UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Contribuição à farmacognosia de *Artemisia annua* L. e *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Acompanhamento da variação de metabólitos secundários em diferentes fases fenológicas, órgãos e extratos vegetais, aspectos botânicos e avaliação da atividade antileishmania *in vitro*

FABIANA LIMA SILVA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Profa. Dra. Dominique C H Fischer

19.499
São Paulo

2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015118

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Silva, Fabiana Lima

S586co Contribuição à farmacognosia de *Artemisia annua* L. e
Bidens pilosa L. (Asteraceae) – Acompanhamento da variação de
metabólitos secundários em diferentes fases fenológicas, órgãos
e extratos vegetais, aspectos botânicos e avaliação da atividade
antileishmania *in vitro* / Fabiana Lima Silva. -- São Paulo, 2008.
236p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Fischer, Dominique Corinne Hermine

I. Farmacognosia 2. Asteraceae : Farmacognosia I. T.
II. Fischer, Dominique Corinne Hermine, orientador.

615.321 CDD

FABIANA LIMA SILVA

Contribuição à farmacognosia de *Artemisia annua* L. e *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Acompanhamento da variação de metabólitos secundários em diferentes fases fenológicas, órgãos e extratos vegetais, aspectos botânicos e avaliação da atividade antileishmania *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Dominique CH Fischer
orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, 29 de setembro de 2008.

*Ao meu amado filho Mateus pelo simples
fato de existir em minha vida e a cada
manhã me mostrar que tudo vale a pena.*

AGRADECIMENTOS

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro na aquisição de parte do material utilizado no desenvolvimento do trabalho.

Parece meio passional dizer, mas eu nunca pensei em outra atividade que não fosse a pesquisa. É claro que quando criança eu não sabia qual profissão me encaixaria neste meio, por isso meu pais, Rita e Manoel, foram cruciais para a minha chegada até aqui. Minha mãe procurando, do jeitinho dela, pessoas e informações que pudessem me ajudar e meu pai com aquela enxurrada de conhecimentos gerais próprios dele, que me inundavam e apaixonavam. A eles devo e agradeço a certeza desta minha escolha.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Dominique C. H. Fischer por ter acolhido a mim e a este projeto com tanta dedicação, carinho e entusiasmo. Obrigada por tudo.

Ao Dr. Benjamin Gilbert por acreditar em mim, no meu trabalho e me mostrar que é dividindo que se multiplica.

Ao querido Robert van Hoorn, pelo apoio integral e por ser um pai tão dedicado ao nosso filho.

À queridíssima amiga Carol pela amizade que cresceu juntamente com o desenvolvimento deste trabalho e espero que não tenha fim.

A Jô, André Wasicky, Susan Bruna, Nayara Nhoque, Felipe Capeli, Monique Baron, Thais Aragão, Gilberto Hideo Kaihami, Ana Paula Espírito Santo, Larissa, Tati, Alberto e Leandro por serem amigos tão maravilhosos.

Ao Roberto de Jesus Honório por sempre dar um jeitinho de me ajudar no que eu precisava e por muitas vezes me tirar de enrascadas.

Ao Dr. Pedro Mellilo de Magalhães por ceder os espécimes de *Artemisia annua* para o trabalho e me auxiliar em diversas dúvidas.

À Dra. Berta Lange de Morretes pelas diversas lições tanto acadêmicas quanto de vida.

Ao Sr. Antonio Carlos Franco Barbosa (Sr. Antonio) por ter-me ensinado tanto, não só sobre os métodos anatômicos, mas principalmente sobre amizade, carinho, lealdade e desinteresse em tudo que não seja o bem do próximo.

À equipe do CT-floresta (IPT), Geraldo, Maria José, Márcio, Lígia, Cláudia, Pigozzo, Richard, Cícero, Chicão, Anderson, Sílvia, Cíntia por abrirem as portas da sessão para conclusão dos trabalhos anatômicos e, principalmente pela acolhida tão carinhosa.

À Dra. Silvia Bertolin Reni Uliana pela parceria com os ensaios biológicos e, mais do que isso, pela enorme paciência em me ajudar e ouvir.

Aos amigos Rogéria, Danilo, Jenicer, Alessandro, Fernando e Sandra pelo carinho, amizade e auxílio às dúvidas nos ensaios biológicos.

À Dra. Alcira Tania B. de Katzin por me ensinar sobre mosquitos nas excelentes aulas de Parasitologia e também a ela e equipe: Alexandre, Fábio e André por cederem o leitor de Elisa.

À Dra. Valentina Porta, Eunice Kasue Kano, Eunice, Simone e equipe do Biofar pela disponibilização dos materiais e auxílio nas análises no CLAE.

A Kátia Botelho e Charles de Lima Brito (LAPEN) pelo uso do espectrofotômetro. À Kátia Botelho também pelo carinho e amizade.

Ao Dr. José Rubens Pirani e à Dra. Mara Magenta pela identificação das espécies coletadas e esclarecimentos em morfologia vegetal.

À Dra. Maria Luiza Salatino, Dr. Antônio Salatino, Dra. Cláudia, Mouriza e Carol pelo suporte junto ao isolamento e caracterização de flavonóides.

À equipe da Silvia Berlanga, Diogo e Batata por ceder o espectrofotômetro.

Ao grupo da botânica, Gisele, Vivi Jono, Marcelo Pati e Gui Freire por todo auxílio prestado.

Ao Pedro (Cabeça) e Fábio pela amizade e milhares de risadas.

Ao funcionários Adalto, Bete, Alexandre, Luís, Suzi, Kelma.

A Auriluce e Renato, da equipe da informática.

Aos vigilantes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por me abrirem as portas do Bloco 15 inúmeras vezes.

Às Dra. Elfriede Bacchi e Dra. Edna pelo uso do liofilizador.

À equipe de transportes, principalmente João por me levar ao local de coleta das espécimes vegetais.

À equipe da mecânica por nos socorrerem com o conserto dos aparelhos.

À equipe da mecânica (IPT) pelo desenho do suporte de lâminas descartáveis.

A todos que de uma forma ou outra colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais volta ao
seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

RESUMO

SILVA, F.L. Contribuição à farmacognosia de *Artemisia annua* L. e *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Acompanhamento da variação de metabólitos secundários em diferentes fases fenológicas, órgãos e extratos vegetais, aspectos botânicos e avaliação da atividade antileishmania *in vitro*. 2008. 236f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Na busca por espécies vegetais com atividade antileishmania, selecionaram-se, para o estudo, duas espécies bem conhecidas da família Asteraceae: *Artemisia annua* L. e *Bidens pilosa* L. Ambas são reconhecidamente utilizadas na medicina popular, como antiprotozoárias. Apesar de terem sido amplamente estudadas em diversos aspectos, alguns permaneceram inexplorados, até o momento, e foram abordados, neste trabalho. As duas espécies foram analisadas quanto aos aspectos químico e biológico de extratos (hidroetanólico e infuso) e frações orgânicas selecionados, em função da atividade antileishmania *in vitro*, frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os extratos foram obtidos a partir de órgãos vegetais, em estados de conservação diferentes (*in natura*, droga) e coletados em fenofases distintas. Extratos e frações orgânicas das espécies estudadas mostraram promissora atividade antileishmania *in vitro* e baixo nível de citotoxicidade *in vitro* em células epiteliais humanas (HEP-2). No estudo químico dos extratos e frações bioativos, realizaram-se análises qualitativas e/ou quantitativas de terpenos, flavonóides e de marcadores específicos (artemisinina, quercetina e rutina), avaliando-se a variação da composição dos mesmos, nas diferentes fenofases consideradas. Discutiram-se as possíveis relações existentes entre a composição química e a atividade biológica verificada. Aspectos inéditos do estudo morfoanatômico de partes aéreas de *A. annua* foram descritos.

Palavras-chave: *Artemisia annua*, *Bidens pilosa*, atividade antileishmania *in vitro*, atividade citotóxica *in vitro*, variação sazonal de constituintes

ABSTRACT

SILVA, F.L. Pharmacognosy of *Artemisia annua* L. and *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Growth stages variation of secondary metabolites in extracts from plant parts collected in different growth stages, botanical aspects and *in vitro* evaluation of the antileishmanial activity. 2008. 236f. Dissertation (Mastership) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Plants are potential sources of new antileishmanial drugs. Two well-known antiprotozoal species were selected, from the Asteraceae family, for this study: *Artemisia annua* L. and *Bidens pilosa* L. Despite the traditional and scientific accumulated knowledge, some aspects were not investigated before and were the subject of this work. Several extracts (infusions and ethanol 96 °GL) and selected fractions from both species were evaluated according to the different parameters, such as: plant organs and/or parts, growth stages and drying state of starting materials (fresh, drug). Fractions were selected among those more active against promastigotes of *Leishmania amazonensis*. Ethanol extracts and their fractions showed a high level of *in vitro* antileishmanial activity and a low cytotoxicity on epithelial human cells (HEP-2). Qualitative and/or quantitative analysis of extracts and fractions were performed for terpenes, flavonoids and selected markers (artemisinin, quercetin and rutin) in order to characterize them and evaluate variations during the different growth stages. Correlations of the chemical composition and the biological activity were discussed. The main anatomical characters of the aerial parts of *A. annua* were described for the first time and illustrated by photomicrographs.

Key words: *Artemisia annua*, *Bidens pilosa*, *in vitro* antileishmanial activity, *in vitro* cytotoxic activity, seasonal variation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da artemisinina	3
FIGURA 2	Registros dos casos de leishmaniose cutânea no mundo.....	7
FIGURA 3	Registros dos casos de leishmaniose visceral no mundo.....	8
FIGURA 4	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	9
FIGURA 5	Vias biometabólicas de artemisinina.....	14
FIGURA 6	Estrutura química de ácido minquartinóico.....	66
FIGURA 7	Distribuição geográfica mundial de espécies do gênero <i>Artemisia</i> L.....	68
FIGURA 8	Distribuição geográfica mundial de espécies do gênero <i>Bidens</i> L.....	69
FIGURA 9	Curva de Ringbom do padrão de quercetina.....	108
FIGURA 10	Reta analítica do padrão de quercetina.....	109
FIGURA 11	Curva analítica do padrão de artemisinina convertido a Q260....	113
FIGURA 12	Cromatograma (CLAE, coluna C-18) das soluções do derivado do padrão de artemisinina (Q260) (mAU x min).....	116
FIGURA 13	Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos extratos hidroetanólicos das partes aéreas de <i>A. annua</i> obtidos a partir do material vegetal proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena.....	117
FIGURA 14	Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos infusos das partes aéreas de <i>A. annua</i> , obtidos a partir do material vegetal proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena.....	118
FIGURA 15	Cromatograma (CLAE, coluna C-18) das soluções dos padrões de quercetina e rutina.....	120
FIGURA 16	Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos extratos hidroetanólicos das partes aéreas de um exemplar <i>A. annua</i> (mAU x min), obtidos a partir do material vegetal (<i>in natura</i> e droga), proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena.....	121

FIGURA 17	Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos infusos das partes aéreas de um exemplar de <i>A. annua</i> , obtidos a partir do material vegetal, proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena.....	122
FIGURA 18	Cromatogramas em camada delgada da fração bioativa <i>n</i> -hexano do extrato hidroetanólico das partes aéreas da fenofase de floração plena de <i>Artemisia annua</i> L.....	127
FIGURA 19	Cromatogramas em camada delgada da fração bioativa clorofórmio do extrato hidroetanólico das partes aéreas da fenofase de floração plena de <i>Artemisia annua</i> L.....	128
FIGURA 20	Cromatogramas em camada delgada da fração bioativa acetato de etila do extrato hidroetanólico das partes aéreas da fenofase de floração plena de <i>Artemisia annua</i> L.....	129
FIGURA 21	Esquema geral da avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos extratos e frações orgânicas de <i>A. annua</i>	132
FIGURA 22	Esquema geral da avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos extratos e frações orgânicas de <i>B. pilosa</i>	133
FIGURA 23	<i>Artemisia annua</i> L. - 23A. Cultivo, processamento de corte e secagem. 23B. Detalhe de arbustos na área de plantio.....	143
FIGURA 24	<i>Bidens pilosa</i> L. - 24A. Área de cultivo. 24B. Detalhe das inflorescências. 24C. Detalhe do fruto seco	144
FIGURA 25	<i>Artemisia annua</i> L. - 25A. Detalhe de folíolos medianos da face adaxial. 24B. Esquema geral do limbo foliar e detalhe para folíolo apical.....	145
FIGURA 26	<i>Artemisia annua</i> L. Folha composta (<i>in natura</i>). 26A. Face abaxial. 26B. Face adaxial. 26C. Desenho representando a nervação no folíolo de segunda ordem (apical).....	146
FIGURA 27	<i>Artemisia annua</i> L. – Face abaxial. Detalhe de indumento sobre a nervura mediana.....	147
FIGURA 28	<i>Artemisia annua</i> L. Droga. 28A. Detalhe dos folíolos (face abaxial). 28B. Detalhe de dobramento do limbo em direção à face abaxial. 28C. Aspecto geral dos folíolos destacados da raque.....	148
FIGURA 29	<i>Artemisia annua</i> L. – Detalhe dos folíolos e foliólulos (droga) e do raque (r) alado.....	149
FIGURA 30	<i>Artemisia annua</i> L. - Panícula. Aspecto geral de inflorescência composta.....	149

FIGURA 31	<i>Artemisia annua</i> L. Capítulo floral. 31A e 31B. Aspecto geral do capítulo. 31C. Disposição das brácteas involucrais, em duas fileiras.....	150
FIGURA 32	<i>Artemisia annua</i> L. – 32A. Esquema geral do capítulo floral com receptáculo cônico e brácteas involucrais em duas fileiras. 32B. Flor feminina contendo tricomas glandulares na corola e estigma bifido. 32C. Flor feminina aberta. 32D. Flor hermafrodita aberta com estames sinantéreos. 32E. Flor hermafrodita contendo tricomas glandulares na corola.....	151
FIGURA 33	<i>Artemisia annua</i> L. Floretas tubulosas. 33A. Floreta feminina. Aspecto geral e presença de estigma bifido. 33B. Detalhe da corola com tricomas glandulares. 33C Floreta hermafrodita. Tricomas glandulares bisseriados na superfície da corola.....	152
FIGURA 34	<i>Artemisia annua</i> L. Folíolo. Secção transversal: Detalhes do mesofilo.....	153
FIGURA 35	<i>Artemisia annua</i> L. Folíolo. Vista frontal da epiderme. 35A. Face adaxial. Detalhe de cutícula estriada (seta). 35B. Face abaxial.	154
FIGURA 36	<i>Artemisia annua</i> L. Folíolo. Vista frontal de epiderme. Detalhe de tricoma ramificado em formato de “T”.....	155
FIGURA 37	<i>Artemisia annua</i> L. Folíolo. Vista frontal da epiderme. Detalhes dos tricomas glandulares típicos de Asteraceae.....	155
FIGURA 38	<i>Artemisia annua</i> L. Folíolo. Secção transversal mostrando mesofilo e nervura mediana.....	157
FIGURA 39	<i>Artemisia annua</i> L. Pecíolo. Secção transversal. Disposição geral dos tecidos.....	158
FIGURA 40	<i>Artemisia annua</i> L. Pecíolo. Secção transversal com detalhe para cutícula espessa e irregular e estômato em nível superior às demais células epidérmicas	159
FIGURA 41	<i>Artemisia annua</i> L. Pecíolo. Secção transversal com detalhe do feixe vascular colateral.....	160
FIGURA 42	<i>Artemisia annua</i> L. Raque. Secção transversal mostrando disposição geral dos tecidos.....	161
FIGURA 43	<i>Artemisia annua</i> L. Raque. Secção transversal.	162
FIGURA 44	Comparação dos rendimentos da extração, por infusão e por percolação com etanol 96°GL, das partes aéreas (<i>in natura</i> , droga) de <i>A. annua</i> L. , coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena.....	166

FIGURA 45	Comparação dos rendimentos da extração de folhas, vegetal inteiro e raiz (<i>in natura</i> , droga) de <i>B. pilosa</i> L. coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração, de floração plena e de frutificação, por infusão e por percolação com etanol 96°GL.....	167
FIGURA 46	Avaliação comparativa dos teores médios de artemisinina em infusos e extratos hidroetanólicos de partes aéreas (<i>in natura</i> , droga) de <i>A. annua</i> L. coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena.....	174
FIGURA 47	Confronto dos teores médios de flavonóide totais e de artemisinina em infusos e extratos hidroetanólicos de partes aéreas (<i>in natura</i> , droga) de <i>A. annua</i> L. coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena.....	175
FIGURA 48	Conversão de artemisinina no composto Q292, por tratamento com NaOH 2% (m/v) e, em Q260, após o tratamento com ácido acético 0,1 M (CLAE/UV).....	176

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Sesquiterpenos encontrados <i>Artemisia annua</i> L.....	16
QUADRO 2	Flavonóides encontrados <i>Artemisia annua</i> L.....	31
QUADRO 3	Flavonóides encontrados em <i>Bidens pilosa</i> L.....	47
QUADRO 4	Poliacetilenos encontrados em <i>Bidens pilosa</i> L.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Extratos de <i>A. annua</i> e material vegetal de origem (órgãos vegetais, fenofase de coleta e estado de conservação) destinados ao estudo químico e avaliação das atividades antileishmania e citotóxica <i>in vitro</i>	81
TABELA 2	Extratos de <i>B. pilosa</i> e material vegetal de origem (órgãos vegetais, fenofase de coleta e estado de conservação) destinados ao estudo químico e avaliação das atividades antileishmania e citotóxica <i>in vitro</i>	81
TABELA 3	Programação do gradiente de solventes, nas análises cromatográficas dos padrões de flavonóides e dos extratos de <i>A. annua</i> e <i>B. pilosa</i> , por CLAE/UV.....	91
TABELA 4	Sistemas cromatográficos (SC) empregados para a pesquisa de compostos terpênicos e flavonóides nas frações orgânicas bioativas dos extratos hidroetanólicos de <i>A. annua</i> , por CCD..	92
TABELA 5	Rendimentos das extrações (% m/m), por percolação (etanol 96° GL) e por infusão, das partes aéreas (<i>in natura</i> e droga) de <i>Artemisia annua</i> L., coletadas nas fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena, efetuadas por percolação com etanol 96°GL e por infusão.....	100
TABELA 6	Rendimentos das extrações (% m/m), por percolação (etanol 96° GL) e por infusão, de órgãos vegetais distintos (<i>in natura</i> e droga) de <i>Bidens pilosa</i> L., coletados nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e de frutificação, efetuadas por percolação com etanol 96°GL e por infusão.....	102
TABELA 7	Rendimentos do fracionamento (% m/m) dos extratos hidroetanólicos das partes aéreas (<i>in natura</i> e droga) de <i>Artemisia annua</i> L., coletadas nas fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena.....	103
TABELA 8	Rendimentos do fracionamento (% m/m) dos extratos hidroetanólicos de folhas e raízes (<i>in natura</i> e droga) de <i>Bidens pilosa</i> L., coletadas nas fenofases vegetativa e de frutificação.....	104
TABELA 9	Determinação dos valores médios de massa seca das partes aéreas <i>in natura</i> , cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido da droga, a partir de dois exemplares de <i>A. annua</i> L., nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena.....	106
TABELA 10	Determinação dos valores médios de resíduo seco de folhas, vegetal inteiro e raízes (droga) a partir de cinco exemplares de <i>Bidens pilosa</i> L., nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação.....	107

TABELA 11	Teores médios de flavonóides totais, em folhas e capítulos florais de <i>A. annua</i> (droga) e nos extratos hidroetanólicos e infusos destes órgãos vegetais, <i>in natura</i> e na forma de droga, provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena, determinados por espectrofotometria e expressos com base na concentração de quercetina.....	110
TABELA 12	Teores médios de flavonóides totais, nos extratos hidroetanólicos e infusos de folhas vegetal inteiro e raízes de <i>B. pilosa</i> , <i>in natura</i> e na forma de droga, provenientes de cinco exemplares, coletados nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação, determinados por espectrofotometria e expressos com base na concentração de quercetina.....	112
TABELA 13	Precisão do método de quantificação* da artemisinina por CLAE/UV- Concentração média de artemisinina nas amostras dos extratos em acetonitrila de <i>A. annua</i> (droga, 3 fenofases) e respectivos desvios padrão relativos (DPR).....	114
TABELA 14	Recuperação (%) de artemisinina, a partir das amostras dos extratos em acetonitrila de <i>A. annua</i> (droga, 3 fenofases) e respectivos coeficientes de variação (CV), pelo método de quantificação* de artemisinina, por CLAE.....	115
TABELA 15	Teores médios de artemisinina, nos extratos hidroetanólicos e infusos de folhas e capítulos florais (<i>in natura</i> e droga) de <i>A. annua</i> , provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena, determinados por CLAE/UV.....	119
TABELA 16	Avaliação da presença dos marcadores flavonoídicos (quercetina e rutina), por CLAE/UV, nos extratos de partes aéreas (<i>in natura</i> , droga) de <i>A. annua</i> L., provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena.....	123
TABELA 17	Avaliação da presença dos marcadores flavonoídicos (quercetina e rutina), por CLAE/UV, nos infusos extratos hidroetanólicos de folhas, vegetal inteiro e raízes (<i>in natura</i> , droga) de <i>B. pilosa</i> L., provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação.....	125
TABELA 18	Valores das concentrações inibitórias de 50% (CI ₅₀) das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e da concentração citotóxica de 50% (CC ₅₀) das células epiteliais humanas para artemisinina, quercetina e rutina.....	131
TABELA 19	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos infusos de raízes (<i>in natura</i> e droga) de <i>B. pilosa</i> frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	134

TABELA 20	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> (% de morte) dos extratos hidroetanólicos de partes aéreas (<i>in natura</i> e droga) de <i>A. annua</i> L., coletadas nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena, e de suas frações orgânicas frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	136
TABELA 21	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> (% de morte) dos extratos hidroetanólicos de folhas, vegetal inteiro e raízes de <i>Bidens pilosa</i> L., coletados nas fenofases vegetativa e de frutificação e de suas frações orgânicas frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	138
TABELA 22	Concentrações inibitórias de 50% e 90% (CI ₅₀ e CI ₉₀) das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , concentração citotóxica <i>in vitro</i> (CC ₅₀) em células epiteliais humanas e índice de seletividade (IS) de frações <i>n</i> -hexano, clorofórmio e acetato de etila do extrato hidroetanólico das partes aéreas* (droga) de <i>A. annua</i> , coletadas na fenofase de floração plena.	140
TABELA 23	Concentrações inibitórias de 50% e 90% (CI ₅₀ e CI ₉₀) das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , concentração citotóxica <i>in vitro</i> (CC ₅₀) em células epiteliais humanas e índice de seletividade (IS) de frações orgânicas do extrato hidroetanólico de folhas e raízes (<i>in natura</i> e droga), nas fenofases vegetativa e de frutificação.....	141
TABELA 24	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos padrões de artemisinina e quercetina frente a formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	120
TABELA 25	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos e frações orgânicas de <i>A. annua</i> frente a formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	121
TABELA 26	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos infusos de folhas, vegetal inteiro e raízes (<i>in natura</i> e droga) de <i>B. pilosa</i> frente a formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	122
TABELA 27	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> de extratos hidroetanólicos e frações orgânicas de <i>Bidens pilosa</i> frente a formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	123
TABELA 28	Avaliação da concentração inibitória de 50% (CI ₅₀) para <i>L. amazonensis</i> e da concentração citotóxica (CC ₅₀) para células epiteliais humanas, <i>in vitro</i> das substâncias-padrão.....	124

TABELA 29	Avaliação da concentração inibitória (CI_{50} e CI_{90}) para <i>L. amazonensis</i> , da concentração citotóxica (CC_{50}) para células epiteliais humanas, <i>in vitro</i> , e cálculo do índice de seletividade das frações provenientes do bioativo extrato hidroetanólico na fenofase de floração plena (droga) de <i>A. annua</i>	125
TABELA 30	Avaliação da concentração inibitória (CI_{50} e CI_{90}) para <i>L. amazonensis</i> , da concentração citotóxica (CC_{50}) para células epiteliais humanas, <i>in vitro</i> , e cálculo do índice de seletividade das frações provenientes das frações bioativas selecionadas de <i>B. pilosa</i>	126

CONTEÚDO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de figuras	ix
Lista de quadros	xiii
Lista de tabelas	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Leishmaniose	5
2.1.1 Agentes etiológicos	5
2.1.1.1 Leishmaniose cutânea (LC)	6
2.1.1.2 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)	6
2.1.1.3 Leishmaniose muco-cutânea (LM)	6
2.1.1.4 Leishmaniose visceral (LV)	6
2.1.2 Distribuição geográfica	6
2.1.3 Transmissão e ciclo de vida	8
2.1.4 Tratamento	9
2.1.4.1 Antimoniais pentavalentes (Sb V)	10
2.1.4.2 Pentamidina	11
2.1.4.3 Anfotericina B	12
2.2 Aspectos químicos	12
2.2.1 <i>Artemisia annua</i> L.	12
2.2.1.1 Sesquiterpenos	12
2.2.1.1.1 Artemisinina	13
<i>Vias biometabólicas da artemisinina</i>	13
2.2.1.2 Compostos fenólicos	30
2.2.1.2.1 Flavonóides	30

2.2.2 <i>Bidens pilosa</i> L.	46
2.2.2.1 Compostos fenólicos	46
2.2.2.1.1 Flavonóides	46
2.2.2.2 Derivados de ácidos graxos	57
2.2.2.2.1 Acetilenos	57
2.3 Usos tradicionais e estudos farmacológicos de <i>A. Annua</i> e <i>B. pilosa</i>	62
2.3.1 Usos tradicionais com antiprotozoários	62
<i>A. annua</i>	62
<i>B. pilosa</i>	62
2.3.2 Outros usos	62
<i>A.annua</i>	62
<i>B pilosa</i>	63
2.3.3 Estudos relativos à atividade antileishmania	63
2.3.3.1 <i>A. annua</i>	63
2.3.3.2 <i>B. pilosa</i>	64
2.3.3.3 Classes de metabólitos e mecanismos de ação antiprotozoária	64
2.3.3.3.1 Sesquiterpenos	64
Artemisinina	65
2.3.3.3.2 Flavonóides	65
2.3.3.3.3 Poliacetilenos	66
2.4 Aspectos botânicos	66
2.4.1 Generalidades	66
2.4.1.1 Família Asteraceae (Compositae)	66
2.4.1.2 Gênero <i>Artemisia</i> L.	67
2.4.1.3 Gênero <i>Bidens</i> L.	68
2.4.2 Sinonímia científica	69
<i>A.annua</i> L.	69

<i>B. pilosa</i> L.	69
2.4.3 Sinonímia vulgar	70
<i>A. annua</i> L.	70
<i>B. pilosa</i> L.	70
2.4.4 Aspectos morfológicos	70
2.4.4.1 Família Asteraceae	70
2.4.4.2 Gênero <i>Artemisia</i> L.	71
<i>A. annua</i> L.	72
Folhas	72
Capítulos florais	72
2.4.4.3 Gênero <i>Bidens</i> L.	73
<i>B. pilosa</i> L.	73
Folhas	73
Capítulos florais	74
2.4.5 Aspectos anatômicos	74
2.4.5.1 Família Asteraceae	74
Folhas	75
2.4.5.2 Gênero <i>Artemisia</i> L.	75
Folhas	75
<i>A. annua</i> L.	76
Folhas	76
Capítulos florais	76
2.4.5.3 Gênero <i>Bidens</i> L.	77
<i>B. pilosa</i> L.	77
Folhas	77
3 OBJETIVOS	79
3.1 Objetivos gerais	79

3.2 Objetivos específicos	79
4 MATERIAL E MÉTODOS	80
4.1 Material botânico	80
4.2 Material estudado	80
4.3 Métodos	81
4.3.1 Processamentos posteriores à coleta	81
4.3.1.1 <i>Artemisia annua</i>	81
4.3.1.2 <i>Bidens pilosa</i>	82
4.3.2 Obtenção da droga	82
<i>A. annua</i>	82
<i>B. pilosa</i>	82
4.3.3 Pulverização	82
4.4 Obtenção de extratos	82
4.4.1 Extratos hidroetanólicos	83
4.4.2 Infusos	83
<i>A. annua</i>	83
<i>B. pilosa</i>	83
4.4.3 Frações orgânicas	84
<i>A. annua</i>	84
<i>B. pilosa</i>	84
4.5 Determinação de parâmetros físico-químicos	84
4.5.1 Determinação de massa seca do material <i>in natura</i> e do resíduo seco da droga	84
4.5.2 Determinação do teor de cinzas totais	85
4.5.3 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido	85
4.6 Análise espectrofotométrica	85
4.6.1 Quantificação de flavonóides totais	85
4.6.1 Validação	86

<i>Curva de Ringbom do padrão de quercetina</i>	86
<i>Reta analítica da quercetina</i>	86
4.6.1.2 Preparo das amostras	86
<i>A. annua</i> (droga)	86
Extratos hidroetanólicos e infusos de <i>A. annua</i> e <i>B. pilosa</i>	87
4.7 Análises cromatográficas	87
4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência/UV (CLAE/UV)	87
4.7.1.1 Quantificação da artemisinina	87
4.7.1.1.1 Preparo do padrão de artemisinina	87
4.7.1.1.2 Preparo das amostras	87
4.7.1.1.3 Validação do método	88
<i>Especificidade</i>	88
<i>Curva analítica e linearidade</i>	88
<i>Precisão</i>	88
<i>Exatidão</i>	88
Limite de detecção	88
<i>Ensaio de Recuperação</i>	88
4.7.1.1.4 Condições analíticas	89
4.7.1.2 Análise qualitativa para a pesquisa de marcadores flavonoídicos nos extratos	89
4.7.1.2.1 Preparo dos padrões	89
4.7.1.2.2 Preparo das amostras	90
4.7.1.2.3 Condições analíticas	90
4.7.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	91
4.7.2.1 Análise das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos de <i>A. annua</i>	91
Preparo das amostras	91
Sistema cromatográfico	92
Detecção de compostos terpênicos	92

Detecção de flavonóides	92
4.8 Avaliação da atividade biológica	93
4.8.1 Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i>	93
4.8.1.1 Ensaios de viabilidade frente aos padrões, por contagem direta	93
4.8.1.2 Ensaios de viabilidade frente aos extratos, frações e padrões pela técnica do MTT	93
4.8.1.3 Determinação das concentrações inibitórias de 50 e 90% (CI ₅₀ e CI ₉₀) das frações selecionadas	94
4.8.2 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	95
4.8.2.1 Células	95
4.8.2.2 Determinação da CC ₅₀	95
4.8.3 Determinação do Índice de Seletividade	96
4.9 Estudo morfoanatômico de <i>A. annua</i>	96
5 RESULTADOS	99
5.1 Rendimentos das extrações na obtenção dos infusos, extratos hidroetanólicos e no fracionamento	99
5.1.1 Extratos de <i>A. annua</i>	99
5.1.2 Rendimentos de <i>B. pilosa</i>	101
5.1.3 Fracionamento dos extratos hidroetanólicos	103
5.2 Parâmetros físico-químicos	105
5.3 Teor de flavonóides totais	108
5.3.1 Curva de Ringbom e reta analítica do padrão de quercetina	108
5.3.2 Teor de flavonóides totais em <i>A. annua</i>	109
5.3.3 Teor de flavonóides totais em <i>B. pilosa</i>	111
5.4 Determinação do teor de artemisinina nos extratos de <i>A. annua</i>	113
5.4.1 Validação do método empregado na quantificação de artemisinina, por CLAE/UV	113
5.4.1.1 Curva analítica e linearidade	113
5.4.1.2 Precisão	114

5.4.1.3 Limite de detecção	114
5.4.1.4 Fator de recuperação	114
5.4.2 Cromatogramas do padrão de artemisinina e dos extratos	115
5.4.3 Teores de artemisinina nos extratos	119
5.5 Detecção dos marcadores flavonoídicos nos extratos por CLAE/UV	120
5.5.1 <i>A. annua</i>	120
5.5.2 <i>B. pilosa</i>	124
5.6 Perfil cromatográfico das frações orgânicas bioativas dos extratos hidroetanólicos de <i>A. Annua</i> , por CCD	126
5.7 Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> da artemisinina e da quercetina	130
5.7.1 Acompanhamento da viabilidade das formas promastigotas frente aos padrões selecionados	130
5.7.2 Concentração inibitória de 50% (CI ₅₀) e concentração citotóxica de 50% (CC ₅₀) de artemisinina, quercetina e rutina	130
5.8 Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos extratos e frações orgânicas	131
5.8.1 Triagem dos extratos e frações orgânicas	134
5.8.2 Concentrações inibitórias de 50% e de 90% (CI ₅₀ e CI ₉₀) das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , concentração citotóxica de 50% (CC ₅₀) em células HEP-2 de frações orgânicas de <i>A. annua</i> e <i>B. pilosa</i> e respectivos índices de Seletividade (IS)	139
5.9 Estudo botânico	143
5.9.1 Coleta	143
5.9.2 Estudo morfológico de <i>Artemisia annua</i> L.	144
5.9.2.1 Folhas	144
5.9.2.2 Capítulos florais	149
5.9.3 Estudo anatômico de folha de <i>Artemisia annua</i> .L.	153
5.9.3.1 Foliólos	153
Limbo foliar	153
Pecíolo	157
Raque	160

6 DISCUSSÃO	163
6.1 Fenofases e espécies consideradas	164
6.2 Estudo químico	164
6.3 Estudo biológico	177
6.4 Estudo morfoanatômico	183
7 CONCLUSÕES	189
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178

.....

