 1999).

A figura 1 mostra as principais rotas de produção de metabólitos secundários em Asteraceae, de acordo com BOHLMANN (1976). As figuras 2 e 3 ilustram as lactonas sesquiterpênicas encontradas na família Asteraceae, segundo HERS

(1973) e HEGNAUER (1964), respectivamente. A figura 4 mostra algumas estruturas triterpênicas comuns na família, de acordo com HEGNAUER (1964).

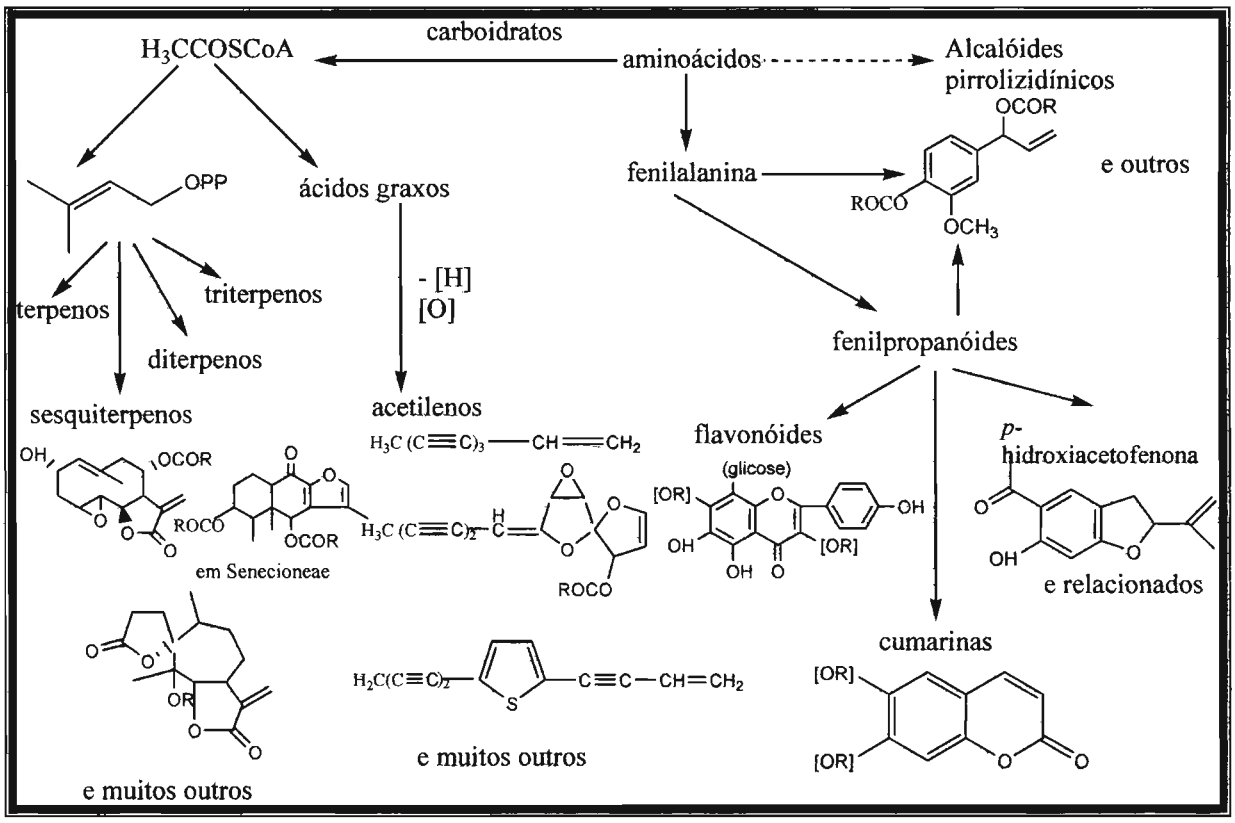


Figura 1: Rotas principais de produtos naturais de Asteraceae (BOHLMANN, 1976).

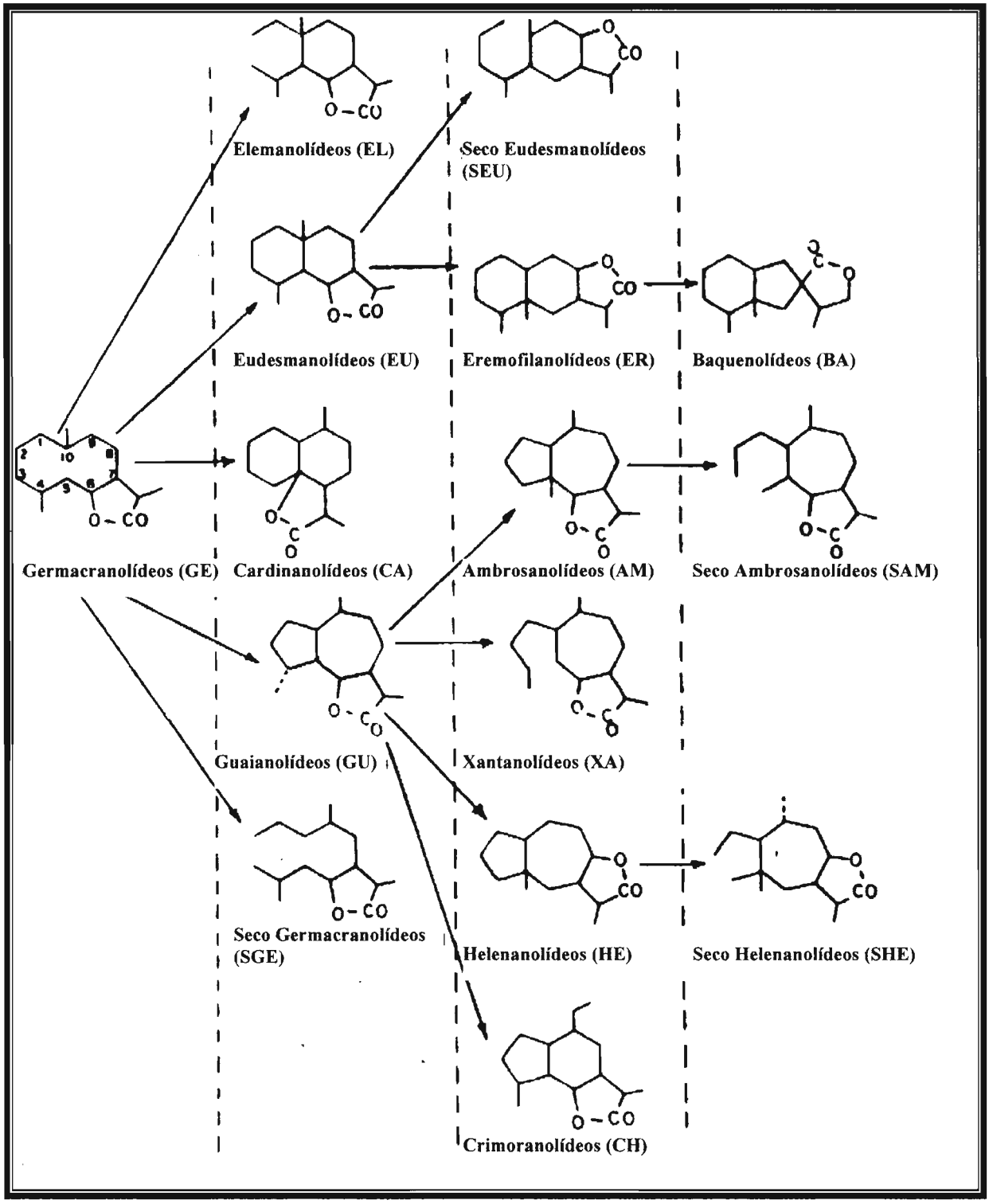


Figura 2: Classes estruturais de lactonas sesquiterpênicas encontradas em Asteraceae (HERZ, 1973).

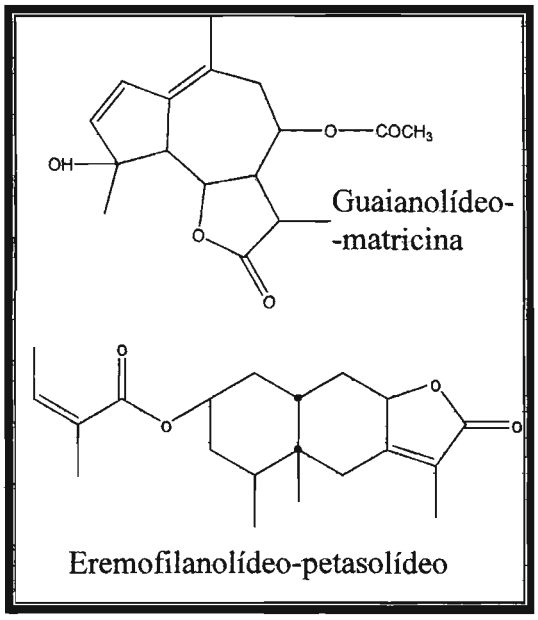


Figura 3: Lactonas sesquiterpênicas de Asteraceae (HEGNAUER, 1964).

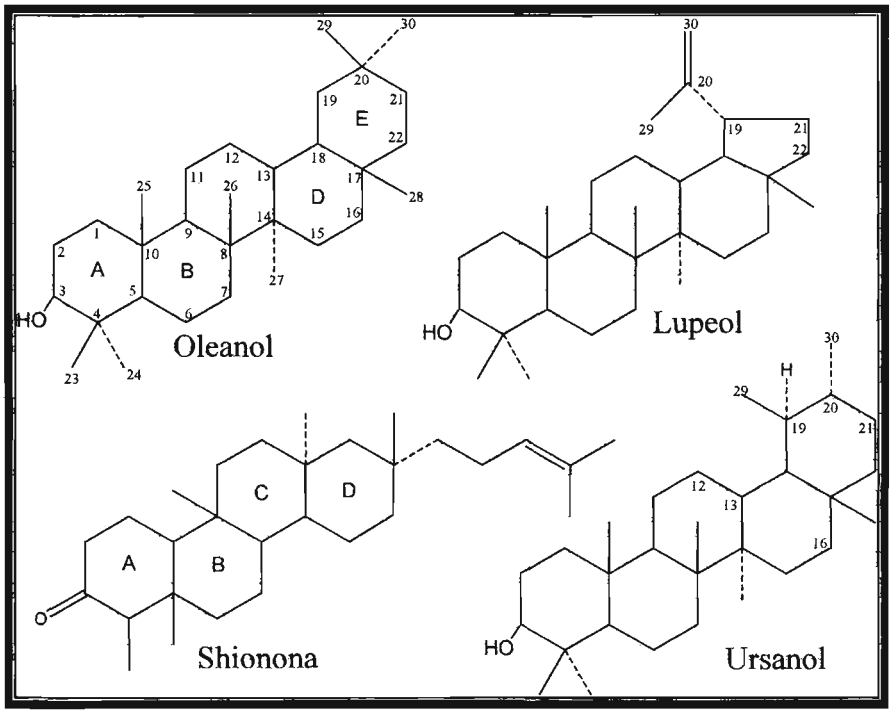


Figura 4: Algumas estruturas triterpênicas de Asteraceae (HEGNAUER, 1964).

Em relação ao óleo essencial, membros das Asteraceae, com exceção da Cichorieae, produzem esta substância que são depositadas no interior de tricomas glandulares ou ductos esquizógenos em quantidades apreciáveis. Além dos monoterpenóides e dos sesquiterpenóides como constituintes deste óleo, fazem parte da composição, os fenilpropanóides, acetilenos e cromonas (HEGNAUER, 1964). A figura 5 ilustra alguns componentes do óleo essencial de plantas pertencentes a esta família, de acordo com o mesmo autor.

O ácido 3,4-dihidroxicinâmico, conhecido comercialmente como ácido caféico [$(HO)_2C_6H_3CH{=}CHCO_2H$], é um composto fenólico que está entre os componentes em maior quantidade nesta família de vegetais. Está normalmente presente como uma mistura de ácidos clorogênico, incluindo cinarina e algumas vezes como ácido chicórico (HEGNAUER, 1964). Alguns compostos fenólicos e fenilpropanóides de Asteraceae podem ser vistos na figura 6.

A partir de extratos de ervas medicinais de uso popular, utilizados no combate aos mais diferentes tipos de doenças, podem ser isolados inúmeros metabólitos com atividades biológicas cientificamente comprovadas, como os antivirais (*Calendula arvensis*, saponinas triterpenóides), (TOMASI, 1991), antitumorais (*Helianthella quinquinervis*, o benzofurano 6-metoxi-trimetil-ona), analgésicos e antiinflamatórios (*Cirsium subcoriaceum*, o flavonóide pectoliarina), antibacterianos, antimaláricos (*Artemisia annua*, a lactona sesquiterpênica artemisinina; *NGO et al.*, 1997), antileishmaniose (*Jasonia glutinosa*, o sesquiterpeno [11R]-eudesm-4 (14)-eno-5, 11-12-diol (VILLAESCUSA-CASTILLO *et al.*, 2000) e antifúngicos (*Senecio pampae*, furanoeremofilanos). Tais metabólitos servem como padrões ou protótipos para desenvolvimento de seus derivados, bem como de sua síntese.

São também comuns na família algumas ervas que agem como inseticidas naturais, pois contêm alcamidas especiais como a *Spillanthes mauritiana*, (JONDICO, 1986); piretrinas e ésteres de piretrolona, substâncias existentes nas flores do *Chrysanthemum* (*Pyrethrum*) *cinerariaefolium*, valendo a pena ainda mencionar que inseticidas piretróides são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à da piretrina: aletrina, resmetrina, decametrina, cipermetrina e fempropanato.

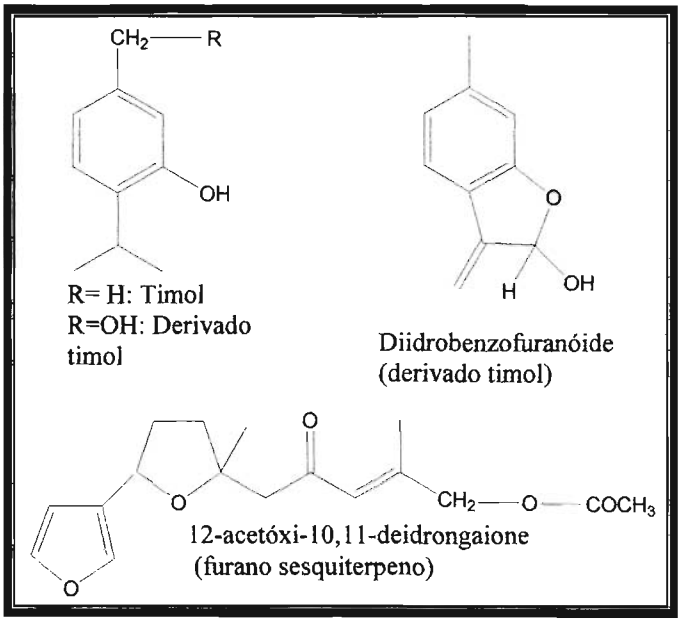


Figura 5: Alguns componentes do óleo essencial de Asteraceae (HEGNAUER, 1964).

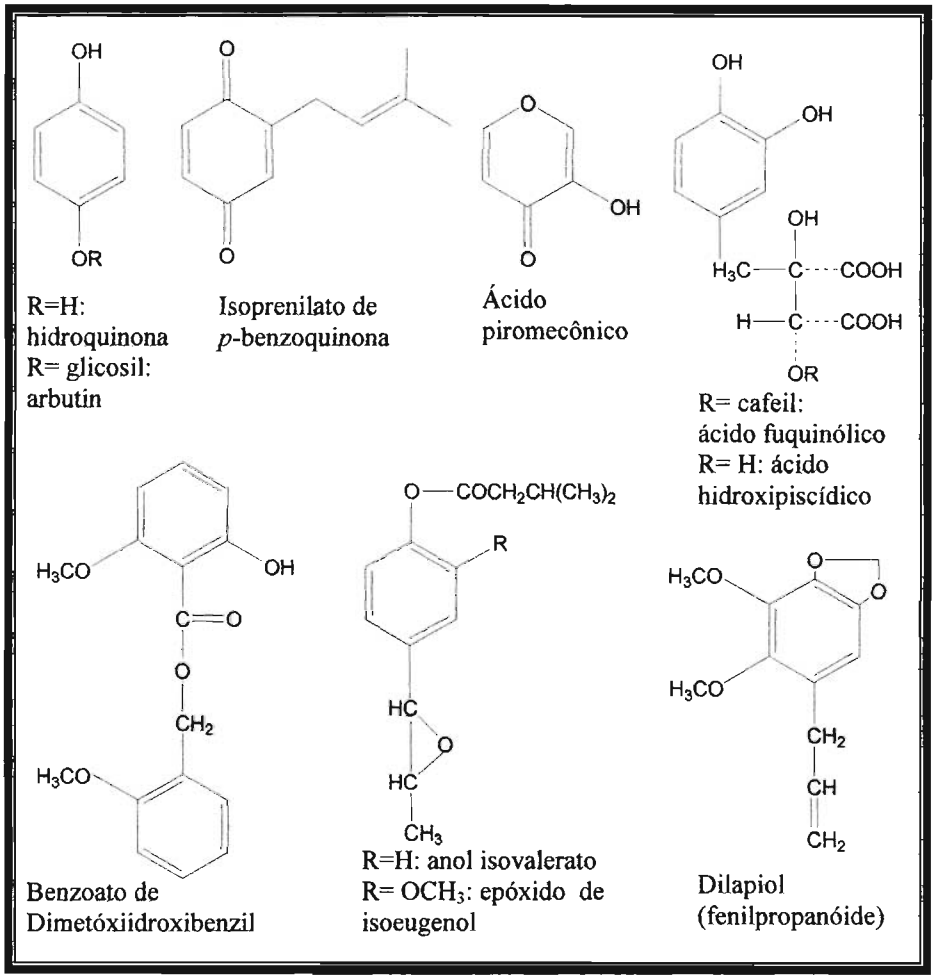


Figura 6: Alguns componentes fenólicos, fenilpropanóides de Asteraceae (HEGNAUER, 1964).

3.2- Revisão do gênero *Acanthospermum* (INDEX KEWENSIS)

Espécies descritas do gênero *Acanthospermum*:

ACANTHOSPERMUM, Schrank, Pl. Rar. Hort.
Monac, t. 53 (1819). *COMPOSITAE*, Benth. & Hook. F. ii. 349.
Centrospermum, H. B. & K. Nov. Gen. Et Sp. Iv. 270. t.397 (1820)
Echinodium, Poiteau, ex Cass. In Dict. Sc. Nat. Lix. 235 (1829)
ORCYA, Vell. Fl. Flum.344 (1825).

brasilium , Schrank, Pl, Rar. Hort. Monac. Ii. 53.-Bras.

hirsutum, DC. Prod. V. 522 = *brasilum*.

hispidum, DC. I. c. 522—Bras.

humile, DC. I. c. 522—Ind. occ.

xanthioides, DC. I. c. 521 = *brasilum*.

3.3- A espécie *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

Figura 7: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze.

3.3.1- Estudos botânicos

3.3.1.1- Posição taxonômica

De acordo com o sistema de Cronquist (CRONQUIST, 1996), a espécie *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze tem a seguinte posição taxonômica:

Divisão:	Magnoliophyta Cronquist, Takhtajan,
Classe:	Magnoliopsida ("Magnoliate") Cronquist
Ordem:	Asterales
Família:	Asteraceae (Compositae)
Sub-família:	Asteroideae
Tribo:	Heliantheae
Sub-tribo:	Helianthinae
Gênero:	*Acanthospermum*
Espécie:	*Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

3.3.1.2- Denominação vulgar e científica

Denominação vulgar: carrapichinho, cordão de sapo, carrapicho miúdo, marôto, chifrinho, picão da prata (LORENZI, 2000), picão da praia e poejo da praia (MORS, 2000, PENNA, 1941), espinho de agulha, erva-mijona, erva-mineira (MORS, 2000), carrapicho-rasteiro e amor de negro (LORENZI, 2000; MORS, 2000, PENNA, 1941), carrapicho de carneiro e mata-pasto (LORENZI, 2000; MORS, 2000), retirante (PENNA, 1941), tapecue (SHIMIZU, 1987).

Denominação científica: *Acanthospermum brasilium* Schrank, *Melampodium australe* Loef., *Centrospermum xanthioides* H.B.K. e *Oreya adhaerescens* Vell. (CORRÊA, 1984, LORENZI, 2000), *Acanthospermum hirsutum* DC., *Echinodium prostatum* Poit. e *Acanthospermum obtusifolium* DC. (LORENZI, 2000), *Acanthospermum xanthioides* DC (CORRÊA, 1984, PENNA, 1941, LORENZI,2000) *Melampodium divaricatum, Plumbago littoralis* e *Acanthospermum hispidum* D.C (PENNA, 1941).

3.3.1.3- Características morfológicas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

Trata-se de uma erva daninha muito comum em lavouras novas de cerrados e campos e é considerada como planta medicinal (LORENZI, 2000), desenvolvendo-se ainda melhor em terrenos arenosos do litoral (CORRÊA, 1984).

Possui como características gerais ser uma planta anual, herbácea, prostrada (CORRÊA, 1984, LORENZI, 2000), caules pubescentes e arroxeados medindo 20 a 40 cm de comprimento (LORENZI, 2000) ou até 1 m (CORRÊA, 1984; PENNA, 1941), com reprodução por sementes.

Suas folhas são opostas (CORRÊA, 1984; PENNA, 1941; LORENZI, 2000), membranosas, denteadas e pilosas (CORRÊA, 1984), pubescentes e glandulosas (LORENZI, 2000), medindo 1 a 4 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura (LORENZI, 2000) ou até 3 cm de comprimento por igual largura (CORRÊA, 1984).

O pecíolo é curto, de aproximadamente 1 cm, pilosos na base (LORENZI, 2000; CORRÊA, 1984); suas inflorescências são axilares, em forma de capítulos solitários e curto-pedunculados, contendo pequenas flores amareladas (LORENZI, 2000).

3.3.1.4- Propriedades medicinais de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

A parte empregada na medicina popular são as partes aéreas ou mesmo a planta inteira, sendo a infusão e a decocção os métodos de extração mais utilizados (PENNA, 1941).

As folhas apresentam propriedades amarga e aromática (CORRÊA, 1984; PENNA, 1941; LORENZI, 2000), tônica, diaforética, mucilaginosa e antidiarréica (CORRÊA, 1984; PENNA, 1941; LORENZI, 2000, MORS, 2000), antiblenorrágica, sendo usadas em casos de irisipela (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2000; MORS, 2000), antimalárica, anemia e doenças do sistema urinário (MORS, 2000). É ainda muito utilizada contra febres palustres e intermitentes (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2000), assim como para tratamento da tosse, bronquite, moléstias do fígado e como expectorante (PENNA, 1941).

GARCIA-BARRIGA (1975) informa em seu trabalho que o extrato da planta inteira de *A. australe* tem sido usado na Colômbia, no tratamento do câncer.

Os homeopatas empregam as folhas para a tintura que, com o nome de *Plumbago littoralis*, tem sido usada nos casos de palpitações, vertigens, reumatismo articular e muscular e afecções do peito (PENNA, 1941).

3.3.1.5- Componentes isolados e ações farmacológicas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

Partes aéreas contêm numerosas lactonas sesquiterpênicas e diterpênicas (HERZ, 1973; BOHLMANN, 1976; MORS, 2000). O flavonóide, 5,7,4'-triidroxi-3,6-dimetoxi-flavona, com atividade inibitória da aldolase foi isolado a partir do fracionamento de um extrato hidroetanólico 70% de partes aéreas de *A. australe*, proveniente do Paraguai (SHIMIZU *et al.*, 1987). Outras substâncias obtidas pelos mesmos autores foram o trifolina, hiperina rutina, quercetina e ácido caféico.

Extratos brutos de *A. australe* testados em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* e testados *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* mostraram ser ativos (CARVALHO, 1991).

Extratos de *A. australe* forneceram muitos melampolídeos, um subgrupo de germacranolídeo e flavonóides (BOHLMANN *et al.*, 1984; ZDERO, *et al.*, 1987). Alguns deles têm sido caracterizados por atividade antineoplásica (HERZ, 1975);

MATSUNAGA *et al.* (1996) isolaram uma substância antineoplásica denominada de acanthostral (cis, cis, cis-germacranolídeo) a partir de um extrato benzênico de "Tapecué" (*A. australe*), coletada no Paraguai. Vários diterpenos (HERZ, 1981), acanthospermal A, timol, isotimol etc. têm sido isolados desta planta (BOHLMAN *et al.*, 1984).

3.3.1.6- Distribuição geográfica de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

No Brasil ocorre em Goiás, do Piauí até o Rio Grande do Sul e Minas Gerais (PENNA, 1941). A correção das condições de fertilidade do solo geralmente leva à diminuição do nível de infestação. Ocorre também em pastagens e em outros tipos de solo, porém sua presença está sempre ligada a baixos índices de fertilidade dos mesmos (PENNA, 1941; CORRÊA, 1984; LORENZI, 2000).

Figura 8: Distribuição geográfica do *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze (LORENZI, 2000).

3.3.1.7- Agentes antimaláricos de origem vegetal

A malária é a doença que mais prevalece no mundo, dentre aquelas causadas por insetos. É um exemplo clássico de doença que afeta a produtividade de indivíduos, de famílias e de toda sociedade, sendo mais comum em países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento (WHO, 1993; EKTHAWATCHAI, *et* al, 1999; SAXENA, 2003).

Na África, seu impacto é muito grande (WHO, 1993; EKTHAWATCHAI, *et* al, 1999). Outras áreas incluem o leste da Ásia, a China e a Índia. Pesquisadores estimam que mais de 40% de casos de malária que ocorrem na Índia são causadas por *Plasmodium falciparum* (KUMAR, 1994).

A primeira droga antimalárica descoberta foi a quinina, isolada de cascas de espécies do gênero *Cinchona* (Rubiaceae) em 1820. Em 1940, uma outra droga antimalárica, a cloroquina, foi sintetizada (BHAREL *et al.*, 1996). Este antimalárico, amplamente disponível mundialmente que outrora foi considerado o principal controlador da doença, é hoje, ineficaz na maioria da malária provocada por *P. falciparum* de áreas endêmicas (WHO, 2006).

Tratamentos da malária resistentes à cloroquina, foram feitos com fármacos alternativos ou combinações de fármacos, que mostraram ter alto custo e algumas vezes, tóxicos. Além disso, essas combinações não foram sempre baseadas na farmacocinética dos princípios ativos devido aos poucos conhecimentos sobre o mecanismo de ação da maioria dos fármacos antimaláricos (SAXENA, *et al*, 2003). Por esta razão, grupos de pesquisa estão se desempenhando atualmente para desenvolver novos compostos ativos como uma alternativa para a cloroquina.

A descoberta da Qinghaosu, conhecida como artemisinina, inspirou a investigação de alguns outros peróxidos de ocorrência natural por suas atividades esquizonticidas (KLAYMAN, 1985). Esta substância é uma lactona sesquiterpênica com atividade antimalárica, isolada das folhas e inflorescências da *Artemisia annua* Linné (Asteraceae). A pouca hidrossolubilidade da artemisinina constituiu, talvez, o maior problema das indústrias farmacêuticas que desenvolveram várias posologias, vias de administração e derivados mais potentes desta substância no intuito de solucionar o problema; o mais promissor é o seu derivado éter metílico artemeter (ROBBERS, *et al.*, 1997), que apresentou atividade também em *Schistosoma mansoni* (ARAÚJO *et al.*, 1991).

A mortalidade anual, estimada a mais de um milhão de pessoas, vem subindo, provavelmente devido ao aumento da resistência do protozoário aos fármacos. O controle da malária requer uma integridade aproximada compreendendo prevenção que inclui o controle do vetor e tratamentos com antimaláricos efetivos (WHO, 2006).

Devido ao fato dos dois principais agentes antimaláricos (quinina e artemisinina) serem de origem vegetal, a busca por componentes ativos oriundos de plantas têm sido uma constante mundial (SAXENA, *et al.*, 2003).

A seguir, apresentar-se-ão alguns resultados de estudos com espécies vegetais que apresentaram alguma atividade contra o protozoário da malária:

- Em 1995, VALSARAJ *et al.* avaliaram as espécies vegetais *Garcinia gummigutta* (Guttiferae) e *Mammea longifolia* (Guttiferae) contra o parasita da malária, sensíveis e resistentes à cloroquina na concentração de 100 mg/mL. A porcentagem da inibição de crescimento induzida por *Garcinia* e *Mammea* foram, respectivamente, 99.5% e 86%.

- Uma atividade antimalárica *in vivo* do extrato alcaloídico total de *Golipea longiflora* tem sido confirmada em roedores infectados com *P. vinckei patteri*, quando do tratamento oral com uma dose de 50 mg/Kg do extrato (GANTIER, *et al.*, 1996.).

- Um novo alcalóide dibenzilisoquinolínico, nomeado como (+)-2-*N*-metiltelobino, foi isolado de *Stephania erecta* (Menispermaceae), que inibiu o crescimento de cultura de cepas sensíveis e resistentes à cloroquina (VALSARAJ, *et al.*, 1995). Verificou-se também que o alcalóide augustina, isolado de *Strychnopsis thouarsi* e *Spirospermum penduliflorum* exibiu significante atividade antimalárica (RATSIMAMANGA-URVERG, *et al.*, 1992).

- Um extrato aquoso proveniente da decocção de cascas de raízes de *Uapaca nitida* (Euforbiaceae) é usado na Tanzânia no tratamento da malária. Extrato alcoólico de cascas de raízes dessa espécie mostrou atividade antimalárica contra *P. berghei* em roedores (KIRBY, *et al.*, 1993).

- Flavonóides isolados de *Artemisia annua* não demonstraram ser ativos contra *P. falciparum*, mas demonstraram um efeito de potencialização seletiva sobre a atividade da artemisinina (LIU, *et al.*, 1992).

- O extrato etanólico de *Garcinia dulcis* (Guttiferae) forneceu 5 xantonas, sendo que uma delas, a garciniaxantona, apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *P. falciparum* com valor de IC_{50} igual a 0.96µg/mL (LIKHITWITAYAWUID, *et al.*, 1998).