1 INTRODUÇÃO

Cerca de meio bilhão de pessoas em todo o mundo padecem de enfermidades parasitárias endêmicas. Neste âmbito, algumas regiões figuram entre as mais afetadas, com uma parcela expressiva de suas populações convivendo com velhas endemias como esquistossomose, malária, leishmanioses e hanseníase (BARATA, 2000). Dentre estas parasitoses, a leishmaniose é responsável pela infecção de mais de 12 milhões de pessoas em 88 países (21 deles no Novo Mundo e 67 no Velho Mundo), sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 1993, como a segunda doença de maior importância, após a malária, causada por protozoários (RATH, 2003; TDR, 2005).

Anualmente, ocorrem dois milhões de novos casos, sendo que 1,5 milhões são atribuídos à leishmaniose cutânea e 500 mil; à visceral. Entretanto, estes números não mostram a real situação da epidemia, uma vez que, a notificação compulsória da doença só é feita em 32 países e grande parte dos casos não são notificados (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998; REITHINGER *et al*, 2007; RIDLEY, 2007).

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados (reservatórios de parasitas em áreas peri-domiciliares), bem como no tratamento dos pacientes, mas a eliminação do vetor e seus reservatórios silvestres é uma ação limitada por fatores como a resistência do inseto aos inseticidas, a descontinuidade das campanhas de controle, a ampla distribuição mundial do vetor e de seus reservatórios e a proximidade com o habitat do inseto (CARVALHO & FERREIRA, 2001; SOARES-BEZERRA *et al*, 2004; MURRAY *et al*, 2005). Assim, o tratamento dos doentes é a forma mais eficaz de controle da leishmaniose, já que a pesquisa de vacinas ainda está em andamento (CARVALHO *et al*, 2000; MARKLE *et al*, 2004).

O arsenal terapêutico disponível atualmente é precário incluindo os antimoniais, como fármacos de primeira linha. Estes causam uma série de problemas, como efeitos adversos graves e freqüentes e o aumento da resistência primária do parasita, levando à utilização de fármacos de segunda linha, como as diaminas aromáticas e a anfotericina B, que também são extremamente tóxicos e mal tolerados, requerendo tratamentos prolongados. No caso da anfotericina B, há necessidade de internação para monitoramento do paciente (BERMAN, 1997; GONTIJO & MELO, 2004; COLAKOGLU *et al*, 2006; FIOCRUZ, 2007; GIL *et al*, 2007). Além disso, todos esses fármacos são administrados por via parenteral, o que exige colaboração do

paciente, que muitas vezes não atende, favorecendo o surgimento de cepas resistentes (AMATO, 1998).

Um dos problemas da leishmaniose refere-se à distribuição geográfica, ocorrendo, geralmente em países de extrema pobreza, com poucas perspectivas de retorno financeiro, por isso o desenvolvimento de novos fármacos permanece parado (MURRAY *et al*, 2005). Outro fator preocupante é o desenvolvimento da resistência, principalmente, na Índia, onde atualmente até 60% dos casos apresentam resistência aos medicamentos de primeira linha (antimoniais), levando à necessidade de utilização daqueles de segunda linha, mais caros e mais tóxicos, como a anfotericina B (CROFT & COOMBS, 2003; OUELLETTE *et al*, 2004; MITTAL *et al*, 2007; KOTHARI *et al*, 2007; ASHUTOSH *et al*, 2007).

Desta forma, tem crescido a preocupação mundial com a doença. Campanhas direcionadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) vêm estimulando as pesquisas com drogas alternativas e diversos fármacos, novos e antigos, de diferentes classes terapêuticas têm sido estudados, quanto à atividade contra leishmaniose (CARVALHO *et al*, 2000; TDR, 2007).

Os novos fármacos são indispensáveis para o tratamento da doença, entretanto, devem apresentar, preferencialmente, mecanismos de ação diferentes daqueles usados, atualmente, como forma de driblar o desenvolvimento da resistência. Assim, alvos potenciais da ação de fármacos com atividade antileishmania são os sistemas de transporte de glicose, purinas e outras biomoléculas essenciais, bem como diversos sistemas enzimáticos importantes e específicos do protozoário (BARRETT *et al*, 1999; DOERIG *et al*, 2002; SOARES-BEZERRA *et al*, 2004; MACHUCA *et al*, 2006).

No tocante às pesquisas de novos fármacos, as espécies vegetais são consideradas uma importante alternativa na descoberta de novos compostos, particularmente, contra parasitas, devido à longa coexistência entre estes, os seres humanos e os vegetais (ANTHONY, 2005). Recentemente, muitos compostos ou fármacos potentes usados no tratamento de diversas doenças têm sido isolados de plantas encontradas em todos os tipos de ambientes e contendo classes de metabólitos secundários com surpreendente eficácia e seletividade antiparasitária, como: alcalóides (quinina), terpenos (artemisinina), fenólicos (casticina). Esses resultados têm levado a um interesse crescente pelas terapias alternativas e ao uso de

produtos naturais, especialmente aqueles de origem vegetal (PHILLIPSON & WRIGHT, 1991; BRANDÃO *et al*, 1997; KAYSER *et al*, 2003; ROSA *et al*, 2003).

Neste contexto, representantes da família Asteraceae estão entre os mais promissores na pesquisa de compostos antiparasitários (KAYSER *et al*, 2002), constituindo uma gama de espécies conhecidas, popularmente, por suas ações frente às diversas enfermidades, como o arbusto de origem chinesa, *Artemisia annua* L. (HIEN & WHITE, 1993). De forma semelhante, a espécie *Bidens pilosa* L., considerada como erva-daninha em muitas regiões de cultivo de soja e outros grãos (NICOLAI *et al*, 2006), é muito utilizada na medicina popular (BRANDÃO *et al*, 1997).

Quanto à atividade antileishmania, pouco se tem estudado em relação aos compostos produzidos por estas espécies vegetais. No caso de *A. annua*, as pesquisas têm se limitado ao estudo da atividade da artemisinina (**1**) (**Figura 1**). Este composto é um sesquiterpeno isolado da mesma (YANG & LIEW, 1993; AVERY *et al*, 2003; MA *et al*, 2004; MISHINA *et al*, 2007; LEZAMA-DAVILA *et al*, 2007; RUPASHREE *et al*, 2007).

Com relação a *B. pilosa*, apesar de conter compostos antimicrobianos como os poliacetilenos (TOWERS & WAT, 1978; ARNASON *et al*, 1980; WAT *et al*, 1980; MACHADO *et al*, 1988; MINAMI & OLIVEIRA, 1988)., até o momento, não há estudos referentes à atividade antileishmania da espécie.

A atividade antiparasitária de flavonóides, presentes nas duas espécies estudadas, tem sido investigada de forma isolada (NAVARRO *et al*, 2003; SEN *et al*, 2005; MUZITANO *et al*, 2006; TASDEMIR *et al*, 2006; SEN *et al*, 2008).

FIGURA 1 - Estrutura química da artemisinina

Com base na linha de pesquisa do grupo, no qual este trabalho se inseriu, ou seja, na bioprospecção de novas drogas vegetais com potencial de uso como antiprotozoário, e nas considerações, anteriormente apresentadas, a principal

proposta do presente trabalho foi realizar a avaliação da atividade antileishmania *in vitro* de extratos de *A. annua* e *B. pilosa*, além do estudo químico qualitativo e/ou quantitativo de classes de metabólitos secundários e respectivos marcadores presentes nos extratos obtidos de diferentes órgãos vegetais, considerados em fases fenológicas e estados de conservação distintos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são parasitoses com ampla gama de sintomas clínicos, que podem ser reunidas em quatro grupos: leishmaniose cutânea, cutânea difusa, muco-cutânea e visceral.

A forma cutânea da doença normalmente produz numerosas lesões, ulcerosas ou não, na face, braços e pernas, sendo limitadas. Constitui a forma mais branda da doença, sendo que os sintomas regredem espontaneamente depois de alguns meses. Entretanto, dependendo da espécie de *Leishmania* responsável pela doença, pode evoluir para a leishmaniose cutânea difusa ou muco-cutânea (ROSA *et al*, 2003).

A leishmaniose cutânea difusa caracteriza-se pela formação de nódulos e placas muito mutiladoras espalhadas por todo o corpo. Nas formas muco-cutâneas, as lesões podem levar à destruição parcial ou total das membranas das mucosas do nariz, boca, das cavidades e tecidos circundantes da garganta, ao passo que, a forma visceral, conhecida como calazar, é caracterizada por episódios de febre irregulares, significativa perda de peso, inchaço do fígado e baço, com anemia, ocasionalmente severa. É a mais grave forma da doença e causa até 100% de morte, em casos não tratados, nos países em desenvolvimento, (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998; CARVALHO *et al*, 2000; REY, 1999; CROFT & COOMBS, 2003; WHO, 2007; SALAY *et al*, 2007; REITHINGER *et al*, 2007, OPAS, 2007).

2.1.1 Agentes etiológicos

Os agentes causadores das leishmanioses humanas são protozoários do gênero *Leishmania*, entretanto, há divergências acerca das espécies causadoras de cada grupo de sintomas clínicos, devido à dificuldade de distingui-las morfológicamente (REY, 2001).

As formas de leishmaniose identificadas apresentam os seguintes agentes etiológicos:

2.1.1.1 Leishmaniose cutânea (LC)

Múltiplas espécies de *Leishmania* são responsáveis pela LC, em crianças e adultos, como: *Leishmania braziliensis*, *L.(L.) amazonensis*, *L. mexicana*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* no Novo Mundo e *L. tropica*, *L. (L.) aethiopica* e *L. major* no Velho Mundo (BERMAN, 1997; REY, 2001; MURRAY *et al*, 2005).

2.1.1.2 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

É causada, no Novo Mundo, pelas seguintes espécies: *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* (LEON *et al*, 1990; REY, 2001).

No continente americano, a leishmaniose cutânea difusa é causada por diferentes cepas de *L. amazonensis*, que produzem um amplo espectro de formas clínicas. Entretanto, pesquisas recentes mostraram que, no Brasil, *L. amazonensis* foi encontrada em pacientes com leishmaniose visceral e muco-cutânea, apesar destas formas estarem associadas, geralmente às espécies *L. chagasi* e *L. braziliensis*, respectivamente (LEON *et al*, 1990; ROSA, 2003; OLIVEIRA, 2007).

2.1.1.3 Leishmaniose muco-cutânea (LM)

O agente etiológico desta forma é a espécie *L. braziliensis* (REY, 2001; KEDZIERSKI *et al*, 2006).

2.1.1.4 Leishmaniose visceral (LV)

É causada por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (BERMAN, 1997; MURRAY *et al*, 2005).

2.1.2 Distribuição geográfica

A leishmaniose cutânea é autóctone nas Américas, distribuindo-se por todo o território brasileiro, particularmente, na Amazônia e áreas florestais adjacentes da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Paraguai. Além disso, a doença encontra-se no Brasil e Peru, que juntamente com Irã, Algéria, Afeganistão, Síria e Arábia Saudita somam 90% dos casos (**Figura 2**) registrados (REY, 2001; GONTIJO & MELO, 2004; MURRAY *et al*, 2005; WHO, 2007; TDR, 2007; MIGUEL *et al*, 2007).

FIGURA 2 - Registros dos casos de leishmaniose cutânea no mundo (WHO, 2007).

Os casos de leishmaniose cutânea difusa encontram-se mais disseminados, nas Américas. O agente causador *L. amazonensis*, geralmente, é encontrado em uma área geográfica que se estende por toda a Bacia Amazônica, na região brasileira e dos países vizinhos, bem como territórios adjacentes, inclusive Maranhão, Bahia, Minas Gerais. Mais recentemente foram reportados casos autóctones no Rio de Janeiro (REY, 2001; AZEREDO-COUTINHO *et al*, 2007; OLIVEIRA *et al*, 2007).

A leishmaniose muco-cutânea é autóctone no Novo Mundo, encontrando-se bastante disseminada no Brasil, Venezuela, Guiana Francesa, América Central e nas áreas florestais dos Andes (REY, 2001; MURRAY *et al*, 2003).

A leishmaniose visceral ocorre nas Américas, na Ásia, na África e na Europa sendo que, mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, no Brasil, na Índia, no Nepal e no Sudão (**Figura 3**) (REY, 2001; MURRAY *et al*, 2003; ASHUTOSH *et al*, 2007).

FIGURA 3 - Registros dos casos de leishmaniose visceral no mundo (WHO, 2007).

Nas Américas, a LV possui grande incidência no Brasil, na Venezuela e na Argentina (região dos Chacos). No Brasil, a doença encontra-se disseminada por todos os estados da federação, entretanto as principais áreas endêmicas encontram-se no Norte e Nordeste, estando relacionadas às características econômicas e culturais dessas populações.

Os estados de maior incidência são: Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; REY, 2001; GONTIJO & MELO, 2004).

2.1.3 Transmissão e ciclo de vida

Os insetos vetores das leishmanioses pertencem aos gêneros *Lutzomyia* (encontrado nas Américas) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (REY, 2001).

FIGURA 4 – Ciclo de vida de *Leishmania* (CDC, 2007).

O ciclo de vida dos parasitas de *Leishmania* consiste em duas formas distintas: as promastigotas (1), parasitas extracelulares flagelados que se encontram no trato digestivo do inseto vetor e, as amastigotas (4), estágio desprovido de flagelo e sem motilidade, que vivem dentro dos vacúolos de macrófagos (MIGUEL *et al*, 2007). Assim, quando o inseto pica o homem, inocula as formas promastigotas (1), que invadem ou são fagocitadas por células de defesa local, incluindo neutrófilos (2). Dentro dos fagossomas dos macrófagos as formas promastigotas transformam-se em amastigotas e passam a se replicar (3). Após o rompimento dos macrófagos parasitados (4), estas formas infectam outros macrófagos, no local ou em outros mais distantes, culminando na expressão clínica. Porém em cerca de 90% dos casos, a doença permanece assintomática, na pessoa infectada (REY, 2001; COSTA *et al*, 2002; MURRAY *et al*, 2003).

2.1.4 Tratamento

São conhecidos cerca de 25 compostos que apresentam efeito antileishmaniano, mas poucos desses são classificados como fármacos para o tratamento de leishmanioses e usados em humanos (SINGH & SIVAKUMAR, 2004). Os medicamentos mais difundidos são os antimoniais pentavalentes, a pentamidina e

a anfotericina B. Todos requerem a administração parenteral e a supervisão clínica ou hospitalar durante o tratamento, devido à severidade dos efeitos secundários (BERMAN & LEE, 1983).

Diversos outros compostos vêm sendo estudados quanto a sua atividade antileishmania como pirimetamina, cetoconazol, itraconazol e alopurinol, entretanto, ainda não há um fármaco que apresenta índice terapêutico adequado, com baixa toxicidade (BERMAN, 2001).

2.1.4.1 Antimoniais pentavalentes (Sb V)

Os antimoniais orgânicos foram introduzidos na terapêutica antileishmania em 1912, por Gaspar Viana, no Instituto Butantã, sendo considerados, até hoje, como fármacos de primeira linha, no tratamento de todas as leishmanioses (FIOCRUZ, 2007).

Entre os antimoniais mais utilizados na terapêutica são estibogluconato de sódio e antimoniato de *N*-metil glucamina (RATH *et al*, 2003). Observam-se, porém, variações na resposta clínica aos dois fármacos, nas leishmanioses nas formas cutânea, muco-cutânea e visceral, em função da diferença intrínseca entre a sensibilidade das espécies frente a estes fármacos (CROFT *et al*, 2006).

No Brasil, o antimoniato de *N*-metil glucamina tem sido, particularmente, eficaz no tratamento de leishmanioses cutânea, muco-cutânea e visceral, quando administrado de forma contínua e na posologia adequada (RATH *et al*, 2003).

Esses fármacos provocam regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como a esterilização dos parasitas, porém, a terapia com antimoniais pentavalentes apresenta entre os efeitos indesejáveis: mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas, distúrbios cardiológicos, além de dos inconvenientes dos regimes de tratamento muito prolongados, caros e nem sempre efetivos, tendo em vista a alta resistência (BERMAN, 1997; CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; REY, 2001; MURRAY *et al*, 2003).

O mecanismo de ação, a estrutura e a identidade dos antimoniais [Sb (V)] são ainda controversos e pouco compreendidos (OUELLETTE *et al*, 2004; CHAI *et al*, 2005). Conforme o Manual do Ministério da Saúde (2007), eles são considerados antileishmaniais, por inibirem a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos. Estas são acompanhadas da redução na produção de ATP (adenina-trifosfato) e GTP (guanosina-trifosfato), sendo ativada a conversão do antimonial para a forma trivalente (Sb III).

Outro possível mecanismo de ação refere-se à inibição da proteína tirosina fosfatase, levando ao aumento da resposta de citosina do indivíduo parasitado e, ainda, o antimônio pentavalente pode estar envolvido na destruição do parasita por mecanismos diretos e indiretos, com a ajuda da resposta imune do hospedeiro (OULLETTE *et al*, 2004; LIMA *et al*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Outro mecanismo de ação, que tem sido cogitado relaciona-se à capacidade do antimônio pentavalente formar complexos com nucleotídeos, interferindo no metabolismo e inibindo a topoisomerase do parasita (GIL *et al*, 2007 *apud* DEMICHELI *et al*, 2002). Esta hipótese está consolidada pelo fato de que os nucleotídeos e polinucleotídeos apresentam elevado número de funções oxigenadas e nitrogenadas, que constituem sítios doadores potenciais para íons metálicos. Além disso, ao contrário das células de mamíferos, os protozoários são incapazes de sintetizar purinas e se utilizam de mecanismos bioquímicos alternativos, que têm como ponto de partida a translocação de purinas pré-formadas. Esta estratégia, exacerbada em *Leishmania*, pode também contribuir para a formação de complexos antimônio pentavalente-purina que, por sua vez, teriam influência deletéria em toda bioquímica do DNA do parasita (CHAI *et al*, 2005).

Dados recentes também sugerem que os antimoniais pentavalentes comprometem o potencial redox do tiol, por redução da saída de tióis intracelulares e inibição da tripanotiona redutase (OULLETTE *et al*, 2004).

2.1.4.2 Pentamidina

A pentamidina tem sido usada como fármaco de segunda linha no tratamento de leishmanioses cutânea, cutânea difusa e visceral há mais de 40 anos (CROFT *et al*, 2006) e apresenta-se em duas formas, isotionato ou cloridrato (GIL *et al*, 2007). É uma molécula de grande interesse no tratamento de leishmanioses visceral e muco-cutânea resistentes aos antimoniais pentavalentes, porém a alta toxicidade deste fármaco, com relatos de morte repentina e o tratamento por período prolongado, se são fatores limitantes de seu emprego terapêutico em relação aos antimoniais (BERMAN, 1997; CARVALHO *et al*, 2000; RATH *et al*, 2003). Outros efeitos adversos observados são: hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (RATH *et al*, 2003).

Os possíveis mecanismos da ação antileishmania da pentamidina incluem a interferência na biossíntese de poliamidas e os efeitos sobre a inibição da topoisomerase mitocondrial do parasita (KRAMP *et al*, 2005; CROFT *et al*, 2006). O mecanismo molecular está associado à inibição não-competitiva da recaptura de

poliaminas e inibição direta da S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), enzima envolvida na biossíntese da espermidina (poliamina) (GIL *et al*, 2007).

2.1.4.3 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico muito utilizado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Ela interage com a membrana fúngica e com os esteróis, preferencialmente, com ergosterol. Tal como nos fungos, as leishmanias também possuem o ergostano, na membrana plasmática, o que pode explicar a eficácia do fármaco contra esses parasitas (OULLETTE *et al*, 2004).

Cerca de um terço dos pacientes apresenta manifestações de toxicidade elevada como: anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrios, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia.

Apesar destes efeitos e da necessidade de administração parenteral e de internação tem sido proposto o uso da anfotericina B, como agente terapêutico de escolha no tratamento da leishmaniose visceral (LIMA *et al*, 2007).

2.2 Aspectos químicos

2.2.1 *Artemisia annua* L.

Diversas classes de metabólitos secundários têm sido isoladas a partir dos diferentes órgãos de *A. annua*, entre as quais, citam-se: sesquiterpenos, cumarinas, mono-, di- e triterpenos, poliacetilenos, esteróides, compostos fenólicos, compostos alifáticos, lipídeos e purinas (JEREMIC *et al*, 1973; DJERMANOVIC *et al*, 1975; ULUBELEN *et al*, 1976; TU *et al*, 1982; ACTON & KLAYMAN, 1985; MISRA, 1986; ROTH & ACTON, 1987a; ROTH & ACTON, 1987b; EL-FERALY *et al*, 1989; SHILIN *et al*, 1989; BHAKUNI *et al*, 1990; MANNS & HARTMANN, 1992; WEJ *et al*, 1992; BROWN, 1992; BROWN, 1993; BROWN, 1994; AHMAD & MISRA, 1994; YANG *et al*, 1995; OLIVEIRA *et al*, 1997; DJERMANOVIC *et al*, 1997; SHUKLA *et al*, 1997; SY & BROWN, 1998; TANG *et al*, 2000; BHAKURI *et al*, 2001; BROWN *et al*, 2003; SINGH & BHAKUNI, 2004).

2.2.1.1 Sesquiterpenos

A partir das investigações fitoquímicas realizadas a partir de *A. annua*, foram isolados, até o momento, sessenta e dois sesquiterpenos dos seus diferentes órgãos vegetais (**Quadro 1**). A maioria desses compostos está relacionada classe dos amorfanos, pertencentes ao grupo dos cadinanos, caracterizados pela presença do

núcleo estrutural (1S, 6S, 7S)-7-(2-propil)-4,10-dimetilbiciclo [4.0.4] decano ou de sua imagem especular (BORDOLOI *et al*, 1989).

2.2.1.1.1 Artemisinina

A artemisinina (**1**) é o componente principal e majoritário de *A. annua* sendo uma lactona sesquiterpênica do 1,2,4-trioxano (BROWN *et al*, 2003), mais conhecida por sua acentuada atividade antimalárica *in vivo* frente aos plasmódios: *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*.

O primeiro isolamento deu-se, em 1972, a partir das folhas de *A. annua* (HIEN & WHITE, 1993). Sua síntese completa foi realizada por diversos grupos. Entretanto, para a mesma, processos complexos, requerendo diversas etapas e materiais, além dos baixos rendimentos e custo elevado mostraram-se necessários, sendo assim a obtenção direta da planta mostrou-se a forma mais viável de obtenção do composto (FERREIRA *et al*, 2005).

A artemisinina foi encontrada em folhas, caules primários, botões florais, inflorescências e sementes da referida espécie, sendo que as folhas e inflorescências apresentaram teores variando de 0,01 a 1,4% (m/m) (LIERSCH *et al*, 1986; SINGH *et al*, 1988; ELSOHLY *et al*, 1990; HIEN & WHITE, 1993; FERREIRA *et al*, 1995a,b; JAIN *et al*, 1996; MAGALHÃES *et al*, 1997; van GELDRE *et al*, 1997; KAWAMOTO *et al*, 1999; WALLAART *et al*, 2000; RÄTH *et al*, 2004; RODRIGUES *et al*, 2006; LOMMEN *et al*, 2006; BILIA *et al*, 2006a,b; TONK *et al*, 2007).

Vias biometabólicas da artemisinina

Com o intuito de aumentar o teor de artemisinina na planta, algumas pesquisas foram direcionadas para o estudo das rotas biossintéticas da artemisinina e de alguns precursores na planta.

As vias metabólicas para a formação de artemisinina ainda não estão totalmente elucidadas (**Figura 5**), porém a importância dos últimos precursores, os sesquiterpenóides: ácido artemisínico (**23**) (precursor do ácido dihidroartemisínico (**24**)), arteanuína B (**34**) e artemisitenol (**52**) é conhecida (van GELDRE *et al*, 1997).

FIGURA 5 – Vias biometabólicas de artemisinina (LOMMEN *et al*, 2006)

A artemisinina é formada por reações enzimáticas a partir do artemisitenol. Esta, porém, não é a única via biossintética para a sua formação. Na fase de pós-coleta, ocorre a conversão do ácido dihidroartemisínico em artemisinina, por processo não-enzimático e reação fotooxidativa. Desta forma, alguns autores sugeriram que o cálculo do teor de artemisinina seja realizado somando-se os teores de ácido dihidroartemisínico e da artemisinina (WALLAART *et al*, 1999a; LOMMEN *et al*, 2006). Neste sentido, pouca atenção tem sido despendida na análise conjunta desses bioprecusores e da artemisinina.

GUPTA e colaboradores (1994) avaliaram as concentrações de artemisinina e de dois sesquiterpenos intermediários (ácido artemisínico e arteanuína B), em diferentes clones de *A. annua*. A artemisinina mostrou maior teor, na floração plena, para todos os clones, enquanto que o maior teor de precursoros ocorreu na pré-floração, seguido daquele na floração plena.

Em outro estudo, KAWAMOTO e colaboradores (1999) avaliaram a variação de artemisinina e dos precursoros ácido artemisínico, arteanuína B e artemisitenol. Os maiores teores de ácido artemisínico e de artemisinina foram constatados, durante a floração plena, entretanto, para os outros precursoros, ocorreram na fenofase de pré-floração.

QUADRO 1 - Sesquiterpenos encontrados em *Artemisia annua* L.

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
artemisinina (<i>qinghaosu</i>)		-	Coordinating Group for Research on the Structure of Qing Hau Sau, 1977 KASYMOV <i>et al</i> , 1986
	(1)	partes aéreas	KLAYMAN <i>et al</i> , 1984
		cultura de tecidos	NAIR <i>et al</i> , 1986
(1'S) <i>cis</i> -2-[2',2'-dimetil-3'-(3''-butanon-1''-il)-ciclopropil]-2-ciclopenten-1-ona		flores	OLIVEIRA <i>et al</i> , 1997
	(2)		
1-oxo-2β-[3-butanona]-3α-metil-6β-[2-ácido-propanóico]-ciclohexano		sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
	(3)		

QUADRO 1 – continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
1-oxo-2β-[3-butanona]-3α-metil-6β-[2-propanol formil ester]-ciclohexano	<p>(4)</p>		
1α-aldeído-2β-[3-butanona]-3α-metil-6β-[2-ácido propanóico]-ciclohexano	<p>(5)</p>	sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
1β,6α-dihidroxi-4(15)-eudesmano	<p>(6)</p>		
1β-hidroxi-4 (15), 5E,10(14)-germacratrieno	<p>(7)</p>		

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
1 β -hidroxi-4-(15),7-eudesmadieno	(9)	sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
3-isobutiril-cadin-4-en-11-ol	(10)	partes aéreas	AHMAD & MISRA, 1994
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
3 α ,5 β -dihidroxi-4 α ,11-epoxibisnorcadinano	(11)	idem	TEWARI & BHAKUNI, 2003
3 α ,7 α -dihidroxi amorf-4-eno 3-acetato	(12)	sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
3 α -hidroxi-4 α ,5 α -epoxi-7-oxo-(8[7→6]-abeo-amorfano	(13)	idem	idem

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
4 α , 5 α -epoxi-6 α -hidroxi amorfan-12-ol		sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
5 α -[3'(15'),7'(14'),11'(13')-trien]pentadecaniloxidihidroxiartenuina B		folhas	SINGH & BHAKUNI, 2004
5 α -hidroperoxi-eudesma-4(15), 11-dieno		sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
5 α -hidroxi-eudesma-4(15), 11-dieno		folhas	SY & BRONW, 1998
ácido 15-nor-10-hidroxi-amorfan-4-óico		sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
ácido 4 α .5 α -epoxi-6 α -hidroxi amorfan-12-óico		sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
ácido 6,7-dehidroartemisínico		folhas	EL-FERALY <i>et al</i> , 1989 SY, BROWN & HAYNES, 1998
ácido 6,7-dehidroartemisínico		idem	EL-FERALY <i>et al</i> , 1989
ácido abscísico		partes aéreas	SHUKLA <i>et al</i> , 1991
ácido artemisínico (ácido <i>qinghaosu</i> , ácido arteanuico)		folhas	ROTH & ACTON, 1987 SY, BROWN & HAYNES, 1998

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
ácido dihidroartemisínico (ácido 11,13-dihidroarteanuico)	(24)	folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998 WALLAART <i>et al</i> , 1999
ácido epoxiartemisínico (ácido epoxiarteanuico)	(25)	idem	WU <i>et al</i> , 1984 SY, BROWN & HAYNES, 1998
ácido formil éster noranuico	(26)	sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
ácido metil éster abscísico	(27)	partes aéreas	SHUKLA <i>et al</i> , 1991
ácido metil éster artemisínico	(28)	folhas	SY & BROWN, 1998

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
ácido noranuico	(29)	partes aéreas	MISRA <i>et al</i> , 1993
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
ácido α -epoxi-dihidroartemisínico	(30)	sementes	BROWN <i>et al</i> , 2003
álcool arteanuico	(31)	folhas	ROTH & ACTON, 1987
		raiz	WOERDENBAG <i>et al</i> , 1993
anulídeo	(32)	partes aéreas	BROWN, 1993 SY & BROWN, 2001 b
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
arteanuina A (qinghaosu I)	(33)	partes aéreas	MISRA <i>et al</i> , 1993 AHMAD & MISRA, 1994
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
arteanuina B (<i>qinghaosu</i> II)	<p>(34)</p>	-	JEREMIC <i>et al</i> , 1973 STEFANOVIC <i>et al</i> , 1977
		folhas	ROTH & ACTON, 1989 SY, BROWN & HAYNES, 1998
arteanuina C	<p>(35)</p>	partes aéreas	MISRA, 1986
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
arteanuina D (<i>qinghaosu</i> IV)	<p>(36)</p>	-	TU <i>et al</i> , 1982
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
arteanuina E (<i>qinghaosu</i> V)	<p>(37)</p>	-	TU <i>et al</i> , 1982
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
arteanuina F (artemisilactona)	(38)	-	ZHU <i>et al</i> , 1984
arteanuina H	(39)		
arteanuina I	(40)		
arteanuina J	(41)	folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
arteanuina K	(42)		

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
arteanuina L	(43)	folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
arteanuina M	(44)		
arteanuina N	(45)		
arteanuina O	(46)		
artemisia dihidroxicadinolideo	(47)	partes aéreas	BROWN, 1994

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
artemisía secocadinano	(48)	partes aéreas	BROWN, 1994
artemisina	(49)	planta inteira	BHAKUNI <i>et al</i> , 2001 <i>apud</i> MENGAL <i>et al</i> , 1994
artemisinina G	(50)	folhas	WEJ <i>et al</i> , 1992
artemisinol	(51)		SY, BROWN & HAYNES, 1998
artemisitenol	(52)	-	ACTON & KLAYMAN, 1985
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
cadin-4(15),11-dien-9-ona	(53)	partes aéreas	AHMAD & MISRA, 1994
cadin-4,7(11)-dien-12-al	(54)	folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
dehidroartemisinina	(55)	partes aéreas	ACTON & KLAYMAN, 1985
desoxiarteanuína B	(56)	partes aéreas	SY & BROWN, 2001b
desoxiartemisinina (desoxiarteanuína, qinghaosu III)	(57)	folhas	ZHENG, 1994 SY, BROWN & HAYNES, 1998

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
dihidroarteanuína B		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
dihidro-desoxiarteanuína B		partes aéreas	SY & BROWN, 2001b
dihidro-epidesoxiarteanuína B		partes aéreas	BROWN, 1992 SY & BROWN, 2001 b
epidesoxiarteanuína B		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998
		planta inteira	ROTH & ACTON, 1987
		partes aéreas	BROWN, 1992 SY & BROWN, 2001b

QUADRO 1 - continuação

Sesquiterpeno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
isoanulídeo	(62)	partes aéreas	BROWN, 1993 SY & BROWN, 2001 b
		folhas	SY, BROWN & HAYNES, 1998

.-): Órgão não especificado

2.2.1.2 Compostos fenólicos

2.2.1.2.1 Flavonóides

A. annua também é rica fonte de outros produtos naturais, como os compostos fenólicos, principalmente flavonóides. Dentre eles, algumas agliconas são majoritárias, como: crisosplenol-D (0,1%, m/m) **(98)**, artemetina (0,074% , m/m) **(88)**, crisoplenetina (0,035%, m/m) **(97)**, eupatorina (0,019%, m/m) **(76)**, cirsilineol (0,006%, m/m) **(73)** e casticina (0,004%, m/m) **(95)** (ELFORD *et al*, 1987; LIU *et al*, 1989; SHILIN *et al*, 1989; MARCO *et al*, 1990; ZHENG, 1994; YANG *et al*, 1995), estando presentes, principalmente, nas partes aéreas do vegetal.

Outras agliconas foram encontradas na espécie, como: apigenina **(65)**, canferol **(93)**, quercetina **(119)**, luteolina **(77)**, isoramnetina **(105)**, 7-metil-éter-luteolina **(79)**, assim como os glicosídeos: 3-ramnoglicosídeo da quercetina [rutina **(122)**], 7-O-glicosídeo da luteolina **(78)** e os 3-O-glicosídeos de canferol **(87)**, quercetina **(121)** e patuletina **(112)** (MARCO *et al*, 1990; YANG *et al*, 1995; BHAKUNI *et al*, 2001; LAI *et al*, 2007), totalizando 67 flavonóides **(Quadro 2)**.

QUADRO 2 - Flavonóides encontrados em *Artemisia annua* L.

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
FLAVONAS			
2',4',5'-trihidroxí-6,7,5'-trimetoxi-flavona	<p>(63)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989
2',4',5'-trihidroxí-6,7-dimetoxi-flavona	<p>(64)</p>		
apigenina	<p>(65)</p>	partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990
		folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995
		folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
6-C-arabnosil-8-C-glicosil-apigenina	<p>(66)</p>	-	HAN <i>et al</i> , 2008
6-C-glicosil-8-C-arabnosil-apigenina (eschaftosídeo)	<p>(67)</p>		

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
6-C-glicosil-8-C-pentosil-apigenina	<p>(68)</p>		
6-C-glicosil-8-C-ramnosil-apigenina	<p>(69)</p>		
6-C-pentosil-8-C-glicosil-apigenina	<p>(70)</p>	-	HAN <i>et al</i> , 2008
6-C-ramnosil-8-C-glicosil-apigenina	<p>(71)</p>		
6,8-di-C-glicosil-apigenina (vicenina-2)	<p>(72)</p>		

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
cirsilineol	<p>(73)</p>		
cirsimaritina	<p>(74)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989
crisoeriol	<p>(75)</p>		
eupatorina (3', 5-dihidroxi-6, 7, 4'-trimetoxiflavona)	<p>(76)</p>	-	HAN <i>et al</i> , 2008
luteolina	<p>(77)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989 YANG <i>et al</i> , 1995
		folhas	LAI <i>et al</i> , 2007

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
7-O-glicosil-luteolina (cinarosídeo)	<p>(78)</p>	partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990 YANG <i>et al</i> , 1995
7-metil-éter-luteolina	<p>(79)</p>		
piloína	<p>(80)</p>	folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
vitexina	<p>(81)</p>	-	HAN <i>et al</i> , 2008
FLAVONÓIS			
3-hidroxi-6,7,4'-trimetoxi-flavona	<p>(82)</p>	-	HAN <i>et al</i> , 2008

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3,3',5-trihidroxí-4',6,7-trimetoxi-flavona	<p>(83)</p>	-	LIU <i>et al</i> , 1980
3,5-dihidroxí-3',4',6,7-tetrametoxi-flavona	<p>(84)</p>	partes aéreas	MISRA, 1986
5-hidroxí-3,4',6,7-tetrametoxi-flavona	<p>(85)</p>	idem	TU <i>et al</i> , 1985
4',5,5'-trihidroxí-3,5,6,7-tetrametoxi-flavona	<p>(86)</p>	-	YANG <i>et al</i> , 1988
3-O-glicosil-6-metoxi-canferol	<p>(87)</p>	partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
artemetina (5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxi-flavona, 3,6,7,3',4'-pentametil-éter-quercetagetina)	<p>(88)</p>	-	TU <i>et al</i> , 1985
		partes aéreas	MISRA, 1986 MARCO <i>et al</i> , 1990 NIKOLOVA <i>et al</i> , 2004
		folhas	ZHENG, 1994 PHAM, 2002
astragalina (3-O-glicosil-canferol)	<p>(89)</p>	partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990
		folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995
axilarina (3,6-dimetil-éter-quercetagetina)	<p>(90)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989
		partes aéreas	NIKOLOVA <i>et al</i> , 2004

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3-O-glicosil-axilarina	<p>(91)</p>	idem	MARCO <i>et al</i> , 1990
canferideo	<p>(92)</p>	folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
canferol	<p>(93)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989 YANG <i>et al</i> , 1995
3,7-dimetil-éter-canferol	<p>(94)</p>	partes aéreas	NIKOLOVA <i>et al</i> , 2004
casticina	<p>(95)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989
(3,6,7,4'-tetrametil-éter-quercetagina)		partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990 NIKOLOVA <i>et al</i> , 2004
		-	HAN <i>et al</i> , 2007

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
cirsiliol	<p>(96)</p>	<p>folhas e caules</p> <p>folhas</p>	<p>SHILIN <i>et al</i>, 1989</p> <p>LAI <i>et al</i>, 2007</p>
crisoplenetina	<p>(97)</p>	<p>folhas e caules</p> <p>partes aéreas</p> <p>folhas</p>	<p>SHILIN <i>et al</i>, 1989</p> <p>BROWN, 1992 SY & BROWN, 1998</p> <p>PHAM, 2002 LAI <i>et al</i>, 2007</p>
crisosplenol		-	TU <i>et al</i> , 1982
(crisosplenol D, 3,6,7-trimetil-éter-quercetagina)	<p>(98)</p>	<p>partes aéreas</p> <p>folhas e caules</p> <p>folhas</p>	<p>MISRA, 1986</p> <p>MARCO <i>et al</i>, 1990 NIKOLOVA <i>et al</i>, 2004</p> <p>SHILIN <i>et al</i>, 1989</p> <p>PHAM, 2002 LAI <i>et al</i>, 2007</p>

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3'-metoxi-crisosplenol	<p>(99)</p>	partes aéreas	MISRA, 1986
crisosplenol-C	<p>(100)</p>	folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
isocanferideo	<p>(101)</p>	folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995
isocrisosplenol-C	<p>Isômero: crisosplenol-C (102)</p>	folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
isocrisosplenol-D	<p>(103)</p> <p>Isômero: crisosplenol</p>		

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
isoquercetrina	<p>(104)</p>	folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995
		folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
isoramnetina	<p>(105)</p>	partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990
		folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995
3-O-glicosil-isoramnetina	<p>(106)</p>		
3-O-glicosil-laricitina	<p>(107)</p>	folhas	LAI <i>et al</i> , 2007

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3-O-glicosil-meamestetina	<p>(108)</p>	folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
di-glicosil-meamestetina	<p>(109)</p>	-	HAN <i>et al</i> , 2008
pachipodol (3,7,3'-trimetil éter-quercetina)	<p>(110)</p>	idem	SY & BROWN, 1998 ^a
patuletina	<p>(111)</p>	partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990
3-O-glicosil-patuletina	<p>(112)</p>		

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
penduletina (6-hidroxi-3,6,7-trimetil-éter-canferol)	<p>(113)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989
3-metil-éter quercetagetina	<p>(114)</p>	idem	MARCO <i>et al</i> , 1990
3,4'-dimetil-éter quercetagetina	<p>(115)</p>	idem	SHILIN <i>et al</i> , 1989
6,7,3',4'-tetra-O-metil éter quercetagetina	<p>(116)</p>	planta inteira	DJERMANOVIC' <i>et al</i> , 1975
4'-metil-éter quercetagetina	<p>(117)</p>	folhas	ZHENG, 1994
		folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
4',6,7-trimetil-éter quercetagetina	<p>(118)</p>	-	LIU <i>et al</i> , 1981
quercetina	<p>(119)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989 YANG <i>et al</i> , 1995
		folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
3-metil éter-quercetina	<p>(120)</p>	folhas e caules	SY & BROWN, 1998
3-O-glicosil-quercetina	<p>(121)</p>	partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990
		folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995
		folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
		-	HAN <i>et al</i> , 2008

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3-ramnoglicosil-quercetina (rutina)	<p>(122)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989
		partes aéreas	MARCO <i>et al</i> , 1990
		-	HAN <i>et al</i> , 2008
quercimeritrina	<p>(123)</p>	folhas e caules	YANG <i>et al</i> , 1995
ramnetina	<p>(124)</p>	idem	SHILIN <i>et al</i> , 1989
3-O-glicosil- ramnetina	<p>(125)</p>	folhas	LAI <i>et al</i> , 2007
ramnocitrina	<p>(126)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989

QUADRO 2 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
retusina	<p>(127)</p>	partes aéreas	SY & BROWN, 1998
tamarixetina	<p>(128)</p>	folhas e caules	SHILIN <i>et al</i> , 1989
.(-): Órgão não especificado			

2.2.2 *Bidens pilosa* L.

Nos estudos fitoquímicos de *B. pilosa*, verificou-se a presença de compostos das classes dos flavonóides (auronas, chalconas e antocianinas), acetilenos, monoterpênicos, diterpenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas, taninos, saponinas, alcalóides, esteróides, ácido ascórbico e açúcares nos diversos órgãos desta espécie (HOFFMANN & HÖLZL, 1988a,b; HOFFMANN & HÖLZL, 1989; GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991; OGAWA & SASHIDA, 1992; ZULUETA *et al*, 1995; ALVAREZ *et al*, 1996; WANG *et al*, 1997; BRANDÃO *et al*, 1997, 1998; ALVAREZ *et al*, 1999; SARKER *et al*, 2000; VALDÉS & REGO, 2001; ABAJO *et al*, 2004; ZHAO *et al*, 2004; CHIANG *et al*, 2007).

2.2.2.1 Compostos fenólicos

2.2.2.1.1 Flavonóides

Diversos flavonóides (agliconas e glicosídeos) têm sido isolados a partir dos diferentes órgãos de *B. pilosa* (HOFFMANN & HÖLZL, 1988a,b; HOFFMANN & HÖLZL, 1989; GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991; WANG *et al*, 1997; BRANDÃO *et al*, 1998; SARKER *et al*, 2000; CHIANG *et al*, 2007), sendo que entre eles as chalconas da ocanina (**158-173**) estão presentes nas folhas, flores e partes aéreas da espécie. As flavonas também ocorrem como a apigenina (**129**) e a luteolina (**133**), bem como os seus glicosídeos correspondentes (**Quadro 3**).

QUADRO 3 - Flavonóides encontrados em *Bidens pilosa* L.

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
FLAVONAS			
apigenina	(129)		
7-O-glicosil-apigenina	(130)	partes aéreas	GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991
5-O-metilhoslundina	(131)	idem	SARKER <i>et al</i> , 2000
7-O-β-D-(2'', 4'', 6''-diacetil)-glicopiranosil-iso-ocanina	(132)	idem	WANG <i>et al</i> , 1997
luteolina	(133)	idem	ZHAO <i>et al</i> , 2004

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3-O- β -D-glicosil-luteolina	<p>(134)</p>	partes aéreas	GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991
7-O- β -D-glicosil-luteolina	<p>(135)</p>		
FLAVONÓIS			
astragalina	<p>(136)</p>	partes aéreas	ZHAO <i>et al</i> , 2004
centaureidina	<p>(137)</p>	planta inteira	CHANG <i>et al</i> , 2007
centaureína	<p>(138)</p>	idem	CHIANG <i>et al</i> , 2004 CHANG <i>et al</i> , 2007

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
isoquercitrina	<p>(139)</p>	partes aéreas	ZHAO <i>et al</i> , 2004
jaceína	<p>(140)</p>	planta inteira	CHIANG <i>et al</i> , 2004
quercetina	<p>(141)</p>	partes aéreas	ZHAO <i>et al</i> , 2004
3,3'-dimetil éter 7-O- α -L-ramnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosil-quercetina	<p>(142)</p> <p>R= α-L-ramnopyranosil-(1$\rightarrow$6)-β-D-glicopiranosídeo</p>	raízes	BRANDÃO <i>et al</i> , 1998
3,3'-dimetil éter 7-O- β -D-glicopiranosil-quercetina	<p>(143)</p>		

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3-O- β -D galactopiranosil-quercetina (3-O- β -D galactosil-quercetina)	(144)		
3-O- β -D glicosil-quercetina	(145)	partes aéreas	GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991
3-O- β -D glicuronopiranosil-quercetina	(146)		
3-O-rabinobiosil-quercetina	(147)	planta inteira	CHIANG <i>et al</i> , 2004
3-O-ramnoglicosil-quercetina (rutina)	(148)	partes aéreas	ZHAO <i>et al</i> , 2004

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3,4'-dimetil éter-7-O-rutinosil-quercetina	<p>(149)</p>	partes aéreas	WANG <i>et al</i> , 1997 ZHAO <i>et al</i> , 2004
AURONAS			
(Z)-6-O-(3'',4'',6''-triacetil-β-D-glicopiranosil)-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona	<p>(150)</p>	partes aéreas	WANG <i>et al</i> , 1997 ZHAO <i>et al</i> , 2004
(Z)-6-O-(6-O-p-cumaroil-β-D-glicopiranosil)-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona	<p>(151)</p>	folhas	SASHIDA <i>et al</i> , 1991
(Z)-6-O-β-D-glicopiranosil-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona	<p>(152)</p>		

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
(Z)-7-O- β -D-glicopiranosil-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona	(153)	folhas	SASHIDA <i>et al</i> , 1991
2'',4'',6''-triacetilmaritimeína	(154)	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1989b
4'',6''-diacetilmaritimeína	(155)		
6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona (maritimeína)	(156)		
sulfuretina	(157)	partes aéreas	ZHAO <i>et al</i> , 2004

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
CHALCONAS			
(Z)-6-O-(4",6"-diacetil-β-D-glicopiranosil)-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona	<p>(158)</p>	partes aéreas	WANG <i>et al</i> , 1997 ZHAO <i>et al</i> , 2004
(Z)-6-O-(6"-acetil-β-D-glicopiranosil)-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona	<p>(159)</p>	folhas	SASHIDA <i>et al</i> , 1991
buteína	<p>(160)</p>	partes aéreas	ZHAO <i>et al</i> , 2004
3',4'-di-O-β-D-glicosil-ocanina	<p>(161)</p>	flores	HOFFMANN & HÖLZL, 1989a
3'-O-β-D-glicosil-ocanina	<p>(162)</p>	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1988a HOFFMANN & HÖLZL, 1988b
		flores	HOFFMANN & HÖLZL, 1989a

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
4'-O- β -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosil]-ocanina	<p>(163)</p>	flores	HOFFMANN & HÖLZL, 1989a
4'-O- β -D-(2'',4'',6''-triacetil)-glicosil-ocanina	<p>(164)</p>	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1988a
4'-O- β -D-(2'',4''-diacetil-6''-trans-p-cumaroil)-glicosil-ocanina	<p>(165)</p>	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1988c
4'-O- β -D-(3'',4'',6''-triacetil)-glicopiranosil-ocanina	<p>(166)</p>	partes aéreas	WANG <i>et al</i> , 1997
4'-O- β -D-(3'',4''-diacetil-6''-trans-p-cumaroil)-glicosil-ocanina	<p>(167)</p>	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1988c

QUADRO 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
4'-O-β-D-(4'',6''-diacetil)-glicopiranosil-ocanina	<p>(168)</p>	partes aéreas	WANG <i>et al</i> , 1997
4'-O-β-D-(4''-acetil-6''- <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosil-ocanina	<p>(169)</p>	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1988c
4'-O-β-D-(6''-O-acetilglicosil)-ocanina	<p>(170)</p>	flores	HOFFMANN & HÖLZL, 1989a
4'-O-β-D-(6''- <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosil-ocanina	<p>(171)</p>	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1988a
4'-O-β-D-glicosil-ocanina	<p>(172)</p>	idem	HOFFMANN & HÖLZL, 1988a
		flores	HOFFMANN & HÖLZL, 1989a

Quadro 3 - continuação

Flavonóide	Estrutura	Parte vegetal	Referência
4-metil éter-3'-O-β-D-glicosil-ocanina	(173)	folhas	HOFFMANN & HÖLZL, 1988b
		partes aéreas	ZHAO <i>et al</i> , 2004

2.2.2.2 Derivados de ácidos graxos

2.2.2.2.1 Acetilenos

Os compostos acetilênicos são metabólitos secundários muito freqüentes em *B. pilosa* (TOWERS & WAT, 1978; WAT *et al*, 1979; ARNASON *et al*, 1980; N'DOUNGA *et al*, 1983; PAIZ *et al*, 1989; CANTONWINE & DOWNUM, 2001; GROMBONE-GUARATINI *et al*, 2005). Foram encontrados, em todos os órgãos da planta, principalmente, nas partes aéreas e o principal representante da classe é fenil-heptatriino (PHT) (**185**), um poliacetileno, presente em maior abundância nas folhas e caules

QUADRO 4 – Poliacetilenos encontrados em *Bidens pilosa* L.

Acetileno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
1,2-dihidroxi-5(E)-trideceno-7,9,11-triino	(174)	planta inteira	WU <i>et al</i> , 2007
1,2-dihidroxitrideca-5,7,9,11-tetraino	(175)	idem	WU <i>et al</i> , 2004 WU <i>et al</i> , 2007
1,3-dihidroxi-6(E)-tetradeceno-8,10,12-triino	(176)	idem	YANG <i>et al</i> , 2006
1,3-dihidroxi-6(E)-tetradeceno-8,10,12-triino	(177)	idem	WU <i>et al</i> , 2004 WU <i>et al</i> , 2007
1-fenilhepta-1,3-diin-5-eno (fenilheptadiineno)	(178)	caule	TOWERS & WAT, 1978

QUADRO 4 - continuação

Acetileno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
2-O-β-D-glicosiltrideca-11E-em-3,5,7,9-tetrain-1,2-diol	(179)	folhas	PEREIRA <i>et al</i> , 1999
2-β-D-glicopiranosiloxi-1-hidroxi-5(E)-trideceno-7,9,11-triino	(180)	partes aéreas	UBILLAS <i>et al</i> , 2000
		planta inteira	CHANG <i>et al</i> , 2004 YANG <i>et al</i> , 2006
2-β-D-glicopiranosiloxi-1-hidroxitrideca-5,7,9,11-tetraino (citopiloine)	(181)	idem	CHIANG <i>et al</i> , 2007 CHANG <i>et al</i> , 2007
3-β-D-glicopiranosiloxi-1-hidroxi-6(E)-tetradeceno-8,10,12-triino	(182)	partes aéreas	UBILLAS <i>et al</i> , 2000
		planta inteira	ALVAREZ <i>et al</i> , 1996 CHANG <i>et al</i> , 2004 YANG <i>et al</i> , 2006
7-fenilhepta-2,4,6-triino-1-il-acetato	(183)	-	VALDÉZ & REGO, 2001

QUADRO 4 - continuação

Acetileno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
7-fenilhepta-2,4,6-triino-1-ol		-	VALDÉZ & REGO, 2001 (184)
7-fenilhepta-2,4,6-triino (fenilheptatriino)		folhas folhas, flores e aquênios	TOWERS & WAT, 1978 WAT <i>et al</i> , 1979 N'DOUNGA <i>et al</i> , 1983 (185)
7-fenilhepta-4,6-diin-2-en-1-il-acetato (fenilacetileno)		raízes	KRETLI <i>et al</i> , 2001 BRANDÃO <i>et al</i> , 1997 KRETLI <i>et al</i> , 2001 OLIVEIRA <i>et al</i> , 2004 (186)
heptadeca-2E,8E,10E,16-tetraen-4,6-diino	----	-	WANG <i>et al</i> , 2005 (187)
selina-3,7(11)-dieno	----	folhas	GROMBONE-GUARATINI <i>et al</i> , 2005 (188)
trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino		-	VALDÉZ & REGO, 2001 (189)

QUADRO 4 - continuação

Acetileno	Estrutura	Parte vegetal	Referência
trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino-13-acetato	(190)		
trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino-13-al	(191)		
trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino-13-ol	(192)		
trideca-1,3,11-trien-5,7,9-triin-13-ol	(193)	-	VALDÉZ & REGO, 2001
trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino	(194)		

(-): Órgão não especificado

(---): Estrutura química não encontrada

2.3 Usos tradicionais e estudos farmacológicos de *A. annua* e *B. pilosa*

2.3.1 Usos tradicionais como antiprotozoário

A. annua

A. annua tem sido usada, no tratamento de febres e calafrios, há mais de 2.000 anos, na China (HIEN & WHITE, 1993). Em 1596, Li Shizhen descreveu o seu uso no preparo de bebida usada no tratamento de malária, no *Compendium of Treatments (Ben Cao Gang Mu)* e com base no método descrito por Ge Hong (ano de 340). Atualmente, a espécie encontra-se incluída na Farmacopéia Chinesa, com semelhante indicação de uso (HSU, 2006).

B. pilosa

B. pilosa igualmente integra a lista de plantas usadas tradicionalmente, em parasitoses. Na África, o suco obtido do cozimento das raízes é empregado na malária (N'DOUNGA *et al*, 1983; GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991 *apud* KOKWARO, 1976).

Na região amazônica, raízes e partes aéreas de diferentes espécies do gênero *Bidens* são utilizadas no tratamento de malária e em complicações do fígado resultantes da doença (KRETTLI *et al*, 2001).

2.3.2 Outros usos

A. annua

O óleo essencial extraído das folhas e inflorescências de *A. annua* é comercializado na Índia como aromatizante, em perfumaria e cosmética. Apresenta sabor amargo, aroma doce e refrescante e odor típico de gramínea com nuances de cânfora (AHMAD & MISRA, 1994; JAIN *et al*, 1996; FOGLIO, 1996).

Há séculos, *A. annua* vem sendo empregada na medicina tradicional chinesa e indiana em surtos de febre, bem como no lúpus eritematoso (LORENZI & MATOS, 2002).

B. pilosa

B. pilosa é amplamente utilizada na medicina popular. Na África, preparações aquosas da planta são usadas no tratamento de dores estomacais (FREISE, 1933), constipação, verminoses intestinais (GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991 *apud* KOKWARO, 1976), diarréias e cólicas (N'DOUNGA *et al*, 1983; RABE & van STADEN, 1997 *apud* WATT & BREYER-BRANDWIJK, 1962; MINAMI & OLIVEIRA, 1986). O suco da planta é aplicado em queimaduras e cortes (ASPREY & THORNTON, 1953; HAERDI, 1964) ou usado para tratar conjuntivites (HAERDI, 1964; AMICO, 1977), otites e aftas bucais (WAT *et al*, 1980). Os brotos da planta são utilizados contra o reumatismo, pelo povo Zulu (GEISSBERGER & SÉQUIN, 1991 *apud* WATT & BREYER-BRANDWIJK, 1962).

Na medicina tradicional chinesa, *B. pilosa*, é também conhecida e utilizada contra enterites, diarréias e faringites (WONG-LEUNG, 1988). A planta fresca e o decocto são usados em feridas e úlceras crônicas (WAT *et al*, 1980 *apud* CHIANG-SU, 1977).

Nas ilhas da América Central, utiliza-se o suco da planta contra irritações nos olhos e feridas (ELDRIDGE, 1975). No Brasil a erva é considerada emoliente, sendo empregada, principalmente, em blenorragias, leucorréias, diabetes, problemas do fígado e infecções urinárias, vaginais (LORENZI & MATOS, 2002) e, assim como na Venezuela, no tratamento de úlcera gástrica (FREISE, 1933).

Os indígenas da região amazônica fazem uso, também, como diurético, emenagogo, antidiarréico, em icterícia e febres causadas por rubéola e escarlatina (LORENZI & MATOS, 2002). Em Cuba, há indicações de uso como agente antiinflamatório, em hepatites, laringites e desordens digestivas (LASTRA *et al*, 2001).

Há relatos, na África, do uso das folhas, na alimentação (LINDSEY *et al*, 2002).

2.3.3 Estudos relativos à atividade antileishmania

2.3.3.1 *A. annua*

De acordo com TAN *et al* (1998), muitas espécies de *Artemisia* têm sido investigadas quanto à atividade antiprotozoária. Algumas delas apresentaram atividade *in vitro* contra as formas promastigotas de *Leishmania*,

entretanto, não se tem conhecimento de estudos similares realizados, especificamente, com *A. annua*.