- O óleo essencial de folhas e caules de *Tetradenia ripari* mostrou moderada atividade antimalárica contra duas cepas de *P. falciparum* (CAMPBEL, *et al.*, 1997).

- LOPES, *et al.* (1999) mencionam que o óleo essencial de folhas de *Virola surinamensis*, coletadas na ilha de Combú, próximo a Belém-Pará, apresentou

excelente atividade antimalárica *in vitro*, sendo esta atividade atribuída ao sesquiterpeno nerolidol.

- MILHAN *et al.* (1997) avaliaram os óleos essenciais de *Artemisia vulgaris, Eucalyptus globulus, Myrtus comunis, Juniperus comunis, Lavandula angustifoia, Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis*, contra duas cepas de *P. falciparum*, FcB1-Columbia e uma cepa Nigeriana resistente à cloroquina. Os melhores resultados foram obtidos com óleos de *Myrtus comunis* e *Rosmarinus officinalis* que inibiram 50% do crescimento do parasita, *in vitro*, nas concentrações compreendidas entre 150 µg/mL a 270 µg/mL.

Material e Métodos

4- Material e Métodos

4.1- Aspectos botânicos
4.1.1- Coleta e identificação
4.1.2- Caracterização macroscópica de folha
4.1.3- Caracterização microscópica de folha e caule
4.2- Aspectos químicos
4.2.1-Triagem fitoquímica
4.2.2- Ensaios para o óleo essencial
4.2.3- Preparação dos extratos
4.2.3.1- Extratos aquosos
4.2.3.2- Extrato hidroetanólico 70% e Extrato Hidroetanólico Liofilizado (EHL)
4.2.3.3- Extratos hexânico e clorofórmico
4.2.3.4- Extrato acetona:água
4.2.4- Aplicação dos extratos em CCD
4.2.5- Isolamento do componente comum a todos os extratos por CCD preparativa
4.2.6- Isolamento de um componente comum aos extratos clorofórmico e hexânico por CCD preparativa
4.2.7- Doseamento de taninos na droga vegetal e no extrato hidroetanólico liofilizado (EHL)
4.2.8- Determinação de água no pó da droga e no EHL
4.3- Aspectos farmacológicos
4.3.1- Atividade antimalárica e antileishmania dos extratos hidroetanólico liofilizado (EHL) e clorofórmico
4.3.2- Atividade antiúlcera aguda
4.3.3- Atividade antimicrobiana do EHL em bactérias, leveduras e bolor

4.1- Aspectos botânicos

4.1.1- Coleta e identificação

O material vegetal correspondente às partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze utilizada para os estudos botânico, químico e farmacológico foi coletado em três momentos diferentes, no Sítio Toyota, perímetro urbano da cidade de Iacri, situada a 540 Km da cidade de São Paulo, em janeiro de 2003, outubro e novembro de 2005. O vegetal em questão apresentava-se em fase de floração e frutificação. As condições do tempo, assim como o horário da coleta foram levadas em consideração (OLIVEIRA e AKISUE, 1991).

O vegetal foi identificado pelas botânicas, Dra. Rosângela Simão Bianchini, do Instituto Botânico de São Paulo, Seção de Curadoria do Herbário e por Rejane Esteves, do Departamento de Botânica do Horto Florestal – SP, e também pelo professor da Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, SP, Dr. Fernando de Oliveira. A exsicata foi depositada no Instituto Botânico de São Paulo sob número SP 366743.

O material foi dividido em duas partes, sendo uma destinada ao estudo morfológico e anatômico e a outra destinada aos ensaios químicos e farmacológicos.

4.1.2- Caracterização macroscópica de folha

Folhas adultas, frescas e secas, de vários tamanhos, foram analisadas quanto à dimensão, forma, aspecto da superfície, cor, odor, sabor, entre outras características consideradas importantes para a diagnose da droga (OLIVEIRA e AKISUE, 2000). Para tanto, o material foi observado a olho nu ou através de lupa de pequeno aumento e as medidas foram obtidas com régua e paquímetro.

4.1.3- Caracterização microscópica de folha e caule

Executou-se o estudo anatômico da folha mediante a elaboração de cortes à mão livre, no terço médio inferior do órgão conservado em etanol 70%, de acordo com as técnicas usuais (OLIVEIRA e AKISUE, 2000). O estudo do caule foi obtido a partir de cortes realizados em brotos apicais, na região de estrutura primária (OLIVEIRA e AKISUE, 2000).

Os cortes foram submetidos à dupla coloração com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1962) ou com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1965). Testes histoquímicos foram também realizados, empregando-se as soluções de floroglucina clorídrica (SASS, 1951) para estruturas lignificadas; lugol (BERLYN e MIKSCHE, 1976) para amido; reagente Sudan IV (FOSTER, 1949) para substâncias lipofílicas; azul de metileno (OLIVEIRA e AKISUE, 2000) para mucilagem; cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para compostos fenólicos e ácido sulfúrico (OLIVEIRA e AKISUE, 2000) para evidenciar a natureza química dos cristais. As fotomicrografias foram obtidas através de aparelho Nikon®, utilizando-se escalas nas seguintes condições ópticas: 40 vezes: barra de 0,4 cm equivalendo a 100 µm; 100 vezes: barra de 1,1 cm equivalendo a 100 µm; 200 vezes: barra de 1,1 cm equivalendo a 50 µm; 400 vezes: barra de 1,1 cm equivalendo a 25 µm.

4.2- Aspectos químicos

As folhas e caule do vegetal foram submetidos à secagem, em estufa, com circulação de ar, à temperatura de 40-45 °C, por 24 horas, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de facas e martelos, obtendo-se pó semi-fino (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.1- Triagem fitoquímica

Realizaram-se os ensaios fitoquímicos em triplicata com folhas e caules do vegetal à pesquisa de alcalóides (COSTA, 1978, DOMINGUES, 1973, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959), saponinas (COSTA, 1978), glicosídeos cardiotônicos (COSTA, 1978, DOMINGUES, 1973), antraderivados (COSTA, 1978, DOMINGUES, 1973), flavonóides (COSTA, 1978, GRAYER, 1989), mucilagens (COSTA, 1978), taninos e outros compostos fenólicos (COSTA, 1978, GRAYER, 1989, FARMACOPÉIA, 1959, SPENCER, 1988), além de óleo essencial (COSTA, 1978). Os mesmos procedimentos foram realizados com as drogas-padrão contendo altas concentrações de cada grupo de princípio ativo.

A tabela 3 mostra todos os ensaios fitoquímicos realizados com as partes aéreas da espécie em estudo.

Tabela 3: Ensaios para detecção de grupos de princípios ativos em partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze.

Grupos de princípios ativos	Reações
Alcalóides	- Reação de Bertrand - Reação de Mayer - Reação de Dragendorff - Reação de Bouchardat
Flavonóides	- Reação de Shinoda - Reação com cloreto de alumínio - Reação com hidróxidos alcalinos
Saponinas	*- Teste de espuma
Taninos e compostos fenólicos	*- Adstringência - Reações com sais de ferro - Reação com acetato de chumbo - Reação com acetato de cobre - Reação com alcalóides - Reação com gelatina
Antraderivados	- Pesquisa de compostos antraquinônicos livres e combinados
Glicosídeos cardiotônicos	**- Do núcleo esteroidal:** - Reação de Liebermann-Burchard **- Do anel lactônico pentagonal:** - Reação de Kedde - Reação de Baljet **- De 2-desoxiaçúcares:** - Reação de Keller-Killiani
Mucilagens	*- Índice de Intumescimento (I.I)
Óleo essencial	*- Verificação de odor

* Foram obtidos sem o uso de reativos químicos.

4.2.2- Ensaios para o óleo essencial

O óleo essencial das folhas frescas proveniente de duas coletas (outubro/2005 e novembro/2005), assim como da droga pulverizada, constituída de folhas e caules e droga pulverizada constituída somente de caule, coletadas em janeiro de 2003, foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado (WASICKY e AKISUE 1969), por aproximadamente 6 horas. Para estes procedimentos foram hidrodestiladas 400 g de folhas frescas e 150 g de droga.

Os rendimentos foram calculados e o óleo foi acondicionado em frasco âmbar e conservado em geladeira, sendo posteriormente submetido a ensaios em cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em camada delgada preparativa (CCD preparativa) e análise de seus componentes em cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massa, com banco de dados (CG/EM).

Os dados do aparelho e as condições de análise deste trabalho de pesquisa são mostrados a seguir:

A- Análise do óleo essencial da droga constituída de folhas e caules coletadas em janeiro de 2003, quando o vegetal encontrava-se em fase final de frutificação:

- Dados do aparelho:
Marca Shimadzu QP 5050 A (CG/EM);

- Condições da análise:
Solvente: Diclorometano (CH_2Cl_2);
Temperatura do forno: 100°C;
Temperatura do injetor: 230°C;
Temperatura da interface: 280°C;
Gás carreador: Hélio;
Coluna: DB-5 (5% fenil, metil polisiloxano, 30 m x 0,32 mm);
Rampa: início a 100°C por 3 minutos e velocidade de 5°C/min até alcançar 280°C, permanecendo por mais 10 minutos; tempo total da análise: 49 minutos.

B- Análise do óleo essencial da droga constituída de caules coletados em janeiro de 2003, quando o vegetal encontrava-se em fase final de frutificação:

- Dados do aparelho:

Marca Shimadzu QP 5050 A (CG/EM);

- Condições da análise:

Solvente: Diclorometano (CH_2Cl_2);

Temperatura do forno: 100°C;

Temperatura do injetor: 230°C;

Temperatura da interface: 280°C;

Gás carreador: Hélio;

Coluna: DB-5 (5% fenil, metil polisiloxano, 30 m x 0,32 mm);

Rampa: início a 100°C por 3 minutos e velocidade de 5°C/min até alcançar 280°C, permanecendo por mais 10 minutos; tempo total da análise: 49 minutos.

C- Análise do óleo essencial de folhas frescas coletadas em outubro e novembro de 2005, quando o vegetal encontrava-se, respectivamente, em fase de floração e início de frutificação:

- Dados do aparelho:

Marca Shimadzu QP 5050 A (CG/EM);

- Condições da análise:

Solvente: Diclorometano (CH_2Cl_2);

Temperatura do forno: 100°C;

Temperatura do injetor: 280°C;

Temperatura da interface: 320°C;

Gás carreador: Hélio;

Coluna: DB-5 (5% fenil, metil polisiloxano, 30 m x 0,32 mm);

Rampa: início a 60°C por 1 minuto e velocidade de 10°C/min. até alcançar 280°C, permanecendo por mais 5 minutos; de 280°C até 320°C na velocidade de 20°C/min., permanecendo a 320°C durante 10 minutos.

4.2.3- Preparação dos extratos

4.2.3.1- Extratos aquosos

Os extratos aquosos foram obtidos de duas formas: 1º- a fração aquosa utilizada na extração do óleo essencial, conforme citado no item 4.2.2, foi reservada para estudo de composição química. Este extrato foi submetido a um processo de liofilização e o seu rendimento calculado; 2º- uma amostra de 100 g de droga pulverizada foi levada à fervura por 30 minutos, em 1 litro de água. Deixou-se resfriar naturalmente o produto, sendo em seguida filtrado por papel de filtro. A operação foi efetuada por mais duas vezes, utilizando-se 1 litro de água, em cada uma. Os líquidos assim obtidos foram reunidos num mesmo frasco e, posteriormente, liofilizados. O rendimento do liofilizado foi calculado e ambos os extratos foram submetidos à análise em CCD.

4.2.3.2- Extrato hidroetanólico 70% e Extrato Hidroetanólico Liofilizado (EHL)

Uma amostra de 100 g de droga constituída por partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze foi percolada segundo o método descrito na Farmacopéia Brasileira (1959), empregando-se como líquido extrator, etanol 70%. O extrato hidroalcoólico assim adquirido foi concentrado em evaporador rotativo, sendo posteriormente submetido a um aparelho de liofilização, conseguindo-se finalmente o extrato hidroetanólico liofilizado (EHL), cujo rendimento foi calculado.

O EHL foi acondicionado em vidro âmbar e conservado em dessecador até o momento dos ensaios farmacológicos; o extrato hidroetanólico 70% foi submetido à análise em CCD e CG/EM.

4.2.3.3- Extratos hexânico e clorofórmico

Para se chegar aos extratos hexânico e clorofórmico, uma amostra de 50 g da droga pulverizada de partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl). O. Kuntze foi submetida a um processo de percolação, como no item anterior. Os extratos assim obtidos (percolados) foram concentrados em evaporador rotativo, e os rendimentos, calculados. Posteriormente, alíquotas foram aplicadas em

cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa, alcançando-se os respectivos perfis cromatográficos. O extrato clorofórmico foi ainda submetido à análise em CG/EM.

4.2.3.4- Extrato acetona:água

Uma amostra de 300 g de droga pulverizada foi percolada com uma associação de solventes, acetona:água (1:1) (HAGERMAN, 1988) de acordo com a mesma técnica empregada para obtenção dos extratos dos itens anteriores. O percolado foi concentrado até à secura, por evaporador rotativo, sendo calculado o seu rendimento; alíquotas deste extrato foram aplicadas em CCD e CG/EM

4.2.4- Aplicação dos extratos em CCD

Os perfis cromatográficos dos extratos clorofórmico e hexânico foram obtidos a partir da aplicação das respectivas amostras em CCD, no sistema cromatográfico 1 e os perfis cromatográficos dos extratos aquoso, acetona:água, clorofórmico e hidroetanólico, no sistema cromatográfico 2, conforme são apresentadas a seguir.

- Sistema cromatográfico 1:
Suporte: placa de vidro 20 X 20 cm
Adsorvente: sílica gel preparativa PF 254
Fase móvel: tolueno e acetato de etila (85:15)
Saturação: completa; percurso: 12 cm ascendente
Espessura da sílica: 800 μ
Revelador: anisaldeído sulfúrico

- Sistema cromatográfico 2:
Suporte: placa de vidro 20 X 20 cm
Adsorvente: sílica gel G254 de espessura 300 μ
Adsorvente: sílica gel preparativa PF 254 de espessura 1mm
Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26)
Saturação: completa; percurso: 12 cm ascendente; Revelador: NP/ luz UV 366 nm

4.2.5- Isolamento do componente comum a todos os extratos por CCD preparativa

Após aplicação dos extratos aquoso, acetona:água, clorofórmico e hidroetanólico no sistema cromatográfico 2, com espessura de sílica de 300 μ, observou-se a existência de um componente comum a todos os extratos. Assim, isolou-se o mesmo por cromatografia em camada delgada preparativa a partir da aplicação do extrato acetona:água 1:1 no sistema cromatográfico 2 com espessura de sílica de 1mm.

A fração isolada, assim como todos os outros extratos, foi analisada em CG/EM. Os dados do aparelho e as condições da análise são mostrados a seguir:

- Dados do aparelho:
Marca Shimadzu QP 5050 A (CG/EM);

- Condições da análise:
Coluna: DB-WAX (30 m x 0,25 mm);
Rampa: início a 60°C por 2 minutos e velocidade de 10°C/min. até 230°C.

4.2.6- Isolamento de um componente comum aos extratos clorofórmico e hexânico por CCD preparativa

Após aplicação dos extratos clorofórmico e hexânico no sistema cromatográfico 1, isolou-se um componente comum a esses extratos. Esta substância foi aplicada em aparelho CG/EM e seus espectros foram analisados. Os dados do aparelho e as condições da análise são mostrados a seguir:

- Dados do aparelho:
Marca Shimadzu QP 5050 A (CG/EM);

- Condições da análise:
Coluna: DB-5 (30 m x 0,25 mm);
Rampa: início a 60°C por 1 minuto e velocidade de 20°C/min. até 280°C, permanecendo por mais 10 minutos;
Fluxo da coluna: 4,9 mL/min.

4.2.7- Doseamento de taninos na droga vegetal e no extrato hidroetanólico liofilizado (EHL)

O doseamento de taninos na droga vegetal e no extrato hidroetanólico liofilizado foi realizado conforme preconizado pela EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2001). O resultado foi expresso em porcentagem de taninos e o método baseia-se na reação colorimétrica dos polifenóis com o ácido fosfomolibdotúngstico, utilizando-se como referência o pirogalol (Sigma).

Os ensaios foram realizados em triplicata.

Doseamento

À 0,750 g de droga vegetal foram adicionados 150 mL de água destilada. O conjunto foi aquecido em banho-maria por 30 minutos, resfriado e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL. Após a decantação dos sólidos, o conjunto foi filtrado por papel de filtro, e foram descartados os 50 mL iniciais do filtrado (F1). O mesmo procedimento acima descrito utilizando-se 0,300 g de extrato hidroetanólico liofilizado (F3), também foi feito.

Polifenóis totais

Quantidade de 5 mL de F1 foram diluídos com água destilada em um balão volumétrico de 25 mL. À 2 mL desta solução foram adicionados 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com a solução de carbonato de sódio. Após 30 minutos, fez-se a leitura da absorbância a 760 nm (A_1), usando água como branco.

Desenvolveu-se o mesmo procedimento utilizando-se o filtrado obtido a partir do extrato hidroetanólico liofilizado (F3).

Polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele

Quantidade de 10 mL de F1 foram adicionados a 0,10 g de pó de pele Merck. O conjunto foi levado à agitação em agitador magnético durante 1 hora e, em seguida foi filtrado através de papel de filtro. Cinco mililitros deste filtrado foram

diluídos com água destilada em balão volumétrico de 25 mL. À 2 mL desta solução foram adicionados 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com a solução de carbonato de sódio. Após 30 minutos, fez-se a leitura da absorbância a 760 nm (A_2), usando água como branco.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se o filtrado obtido a partir do extrato hidroetanólico liofilizado (F3).

Padrão

Imediatamente antes do uso, 50,0 mg de pirogalol (Merck) foram diluídos em água em um balão volumétrico de 100 mL. À 2 mL desta solução foram adicionados 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com a solução de carbonato de sódio. Após 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 760 nm (A_3), usando água como branco.

Cálculo

O teor de taninos foi calculado em porcentagem através da equação:

$$\% \text{ taninos} = \frac{62{,}5\,(A_1 - A_2)\,m_2}{A_3\,m_1}$$

Onde: A_1= valor de absorbância dos polifenóis totais a 760 nm; A_2= valor de absorbância dos polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele a 760 nm; A_3= valor de absorbância do padrão de pirogalol a 760 nm; m_1= massa da amostra analisada (droga vegetal ou extrato hidroetanólico liofilizado) em gramas; m_2= massa do pirogalol em gramas.

4.2.8- Determinação de água no pó da droga e no EHL

Quantidade de 2 g de droga vegetal e 2 g do extrato hidroetanólico liofilizado foram levados à estufa a 100 °C, separadamente, por 6 horas. Após resfriamento do cadinho de porcelana em dessecador, os mesmos foram pesados até que a massa entre as pesagens não diferisse em mais de 5 mg, em 3 pesagens consecutivas. A determinação de água foi calculada em porcentagem em relação à massa da amostra inicial através da fórmula:

$$Pd = \frac{mf \times 100}{mi}$$

Onde: Pd = determinação de água em porcentagem; mi = massa inicial da amostra em gramas; mf = massa final da amostra, após a secagem, em gramas.

4.3- Aspectos farmacológicos

4.3.1- Atividade antimalárica e antileishmania dos extratos hidroetanólico liofilizado (EHL) e clorofórmico

- Atividade antimalárica

Animais

O biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ofereceu os animais que foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. A infecção com *Plasmodium chabaudi* AJ., ocorreu em camundongos BALB/c fêmeas. Todos os procedimentos realizados tiveram aprovação prévia das comissões de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ensaio para determinação da CE_{50}

Camundongos BALB/c foram infectados com 1x 10^7 *P. chabaudi* AJ e avaliados diariamente quanto à parasitemia, utilizando-se esfregaços sanguíneos corados com Giemsa e visualizados em microscópio óptico. Quando se verificou a parasitemia de 15%, os animais sofreram sacrifício em câmara de CO_2 e o sangue

foi coletado através de punção cardíaca em tubo contendo solução de 50 μL de liquemine (anticoagulante). O material foi diluído em 3 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e posteriormente centrifugado a 200 G por 8 minutos, para separação das hemácias.

Após a contagem das hemácias em câmara de Neubauer, determinou-se a parasitemia e houve a aplicação de $5x10^6$ de Plasmodium/poço em placas de cultura de 96 poços, com volume final de 150 μL. Os compostos (5 mg), correspondente aos extratos hidroetanólico liofilizado e clorofórmico, foram previamente dissolvidos em DMSO e diluídos em meio de cultura RPMI 1640 na concentração de 100 μg/mL em triplicata. A placa foi incubada a 37°C em sistema "candle jar" (5% O_2, 5% CO_2, 90% N_2) por 6 horas e após este período adicionou-se 1 μCi/poço de [^{3}H] Hipoxantina (Amersham) por mais 18 h. Ao final, a placa foi lavada em Cell Harvester e o material radiativo aderido ao DNA foi coletado em fibra de vidro no mesmo aparelho.

A contagem da radiação foi determinada em triplicata em um Espectrômetro Cintilador Rack Beta WALLAC 1209. Utilizou-se o sulfato de cloroquina (16 μg/mL) como controle positivo do ensaio. Parasitas incubados na ausência de fármacos serviram como controle de viabilidade do ensaio. DMSO foi incubado nas mesmas concentrações com os parasitas para se verificar a ausência de toxicidade e conseqüentemente interferência no ensaio.

Analisaram-se os dados pelo softaware Graph Pad Prism 3.0, servindo-se de uma curva do tipo sigmóide dose-resposta.

- Atividade antileishmania

Cultura dos Parasitas

Cultivaram-se promastigotas *de Leishmania (L.) chagasi* (cepa M 6445) em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,25% de hemina e a 24°C. Hamsters Gold foram infectados periodicamente para manutenção da cepa, sendo utilizados nos ensaios as formas promastigotas de no máximo três passagens em cultura.

Ensaio de Viabilidade Celular- MTT

A viabilidade das formas promastigotas e macrófagos nos ensaios "*in vitro*", foram verificados pelo método do MTT (TADA *et al*, 1986). O MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo) é um cromógeno que age como substrato no processo respiratório oxidativo de mitocôndrias. Devido às desidrogenases mitocondriais da célula, este produto é reduzido a seu subproduto formazan. Assim, através da leitura da densidade óptica (D.O.) a 570 nm é possível quantificar as células viáveis do sistema utilizado.

O MTT, na forma de um pó amarelo fino, foi dissolvido em meio RPMI-PR$^-$ na concentração de 5mg/ml, e posteriormente esterilizado por filtração em membrana de 0,22μm. O MTT (20μl/poço) foi aplicado e a placa incubada na sua respectiva temperatura (24°C Leishmania e 37°C macrófagos peritoniais) por 4 horas. Após este período, adicionou-se 100μl/poço de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), e após 18 horas realizou-se a leitura da D.O. a 570nm, em espectrofotômetro Labsystems Multiskan MS.

Determinação da Concentração Efetiva 50% (CE_{50})

Utilizando-se promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* determinou-se a CE_{50} dos extratos, hidroetanólico liofilizado e clorofórmico, que indica a concentração necessária para matar 50% dos parasitas na cultura.

Diluiu-se o composto em análise (triplicata) em meio RPMI-PR$^-$ 1640, nas concentrações iniciais de 100μg/mL em placa de 96 poços. Aplicou-se $1x10^6$ promastigotas/poço e em seguida incubou-se a placa à 24° C por 24 horas.

Verificou-se a viabilidade dos promastigotas através do ensaio com MTT, conforme descrito anteriormente. Os dados foram analisados pelo Softaware Graph Pad Prism 3.0, utilizando-se uma curva do tipo sigmóide dose-resposta.

4.3.2- Atividade antiúlcera aguda

Animais

Ratos Wistar Hannover fêmeas, pesando entre 150g a 180g, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, foram mantidos em gaiolas apropriadas recebendo ração e água *ad libitum* por 5 dias antes do início do experimento; o ciclo de claro-escuro de 12/12h foi obedecido. Os testes realizaram-se com lotes de 8 animais controle e 8 animais teste; o experimento baseou-se na metodologia de MIZUI & DOTEUCHI, (1983) e BACCHI, (1988).

Ensaio

A avaliação da atividade antiúlcera do extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) ocorreu através do modelo de indução com ácido clorídrico e etanol.

Respeitado o período de adaptação, os ratos foram mantidos em jejum durante 24 horas. Em seguida, administrou-se o EHL, via oral, na dose de 400 mg/kg de massa corpórea do animal, em suspensão aquosa na concentração de 40 mg/mL.

Para o grupo controle foi administrado o mesmo volume de água (10 mL/kg ou 1 mL por 100g do animal). O cloridrato de ranitidina, administrado via oral, na dose de 100 μg/kg serviu como controle positivo. Após 30 minutos, usou-se, por via oral, o agente indutor de úlceras HCl 0,3 M em etanol 60%.

Decorrido uma hora, os animais foram anestesiados e mortos com éter. Os estômagos foram retirados e abertos pela curvatura maior e fixados entre placas de vidro para avaliação das ulcerações.

Realizou-se a avaliação das ulcerações através de dois parâmetros: Área Total de Lesão (ATL) e Área Relativa de Lesão (ARL). A ATL foi calculada somando-se as áreas de todas as úlceras, sendo expressa em mm^2. Para a medida das áreas utilizou-se o programa Image Pro Plus. A ARL foi calculada através da fórmula conforme descrita a seguir:

$$ARL = ATL/AT \times 100$$

Onde, ARL = Área Relativa de Lesão expressa em porcentagem; ATL = Área Total de Lesão em mm^2; AT= Área Total do Estômago em mm^2.

Análise dos Resultados

Avaliaram-se os resultados através de análise de variância, com nível crítico igual ou menor a 0,05 (5%) para rejeição da hipótese de nulidade, seguido de Tukey (SOKAL e ROHLF, 1969). Os dados expressos em porcentagem (Área Relativa de Lesão) foram previamente transformados em arcosseno, para posterior análise estatística.

4.3.3- Atividade antimicrobiana do EHL em bactérias, leveduras e bolor

Microrganismos empregados

Na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico liofilizado empregaram-se os seguintes microrganismos:

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)

Escherichia coli (ATCC 10536)

Candida albicans (ATCC 10231)

Aspergillus niger (ATCC 16404)

Meios de cultura

Para os meios de cultura utilizados, caldo e ágar de caseína soja (TSB e TSA) e ágar de sabouraud dextrose a 4%, seguiu-se as instruções do fabricante.

A partir de culturas estoques, as bactérias foram repicadas em estrias na superfície de meio de cultura ágar caseína soja inclinado e incubadas a 30-35 C° por 24 horas. Repicou-se a levedura em meio de ágar sabouraud dextrose a 4%, sendo incubada a 20 - 25C°, por 48 horas.

A massa celular resultante do crescimento foi recolhida em 9mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril e a suspensão obtida foi padronizada conforme metodologia para padronização da suspensão microbiana.

Preparação das soluções padrões dos antibióticos

Os padrões secundários de cloranfenicol, amicacina e nistatina foram dissolvidos com água destilada até obtenção da concentração de 1mg/mL. Utilizaram-se o cloranfenicol no ensaio para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, a amicacina em *Pseudomonas aeruginosa* e a nistatina em *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

Determinação da atividade antimicrobiana

O procedimento do teste para determinação da concentração mínima inibitória, pela técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação do procedimento que se serve de tubos, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 μL. A partir da suspensão padronizada de cada microrganismo, efetuaram-se as diluições necessárias com solução salina estéril e caldo caseína soja (TSB), para se obter soluções com 10^4 a 10^5 UFC/mL.

A microplaca utilizada possui 96 alvéolos divididos em 12 colunas, com 8 poços cada. As quatro primeiras colunas serviram como controles (controle do meio de cultura, controle do solvente, controle do crescimento e controle positivo).

Na primeira coluna foram adicionados 200μL de meio de cultura TSB ou SDB; na segunda coluna, 180-190μL de meio de cultura sem microrganismo e 10-20μL de solvente (etanol 70%); na terceira coluna foram adicionados 200μL de meio de cultura inoculado com o microrganismo e na quarta coluna foram adicionados 10μL do antibiótico e 190μL de meio de cultura inoculado com o microrganismo.

As colunas restantes serviram ao teste propriamente dito, sendo uma coluna destinada ao controle da tintura e as outras três colunas para cada tintura testada. Em cada coluna adicionou-se 10-20 μL da amostra e 180-190μL de meio TSB ou SDB inoculado.

Após incubação de 24-48 horas a 35°C ou 5-7 dias a 25°C, foi realizada a leitura das microplacas por espectrofotometria, com detector de Elisa a 630 nm.

Resultados

5 – Resultados

5.1- Aspectos botânicos

5.1.1- Caracterização macroscópica de folhas

5.1.2 – Caracterização microscópica de folhas e caule

5.1.2.1- Folha

5.1.2.2- Caule

5.2- Aspectos químicos

5.2.1- Triagem fitoquímica

5.2.2- Rendimento do óleo essencial

5.2.2.1- Cromatografia em fase gasosa do óleo essencial

5.2.2.2- Composição química do óleo essencial

5.2.2.3- Espectro de massas dos componentes majoritários identificados no óleo essencial de *A. australe* de diferentes coletas da região de Iacri – SP.

5.2.3- Comparação dos rendimentos de diferentes extratos de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

5.2.4- Perfil cromatográfico dos extratos clorofórmico e hexânico

5.2.5- Isolamento da fração F4 $CHCl_3$ por cromatografia em camada delgada preparativa e identificação por Cromatógrafo a gás/Espectro de massa

5.2.6- Perfil cromatográfico dos extratos aquoso, acetona:água, clorofórmico e hidroetanólico 70% e isolamento da substância F3.