HATIMI *et al* (2001) verificaram que o infuso (4 µg/mL) e o óleo essencial (2 µg/mL) das partes aéreas secas de *A. herba-alba* Asso., levaram à morte das formas promastigotas de *L. tropica* e *L. major* (HATIMI *et al*, 2001).

Outra espécie de *Artemisia*, *A. indica* Willd., foi recentemente testada quanto à atividade antileishmania *in vitro* por GANGULY *et al* (2006) Os autores determinaram concentração inibitória de 50% (CI₅₀) das formas promastigotas de sete espécies do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos de três formas da doença, para o extrato etanólico de folhas secas tendo obtido os seguintes resultados: *L. donovani* (CI₅₀: 210 µg/mL), *L. amazonensis* (CI₅₀: 290 µg/mL), *L. tropica* (CI₅₀: 330 µg/mL), *L. mexicana* (CI₅₀: 340 µg/mL), *L. infantum* (CI₅₀: 390 µg/mL), *L. major* (CI₅₀: 430 µg/mL) e *L. braziliensis* (CI₅₀: 580 µg/mL) (GANGULY *et al*, 2006).

2.3.3.2 *B. pilosa*

Para *B. pilosa*, igualmente, não foram encontrados estudos relacionados à avaliação da atividade antileishmania, até o presente trabalho.

2.3.3.3 Classes de metabólitos e mecanismos de ação antiprotozoária

Entre os metabólitos de origem vegetal, que mostraram atividade antileishmania, enumeram-se os: sesquiterpenos, flavonóides e derivados de ácidos graxos, como os poliacetilenos, sendo que diversos compostos pertencentes a estas classes, foram encontrados em *A. annua* e *B. pilosa* (item 2.2).

2.3.3.3.1 Sesquiterpenos

Estudos com espécies da família Asteraceae revelaram a ação inibitória das sesquiterpeno-lactonas frente às diferentes espécies de *Leishmania* (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRIGUEZ, 2001), incluindo-se a artemisinina (YANG & LIEW, 1993; AVERY *et al*, 2003; MISHINA *et al*, 2007; LEZAMA-DÁVILA *et al*, 2007; SEN *et al*, 2007).

Artemisinina

Estudos de YANG & LIEW (1993) mostraram a atividade da artemisinina sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. major*.

As doses efetivas para a morte de 50% das formas promastigotas de *L. major* foram de 75 μM para a artemisinina e de 3 μM , contra as amastigotas em macrófagos infectados (YANG & LIEW, 1993), em ensaios de 48h.

Outras espécies de *Leishmania* foram testadas. Artemisinina apresentou concentração inibitória de 50% (CI_{50}) de 124 μM frente às formas promastigotas de *L. donovani* transgênica, para ensaio de 72h (AVERY *et al*, 2003). Nos ensaios de MISHINA *et al* (2007), a CI_{50} de artemisinina foi de 30,8 μM nas formas promastigotas de *L. donovani* (incubação de 72h).

Estudos *in vitro*, com amastigotas de *L. mexicana*, mostraram alteração significativa na morfologia parasitária, redução da massa corporal e da mobilidade e morte, após 96h, à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de artemisinina. (LEZAMA-DÁVILA *et al*, 2007).

Nos ensaios de SEN *et al* (2007), a artemisinina foi testada frente às formas promastigotas (*in vitro*, 48h) (CI_{50}) e amastigotas (*ex vitro*, 48h) de *L. donovani*, tendo apresentado CI_{50} , respectivamente, de: 160 e 22 μM . Além disto, a concentração citotóxica de 50% em células de macrófagos peritoniais foi maior que 0,5 mM. Os autores também demonstraram que a atividade antileishmania da artemisinina é mediada via apoptose, em função da externalização de fosfatidil-serina e diminuição do potencial da membrana mitocondrial.

2.3.3.3.2 Flavonóides

Estudos evidenciaram a ação antileishmania de flavonóides.

Em testes *in vitro*, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (24h), TALEB-CONTINI *et al* (2004) observaram que a quercetina (CI_{50} 123,50 $\mu\text{g/mL}$), além de: 3,6-dimetoxi quercetagina (CI_{50} 174,70 $\mu\text{g/mL}$) e 3-metoxi quercetina (CI_{50} 87,87 $\mu\text{g/mL}$). Inibiram os parasitas.

Nos testes *in vitro*, realizados por TASDEMIR *et al* (2006), em formas amastigotas de *L. donovani* (72h) e em células tumorais mamárias, as concentrações inibitórias de 50% e citotóxicas de 50%, respectivamente, indicaram entre os compostos mais ativos: fisetina (CI_{50} 0,6 $\mu\text{g/mL}$; CC_{50} 38,5

$\mu\text{g/mL}$), 3-hidroxi-flavona (CI_{50} 0,7 $\mu\text{g/mL}$; CC_{50} 14,4 $\mu\text{g/mL}$) e luteolina (CI_{50} 0,8 $\mu\text{g/mL}$; CC_{50} 9,4 $\mu\text{g/mL}$). Os valores de CI_{50} foram comparáveis 'aqueles da miltefosina (CI_{50} 0,34 $\mu\text{g/mL}$). A quercetina mostrou atividade antileishmania promissora (CI_{50} 1,0 $\mu\text{g/mL}$; CC_{50} 37,1 $\mu\text{g/mL}$). Os flavonóides mais potentes mostram-se inativos frente às formas amastigotas de *L. donovani in vivo*, porém a quercetina (15,39%) levou à inibição da infecção.

Em pesquisa sobre o mecanismo de ação da quercetina, SEN *et al* (2008) verificaram que o grupo catecol (anel B) e grupo 3-hidroxi (anel C) interagem com íons metálicos, como o Fe^{+3} do grupo heme, formando quelatos e impedindo a replicação do parasita.

2.3.3.3 Poliacetilenos

Os poliacetilenos são conhecidos pela sua atividade antiprotozoária. RASMUSSEN *et al* (2000) avaliaram a atividade *in vitro* do ácido minquartinóico (**Figura 6**) contra as formas promastigotas de *L. major* (18h), (CI_{50} : 1,4 $\mu\text{g/mL}$). Os autores atribuíram a atividade verificada à toxicidade dos poliacetilenos. (RASMUSSEN *et al*, 2000).

FIGURA 6 – Estrutura química de ácido minquartinóico

2.4 Aspectos botânicos

2.4.1 Generalidades

2.4.1.1 Família Asteraceae (Compositae)

A família Asteraceae apresenta o maior número de representantes do grupo das Dicotiledôneas, compreendendo 1.535 gêneros e 23.000 espécies descritos (8-10% das Angiospermas) (CRONQUIST, 1981; TAKHTAJAN, 1987; CRONQUIST, 1988; HEYWOOD, 1993; BHATTACHARYYA, 1998; JUDD, 2002; PRUSKI & SANCHO *in*: SMITH *et al*, 2004; SIMPSON, 2006). A maioria de seus membros é constituída de arbustos verdes, subarbustos ou de ervas rizomatosas perenes. Ocorrem, igualmente, na forma de vegetais anuais com raízes pivotantes (ou axiais) ou perenes e ervas anuais e bianuais.

Plantas de porte arbóreo, epífitas ou aquáticas são raras na família. Algumas espécies tropicais e montanhosas são ervas gigantes semelhantes às árvores (METCALFE & CHALK, 1950; CRONQUIST, 1977; CRONQUIST, 1981; HEYWOOD, 1993; BHATTACHARYYA, 1998; JUDD, 2002; PRUSKI & SANCHO *in*: SMITH *et al*, 2004; SIMPSON, 2006).

Muitas são escandentes, algumas são trepadeiras e outras suculentas, com folhas e caules carnosos (HEYWOOD, 1993; BHATTACHARYYA, 1998; SIMPSON, 2006).

A família possui distribuição cosmopolita, estando ausente no continente Antártico e melhor representada nas regiões temperadas e subtropicais em relação às florestas densas (CRONQUIST, 1981; CRONQUIST, 1988; HEYWOOD, 1993; VAVILOV, 1994; PRUSKI & SANCHO *in*: SMITH *et al*, 2004).

A América Latina é considerada um centro de diversidade de Asteraceae, sendo que, na América do Sul, em algumas regiões semi-áridas e na Patagônia, os representantes de Asteraceae correspondem a 20% da flora (CABRERA, 1978).

No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 180 gêneros e 3.000 espécies, estando distribuídos desde as regiões mais frias e úmidas, como as serras do Sudeste e Sul, até as áreas secas na região do semi-árido nordestino, sendo menos freqüentes em formações florestais (LING *In*: HIND, 1995).

Os representantes da família constituem importante fonte de alimentos, matérias-primas, medicamentos e plantas ornamentais. Entretanto ocorrem também entre eles ervas-daninhas e plantas tóxicas (METCALFE & CHALK, 1950; HEYWOOD, 1993; JUDD, 2002; BHATTACHARYYA, 1998; VAVILOV, 1994; PRUSKI & SANCHO *in*: SMITH *et al*, 2004; SIMPSON, 2006).

2.4.1.2 Gênero *Artemisia* L.

Artemisia L. é um dos maiores gêneros de Asteraceae. Possui mais de 349 espécies distribuídas, principalmente, na Ásia Central e Oriental e América do Norte, com menos representantes nesta área, embora o gênero também ocorra nas regiões norte, leste e sul da África, sul da Ásia Central, América do Sul, nas Ilhas do Pacífico e Oceania (**Figura 7**) (BREMER, 1994; LING, 1995; TORRELL *et al*, 1999).

FIGURA 7 – Distribuição geográfica mundial de espécies do gênero *Artemisia* L. (Missouri Botanical Garden, 2008).

As espécies deste gênero são caracterizadas como ervas anuais ou perenes, subarborescentes ou arbustivas com folhas lobadas ou dissecadas, raramente inteiras (BREMER, 1994).

Algumas apresentam uso medicinal, enquanto outras são usadas como ornamentais, alimentos e forrageiras em áreas pastoris (LING *in*: HIND *et al*, 1995; VAVILOV, 1994; TORRELL *et al*, 1999).

2.4.1.3 Gênero *Bidens* L.

O gênero *Bidens* L. apresenta cerca de 240 espécies e é representado por ervas ou subarborescentes anuais ou perenes e raros arbustos. Sua distribuição é cosmopolita, havendo maior concentração de espécies nas Américas do Norte e Sul (**Figura 8**) (KARIS & RYDING *in*: BREMER, 1994; NAKAJIMA, 2000; GROMBONE-GUARATINI *et al*, 2004).

FIGURA 8 – Distribuição geográfica mundial de espécies do gênero *Bidens* L. (Missouri Botanical Garden, 2008).

No Brasil, ocorrem treze espécies de *Bidens*, localizadas principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (LORENZI, 1991; NAKAJIMA, 2000), sendo muitas delas vistas como um estorvo nas áreas agrícolas, onde são combatidas com herbicidas, no entanto algumas também são utilizadas na medicina popular. Há ainda algumas espécies ornamentais (PENNA, 1946; BRANDÃO *et al*, 1985; KRETTLI *et al*, 2001; CARVALHO *et al*, 2004).

2.4.2 Sinonímia científica

***A. annua* L.**

O Missouri Botanical Garden (2008) cita apenas *Artemisia chamomilla* C. Winkl. como sinonímia de *A. annua*.

***B. pilosa* L.**

De acordo com Lorenzi & Matos (2002) e dados do Missouri Botanical Garden (2008), *B. pilosa* apresenta as seguintes sinonímias: *B. adhaerescens* Vell., *B. alausensis* Kunth, *B. alba* (L.) DC., *B. alba* var. *radiata* (Sch. Bip.) R.E. Ballard, *B. chilensis* DC., *B. hirsuta* Nutt., *B. leucantha* Meyen & Walp., *B. leucantha* fo *discoidea* Sch. Bip., *B. leucantha* var. *pilosa* (L.) Griseb., *B. leucanthema* (L.) Willd., *B. montaubani* Phil., *B. odorata* Cav., *B. pilosa* fo *discoidea* Sch. Bip., *B. pilosa* fo *indivisa* Sherff, *B. pilosa* var. *alausensis* (Kunth) Sherff, *B. pilosa* var. *minor* (Blume) Sherff, *B. pilosa* var. *pilosa*, *B. pilosa* var. *radiata* Sch. Bip., *B. pilosa* var. *radiata* (Sch. Bip.) J.A. Schmidt, *B. quadrangularis* DC., *B. reflexa* Link, *B. scandinavica* Kunth, *B. subalternans* DC., *B. sudaica* var. *minor* Blume, *B. sudaicus* Brume., *Centipeda minuta* (Less.) C.B.

Clarke, *C. orbicularis* Lour., *Coreopsis leucantha* L., *Kerneria dubia* Cass., *K. pilosa* (L.) Lowe, *K. pilosa* var *discoidea* (Sch. Bip.) Lowe, *K. tetragona* Moench. e *Myriogyne minuta* (G. Forst.) Less.

2.4.3 Sinonímia vulgar

***A. annua* L.**

No Brasil, *A. annua* L. é tida, como planta exótica medicinal e restrita às áreas de produção e melhoramento de variedades, possuindo poucos nomes populares, como: “losna-verde”, “Artemísia”, “artemísia-chinesa” e “artemisia-doce” (LORENZI & MATOS, 2002). Na China, Europa e América do Norte apresenta as seguintes denominações: *qing hao*, *annual wormwood*, *sweet wormwood*, *sweet Annie* (FERREIRA & JANICK, 1995; LORENZI & MATOS, 2002).

***B. pilosa* L.**

B. pilosa L. é conhecida, popularmente, como “picão-preto”, embora receba denominações variáveis segundo a região onde se encontra, tais como: “amor-seco”, “carrapicho”, “carrapicho-branco”, “carrapicho-de-agulha”, “carrapicho-de-duas-pontas”, “carrapicho-picão”, “coabu”, “coambi”, “coambu”, “cosmos”, “cuambri”, “cuambu”, “erva-picão”, “espinho-de-coambu”, “fura-capá”, “guambu”, “macela-do-campo”, “paconca”, “picão”, “picão-amarelo”, “picão-do-campo”, “picão-das-horas”, “picão-roxo”, “pico-pico”, “piolho-de-padre” e “piolho-de-praia” (PENNA, 1946; DUARTE & ESTELITA, 1999; LORENZI & MATOS, 2002).

2.4.4 Aspectos morfológicos

2.4.4.1 Família Asteraceae

De modo geral, os membros da família Asteraceae caracterizam-se por **folhas** de disposição alterna ou oposta, raramente verticilada, simples ou compostas, com limbo inteiro, lobado ou fendido, pecioladas ou sésseis. Estão distribuídas ao longo dos ramos, em rosetas basais ou ausentes e geralmente não apresentam estípulas. Os **indumentos** são variados, constituídos de tricomas pluricelulares unisseriados ou multisseriados compostos de células uniformes ou células basais e terminais modificadas. Geralmente, os tricomas tectores são simples, estrelados, malpighiáceos ou escamiformes. Também são comuns tricomas glandulares depressos na face abaxial das folhas e, neste caso, aparecem como pontos pretos, translúcidos ou estrias alongadas. Em algumas espécies, os tricomas glandulares e não-glandulares estão ausentes.

A **inflorescência** típica é o capítulo. Estes podem ser solitários ou agrupados em capitulescências, geralmente distintas umas das outras, mas ocasionalmente fundidas (gamossépala), formando supercapítulos. As **capitulescências** podem ser corimbiformes, paniculiformes, tirsóideo-paniculadas, racemiformes, espiciformes, fasciculadas, glomeruliformes ou até mesmo apresentar capítulos envoltos por involúcro secundário. Os **capítulos** são constituídos de muitas floretas tubulosas sésseis, que se inserem em um receptáculo, geralmente glabro, cercado de **brácteas** involucrais, designadas filárias, geralmente persistentes, podendo ser imbricadas e graduadas. As **floretas** possuem simetria radial (actinomorfa) ou bilateral (zigomorfa), sendo homógamas (único tipo de flor) ou heterógamas (com dois tipos de flores), sendo as mesmas bissexuais, unissexuais ou estéreis. Apresentam corola gamopétala, actinomorfa ou zigomorfa, pentâmera ou raramente tetrâmera, que pode ser glabra, pilosa ou glandulosa. O cálice mostra-se profundamente modificado, transformando-se em papo piloso ou espinhoso. O **androceu** é formado por cinco estames férteis com filetes livres e anteras bitecas, introrsas, soldadas, formando um cilindro, que é atravessado pelo estilete. O **gineceu** apresenta ovário ínfero, bicarpelar e unilocular, com um óvulo basal e anátropo. O **fruto** seco e indeiscente, do tipo aquênio, contém uma única semente sem endosperma e o embrião é ereto com cotilédones plano-convexos (CRONQUIST, 1981; JUDD, 2002; HEYWOOD, 1993; BHATTACHARYYA, 1998; PRUSKI & SANCHO *in*: SMITH *et al*, 2004; SIMPSON, 2006; SOUZA, 2007).

2.4.4.2 Gênero *Artemisia* L.

O gênero *Artemisia* é reconhecido por apresentar **folhas** dissecadas e **inflorescências** em capítulos disciformes, contendo floretas gamopétalas, geralmente formando longa panícula ou, algumas vezes, reduzida e racimosa, espiciforme ou subglobosa. O **receptáculo** plano a cônico pode ser piloso e encontra-se circundado por **brácteas** involucrais marginais e escariosas, translúcidas ou acastanhadas. As **floretas** femininas marginais são, geralmente, estreitas na parte superior, mostrando dois a quatro dentes, ou truncadas, comumente oblíquas no orifício. As floretas centrais perfeitas ou funcionalmente masculinas são amarelas ou algumas vezes arroxeadas. O apêndice apical das **anteras** difere de outros gêneros por ser lanceolado-linear a subulado. A **cipsela** é obovóide, de parede fina, com ou sem linhas de células mixogênicas, normalmente glabra e, ocasionalmente, pilosa. O papo não está presente (METCALFE & CHALK, 1950; BREMER, 1994; TORRELL, 1999).

***A. annua* L.**

A. annua é um arbusto anual que mede de 30 cm a 2,5 m, sendo que a altura depende de diversos fatores como: variedade, região de produção e condições agronômicas (LAUGHLIN *et al*, 2002 *apud* KEYS, 1976).

Folhas

Foram descritas de forma breve por alguns autores. As folhas são simples (MAGALHÃES *et al*, 1997) ou bipinadas (LAUGHLIN *et al*, 2002 *apud* KEYS, 1976), com disposição alterna, limbo pinasectado (MAGALHÃES *et al*, 1997) ou com segmento linear e denteado (LAUGHLIN *et al*, 2002 *apud* KEYS, 1976), membranáceas, pecioladas, com pontuações glandulosas e pêlos esparsos em ambas as faces (MAGALHÃES *et al*, 1997), embora tenham sido descritas como glabras por LAUGHLIN *et al*, 2002.

O limbo apresenta cerca de 5,0 a 9,0 cm de comprimento e de 3,0 a 5,0 cm de largura. O **pecíolo** possui cerca de 2,0 cm de comprimento (MAGALHÃES *et al*, 1997).

Capítulos florais

As flores têm disposição axilar e terminal, constituindo um rácemo composto de capítulos multifloros (FERREIRA & JANICK, 1995; LAUGHLIN *et al*, 2002 *apud* KEYS, 1976). Os capítulos pedicelados são pequenos, globosos e de cor amarela. Apresentam em média 12 floretas hermafroditas centrais e 12 floretas pistiladas marginais. O receptáculo glabro e em forma de cone achatado está delimitado por várias camadas de brácteas imbricadas (FERREIRA & JANICK, 1995), lineares, ovais-acuminadas a ovais (LAUGHLIN *et al*, 2002 *apud* KEYS, 1976). As floretas pistiladas e hermafroditas apresentam corolas tubulares simpétalas, com o ápice dividido em dois a três (FERREIRA & JANICK, 1995) ou quatro lóbulos (LAUGHLIN *et al*, 2002 *apud* KEYS, 1976) e cinco lóbulos (FERREIRA & JANICK, 1995). As floretas pistiladas são esverdeadas, com corola filiforme coberta por glândulas hialinas esparsas. O estilete apresenta ramos longos e ápice agudo. As floretas hermafroditas, de coloração amarelo-esverdeada, são constituídas de corola tubulosa e as anteras apresentam base obtusa e apêndice apical acuminado, enquanto o estilete possui ramos curtos truncados no ápice, com pêlos coletores nos bordos (FERREIRA & JANICK, 1995).

2.4.4.3 Gênero *Bidens* L.

As **folhas** aparecem pecioladas e com disposição oposta, raramente ocorrendo folhas superiores alternas. O limbo apresenta-se inteiro a pinatissectado, com margem denteada a serreada e trinérvea. Possui tricomas multiseptados, freqüentemente com base multicelular, dando às folhas a aparência de manchas brancas, o que é mais evidente em folhas velhas.

A **capitulescência** pode ser corimbiforme ou paniculiforme ou, ainda, os capítulos podem apresentar-se solitários, sendo terminais ou axilares. Os **capítulos** são pedunculados, heterógamos, radiados ou homógamos discóides. O **invólucro**, campanulado, seriado, apresenta brácteas involucrais imbricadas, livres e em número reduzido de fileiras. As **brácteas** externas são ovadas, lineares a oblanceoladas, membranáceas, híspidas, de margem glabra ou ciliada, enquanto as brácteas internas são ovadas a oblongas, membranáceas e de margem hialina. O **receptáculo** é plano ou subconvexo e paleáceo, com páleas estreitovadas escariosas. As **floretas** do raio, estéreis ou pistiladas, possuem corolas amarelas ou alvas, liguladas e 3-lobadas e aquelas do disco, normalmente monóclinas, apresentam corola amarela, tubulosa, 5-laciniada. As **anteras**, acastanhadas ou enegrecidas, contêm apêndice estreito-ovado, duto resinífero central, base obtusa ou sagitada e ramos do **estilete** curtos e achatados. As **cipselas** são negras, tetragonais, 3-4 costadas, às vezes compridas, ápice estrigoso, papo aristado, 2-4 aristas-barbeladas e tricomas retrorsos (HEYWOOD, 1993; KARIS & RYDING *in*: BREMER, 1994; JUDD, 2002; SOUZA, 2007).

***B. pilosa* L.**

Folhas

As folhas opostas (VALDÉS & REGO, 2001; SOUZA, 2007), às vezes alternas (VALDÉS & REGO, 2001) e pinatissectadas (SOUZA, 2007), apresentam lâmina com três segmentos ovados a estreito-ovados (VALDÉS & REGO, 2001; SOUZA, 2007). Seu comprimento varia em torno de 3,5 a 6,7 cm e a largura de 2,0 a 3,0 cm (SOUZA, 2007). A superfície das folhas é membranácea ou cartácea, sendo a face adaxial estrigoso-glandulosa e a face abaxial provida de tricomas esparsos (SOUZA, 2007). O ápice é agudo (VALDÉS & REGO, 2001; SOUZA, 2007) ou acuminado (VALDÉS & REGO, 2001), mucronado e de base atenuada (SOUZA,

2007). A margem das folhas é denteada, ciliada, com nervação craspedódroma. O pecíolo, com comprimento de 2,0 a 3,5 cm, é amplexicaule e viloso (SOUZA, 2007).

Capítulos florais

A capitulescência é paniculiforme, constituída de dicásios. O pedúnculo, com 2,5 a 4,5 cm de comprimento, é glabro (SOUZA, 2007). Os capítulos são discóides (VALDÉS & REGO, 2001; GROMBONE-GUARATINI *et al*, 2004; SOUZA, 2007), constituídos de 35 flores (SOUZA, 2007). O involúcro campanulado (VALDÉS & REGO, 2001) mede de 4,0 a 5,0 mm de comprimento, de 5,0 a 5,5 mm de largura (SOUZA, 2007) e 8 mm de altura (VALDÉS & REGO, 2001) e apresenta brácteas involucrais verdes, oblanceoladas, ovadas a oblongas. As brácteas externas são mais curtas (VALDÉS & REGO, 2001), possuindo de 2,5 a 3,0 mm de comprimento e 1,0 mm de largura, vilosas e com tricomas concentrados no ápice e base. O ápice é agudo a obtuso, ciliado, glanduloso e mucronado (SOUZA, 2007). As brácteas internas medem de 2,5 a 4,0 mm de comprimento e 1,0 mm largura, são glabras e possuem o ápice agudo. O receptáculo plano a quase plano (VALDÉS & REGO, 2001) ou subconvexo (SOUZA, 2007) apresenta páleas de 5,5 a 6,0 mm de comprimento e 0,7 mm de largura, hexa-nervadas, de nervuras acastanhadas e margem ciliada (SOUZA, 2007). As flores monóclinas mostram corola amarelada e comprimento de 3,5 a 4,5 mm. São piloso-glandulosas com corola tubulosa de 1,0 a 1,5 mm de comprimento e 0,4 mm de largura. O limbo das pétalas mede de 2,5 a 3,0 mm de comprimento e 1,5 mm de largura, sendo lacínio-triangular, internamente glanduloso e externamente papiloso-glanduloso. As anteras são negras, de apêndice ovado e base caudada. Os ramos do estilete, têm cerca de 1,5 mm de comprimento e são papilosos (SOUZA, 2007). As cipselas, marrom-escuras e costadas (GROMBONE-GUARATINI *et al*, 2005), apresentam de 5,0 a 5,5 mm de comprimento e de 0,6 a 1,0 mm de largura, sendo tetra-angulosas, verrucosas, esparsas, estrigosas, com carpopódio simétrico e cilíndrico com cerca de 0,5 mm. O papo é tri-aristado, com aristas amarelo-esverdeadas, medindo de 2,5 a 3,0 mm.

2.4.5 Aspectos anatômicos

2.4.5.1 Família Asteraceae

A estrutura anatômica da família Asteraceae mostra considerável diversidade, relacionada aos diferentes habitats em que seus representantes podem ocorrer (METCALFE & CHALK, 1950).

Observa-se a presença de cristais agrupados, por vezes grandes. Na região cortical pode haver colênquima, clorênquima ou ambos, dispostos alternadamente. As fibras pericíclicas formam faixas, em forma de arco, unidas pelas extremidades distais lignificadas com os raios medulares, formando um círculo contínuo em certas espécies de *Artemisia*. Os vasos do xilema são diminutos, com menos de 50 µm de largura. Os raios parenquimáticos apresentam mais de 1 mm de comprimento. Observam-se canais intercelulares, nos raios de *Artemisia tridentate*, assim como camadas interxilemáticas de súber (METCALFE & CHALK, 1950).

Folhas

Na família Asteraceae o mesofilo é, geralmente, dorsiventral. Na epiderme é comum ocorrerem células silicificadas, dispostas de forma concêntrica na base dos tricomas. Os estômatos podem ser anomocíticos ou anisocíticos. Os feixes vasculares das nervuras são envoltos, freqüentemente, por bainha de células parenquimáticas distintas (METCALFE & CHALK, 1950).

Em corte transversal, o **pecíolo** apresenta, geralmente, feixes vasculares dispostos em arco simples descontínuo, podendo ter formato menos arqueado, com número reduzido de feixes vasculares ou ser mais arqueado, com numerosos feixes vasculares. Em muitos gêneros, o pecíolo mostra-se alado, enquanto em outros ocorre uma faixa periférica de células colenquimáticas. Em espécies xerófitas a cutícula pode ser espessa. O tecido fundamental possui numerosas células suberizadas (METCALFE & CHALK, 1950).

Na família Asteraceae, ocorrem tricomas tectores que são unisseriados e constituídos de células uniformes com modificações nas células terminal e basal, sendo que a base pode ser unicelular, consistindo de um pedestal, a unisseriada, dispondo de prolongamento, em forma de chicote, na célula terminal ou, ainda, pode ser bifurcado, sendo que cada ramificação apresenta um pedúnculo unisseriado com porção terminal unicelular (METCALFE & CHALK, 1950).

2.4.5.2 Gênero *Artemisia* L.

Folhas

O mesofilo foliar no gênero *Artemisia* pode ser isolateral, com parênquima paliádico em ambas as faces e estreita faixa de parênquima esponjoso, na porção central da lâmina (ESAU, 1959), ou dorsiventral (FAHN, 1990). Na epiderme ocorrem tricomas tectores com bases constituídas de uma célula em pedestal ou de pedicelo unisseriado, com célula terminal longa em forma de chicote ou bifurcada, sendo que

cada ramificação apresenta pedúnculo unisseriado com porção terminal unicelular (METCALFE & CHALK, 1950).

Os dutos secretores, típicos da família Asteraceae, algumas vezes aparecem como pontos translúcidos na folha e também nos raios parenquimáticos, no floema e/ou xilema, nas partes subterrâneas (METCALFE & CHALK, 1950).

***A. annua* L.**

Segundo a literatura disponível até o presente, o estudo anatômico de *A. annua* limitou-se ao aspecto da secção transversal das folhas, órgão vegetal mais utilizado como droga, e nos estudos microscópicos e ultramicroscópicos de tricomas glandulares e tectores presentes nas superfícies foliar e floral (DUKE & PAUL, 1993; DUKE *et al*, 1994; FERREIRA & JANICK, 1995; MARCHESE *et al*, 2005).

Folhas

DUKE & PAUL (1993) observaram tricomas glandulares bisseriados constituídos de dez células, cinco de cada lado, na epiderme foliar de *A. annua*. Na face adaxial das folhas jovens, tanto estes, como os tricomas tectores filamentosos, estão dispostos em fileiras sub-epidérmicas ao longo do limbo foliar, já na face abaxial os tricomas glandulares não apresentam padrão regular de disposição.

Estudos realizados, por DUKE *et al* (1994), em microscópio eletrônico de varredura, mostraram que o mesofilo é dorsiventral.

MARCHESE *et al* (2005) apresentaram outras características da anatomia foliar de *A. annua*, entretanto, deram enfoque à avaliação do mecanismo fotossintético da mesma. Neste estudo, alguns caracteres citados, de forma geral, foram: a presença de bainha de células parenquimáticas envolvendo o tecido vascular e contendo amido e cloroplastos. Ainda, segundo eles, as folhas são anfiestomáticas e o mesofilo é dorsiventral, sendo reduzida a diferenciação entre os parênquimas paliçádico e esponjoso. Observaram grãos de amido em todo o mesofilo, evidenciando a sua produção e presença, em regiões inespecíficas.

Capítulos florais

Estudo de FERREIRA & JANICK (1995), referente aos tricomas presentes na epiderme floral, mostrou que tricomas tectores pentacelulares, unisseriados, filamentosos com ápice em forma de T formado por uma imensa célula alongada são encontrados, na região basal das brácteas e no pedicelo do capítulo. Além destes, ocorrem numerosos tricomas glandulares translúcidos, na corola das floretas, no

receptáculo e nas brácteas, sendo idênticos àqueles observados na epiderme foliar. Estes tricomas aparecem sob a linha da epiderme nas brácteas do capítulo, como ocorre nas folhas, e são orientados de modo que o plano formado pelas duas colunas de cinco células é paralelo ao eixo floral.

2.4.5.3 Gênero *Bidens* L.

De forma geral, na literatura especializada, os dados sobre a anatomia do gênero *Bidens* são escassos.

Particularmente, a espécie *B. pilosa* L, analisada no presente estudo, foi detalhadamente descrita, por DUARTE & ESTELITA (1999), que estudaram a anatomia dos órgãos vegetativos.

Segundo METCALFE E CHALK (1950), a presença de ducto resinífero, na região contígua ao ducto da região medular, nas raízes e caules, é característica da família Asteraceae sendo observada, igualmente, no gênero *Bidens*.

Em *Bidens rubifolia*, o xilema encontra-se dividido em estreitas placas ou faixas, que se mostram separadas por largos raios parenquimáticos primários.

***B. pilosa* L.**

A anatomia de folhas, capítulos florais, aquênios, caules e raízes primários e secundários de *B. pilosa* foi detalhadamente descrita por DUARTE & ESTELITA (1999).

Folhas

A distribuição das nervuras na folha é craspedódroma pinada. As terminações vasculares são constituídas por traqueídes com espessamento de parede helicoidal, envoltas pela bainha do feixe vascular, cujas células são parenquimáticas. A epiderme foliar uniestratificada (DUARTE & ESTELITA, 1999; VALDÉS & REGO, 2001) é recoberta pela cutícula delgada e estriada; em vista frontal, as células epidérmicas têm as paredes anticlinais sinuosas na região internervural e retas sobre as nervuras de maior porte. Tricomas tectores pluricelulares, unisseriados, revestidos pela cutícula estriada estão presentes em ambas as faces epidérmicas, bem como estômatos anomocíticos, embora estes predominem na abaxial. O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico constituído por um único estrato de células e parênquima lacunoso composto por 4 a 6 camadas (DUARTE & ESTELITA, 1999; VALDÉS & REGO, 2001). A nervura mediana possui formato biconvexo, mais proeminente na face abaxial; uma estreita faixa de colênquima angular ocorre

subjacentemente à epiderme e, voltada para a face adaxial, observa-se uma camada de parênquima paliçádico (DUARTE & ESTELITA, 1999; VALDÉS & REGO, 2001); o feixe vascular colateral encontra-se envolvido pelo parênquima fundamental e pode apresentar uma calota de parênquima colenquimatoso aposta ao xilema; os elementos traqueais estão agrupados ou separados por células parenquimáticas de paredes delgadas. Hidatódios localizam-se nas projeções da margem serreada do limbo, na face adaxial; os estômatos aquíferos têm características semelhantes aos demais estômatos; o epitema possui células levemente lobadas e contém raros cloroplastos; a bainha do feixe parece não alcançar a epiderme. O pecíolo apresenta, em secção transversal, contorno nitidamente plano-convexo nos terços distal e mediano, que se atenua em direção ao terço proximal, tornando-se quase plano; tricomas tectores pluricelulares e unisseriados são observados com maior frequência junto à face adaxial, enquanto uma estreita e praticamente contínua faixa de colênquima angular se localiza contiguamente à epiderme; os feixes vasculares de maior porte apresentam uma estreita zona cambial e uma calota de parênquima colenquimatoso aposta ao xilema. Dutos secretores estão localizados junto aos feixes vasculares (DUARTE & ESTELITA, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho visou ao estudo de *Artemisia annua* L. e de *Bidens pilosa* L., avaliando-se de forma inédita a atividade antileishmania *in vitro* de extratos e de suas frações, bem como à análise qualitativa e quantitativa de terpenos e flavonóides e/ou de seus respectivos marcadores selecionados, considerando fenofases de coleta, órgãos vegetais e estados de conservação distintos do material vegetal utilizado na obtenção dos extratos, e à contribuição na caracterização de alguns aspectos botânicos de *A. annua*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obtenção dos extratos hidroetanólicos, infusos e fracionamento preliminar daqueles bioativos.
- ✓ Pesquisa de flavonóides, compostos terpênicos e respectivos marcadores, em extratos e frações ativas.
- ✓ Quantificação de flavonóides totais nos extratos.
- ✓ Determinação de parâmetros físico-químicos da droga.
- ✓ Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269).
- ✓ Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* frente às células epiteliais humanas (HEP-2).
- ✓ Estudo morfoanatômico de folhas e capítulos florais de *A. annua*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

As partes aéreas (folhas e capítulos florais) do híbrido brasileiro de *Artemisia annua* L. cv. *Silves-1*, foi cultivado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (CPQBA-UNICAMP), localizado na cidade de Paulínia, bairro Vila Betel, SP, em área situada entre as coordenadas: 47°6'765" de latitude Oeste e 22°48'73" de longitude Sul e à altitude aproximada de 628m. Foram realizadas cinco coletas de partes aéreas, a partir de quatro exemplares demarcados. As coletas foram realizadas nas seguintes fases fenológicas (fenofases): vegetativa (6 de fevereiro de 2006), pré-floração (20 de fevereiro de 2006) e floração plena (14 de março de 2006). As partes aéreas coletadas variaram em função da fenofase em que se encontraram os vegetais estudados. Nas fenofases vegetativa foram obtidas as folhas e na pré-floração e floração plena, os capítulos florais.

Vinte exemplares de *Bidens pilosa* L. foram coletados em propriedade particular, localizada no bairro Vila São Francisco, São Paulo, SP, situada entre as coordenadas: 46°44'597" de latitude Oeste e 23°33'58" de longitude Sul, à altitude de 727m. A coleta foi realizada, em uma única vez (22 de novembro de 2006), a partir de exemplares inteiros encontrados em fenofases distintas. Estes foram separados, para o estudo, segundo as fenofases: Vegetativa (5 exemplares), pré-floração (5 exemplares), floração plena (5 exemplares) e de frutificação (5 exemplares).

Exsiccatas de partes aéreas, referentes a ambas as espécies, foram depositadas no Herbário (SPF) do IB-USP sob as denominações Silva-1(*A. annua*) e Silva-2 (*B. pilosa*) tendo sido identificadas pelos professores: Dr. José Rubens Pirani e Dra. Mara Magenta do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

4.2 Material estudado

Os extratos de *A. annua* e de *B. pilosa*, destinados aos estudos químicos e da atividade biológica, foram preparados com o material vegetal (de origem) especificado, respectivamente, nas **Tabelas 1 e 2**.

TABELA 1 - Extratos de *A. annua* e material vegetal de origem (órgãos vegetais, fenofase de coleta e estado de conservação) destinados ao estudo químico e avaliação das atividades antileishmania e citotóxica *in vitro*

Extratos	<i>A. annua</i> L.		
	Material vegetal de origem		
	Órgão vegetal	Fenofase	Estado de conservação
Hidroetanólico/ Infuso	folha	vegetativa pré-floração	<i>in natura</i> droga
	capítulo floral	pré-floração	
		floração plena	

Para o estudo morfoanatômico de *A. annua*, foram separadas folhas e capítulos florais, para a análise das partes frescas.

TABELA 2 - Extratos de *B. pilosa* e material vegetal de origem (órgãos vegetais, fenofase de coleta e estado de conservação) destinados ao estudo químico e avaliação das atividades antileishmania e citotóxica *in vitro*

Extratos	<i>B. pilosa</i> L.		
	Material vegetal de origem		
	Órgão vegetal	Fenofase	Estado de conservação
Hidroetanólico/ Infuso	vegetal inteiro	vegetativa	<i>in natura</i> droga
	folha	pré-floração	
	raiz	floração plena	
		frutificação	

4.3 Métodos

4.3.1 Processamentos posteriores à coleta

4.3.1.1 *Artemisia annua*

Parte das folhas e capítulos florais de *A. annua* foi separada para o estudo morfoanatômico a fresco (item 4.9) e, outra parte, conservada em solução

hidroetanólica 70 % (v/v). O restante foi fragmentado e parte separada *in natura*, para o preparo direto dos extratos (item 4.4) e, outra parte, para a obtenção da droga.

4.3.1.2 *Bidens pilosa*

O material relativo ao vegetal inteiro, folhas e raízes de *B. pilosa*, obtido nas quatro fenofases (Tabela 2) foi fragmentado e destinado ao preparo dos extratos (*in natura*) e de droga, à semelhança de *A. annua*.

4.3.2 Obtenção da droga

A. annua

Folhas e capítulos florais provenientes de quatro exemplares de *A. annua*, obtidos nas três fenofases de coleta, em conformidade com sua ocorrência (item 4.1), foram secos, à sombra, à temperatura ambiente, por 15 dias e, posteriormente, transferidos para estufa de circulação de ar, à temperatura de 40°C, onde permaneceram, por 2 dias (MUELLER *et al*, 2000; MAGALHÃES, 2002).

B. pilosa

O material vegetal correspondente aos dois exemplares inteiros e às folhas e raízes, obtidos de outros três exemplares, cada, de *B. pilosa* (item 4.1) foram submetidos à secagem, conforme descrito para *A. annua*.

4.3.3 Pulverização

As drogas obtidas das duas espécies (item 4.3.2) foram finamente pulverizadas em gral de porcelana, com auxílio de pistilo e de dióxido de carbono tendo sido usadas no preparo dos extratos estudados (Tabelas 1 e 2).

4.4 Obtenção de extratos

Os extratos de *A. annua* foram preparados, separadamente, para os materiais vegetais (folhas e capítulos florais), provenientes de 4 exemplares demarcados, coletados nas três fenofases (item 4.1).

Os extratos de *B. pilosa* foram obtidos a partir de folhas, vegetal inteiro e raízes coletados de 5 exemplares. Estes órgãos vegetais foram agrupados em uma única amostra, subdividida segundo cada uma das 4 fenofases citadas anteriormente (item 4.1).

4.4.1 Extratos hidroetanólicos

Cerca de 8 g (massa seca) do material vegetal *in natura* (item 4.3.1.1) e 2 g dos mesmos órgãos vegetais transformados em droga (item 4.3.2) de *A. annua* foram submetidos à maceração com etanol 96° GL, por 24 h. Após este período, efetuou-se percolação, a frio, com o mesmo solvente (KLAYMAN *et al*, 1984). O procedimento foi repetido três vezes. Os extratos hidroetanólicos foram concentrados à pressão reduzida, em evaporador rotatório (Büchi®), até a secura, tendo-se determinado a massa dos resíduos e o rendimento da extração (% m/m). Os extratos hidroetanólicos (resíduos) (Tabela 1) foram mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração a 8°C.

Na obtenção dos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa* (Tabela 2), seguiu-se o mesmo procedimento empregado para *A. annua*.

4.4.2 Infusos

A. annua

Os infusos do material *in natura* de *A. annua* (Tabela 1) foram preparados a partir de 8 g das partes aéreas (em relação à massa seca), tendo-se adicionado cerca de 400 mL de água fervente (MUELLER *et al*, 2000; MUELLER *et al*, 2004). Após a agitação branda de 15 minutos, procedeu-se à filtração. O filtrado foi submetido à liofilização (Edwards Brasil, modelo Pirani 501). Determinou-se a massa dos resíduos dos infusos e o rendimento de extração (% m/m).

No preparo dos infusos, a partir da droga (Tabela 1), tomaram-se 2g das partes aéreas, seguindo-se o mesmo procedimento descrito, anteriormente (MUELLER *et al*, 2000).

B. pilosa

Para o preparo dos infusos de *B. pilosa*, adicionaram-se 200 mL de água fervente (DIMO *et al*, 1998) a cerca de 2 g do vegetal inteiro, folhas e raízes, *in natura* (item 4.3.1.2) e de droga (item 4.3.2) (Tabela 2), com posterior liofilização do infuso. Determinaram-se as massas dos resíduos (média $\pm$ D.P) e o rendimento das extrações (% m/m). No caso do material *in natura*, os cálculos foram realizados com base nos resíduos secos, anteriormente determinados.

4.4.3 Frações orgânicas

A. annua

Os extratos hidroetanólicos das partes aéreas de *A. annua*, obtidos nas três fenofases consideradas (**Tabela 1**), foram fracionados.

Cerca de 1g de extrato hidroetanólico proveniente de um exemplar de *A. annua*, foi deixado em maceração, à temperatura ambiente, com 20 mL de *n*-hexano p.a. (Merck®), por 5 minutos, e posteriormente, foi agitado. Após a decantação, o resíduo foi separado e retomado com o mesmo solvente, repetindo-se o processo cinco vezes.

O extrato em *n*-hexano foi concentrado, à pressão reduzida, em evaporador rotatório (Büchi®), até a secura.

O resíduo insolúvel em *n*-hexano foi retomado com clorofórmio p.a. (Carlo Erba®) tendo-se procedido conforme descrito anteriormente. O processo foi repetido, sucessivamente, com acetato de etila p.a. (Synth®) e metanol p.a. (Merck®).

B. pilosa

No fracionamento dos extratos hidroetanólicos de folhas e de raízes de *B. pilosa*, nas fenofases vegetativa e de frutificação, empregou-se a metodologia idêntica àquela de *A. annua*, substituindo o clorofórmio por diclorometano (Carlo Erba®).

As massas dos resíduos foram determinadas e os mesmos foram conservados em congelador, em frascos hermeticamente fechados e ao abrigo da luz.

As frações orgânicas de ambas as espécies foram submetidas aos testes de atividade antileishmania *in vitro* (item 4.8.1.2).

4.5 Determinação de parâmetros físico-químicos

4.5.1 Determinação de massa seca do material *in natura* e de resíduo seco da droga

Cerca de 1 g de folhas e capítulos florais, provenientes de dois exemplares de *A. annua* (*in natura* e droga), e do vegetal inteiro, folhas e raízes de cinco exemplares de *B. pilosa* (droga), respectivamente, coletados nas 3 e 4 fenofases especificadas anteriormente (item 4.1), foram transferidos, em duplicata, para cadinhos previamente tarados. Posteriormente, estes foram mantidos em estufa, a 40 °C, até a constatação de valores de massa constante (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; MAGALHÃES, 2002). Efetuou-se o cálculo das médias das massas secas

dos materiais *in natura* de *A. annua* e dos resíduos secos das drogas das duas espécies (média $\pm$ desvio-padrão) e os resultados foram expressos em porcentagem.

4.5.2 Determinação do teor de cinzas totais

Determinou-se o teor de cinzas totais, no material vegetal proveniente de *A. annua*, em duplicata, após o processamento realizado no item 4.3.1.1, a partir de cerca de 1g de droga disposto em cadinho previamente calcinado e tarado. Posteriormente, o resíduo foi incinerado, em mufla (Quimis®), até a verificação de massa constante. Calculou-se a porcentagem de cinzas totais presentes e o valor foi expresso como média $\pm$ desvio-padrão (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.5.3 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

O resíduo resultante da determinação de cinzas totais (item 4.5.2) foi levado à fervura com 12,5 mL de solução de ácido clorídrico 7% (v/v) (Merck®), por 5 minutos. A seguir, filtrou-se através de papel de filtro quantitativo (Whatman nº 42). Posteriormente, o resíduo foi lavado com água destilada quente, até a obtenção de filtrados neutros, que foram incinerados até massa constante.

Calculou-se a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido, a partir dos dados obtidos em duplicata e o valor foi expresso como média $\pm$ desvio-padrão (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

4.6 Análise espectrofotométrica

4.6.1 Quantificação de flavonóides totais

Os teores de flavonóides totais foram determinados, a partir das duas espécies estudadas, por espectrofotometria/UV.

Em *A. annua*, as determinações foram realizadas nas folhas e capítulos florais, conforme a ocorrência nas fenofases distintas (item 4.1). A quantificação foi feita, na droga e nos extratos hidroetanólicos e infusos (Tabela 1), obtidos a partir do material *in natura* e na forma de droga e proveniente de 1 exemplar.

No caso de *B. pilosa*, os flavonóides totais foram determinados nos extratos (Tabela 2) obtidos a partir de material vegetal coletado nas quatro fenofases e separado em folhas, vegetal inteiro e raízes (*in natura* e droga), provenientes de 5 exemplares cada. As determinações foram realizadas empregando-se as técnicas modificadas de SANTOS *et al*, 1998 e FUNARI *et al*, 2006.

4.6.1.1 Validação

Curva de Ringbom do padrão de quercetina

A solução do padrão de quercetina di-hidratada (98%, Sigma-Aldrich®) foi obtida em metanol p.a. (Merck®) (50 µg/ mL). Aliquotas de 1 a 20 mL (com volumes variando de 1 em 1 mL) da solução de quercetina foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, tendo-se previamente adicionado 1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 2,5% (m/v). Ajustou-se o volume final com metanol p.a e agitou-se, por alguns segundos.

No preparo do controle, para ajuste do zero, transferiu-se 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio 2,5% (m/v) para balão volumétrico, completando-se o volume para 25 mL, com metanol p.a (Merck®) e agitando-se, em seguida.

Decorridos 30 minutos, efetuaram-se as determinações de absorbância em espectrofotômetro (Beckman® DU 70) a 425 nm. Os dados de absorbância (100 -%T) foram dispostos em gráfico em função do logaritmo das concentrações de quercetina.

Reta analítica da quercetina

A reta analítica da quercetina foi construída com base na curva de Ringbom, a partir dos dados situados na faixa de linearidade.

4.6.1.2 Preparo das amostras

A. annua (droga)

Cerca de 2 g de folhas e capítulos florais de *A. annua*, na forma de droga (item 4.3.2), foram transferidos para Soxhlet contendo 150 mL de metanol 70% (v/v) (Merck®) e aquecidos a 60°C, por 3 h. O extrato foi filtrado para balão volumétrico e o volume completado para 250 mL, com o mesmo solvente (SANTOS *et al*, 1998). Posteriormente, 2 mL do extrato foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, adicionando-se 1mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 2,5% (m/v) e completando-se o volume com o mesmo solvente. O processo foi realizado em triplicata. Decorridos 30 minutos, foram determinadas as absorbâncias das soluções, a 425 nm.

Os resultados foram expressos em relação ao teor de quercetina, presente na droga, em porcentagem média (n=3) ± desvio-padrão.

Extratos hidroetanólicos e infusos de *A. annua* e de *B. pilosa*

Cerca de 15 mg dos extratos hidroetanólico e infuso de *A. annua* (Tabela 1) e de *B. pilosa* (Tabela 2) foram transferidos, quantitativamente, para triplicata de balões volumétricos de 25 mL, acrescentando-se 2 mL de de metanol p.a e homogeneizando-se até a completa solubilização. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 2,5% (m/v) e completou-se o volume com metanol. Decorridos 30 minutos, foram determinadas as absorbâncias, a 425 nm.

Os resultados foram expressos, em relação ao teor de quercetina presente nos extratos hidroetanólicos e infusos, como porcentagem média ($n=3$) $\pm$ desvio-padrão.

4.7 Análises cromatográficas

4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência/UV (CLAE/UV)

4.7.1.1 Quantificação da artemisinina

A quantificação de artemisinina nos extratos hidroetanólicos e infusos (Tabela 1) de um exemplar de *A. annua*, obtidos a partir das partes aéreas coletadas nas três fenofases, foi efetuada segundo o método de padronização externa adaptado de Zhao & Zheng (1985).

4.7.1.1.1 Preparo do padrão de artemisinina

A solução estoque do padrão de artemisinina (400 $\mu\text{g/mL}$) foi preparada com 10mg de artemisinina (98% pureza) (Sigma-Aldrich®) em etanol 95% (Carlo Erba®). Posteriormente, alíquotas de: 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 e 2000 μL desta solução foram transferidas para triplicata de tubos de ensaio. Em seguida, o solvente foi evaporado, tendo-se adicionado, a cada tubo: 1 mL de etanol 95% (Carlo Erba®), 1 mL de acetonitrila grau HPLC (Merck®) e 4 mL de solução de NaOH 0,2% (m/v) (Merck®). Após o aquecimento a 45°C, por 15 min, os tubos foram resfriados, até a temperatura ambiente, em banho de gelo. Posteriormente, adicionaram-se 4 mL de ácido acético 0,1 M, por tubo.

4.7.1.1.2 Preparo das amostras

Adicionou-se 1 mL de etanol 95% (v/v) (Carlo Erba®), a cerca de 5 mg de cada extrato hidroetanólico e infuso de *A. annua* (Tabela 1), em triplicatas de tubos de ensaio. Em seguida, procedeu-se à reação de derivatização, à semelhança do que foi descrito anteriormente para o padrão de artemisinina.

4.7.1.1.3 Validação do método

Especificidade

A especificidade foi investigada pela comparação da matriz isenta de artemisinina (padrão) e aquela adicionada do padrão, à concentração de 2 µg/mL (RIBANI *et al*, 2004).

Curva analítica e linearidade

As soluções do padrão de artemisinina, obtidas anteriormente, foram filtradas por membrana (0,45 µm, Millex®HV, Millipore, Milford, USA). A curva analítica foi construída dispondo-se a média das áreas do pico do derivado de artemisinina (composto Q260), nas dez soluções do padrão, em função das concentrações. O gráfico e os cálculos das áreas e do coeficiente de correlação linear foram feitos com o auxílio do Excell (Microsoft Office 2008).

Precisão

As amostras constituíram-se dos extratos em acetonitrila preparados, a partir de exatamente 100 mg da droga pulverizada (partes aéreas) de *A. annua*, proveniente das três fenofases estudadas. Adicionaram-se 15 mL de acetonitrila grau HPLC (Merck®), seguindo-se de agitação, à temperatura ambiente, por 30 segundos, em aparelho de ultrassom (Odontobrás®) e centrifugação (Heraeus Instruments®), por 6 minutos, a 3.200 r.p.m. (MARCHESE *et al*, 2001).

Alíquotas de 500 µL dos extratos em acetonitrila foram transferidas para tubos de ensaio, em réplicas de cinco, com adição de 500 µL de acetonitrila grau HPLC (Merck®), 1 mL de etanol 95% (Carlo Erba®) e 4 mL de NaOH 0,2% (Merck®) (m/v). As soluções resultantes foram analisadas, tendo-se determinado a média dos teores de artemisinina e o coeficiente de variação (C.V.) (%).

Exatidão

Limite de detecção

A fixação destes parâmetros foi realizada quando da injeção das soluções do padrão de artemisinina, em triplicata, até a obtenção de pico cromatográfico de razão sinal-ruído de 3:1.

Ensaio de Recuperação

Volumes de 500 µL de solução estoque de artemisinina (400 µg/mL) foram adicionados a alíquotas de 500 µL dos extratos de *A. annua* (**Tabela 1**). À solução

resultante acrescentaram-se 500 µL de etanol 95% e 500 µL de acetonitrila grau HPLC (Merck®). Em seguida, adicionaram-se 4 mL de solução de NaOH 0,2% (Merck®) (m/v) e procedeu-se à semelhança do padrão de artemisinina. O ensaio foi realizado em réplicas de cinco.

4.7.1.1.4 Condições analíticas

A análise do padrão de artemisinina e dos extratos de *A. annua*, por CLAE/UV, além da determinação dos parâmetros para a validação do método foram realizadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu®, modelo SPD-M10AVP, Quioto, Japão), detector SPD-10ADVP de comprimento de onda, equipado com bomba LC-10ADVP, válvula de injeção SIL-10ADVP com *loop* de 50 µL, coluna CTO-10ADVP. Empregou-se coluna C18 (150 X 4,60 mm I.D.; 5 µm) (Phenomenex Gemini®) e pré-coluna AJO-4287 C18 (5 x 4.6 mm I.D., 5 µm) (Torrance, CA, United States), temperatura do forno de 40°C.

A eluição foi feita de forma isocrática, com fase móvel constituída de solução-tampão de KH₂PO₄ 10 mM e acetonitrila grau HPLC (Merck®), na proporção 70:30 (v/v). O fluxo foi ajustado para 1 mL/min. O volume de injeção das soluções do padrão e das amostras foi de 20 µL. A detecção, na região de ultravioleta, foi em comprimento de onda de 260 nm. Calcularam-se os teores de artemisinina presentes nos extratos em acetonitrila (Ensaio de Precisão e de Recuperação), nos extratos hidroetanólicos e infusos (Tabela 1), com base na equação da reta obtida para o padrão derivatizado.

4.7.1.2 Análise qualitativa para a pesquisa de marcadores flavonoídicos nos extratos

Os marcadores selecionados para as análises foram quercetina e rutina, tendo sido avaliada a presença, nos diferentes extratos de *A. annua* e de *B. pilosa* (Tabelas 1 e 2), empregando-se CLAE, segundo o método de Schieber *et al* (2001) modificada por Furlan (2004).

4.7.1.2.1 Preparo dos padrões

Cerca de 1 mg de quercetina di-hidratada (98%, Sigma-Aldrich®) e de rutina (98%, Sigma-Aldrich®) foram dissolvidos em 1 mL de metanol grau HPLC (Merck®). Posteriormente, as soluções foram filtradas, por membrana (0,45 µm, Millex®HV, Millipore, Milford, USA) e submetidas à análise.

4.7.1.2.2 Preparo das amostras

Na análise de *A. annua*, foi considerada a totalidade dos extratos obtidos (**Tabela 1**). No caso de *B. pilosa*, os extratos hidroetanólicos submetidos à análise foram aqueles de: folhas na fenofase de frutificação (*in natura* e droga), vegetal inteiro na fenofase vegetativa (droga) e raízes, nas fenofases vegetativa (*in natura*) e de frutificação (droga) (**Tabela 2**). Entre os infusos, foram considerados aqueles obtidos das raízes, todos os extratos *in natura* do vegetal inteiro e todos os de folhas, exceto aqueles preparados a partir da droga em fenofase de floração (**Tabela 2**).

Exatamente 250 mg dos extratos hidroetanólicos e infusos de 1 exemplar de *A. annua* e do vegetal inteiro, folhas e raízes de cinco exemplares de *B. pilosa* foram adicionados de 1 mL de tolueno p.a. (Merck®), em tubos de eppendorf. Posteriormente, foram agitados, aquecidos por 5 min, a 67°C e centrifugados (Andrade e Pedrosa S.A.) a 5.000 r.p.m., por 5 min.

O sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio. Repetiu-se o processo duas vezes e o solvente foi evaporado, à temperatura de 67 °C, em banho-de-água.

O resíduo foi solubilizado em 1mL de metanol grau HPLC (Merck®), em banho-de-água a 67°C, por 5 min, com posterior centrifugação, conforme anteriormente descrito. O resíduo em metanol foi retomado em 1 mL do mesmo solvente. Antes da análise, a solução foi filtrada, através de membrana (0,45µm, Millex®HV, Millipore, Milford, USA) e levada à análise.

4.7.1.2.3 Condições analíticas

As análises foram realizadas, no cromatógrafo líquido, cujas especificações foram anteriormente descritas (**item 4.7.1.1.4**). A fase móvel utilizada constituiu-se de mistura de solução de ácido acético 10% (v/v) (Merck®) (**A**) e acetonitrila grau HPLC (Merck®) (**B**). O fluxo foi ajustado para 0,5mL/min. Injetou-se volume de 50 µL de amostra. A programação do gradiente de solventes foi realizada, conforme a **Tabela 3**. As demais condições analíticas foram idênticas ao **item 4.7.1.1.4**.

TABELA 3 - Programação do gradiente de solventes, nas análises cromatográficas dos padrões de flavonóides e dos extratos de *A. annua* e *B. pilosa*, por CLAE/UV

Período de tempo de análise (min)	Fase móvel	
	Proporção de solventes A/B	
	Solvente A	Solvente B
0-5	88	12
6-8	88-80	12-20
9-28	80	20
29-38	80-50	20-50
39-48	50-35	50-65
49-50	35-0	65-100
51-55	0	100
56-60	88	12

Solvente A: solução de ácido acético 10% (v/v), **Solvente B:** acetonitrila.

4.7.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

4.7.2.1 Análise das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos de *A. annua*

As frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos de *A. annua*, que apresentaram atividade antileishmania *in vitro*, foram submetidas à pesquisa genérica de flavonóides e compostos terpênicos e dos respectivos marcadores selecionados: quercetina e artemisinina, por CCD.

Preparo das amostras

Cerca de 10 mg de cada fração orgânica dos extratos hidroetanólicos, obtidos das partes aéreas *in natura* e secas (droga) de *A. annua* (**Tabela 1**) foram solubilizadas em 1 mL de metanol p.a. (Synth®).

Os padrões de artemisinina (98%, Sigma-Aldrich®) e de quercetina di-hidratada (98%, Aldrich®) foram empregados como marcadores, respectivamente nas pesquisas específicas de compostos terpênicos e de flavonóides, tendo sido solubilizados em metanol p.a. (Synth®) à concentração de 0,5 mg/mL.

Sistema cromatográfico

Na análise, por CCD, foram mantidas constantes, as seguintes condições: adsorvente sílica gel 60G (Merck®) (pesquisa de flavonóides) e adsorvente sílica gel GF₂₅₄ (pesquisa de compostos terpenos), espessura do adsorvente 300µm, percurso de 12,5cm, desenvolvimento ascendente e saturação total da cuba. A visualização das manchas foi realizada à luz visível e sob luz UV, a 366 nm. As soluções das frações foram aplicadas em volumes de 20 µL e aquelas dos padrões; em volumes de 5 µL por cromatoplaça.

Os sistemas de solventes empregados foram variáveis para a separação de compostos terpênicos e de flavonóides (Tabela 4).