5.2.7- Cromatógrafo a gás/Espectro de massa dos extratos acetona:água, etanol 70%, clorofórmico e da fração isolada F3

5.2.8- Doseamento de taninos no pó da droga e no EHL

5.2.9- Determinação de água no pó da droga e no EHL

5.3- Aspectos farmacológicos

5.3.1- Atividade antimalárica e antileishmania do EHL e do extrato clorofórmico

5.3.2- Atividade antiúlcera aguda

5.3.3- Atividade antimicrobiana do EHL em bactérias, leveduras e bolor

5.1- Aspectos botânicos

5.1.1- Caracterização macroscópica de folhas

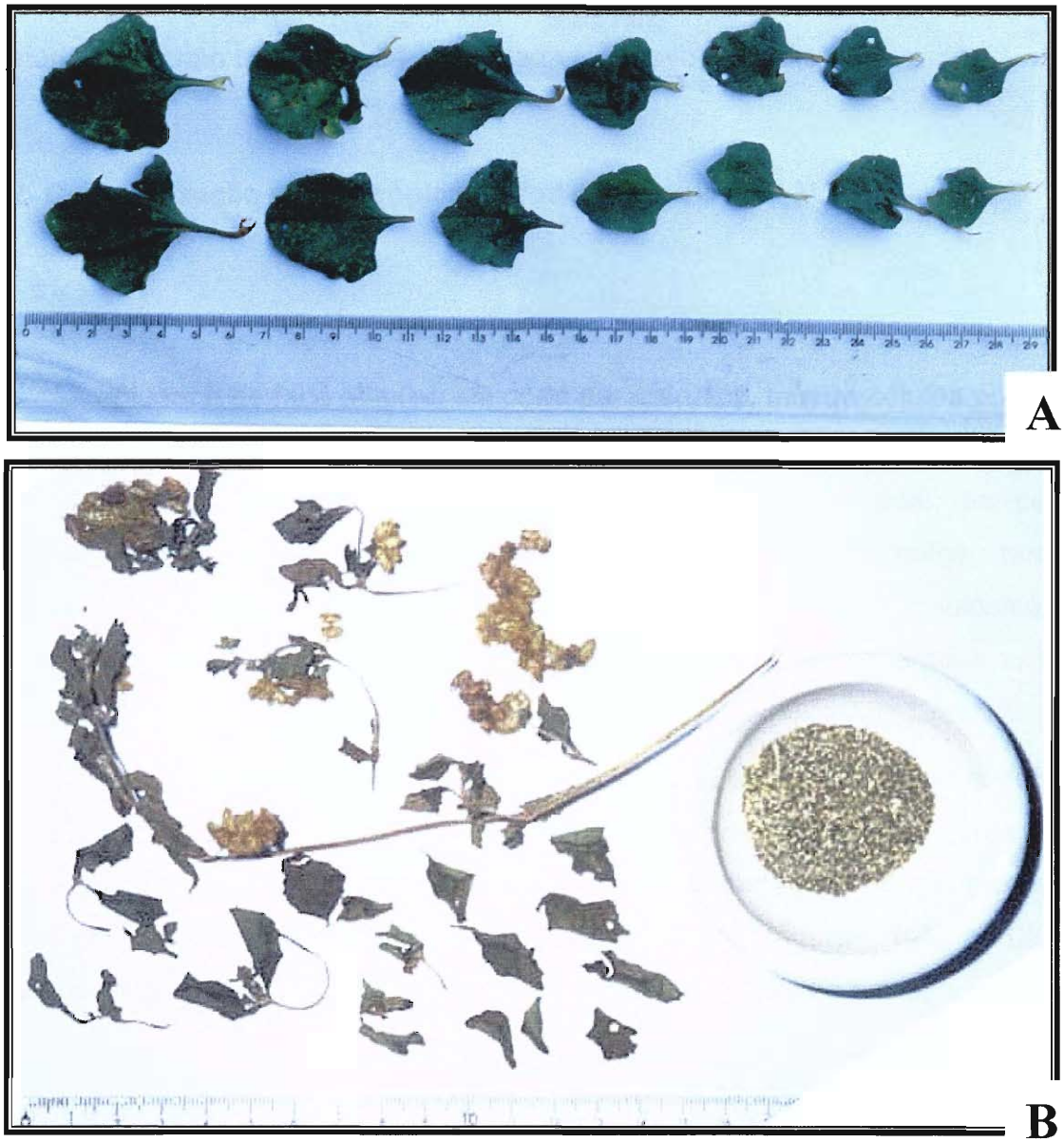


Figura 9: *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze: A- folhas frescas; B- droga vegetal.

As folhas podem se apresentar inteiras ou fragmentadas, de consistência membranácea, superfície lisa, pilosa, possuindo coloração verde em ambas as faces, sendo um pouco mais escura na epiderme superior. Quando transformadas em drogas, apresentam-se enroladas e são friáveis; a coloração é marrom-castanha. Apresentam fraco odor aromático, com leve sabor mucilaginoso e amargo.

O contorno foliar é romboidal a oval, apresentando de 1,5 a 4,5 cm de comprimento, por 1,0 a 3,0 cm de largura, sendo que em muitos casos, comprimento

e a largura são equivalentes. A base foliar é geralmente simétrica, o ápice é obtuso, a margem é denteada a sinuosa e a nervação é peninérvea (figura 9A).

O pecíolo (figura 9A), piloso na base, é de inserção lateral, sendo reto e achatado. A secção transversal é canaletada (côncavo-convexa).

5.1.2- Caracterização microscópica de folhas e caules

5.1.2.1- Folha

- Lâmina foliar

A epiderme de face adaxial, em corte paradérmico, mostra células poligonais de contorno levemente ondeado (figura 10C) com estômatos bastante freqüentes, sendo do tipo anomocítico (figuras 10A e 10C). Na face abaxial, as células poligonais apresentam contorno sinuoso (figura 10B); os estômatos, também freqüentes, são anomocíticos. Há certo grau de espessamento celulósico nas paredes celulares de ambas as epidermes, sendo a cutícula lisa em ambas as faces (figuras 10A, 10B e 10C).

Anexos epidérmicos como os tricomas tectores de forma cônica podem ser observados no mesofilo (figura 11C), na região de nervura mediana (figuras 11A e 12B), no pecíolo (figura 13C) e no caule (figura 14A), podendo ser do tipo bicelulares unisseriados (figura 11C) a pluricelulares unisseriados (figuras 10D e 13C); o espessamento de suas paredes é reduzido e a superfície externa é lisa.

Através da figura 11C é possível observar que o mesofilo é dorsiventral, apresentando uma única camada de parênquima paliçádico (figura 11D) e seis a sete camadas de parênquima lacunoso (figura 11E); as células do parênquima paliçádico estão voltadas para a face adaxial (figura 11B), enquanto que as do parênquima lacunoso (ou esponjoso) para a superfície abaxial.

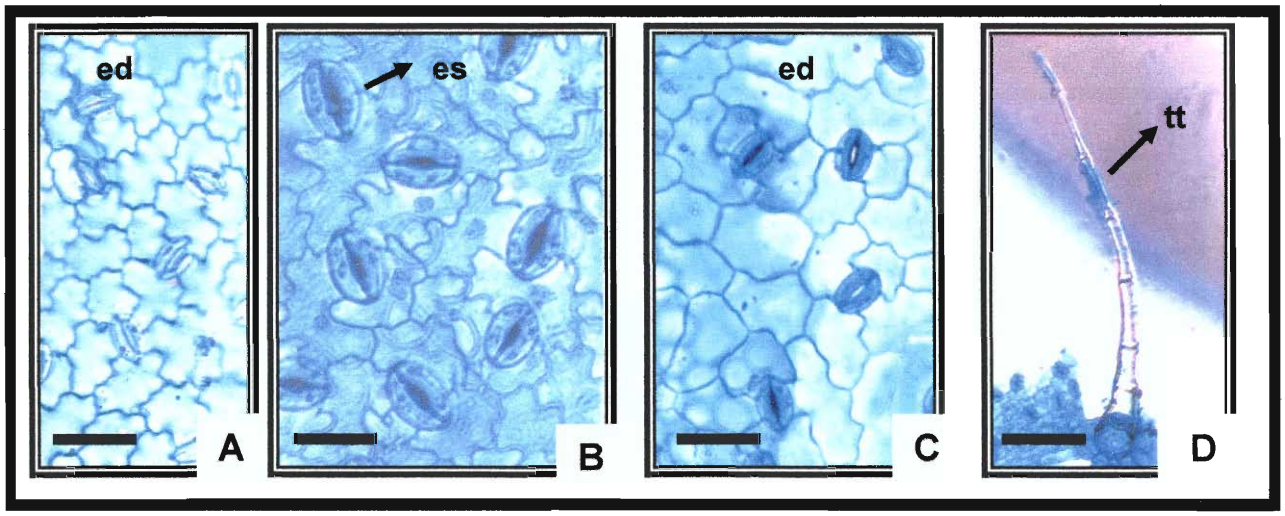


Figura 10- *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Folha - Vista frontal: A e C- Epiderme de face adaxial. estômatos anomocíticos (escala = 50 µm e 25 µm, respectivamente); B- Epiderme de face abaxial. estômatos anomocíticos (escala = 25 µm); D- Tricoma tector pluricelular unisseriado na epiderme de face abaxial (escala 100 µm). eb - epiderme abaxial; ed - epiderme adaxial; es - estômato; tt - tricoma tector.

A nervura mediana apresenta normalmente três a quatro camadas de colênquima na face adaxial (figuras 11B e 12A) e duas a três camadas na face abaxial (figura 12B); o parênquima fundamental mostra células arredondadas e com espaços intercelulares do tipo meato (figuras 12B e 12C).

O feixe vascular da nervura central é do tipo colateral (figuras12B e 12D). A visualização das células do câmbio também é possível através da observação das figuras 12B e 12D.

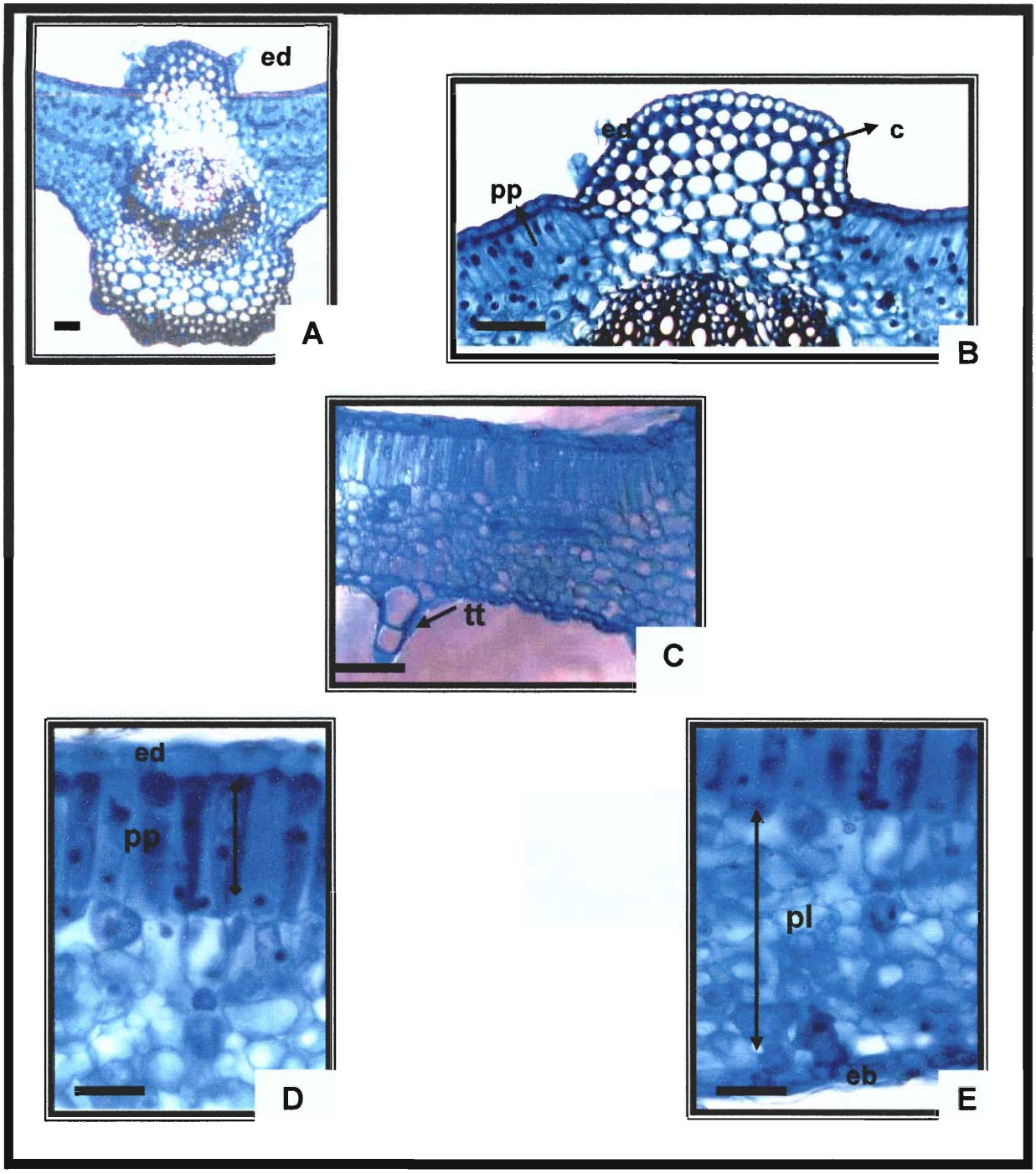


Figura 11- *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Folha - Secção transversal: A- Nervura mediana. feixe vascular colateral (escala = 100 µm). B- Região de face adaxial de nervura mediana. colênquima, parênquima paliçádico (escala = 100 µm). C- Lâmina foliar. tricoma tector (escala = 100 µm). D e E- Detalhe da lâmina foliar. parênquima paliçádico e parênquima lacunoso, respectivamente (escala = 25 µm). c - colênquima; eb - epiderme abaxial; ed - epiderme adaxial; pl - parênquima lacunoso; pp - parênquima paliçádico; tt - tricoma tector.

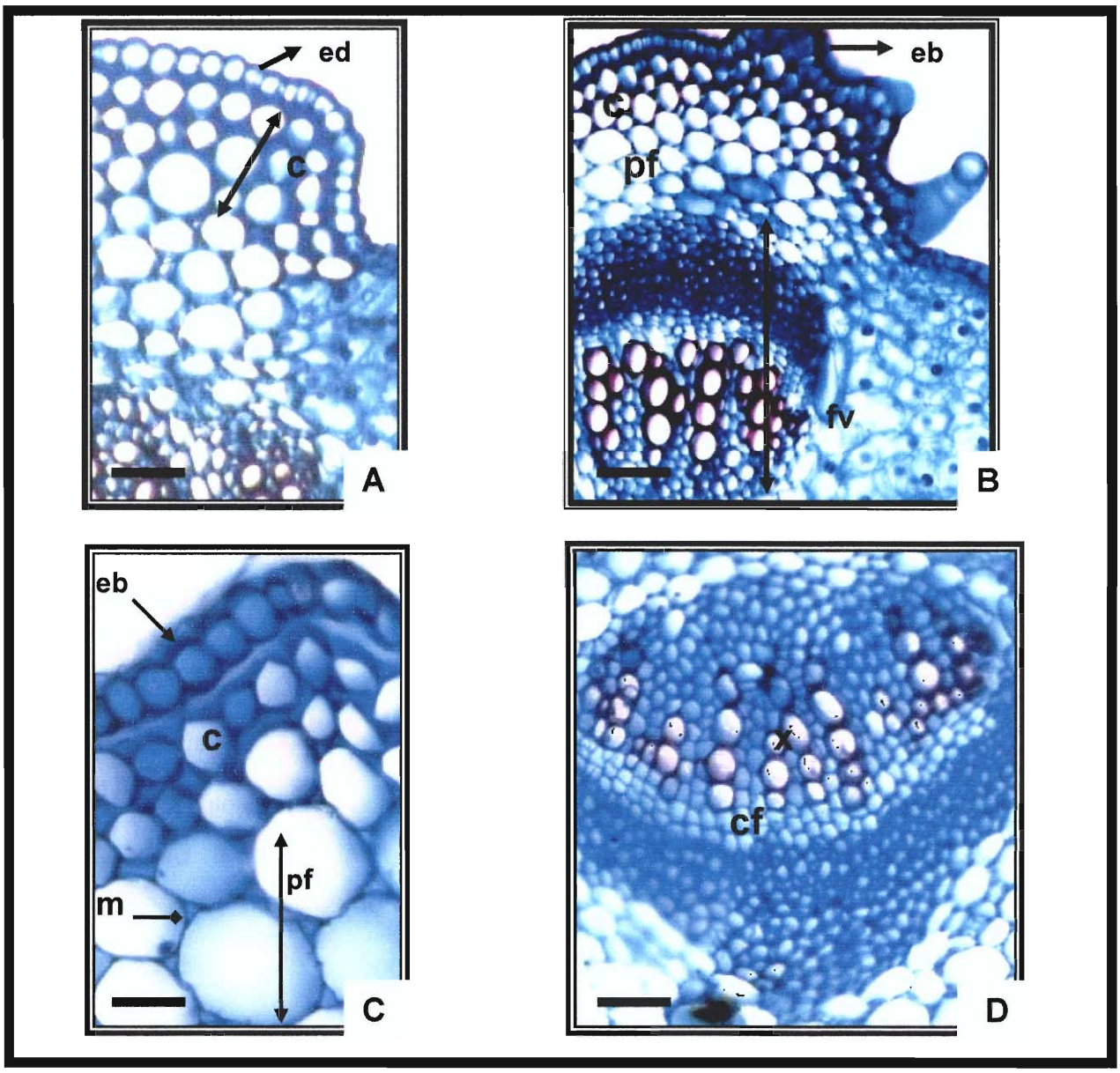


Figura 12- *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Nervura mediana - Secção transversal: A- Região de face adaxial. epiderme e colênquima (escala = 100 µm). B- Detalhe de face abaxial. colênquima, feixe vascular e parênquima (escala = 100 µm). C- Detalhe de colênquima angular, parênquima (fundamental) e meato (escala = 25 µm). D- Detalhe de feixe vascular. colateral, xilema, câmbio fascicular e floema (escala = 50 µm); c - colênquima; cf - câmbio fascicular; eb - epiderme abaxial; ed - epiderme adaxial; fv - feixe vascular; fl - floema; m - meato; pf - parênquima fundamental; x - xilema.

- Pecíolo

A secção transversal do pecíolo possui formato canaletado (figura 13A). As células epidérmicas apresentam formato quadrangular e são ligeiramente espessadas (figura 13B), podendo mostrar tricomas tectores pluricelulares unisseriados (figura 13C).

Podem ser vistas 2 a 5 camadas de colênquima, sendo as duas camadas mais externas, do tipo lamelar e as demais do tipo angular (figura 13B). As células do parênquima fundamental apresentam espessamento de celulose e os espaços intercelulares são do tipo meato (figuras 13E e 13F).

O feixe vascular é do tipo colateral (figura 13D), sendo visível 2 a 3 camadas de células do câmbio fascicular (figura 13 D); diminutos canais secretores podem ser vistos na região de feixe vascular próximos ao floema (figuras 13E e 13F).

5.1.2.2- Caule

O caule, em secção transversal, mostra células epidérmicas pequenas (figuras 14B e 14D). Internamente, há 3 a 4 camadas de colênquima, com espessamento celulósico do tipo lamelar (figuras 14B e 14D).

As células do parênquima cortical apresentam aspecto arredondado e são maiores que as células colenquimáticas (figuras 14B). O estelo é do tipo eustélico (figura 14A), onde os feixes vasculares colaterais encontram-se separados por faixas de tecido parenquimático.

O feixe vascular é do tipo colateral, sendo que os elementos de vaso do xilema encontram-se dispostos em fileiras radiais (figuras 14B, 14C e 14D); o câmbio fascicular apresenta 3 a 5 camadas de células (figura 14C).

Canais secretores podem ser vistos na região do parênquima cortical, próximos ao floema (figuras 14D). As células do parênquima medular são grandes, arredondadas e apresentam pouco espessamento de celulose (figuras 14A e 14B), com espaços intercelulares do tipo meato (figura 14D).

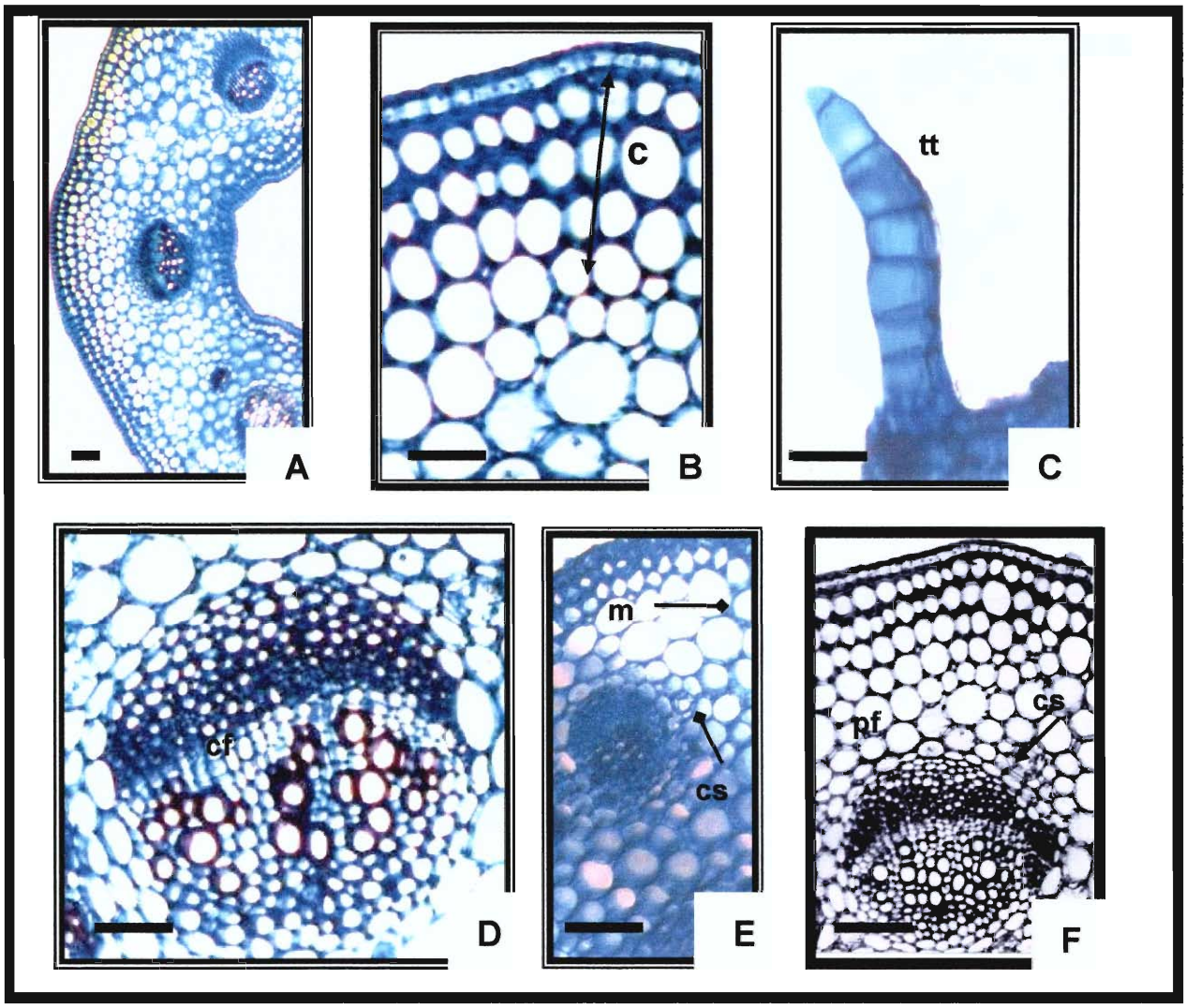


Figura 13- *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Pecíolo - Secção transversal. A- Aspecto geral. epiderme, parênquima e feixe vascular (escala = 100 µm). B- Detalhe de colênquima (escala = 100 µm). C- Detalhe de tricoma tector pluricelular unisseriado (escala = 100 µm). D- Detalhe de feixe vascular. Floema, câmbio fascicular e xilema (escala = 50 µm). E e F- Células do parênquima fundamental e canais secretores próximos ao floema (escala 100 µm). cf - câmbio fascicular; cs - canal secretor; m - meato; pf - parênquima fundamental;

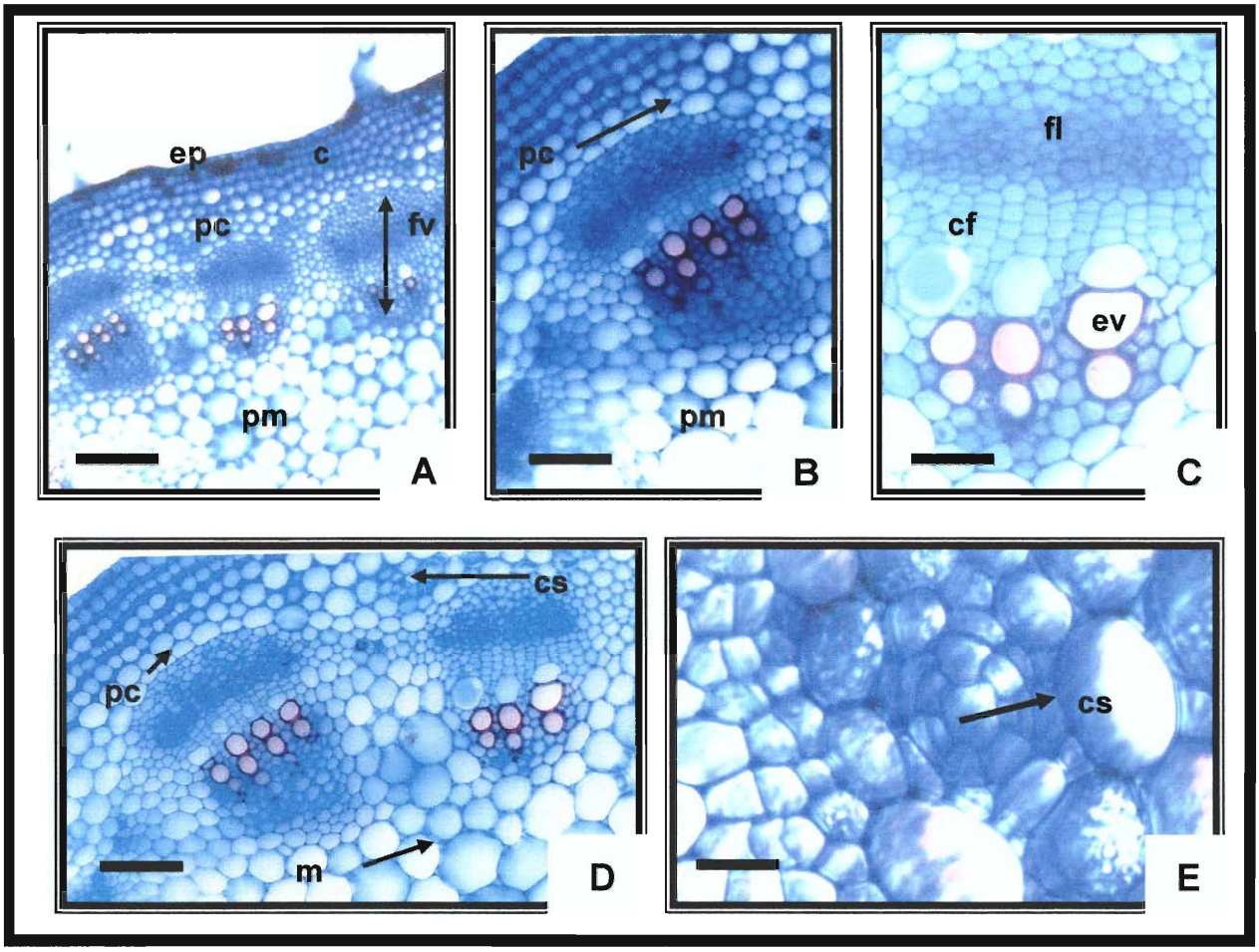


Figura 14- *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. Caule - Secção transversal: A- Aspecto geral. epiderme, colênquima, parênquima cortical, feixe vascular e parênquima medular (escala = 100 µm). B- Detalhe das regiões cortical, feixe vascular e medula (escala = 50 µm). C- Detalhe de feixe vascular colateral, câmbio fascicular e elemento de vaso do xilema (escala = 25 µm). D- Canal secretor na região do parênquima cortical, espaço intercelular do tipo meato (escala = 50 µm). E- Detalhe da região de feixe vascular com canal secretor (escala = 25 µm). cf - câmbio fascicular; cs - canal secretor; ep – epiderme; ev - elemento de vaso do xilema; fl - floema; m - meato; pc - parênquima cortical; pm - parênquima medular.

5.2- Aspectos químicos

5.2.1- Triagem fitoquímica

Os resultados obtidos da triagem fitoquímica, conforme mencionado no item 4.2.1 estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Grupos de princípios ativos em partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze.

Grupos de princípios ativos	Reações	Resultados
Glicosídeos cardiotônicos	Liebermann-Burchard Kedde Baljet Keller-Killiani	+ - - -
Glicosídeos saponínicos	Teste de espuma	+
Antraquinonas	Borntraeger Antraquinonas livres O-glicosídeos C-glicosídeos	 - +/- +/-
Glicosídeos flavonoídicos	Hidróxidos alcalinos Shinoda Cloreto de alumínio	+ + +
Taninos	Adstringência Sais de ferro Acetato de chumbo Alcalóides Gelatina Acetato de cobre	+ + + + + +
Alcalóides	Mayer Bertrand Dragendorff Bouchardat	+/- - + -
Óleo essencial		+
Mucilagens		+ (I.I= 220%)

+ teste positivo

- teste negativo

+/- vestígios

5.2.2- Rendimento do óleo essencial

A hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado de 150 g de droga constituída de partes aéreas de *Acanthospermum australe*, proporcionou um volume de 0,15 mL de óleo essencial, de coloração amarelo-esverdeada, ou seja, um rendimento de 0,10%. A hidrodestilação de 400 g de folhas frescas de diferentes coletas neste mesmo aparelho forneceu um menor rendimento (média de 0,05%).

5.2.2.1- Cromatografia em fase gasosa do óleo essencial

Os cromatogramas do óleo essencial provenientes de diferentes coletas do vegetal, após aplicação no aparelho sob condições especificadas no item 4.2.2 são mostradas nas figuras 15, 16, 17 e 18.

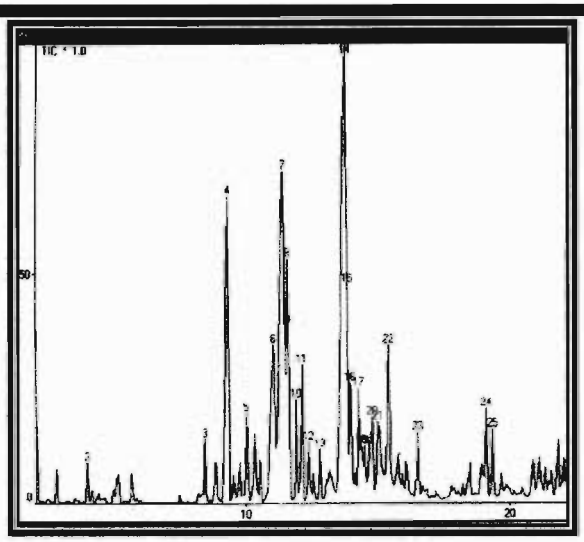


Figura 15: Cromatografia gasosa do óleo essencial da droga constituída de folhas e caules de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletada em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação.

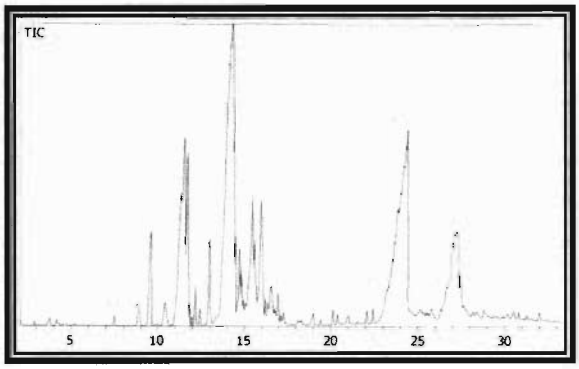


Figura 16: Cromatografia gasosa do óleo essencial da droga constituída de caules de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletada em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação.

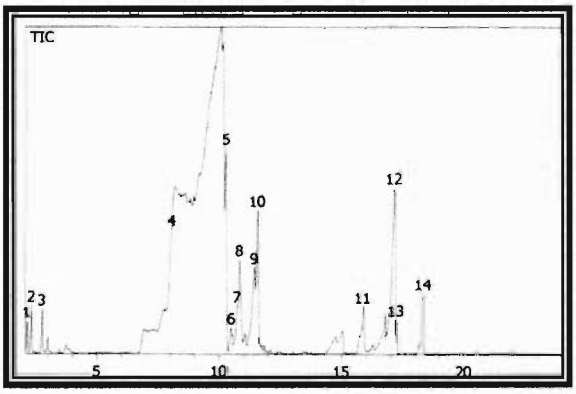


Figura 17: Cromatografia gasosa do óleo essencial de folhas frescas de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletadas em outubro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase de floração.

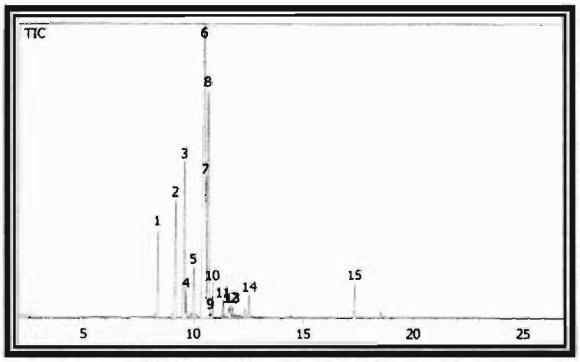


Figura 18: Cromatografia gasosa do óleo essencial de folhas frescas de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletadas em novembro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase inicial de frutificação.

5.2.2.2- Composição química do óleo essencial

Os principais componentes do óleo essencial, após aplicação no aparelho sob condições especificadas no item 4.2.2, são mostradas nas tabelas 5, 6, 7 e 8.

Tabela 5: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação da droga, constituída de folhas e caules coletadas em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Porcentagem (%)
β-cariofileno	9.375	12.06
γ-muuroleno	11.097	6.20
valenceno	11.467	15.39
α-selineno	11.617	7.07
δ-cadineno	12.175	3.21
*espatulenol	13.847	30.22
*globulol	13.960	4.22
α-cadinol	15.438	2.64

*isômeros não identificados

Tabela 6: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação da droga, constituída de caules coletadas em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Porcentagem (%)
β-cariofileno	9.637	3.61
allo-aromadendreno	11.325	7.31
valenceno	11.581	9.83
germacreno B	11.774	8.40
óxido de cariofileno	13.775	11.50
*espatulenol	14.200	42.23
*globulol	14.418	2.21
α-cadinol	15996	5.46

*isômero não identificado

Tabela 7: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação de folhas frescas, coletadas em outubro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase de floração.

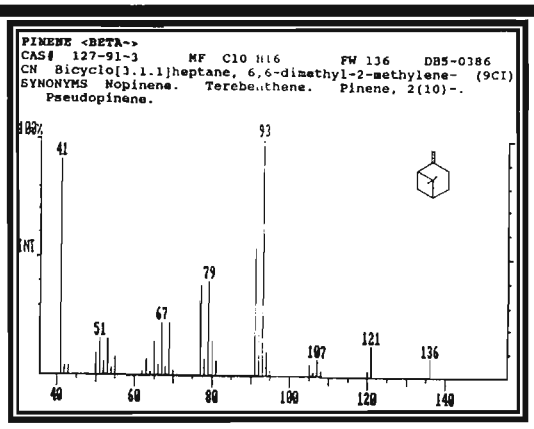
Composto	Tempo de retenção (minutos)	Porcentagem (%)
β-pineno	2.176	1.96
Mirceno	2.359	2.82
limoneno	2.792	1.82
δ-cadineno	10.309	16.80
*nerolidol	10.504	3.65
Globulol	10.790	20.22
α-cadinol	11.594	14.07
*farnesol	17.244	2.02

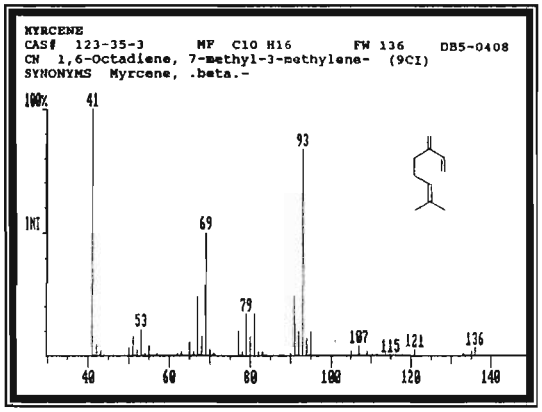
*isômeros não identificados

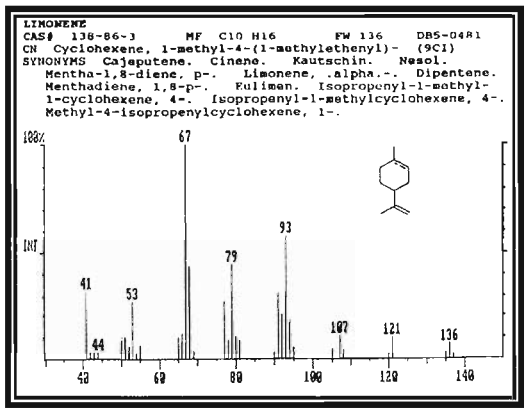
Tabela 8: Componentes majoritários do óleo essencial de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, extraído por hidrodestilação de folhas frescas, coletadas em novembro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase inicial de frutificação.

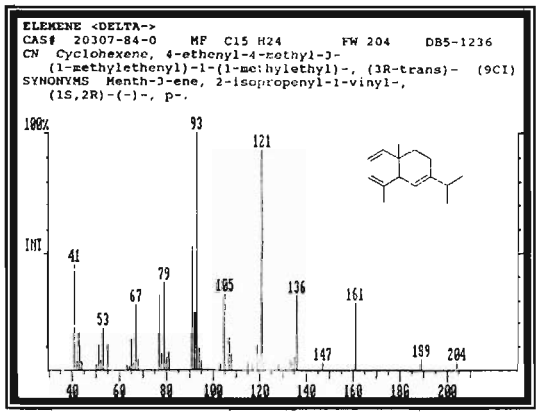
Composto	Tempo de retenção (minutos)	Porcentagem (%)
δ-elemeno	8.377	4.52
β-elemeno	9.176	7.63
β-cariofileno	9.592	13.44
α-humuleno	9.994	3.03
germacreno D	10.509	44.14
β-selineno	10.545	3.82
germacreno B	10.669	17.35
δ-cadineno	10.883	1.36

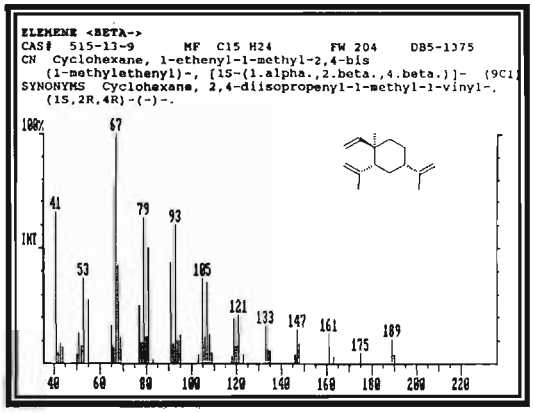
5.2.2.3- Espectro de massas dos componentes majoritários identificados no óleo essencial de *A. australe* de diferentes coletas da região de Iacri – SP.

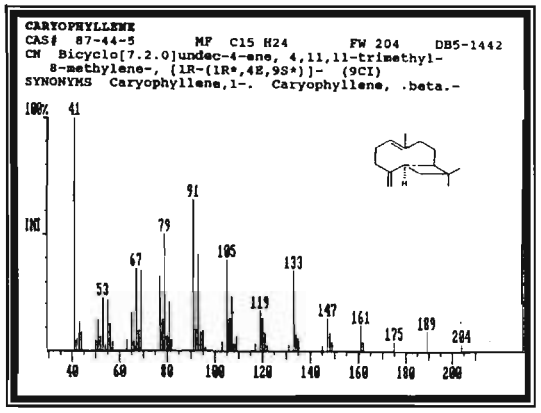


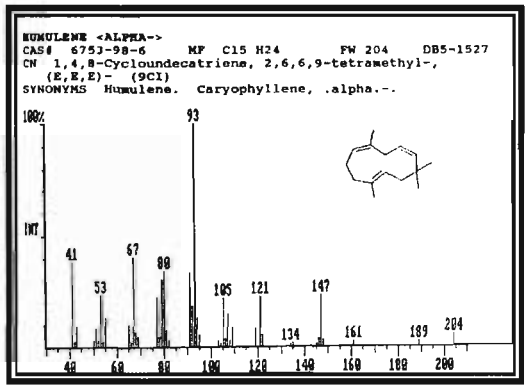


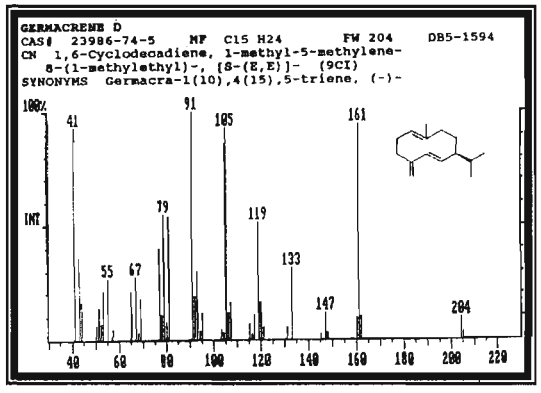


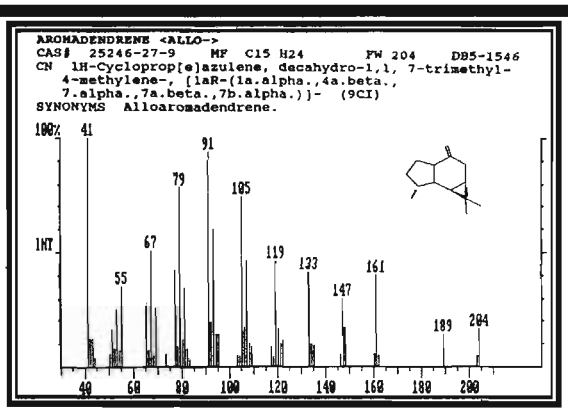


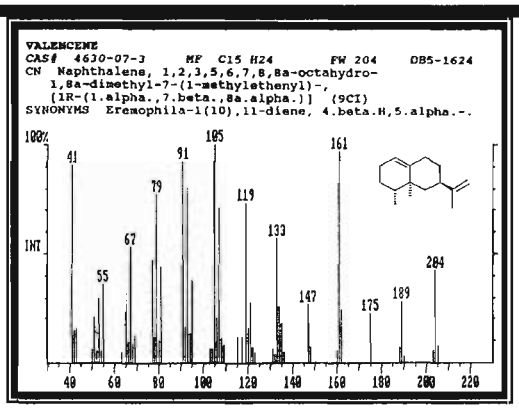


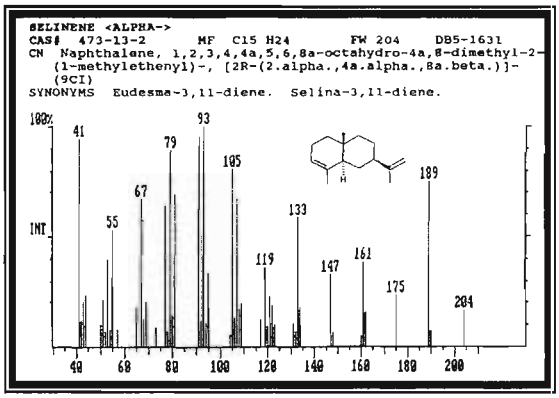


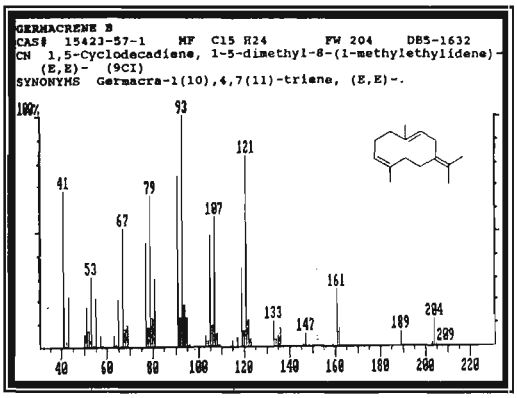


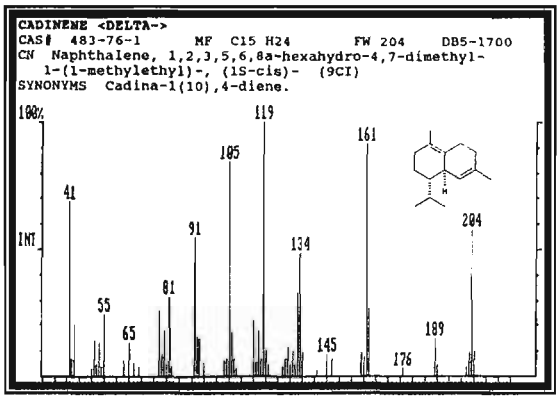


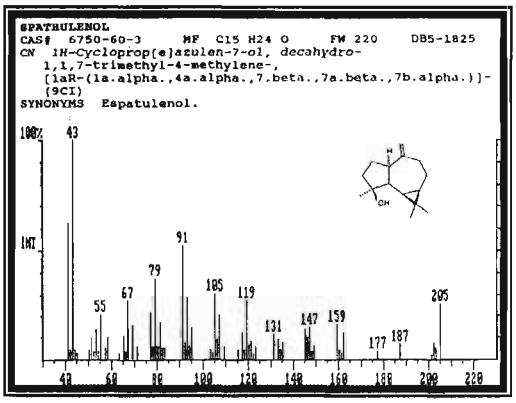

AROMADENDRENE <ALLO->
CAS# 25246-27-9 MF C15 H24 FW 204 DB5-1546
CN 1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1, 7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta., 7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (9CI)
SYNONYMS Alloaromadendrene.
100% INT
41 55 67 79 91 105 119 133 147 161 189 204
40 60 80 100 120 140 160 180 200

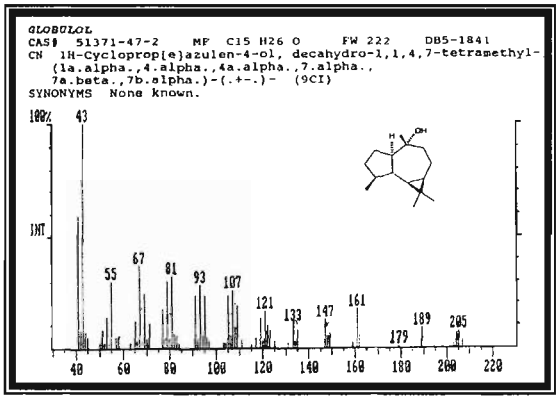

VALENCENE
CAS# 4630-07-3 MF C15 H24 FW 204 DB5-1624
CN Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,7.beta.,8a.alpha.)] (9CI)
SYNONYMS Eremophila-1(10),11-diene, 4.beta.H,5.alpha.-.
100% INT
41 55 67 79 91 105 119 133 147 161 175 189 204
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220


SELINENE <ALPHA->
CAS# 473-13-2 MF C15 H24 FW 204 DB5-1631
CN Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]- (9CI)
SYNONYMS Eudesma-3,11-diene. Selina-3,11-diene.
100% INT
41 55 67 79 93 105 119 133 147 161 175 189 204
40 60 80 100 120 140 160 180 200


GERMACRENE B
CAS# 15423-57-1 MF C15 H24 FW 204 DB5-1632
CN 1,5-Cyclodecadiene, 1-5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-(E,E)- (9CI)
SYNONYMS Germacra-1(10),4,7(11)-triene, (E,E)-.
100% INT
41 53 67 79 93 107 121 133 147 161 189 204 209
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220


CADINENE <DELTA->
CAS# 483-76-1 MF C15 H24 FW 204 DB5-1700
CN Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)- (9CI)
SYNONYMS Cadina-1(10),4-diene.
100% INT
41 55 65 81 91 105 119 134 145 161 176 189 204


SPATHULENOL
CAS# 6750-60-3 MF C15 H24 O FW 220 DB5-1825
CN 1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (9CI)
SYNONYMS Espatulenol.
100% INT
43 55 67 79 91 105 119 131 147 159 177 187 205
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220


GLOBULOL
CAS# 51371-47-2 MF C15 H26 O FW 222 DB5-1841
CN 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.alpha.,7.alpha., 7a.beta.,7b.alpha.)-(.+-.)- (9CI)
SYNONYMS None known.
100% INT
43 55 67 81 93 107 121 133 147 161 179 189 205
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220

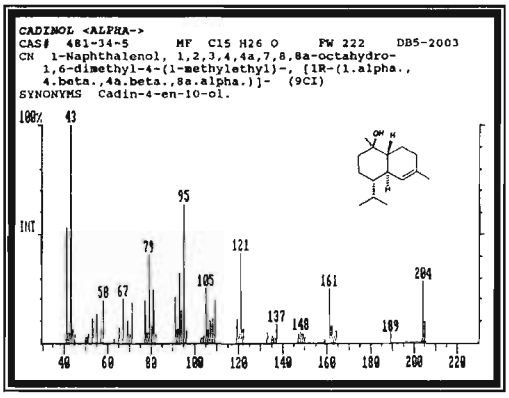

CADINOL <ALPHA->
CAS# 481-34-5 MF C15 H26 O FW 222 DB5-2003
CN 1-Naphthalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [1R-(1.alpha., 4.beta.,4a.beta.,8a.alpha.)]- (9CI)
SYNONYMS Cadin-4-en-10-ol.
100% INT
43 58 67 79 95 105 121 137 148 161 189 204
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220

Tabela 9: Composição percentual do óleo essencial de *A. australe* coletado em diferentes épocas do ano.

constituintes	#Amostra 1 (%)	*TR (min.)	#Amostra 2 (%)	*TR (min.)	#Amostra 3 (%)	*TR (min.)	#Amostra 4 (%)	*TR (min.)
Monoterpenos	**0.0**		**0.0**		**6.6**		**0.0**	
Série acíclica	**0.0**		**0.0**		**2.82**		**0.0**	
mirceno	---		---		2.82	(2.359)	---	
Série pinano	**0.0**		**0.0**		**1.96**		**0.0**	
β-pineno	---		---		1.96	(2.176)	---	
Série *p*-mentano	**0.0**		**0.0**		**1.82**		**0.0**	
limoneno	---		---		1.82	(2.792)	---	
Sesquiterpenos	**89.44**		**94.02**		**57.43**		**98.46**	
Série acíclica	**0.0**		**0.0**		**3.65**		**0.65**	
**(*E*)-nerolidol	---		---		3.65	(10.504)	0.65	(11.354)
Grupo Cadinano	**32.01**		**16.84**		**32.58**		**47.46**	
β-gurjuneno	---		1.55	(11.250)	---		0.93	(9.657)
γ-muuroleno	6.20	(11.097)	---		---		---	
germacreno-D	---		---		---		44.14	(10.509)
valenceno	15.39	(11.467)	9.83	(11.581)	---		---	
α-muuroleno	1.11	(11.667)	---		---		---	
γ-cadineno	1.85	(11.953)	---		---		0.15	(10.775)
δ-cadineno	3.21	(12.175)	---		16.80	(10.309)	1.36	(10.883)
τ-muurolol	---		---		1.71	(11.455)	0.88	(12.543)
δ-cadinol (torreyol)	1.61	(15.025)	---		---		---	
α-cadinol	2.64	(15.438)	5.46	(15.996)	14.07	(11.594)	---	
Grupo Cariofilano	**12.06**		**15.11**		**0.98**		**13.44**	
β-cariofileno	12.06	(9.375)	3.61	(9.637)	0.98	(8.067)	13.44	(9.592)
óxido de cariofileno	---		11.50	(13.775)	---		---	
Grupo Humulano	**0.0**		**0.0**		**0.0**		**3.03**	
α-humuleno	---		---		---		3.03	(9.994)
Grupo Germacrano	**45.37**		**62.07**		**20.22**		**33.88**	
δ-elemeno	---		---		---		4.52	(8.377)
β-elemeno	---		---		---		7.63	(9.176)
allo-aromadendreno	2.16	(10.068)	7.31	(11.325)	---		---	
β-selineno	---		---		---		3.82	(10.545)
α-selineno	7.07	(11.617)	---		---		---	
germacreno B	---		8.40	(11.774)	---		17.35	(10.669)
**espatulenol	30.22	(13.847)	42.23	(14.200)	---		---	
**globulol	4.22	(13.960)	2.21	(14.418)	20.22	(10.790)	0.56	(11.736)
viridiflorol	---		1.92	(14.500)	---		---	
isoespatulenol	1.70	(14.818)	---		---		---	
Outros	**1.09**		**0.72**		**5.50**		**1.54**	
farnesol	---		---		2.02	(17.244)	---	
2-tridecen-1-ol	1.09	(16.557)	---		---		---	
Hexadecanoic Acid	---		0.72	(19.885)	---		---	
Hexanedioic Acid	---		---		3.48	(18.346)	---	
1-nonene,4,6,8-trimetil	---		---		---		1.54	(17.337)
Total	90.53		94.74		69.53		100.00	

#amostra 1: óleo essencial da droga constituída de folhas e caules de *A.australe*, coletada em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação; #amostra 2: óleo essencial da droga constituída de caules de *A.australe*, coletada em janeiro de 2003, quando a planta encontrava-se em fase final de frutificação; #amostra 3: óleo essencial de folhas frescas de *A.australe*, coletadas em outubro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase de floração; #amostra 4: óleo essencial de folhas frescas de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, coletadas em novembro de 2005, quando a planta encontrava-se em fase inicial de frutificação; * TR (min.) – Tempo de retenção em minutos; ** Isômero não identificado

5.2.3- Comparação dos rendimentos de diferentes extratos de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

Todos os extratos obtidos provenientes de partes aéreas do vegetal, utilizados no presente trabalho, como também seus respectivos métodos de extração, quantidades e rendimentos, podem ser visualizados na tabela 10.

Tabela 10: Comparação dos diferentes métodos de extração e rendimento dos extratos de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze.

	Método de extração	**Quantidade do pó da droga (g)**	**Rendimento (%)**
Extrato aquoso	Decocção	100	*15.00
Resíduo da hidrodestilação	Decocção	150	*11.93
Extrato clorofórmico	Percolação	50	**4.42
Extrato hexânico	Percolação	50	**0.60
Extrato Et.OH 70%	Percolação	100	*18.50
Extrato acetona:água	Percolação	300	*16.35

* o rendimento foi calculado após o extrato sofrer processo de liofilização.

** o rendimento foi calculado após a evaporação do solvente.

5.2.4- Perfil cromatográfico dos extratos clorofórmico e hexânico

Alíquotas dos extratos clorofórmico e hexânico após serem aplicados em cromatografia em camada delgada, no sistema cromatográfico 1, conforme citado no item 4.2.4, forneceram perfis cromatográficos que podem ser observados na figura 19.

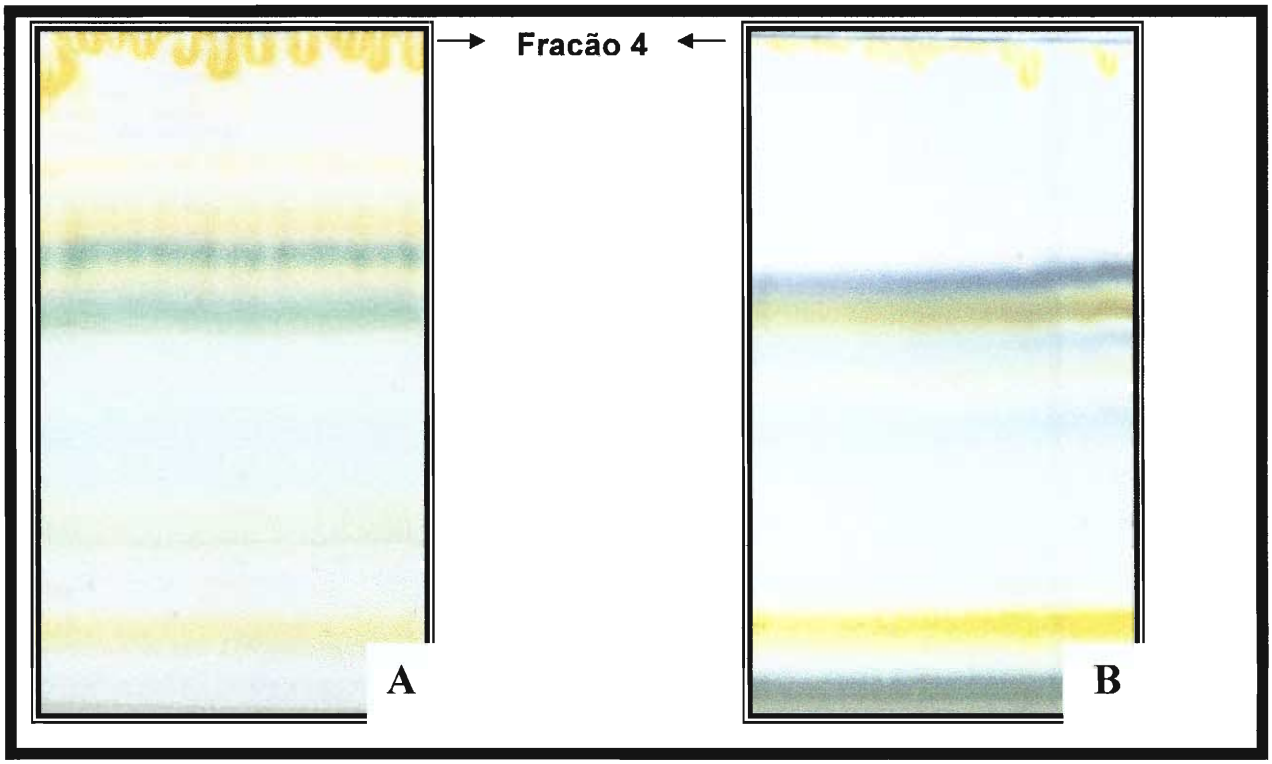


Figura 19: Perfil cromatográfico dos extratos clorofórmico (A) e hexânico (B), mostrando a presença da fração 4.

5.2.5- Isolamento da fração F4 $CHCl_3$ por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa e identificação por Cromatógrafo a gás/Espectro de massa (CG/EM).

A fração 4, isolada do extrato clorofórmico por cromatografia em camada delgada preparativa no sistema cromatográfico 1, aqui denominada de F4 $CHCl_3$ foi identificada como sendo o globulol (pico 1 do cromatograma da figura 20), um sesquiterpeno de fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$, com peso molecular igual a 222 que pertence ao grupo germacrano. Os demais picos (2, 3, 4 e 5) da figura 20 correspondem à impurezas da fração, que de acordo com o banco de dados do aparelho, são ácidos graxos. O espectro de massa da fração F4 $CHCl_3$, assim como os dados que permitiram chegar à identificação desta substância, são mostradas nas figuras 20 e 21.