TABELA 4 - Sistemas cromatográficos (SC) empregados para a pesquisa de compostos terpênicos e flavonóides nas frações orgânicas bioativas dos extratos hidroetanólicos de *A. annua*, por CCD

SC	Sistema de solventes	Referências
1	clorofórmio-acetato de etila (8:2)	TAWFIQ <i>et al</i> , 1989
2	clorofórmio-acetato de etila-acetona (7:1:1)	-
3	clorofórmio-acetona-ácido fórmico (75:16,5:5)	-
4	clorofórmio-acetona-ácido fórmico (45:10:5)	-

SC-1 a SC-2: sistemas cromatográficos empregados na caracterização de compostos terpênicos. SC-3 a SC-4 sistemas cromatográficos empregados na caracterização de flavonóides.

Deteção de compostos terpênicos

Para a detecção de compostos terpênicos, nas frações, as cromatoplaças foram nebulizadas com solução de ácido sulfúrico 60% (Merck®) seguindo-se o aquecimento, em estufa, a 105°C, por 5 min (PICMAN *et al*, 1980; TAWFIQ *et al*, 1989). Posteriormente, foram observadas à luz natural.

Deteção de flavonóides

Na detecção de flavonóides, nas frações, as cromatoplaças foram nebulizadas com o reagente *Natural Products* (NP) (Sigma-Aldrich®) (WAGNER & BLADT, 1996). Posteriormente, foram observadas sob luz UV, em 366 nm.

4.8 Avaliação da atividade biológica

A avaliação da atividade biológica *in vitro* de *A. annua* e de *B. pilosa* foi realizado em duas fases. Na etapa inicial, foi avaliada a atividade antileishmania dos infusos e extratos hidroetanólicos de ambas as espécies (**Tabelas 1 e 2**). Os extratos mais ativos foram fracionados. As frações orgânicas resultantes foram submetidas aos mesmos testes. Na segunda etapa, foram determinadas as concentrações inibitórias de 50% e de 90% dos parasitas (CI_{50} e CI_{90}) e as concentrações citotóxicas *in vitro* das frações mais ativas.

4.8.1 Avaliação da atividade antileishmania *in vitro*

4.8.1.1 Ensaios de viabilidade frente aos padrões, por contagem direta

Os padrões de artemisinina (98%, Sigma-Aldrich®) e de quercetina di-hidratada (98%, Aldrich®) foram submetidos aos testes de viabilidade por contagem direta das formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis*, em câmara de Neubauer. Ambos foram solubilizados em DMSO e testados às concentrações de: 10, 30 e 90 µg/mL, por poço.

As formas promastigotas do parasita foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas (5×10^5 promastigotas/ poço), em placa de 24 poços, para volume final de 500 µL, sendo realizados em triplicata. As placas foram incubadas à temperatura de 25 °C, por 72 h, com avaliação a cada 24 h. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 10 µL do meio, para a contagem dos parasitas vivos, em câmara de Neubauer. O percentual de promastigotas viáveis foi avaliado em relação à cultura controle na ausência dos padrões.

Determinaram-se as condições de tempo de incubação e de concentração dos padrões, que levaram à viabilidade de 0% das formas promastigotas.

4.8.1.2 Ensaios de viabilidade frente aos extratos, frações e padrões pela técnica do MTT

Os testes de viabilidade das formas promastigotas de *Leishmania* (*L. amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269] frente aos extratos e frações de *A. annua* e *B. pilosa* e aos padrões de artemisinina, quercetina e rutina foram realizados segundo a técnica de Arruda *et al* (2005).

Os extratos hidroetanólicos e infusos de *A. annua* (**Tabela 1**) e de *B. pilosa* (**Tabela 2**) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (90 mg/mL) e diluídos, no meio de cultura com parasitas, à concentração testada de 1.600 µg/mL, por poço. As frações orgânicas dos extratos foram solubilizadas no mesmo solvente, para obtenção

da concentração de 300 µg/mL, por poço. Os padrões de artemisinina (98%, Sigma-Aldrich®), quercetina di-hidratada (98%, Aldrich®) e rutina (98%, Sigma-Aldrich®) foram solubilizados em DMSO, adicionando-se volume final, por poço, referente à concentração de 100 µg/mL.

Empregou-se como fármaco de referência a anfotericina B, à concentração de 0,3 µM, por poço.

As formas promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas (3×10^6 promastigotas/ por poço) em placa de 96 poços, com volume final de 150 µL/poço. Em seguida, as amostras referentes a *A. annua* e *B. pilosa* foram adicionadas, em triplicata. As placas foram incubadas, a 25 °C, por 48 h (*A. annua*) e 24 h (*B. pilosa*). O mesmo procedimento foi seguido para o controle contendo somente DMSO 1,5 a 4% sem as amostras, para o fármaco de referência e para o controle contendo somente os parasitas na ausência das amostras, com incubação por 48h.

Após a incubação, foram adicionados 30 µL de solução aquosa de MTT [brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Sigma-Aldrich®) (5 mg/mL) por poço, seguindo-se incubação à 25°C, por 2 h.

Extraiu-se a formazana dos parasitas viáveis com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% (Merck®) (50 µL/ poço), à temperatura ambiente. Posteriormente, determinou-se a densidade ótica (D.O.) dos sobrenadantes, em espectrofotômetro Multiskan EX (Labsystems®), a 595 nm, utilizando-se como referência valores determinados a 690 nm. Determinou-se o percentual de parasitas viáveis (%), em relação aos controles.

4.8.1.3 Determinação das concentrações inibitórias de 50 e 90% (CI₅₀ e CI₉₀) das frações selecionadas

Frações orgânicas bioativas dos extratos de *A. annua* e *B. pilosa* foram selecionadas para a determinação das concentrações inibitórias de 50 e 90% das formas promastigotas de *L. amazonensis*. Empregou-se o método descrito no item **4.8.1.2.**

As frações foram solubilizadas em DMSO e testadas às concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 µg/mL, por poço. Os padrões de artemisinina (98%, Sigma-Aldrich®), quercetina di-hidratada (98%, Aldrich®), rutina (98%, Sigma-Aldrich®) foram solubilizados em DMSO e testados nas concentrações de 10, 30, 60 e 90 µg/mL, por poço.

O tratamento dos dados e o cálculo das concentrações que levaram à morte de 50% e de 90% das formas promastigotas do parasita foram realizados empregando o ORIGIN 7.5.

4.8.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das frações cujas concentrações CI_{50} e CI_{90} foram determinadas anteriormente (item 4.8.1.3) foi realizada frente às células epiteliais humanas HEP-2 (ATCC: CCL-23), por meio da adaptação da técnica de Arruda *et al* (2005). Determinaram-se as concentrações das frações, que levaram à citotoxicidade de 50% destas células (CC_{50}).

4.8.2.1 Células

As células epiteliais humanas HEP-2 (ATCC: CCL-23) foram descongeladas rapidamente em banho-de-água, a 37°C, sob agitação. A suspensão foi transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após homogeneização, transferiu-se volume de 1 mL para garrafa de cultura contendo 5 mL do mesmo meio (ARRUDA *et al*, 2005). As culturas foram mantidas em estufa de CO₂ (5%), a 37°C, por 72 h, sendo observadas quanto à multiplicação e à aderência das células às paredes da garrafa.

Posteriormente, o meio de cultura foi descartado. As células aderidas foram lavadas com PBS (tampão de fosfato salino) e tratadas com tripsina (1,5 mL). Adicionou-se 9 mL do mesmo meio e homogeneizou-se. Os repiques foram realizados adicionando-se 1 mL de suspensão, a cada garrafa, e completando o volume para 10mL com o meio. Após 72 h, as células foram utilizadas nos ensaios.

4.8.2.2 Determinação da CC_{50}

As frações orgânicas de *A. annua* e *B. pilosa* foram solubilizadas em suspensão constituída de meio RPMI-metanol (1:1), para a obtenção das concentrações de teste de: 30, 100, 300, 1000 e 3000 µg/mL por poço.

Os padrões de artemisinina (98%, Sigma-Aldrich®) e quercetina di-hidratada (98%, Aldrich®) foram preparados à semelhança das frações, nas concentrações de 10, 30, 60, 90 e 120 µg/mL por poço. A anfotericina B foi empregada como fármaco de referência e testada, nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 e 5 µM, por poço.

As células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas (5×10^6 células / por poço) em placa de 96 poços, considerando o volume final de 150

$\mu\text{L/poço}$. Posteriormente, foams incubadas a 37°C , em estufa de CO_2 (5%), por 24 h. Após este período, as frações e os padrões foram adicionados para os poços, em triplicata. As placas foram incubadas, nas mesmas condições, por 24 h.

Para a determinação da viabilidade das células epiteliais, após o tratamento com as frações e padrões testados, utilizou-se o método de MTT (item 4.8.1.2).

O cálculo das concentrações das frações, que levaram à viabilidade celular de 50%, foi realizado com auxílio do programa ORIGIN 7.5.

4.8.3 Determinação do Índice de Seletividade

O Índice de Seletividade (IS) das frações cujas CC_{50} e CI_{50} foram previamente determinadas (itens 4.8.1.3 e 4.8.2.2) foi calculado, tendo sido expresso como a proporção entre a CC_{50} determinada em células HEP-2 e a CI_{50} frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

4.9 Estudo morfoanatômico de *A. annua*

As características morfológicas de *A. annua* foram observadas com auxílio de lupa estereoscópica (Herbrough®) com ampliação de até 80 vezes. As mensurações foram efetuadas com régua milimetrada comum e paquímetro. Os detalhes de folhas e das inflorescências (capítulos florais) foram registrados com máquina fotográfica digital Sony tendo-se obtido as escalas sob as mesmas condições ópticas.

Para a análise anatômica de folha e ráquis de *A. annua*, foram obtidas secções a partir de material fresco e conservado (item 4.3.1). Os materiais foram previamente incluídos por meio de três diferentes técnicas, descritas a seguir.

Inclusão em polietilenoglicol (PEG 4000) (BARBOSA & ANGYALOSSY-ALFONSO, com. pess.)

Os materiais vegetais (folhas, ráquis, flores hermafroditas e femininas) foram impregnados e incluídos em PEG 4000 (Synth®). As secções transversais (2-5 μm) foram feitas em micrótomo de deslize (Leica SM 2000R), lavadas em água destilada e separadas para tratamento posterior.

Inclusão em parafina (SASS, 1951)

Os materiais vegetais (folhas e ráquis) foram desidratados na série etanólica seguida da série com xileno (JOHANSEN, 1940), permanecendo em cada

passagem, por 3 horas. Após a desidratação, foram infiltrados e incluídos em parafina (SASS, 1951). Os blocos foram presos em suporte de madeira. Os cortes, em sentido transversal, elaborados conforme anteriormente descrito, foram aderidos à lâmina com albumina glicerina (MAYER, 1937) e posteriormente distendidos, segundo Bissing (1974), desparafinados e separados para a fase seguinte de tratamento.

Inclusão do material vegetal pelo método de GODFRIN (1929, modif. BARBOSA)

A folha e o ráquis frescos foram incluídos em suporte glicerinado, após amolecimento, sob fervura, em glicerina 10% (v/v). As secções transversais obtidas conforme descrito anteriormente foram lavadas em água quente e separadas para o tratamento posterior.

As secções obtidas, após a aplicação das diferentes técnicas de inclusão, foram submetidas ao processo de dupla coloração com azul de Astra 1% e safranina 1% (BUKATSCH, 1972 modificado por KRAUS & ARDUIN, 1997) e montagem de lâminas permanentes em Bálsamo do Canadá (Merck®).

No estudo de epidermes, folhas inteiras foram diafanizadas com hidróxido de sódio 10% (FOSTER, 1950), para a observação dos tricomas. Após clarificação, o material foi lavado diversas vezes com água destilada e corado com azul de Astra 1% (BUKATSCH, 1972, modificado por KRAUS & ARDUIN, 1997). A montagem nas lâminas foi feita em solução aquosa de glicerina 50% (v/v) (PURVIS *et al*, 1964, modificado).

Os capítulos florais foram dispostos entre duas lâminas microscópicas, em solução aquosa de glicerina 50% (v/v), para a separação das floretas e brácteas do receptáculo e observação direta ao microscópio de luz (Olympus®-CH2). Parte das peças florais foi corada, após diafanização com solução aquosa de hipoclorito de sódio 50% (v/v) (BERSIER & BOCQUET, 1960 modificado por KRAUS & ARDUIN, 1997) e lavada.

Em seguida, os métodos de coloração e montagem foram idênticos àqueles descritos anteriormente.

Os testes histoquímicos foram realizados a partir de folhas e inflorescências frescas. As secções transversais (10-20 µm) de folhas foram realizadas em micrótomo de deslize (Leica SM 2000R), a partir de adaptação da técnica de Sass (1951) para este aparelho. No estudo das inflorescências, as flores femininas e hermafroditas foram destacadas da inflorescência. Os reativos empregados foram:

lugol, na caracterização de amido (BERLYN & MIKSCHE, 1976), cloreto férrico 3%, para substâncias fenólicas (JOHANSEN, 1940) e sudan III (SASS, 1951), para substâncias lipofílicas.

Os desenhos, que acompanham a descrição morfológica de capítulo floral, floretas femininas e hermafroditas e de folhas foram realizados em câmara clara, em escala.

Após a observação preliminar, ao microscópio de luz (Olympus®-CH2), os principais caracteres anatômicos e detalhes importantes para a caracterização da espécie foram registrados por meio de fotomicrografias, tendo-se obtido as escalas nas mesmas condições óticas. Nos registros fotomicrográficos, empregou-se o microscópio Nikon® (Eclipse-E-600), equipado com sistema de fotodocumentação (H-III).

5 RESULTADOS

5.1 Rendimentos das extrações na obtenção dos infusos, extratos hidroetanólicos e no fracionamento

5.1.1 Extratos de *A. annua*

Os valores dos rendimentos (% m/m) das extrações, por percolação com etanol 98° GL e por infusão, realizadas a partir de folhas e capítulos florais de *A. annua*, provenientes de coletas realizadas, nas fenofases: vegetativa, pré-floração e floração plena (**Tabela 1**), a partir de material vegetal *in natura* e da droga, foram dispostos na **Tabela 5**.

Os rendimentos do processo de percolação, na fenofase vegetativa, foram maiores a partir do material *in natura*, enquanto que na pré-floração, considerando as determinações dos exemplares 1 e 4, os rendimentos foram maiores para as extrações realizadas a partir da droga. Na floração, as determinações a partir dos exemplares 2 e 4 não apresentaram perfil uniforme de comportamento em relação ao estado de conservação (**Tabela 5**).

Os rendimentos obtidos no processo de infusão, na fenofase vegetativa, considerando os exemplares 1 a 3, foram praticamente equivalentes para os materiais extraídos *in natura* e na forma de droga. Na pré-floração e na floração plena, os exemplares 1,2 e 4, mostraram maiores valores de rendimentos de extração a partir da droga (**Tabela 5**).

Considerados os dois processos de extração empregados a partir de materiais com, formas de conservação equivalentes (*in natura* e droga) e obtidos nas mesmas fenofases, de forma geral, observou-se que os valores dos rendimentos pelo processo de infusão foram superiores àqueles resultantes da percolação com etanol 96°GL (**Tabela 5**).

19499

TABELA 5 - Rendimentos das extrações (% m/m), por percolação (etanol 96° GL) e por infusão, das partes aéreas (*in natura* e droga) de *Artemisia annua* L., coletadas nas fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena, efetuadas por percolação com etanol 96°GL e por infusão

<i>Artemisia annua</i> L. (*) Rendimento das extrações (% m/m) (M ± D.P.)												
Percolação (etanol 96°GL)				Infusão								
EXE	<i>in natura</i>			droga			<i>in natura</i>			droga		
	VEG	PRE	FLOR	VEG	PRE	FLOR	VEG	PRE	FLOR	VEG	PRE	FLOR
FENOFASE												
1	22,2±2,8	13,3±1,9	17,8±2,5	14,8±1,4	16,8±2,1	nd	35,8±2,4	14,0±0,6	27,4±2,2	35,8±1,2	33,5±2,1	37,2±0,3
2	27,4±0,3	5,1±0,9	14,8±0,3	21,5±3,1	nd	25,2±1,8	28,4±2,4	10,1±0,3	17,7±2,8	33,0±1,5	34,2±0,3	36,2±0,6
3	30,1±1,4	8,6±0,1	15,9±0,5	nd	nd	nd	33,8±0,3	nd	23,4±0,4	33,3±1,1	nd	nd
4	30,8±1,7	14,7±0,2	26,2±0,9	26,6±1,1	19,0±1,6	18,3±3,8	59,3±3,1	14,2±1,1	26,5±0,7	32,9±0,8	35,0±1,5	36,0±0,2

(*) **Material vegetal:** Folha (fenofases: vegetativa e antese), capítulo floral (fenofases antese e floração). **Estado conservação** (material vegetal usado no preparo dos extratos): *in natura*, droga **EXE:** (1-4) exemplares demarcados para o estudo. **Fenofase:** **VEG:** vegetativa; **PRE:** pré-floração; **FLOR:** floração plena. **Rendimento:** Valores médios (**M**) determinados, a partir de 4 exemplares, em triplicata (n=3) e considerando a massa seca para o material *in natura*, **DP:** desvio-padrão. **Processo de extração:** **Percolação:** realizada com etanol 96 °GL, a partir de material vegetal *in natura* (8 g) e droga (2 g). **Infusão:** realizada a partir de material vegetal *in natura* (8 g / 400mL) e droga (2 g / 400mL). **nd:** dados não determinados.

5.1.2 Extratos de *B. pilosa*

Os valores de rendimento (% m/m) das extrações, por percolação com etanol 96° GL e por infusão, realizadas a partir de folha, vegetal inteiro e raiz de *B. pilosa*, coletados nas fenofases: vegetativa, pré-floração, floração plena e de frutificação (**Tabela 2**), a partir de material vegetal *in natura* e da droga encontram-se, na **Tabela 6**.

Os valores dos rendimentos do processo de percolação de folhas, vegetal inteiro e raízes, nas fenofases de floração e frutificação foram maiores para a droga em relação àqueles da percolação realizada com os mesmos materiais *in natura*. Além disto, nestas duas fenofases, os rendimentos das percolações de folhas foram superiores àquele do vegetal inteiro e das raízes (**Tabela 6**).

Os rendimentos das extrações do vegetal inteiro, na fenofase vegetativa, e das raízes, na fenofase de pré-floração, igualmente apresentaram valores superiores para a droga (**Tabela 6**).

No preparo dos infusos, o mesmo comportamento dos valores dos rendimentos foi observado. A infusão da droga obteve, em geral, maior nível de rendimento, independentemente da fenofase, não se podendo tecer comentário acerca do vegetal inteiro, nas fenofases de floração e de frutificação, uma vez que, nestes casos, não se preparou o infuso a partir da droga (**Tabela 6**).

No tocante à infusão realizada com folhas e com o vegetal inteiro, coletados nas fenofases vegetativa e de pré-floração, observaram-se as maiores diferenças entre os valores obtidos para as extrações, a partir do material *in natura* e da droga, tendo sido de cerca de 11 a 15 vezes superior, para a droga. De forma geral, estas diferenças foram superiores, igualmente, àquelas observadas em situação correspondente, para o processo de percolação com etanol 96° GL, nas fenofases de floração e de frutificação, quando foi possível coletar os dados completos e estabelecer a comparação para os diferentes órgãos. No caso da percolação, as diferenças mais pronunciadas foram constatadas para a droga originada do vegetal inteiro, cujo valor de rendimento de extração chegou a ser sete vezes superior em relação àquele *in natura* (**Tabela 6**).

TABELA 6 - Rendimentos das extrações (% m/m), por percolação (etanol 96° GL) e por infusão, de órgãos vegetais distintos (*in natura* e droga) de *Bidens pilosa* L, coletados nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e de frutificação, efetuadas por percolação com etanol 96°GL e por infusão

Bidens pilosa L.(*)																
Rendimento das extrações (% m/m)																
(M ± D.P.)																
ORG	Percolação (etanol 96°GL)								Infusão							
	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR
	FENOFASE															
VEG		PRE		FLO		FRU		VEG		PRE		FLO		FRU		
FO	8,7±0,6	nd	nd	nd	3,1±0,4	17,4±0,0	48,7±5,1	52,2±3,9	2,7±0,2	30,3±2,4	1,7±0,3	21,5±0,7	2,8±0,3	27,8±1,2	24,2±0,4	27,6±0,2
VI	6,7±0,4	10,5±0,1	3,1±0,5	nd	1,5±0,1	10,8±0,7	1,8±0,3	10,5±1,2	1,5±0,1	21,2±0,9	1,2±0,1	18,5±0,9	1,5±0,0	nd	1,2±0,1	nd
RZ	2,7±0,3	Nd	1,9±0,2	12,6±0,4	1,5±0,2	9,6±0,8	7,5±0,2	9,2±0,7	1,2±0,2	3,5±0,1	0,8±0,1	4,4±0,3	1,4±0,1	3,7±0,3	1,0±0,1	4,5±0,2

(*) **Material vegetal/ORG**: órgão vegetal: **FO**: folhas, **VI**: vegetal inteiro, **RZ**: raízes. **Processo de extração**: **Percolação**: realizada com etanol 96 °GL, a partir de material vegetal *in natura* (8 g) e droga (2 g). **Infusão**: realizada a partir de material vegetal *in natura* e droga (2 g/ 200mL). **Estado conservação** (material vegetal usado no preparo dos extratos): **IN**: *in natura*, **DR**: droga **Fenofase**: **VEG**: vegetativa; **PRE**: pré-floração; **FLO**: floração plena; **FRU**: frutificação. **Rendimento**: Valores médios (**M**) determinados, a partir de cinco exemplares, em duplicata (n=2), e considerando a massa seca para o material *in natura*, **DP**: desvio-padrão. **nd**: dados não determinados.

5.1.3 Fracionamento dos extratos hidroetanólicos

Os valores de rendimento do fracionamento (% m/m) dos extratos hidroetanólicos das partes aéreas (*in natura* e droga) de *A. annua*, coletadas nas três fenofases, com os solventes: *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, estão na **Tabela 7**. Nesta, é possível verificar que para uma mesma fenofase, independentemente do estado de conservação do material vegetal (*in natura* e droga) empregado no preparo do extrato de origem da fração, as frações obtidas em metanol apresentaram os maiores teores de resíduo, enquanto que as frações em acetato de etila mostraram os menores rendimentos. Para as frações em *n*-hexano e diclorometano, não foi observada tendência uniforme quanto aos rendimentos entre fenofases e em relação ao estado de conservação das partes vegetais.

TABELA 7 - Rendimentos do fracionamento (% m/m) dos extratos hidroetanólicos das partes aéreas (*in natura* e droga) de *Artemisia annua* L., coletadas nas fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena

<i>Artemisia annua</i> L.(*)						
Rendimento do fracionamento						
(% m/m)						
FRAÇÃO	Extrato hidroetanólico					
	<i>in natura</i>			droga		
	FENOFASE					
	VEG	PRE	FLO	VEG	PRE	FLO
<i>n</i> -hexano	8,75	18,57	12,85	13,20	16,08	11,02
diclorometano	30,51	11,10	8,66	36,77	22,17	7,35
acetato de etila	6,08	2,04	5,46	6,71	9,85	6,82
metanol	47,86	35,74	38,98	42,92	50,69	40,27

Partes aéreas/(*): Folha (fenofases vegetativa e pré-floração), capítulo floral (fenofases pré-floração e floração plena). **Estado conservação** (material vegetal: usado no preparo dos extratos hidroetanólicos de origem): *in natura*, droga **Fenofase:** **VEG:**vegetativa; **PRE:**pré-floração; **FLO:**floração plena. **Rendimento:** Valores determinados para uma amostra de cada extrato (item 4.4.3)

Os valores de rendimento do fracionamento (% m/m) dos extratos hidroetanólicos de folhas e raízes (*in natura* e droga) de *B. pilosa*, nas fenofases vegetativa e de frutificação constam da **Tabela 8**.

Segundo a **Tabela 8**, verificou-se que o percentual majoritário de resíduo ocorreu nas frações *n*-hexano e metanol, respectivamente, para *A. annua* e *B. pilosa*.

Com relação ao estado de conservação do material vegetal empregado no preparo dos extratos hidroetanólicos de origem, observou-se que, independentemente do solvente empregado no fracionamento dos mesmos e do órgão vegetal considerado, o maior percentual de resíduo foi obtido a partir da droga, sendo que para *A. annua*, em geral, as diferenças entre extratos obtidos a partir da droga e do material *in natura*, foram mais acentuadas do que para *B. pilosa* (**Tabela 8**).

TABELA 8 - Rendimentos do fracionamento (% m/m) dos extratos hidroetanólicos de folhas e raízes (*in natura* e droga) de *Bidens pilosa* L., coletadas nas fenofases vegetativa e de frutificação

FRAÇÃO	<i>B. pilosa</i> L.(*)			
	Rendimento das frações			
	(% m/m)			
	Extrato hidroetanólico			
	<i>in natura</i>		droga	
	FENOFASE			
	VEG		FRU	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz
<i>n</i> -hexano	58,99	8,41	61,03	16,63
diclorometano	5,19	2,33	7,42	2,58
acetato de etila	9,72	1,54	11,32	4,93
metanol	3,33	59,00	5,22	59,41

Órgãos vegetais/(*): Folhas e raízes. **Estado conservação** (material vegetal: usado no preparo dos extratos hidroetanólicos de origem): *in natura*, droga **Fenofase**: **VEG**: vegetativa; **FRU**: frutificação. **Rendimento**: Valores determinados para uma amostra de cada extrato (**item 4.4.3**)

5.2 Parâmetros físico-químicos

O resultado das determinações dos parâmetros físico-químicos das partes aéreas de *A. annua* encontra-se, na **Tabela 9**. Nesta, foram dispostos os valores médios de massa seca das partes aéreas *in natura* de dois exemplares desta espécie e os valores médios de: resíduo seco, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, obtidos a partir da droga, nas três fenofases estudadas.

As partes aéreas *in natura* de *A. annua* apresentaram valores de massa seca decrescentes, na seguinte seqüência cronológica: pré-floração, floração plena e vegetativa (**Tabela 9**), sendo que nesta última, foram de cerca da metade, em relação à fenofase de floração plena.

Na droga, verificou-se que os teores de cinzas totais foram superiores na fase vegetativa (**Tabela 9**), enquanto que, na pré-floração e na floração plena, os órgãos aéreos apresentaram conteúdos equivalentes. O mesmo comportamento foi observado para os teores de resíduo seco insolúveis em ácido da droga obtida de materiais coletados nestas duas últimas fenofases (**Tabela 9**), que foi inferior a 0,2% (m/m).

O material referente às partes aéreas da fenofase vegetativa, transformadas em droga, não apresentou resíduo seco insolúvel em ácido (**Tabela 9**).

TABELA 9 – Determinação dos valores médios de massa seca das partes aéreas *in natura*, cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido da droga, a partir de dois exemplares de *A. annua* L., nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena

A. annua L.			
Folhas e capítulos florais*			
FENOFASE	Massa seca	Cinzas totais	Cinzas totais insolúveis em ácido
	In natura	Droga	
	% (m/m) (M ± D.P.)		
VEGETATIVA	25,280 ± 0,901	8,605 ± 0,702	0
PRÉ-FLORAÇÃO	64,965 ± 1,124	7,735 ± 0,252	0,150 ± 0,042
FLORAÇÃO PLENA	52,295 ± 12,862	7,425 ± 0,451	0,140 ± 0,014

Valores médios (% m/m) determinados, em duplicata (n=2), a partir de 2 exemplares de *A. annua* ; **M**: média, **D.P.**: desvio-padrão. (*) Folhas (fenofases vegetativa e pré-floração), capítulos florais (fenofases pré-floração e floração)

Os resultados das determinações dos resíduos secos de folhas, vegetal inteiro e raízes de *B. pilosa* (droga), a partir de cinco exemplares coletados nas quatro fenofases estudadas, foram apresentados na **Tabela 10**.

De forma geral, os valores dos teores de resíduo seco não variaram consideravelmente para os mesmos órgãos vegetais estudados nas quatro fenofases (**Tabela 10**), sendo que os teores foram crescentes na seguinte seqüência: folhas, vegetal inteiro e raízes.

Os teores de resíduos secos das drogas constituídas de folhas e de raízes apresentaram níveis ligeiramente superiores, na floração plena e na frutificação, em relação às demais fenofases avaliadas (**Tabela 10**), enquanto que, no vegetal inteiro, o comportamento não mostrou tendência uniforme.

TABELA 10 - Determinação dos valores médios de resíduo seco de folhas, vegetal inteiro e raízes (droga) a partir de cinco exemplares de *Bidens pilosa* L., nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação

FENOFASE	<i>B. pilosa</i> L.		
	% RESÍDUO SECO (m/m)		
	(M ± D.P.)		
	FOLHAS	VEGETAL INTEIRO	RAÍZES
VEGETATIVA	85,9 ± 5,1	88,5 ± 3,7	91,0 ± 2,3
PRÉ-FLORAÇÃO	84,3 ± 3,7	90,2 ± 1,5	91,3 ± 4,1
FLORAÇÃO PLENA	86,0 ± 6,8	89,0 ± 3,5	92,2 ± 1,7
FRUTIFICAÇÃO	86,6 ± 7,7	91,2 ± 1,8	92,2 ± 2,8

Valores médios (% m/m) determinados, em duplicata (n=2), a partir de 5 exemplares de *B. pilosa* ; **M**: média, **D.P.**: desvio-padrão.

5.3 Teor de flavonóides totais

Na avaliação dos teores de flavonóides totais, nos extratos de *A. annua* e de *B. pilosa* e na droga de *A. annua*, nas diferentes fenofases e considerando os estados de conservação do material de origem empregado na sua obtenção (Tabelas 1 e 2), por meio de espectrofotometria/UV (item 4.6.1), foi estabelecida a reta analítica, considerando-se a curva de Ringbom, ambas determinadas com base no padrão de quercetina.

5.3.1 Curva de Ringbom e reta analítica do padrão de quercetina

A curva de Ringbom, construída a partir dos dados de absorbância (100-%T) em função do logaritmo das concentrações de quercetina, encontra-se na Figura 9.