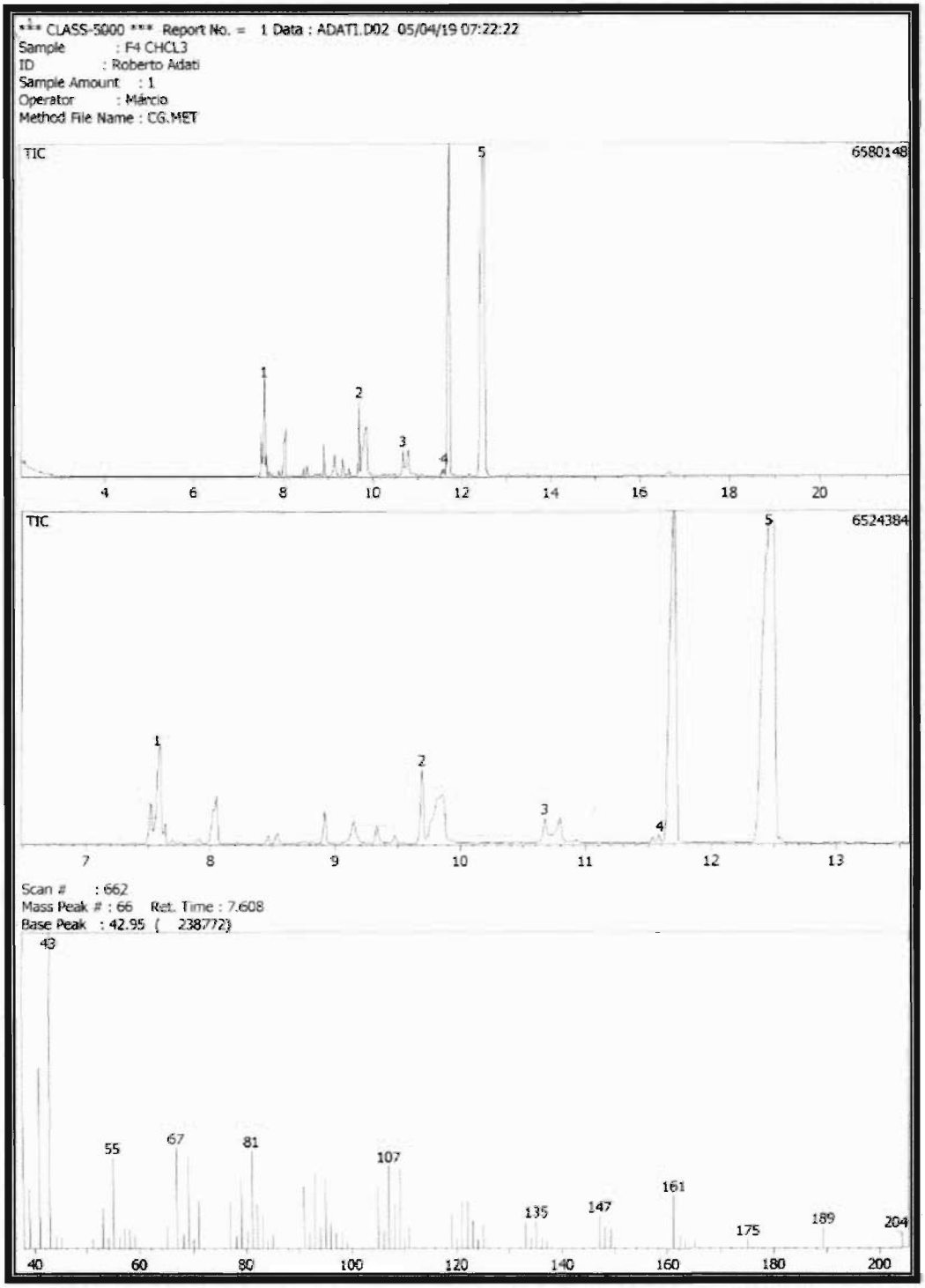


Figura 20: A. Cromatografia gasosa da fração F4 $CHCl_3$, isolada por cromatografia em camada delgada preparativa; B. Cromatograma ampliado da fração F4 $CHCl_3$, mostrando a fração F4 (pico 1) e todas as impurezas presentes nesta fração (picos 2, 3, 4 e 5); C Espectro de massa da fração F4 (pico 1 com tempo de retenção = 7.608).

Mass Peak # : 66 Ret. Time : 7.608

Mass	R.Int	Mass	R.Int
39.05	18.80	96.10	7.94
41.00	57.14	97.10	4.80
42.95	100.00	98.10	5.34
44.10	3.77	99.10	2.14
45.05	4.13	105.05	19.67
51.05	3.15	106.10	5.74
53.05	13.00	107.10	26.06
54.10	3.47	108.15	14.36
55.05	28.84	109.10	25.33
56.10	3.66	110.15	3.50
57.10	6.87	111.10	7.09
58.05	6.11	119.00	10.92
59.05	4.07	120.10	3.56
65.05	7.21	121.10	15.33
67.00	31.79	122.10	15.25
68.15	4.68	123.10	8.50
69.15	29.48	124.10	2.86
70.15	3.04	125.10	7.56
71.10	15.45	133.00	7.99
77.05	14.86	134.15	3.38
78.15	4.03	135.10	8.86
79.10	23.03	136.10	3.76
80.15	5.92	137.15	2.20
81.10	30.84	147.05	10.38
82.10	14.08	148.15	6.93
83.10	10.56	149.15	5.97
84.10	2.77	161.10	16.91
85.10	4.61	162.20	4.02
91.05	19.65	163.20	2.77
92.10	4.98	165.15	2.16
93.10	23.84	175.15	2.89
94.10	6.93	189.20	6.59
95.10	21.94	204.25	5.36

Mass Peak # : 66 Ret. Time : 7.608
Scan # : 662
Base Peak : 42.95 (238772)

<Hit List>

No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	91	222	$C_{15}H_{26}O$ GLOBULOL $$	489-41-8	86617	3
2	91	222	$C_{15}H_{26}O$ Globulol $$	- -0	44114	1
3	91	222	$C_{15}H_{26}O$ VERIDIFLOROL $$ VIRIDIFLOROL $$	552-02-3	86623	3
4	91	222	$C_{15}H_{26}O$ Ledol	577-27-5	14306	2
5	91	222	$C_{15}H_{26}O$ VERIDIFLOROL $$ VIRIDIFLOROL $$	552-02-3	86624	3
6	91	222	$C_{15}H_{26}O$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (CAS) Ledol $$ d-Ledol $$ (+)-Ledol $$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, (1aR,4R,4aS,7R,7aS,7bS)- $$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]- $$	577-27-5	86604	3
7	91	222	$C_{15}H_{26}O$ Ledol	577-27-5	14305	2
8	90	222	$C_{15}H_{26}O$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1ar-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	552-02-3	14273	2
9	90	222	$C_{15}H_{26}O$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1ar-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- $$	552-02-3	44150	1
10	90	222	$C_{15}H_{26}O$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (CAS) Ledol $$ d-Ledol $$ (+)-Ledol $$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, (1aR,4R,4aS,7R,7aS,7bS)- $$ 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]- $$	577-27-5	86606	3

Library Name
(1) NIST107.LIB (2) NIST21.LIB (3) WILEY229.LIB (4) SHIM1607.LIB

Figura 21: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa que permitiram identificar a fração F4 isolada do extrato clorofórmico por cromatografia em camada delgada preparativa como sendo o globulol.

5.2.6- Perfil cromatográfico dos extratos aquoso, acetona:água, clorofórmico e hidroetanólico 70% e isolamento da substância F3.

A aplicação de alíquotas dos extratos aquoso, acetona:água, clorofórmico e hidroetanólico 70% no sistema cromatográfico 2, citado no item 4.2.4, mostrou que há uma substância em comum a todos os extratos, após aspersão do revelador NP e observação à luz ultravioleta de ondas longas (366 nm). Esta substância, isolada por CCD preparativa a partir do extrato acetona:água, foi denominada de fração F3 e foi identificada como 4-hidroxi 4-metil 2-pentanona, uma cetona-álcool de fórmula molecular $C_6H_{12}O_2$ e peso molecular de 116,16. O perfil cromatográfico dos referidos extratos, assim como da fração isolada F3 são mostrados na figura 22.

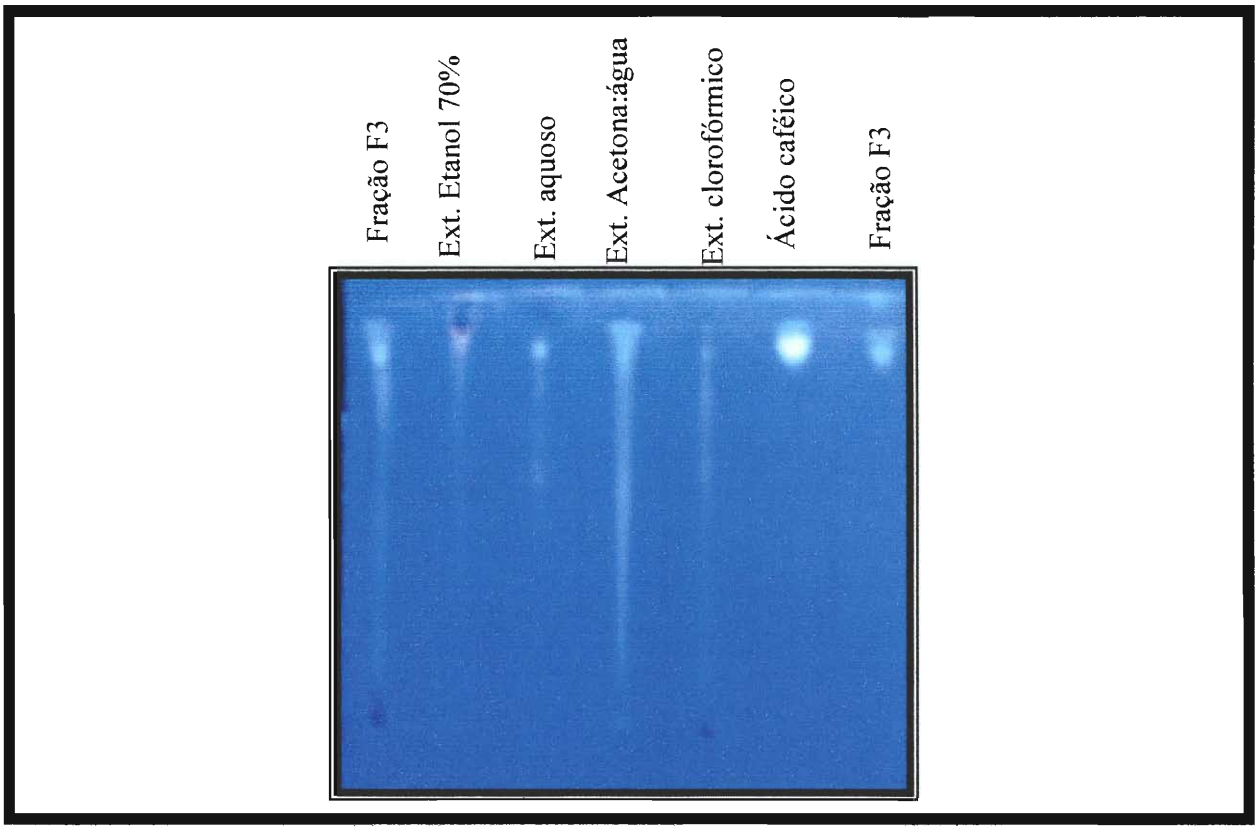


Figura 22: Cromatografia em camada delgada dos diferentes extratos de *Acantospermum australe* (Loefl) O. Kuntze e da fração F3 no sistema cromatográfico 2 [Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26); revelador NP e observação à luz ultravioleta de ondas longas (366 nm)].

5.2.7- Cromatógrafo a gás/Espectro de massa dos extratos acetona:água, etanol 70%, clorofórmico e da fração isolada F3

A substância F3, seu respectivo padrão e todos os extratos foram injetados no equipamento de CG/EM. Os espectros de massa das substâncias presentes nos extratos provam que a substância referida está presente em todas as amostras, porém em concentrações variáveis (figuras 23 a 32).

- Legenda:

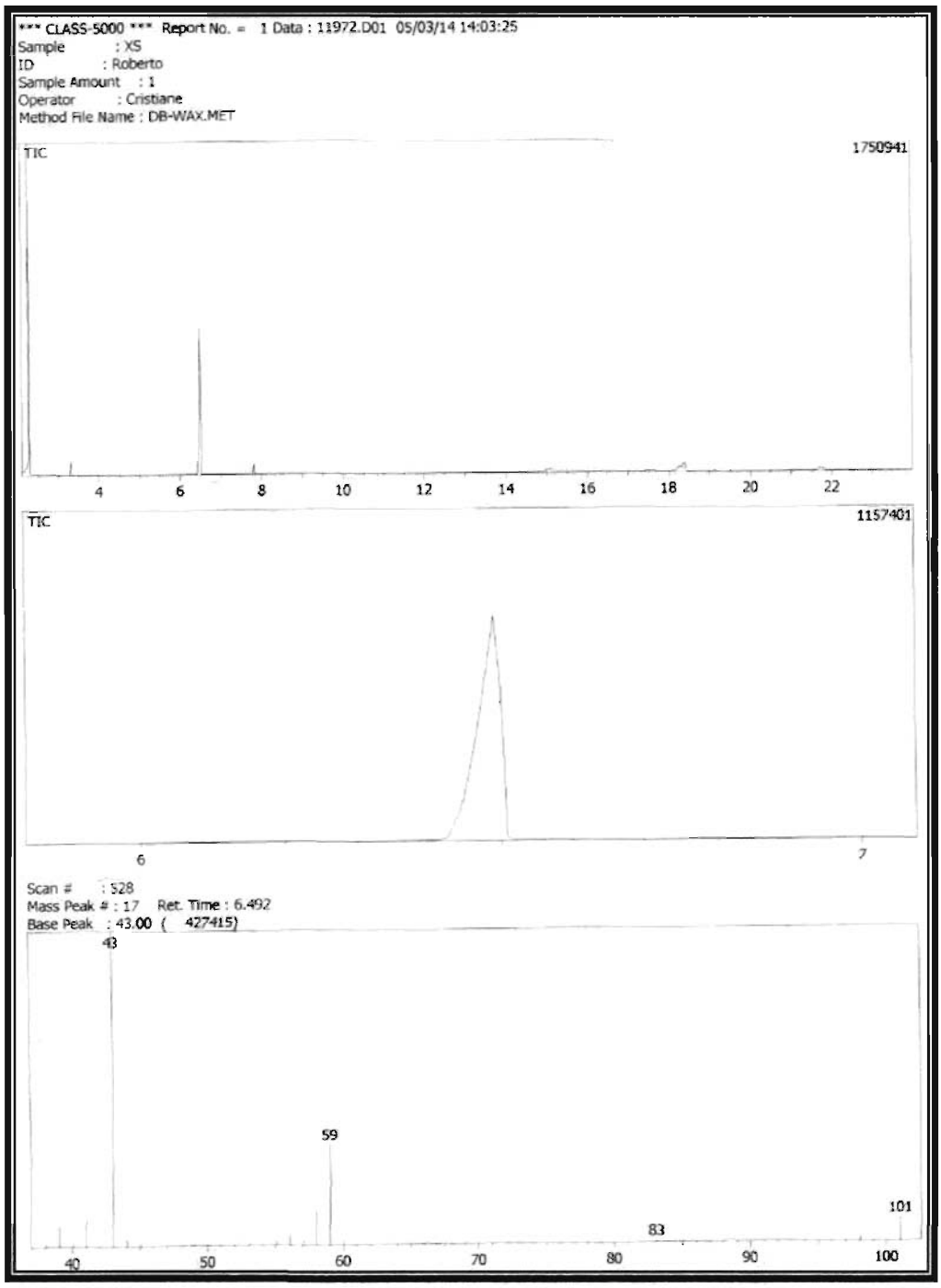
Amostra 1 (= padrão), código XS, espectro n°11972

Amostra 2 (=extrato acetona:água), código ext. acetona:água, espectro n°11973

Amostra 3 (= fração isolada), código F3, espectro n°11975

Amostra 4 (=extrato $CHCl_3$), código ext.$CHCl_3$, espectro n°11976

Amostra 5 (=extrato EtOH 70%), código ext EtOH 70%, espectro n°11977



A

B

C

Figura 23: A. Cromatografia gasosa da substância XS; B. pico ampliado da substância XS (tempo de retenção = 6.492); C Espectro de massa da substância padrão XS (tempo de retenção = 6.492).

<Unknown Spectrum>
Data : 11972.D01
Mass Peak # : 17 Ret. Time : 6.492
Scan # : 528
Base Peak : 43.00 (427415)

<Hit List>

No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	97	116	$C_6H_{12}O_2$ 4-HYDROXY-4-METHYL-2-PENTANONE $$	-0	10432	3
2	96	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10269	3
3	96	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10274	3
4	95	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10275	3
5	95	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	123-42-2	3075	2
6	94	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10278	3
7	94	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	123-42-2	3076	2
8	94	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10279	3
9	93	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ Diacetone alcohol $$ Diketone alcohol $$ Tyranton $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ (CH3)2C(OH)CH2C(O)CH3 $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ 2-Methyl-2-pentanol-4-one $$ 4-Methyl-2-pentanon-4-ol $$ Pyranton a $$ Diacetonalcohol $$ Diaceton alcool $$ Diacetonalkohol $$ Diacetone-alcool $$ 4-Hydroxy-2-keto-4-methylpentane $$ 4-Hydroxy-4-methyl-pentan-2-on $$ 4-Idrossi-4-metil-pentan-2-one $$ Diacetone $$ 4-Hydr	123-42-2	4119	1
10	93	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10277	3

Library Name
(1) NIST107.LIB (2) NIST21.LIB (3) WILEY229.LIB (4) SHIM1607.LIB

Figura 24: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa que mostram que a substância padrão XS (tempo de retenção = 6.492) é o 4-hidroxi-4-metil -2-pentanona.

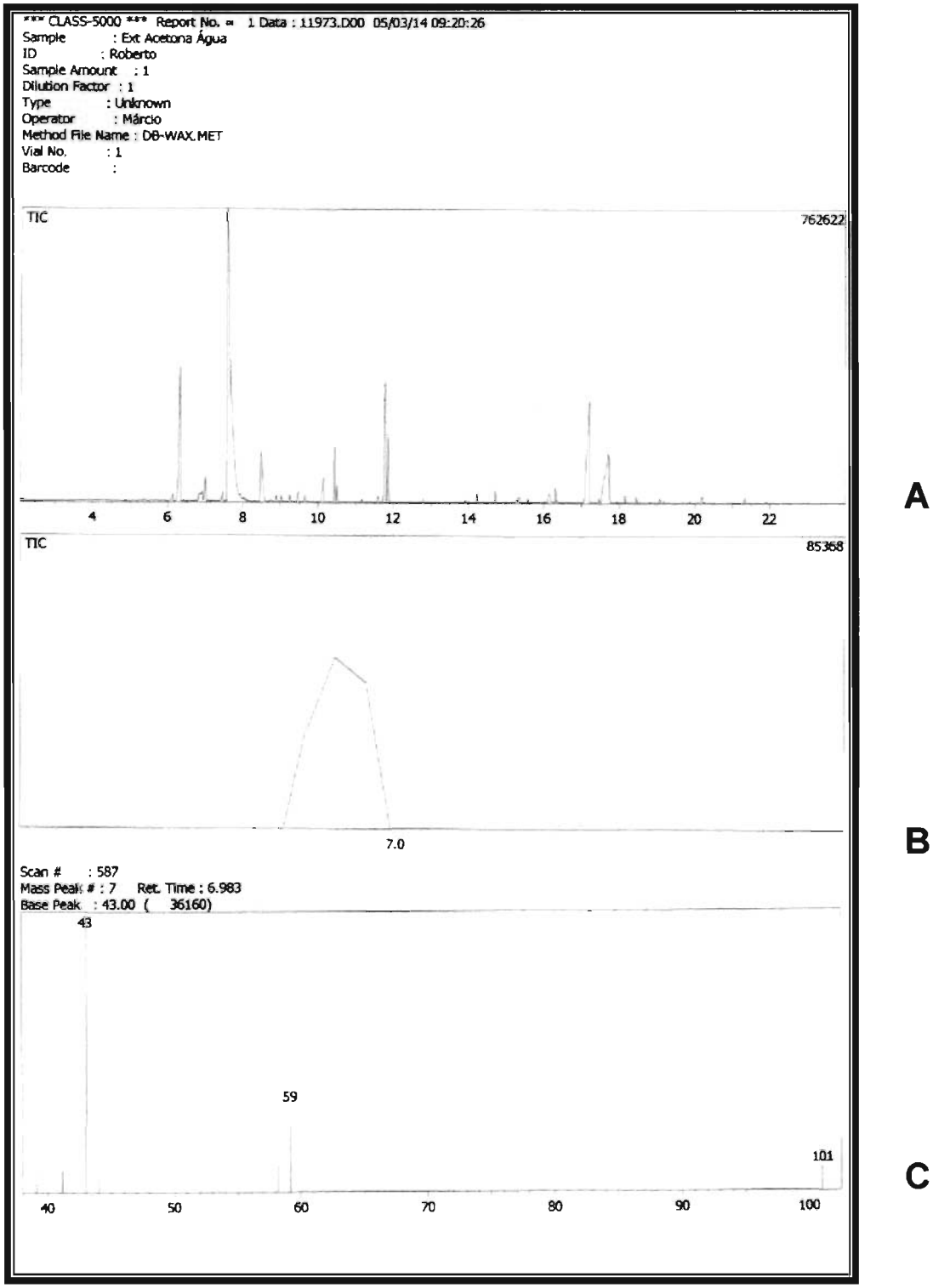


Figura 25: A. Cromatografia gasosa do extrato acetona:água; B. pico ampliado de uma das substâncias presente no extrato (tempo de retenção = 6.983); C Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.983.

<Unknown Spectrum>
Data : 11973.D00
Mass Peak # : 7 Ret. Time : 6.983
Scan # : 587
Base Peak : 43.00 (36160)

<Hit List>

No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	93	116	$C_6H_{12}O_2$ 4-HYDROXY-4-METHYL-2-PENTANONE $$	- -0	10432	3
2	92	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10269	3
3	91	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10279	3
4	91	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	123-42-2	3076	2
5	91	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10278	3
6	90	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10274	3
7	90	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	123-42-2	3075	2
8	90	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10275	3
9	89	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10281	3

Figura 26: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa referente ao extrato acetona:água que permitiram identificar a substância com tempo de retenção 6.983, como sendo o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona.

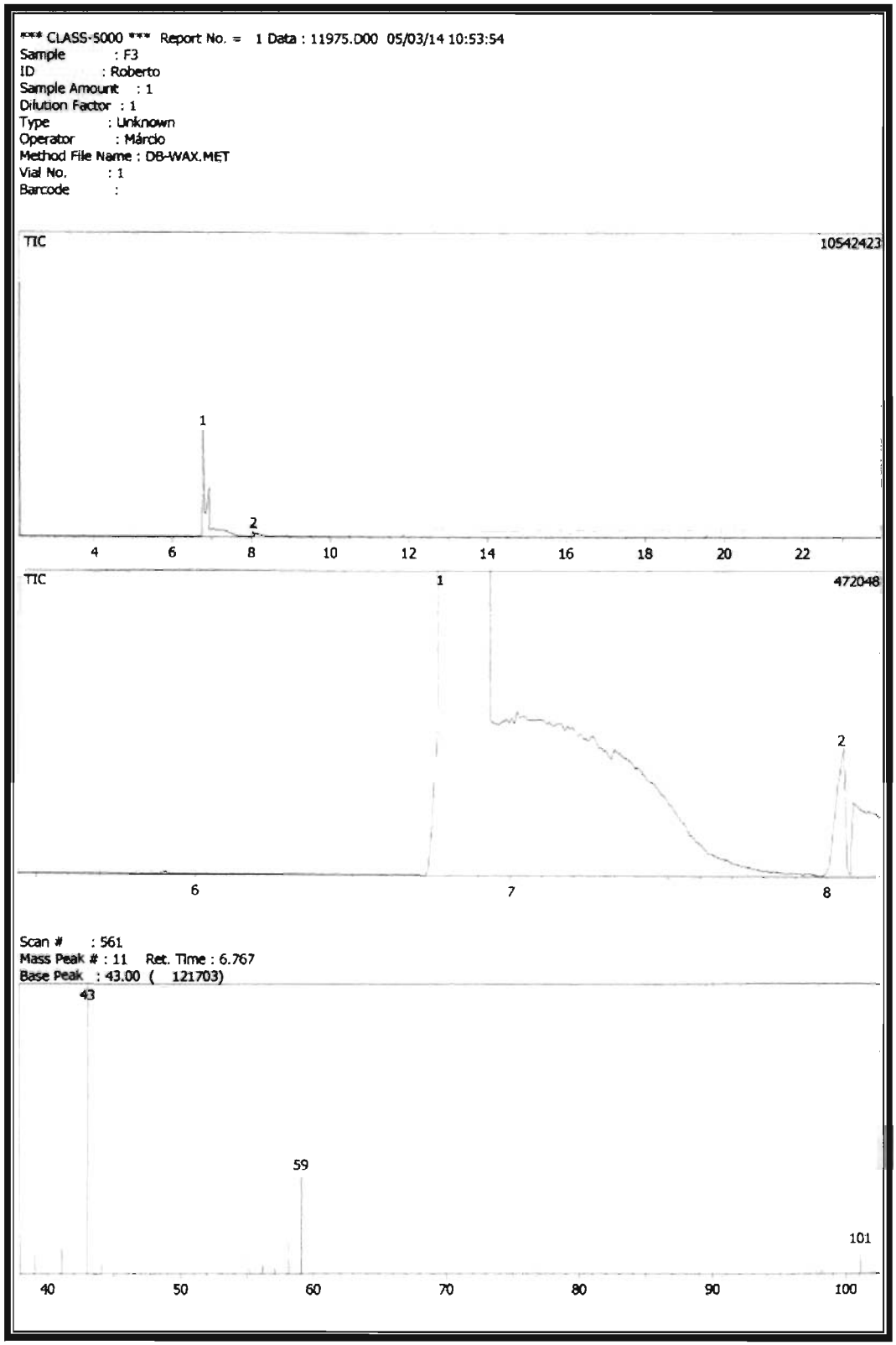


Figura 27: A. Cromatografia gasosa da fração F3; B. pico ampliado da substância majoritária presente na fração F3 (tempo de retenção = 6.767); C. Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.767.

<Unknown Spectrum>
Data : 11975.D00
Mass Peak # : 11 Ret. Time : 6.767
Scan # : 561
Base Peak : 43.00 (121703)

<Hit List>

No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	96	116	$C_6H_{12}O_2$ 4-HYDROXY-4-METHYL-2-PENTANONE $$	- -0	10432	4
2	96	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10269	4
3	95	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10274	4
4	94	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10279	4
5	94	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	123-42-2	3075	3

Library Name
(1) SHIM1607.LIB (2) NIST107.LIB (3) NIST21.LIB (4) WILEY229.LIB

Figura 28: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa que permitiram comprovar que a substância F3 isolada por cromatografia em camada delgada preparativa (tempo de retenção = 6.767) é o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona.

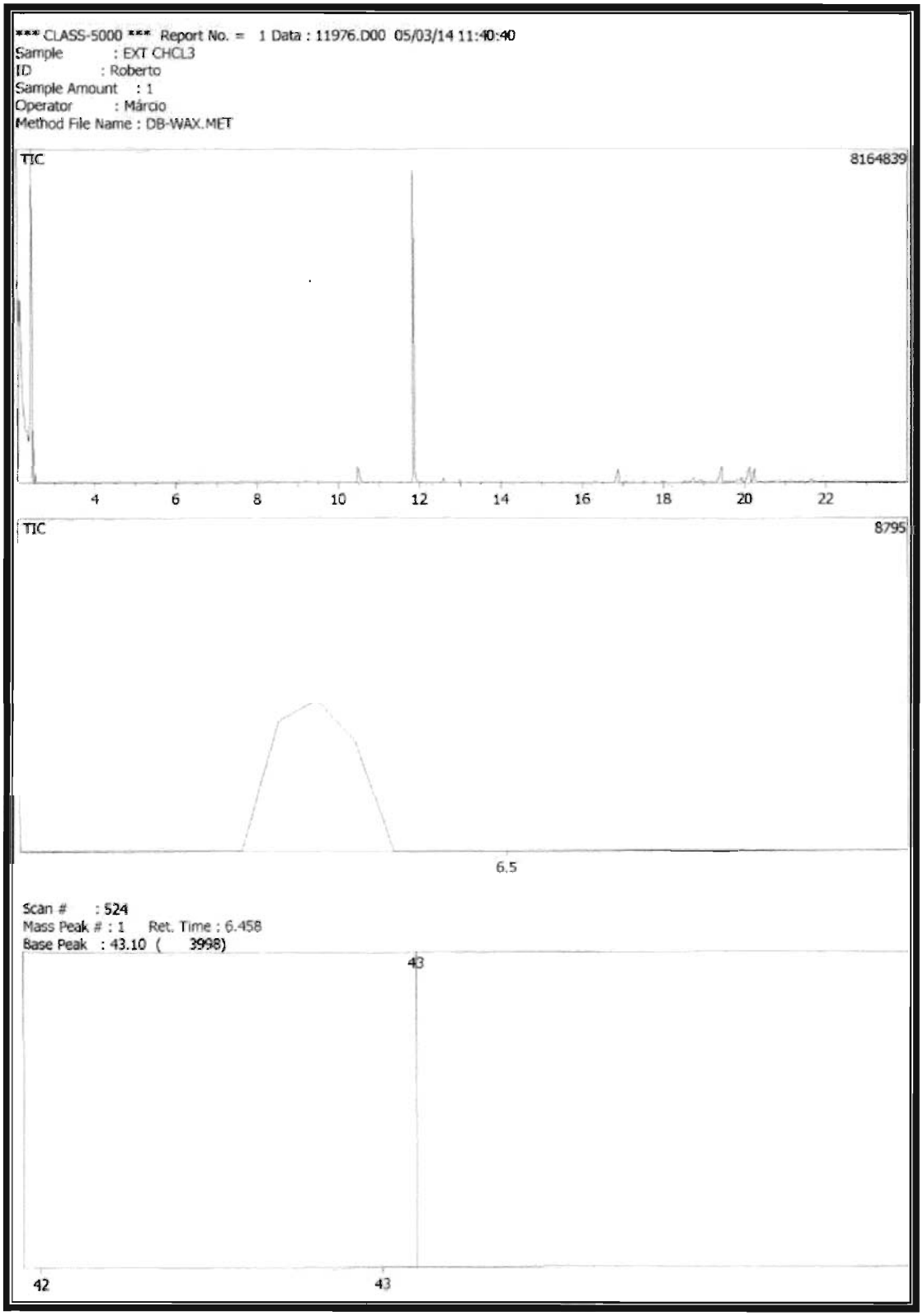
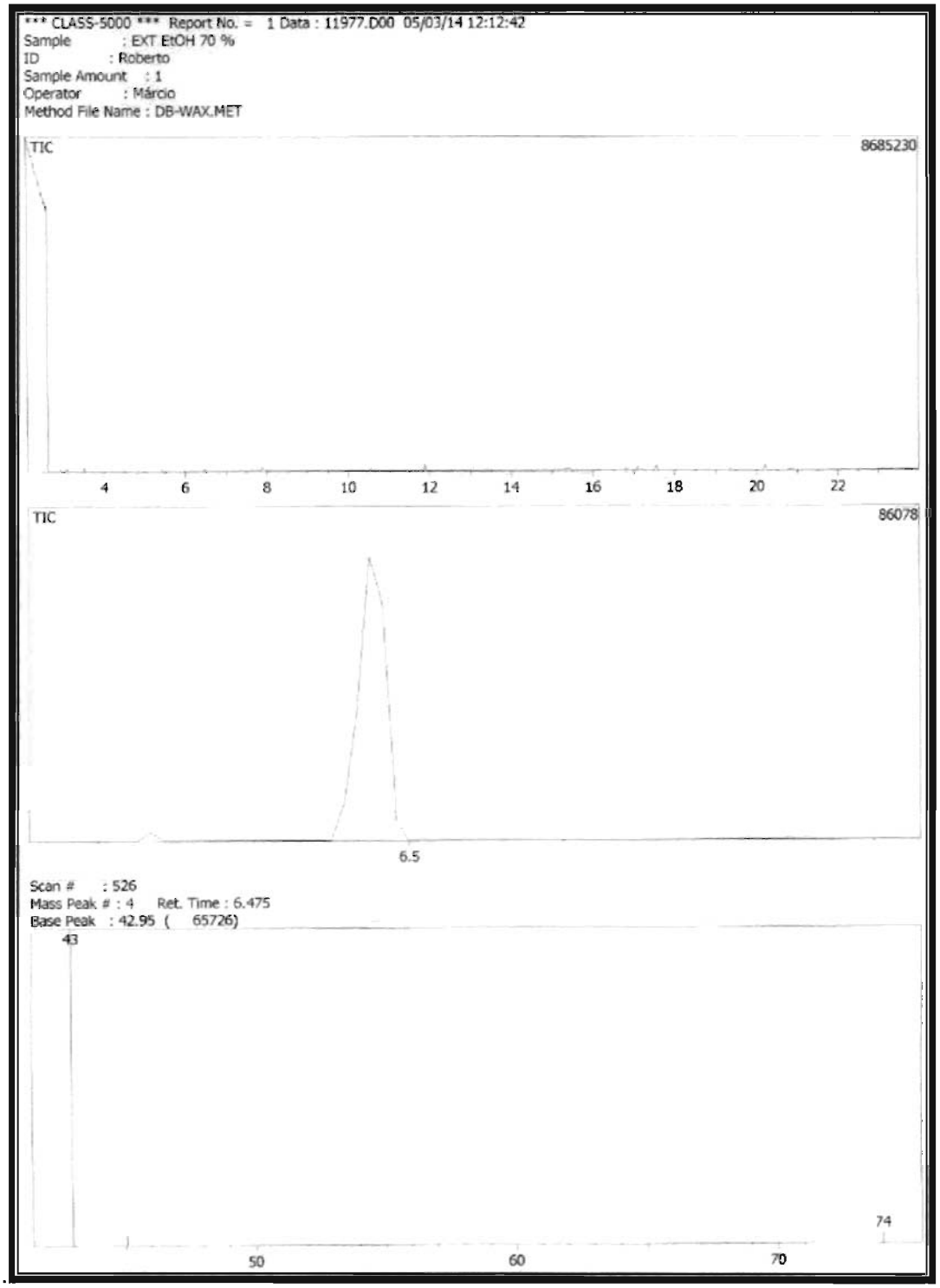


Figura 29: A. Cromatografia gasosa do extrato clorofórmico; B. pico ampliado de uma das substâncias presente no extrato clorofórmico (tempo de retenção = 6.458); C Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.458.

<Hit List>

No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	93	116	$C_6H_{12}O_2$	- -0	10432	3
			4-HYDROXY-4-METHYL-2-PENTANONE $$			
2	92	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	10269	3
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$			
3	91	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	10279	3
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$			
4	91	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	3076	2
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-			
5	91	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	10278	3
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$			
6	90	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	10274	3
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$			
7	90	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	3075	2
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-			
8	90	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	10275	3
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$			
9	89	116	$C_6H_{12}O_2$	123-42-2	10281	3
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$			

Figura 30: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa referente ao extrato clorofórmico que permitiram identificar a substância com tempo de retenção 6.458, como sendo o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona.



A

B

C

Figura 31: A. Cromatografia gasosa do extrato etanol 70%; B. pico ampliado de uma das substâncias presente no extrato etanol 70% (tempo de retenção = 6.475); C Espectro de massa da substância com tempo de retenção = 6.475.

<Hit List>

No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	96	116	$C_6H_{12}O_2$ 4-HYDROXY-4-METHYL 2-PENTANONE $$	- -0	10432	4
2	96	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4 methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10269	4
3	95	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4-methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10274	4
4	94	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol $$ 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- $$ 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone $$ Tyranton $$ Diketone alcohol $$ Acetonyldimethylcarbinol $$ 4-Hydroxy-4 methylpentanone $$ 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-one $$ 2-HYDROXY 2-METHYL-4-PENTANONE $$ DIACETONE $$ Pyranton A $$ 4-Methyl-4-hydroxy-2-pentanone $$	123-42-2	10279	4
5	94	116	$C_6H_{12}O_2$ 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	123-42-2	3075	3

Library Name
(1) SHIM1607.LIB (2) NIST107.LIB (3) NIST21.LIB (4) WILEY229.LIB

Figura 32: Dados fornecidos pelo aparelho Cromatógrafo a gás/Espectro de massa referente ao extrato etanol 70% que permitiram identificar a substância com tempo de retenção 6.475, como sendo o 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona.

5.2.8- Doseamento de taninos no pó da droga e no EHL

Neste experimento, a concentração de taninos no pó da droga e no EHL, foi de 0,05% e 0,72%, respectivamente.

5.2.9- Determinação de água no pó da droga e no EHL

O teor de água encontrado na droga, de acordo com o procedimento descrito, foi de 11,00% e no EHL, 10,94%.

5.3- Aspectos farmacológicos

5.3.1- Atividade antimalárica e antileishmania do EHL e do extrato clorofórmico

Na avaliação antimalárica e antileishmania dos extratos hidroetanólico liofilizado (EHL) e clorofórmico, ambos os extratos, nas concentrações de 100 µg/mL, provocaram 100% de morte nos protozoários da malária (figura 33), não tendo, no entanto, nenhuma ação nesta mesma concentração nos protozoários da leishmania (figura 34).

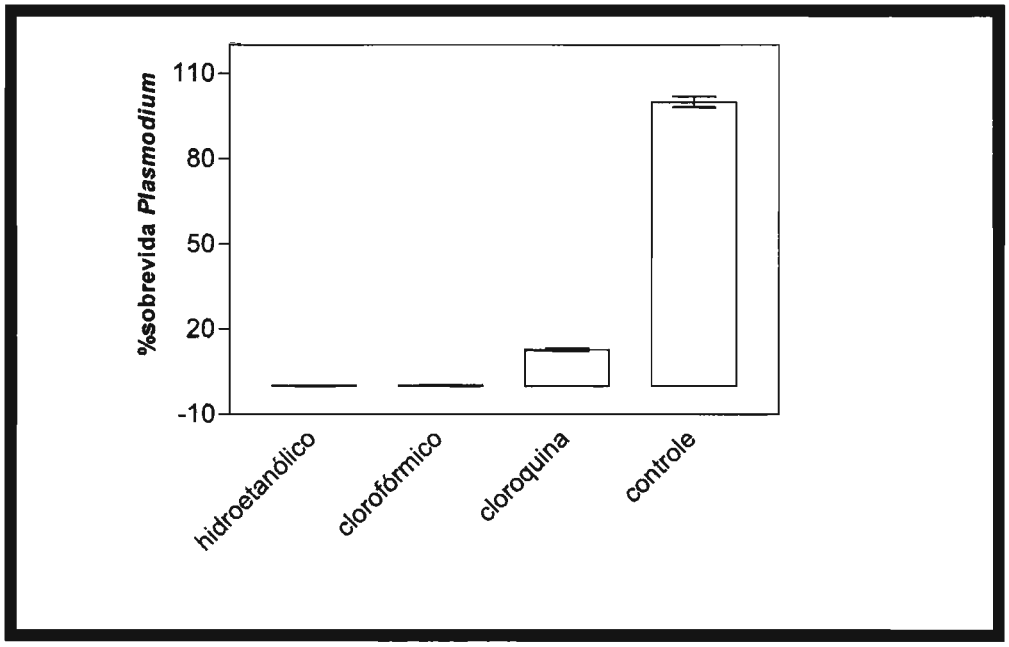


Figura 33: Atividade antimalárica do extrato hidroetanólico liofilizado (100µg/mL) e clorofórmico (100µg/mL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze. A atividade foi verificada em *Plasmodium chabaudi* AJ e determinada através da incorporação de 1µCi de [^{3}H] hipoxantina, após incubação por 24 h. Cloroquina (16 µg/mL) foi utilizada como fármaco padrão.

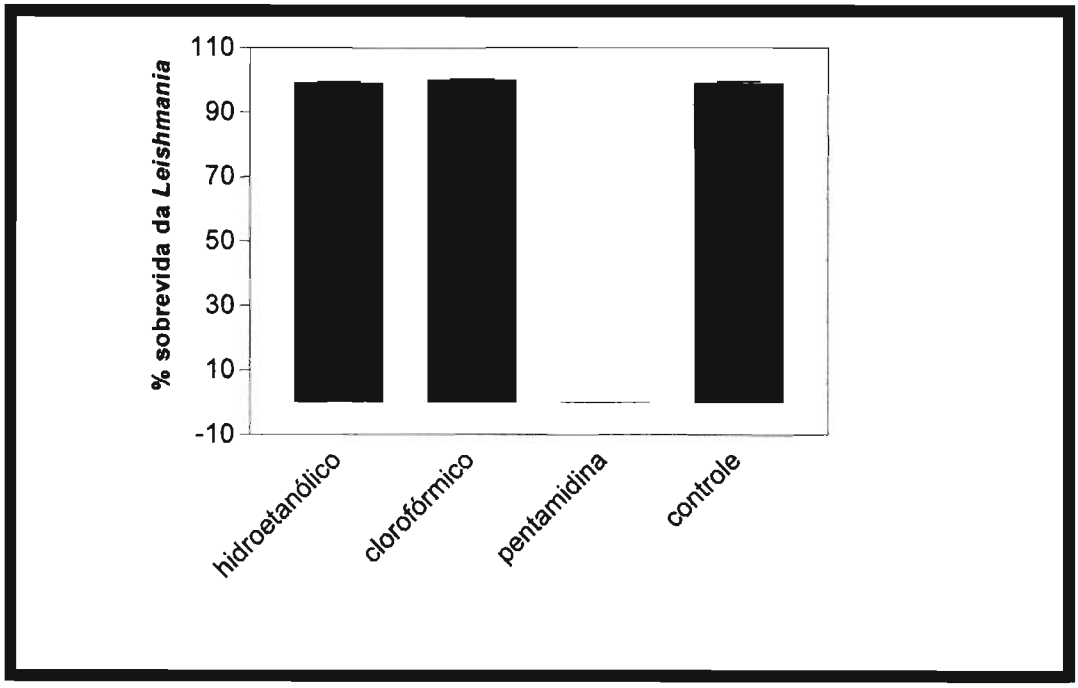


Figura 34: Avaliação da atividade antileishmania do extrato hidroetanólico liofilizado (100 μg/mL) e clorofórmico (100 μg/mL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze. A atividade foi verificada em promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* e a viabilidade celular determinada através do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo). Pentamidina (10 μg/mL) foi utilizada como fármaco padrão.

5.3.2- Atividade antiúlcera aguda

A avaliação da atividade antiúlcera do extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) foi efetuada através do modelo de indução com ácido clorídrico e etanol, conforme descrita no item 4.3.2. Os resultados deste ensaio estão representados pelas figuras 35, 36 e 37 e pelas tabelas 11, 12 e 13.

- Controle

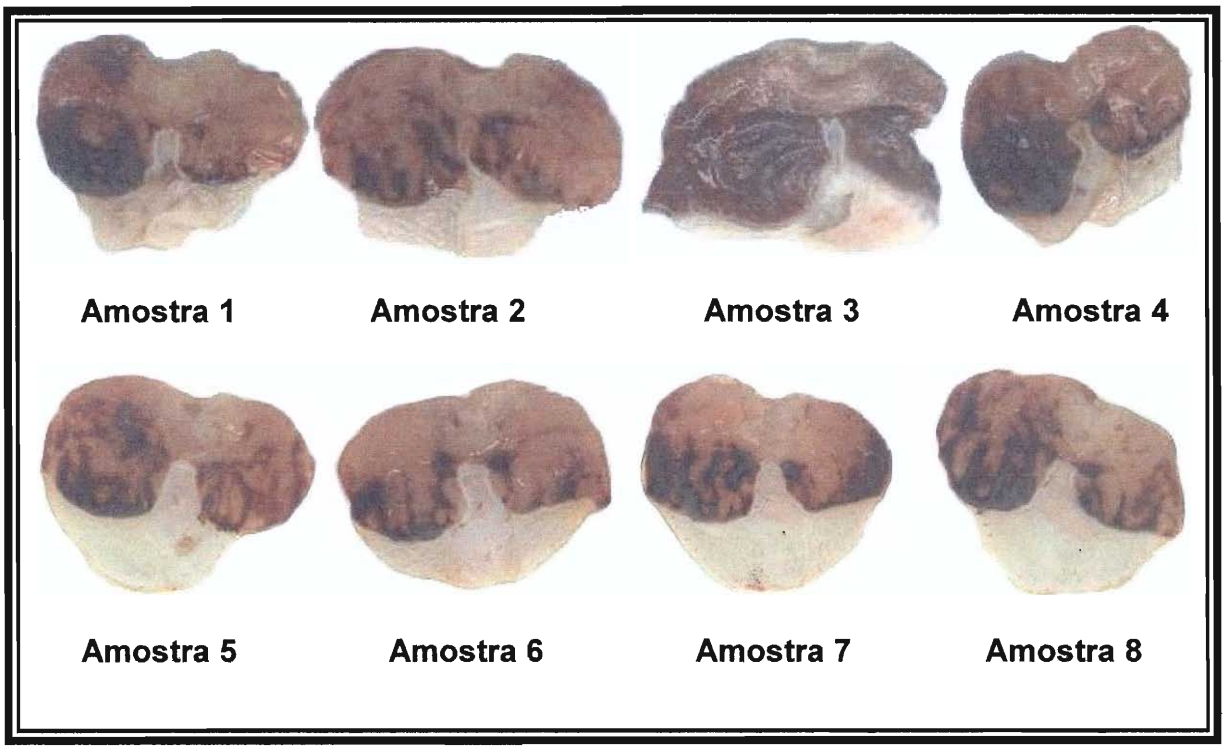


Figura 35: Estômagos do grupo de ratos controles tratados com água, por via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol.

Tabela 11: Comparação da área total do estômago, área total da lesão e área relativa da lesão do grupo de ratos controles tratados com água, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol.

Controle	Área Total da Lesão (mm^2)	Área Total do estômago (mm^2)	Área Relativa da Lesão (Arcosseno %)
Amostra 1	167,1250	723,7500	28,7205
Amostra 2	228,5625	658,0625	36,1105
Amostra 3	343,3750	1324,0000	30,6146
Amostra 4	316,1250	717,4375	34,3628
Amostra 5	474,3125	1188,4380	39,1792
Amostra 6	369,8125	985,9375	37,7664
Amostra 7	326,8750	1321,5625	29,8237
Amostra 8	593,5000	1337,1875	41,7756

- Extrato bruto

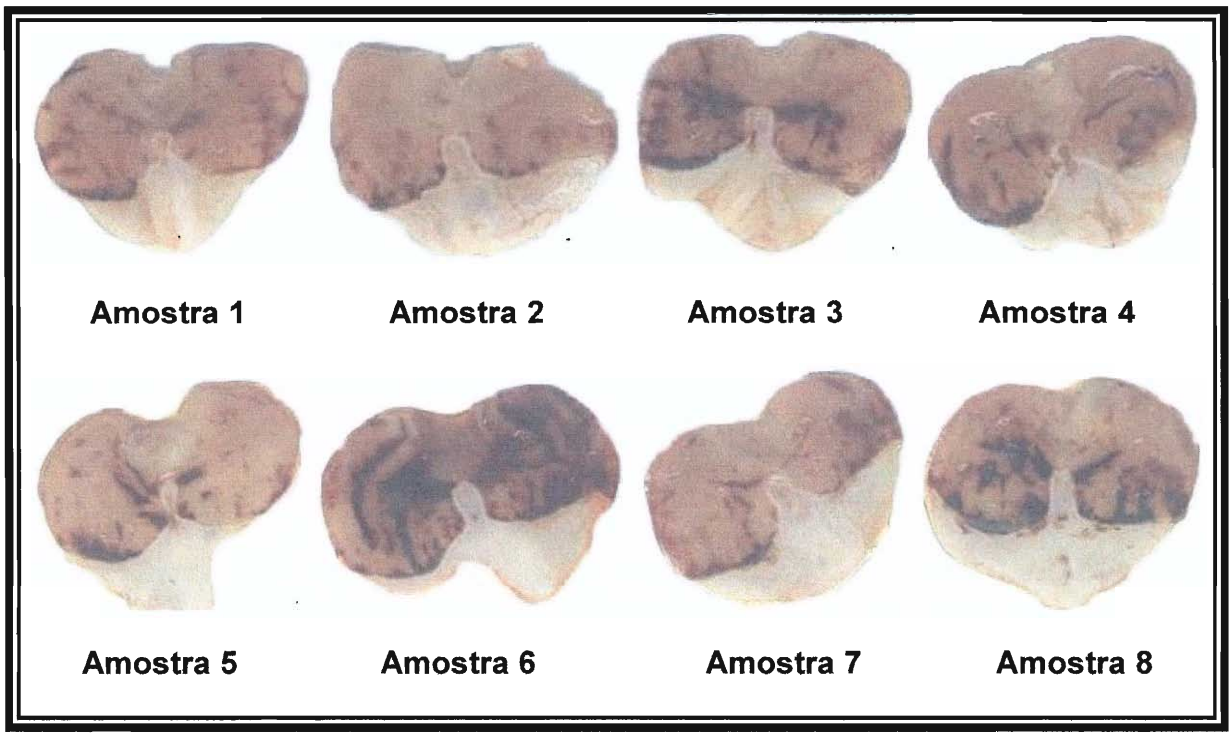


Figura 36: Estômagos do grupo de ratos tratados com uma dose de 400 mg/kg de extrato liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol.

Tabela 12: Comparação da área total do estômago, área total da lesão e área relativa da lesão do grupo de ratos tratados com uma dose de 400 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado (EHL), via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol.

Extrato bruto	Área Total da Lesão (mm^2)	Área Total do estômago (mm^2)	Área Relativa da Lesão (Arcosseno %)
Amostra 1	49,0625	859,8125	13,8202
Amostra 2	142,0625	742,5000	25,9389
Amostra 3	117,2500	837,8750	21,9676
Amostra 4	134,1250	905,0000	23,3409
Amostra 5	164,1250	1074,8750	23,0017
Amostra 6	440,6875	1141,5000	38,4139
Amostra 7	164,3750	986,0000	24,0981
Amostra 8	222,5625	1214,5000	25,3459

- Ranitidina

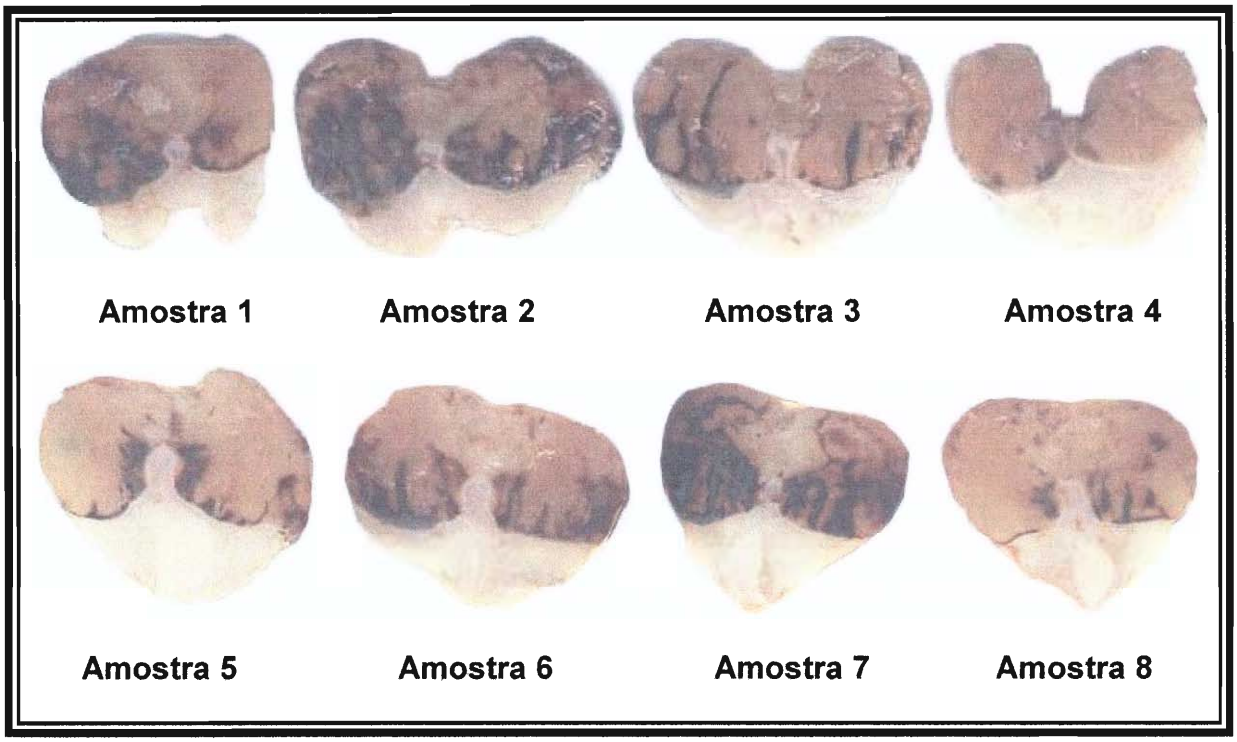


Figura 37: Estômagos do grupo de ratos tratados com cloridrato de ranitidina na dose de 100 µg/kg, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol.

Tabela 13: Comparação da área total do estômago, área total da lesão e área relativa da lesão do grupo de ratos tratados com cloridrato de ranitidina na dose de 100 µg/kg, via oral, no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico e etanol.

Ranitidina	Área Total da Lesão (mm^2)	Área Total do estômago (mm^2)	Área Relativa da Lesão (Arcosseno %)
Amostra 1	191,3125	613,6250	33,9430
Amostra 2	278,5625	780,7500	36,6780
Amostra 3	46,6875	696,7500	15,0023
Amostra 4	67,8125	538,0625	20,7940
Amostra 5	144,5625	1072,5625	21,5386
Amostra 6	198,0625	1110,6875	24,9789
Amostra 7	434,3750	1267,0625	35,8389
Amostra 8	205,4375	1123,1875	25,3201

Na avaliação da atividade antiúlcera aguda, sobre os parâmetros da Área Total da Lesão (ATL) e Área Relativa da Lesão (ARL), o EHL do vegetal em estudo, na dosagem de 400 mg/kg, apresentou atividade protetora significativa nos testes estatísticos realizados em relação ao grupo controle (figuras 38 e 39).

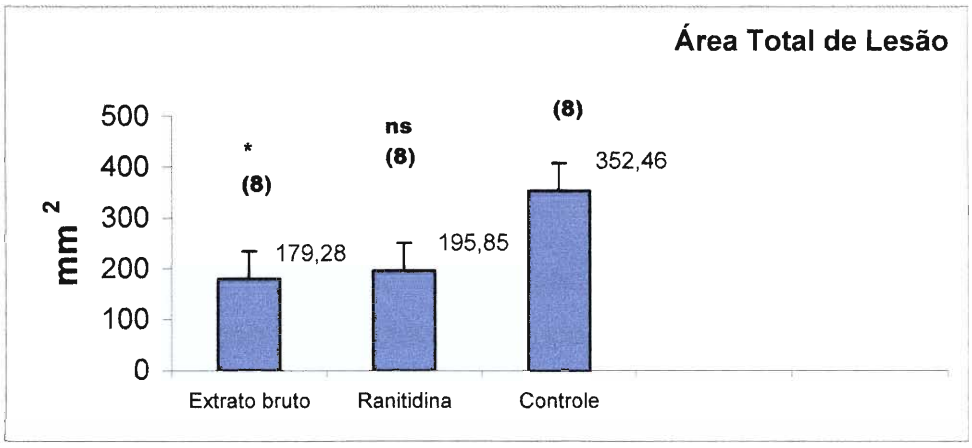


Figura 38: Avaliação da Área Total de Lesão (ATL) no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico (0,3M) e etanol (60%) após a administração, via oral, de água (controle), 400 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze e 100 µg/kg de cloridrato de ranitidina. O gráfico representa a média da Área Total de Lesão e seu respectivo erro padrão (*$p < 0,05$; ANOVA, Teste de Tukey). O número de animais utilizado em cada grupo experimental está representado entre parênteses; *$p < 0,05$ = resultado significativo em relação ao controle; ns = resultado não significativo em relação ao controle.

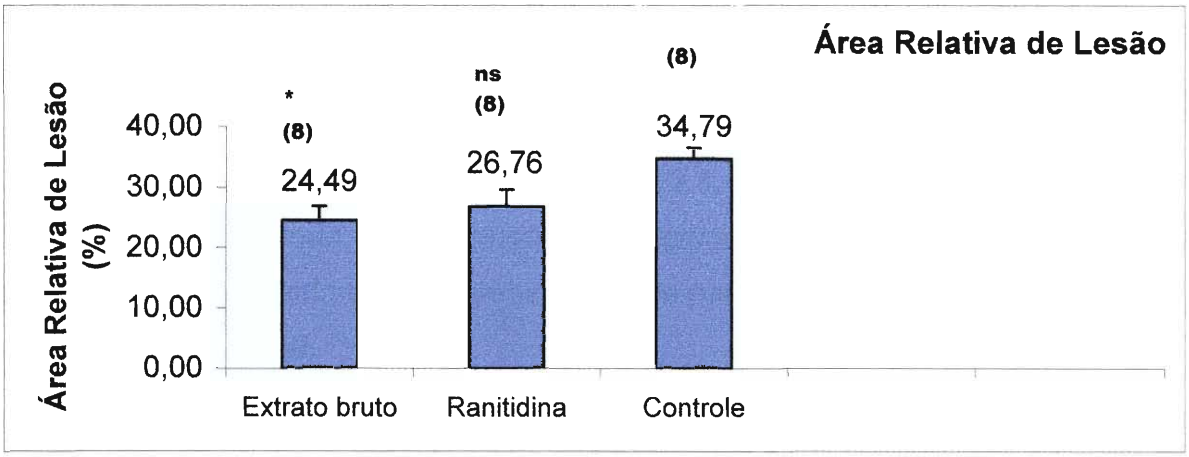


Figura 39: Avaliação da Área Relativa de Lesão (ARL) no ensaio antiúlcera agudo, com modelo de indução por ácido clorídrico (0,3M) e etanol (60%) após a administração, via oral, de água (controle), 400 mg/kg de extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze e 100 µg/kg de cloridrato de ranitidina. O gráfico representa a média da Área Relativa de Lesão e seu respectivo erro padrão (*p < 0,05; ANOVA, Teste de Tukey). O número de animais utilizado em cada grupo experimental está representado entre parênteses; *p < 0,05 = resultado significativo em relação ao controle; ns = resultado não significativo em relação ao controle.

5.3.3- Atividade antimicrobiana do EHL em bactérias, leveduras e bolor

O extrato hidroetanólico liofilizado de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze, nas condições descritas no item 4.3.3, não apresentou atividade para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e *Candida albicans*, demonstrando uma pequena atividade para o *Aspergillus niger*, conforme é mostrado na figura 40.

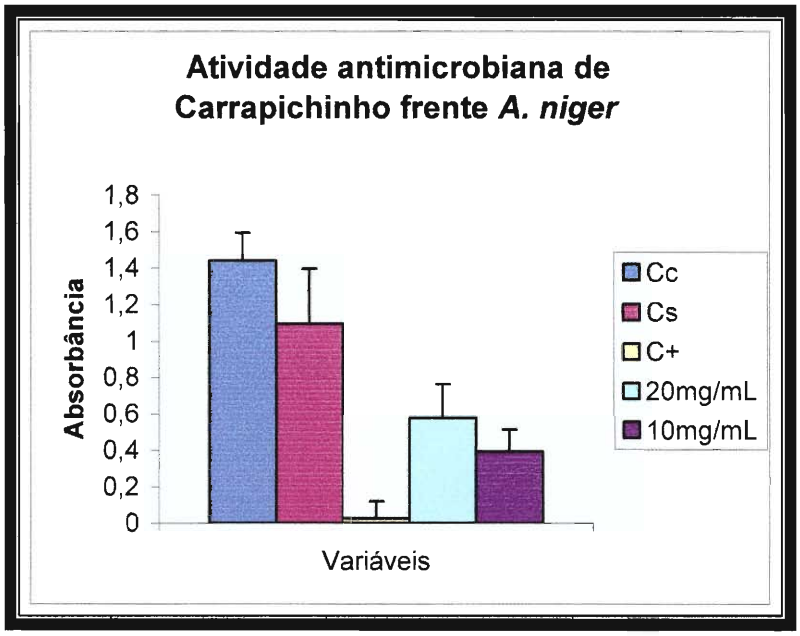


Figura 40: Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico liofilizado (EHL) de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze frente ao bolor *Aspergillus niger* (ATCC 16404), nas concentrações de 10 mg/mL e 20 mg/mL. O fármaco padrão utilizado foi a nistatina dissolvida em água destilada na concentração de 1 mg/mL. A absorbância foi medida em espectrofotômetro, com detector de Elisa a 630 nm. Cc controle de crescimento; Cs. controle do solvente; C+. controle positivo.