FIGURA 9 - Curva de Ringbom do padrão de quercetina [concentrações: 2 a 40 µg/ mL; T = transmitância; λ :425 nm; item 4.6.1.1]

A reta analítica da quercetina elaborada, uma vez determinada a faixa de linearidade das determinações, situada entre as concentrações de 4 e 12 µg/ mL da solução-padrão de quercetina (Figura 9), encontra-se na Figura 10.

FIGURA 10 - Reta analítica do padrão de quercetina (absorbância x concentração) [λ :425 nm; item 4.6.1.1], equação da reta e r.

5.3.2 Teor de flavonóides totais em *A. annua*

Na **Tabela 11**, encontram-se os valores médios dos teores de flavonóides totais encontrados na droga (item 4.3.2), constituída de folhas e capítulos florais de *A. annua*, e determinados a partir de um exemplar demarcado, nas três fenofases de coleta, bem como nos extratos hidroetanólicos e infusos (**Tabela 1**), preparados a partir do material vegetal *in natura* e na forma de droga.

Considerando as determinações do extrato hidroetanólico da droga elaborada a partir do exemplar de *A. annua*, os teores de flavonóides totais atingiram o valor máximo na fenofase de floração plena (**Tabela 11**), independentemente do estado de conservação do material de origem. O mesmo comportamento foi observado para os infusos preparados a partir da droga (**Tabela 11**).

No caso dos infusos obtidos das partes aéreas frescas, o maior teor de flavonóides totais foi recuperado naqueles referentes à fenofase vegetativa, tendo sido próximo daquele da fenofase de floração plena (**Tabela 11**).

Na **Tabela 11**, nota-se, claramente, pelos valores absolutos das porcentagens de flavonóides totais, que os extratos hidroetanólicos continham maior teor de flavonóides que os infusos, em todas as fenofases consideradas e independentemente do estado de conservação das partes aéreas extraídas.

TABELA 11 - Teores médios de flavonóides totais ($M \pm D.P.$), em folhas e capítulos florais de *A. annua* (droga) e nos extratos hidroetanólicos e infusos destes órgãos vegetais, *in natura* e na forma de droga, provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena, determinados por espectrofotometria ($AlCl_3$, λ : 425 nm) e expressos com base na concentração de quercetina

Artemisia annua L.														
FLAVONOIDES TOTAIS (% , m/m)														
(M± D.P.)														
FOLHAS E CAPÍTULOS FLORAIS (* , **)					Percolação (etanol 96°GL)					Infusão				
droga					in natura					in natura				
droga					droga					droga				
FENOFASE														
VEG	PRÉ	FLOR	VEG	PRE	FLOR	VEG	PRE	FLOR	VEG	PRE	FLOR	VEG	PRE	FLOR
0,13±0,00	0,14±0,00	0,16±0,00	2,61±0,09	2,31±0,08	4,68±0,04	1,15±0,03	1,73±0,04	2,29±0,46	0,21±0,01	0,10±0,00	0,09±0,01	0,06±0,00	0,14±0,01	0,22±0,02

Flavonóides totais : Valores médios (**M**) determinados, em triplicata (n=3), com base no teor de quercetina, a partir de 1 exemplar de *A. annua*, e considerando a massa seca do material *in natura*, quando usado no preparo dos extratos, **D.P.** : desvio-padrão, **Extrato hidroetanólico**: obtido por percolação com etanol 96 °GL, a partir de material vegetal *in natura* (8 g) e droga (2 g). **Infuso**: obtido por infusão de material vegetal *in natura* (8 g / 400mL) e droga (2 g/ 400mL). **Estado conservação** (material vegetal usado no preparo dos extratos): **IN**: *in natura* e droga. **Fenofase** (do material de origem): **VEG**:vegetativa; **PRE**: pré-floração; **FLOR**:floração plena; **nd** = não determinado. (*) **Material vegetal**: Folhas (fenofases: vegetativa e pré-floração), capítulos florais (pré-floração e floração plena); ** Determinações realizadas a partir do extrato em metanol (item 4.6.1.2), **AlCl₃**: solução de cloreto de alumínio 2,5% (m/v), empregada como reagente, λ : comprimento de onda empregado nas determinações espectrofotométricas.

5.3.3 Teor de flavonóides totais em *B. pilosa*

Os valores médios dos teores de flavonóides totais nos extratos hidroetanólicos e infusos obtidos a partir de folhas, vegetal inteiro e raízes (*in natura* e droga) de cinco exemplares (item 4.3.2), nas quatro fenofases de coleta (Tabela 2), foram dispostos na Tabela 12.

Os dados determinados para os extratos hidroetanólicos de folhas *in natura* mostraram que o maior teor de flavonóides ocorreu na fenofase vegetativa, considerando que os valores correspondentes à fenofase de pré-floração não foram determinados. Para aqueles preparados com o vegetal inteiro, o maior conteúdo de flavonóides foi observado na pré-floração. Enquanto que, os extratos equivalentes preparados a partir das raízes apresentaram os teores similares e com o maior valor nas duas fenofases citadas (Tabela 12). O maior teor de flavonóides foi observado no extrato hidroetanólico de folhas (0,308%, m/m)

Os infusos, preparados a partir dos órgãos vegetais *in natura*, apresentaram os maiores teores no período de frutificação, tanto naqueles de folhas quanto naqueles de raízes e do vegetal inteiro, devendo-se considerar que para este último não houve determinação, na fase de pré-floração (Tabela 12).

No caso dos extratos hidroetanólicos obtidos da droga, com a ressalva de que faltaram determinações em uma ou duas fenofases para cada órgão vegetal analisado, pode-se dizer que, de forma geral, os maiores teores de flavonóides foram observados nos extratos obtidos de material vegetal coletado nas épocas de floração plena ou frutificação (Tabela 12). Além disto, o maior teor ocorreu nos extratos hidroetanólicos de folhas coletadas durante a frutificação ($0,236 \pm 0,052$ %, m/m).

Nos infusos preparados a partir de folhas, na forma de droga, o maior teor de flavonóides totais ($0,165\% \pm 0,031$, m/m) foi obtido na fenofase vegetativa, enquanto que, naqueles de raízes (droga), observou-se na frutificação (0,0024%, m/m). Para os infusos preparados com o vegetal inteiro (droga) não foram realizadas determinações daqueles obtidos na floração plena e frutificação, sendo que nas outras duas fases, não houve, praticamente, variação no teor (Tabela 12).

De forma geral, os infusos apresentaram teores de flavonóides totais muito baixos, tendo sido inferiores àqueles dos extratos hidroetanólicos correspondentes (Tabela 12).

TABELA 12 - Teores médios de flavonóides totais ($M \pm D.P.$), nos extratos hidroetanólicos e infusos de folhas vegetal inteiro e raízes de *B. pilosa*, *in natura* e na forma de droga, provenientes de cinco exemplares, coletados nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação, determinados por espectrofotometria ($AlCl_3$, λ : 425 nm) e expressos com base na concentração de quercetina.

<i>Bidens pilosa</i> L.										
FLAVONOIDEOS TOTAIS (% m/m)										
(M $\pm$ D.P.)										
Órgão(s) vegetal (is)	EXTRATO	VEG		PRE		FLOR		FRUT		
		IN	DROGA	IN	DROGA	IN	DROGA	IN	DROGA	
folhas	EHE	0,3080 $\pm$ 0,0190	nd	nd	nd	0,1500 $\pm$ 0,0370	0,2160 $\pm$ 0,0080	0,1430 $\pm$ 0,0000	0,2360 $\pm$ 0,0520	
	INF	0,0003 $\pm$ 0,0000	0,1650 $\pm$ 0,0310	0,0002 $\pm$ 0,0000	0,0480 $\pm$ 0,0010	0,0002 $\pm$ 0,0000	0,0880 $\pm$ 0,0070	0,0025 $\pm$ 0,0001	0,0880 $\pm$ 0,0070	
vegetal inteiro	EHE	0,0490 $\pm$ 0,0000	0,0220 $\pm$ 0,0050	0,1390 $\pm$ 0,0420	nd	0,0240 $\pm$ 0,0010	0,0670 $\pm$ 0,0010	0,0280 $\pm$ 0,0010	0,0250 $\pm$ 0,0030	
	INF	0,0001 $\pm$ 0,0000	0,0700 $\pm$ 0,0040	nd	0,0640 $\pm$ 0,0107	0,0001 $\pm$ 0,0000	nd	0,0013 $\pm$ 0,0001	nd	
raízes	EHE	0,0060 $\pm$ 0,0000	nd	0,0060 $\pm$ 0,0000	0,0060 $\pm$ 0,0000	nd	0,0060 $\pm$ 0,0000	0,0060 $\pm$ 0,0000	0,0070 $\pm$ 0,0000	
	INF	0,0001 $\pm$ 0,0000	0,0020 $\pm$ 0,0000	0,0000 $\pm$ 0,0000	0,0000 $\pm$ 0,0000	0,0001 $\pm$ 0,0000	0,0011 $\pm$ 0,0000	0,0002	0,0024 $\pm$ 0,0000	

Flavonóides totais: Valores médios (**M**) determinados, em triplicata ($n=3$), com base no teor de quercetina, a partir de 5 exemplares de *B. pilosa*, e considerando a massa seca do material *in natura*, quando usado no preparo dos extratos, **D.P.**: desvio-padrão, **EXTRATO:** EHE: extrato hidroetanólico [obtido por percolação com etanol 96 °GL, a partir de material vegetal *in natura* (8 g) e droga (2 g)]. **INF:** infuso [obtido por infusão realizada a partir de material vegetal *in natura* e droga (2 g/200mL)]. **Estado conservação** (material vegetal usado no preparo dos extratos); **IN:** *in natura* e droga; **Fenofase** (do material de origem): **VEG:** vegetativa; **PRE:** pré-floração; **FLO:** floração plena; **FRU:** frutificação; **nd:** dados não determinado

5.4 Determinação do teor de artemisinina nos extratos de *A. annua*

Na avaliação dos teores de artemisinina, por CLAE/UV (item 4.7.1.1), nos extratos de *A. annua*, obtidos a partir de folhas e capítulos florais, *in natura* e em forma de droga, nas três fenofases (Tabela 1), validou-se previamente o método adaptado de Zhao & Zheng (1985) e elaborou-se a curva analítica para o padrão da artemisinina derivatizada (composto Q260).

5.4.1 Validação do método empregado na quantificação de artemisinina, por CLAE/UV

5.4.1.1 Curva analítica e linearidade

A equação da reta foi determinada, por regressão linear, tendo fornecido a equação seguinte: $y = 1356 x - 13328$, onde os valores de y correspondem à área e aqueles de x , à concentração de artemisinina. O coeficiente de correlação (r) foi de 0,999.

A curva analítica do padrão de artemisinina, convertido no composto Q260, por derivatização (item 4.7.1.1.1), encontra-se na Figura 11.

FIGURA 11 – Curva analítica do padrão de artemisinina convertido a Q260 (Zhao & Zheng, 1985/modif) (área x concentração) [λ : 260 nm; item 4.7.1.1.3], equação da reta e r .

5.4.1.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos extratos em acetonitrila derivatizados (item 4.7.1.1.3).

Os valores médios dos teores, obtidos a partir da equação da reta e o desvio padrão relativo (DPR) de cinco determinações para cada amostra constituídas do extrato em acetonitrila da droga nas três fenofases estudadas, foram apresentados na Tabela 13.

Segundo a Tabela 13, os DPR ficaram situados entre 1,7 e 6,6% e a maior concentração de artemisinina nos extratos em acetonitrila da droga foram proveniente das amostras da fenofase de floração plena (0,88%, m/m).

TABELA 13 - Precisão do método de quantificação* da artemisinina por CLAE/UV- Concentração média de artemisinina ($M \pm D.P.$) (n=5) nas amostras dos extratos em acetonitrila de *A. annua* (droga, 3 fenofases) e respectivos desvios padrão relativos (DPR)

Precisão		
<i>Artemisia annua</i> L	Concentração de artemisinina	DPR
Amostra	($M \pm D.P.$)	(%)
Extrato em acetonitrila de partes aéreas (*) - Fenofase	(%, m/m)	
VEG	0,60 $\pm$ 0,03	3,39
PRE	0,68 $\pm$ 0,01	1,70
FLOR	0,88 $\pm$ 0,02	6,60

***Método de quantificação:** adaptado de Zhao & Zeng (1985). M = média dos valores de concentração das cinco réplicas (n=5), a partir de amostras preparadas de partes aéreas (droga) de um exemplar (2) de *A. annua*, coletado nas 3 fenofases, D.P.: desvio-padrão, DPR= desvio padrão relativo. **Fenofase** (do material de origem): **VEG:**vegetativa; **PRE:**pré-floração; **FLOR:**floração plena; **(*) Partes aéreas:** Folhas (fenofases: vegetativa e pré-floração), capítulos florais (pré-floração e floração plena)

5.4.1.3 Limite de detecção

Através da medida da linearidade, com os dados obtidos por área, foi calculado o limite de detecção, tendo sido obtido o valor de 0,832 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.1.4 Fator de recuperação

Os valores médios do fator de recuperação de artemisinina e seus respectivos coeficientes de variação obtidos, a partir dos extratos em acetonitrila, empregando o método adaptado de Zhao & Zeng (1985), encontram-se na Tabela 14.

Na **Tabela 14**, verificou-se que o intervalo de recuperação foi de 81,98 a 94,31%, com coeficiente de variação de até 2,88%.

TABELA 14 - Recuperação (%) (n=5) de artemisinina, a partir das amostras dos extratos em acetonitrila de *A. annua* (droga, 3 fenofases) e respectivos coeficientes de variação (CV), pelo método de quantificação* de artemisinina, por CLAE

Recuperação		
<i>Artemisia annua</i> L	Fator de recuperação	CV
Amostra	(%)	(%)
Extrato em acetonitrila de partes aéreas (*) - Fenofase		
VEG	94,31	1,81
PRE	81,09	2,49
FLOR	88,98	2,88

***Método de quantificação**: adaptado de Zhao & Zeng (1985). M = média dos valores do fator de recuperação das cinco réplicas (n=5), a partir de amostras preparadas de partes aéreas (droga) de um exemplar de *A. annua*, coletado nas 3 fenofases, **C.V.**= coeficiente de variação. **Fenofase** (do material de origem): **VEG**:vegetativa; **PRE**:pré-floração; **FLOR**:floração plena; **(*) Partes aéreas**: Folhas (fenofases: vegetativa e pré-floração), capítulos florais (pré-floração e floração plena)

5.4.2 Cromatogramas do padrão de artemisinina e dos extratos

O cromatograma CLAE/UV do derivado Q260 da artemisinina derivatizada (composto Q260) encontra-se na **Figura 12**. O máximo de absorção deste composto ocorreu em 260 nm (**item 4.7.1.1.3**) e o tempo de retenção (T_R) foi relativamente baixo, de 5,6 ou 6,6 minutos (**Figura 12**).

FIGURA 12 - Cromatograma (CLAE, coluna C-18) das soluções do derivado do padrão de artemisinina (Q260) (mAU x min) [Fase móvel: solução de tampão KH_2PO_4 10 mM/ acetonitrila (70:30, v/v). Fluxo: 1 mL/min, T_R : 6,2 min, λ : 260 nm]

Os cromatogramas obtidos dos extratos hidroetanólicos e infusos de *A. annua* (**Tabela 1**) foram dispostos, respectivamente, nas **Figuras 13 e 14**.

Os picos de artemisinina foram observados em todos os extratos de *A. annua*, tendo apresentado maior intensidade nos extratos hidroetanólicos (**Figuras 13 e 14**).

FIGURA 13 - Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos extratos **hidroetanólicos** (após derivatização da artemisinina - **item 4.7.1.1.2**) das partes aéreas de *A. annua* (mAU x min) obtidos a partir do material vegetal (*in natura* e droga) proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena [Fase móvel: solução de tampão KH_2PO_4 10 mM/ acetonitrila (70:30, v/v). Fluxo: 1 mL/min, λ : 260 nm]

FIGURA 14 - Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos **infusos** (após derivatização da artemisinina - **item 4.7.1.1.2**) das partes aéreas de *A. annua* (mAU x min), obtidos a partir do material vegetal (*in natura* e droga) proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena [Fase móvel: solução de tampão KH_2PO_4 10 mM/ acetonitrila (70:30, v/v). Fluxo: 1 mL/min, λ : 260 nm]

5.4.3 Teores de artemisinina nos extratos

Os valores médios de três determinações dos teores de artemisinina, nos extratos hidroetanólicos e infusos (**Tabela 1**) das partes aéreas (*in natura*, droga) do exemplar de *A. annua*, obtidos nas três fenofases estudadas, foram calculados a partir da equação da reta (**item 5.4.1.1**) e dispostos na **Tabela 15**.

Os valores dos teores de artemisinina nos diferentes extratos hidroetanólicos foram superiores àqueles encontrados nos infusos (**Tabela 15**). O maior teor do composto ocorreu nos extratos hidroetanólicos e infusos da droga obtida na fenofase de floração plena.

Tanto nos extratos hidroetanólicos, quanto nos infusos, preparados a partir de partes aéreas, obtidas nas fenofases de pré-floração e de floração plena, o teor de artemisinina foi superior para o material submetido à secagem (droga). Na fenofase vegetativa, o comportamento foi inverso, sendo a diferença mais pronunciada para o extrato hidroetanólico (**Tabela 15**).

TABELA 15 - Teores médios de artemisinina ($M \pm D.P.$), nos extratos hidroetanólicos e infusos de folhas e capítulos florais (*in natura* e droga) de *A. annua*, provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena, determinados por CLAE/UV (NaOH, λ : 260 nm)

<i>Artemisia annua</i> L.(*)						
Teor de artemisinina (% m/m)						
$(M \pm D.P.)$						
EXTRATO	FENOFASE					
	VEGETATIVA		PRÉ-FLORAÇÃO		FLORAÇÃO PLENA	
	<i>IN</i>	DROGA	<i>IN</i>	DROGA	<i>IN</i>	DROGA
EXTRATO HIDROETANÓLICO	1,14 $\pm$ 0,12	0,65 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,11	1,21 $\pm$ 0,11
INFUSO	0,37 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,00

Teor de artemisinina: Valores médios (**M**) determinados, por CLAE/UV, em triplicata (n=3), a partir de 1 exemplar demarcado (2) de *A. annua* (**item 4.7.1.1**), e considerando a massa seca do material *in natura*, quando usado no preparo dos extratos, **D.P.**: desvio-padrão, **Estado de conservação** (material vegetal usado no preparo dos extratos): **IN**: *in natura* e droga. **Fenofase** (do material de origem): **VEG**: vegetativa; **PRE**: pré-floração; **FLOR**: floração plena; (*) **Material vegetal**: Folhas (fenofases: vegetativa e pré-floração), capítulos florais (floração); **NaOH**: solução de hidróxido de sódio 0,2% (m/v), empregada na derivatização da artemisinina em Q260, **λ 260 nm**: comprimento de onda de detecção

5.5 Detecção dos marcadores flavonoídicos nos extratos por CLAE/UV

Foram obtidos os cromatogramas dos padrões dos flavonóides, selecionados como marcadores (**Figura 14**), e dos extratos em metanol de *A. annua* (**Figura 15**) e *B. pilosa* (**Figura 16**), nas mesmas condições analíticas (**item 4.7.1.2.3**).

Os tempos de retenção dos padrões de quercetina e de rutina foram de, respectivamente, 37,07 e 15,58 minutos (**Figura 14**).

FIGURA 15 - Cromatograma (CLAE, coluna C-18) das soluções dos padrões de **quercetina e rutina** (mAU x min) [Fase móvel: gradientes A/B: sol. ácido acético 10% (v/v) (A)/acetonitrila (B) (**item 4.7.1.2.3**). Fluxo 0,5 mL/min, T_R (quercetina): 37,07 min, T_R (rutina): 15,58 min., λ : 260 nm]

5.5.1 *A. annua*

A detecção de quercetina e de rutina nos extratos hidroetanólicos e infusos (**Tabela 1**) de *A. annua* foi realizada, tendo sido reconhecida quando se verificou a presença de dois picos, nos mesmos tempos de retenção dos padrões

(Figura 14), nos cromatogramas dos extratos hidroetanólicos (Figura 15) e dos infusos (Figura 16).

FIGURA 16 - Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos extratos **hidroetanólicos** das partes aéreas de um exemplar ***A. annua*** (mAU x min), obtidos a partir do material vegetal (*in natura* e droga), proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena [Fase móvel: gradientes A/B: sol. ácido acético 10% (v/v) (A)/acetonitrila (B) (item 4.7.1.2.3). Fluxo 0,5 mL/min, T_R (quercetina): 37,07 min, T_R (rutina): 15,58 min., λ : 260 nm]

FIGURA 17 - Cromatogramas (CLAE, coluna C-18) dos **infusos** das partes aéreas de um exemplar de *A. annua* (mAU x min), obtidos a partir do material vegetal (*in natura* e droga), proveniente das fenofases vegetativa, pré-floração e de floração plena [Fase móvel: gradientes A/B: sol. ácido acético 10% (v/v) (A)/acetonitrila (B) (item 4.7.1.2.3). Fluxo 0,5 mL/min, T_R (quercetina): 37,07 min, T_R (rutina):15,58 min., λ : 260 nm]

Os resultados da pesquisa dos marcadores flavonoídicos, nos extratos de *A. annua* foram resumidos na **Tabela 16**.

Nas análises realizadas, por CLAE/UV, quercetina e rutina foram detectados em todos os extratos de *A. annua* (**Tabela 16**), independentemente de fenofase e do estado de conservação do material vegetal, a partir do qual foram preparados.

TABELA 16 - Avaliação da presença dos marcadores flavonoídicos (quercetina e rutina), por CLAE/UV (λ : 260 nm), nos extratos de partes aéreas (*in natura*, droga) de *A. annua* L., provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena

Artemisia annua L. partes aéreas (*)												
flavonóide	EXTRATO HIDROETANÓLICO						INFUSO					
	FENOFASE											
	VEG		PRE		FLOR		VEG		PRE		FLOR	
	in	dr	in	dr	in	dr	in	dr	in	dr	in	dr
quercetina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rutina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Pesquisa dos marcadores (item 4.7.1.2): (+): presença. **Estado de conservação** (material vegetal usado no preparo dos extratos): *in*: *in natura*, *dr*: droga. **Fenofase** (do material de origem): **VEG**: vegetativa; **PRE**: pré-floração; **FLOR**: floração plena; (*) **Partes aéreas**: Folhas (fenofases: vegetativa e pré-floração), capítulos florais (floração); **λ 260 nm**: comprimento de onda de detecção

5.5.2 *B. pilosa*

A detecção de quercetina e de rutina nos extratos de *B. pilosa* (**Tabela 2**) foi realizada pela constatação da presença dos picos, nos mesmos tempos de retenção dos padrões correspondentes (**Figura 14**), nos cromatogramas dos extratos hidroetanólicos e dos infusos.

A análise dos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa* foi parcial, em relação aos órgãos vegetais e fenofases. A avaliação dos cromatogramas dos cinco extratos hidroetanólicos (**Figura 17**), mostrou que, nos extratos de folhas coletadas durante o período de frutificação, ambos os marcadores não foram detectados naquele de folhas extraídas *in natura* e a rutina foi detectada naquele obtido da droga correspondente.

No extrato hidroetanólico do vegetal inteiro na forma de droga, detectou-se a presença de quercetina, mas não de rutina, na fenofase vegetativa (**Tabela 17**). O mesmo ocorrendo no extrato hidroetanólico das raízes *in natura*, na fenofase de pré-floração. Enquanto que, naquele referente às raízes na forma de droga coletadas na fenofase de frutificação, nenhum dos marcadores foi detectado (**Tabela 17**).

Os resultados da pesquisa dos padrões flavonoídicos, nos infusos de *B. pilosa* foram resumidos na **Tabela 17**.

No tocante aos infusos analisados, pode-se verificar na **Tabela 17**, que todos apresentaram quercetina, independentemente da fenofase de coleta dos órgãos vegetais de origem. Com relação ao estado de conservação somente para os infusos de raízes pode-se constatar que o resultado foi invariável para o material *in natura* e droga. No caso dos infusos de folha, o mesmo pode ser dito, exceto naquele preparado na fenofase de pré-floração, em que não se determinou do extrato preparado a partir da droga.

Nos infusos avaliados, notou-se a ausência de rutina naqueles preparados a partir de folhas na fenofase vegetativa e de raízes, nas fenofases de pré-floração e de frutificação, independentemente da forma de conservação. Naqueles obtidos do vegetal inteiro *in natura*, todos apresentaram o glicosídeo (**Tabela 17**).

TABELA 17 - Avaliação da presença dos marcadores flavonoidicos (quercetina e rutina), por CLAE/UV (λ : 260 nm), nos infusos extratos hidroetanolicos de folhas, vegetal inteiro e raízes (*in natura*, droga) de *B. pilosa* L., provenientes de um exemplar coletado nas fenofases vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação.

<i>Bidens pilosa</i> L.																			
FENOFASE																			
VEGETATIVA				PRE-FLORAÇÃO				FLORAÇÃO PLENA				FRUTIFICAÇÃO							
ÓRG	FOLHAS	VEGETAL INTEIRO	RAÍZES	FOLHAS	VEGETAL INTEIRO	RAÍZES	VEGETAL INTEIRO	FOLHAS	VEGETAL INTEIRO	RAÍZES	VEGETAL INTEIRO	FOLHAS	VEGETAL INTEIRO	RAÍZES	VEGETAL INTEIRO	FOLHAS	VEGETAL INTEIRO	RAÍZES	VEGETAL INTEIRO
E.C.	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN	DR	IN
INFUSOS																			
QUER	+	+	nd	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RUT	-	-	+	+	+	nd	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
EXTRATOS HIDROETANÓLICOS																			
QUER	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	nd
RUT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd

FLAV: flavonóides pesquisados (marcadores): QUER: quercetina, RUT: rutina. Pesquisa dos marcadores (item 4.7.1.2): (+): presença, (-): ausência, nd: não determinado. E.C.: Estado de conservação (relativo ao material vegetal usado no preparo dos extratos): IN: *in natura* e DR: droga. ÓRG: órgão vegetal. (*) Fenofase: referente ao material de origem, do qual obtiveram-se os extratos de *B. pilosa* (Tabela 2); λ 260 nm: comprimento de onda de detecção.

5.6 Perfil cromatográfico das frações orgânicas bioativas dos extratos hidroetanólicos de *A. annua*, por CCD

O perfil cromatográfico das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos de *A. annua*, que apresentaram atividade antileishmania *in vitro* e cujas concentrações inibitórias e citotóxicas *in vitro* de 50% e de 90% foram determinadas (item 4.8.1.2), foi obtido em função dos compostos selecionados como marcadores, neste estudo, ou seja, artemisinina e quercetina (Figuras 17 a 19). Desta forma, as frações analisadas, por CCD, foram aquelas em *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila referentes ao extrato hidroetanólico de *A. annua*, obtido de partes aéreas na forma de droga e coletadas na fenofase de floração plena. Os sistemas cromatográficos foram selecionados em função das classes químicas dos marcadores.

Na fração *n*-hexano, foi caracterizada a presença de artemisinina (Figura 17), como mancha castanho-amarelada de forte intensidade, em Rf: 0,86, além de outros compostos terpênicos, nos Rfs 0,93, 0,80, 0,70, 0,62), revelados pelo anisaldeído sulfúrico (Figura 17). No cromatograma referente ao perfil dos compostos flavonoídicos desta fração (não apresentado), empregando o sistema cromatográfico SC-4 [clorofórmio:acetona:ácido fórmico (75:16,5:5)], a quercetina não foi detectada.

FIGURA 18 - Cromatogramas em camada delgada da fração bioativa *n*-hexano do extrato hidroetanólico das partes aéreas da fenofase de floração plena de *Artemisia annua* L. Perfil cromatográfico dos compostos terpênicos. Marcador: artemisinina (**A**) (R_f : 0,86) [**SC-1**: clorofórmio-acetato de etila (8:2), **item 4.7.1.2**]

Na fração clorofórmio, a artemisinina foi caracterizada, no R_f : 0,70, como mancha alaranjada de forte intensidade (**Figura 18A**), após o emprego do reativo de anisaldeído sulfúrico e do sistema cromatográfico **SC-2** [clorofórmio- acetato de etila - acetona (7:1:1)], além de outras 5 manchas, sendo a maioria arroxeadas e uma amarelada (R_f : 0,42). Nesta mesma fração, a quercetina foi observada em R_f : 0,51, como mancha amarela e de fraca intensidade, quando realizado o desenvolvimento cromatográfico com o **SC- 3** [clorofórmio-acetona- ácido fórmico (75:16,5:5)] e outras três manchas de fraca a média intensidade (**Figura 18B**).

FIGURA 19 - Cromatogramas em camada delgada da fração bioativa clorofórmio do extrato hidroetanólico das partes aéreas da fenofase de floração plena de *Artemisia annua* L. **18A**. Perfil cromatográfico dos compostos terpênicos. Marcador: artemisinina (**A**) (R_f :0,70) [SC-2: clorofórmio-acetato de etila-acetona (7:1:1), item 4.7.1.2]. **18B**. Perfil cromatográfico dos compostos flavonoídicos. Marcador: quercetina (**Q**) (R_f :0,51) [SC-3: clorofórmio-acetona- ácido fórmico (75:16,5:5)]

Na fração acetato de etila, a artemisinina foi caracterizada, com o uso do **SC-2** [clorofórmio-acetato de etila- metanol (7:1:1)] e de reativo anisaldeído sulfúrico, na forma de uma mancha de cor avermelhada e intensidade forte, em R_f : 0,78 e de outras 4 manchas arroxeadas (**Figura 19A**). A quercetina foi observada em R_f : 0,51, como mancha amarelada, após o emprego do **SC-4**: clorofórmio-acetona- ácido fórmico (45:10:5)] e do reativo NP (**Figura 19B**).