Discussão

6 – Discussão

6.1- Aspectos botânicos

Em sua grande maioria, as Asteraceae estão representadas por espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e, só raramente, por espécies arbóreas (ex.: *Vernonia* sp.). As folhas, em segmento altamente significativo, são alternas; folhas opostas apresentam-se em alguns gêneros e espécies, principalmente nas tribos Heliantheae e Eupatorieae (BARROSO, 1991).

A espécie analisada apresenta-se como uma herbácea anual, do tipo rasteira como ocorre na família e com folhas inteiras e opostas, vindo a corroborar com as características gerais de sua tribo (Heliantheae). Ainda em relação às folhas, muitas características estão de acordo com as descrições da literatura, como tamanho, filotaxia, base e margem foliar, inserção do pecíolo e características organolépticas de cor e sabor.

No tipo estudado, não foi possível observar o odor aromático acentuado das folhas, citado por LORENZI, (2000) e CORRÊA, (1984), apesar de ter sido respeitado os procedimentos descritos por OLIVEIRA e AKISUE (1991), no que tange aos cuidados relacionados à perda do óleo essencial, substância esta, responsável pela característica odorífera deste vegetal.

A dificuldade em se verificar o odor aromático acentuado citado acima, pode ser atribuída à época do ano em que foi realizada a coleta, fator este bastante importante a ser considerado na coleta de plantas fanerógamas.

Os caules arroxeados podem alcançar até 1m de comprimento, estando de acordo com a informação de CORRÊA (1984). LORENZI (2000), no entanto, admite que a extensão do caule atinge somente 20 a 40 cm, informação não observada na amostra em estudo.

Estudos microscópicos de *Acanthospermum australe* como também de seu gênero *Acanthospermum*, não foram encontrados no trabalho de revisão e, portanto, os resultados aqui obtidos serão comparados com a descrição botânica da sua respectiva família.

Para SOLEREDER (1908), na família Asteraceae, os estômatos são ladeados por 3 ou mais células epidérmicas e a sua diferenciação segue o tipo anisocítico. No entanto, METCALFE e CHALK (1950) registram estômatos geralmente anomocíticos para o mesmo táxon. Na espécie analisada, observa-se estômatos em ambas as epidermes, com células-guarda de formato riniforme, ladeadas por 3 ou mais células epidérmicas de aspecto semelhante às demais. Os estômatos, portanto, são classificados como anomocíticos.

De acordo com ESAÚ (1977), HEYWOOD, (1977), METCALFE e CHALK (1979), BREMER (1994) e CASTRO *et al* (1997), diferentes tipos de estruturas secretoras podem ser encontrados em folhas de Asteraceae, tais como: dutos, cavidades, idioblastos, laticíferos, hidatódios, tricomas e apêndices glandulares.

Verificou-se neste estudo tricomas tectores que estão presentes no caule, pecíolo e na região de nervura mediana de folhas, sendo pluricelulares e unisseriados, como geralmente ocorrem na família.

A presença de canais secretores que medeiam os feixes vasculares, em regiões de pecíolo e caule, também se observou, e, em sendo muito pequenos, apresentam dificuldade de imediata visualização. Tais estruturas são aparentemente do tipo esquizógeno, apontando-se a necessidade, entretanto, de um posterior estudo de ontogênese, para confirmação.

De acordo com METCALFE e CHALK (1979), a presença de canais secretores, relacionados com os feixes vasculares, está entre as características que ocorrem com maior freqüência na família.

HOEHNE *et al* (1952) assinalam tal ocorrência em *Calea pinnatifida* Banks e GROTTA (1945), em *Spilanthes acmella* L.. Os mesmos autores afirmam ainda que as folhas da maioria das espécies pertencentes à família possuem mesofilo dorsiventral e camadas de células hipodérmicas aqüíferas. Na espécie em estudo foi observado o mesofilo dorsiventral, porém, as camadas de células hipodérmicas aqüíferas não foram visualizadas.

O caule jovem de *A. australe* apresenta estrutura sifonostélica ectoflóica descontínua (ou eustélica ectoflóica) como frequentemente ocorre na família. A região cortical pouco desenvolvida (figura 14D), colênquima bastante desenvolvido, chegando a apresentar até 4 camadas (figura 14B), feixes vasculares que se encontram dispostos em um único anel, separados entre si por raios parenquimáticos relativamente largos (figuras 14A e 14D) e canais secretores que ladeiam os feixes vasculares (figura 14D) são informações obtidas no presente estudo que estão de acordo com àquelas descritas na família, por diversos autores.

6.2- Aspectos químicos

Em relação à composição química, as análises dos grupos forneceram resultados positivos para flavonóides, taninos, saponinas, mucilagens e óleo essencial, constituído em grande parte por sesquiterpenos.

Os flavonóides também são comuns à família, sendo citada por HEYWOOD (1977) em sua obra. Estudos químicos e farmacológicos com outra planta do mesmo gênero, *Acanthospermum glabratum* (SALEH *et al.*, 1976) mostrou que a mesma apresenta substâncias com atividade inibidora da aldose redutase.

Apesar de não ter sido isolado neste trabalho nenhuma lactona sesquiterpênica, este grupo de substância tem sido isolado de extratos desta espécie, conforme estudos de BOHLMANN *et al.*, (1984) e ZDERO, *et al.*, (1987). Alguns deles, como é o caso do acanthostral (cis, cis, cis-germacranolídeo), citada por MATSUNAGA *et al.* (1996), revelou atividade antineoplásica.

Em relação a membros da família Asteraceae, inclusas na subtribo Melampoddinae, muitos diterpenóides e melampolídeo tipo sesquiterpenóides, também foram isolados, de acordo com os estudos de QUIJANO *et al.* (1979); BARUA *et al.* (1980); SALEH, *et al.* (1980); BOHLMANN *et al.* (1981 e 1984a); CASTRO *et al.* (1989); ZDERO *et al.* (1991); MACÍAS e FISCHER (1992); MACÍAS *et al.* (1993); INOUE *et al.* (1995) e QUIJANO *et al.* (1997), a partir de numerosas espécies de *Tetragonotheca*, *Sigesbeckia*, *Acanthospermum*, *Melampodium*, *Lecocarpus* e *Smallanthus*.

BARDÓN, *et al.* (2001) isolaram oito melampolídeos, partindo de partes aéreas e raízes de *Enydra anagallis* (Asteraceae, tribo Heliantheae), a única espécie deste gênero que cresce na Argentina.

Estes dados são importantes, uma vez que mostram que a produção deste grupo de substância parece estar intimamente relacionada às Asteraceae, confirmando as afirmações feitas por HEGNAUER (1964).

Apesar de *A. australe* ser rica nesta classe de princípio ativo, não se pode afirmar que tais substâncias são as responsáveis pela variedade de ações terapêuticas da mesma, descritas em literatura, devido às divergências existentes entre a natureza química desses compostos com a do solvente extrator utilizado.

As lactonas sesquiterpênicas, assim como os diterpenos, apresentam natureza apolar e a medicina popular explora todas as atividades farmacológicas, inclusive a antimalárica, através do "chá", que é obtido pela decocção de diferentes partes do vegetal, utilizando-se a água como solvente. Portanto, a extração dessas substâncias ficaria reduzida e a concentração de compostos de natureza polar, seria maior no produto final.

Para fins técnicos, esta forma farmacêutica ("chá") teria uma denominação correta se o processo de obtenção fosse por infusão, ou ainda, se atribuíssemos o nome do produto final por decôcto.

No presente estudo, os extratos aquosos obtidos pelo processo de decocção foram avaliados devido à preocupação em se estudar um extrato que reproduzisse de maneira mais próxima àquela usada na medicina popular.

Os rendimentos dos extratos aquosos, obtido por decocção e aquela obtida a partir da hidrodestilação, foram diferentes. O primeiro, apresentou um rendimento superior (15,00%); o menor rendimento do segundo (11,93%) pode ser justificado pelo fato do material estar exposto ao calor por um tempo superior, o que pode ter levado à degradação de alguns compostos.

O extrato acetona:água foi averiguado tendo em vista o aspecto quantitativo dos princípios ativos de natureza polar (HAGERMAN, 1988), ou seja, essa associação de solventes extrai equitativamente os componentes do "chá", usado na medicina popular, porém em concentrações maiores, o que pode ser comprovado pelo seu rendimento (16,35%) que foi superior à decocção (15.00%). A vantagem dessa associação de solventes é que a extração de interferentes, como a clorofila, fica reduzida quando comparada ao extrato hidroetanólico.

A fração F3, isolada do extrato acetona:água por CCD preparativa e identificada por CG/EM, corresponde a 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, uma cetona-álcool que está na lista de produtos tóxicos publicados pela vigilância sanitária.

Devido ao fato desta substância estar presente nos extratos, 1- clorofórmico, 2- hidroetanólico, 3- aquoso e 4- acetona:água, conforme é mostrada na figura 22, e que os dois primeiros, neste trabalho, apresentaram atividade contra o protozoário da malária, pode-se deduzir que a ação antimalárica obtida com o extrato aquoso na medicina popular possa estar relacionada a um componente comum a todos eles, podendo ser a própria fração F3 ou a substância da qual ela foi originada, que neste caso, corresponde ao ácido caféico.

A sugestão de que esta cetona-álcool (PM:116) corresponde a um produto de degradação do ácido caféico (PM: 180), vem do fato da aplicação do padrão XS (padrão de ácido caféico) no aparelho de CG/EM (figura 24), e o seu banco de dados identificá-lo como sendo a substância 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, e não, o ácido caféico, como era de se esperar. Isto indica que o ácido caféico, ao ser aquecido, originou este artefato, de natureza tóxica.

O ácido caféico é um composto fenólico, presente em grande quantidade nesta família de vegetais. Aparece como uma mistura de ácidos clorogênico,

incluindo cinarina e algumas vezes como ácido chicórico, como foi descrita por Hegnauer, em 1964.

Nenhum estudo relacionando o ácido caféico e derivados com a atividade antimalárica tem sido desenvolvido, uma vez que, dentre as classes de metabólitos secundários de plantas com atividade antimalárica mais pesquisada pelo homem, em estudos *in vitro* contra *P. falciparum*, ou *in vivo* contra *P. berghei*, são os alcalóides [ex.: augustine, (+)- isotetrandina, (+)-homoaramolina]; os sesquiterpenos (ex.:artemisinina, 16-α-óxido de cariofileno); os quassinóides (brusatol, bruceantina, brucei A, B e C); os flavonóides (ex.: exiguaflavona A e B, genisteína, pratenseína) e as xantonas (ex.: couanina, couanol, couaxantona, β-mangostin), (SAXENA, 2003).

Os quassinóides são lactonas altamente oxigenadas, que em sua maior parte apresenta 20 átomos de carbono em seu esqueleto, podendo existir alguns contendo 18, 19 e até 25 átomos.

Devido ao fato da maioria dos alcalóides, das lactonas sesquiterpênicas e dos quassinóides não serem extraídos com água, as razões são grandes para pensarmos que a substância ativa dos "chás", utilizadas na medicina popular com atividade antimalárica, possa estar relacionada também a outros compostos fenólicos, como os flavonóides e algumas xantonas, que podem ser extraídos com água ou misturas hidroalcoólicas.

A fração F4, isolada do extrato clorofórmico por CCD preparativa e identificada por CG/EM, corresponde a um isômero, não identificado, do sesquiterpeno globulol, solúvel em clorofórmio e que apresenta um grupo germacrano em sua estrutura, estando presente em maior concentração no óleo essencial de folhas, do que em caules (tabela 9). Esta maior concentração está relacionada diretamente com a fase em que se encontra o vegetal, sendo no caso, em época de floração.

Este componente continua presente no óleo, mesmo quando o material sofre processo de secagem e, possivelmente, nem ele e nenhum outro componente isolado do óleo, e nem o óleo como um todo, não estão relacionados à atividade antimalárica, explorada pela medicina popular. Esta afirmação pode ser feita baseada em vários motivos: 1- o óleo, devido à sua natureza lipofílica, não é bem

extraído por solventes aquosos, 2- o óleo essencial, mesmo sendo extraído por técnica apropriada, do tipo quantitativo (hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado), apresenta-se em baixas concentrações, tanto em nosso trabalho como no estudo publicado por MORAIS *et al.*, (1991) e 3- devido ao fato de sua composição química não ser uma constante, fica a impossibilidade de atribuir-lhe esta atividade.

Em relação ao óleo essencial, membros das Asteraceae, com exceção da Cichorieae, produzem esta substância que é depositada no interior de tricomas glandulares ou ductos esquizógenos, em quantidades apreciáveis. Além dos monoterpenóides e dos sesquiterpenóides como constituintes deste óleo, fazem parte da composição, os fenilpropanóides, acetilenos e cromonas (HEGNAUER, 1964).

No caso do óleo essencial da espécie em estudo, o mesmo encontra-se armazenado no interior de canais secretores que, por sua vez, estão próximos aos feixes vasculares. Devido a esta localização mais interna, o processo de secagem do material, transformando-o em droga, não leva a uma total eliminação deste componente.

A presença de óleo essencial foi verificada nas amostras do vegetal coletado em diferentes épocas e variados estágios de desenvolvimento. Os rendimentos de 0,05% (p/v) em folhas frescas e 0,10% (p/v) na droga, bastante baixos em relação a outras drogas contendo óleo essencial, pode estar associado à pequena quantidade de organelas de secreção por unidade de superfície, o que é bem inferior às Asteraceae de maior ocorrência. Torna-se, portanto, inviável a exploração deste material em escala industrial.

Neste trabalho, o método empregado na obtenção do óleo essencial foi a hidrodestilação, método preferido na indústria e nos laboratórios de pesquisa, em função da temperatura de destilação manter-se constante e abaixo da temperatura de ebulição da essência. A redução dos riscos de contaminação por outros produtos, aliada ao fato do método ser econômico e o processo poder ser executado praticamente sem supervisão técnica, constituem-se em outras vantagens desta escolha.

O aparelho utilizado para extração deste grupo de princípio ativo foi idealizado por AKISUE (1971) que consiste em uma modificação e aperfeiçoamento do

primitivo aparelho de CLEVENGER (1928) que sofreu sucessivas alterações quanto aos vários dispositivos citados por GOTTLIEB (1960), COSTA (1964), UNGER (1962), e WASICKY (1963), visando condensação mais perfeita, esgotamento mais rápido, menores perdas e diminuição da emulsificação.

O tempo de destilação para a extração do componente do material em estudo foi de 6 a 7 horas. Este tempo, relativamente extenso, indica a presença de componentes de tensão de vapor relativamente baixo, visto que os óleos, em sua maioria, apresentam tempos de destilação de 3 a 4 horas, em média.

Os componentes do óleo essencial, no presente trabalho, mostraram ser qualitativamente e quantitativamente diferentes, quando a comparação é realizada entre as diferentes amostras. As razões para esta variabilidade podem ser entendidas ao se considerar todos os fatores que influenciam na composição química do óleo, como clima, estação do ano, condições geográficas, período de colheita e técnica de destilação, entre outros (PANIZZI *et al.*, 1993).

Ao se comparar a composição do óleo de folhas frescas coletadas em outubro, na fase de floração (amostra 3), com àquelas coletadas em novembro, com intervalo de 25 dias, na fase de frutificação (amostra 4), pode-se notar através da análise da tabela 9 que a amostra 3 apresenta os monoterpenos, mirceno (2.82%), β-pineno (1.96%) e limoneno (1.82%), e sesquiterpenos, α-cadinol (14.07%) e farnesol (2.02%), que estão ausentes na amostra 4.

Comparando-se os teores dos componentes em comum às duas amostras, percebe-se que em época de floração o vegetal apresenta maiores teores de nerolidol (3.65% x 0.65%), δ-cadineno (16.80% x 1.36%), τ-muurolol (1.71% x 0.88%) e globulol (20.22% x 0.56%), do que em época de frutificação e menores concentrações de β-cariofileno (0.98% x 13.44%).

A presença de farnesol e nerolidol em época de floração pode ser justificada, pois estudos recentes mostram que ambos os compostos também são produzidos por determinados insetos, do sexo feminino, que os utilizam como atrativos para os machos, o que leva à fecundação com perpetuação da espécie (STEINWAND, 2005). Em um vegetal, isto facilitaria o processo de polinização de flores.

Industrialmente, o homem vem empregando estes compostos associados a venenos, portanto, como inseticidas. Desta forma, os insetos machos seriam atraídos pelo inseticida por conter farnesol e nerolidol, aumentando assim seu contato, levando-os à morte (STEINWAND, 2005).

Universidade de São Paulo

O nerolidol é um sesquiterpeno que apresenta atividade antimalárica *in vitro*, de acordo com o estudo realizado por LOPES, *et al.* (1999). Este fato não permite afirmar que a atividade antimalárica explorada popularmente seja devido a este componente, pois sua presença nem sempre é verificada no óleo, e quando é detectado, sua concentração é muito reduzida.

O limoneno, substância presente na amostra 3, assim como os pinenos (α e β), estão entre os terpenos mais largamente distribuídos na natureza, ocorrendo em muitos óleos voláteis e, em alguns casos, como o componente principal, especialmente nos óleos cítricos como de *Citrus sinensis* Linaeus, Osbeck com cerca de 90%, *Citrus limon* Linnaeus, Burm. F., *Citrus reticulata* Blanco, var. "Mandarin" *Citrus aurantium* Linnaeus subsp. *amara* Linn., *Foeniculum vulgare* Mill., *Mentha piperita* L., *Mentha arvensis* L. subsp. *haplocolyx* Briquet. O limoneno é muito usado pela indústria de perfumaria e aromatizantes, assim como em inúmeras preparações técnicas (KAYANO, 1972).

A análise da tabela 9 permite ainda observar que o β-cariofileno é um componente presente em maior concentração em folhas, após a época da floração, com início de frutificação. Esta substância é bastante utilizada nas composições de perfumes, principalmente para fortalecer as notas tipo especiaria e alimentos (GUENTHER, 1949).

As diferenças qualitativas e quantitativas dos componentes do óleo essencial de *A. australe* deste trabalho, também ocorreram quando comparadas com o estudo de MORAIS *et al.* (1997). Os autores do trabalho pesquisaram as folhas frescas e identificaram como principais componentes os monoterpenos, α-pineno (4.80%), β-pineno (3.10%), mirceno (3.80%) e o limoneno (5.30%) e os sesquiterpenos, β-cariofileno (16.00%), β-elemeno (14.40%), γ-cadineno (13.00%) e germacreno A (5.50%).

Sabendo-se que a espécie vegetal em questão é do tipo anual, e a coleta do material pelos referidos autores foi em fevereiro, é de se considerar que o vegetal se encontrava em fase de frutificação, portanto, a comparação dos componentes do óleo estudado nesta pesquisa, será realizada com o vegetal na fase mais semelhante a do artigo, representada, neste caso, pela amostra 4, da tabela 9.

Nesta comparação, percebe-se que há diferenças relevantes, por razões já descritas anteriormente, como: 1- inexistência de monoterpenos no óleo essencial

do presente estudo, 2- a concentração do γ-cadineno (0.15%) é bastante inferior, 3- o óleo estudado não apresenta o germacreno A, mas acusa as presenças do germacreno D (44.14%), germacreno B (17.35%), α-humuleno (3.03%) e β-selineno (3.82%). Como semelhança entre os óleos, pode-se citar a presença de β-cariofileno (13.44% no óleo da amostra em estudo) e β-elemeno (7.63%).

6.3- Aspectos farmacológicos

Acanthospermum australe (Loefl) O. Kuntze é uma planta utilizada como fonte de princípios ativos. Esta planta é nativa da América Tropical, sendo muito comum no Brasil, onde é conhecida como carrapichinho. Suas folhas, caules e raízes são amplamente usadas na medicina popular, na forma farmacêutica de chá, por via oral ou tópica; em banhos, como forma de cura para diversos distúrbios como malária, blenorragia e febre. O decôcto proveniente da planta inteira é utilizado ainda em problemas de bexiga, no alívio das dores do estômago e do intestino, provocados por flatulência e ainda, visando uma atividade anti-histérica (PENNA, 1941).

No Paraguai, esta espécie é conhecida como "Tapecué" e é usada popularmente, por via oral, no tratamento de hemorragias, reumatismo e artrite, e por uso tópico, como antiinflamatório e anti-hemorrágico (SHIMIZU, 1987). A população indígena utiliza o decôcto das raízes no tratamento de várias desordens, por suas ações antidiarréica, anti-séptica e antiinflamatória.

No presente estudo, a avaliação da atividade antimalárica dos extratos hidroetanólico e clorofórmico de *Acanthospermum australe*, demonstraram uma significativa atividade antiprotozoária em baixas concentrações contra o clone AJ de *Plasmodium chabaudi*. Apesar de poucos estudos serem encontrados na literatura incluindo esta espécie, significativa atividade antifúngica (PORTILLO *et al.*, 2001) e antimalárica (CARVALHO *et al.*, 1991) vem sendo descrita. Os ensaios realizados

corroboram os dados da literatura e ainda demonstram uma importante atividade *in vitro* contra o modelo de roedor, *Plasmodium chabaudi* clone AJ. Através de análises genéticas, vem sendo demonstrado que o *Plasmodium chabaudi* pode ser considerado o modelo de malária de roedor para a malária humana, com características importantes, como resistência a drogas e imunidade (MARTINELLI *et al.*, 2005). A atual resistência do *Plasmodium falciparum,* principalmente aos medicamentos mais utilizados na clínica como a cloroquina ou associações como sulfadoxina-pirimetamina, vem provocando preocupação e atenção especial por parte dos pesquisadores (BABIKER *et al.,* 2005, BARNES *et al.*, 2005). Através de ensaios biomonitorados, o futuro isolamento e purificação das substâncias ativas do *Acanthospermum australe* poderiam proporcionar uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos para esta doença endêmica que afeta principalmente países em desenvolvimento.

Neste trabalho de discussão, citar-se-ão alguns estudos de revisão relacionados a espécies vegetais contendo substâncias com atividade antimalárica, para facilitar a argüição, no que tange ao posicionamento apresentado sobre a substância presente no extrato aquoso, a responsável pela atividade antimalárica:

- CARVALHO *et al.* (1991), em trabalho sobre a atividade antimalárica ou antipirética de extratos brutos de plantas brasileiras, estudadas *in vivo* em roedores infectados por *Plasmodium berghei*, relatam que o extrato liofilizado de *A. australe* (Asteraceae), obtido a partir da decocção de folhas, inibiu em 40%, a multiplicação das formas sanguíneas de *P. berghei*, na dose de 1000 mg/kg, 4 x dia, durante 4 dias consecutivos. O extrato liofilizado foi administrado oralmente, na forma de suspensão aquosa, com 0,2% de tween-80.

- Extratos aquosos liofilizados de outras plantas, obtidos da mesma forma, demonstraram também atividades: *Esenbeckia febrifuga* A. Juss. (Rutaceae), com 43% de inibição, *Lisianthus speciosus* Cham. et Schl. (Gentianaceae), com 38% e *Tachia guianensis* Aubl. (Gentianaceae), com 39% (CARVALHO *et al.*,1991).

- Em culturas *in vitro*, contra *Plasmodium falciparum* (BHz 26/86), resistente à cloroquina (CARVALHO *et* al, 1988), o extrato aquoso liofilizado de *A. australe*, diluído em meio de cultura (RPMI 1640 + 10% de soro humano) adicionado a tween-80, incubadas em várias concentrações com suspensões do parasita, na concentração de 100 µL com aproximadamente 1% de parasitemia, inibiu 63% da multiplicação do parasita, na dosagem de 10 µg/mL, 43%, na dosagem de 5 µg/mL e 11%, na dosagem de 1µg/mL.

- Usando a mesma metodologia, o extrato hexânico de *Vernonia brasiliana* (L.) Druce, outro membro da família Asteraceae, demonstrou maior atividade, inclusive em dosagens reduzidas: inibição em 71% da multiplicação do parasita na dosagem de 10 µg/mL, 64%, na dosagem de 5 µg/mL, 48% na dosagem de 1 µg/mL, 63% na dosagem de 0,2 µg/mL e 48% na dosagem de 0,04% µg/mL (CARVALHO *et* al, 1988).

- Extrato hidroetanólico 90%, assim como as frações clorofórmica e butanólica de *Bidens pilosa* (Asteraceae), proveniente de folhas, raízes ou planta inteira, nas concentrações de 50 µg/mL causaram inibição acima de 90%, do crescimento *in vitro*, de *P. falciparum*. As frações orgânicas apresentaram redução parcial, *in vivo*, da parasitemia de *P. berghei* em roedores (BRANDÃO *et* al., 1997).

Através destas informações, a análise dos dados apresentados por CARVALHO *et al.* (1988 e 1991) e BRANDÃO *et al.* (1997), mostra que se pode

estar diante de duas substâncias ou grupos de substâncias com atividade antimalárica, cuja natureza química (polaridade) é diferente.

A primeira substância ou grupo de substância, estaria presente no extrato aquoso, como descrito por CARVALHO *et al.*, (1988 e 1991) e o segundo, estaria presente em extratos orgânicos, podendo ser etanólico, clorofórmico, butanólico ou ainda, hexânico (CARVALHO *et al.*, 1988 e BRANDÃO *et al.*, 1997).

As substâncias de natureza polar com atividade antimalárica descritas em literatura poderiam ser apenas da classe dos flavonóides. Sugere-se, neste trabalho, no entanto, que o ácido caféico ou seu artefato, também poderia apresentar esta atividade, mas que nenhum estudo é descrito em literatura.

As substâncias de natureza apolar, presentes nos extratos orgânicos, poderiam ser as lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais e alguns alcalóides, na forma livre.

A associação da atividade antimalárica com a presença de compostos acetilênicos (ex.: fenil acetilênicos) ou ainda, flavonóides (ex: flavonóides poliidroxilados), é discutida por BRANDÃO *et* al., (1997) que obtiveram extratos hidroetanólicos 90%, provenientes da planta inteira de nove outras espécies do gênero *Bidens* (*B. frondosa* L.; *B. tripartitus* L.; *B. ferulaefolia* DC.; *B. bipinnatus* L.; *B. maximovicziana*, Willd.; *B. campylotheca*, Schultz Bip. Spp. campylotheca, *B. bitternata* DC.; *B. parviflora* Willd. e *B. bitternata* DC.).

Dentre os extratos, sete possuíam atividade inibitória de crescimento (65 a 91%), *in vitro*, do *P. falciparum*, sendo que todos apresentavam em sua composição química, acetilenos alifáticos. Os extratos de duas espécies que não apresentavam esses compostos (*B. parviflora* e *B. bitternata*), não foram ativos ao protozoário.

A fração clorofórmica de raízes de *B. pilosa* que causou 86% da inibição do crescimento do parasita, *in vitro*, apresentou como componente majoritário o 1-fenil-1,3-diin-5-en-7-ol-acetato.

Assim, acredita-se que no extrato clorofórmico e no EHL de *A. australe*, possa existir uma outra substância além do ácido caféico, com natureza química mais lipofílica, que sozinha ou em sinergismo com este ácido, apresenta ação antimalárica.

No ensaio de atividade antimicrobiana, o EHL de *A. australe* mostrou maior atividade para *Aspergillus niger*, na dosagem de 10 mg/mL, porém não apresentou nenhuma contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Estudos realizados com esta espécie por PORTILLO *et al.* (2001), utilizando-se extratos aquoso, diclorometano e metanólico proveniente de partes aéreas, revelam que nenhum desses extratos conseguiu inibir o crescimento dos microrganismos *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, no ensaio *in vitro* pelo método da difusão em ágar com disco.

Neste mesmo estudo, os autores avaliam também outra espécie vegetal, pertencente ao mesmo gênero, *Acanthospermum hispidum* DC., e outras da mesma família, *Baccharis articulata* Pers., *Senecio grisebachii* Baker e *Vernonia tweedieana* Baker que não apresentaram nenhuma atividade contra esses microrganismos.

Em estudos mais recentes propostos por FLEISCHER, *et al.*, (2003), a avaliação antimicrobiana de diferentes extratos provenientes de folhas e flores de *Acanthospermum hispidum* mostrou variados graus de atividade contra *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Salmonella typhi* e *Clostridium histolyticum*. Nas mesmas condições, os referidos extratos não apresentaram nenhuma ação em *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e *Candida albicans*, estando este último, de acordo com a informação de PORTILLO *et al.*, (2001).

Na comparação de todos estes dados, nota-se que as atividades contra a levedura *Candida albicans* e bactérias do tipo Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) não são alcançadas com *A. australe*, nem com a espécie do seu gênero, *A. hispidum*, e nem com as espécies das Asteraceae, citadas por PORTILLO, em seu trabalho. Portanto, os resultados negativos para esses microrganismos, neste trabalho, são justificados.

A razão do EHL apresentado neste estudo, inibir o crescimento de *A. niger*, não observado nos estudos de PORTILLO *et al.*, (2001) pode ser atribuído a vários fatores: 1- como o solvente utilizado foi uma mistura de etanol e água, esta foi capaz de retirar parte do óleo essencial e/ou compostos de natureza química semelhante, e 2- a composição dos extratos podem ser influenciados por fatores como: época do ano de coleta, horário do dia de coleta, região geográfica o que acaba influenciando nos fatores climáticos, climático-edáficos e edáficos (OLIVEIRA e AKISUE, 1991). A

escolha do solvente e a metodologia extrativa empregada também constituem fatores relevantes nesta composição.

A atividade antifúngica de um determinado óleo essencial pode variar conforme o período de desenvolvimento do teste. Geralmente, este período é longo e leva à decomposição dos componentes do óleo analisado (JANSSEN *et al.,* 1987).

Os óleos essenciais, de acordo com (SIMÕES *et al.* 1999; SIMÕES *et al.* 2001; SIMÕES *et al.* 2004), apresentam ação anti-séptica; o óxido de cariofileno, é um componente do óleo essencial, que de acordo com CAKIR *et al.,* (2004) apresenta atividade antifúngica. Verifica-se a presença deste componente na pesquisa aqui relatada.

Os taninos e os flavonóides, que certamente estão presentes no EHL, também apresentam ação antifúngica (SIMÕES *et al.* 1999; SIMÕES *et al.* 2001; SIMÕES *et al.* 2004).

Nenhum estudo com a espécie *A. australe,* relacionado à atividade contra bactérias foi encontrada em literatura, fato este que impossibilita a comparação destes resultados. No entanto, o fato do EHL não ter dado nenhuma atividade, "contradiz" o que é descrito em literatura, pois a medicina popular brasileira utiliza seus extratos contra infecções renais, irisipela e na blenorragia (CORRÊA,1984; LORENZI, 2000 e MORS, 2000). Necessita-se, portanto, uma nova avaliação utilizando maior variedade de bactérias, diferentes metodologias e diferentes extratos.

Como já foi descrito anteriormente, a presença de lactonas sesquiterpênicas em *A. australe* e na família Asteraceae é bastante freqüente. Propriedades, antiinflamatória, citotóxica, antitumoral, bactericida, fungincida e antiúlcera, são atribuídas a essa classe de substâncias (RODRIGUEZ, 1977; PICMAN, 1986; ROBLES *et al.*, 1995; HEINRICH *et al.*, 1998), no entanto, nenhum estudo de atividade antiúlcera com seus extratos foi encontrado em literatura.

No presente trabalho, as ulcerações em estômagos de ratos foram induzidas através do uso de uma mistura de etanol a 60% e ácido clorídrico a 0,3%. Solventes ou associação de solventes como etanol ou etanol acidificado levam à formação de úlceras gástricas devido à redução do fluxo sangüíneo na mucosa gástrica seguida de estase sangüínea contribuindo para o desenvolvimento de hemorragias e necrose de tecidos (GUTH *et al.*, 1984). Verifica-se também, redução dos níveis de

compostos sulfidrílicos, agentes capazes de se ligarem a radicais livres ativos, gerando injúria tecidual (CRAWFORD, 1994; SARTORI, 1997; RANG & DALE, 2001). Vale ressaltar que os efeitos citados anteriormente são observados em maior intensidade, quando se utiliza uma associação de etanol com ácido clorídrico como agente indutor de úlceras, em comparação com o etanol isolado.

Neste teste, no parâmetro da Área Relativa de Lesão (ARL), o resultado mostrou ser significativo na comparação do extrato bruto do vegetal com o controle. O EHL de *A. australe*, na dose de 400 mg/kg, administrada via oral, reduziu em 49,13%, a Área Total de Lesão (figura 38) e em 29,61%, a Área Relativa de Lesão (figura 39).

A análise dos componentes de *Acanthospermum australe* permite sugerir que a substância responsável pela ação antiúlcera presente no EHL possa pertencer a vários grupos de princípios ativos: 1- ao grupo dos taninos, uma vez que estes reagem com as proteínas das células lesadas da mucosa estomacal, formando uma camada de proteção, impermeável à ação do suco ácido gástrico (SIMÕES *et al.* 1999; SIMÕES *et al.* 2001; SIMÕES *et al.* 2004); 2- às lactonas sesquiterpênicas, conforme descrita em literatura, que podem ser extraídas por misturas hidroalcoólicas ou 3- aos flavonóides, que apesar de não se ter isolado neste estudo, nenhuma substância pertencente a este grupo, autores como BOHLMANN *et al.*, 1984; SHIMIZU *et al.*, 1987 e ZDERO, *et al.*, 1987, relatam em seus trabalhos o isolamento de algumas. No entanto, nenhum dos referidos autores avaliaram estas substâncias sobre o parâmetro antiúlcera.

LEWIS & HANSON (1991) em um trabalho de revisão, mostram que os flavonóides estão entre os metabólitos secundários oriundos de vegetais com atividade antiulcerogênica em diferentes modelos experimentais como indometacina, etanol, ligadura de piloro, estresse, antioxidante entre outros.

Em relação às ações farmacológicas, a ação antidiarréica do extrato desta espécie vegetal citada por PENNA, (1941); CORRÊA, (1984); LORENZI, (2000) e MORS, (2000), deve-se provavelmente à presença dos taninos, pois o grupo em questão apresenta esta ação (SIMÕES *et al.* 1999; SIMÕES *et al.* 2001; SIMÕES *et al.* 2004) e o mesmo foi detectado na triagem fitoquímica. Segundo alguns autores, nenhum vegetal está isento na produção de taninos, porém existem aqueles que são

"tradicionais" na sua produção, como o *Stryphnodendron barbatimam* Martius e *Quercus robur* L. por apresentarem quantidades grandes do mesmo.

Tendo em vista que os compostos polifenólicos e os óleos essenciais apresentam ação anti-séptica (SIMÕES *et al.*, 2001) e, sabendo-se que a triagem fitoquímica da droga vegetal da espécie mostrou a presença de dois grupos pertencentes à classe dos polifenólicos (flavonóides e taninos), assim como componentes voláteis, as indicações em casos de blenorragia, infecções renais e irisipela (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2000 e MORS, 2000), podem ser assim justificadas. Em relação à ação expectorante citada por PENNA (1941), esta atividade pode ser atribuída à presença de saponinas, ainda que, em pequenas quantidades as quais promovem fluidificação das secreções brônquicas (SIMÕES *et al.*, 2001) o que vai de acordo com HEGNAUER (1964) e HERS (1973), que citam em suas obras que a família apresenta saponinas pentacíclicas, ou seja, do tipo triterpênicas.

Conclusões

- As folhas concolores de *A. australe* podem se apresentar inteiras ou fragmentadas, de consistência membranácea e superfície lisa. O contorno é romboidal a oval, a base é geralmente simétrica, o ápice é obtuso, a margem é denteada a sinuosa e a nervação é peninérvea; o pecíolo, piloso na base é de inserção lateral, sendo reto e achatado; a secção transversal é côncavo-convexa.

- Quando transformadas em drogas, as folhas apresentam-se enroladas e são friáveis; a coloração é marrom-castanha. Apresentam fraco odor aromático, com leve sabor mucilaginoso e amargo.

- As folhas de *A. australe* apresentam estômatos, predominantemente do tipo anomocíticos em ambas as faces (anfiestomáticas), cutícula lisa e certo grau de espessamento celulósico nas paredes celulares de ambas as faces.

- Anexos epidérmicos, como os tricomas tectores de forma cônica, podem ser observados no mesofilo, na região de nervura mediana, no pecíolo e no caule, podendo ser do tipo bicelulares unisseriados a pluricelulares unisseriados.

- Canais secretores associados aos feixes vasculares estão presentes nos órgãos em estudo, sendo o óleo armazenado nessas estruturas; por tal motivo, o óleo continua presente no material, mesmo quando é transformado em droga.

- Caules e folhas de *A. australe* apresentam óleo essencial em baixa concentração, cuja composição química varia, dependendo da época de coleta e do estágio de desenvolvimento do vegetal.

- O óleo essencial, nas condições do experimento, é constituído em sua maioria por sesquiterpenos dos grupos cadinano (α-cadinol e δ-cadineno), cariofilano (β-cariofileno) e, principalmente, germacrano (globulol).

- O componente β-cariofileno e um isômero do globulol estão presentes no óleo essencial de *A. australe*, em todas as amostras coletadas, sendo o isômero do espatulenol um componente exclusivo e majoritário do óleo de caule e o isômero do globulol um componente presente em maior quantidade no óleo quando o vegetal encontra-se em fase de floração.

- O óleo essencial de *A. australe* ou qualquer um de seus componentes não deve ser o responsável pela ação antimalárica obtida na medicina popular,

pelos fatos de: o óleo estar em uma concentração bastante reduzida no vegetal; sua composição química ser muito variável e também pelo fato do processo e solvente extrativos utilizados pela população não serem os ideais para a extração deste grupo de princípio ativo.

- A exploração da espécie *A. australe*, para obtenção de óleo essencial em larga escala, portanto, não é economicamente viável, devido às razões já mencionadas anteriormente.

- Neste experimento, a concentração de taninos foi baixa, tanto no pó da droga (0.05%) como no EHL (0,72%), porém a ação antidiarréica, explorada popularmente, pode ser atribuída a este grupo.

- A ação antiúlcera aguda promovida pelo EHL de *A. australe* pode ser atribuída às lactonas sesquiterpênicas ou aos taninos, ambos presentes no extrato, que sós ou em sinergismo promovem esta ação.

- A ação expectorante de *A. australe*, explorada popularmente, pode ser atribuída às saponinas triterpênicas descritas em literatura e sejam devidas àquelas que foram detectadas neste ensaio, no teste de espuma.

- A ação anti-séptica dos extratos aquosos, explorada popularmente, pode ser atribuída principalmente aos flavonóides e aos taninos.

- O teor de água encontrado na droga, de acordo com o procedimento descrito, foi de 11,00%, e no EHL, 10,94%. Esta informação indica que o material estudado está de acordo com a exigência da Farmacopéia Brasileira (1988), que estabelece limites de umidade na droga (8 - 14%).

- O trabalho permite concluir que existem duas substâncias ou grupo de substâncias que promovem ação antimalárica, sendo que essas substâncias podem ou não coexistir: 1- de natureza polar presente nos "chás", que pode ser o ácido caféico ou um flavonóide polihidroxilado, solúveis em água e/ou misturas hidroalcoólicas e 2- de natureza apolar, que pode ser uma lactona sesquiterpênica ou mesmo um diterpeno, solúvel em clorofórmio e/ou misturas hidroalcoólicas.

- A exploração, em escala industrial, dos extratos liofilizados de etanol 70%, aquoso e acetona:água de *A. australe*, para fins antimaláricos, pode ser economicamente viável, pois a espécie em questão é uma erva daninha que

não requer muitos cuidados e ainda, todas as suas partes podem ser usadas na preparação dos extratos.

- O EHL de *A. australe*, nas condições deste trabalho, na concentração de 10 mg/mL apresentou significativa atividade antifúngica contra o *Aspergillus niger*. Esta atividade pode ser atribuída ao óleo essencial e/ou aos compostos fenólicos, como os taninos e flavonóides, também presentes neste extrato.

Referências Bibliográficas

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. San Diego: Academic Press, 1989. 469p.

AKISUE, G. Um novo aparelho extrator de óleo essencial. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 5, São Paulo, Anais, p.31, 1971.

ARAÚJO, N.; KOHN, A.; KATZ, N. Activity of the artemether in experimental *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, suppl.2, p.185-188, 1991.

BABIKER, H.A.; SATTI, G.; FERGUSON, H.; BAYOUMI, R.; WALLIKER, D. Drug resistant *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal transmission. **Acta Tropica**, v.94, n.3, p.260-268, 2005.

BACCHI, E.M. **Estudo farmacológico da ação anti-úlcera dos extratos de *Styrax camporum* Pohl e *Caesalpinia ferrea* Martius**. São Paulo, 1988. 254p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de São Paulo.

BARDÓN, A.; CARDONA, L.; CARTAGENA, E.; CATALÁN, C.A.N.; PEDRO, J.R. Melampolides from *Enydra anagallis*. **Phytochemistry**, v.57, p.125-130, 2001.

BARNES, K.I.; WHITE, N.J. Population biology and antimalarial resistance: the transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. **Acta Tropica**, v.94, n.3, p.230-240, 2005.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. v.3, 326p.

BARUA, R.N.; SHARMA, R.P.; THYAGARAJAN, G.; HERS, W.; GOVINDAN, S.V. New melampolides and darutigenol from *Sigesbeckia orientalis*. **Phytochesmitry**, v.19, p.323-325, 1980.

BECKMANN, H. In Antimalarial drugs: their nature, action and use. p.529-533, 1958.

BENTHAM, G. *Compositae*. In: BENTHAM, G.; HOOKER, J.D., eds. **Genera plantarum**. London: Lovell Reeve, 1873. v.2, n.1, p.163-533.

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326p.

BHAREL, S.; GULATI, A.; ABDIN, M.Z.; SRIVASTAVA, P.S.; JAIN, S.K. Structure, biosynthesis and functions of artemisinin. **Fitoterapia**, v.67, p.387-399, 1996.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Ein neues Sesquiterpenlacton aus *Dugesia mexicana* Gray. **Chemische Berichte**, v.109, p.2651-2652, 1976.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; DHAR, A.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Two sesquiterpene and three diterpene lactones from *Acanthospermum australe*. **Phytochemistry**, v.20, p.1081-1083, 1981.

BOHLMANN, F.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; JAKUPOVIC, J. Neue melampolide aus *Acanthospermum australe*. **Planta Medica**, v.50, n.1, p.37-39, 1984a.

BOUCHBERG, M. Comparison of antibacterial and antifungal activies of lapachol and β-lapachone. **Planta Medica**, v.60, p.373-374, 1994.

BRANDÃO, M.G.L.; BOTELHO, M.G.A.; KRETTLI, A.U. Quimioterapia experimental antimalárica com produtos naturais. I. Uma abordagem mais racional? **Ciência e Cultura**, v.37, p.1152-1163, 1985.

BRANDÃO, M.G.L.; BOTELHO, M.G.A.; KRETTLI, A.U. Antimaláricos de uso popular na Amazônia. **Ciência Hoje**, v.13, n.78, p.9-11, 1991.

BRANDÃO, M.G.L.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C, MARINUZZI, H.C. Antimalarial activity of extracts and fractions from Bidens pilosa and Bidens species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, n.2, p.131-138, 1997.

BREMER, K. **Asteraceae**: cladistics & classification. Portland: Timber Press, 1994. 752p.

BUCHBAUER, G. The detailed analysis of essencial oils leads to the understanding of their properties. **Perfumer & Flavorist**, v.25, p.64-67, 2000.

CAKIR, A.; KORDALI, S.; ZENGIN, H.; IZUMI, S.; HIRATA, T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, n.1, p.62-68, 2004.

CAMPBELL, W.E.; GAMMON, D.W.; SMITH, P.; ABRAHAMNS, M.; PURVES, T.D. Composition and antimalarial activity *in vitro* of the essencial oil of *Tetradenia riparia*. **Planta Medica**, v.63, p.270-272, 1997.

CARVALHO, L.H.; BRANDÃO, M.G.L.; SANTOS FILHO, D.; LOPES, J.L.C.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-Infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.24, n.11, p.1113-1123, 1991.

CASTRO, M.M.C.; LEITÃO FILHO, H.F.; MONTEIRO, W.R. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.20, n.2, p.163-174, 1997.

CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; DOMINGUEZ, X.A. Melampolides from *Melampodium* and *Smallanthus* species. **Phytochemistry**, v.28, p.2727-2729, 1989.

CLEVENGER, J.F. Apparatus for the determination of volatile oil. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.17, p.345, 1928.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. 3v.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1964. v.1, p.633-635.

CRAWFORD, J.M. Trato gastrointestinal. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L., eds. **Robbins patologia estrutural e funcional.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. cap. 17, p.672-742.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1996.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.287-340.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DOMINGUEZ S., X.A. **Métodos de investigation fitoquimica**. Mexico: Limusa, 1973. 281p.

EKTHAWATCHAI, S.; ISAKA, M.; KITTAKOOP, P.; KONGSAEREE, P.; SIRICHAIWAT, C.; TANTICHAROEN, M.; TARNCHOMPOO, B.; THEBTARANONTH, Y.; YUTHAYONG, Y. Synthetic and naturally occurring antimalarials. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v.36, n.6, p.1595-1605, 1999.

ELISABETTSKY, E.; GELY, A. Plantes médicinales utiliséesen Amazonie comme fond potentiel de noveaux agents thérapeutiques dans les cas d' allergie, thrombose et inflammation. **Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appplique**, v.36, p.143-151, 1987.

ELISABETTSKY, E.; SETZER, R. Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia. In: PARKER, E.P., ed. **The Amazon Caboclo**: historical and contemporary

perspectives. Williamsburg: Department of Anthropology, 1985. p.243-278. (Studies on Third World Societies Publication Series, v.32).

ESAÚ, K. **Anatomy of seed plants**. 2.ed. New York: Wiley, 1977. 550p.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2001. 1705p.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt.1.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959. 1265p.

FERREIRA, E.I. Antimaláricos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.1163-1172.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. 2.ed. Princeton, New York: Van Nostrand, 1949. 228p.

GANTIER, J.C.; FOURNET, A.; MUNOS, M.H.; HOCQUEMILLER, R. The effect of some 2-substitued quinolines isolated from *Galipealongfolia* on *Plasmodium vinckei petteri* infected mice. **Planta Medica**, v.62, p.285-286, 1996.

GARCIA-BARRIGA, H. **Flora medicinal de Colômbia**: botánica médica. Bogotá: Instituto de Ciências Naturales, Universidad Nacional, 1975. v.2.

GLOBAL malaria control: WHO malaria unit. **Bulletin of the World Health Organization**, v.71, n.3/4, p.281-284, 1993.

GRAYER, R.J. Flavonoids. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B., eds. **Methods in plant biochemistry**. London, San Diego: Academic Press, 1989. v.1, cap.8.

GROTTA, A.S. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Spilanthes acmella* L. Asteraceae. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.4, p.130-164, 1945.

GUENTHER, E. **The essential oils**. New York: Van Norstrand, 1949. v.2, p.105.

GUTH, P.H.; PAULSEN, G.; NAGATA, H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol – induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. **Gastroenterology.** Orlando, v. 87, n.5, p.1083-1090, 1984.

HAGERMAN, A.E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v.14, n.2, p.453-461, 1988.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3.ed. London: Academic, 1988. 325p.

HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. **Plant chemosystematics**. London, Orlando: Academic Press, 1984. 562p.

HEGNAUER, R. Chemical caracters in plant taxonomy. Some possibilities and limitations. **Pure and Applied Chemistry**, v.14, p.173-187, 1967.

HEGNAUER, R. **The chemistry of the *compositae***. Leiden, Netherlands, 1964. p.283-335.

HEINRICH, M.; ROBLES, M.; WEST, J.E.; MONTELLANO, BRO.; RODRIGUEZ, E. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.38, p.539-565, 1998.

HERS, W. Sesquiterpene lactones in the Compositae. In: BENDZ, G.; SANTESSON, J., eds. **Chemistry in botanical classification**: proceedings of the twenty-fifth Nobel Symposium, 1973, Stockholm, Sweden. Stockholm: Nobel Foundation: New York, London: Academic Press, 1973. p.337-357. (Nobel Symposium, 153)

HERZ, W.; KALYANARAMAN, P.S. Acanthospermal-A and Acanthospermal-B, 2 new melampolides from Acanthospermum species. **Journal of Organic Chemistry**, v.40, n.24, p.3486-3491, 1975.

HEYWOOD, V.H.; HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L., eds. **The biology and chemistry of the Compositae**. London, New York: Academic Press, 1977. 2v.

HOEHNE, W. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Calea pinnatifida* Banks Asteraceae. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.10, p.9-33, 1952.

INDEX Kewensis: plantarum phanerogamarum. S.l.: E. Prelo Calrendoniano, 1895. p.19.

INOUE, A.; TAMOGAMI, S.; KATO, H.; NAKAZATO, Y.; AKIYAMA, M.; KODAMA, O.; AKATSUKA, T.; HASHIDOTO, Y. Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. **Phytochemistry**, v.39, n.4, p.845-848, 1995.

IVIE, G.W.; WITZEL, D.A. Sesquiterpene lactones: structure, biological action, and toxicological significance. In: KEELER, R.F.; TU, A.T.; HARDEGREE, M.C.; MOSS, J. eds. **Handbook of natural toxins**: plant and fungal toxins. New York: Dekker, 1983. v.1.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, London: McGraw-Hill, 1940. 523p. (McGraw-Hill publications in the botanical sciences).

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Nacional, 1966. 634p. (Biblioteca Universitária. Série 3 – Ciências Puras, v.4).

JONDICO, I.J.O. A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. **Phytochemistry**, v.25, p.2289-2290, 1986.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464p.

KAYANO, I. **Contribuição ao estudo farmacognóstico da folha de *Montanoa grandiflora* D.C**. São Paulo, 1972. 70p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

KIRBY, G.C.; KHUMALO-NGWENYA, N.B.; GRAWEHR, B.A.; FISON, T.W.; WARHURST, D.C.; PHILLIPSON, J.D. Antimalarial activity from "Mhekara" (*Uapaca nitida* Mull-Arg.), a Tanzanian tree. **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, p.47-51, 1993.

KLAYMAN, D.L. Quinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v.228, p.1049-1055, 1985.

KRAUS, W.; KÖLL-WEBER, M.; MAILE, R.; WUNDER, T.; VOGLER, B. Biologically active constituents of tropical and subtropical plants. **Pure and Applied Chemistry**, v.66, p.2347-2352, 1994.

KUMAR, S. Malaria runs amok in India. **New Scientist**, v.9. 1994.

LESSING, C.F. **Synopsis Generum Compositarum**. Berlin: Duncker & Humblot, 1832. 473p.

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Prog. Med. Chem.,** Amsterdam, v.28, p201-231, 1991.

LIKHITWITAYAWUID, K.; CHANMAHASATHIEN, W.; RUANGRUNGSI, N.; KRUNGKRAI, J. Xanthones with antimalarial activity from *Garcinia dulcis*. **Planta Medica**, v.64, p.281-282, 1998.

LIU, K.C.C.; YANG, S.L.; ROBERTS, M.F.; ELFORD, B.C.; PHILLIPSON, J.D. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cells cultures. **Plant Cell Reports**, v.11, p.637-640, 1992.

LOPES, N.P.; KATO, M.J.; ANDRADE, E.H.D.; MAIA, J.G.S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A.R.; KATZIN, A.M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. By Waiãpi Amazon Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, n.3, p.313-319, 1999.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000. 608p.

MACÍAS, F.A.; FISCHER, N.H. Melampolides from *Lecocarpus pinnatifidus*. **Phytochemistry**, v.31, p.2747-2754, 1992.

MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.; FISCHER, N.H. Melampolides and cis, cis-Germacranolides from *Lecocarpus lecocarpoides*. **Phytochemistry**, v.32, p.127-131, 1993.

MARTINELLI, A.; HUNT, P.; FAWCETT, R.; CRAVO, P.V.; WALLIKER, D.; CARTER, R. An AFLP-based genetic linkage map of *Plasmodium chabaudi*. **Malaria Journal**, v.4, n.1, p.11, 2005.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1979. 276p.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950. 2v.

MILHAN, G.; VALENTIN, A.; BENOIT, F.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M.; PELISSIER, Y.; BESSIERE, J.M. *In vitro* antimalarial activity of eight essencial oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.9, p.329-333, 1997.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, n.5, p.939-945, 1983.

MORAIS, S.M.; MACHADO, M.I. Essential oil of *Acanthospermum* Australe DC. **Journal of Essential Oil Research**, v.9, p.601-602, 1997.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A., eds. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications, 2000. 501p. (Medicinal plants of world, 6).

MUKHERJEE, T. Antimalarial herbal drugs: a review. **Fitoterapia**, v.62, n.3, p.197-204, 1991.

NGO, T.H.; VERTOMMEN, J.; KINGET, R. Formulation of artemisinin tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v.146, p.271-274, 1997.

NISBET, L.J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, n.8, p.708-712, 1997.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991. 412p. (Série farmácia. Veterinária).

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 178p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989. 216p.

PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. Composition and antimicrobial properties of essencial oils of four Mediterranean Lamiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.167-170, 1993.

PECOUL, B.; CHIRAC, P.; TROULLER, P.; PINEL, J. Acces to essencial drugs in poor countries: a lost battle?. **JAMA, the Journal of the American Medical Association**, v.281, n.4, p.361-367, 1999.

PENNA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**: descrição das plantas medicinais e das exóticas aclimadas no Brasil. Rio de Janeiro: A Noite, 1941.

PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.14, n.3, p.255-281, 1986.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v.2, p.93.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.1, p.93-98, 2001.

QUIJANO, L.; BLOOMENSTIEL, D.; FISCHER, N.H. Tetraludin A, B and C, three new melampolides from *Tetragonotheca ludoviciana.* **Phytochemistry**, v.18, p.1529-1532, 1979.

QUIJANO, L.; NÚNEZ, I.S.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. A guaianolide and four melampolides from *Melampodium leucanthum.* **Phytochemistry**, v.45, p.769-775, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.

RANG, H.P. e DALE, M.M.P. O Trato gastrointestinal. In: **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.305-317.

RATSIMAMANGA-URVERG, S.; RASOANAIVO, P.; RAMIARAMANANA, L.; MILIJAONA, R.; RAFATRO, H.; VERDIER, F.; RAKOTO-RATSIMAMANGA, A.; LE BRAS, J. *In vitro* antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thouarsi* and *Spirospermum penduliflorum*. **Planta Medica**, v.58, n.6, p.540-543, 1992.

REMME, J.H.; DE RAADT, P.; GODAL, T. The burden of tropical diseases. **Medical Journal of Australia**, v.5, n.7, p.465-469, 1993.

RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, v.24, n.1, p.1-20, 1994.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia.** São Paulo: Editorial Premier. 1997. 372p.

ROBLES, M.; AREGULLIN, M.; WEST, J.; RODRIGUEZ, E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. **Planta Medica**, v.61, p.199-203, 1995.

RODRIGUEZ, E. Sesquiterpene lactones: chemotaxonomy, biological activity and isolation. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v.8, p.56-62, 1977.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v.61, p.33-36, 1962.

SALEH, A.A.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Isolation of 3,6-dimethoxy-4`,5,7-trihydroxyflavone from acanthospermum-glabratum. **Lloydia, the Journal of Natural Products**, v.39, n.6, p.456-548, 1976.

SALEH, A.A.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Potential anti-cancer agents. 13. Cyto-toxic constituents of *Acanthospermum glabratum (Asteraceae)*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.1, n.5, p.1090-1097, 1980.

SARTORI, N.T. **Triagem de plantas medicinais popularmente utilizadas como anti-úlcera em Mato Grosso e avaliação do efeito anti-úlcera de fração diclorometânica (DMC2) de *Calophyllum brasiliensi* Camb. (Guanadi).** Cuiabá, 1997. 115p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Saúde Coletiva – Universidade Federal de Mato Grosso.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2.ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228p.

SAXENA, S.; PANT, N.; JAIN, D.C.; BHAKUNI, R.S. Antimalarial agents from plant sources. **Current Science**, v.85, n.9, p.1314-1329, 2003. [Review].

SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **Botanical Review**, v.48, n.2, p.121-595, 1982. [Review].

SHIMIZU, M.; HORIE, S.; ARISAWA, M.; HAYASHI, T.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; KAWASAKI, M.; TERASHIMA, S.; TSUJI, H.; WADA, S.; UENO, H.; MORITA, N.; BERGANZA, L.H.; FERRO, E.; BASUALDO, I. Chemical and pharmaceutical

studies on medicinal plants in Paraguay. I. Isolation and identification of lens aldose reductase inhibitor from "Tapecué", *Acanthospermum australe* O. K. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.35, p.1234-1237, 1987.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFSC; Florianópolis: UFRGS, 1999. 821p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre: UFSC; Florianópolis: UFRGS, 2001. 833p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFSC; Florianópolis: UFRGS, 2004. 1102p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: W. H. Freeman, 1969. 776p. (A Series of books in biology).

SOLEREDER, H. **Systematische anatomie**: der dicotyledonen. Stuttgart: Ferdinand Enke, 1899. p.515.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy**: der dicotyledons. Oxford: Clarendon Press, 1908. 2v.

SPENCER, C.M.; CAI, Y.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S.H.; GOULDING, P.N.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation some thoughts and observations. **Phytochemistry**, v.27, n.8, p.2397-409, 1988.

STEINWAND, B. **3,7,11-Trymethyl-2,6,10-dodecatriene-1-ol (Farnesol) (128910) 3,7,11-trymethyl-1,6,10-dodecatriene-3-ol (Nerolidol) (128911) Fact Sheet.** Disponível em: http://www.epa.gov/pesticida/biopesticidas/ingredients/facts, 2005.

TOMASI, N.; STEIN, M.L, PIZZA, C. *Structure and* Antiviral activity of *Triterpenoid Saponins* from *Calendula arvensis*. **Planta Medica**, v.57, p.250-253, 1991.

TROUILLER, P.; TORREELE, E.; OLLIARO, P.; WHITE, N.; FOSTER, S.; WIRTH, D.; PÉCOUL, B. Drugs for neglected diseases: a failure of the market and public health failure? **Tropical Medicine & International Health**, v.6, n.2, p.945-951, 2001.

UNGER – *Pharm. Ztg.,* 81, 1400, (1961). *apud* DUQUENOIS, P. Contribution to the standardization of plant drugs. IV. Comparison of methods for determination of

INTERNACIONAL SEMINAR ON RECENT TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES, Oatacamund, 1995. **Abstract**. 1995. n.2A, p.18-20.

VILLAESCUSA-CASTILLO, L.; DÍAZ-LANZA, A.M.; GASQUET, M.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; BARNABÉ, M.; FAURE, R.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. Antiprotozoal Activity of Sesquiterpenes from Jasonia glutinosa. **Pharmaceutical Biology**, v.38, p.176-180, 2000.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.239-254, 1996.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquimica da Universidade de São Paulo**, v.1, n.1, p.77-81, 1963.

WASICKY, R.; AKISUE, G. *Um aparelho aperfeiçoado para extração de óleos essenciais*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.7, p.339-405, 1969.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C., eds. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990. 288p. (Phytochemical Society of Europe. Proceedings, 30).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria control in complex emergences**: an inter-agency field handbook. Geneva: WHO Library Cataloguing-in- publication Data, 2005. p.4.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. Geneva: WHO Library Cataloguing-in- publication Data, 2005. p.xvii.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria**. Geneva: WHO Library Cataloguing-in- publication Data, 2006. p.1-2.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Sigesbechia orientalis* and *Guizotia scabra*. **Phytochemistry**, v.30, p.1579-1584, 1991.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; SCOTT, R. **Phytochemistry**, v.26, p.1999. 1987.