FIGURA 20 - Cromatogramas em camada delgada da fração bioativa acetato de etila do extrato hidroetanólico das partes aéreas da fenofase de floração plena de *Artemisia annua* L. **19A.** Perfil cromatográfico dos compostos terpênicos. Marcador: artemisinina (**A**) (R_f :0,78) [SC-2: clorofórmio-acetato de etila-acetona (7:1:1), item 4.7.1.2]. **19B.** Perfil cromatográfico dos compostos flavonoídicos. Marcador: quercetina (**Q**) (R_f :0,69) [SC-4: clorofórmio-acetona- ácido fórmico (45:10:5)]

5.7 Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* da artemisinina e da quercetina

5.7.1 Acompanhamento da viabilidade das formas promastigotas frente aos padrões selecionados

A partir dos testes prévios da artemisinina e da quercetina, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), foram encontradas as condições de concentração e de incubação mais adequadas para os testes *in vitro*.

A viabilidade dos parasitas foi avaliada, para as três concentrações testadas dos padrões (10, 30 e 90 µg/mL), em função do período de tempo de incubação (24 a 72h).

Os resultados indicaram que à concentração de 90µg/mL, artemisinina levou à morte 100% das formas promastigotas de *L. amazonensis* em 48h.

5.7.2 Concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) de artemisinina, quercetina e rutina

As concentrações inibitórias de 50% das formas promastigotas de *L. amazonensis*, determinadas para os padrões de artemisinina, quercetina e rutina, foram apresentadas na **Tabela 18**.

Os resultados da avaliação da atividade citotóxica destes mesmos compostos frente às células epiteliais humanas (HEP-2) (ATCC:CCL 23) encontram-se dispostos, igualmente, na **Tabela 18**.

Os resultados obtidos mostraram que os valores de CI₅₀ para a artemisinina foram inferiores a 100 µg/ mL, diferentemente dos dois compostos flavonóidicos, tendo-se determinado a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) da mesma.

TABELA 18 - Valores das concentrações inibitórias de 50% (CI₅₀) das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) e da concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) das células epiteliais humanas (HEP-2) (ATCC:CCL 23) para artemisinina, quercetina e rutina

Padrões	<i>Leishmania amazonensis</i>	células epiteliais humanas (HEP-2)
	CI ₅₀ (µg/mL) (M ± DP)	CC ₅₀ (µg/mL) (M ± DP)
artemisinina	13,79 ± 0,26	> 100
quercetina	>100	-
rutina	>100	-
Fármaco de referência		
anfotericina B	0,14	> 0,55

Concentração máxima testada: 100µg/mL; M = média, DP = desvio-padrão, (-) = não determinada.

5.8 Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos extratos e frações orgânicas

A avaliação da atividade antileishmania *in vitro* de extratos e frações orgânicas de *A. annua* e *B. pilosa* encontra-se esquematizada nas **Figuras 20 e 21**, respectivamente, tendo abrangido a parte inicial de triagem daqueles mais ativos e, posteriormente, a determinação das concentrações inibitórias de 50% e 90% dos parasitas, das concentrações citotóxicas e do Índice de Seletividade (IS).

FIGURA 21 - Esquema geral da avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos extratos e frações orgânicas de *A. annua*

FIGURA 22 - Esquema geral da avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos extratos e frações orgânicas de *B. pilosa*

5.8.1 Triagem dos extratos e frações orgânicas

Os resultados da avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos infusos de partes aéreas (folhas e capítulos florais) de *A. annua* mostraram que, independentemente do estado de conservação do material de origem (*in natura* ou droga) e das fenofases avaliadas, não apresentaram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

De forma similar, a maioria dos infusos preparados a partir de folhas e do vegetal inteiro (*in natura* e droga) de *B. pilosa*, coletados nas fenofases vegetativa e de frutificação foi inativa, sendo que a determinação para o infuso do vegetal inteiro na forma de droga e da coleta em fenofase de frutificação, não foi realizada.

Para os infusos preparados a partir de raízes de *B. pilosa*, observou-se fraca atividade nas formas promastigotas (7,9 a 40,6% de morte) (Tabela 19).

TABELA 19 - Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos infusos de raízes (*in natura* e droga) de *B. pilosa* frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269).

<i>Leishmania amazonensis</i>		
% morte (M $\pm$ D.P.)		
<i>Bidens pilosa</i> L.*		
infusos de raiz*	Fenofases	
	vegetativa	frutificação
<i>in natura</i>	26,9 $\pm$ 2,4	40,6 $\pm$ 4,7
droga	7,9 $\pm$ 5,9	13,1 $\pm$ 1,5
Fármaco de referência		
anfotericina B (0,3 μ M): 100 $\pm$ 0		

*Concentração testada: 1.600 μ g/ mL, M: média, D.P.: desvio-padrão. (**): após 24h

Os resultados da triagem dos extratos hidroetanólicos e das frações orgânicas bioativas de *A. annua* (partes aéreas, *in natura* e na forma de droga), nas três fenofases estudadas, encontram-se na Tabela 20.

Verificou-se maior percentagem de morte, à concentração de 1,6 mg/mL, dos extratos hidroetanólicos preparados a partir das partes aéreas coletadas na fenofase vegetativa, seguindo-se aquelas obtidas na floração plena e na pré-floração.

No tocante ao estado de conservação, não se observou comportamento uniforme em relação às fenofases de coleta (**Tabela 20**).

Não foi realizado o fracionamento dos extratos hidroetanólicos obtidos, a partir das partes aéreas secas (droga) coletadas na pré-floração, em função do baixo nível de atividade apresentado (20,5% de mortes das promastigotas) (**Tabela 20**). Os demais extratos deram origem às 20 frações orgânicas testadas (**Tabela 20**).

Os dados indicaram nível de atividade, próximo à média de 50% de mortes, para todas as frações em metanol (**Tabela 20**), enquanto as demais frações levaram a alto nível de mortalidade das formas promastigotas, em geral, próxima de 100% dos parasitas.

Em relação às frações *n*-hexano e clorofórmio dos extratos hidroetanólicos do material *in natura*, verificou-se percentual de morte levemente superior para aquelas provenientes de partes aéreas em fenofase de floração plena (**Tabela 20**), sendo que a fração *n*-hexano levou à inibição total dos parasitas. Para as frações correspondentes em acetato de etila a diferença de atividade antileishmania foi marcante entre aquela referente à fenofase de floração plena (99,8% de mortes) e as outras duas fenofases (55,3 e 56,0% de mortes) (**Tabela 20**).

No caso das frações *n*-hexano e clorofórmio, obtidas a partir dos extratos hidroetanólicos da droga, verificou-se que mantiveram o alto nível de atividade, nas fenofases vegetativa e de floração plena, tendo atingido até 99,9% de mortalidade (**Tabela 20**). Para a fração acetato de etila deste mesmo material, observou-se grau de atividade ligeiramente superior, na coleta na floração plena (99,5% de mortes) em relação àquela da fenofase vegetativa (96,9% de mortes) (**Tabela 20**).

TABELA 20 - Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* (% de morte) dos extratos hidroetanólicos de partes aéreas* (*in natura* e droga) de *A. annua* L., coletadas nas fenofases vegetativa, pré-floração e floração plena, e de suas frações orgânicas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269)

<i>Leishmania amazonensis</i>									
% morte									
(M± D.P.)									
<i>Artemisia annua</i> L.									
Extrato hidroetanólico			Frações orgânicas						
Fenofase	<i>in natura</i>			<i>in natura</i>			droga		
	<i>in natura</i>	droga	<i>n</i> -hexano	clorofórmio	acetato de etila	metanol	<i>n</i> -hexano	clorofórmio	acetato de etila
Vegetativa	82,5 ±0,7	88,0±0,5	99,8±0,1	99,7±0,1	55,3±3,0	48,7±5,0	99,9±0	99,9±0	96,9±2,2
Pré-floração	74,6±1,3	20,5±4,2	89,4±0,7	96,7±5,8	56,0±12	56,0±8,0	-	-	-
Floração plena	80,4±1,0	78,6±0,3	100±0	99,9±0	99,8±0,2	50,0±7,2	99,9±0*	99,96±0*	99,5±0,5*
Fármaco de referência									
anfotericina B (0,3 µM): 100 ± 0									

* **Material vegetal:** Folhas (fenofases: vegetativa e pré-floração), capítulos florais (fenofases: pré-floração e floração plena). **Concentrações:** extratos: 1.600 µg/mL, frações: 300 µg/mL, **M:** média, **D.P.:** desvio-padrão. Tempo de incubação: 48h, (-): fracionamento não efetuado em função da baixa atividade do extrato.

Os resultados da etapa de triagem dos extratos hidroetanólicos e das frações orgânicas bioativas de *B. pilosa* preparados a partir de folhas, raízes e vegetal inteiro (*in natura* e droga), coletados nas fenofases vegetativa e de frutificação, foram dispostos na **Tabela 21**.

TABELA 21 - Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* (% de morte) dos extratos hidroetanólicos de folhas, vegetal inteiro e raízes de *Bidens pilosa* L., coletados nas fenofases vegetativa e de frutificação e de suas frações orgânicas frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269).

Leishmania amazonensis												
% morte												
(M± D.P.)												
Bidens pilosa L.												
Órgão vegetal	Extrato hidroetanólico			Frações orgânicas								
				n-hexano	dicloro	acetato de etila	metanol	n-hexano	dicloro	acetato de etila	metanol	
	Fenofase											
	vegetativa	frutificação	vegetativa	frutificação	vegetativa							
				frutificação								
	in natura			droga			in natura					
				droga								
folha	78,9±0,2	19,0±10,8	nd	11,7±1,5	98,65±0,88*	99,04±0,67*	49,71±6,71	98,65±0,88*	-	-	-	
vegetal inteiro	63,9±3,6	69,4±0,2	70,8±1,4	61,4±4,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
raiz	26,1±3,2	50,6±4,7	nd	8,9±2,4	90,75±2,89*	81,89±13,66	78,45±3,98	41,61±13,03	95,37±0,58*	99,13±1,23	21,00±5,21	
Fármaco de referência												
anfotericina B (0,3 µM): 100%±0												

Concentrações: extratos:1.600 µg/mL, frações: 300 µg/mL, dicloro: fração diclorometano, **M**:média, **D.P.**: desvio-padrão,Tempo de incubação: 48h, **nd**:não determinada. (-): fracionamento não efetuado

5.8.2 Concentrações inibitórias de 50% e de 90% (CI_{50} e CI_{90}) das formas promastigotas de *L. amazonensis*, concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) em células HEP-2 de frações orgânicas de *A. annua* e de *B. pilosa* e respectivos Índices de Seletividade (IS)

A partir dos resultados da triagem das frações orgânicas de *A. annua*, entre aquelas de maior atividade antileishmania *in vitro* (%morte $\geq 95\%$) (**Figura 20**), foram selecionadas as frações em *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtidas do extrato hidroetanólico da droga preparada com as partes aéreas de coleta realizada na fenofase de floração plena (**Tabela 20**), para as quais determinaram-se as concentrações inibitórias CI_{50} e CI_{90} e citotóxicas CC_{50} (**Tabela 22**).

Na triagem das frações de *B. pilosa*, as frações selecionadas, entre aquelas mais ativas (%morte $\geq 90,75\%$) (**Figura 21**) foram aquelas referentes aos órgãos vegetais em separado. No caso de folhas, determinaram-se as CI_{50} , CI_{90} e CC_{50} das três frações mais ativas (*n*-hexano, diclorometano e metanol), que se originaram do extrato hidroetanólico das mesmas *in natura*, coletadas na fenofase vegetativa (**Tabela 23**), tendo levado aos percentuais de morte superiores à 98%, sendo que, somente, a fração em acetato de etila apresentou nível inferior de atividade (**Tabela 21**).

Com relação aos extratos hidroetanólicos de raízes, as frações em *n*-hexano, extraídas do órgão *in natura* e na forma de droga, respectivamente, coletado nas fenofases vegetativa e de frutificação foram submetidas à determinação das concentrações inibitórias e citotóxicas (**Tabela 23**).

TABELA 22 – Concentrações inibitórias de 50% e 90% (CI₅₀ e CI₉₀) das formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), concentração citotóxica *in vitro* (CC₅₀) em células epiteliais humanas (HEP-2) e índice de seletividade (IS) de frações *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila do extrato hidroetanólico das partes aéreas* (droga) de *A. annua*, coletadas na fenofase de floração plena

<i>Artemisia annua</i> L.				
Frações HE [partes aéreas* (droga), fenofase de floração plena]	<i>L. amazonensis</i> formas promastigotas		Células epiteliais humanas (HEP- 2)	IS
	CI ₅₀ (µg/mL) (M±DP)	CI ₉₀ (µg/mL) (M±DP)	CC ₅₀ (µg/mL) (M±DP)	
<i>n</i> -hexano	19,17±8,97	104,04	1.410,37±589,19	0,013
clorofórmio	29,49±3,58	140,64	1.291,38±387,94	0,024
acetato de etila	8,87±0,54	-	1.126,82±203,14	0,008
Fármaco de referência				
anfotericina B	0,14	-	>0,55	-

frações HE: extrato hidroetanólico, *Partes aéreas (fenofase de floração plena): capítulos florais. M = média, D.P. = desvio-padrão. Concentrações-teste: **para CI₅₀ e CI₉₀:** 300,100,30,10,3 µg/mL, **para CC₅₀:** 3000,1000,300,100,30 µg/mL., **para anfotericina B (CC₅₀):** 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 e 5 µM, **IS:** Índice de Seletividade: CI₅₀/CC₅₀, (-): não determinada

Os resultados indicaram que as três frações do extrato hidroetanólico (HE) das partes aéreas de *A. annua*, coletadas na floração plena e transformadas em droga, apresentaram atividade antileishmania *in vitro* (Tabela 22). E destas, a mais ativa, nas formas promastigotas do parasita, foi a fração em acetato de etila, cuja CI₅₀ (8,87± 0,54 µg/mL) (Tabela 22) mostrou-se inferior àquela da artemisinina (CI₅₀: 13,79 ±0,26 µg/mL) (Tabela 18).

No tocante à citotoxicidade, frente às células HEP-2, as três frações apresentaram-na muito reduzida, com valores de CC₅₀, variando de 821, 2 µg/mL até cerca de 2,0 g/mL, sendo que o maior índice de seletividade (IS) foi aquele da fração em clorofórmio, que foi a menos ativa nas formas promastigotas.

TABELA 23 - Concentrações inibitórias de 50% e 90% (CI₅₀ e CI₉₀) das formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), concentração citotóxica *in vitro* (CC₅₀) em células epiteliais humanas (HEP-2) e índice de seletividade (IS) de frações orgânicas do extrato hidroetanólico de folhas e raízes (*in natura* e droga), nas fenofases vegetativa e de frutificação

Bidens pilosa L.				
Frações	L. amazonensis		Células epiteliais humanas (HEP-2)	IS
	CI ₅₀ (µg/mL) (M±D.P.)	CI ₉₀ (µg/mL) (M±D.P.)	CC ₅₀ (µg/mL) (M±D.P.)	
HE folhas <i>in natura</i> fenofase vegetativa				
<i>n</i> -hexano	16,16 ± 0,59	-	1000 < CC ₅₀ <3000	-
diclorometano	18,25 ± 6,00	-	> 3000	-
metanol	13,74 ± 2,29	-	1.139,02 ± 236,59	0,012
HE raízes				
<i>in natura</i> fenofase vegetativa				
<i>n</i> -hexano	15,55 ± 0,39	46,58	1.238,80 ± 263,98	0,012
droga fenofase de frutificação				
<i>n</i> -hexano	8,87 ± 0,55	47,87	1.188,35 ± 251,22	0,007
Fármaco de referência				
anfotericina B	0,14	-	>0,55	-

frações HE: extrato hidroetanólico. M = média, D.P.= desvio-padrão. Concentrações-teste: **para CI₅₀ e CI₉₀:** 300,100,30,10,3 µg/mL, **para CC₅₀:** 3000,1000,300,100,30 µg/mL., **para anfotericina B (CC₅₀):** 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 e 5 µM, **IS:** Índice de Seletividade: CI₅₀/CC₅₀, (-): não determinada

Para *B. pilosa*, a fração *n*-hexano do extrato hidroetanólico de raízes em fenofase de frutificação mostrou ser a mais ativa (CI₅₀: 8,87 ± 0,55 µg/mL) das cinco frações testadas (Tabela 23). No caso das frações provenientes do extrato hidroetanólico de folhas, as três frações apresentaram valores próximos de CI₅₀, sendo que a mais ativa foi a fração em metanol (CI₅₀: 13,74±2,29 µg/mL).

Em relação à citotoxicidade, as cinco frações apresentaram CC_{50} altas (Tabela 23), não se tendo determinado o IS de duas delas. A fração *n*-hexano do HE de raízes (droga) em fenofase de frutificação foi aquela que apresentou o menor IS.

5.9 Estudo botânico

5.9.1 Coleta

Os cinco exemplares do híbrido *Artemisia annua* L. cv. *Silves-1* (**Figura 23**) foram coletados em área de cultivo aberta. Apresentaram porte arbustivo, altura de cerca de 2,0m e diâmetro da base do caule de cerca de 3,5 cm.

As cinco coletas, correspondentes às fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena foram feitas no período de fevereiro a março de 2006 (a partir de três exemplares) e, para a complementação das análises (de dois exemplares), em março de 2008.

O horário de coleta entendeu-se até, no máximo, as 09h30min, em função da temperatura ambiente (29 e 32 °C), de forma a garantir a conservação dos componentes do material vegetal estudado *in natura* e a perda do óleo volátil e de componentes do mesmo, se realizado em horário de maior nível de insolação. Os ramos aéreos foram acondicionados em sacos de papel e imediatamente levados à pesagem.

FIGURA 23 – *Artemisia annua* L. - 23A. Cultivo, processamento de corte e secagem. **23B.** Detalhe de arbustos na área de plantio [escala: 36,5 cm].

Os vinte espécimes da espécie herbácea *Bidens pilosa* L. (**Figura 24**), que foram coletados em propriedade particular, apresentaram cerca de 0,5 a 1,5 m de altura, dependendo da fenofase (vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação). Os exemplares foram encontrados em local aberto sob exposição à luz direta, a partir das 8 h e irrigação periódica.

Na área de cultivo, os espécimes apresentaram-se nas quatro fenofases por isso foi necessária somente uma coleta (22/11/2006) para abranger todas as fenofases do vegetal.

Os espécimes foram separados, por fenofase, e colocados em sacos de papel. A pesagem foi realizada em laboratório, próximo ao local de coleta.

FIGURA 24 – *Bidens pilosa* L. - 24A. Área de cultivo. **24B.** Detalhe das inflorescências [escala: 1,0 cm]. **24C.** Detalhe do fruto seco [escala: 1,0 cm].

5.9.2 Estudo morfológico de *Artemisia annua* L.

5.9.2.1 Folhas

As folhas de *A. annua* são compostas, com limbo verde-escuro (**Figura 25**). O limbo foliar apresenta de 5,0 a 9,0 cm de comprimento e 3,0 a 5,0 cm de largura e base decurrente.

Os folíolos de primeira ordem possuem, de forma geral, contorno lanceolado-oval a lanceolado-elíptico. Os folíolos basais e medianos possuem peciólulo, enquanto que o apical é sésil (**Figuras 26A e 26B**). Os folíolos de segunda ordem apresentam padrão diversificado de subdivisão do limbo, podendo, um mesmo folíolo, apresentar-se lobado, fendido e partido (**Figura 25A**).

FIGURA 25 - *Artemisia annua* L. - 25A. Detalhe da face abaxial dos folíolos [escala: 4mm]. **25B.** Esquema geral do limbo foliar e detalhe do folíolo apical.

Quanto à nervação, as folhas mostram-se peninérveas, sendo as nervuras mais salientes na face abaxial (**Figura 26**). Os folíolos de primeira ordem apresentam nervuras amarelo-esverdeadas, e nos folíolos de segunda ordem, estas são verdes.

Os folíolos de segunda ordem (foliólulos) mostram-se uninérveos, oval-elípticos, com ápice agudo a obtuso e margem inteira. A nervura mediana aparece conspícua, mais saliente na face abaxial, pouco afilada em direção ao ápice, com ramificações de calibres menores que acompanham a margem onde se anastomosam (**Figura 26C**).

FIGURA 26 - *Artemisia annua* L. Folha composta (*in natura*). 26A. Face abaxial [escala: 0,5cm]. **26B.** Face adaxial [escala: 0,5cm]. **26C.** Desenho representando a nervação no folíolo de segunda ordem (apical)

À lupa estereoscópica, é possível observar, em ambas as faces, a presença de pêlos distribuídos, de forma esparsa, por todo limbo foliar, além de diminutos pontos translúcidos, na face adaxial. Na face abaxial, os pêlos ocorrem, geralmente, na região das nervuras sendo menos freqüentes, que na adaxial.

FIGURA 27 - *Artemisia annua* L. – Face abaxial. Detalhe de indumento sobre a nervura mediana

A droga possui odor pronunciado característico, levemente canforáceo. Na folha seca, os folíolos se recurvam em direção à face abaxial, sendo de consistência frável e separando-se com facilidade da raque (**Figura 28**).

FIGURA 28– *Artemisia annua* L. Droga. **28A.** Detalhe dos folíolos (face abaxial) [escala: 1,1 cm]. **28B.** Detalhe de dobramento do limbo em direção à face abaxial [escala: 1,1 cm]. **28C.** Aspecto geral dos folíolos destacados da raque [escala: 0,8 cm].

O pecíolo mostra-se alado e possui comprimento de 1,0 a 2,0 cm e largura de cerca de 2 mm com inserção marginal (**Figura 29**). Apresenta formato achatado e pêlos esparsos na face adaxial. Observado à lupa estereoscópica, em secção transversal, exhibe contorno biconvexo.

A raque, à semelhança do pecíolo, é alada (**Figura 29**). Em secção transversal, apresenta formato plano-convexo, com numerosos pêlos, em ambas as faces.

FIGURA 29 – *Artemisia annua* L. – Detalhe dos folíolos e foliólulos (droga) e do raque (r) alado [escala: 1,0 cm].

5.9.2.2 Capítulos florais

A inflorescência composta é constituída de capítulos, formando panícula (**Figura 30**), é formada por numerosas floretas diminutas (flósculos) dispostas sobre receptáculo cônico.

FIGURA 30 - *Artemisia annua* L. - Panícula. Aspecto geral de inflorescência composta. [escala: 5 mm].

Os capítulos florais de formatos subglobosos são castanho-amarelados e possuem cerca de 2,5 mm de diâmetro, sendo envolvidos por cálice dialissépalo polidenteado (**Figura 31A**). As brácteas involucrais, castanho-amareladas,

apresentam formato oval a oblongo, ápice obtuso, sendo largamente escariosas e inteiras no vértice, dispendo-se em duas fileiras (**Figura 31C**).

O receptáculo é cônico (**Figura 32A**). Neste, dispõem-se de três a dez floretas tubulosas femininas, mais exatamente infundibuliformes, com cerca de 1,0 mm de comprimento, com localização marginal, que apresentam corola gamopétala, oboval a oblonga, ápice bi- a tridentado e coloração castanho-amarelada. O estigma é bifido e alongado (**Figuras 32B e 32C**). Mais detalhadamente, ao microscópio de luz, e em montagem direta, observam-se tricomas glandulares bisseriados com cinco células dispostos sobre a corola.

As floretas hermafroditas são tubulosas e medem em média 1,2 mm de comprimento. Na região interna do capítulo, encontram-se, em número de dez a vinte. Possuem corola amarelada, tubulosa, pentadenteada e cinco estames sinantéreos. Na extremidade do estilete, há estigma bifido recurvado, que ultrapassa o comprimento da corola (**Figuras 32D e 32E**).

A corola das floretas hermafroditas apresenta tricomas glandulares semelhantes àqueles das floretas femininas.

FIGURA 31 - *Artemisia annua* L. Capítulo floral. 31A Detalhe das brácteas involucrais na porção basal. **31B.** Aspecto geral da inflorescência. **31C.** Disposição das brácteas involucrais, em duas fileiras. [escalas: 0,5 mm].

FIGURA 32 – *Artemisia annua* L. – 32A. Esquema geral do capítulo floral com receptáculo cônico e brácteas involucrais 32B. Floreta feminina com tricomas glandulares na corola e estigma bifido. 32C. Floreta feminina aberta. 32D. Floreta hermafrodita aberta com estames sinantéreos. 32E. Floreta hermafrodita com tricomas glandulares na corola.

FIGURA 33 – *Artemisia annua* L. Floretas tubulosas. 33A. Floreta feminina. Aspecto geral e presença de estigma bifido. 33B. Detalhe da corola com tricomas glandulares. 33C Floreta hermafrodita. Tricomas glandulares bisseriados na superfície da corola.

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem desta figura)

5.9.3 Estudo anatômico de folha de *Artemisia annua* L.

5.9.3.1 Folíolos

Limbo foliar

A epiderme foliar é uniestratificada com células cujas paredes periclinais são convexas (Figura 34) e revestidas por cutícula delgada e estriada (Figura 35).

FIGURA 34 - *Artemisia annua* L. Folíolo. Secção transversal: Detalhes do mesofilo [p.p.: parênquima paliçádico, p.e.: parênquima esponjoso, c.col.: célula coletora], da nervura mediana e da epiderme. [estômatos: setas, c.s.: câmara subestomática]

Em vista frontal, as células epidérmicas na face adaxial (Figura 35A) mostram paredes delgadas e sinuosas, enquanto na face abaxial (Figura 35B) possuem menor dimensão e contorno menos sinuoso. Sobre as nervuras, as células epidérmicas apresentam-se poligonais, alongadas no sentido das mesmas e contorno reto. As células epidérmicas do ápice e bordo foliares apresentam-se indistintas.

FIGURA 35 - *Artemisia annua* L. Folíolo. Vista frontal da epiderme. Detalhes de estômatos anomocíticos (e.) 35A. Face adaxial. Detalhe de cutícula estriada (seta). 35B. Face abaxial.

Em ambas as faces, numerosos tricomas tectores são encontrados, em nível semelhante ou inferior àquele das demais células epidérmicas. Estes tricomas apresentam ramificação em “T” e pedicelo pluricelular e unisseriado constituído de três a oito células e parte terminal filamentosa (**Figura 36**). Os tricomas tectores providos de maior número de células no pedicelo apresentam paredes celulares espessadas e célula basal alargada, ocorrendo com maior freqüência na nervura mediana.

Igualmente, em ambas as faces, observam-se numerosos tricomas glandulares bisseriados característicos de Asteraceae constituídos de duas fileiras de cinco células (Figura 37).

FIGURA 36 - *Artemisia annua* L. Folíolo. Vista frontal de epiderme. Detalhe de tricoma ramificado em formato de "T" (seta).

FIGURA 37 - *Artemisia annua* L. Folíolo. Vista frontal da epiderme. Detalhes dos tricomas glandulares típicos de Asteraceae (seta).

A folha, anfiestomática, é provida de numerosos estômatos, que ocorrem sobre a nervura mediana. Os estômatos situam-se no mesmo nível e acima das

demais células epidérmicas (**Figura 34**). Em ambas as faces, observam-se estômatos anomocíticos (**Figura 35**), sendo que na face abaxial também podem ser encontrados estômatos anisocíticos.

O mesofilo é dorsiventral e constituído de parênquima paliçádico formado por um a dois estratos celulares, que ocupam cerca de dois terços da espessura do mesofilo. O parênquima esponjoso é composto de um a dois estratos de células de formato alongado e arredondado, predominando o primeiro, sendo difícil a diferenciação entre os dois tecidos (**Figura 34**).

Na região entre os parênquimas fotossintetizantes ocorrem células coletoras arredondadas a lobadas. (**Figura 34**).

A nervura mediana apresenta formato biconvexo (**Figura 38**), ligeiramente mais proeminente na face adaxial. Na região perivascular, ocorre bainha de células parenquimáticas, com paredes celulósicas, e constituída de um a três estratos celulares.

O sistema vascular é constituído de um único feixe colateral, que apresenta de um a três dutos secretores, na região externa ao xilema. O tecido fundamental apresenta, na região externa, prolongamento do tecido clorofiliano, com células alongadas no sentido anticlinal e dispostas de forma compacta.

FIGURA 38 - *Artemisia annua* L. Foliolo. Secção transversal mostrando mesofilo e nervura mediana. Detalhes do sistema vascular com bainha parenquimática (b.p.) e dutos secretores (setas).

No mesofilo, no parênquima fundamental e na epiderme observam-se substâncias de natureza fenólica em grande concentração. Nos parênquimas ocorrem substâncias lipofílicas dispersas.

Pecíolo

Em secção transversal, o pecíolo apresenta contorno nitidamente biconvexo, irregular na região central e duas expansões laterais localizadas nas extremidades opostas (**Figura 39**).

As células epidérmicas possuem paredes periclinais espessadas e estão dispostas em um estrato único. A cutícula é irregular, evidenciando-se flanges cuticulares (**Figura 40**). Na face adaxial, ocorrem tricomas tectores semelhantes àqueles descritos, anteriormente.

FIGURA 39 – *Artemisia annua* L. Pecíolo. Secção transversal. Disposição geral dos tecidos. [dutos secretores: seta]

Os estômatos são observados nas duas faces, ocorrendo em maior número na face abaxial, podendo estar situados no mesmo nível ou acima (**Figura 40**) das demais células epidérmicas.

FIGURA 40 - *Artemisia annua* L. Pecíolo. Secção transversal com detalhe para cutícula espessa e irregular e estômato em nível superior às demais células epidérmicas [e.: estômato. Flange cuticular: seta]

O colênquima angular é constituído de uma camada celular na face adaxial (**Figura 40**) e de uma a duas na face abaxial, sendo circunscrito na região central do pecíolo.

O parênquima fundamental apresenta células arredondadas, sendo maiores na face abaxial. Internamente ao colênquima, na face adaxial, e com disposição desde a região subepidérmica, na face abaxial, observam-se, respectivamente, 1 a 3 e 1 a 2 estratos de células clorofilianas, respectivamente, em paliçada ou arredondadas (**Figura 39**).

O sistema vascular constitui-se de 1 a 3 feixes vasculares colaterias dispostos em arco descontínuo. Na região externa ao floema ocorre calota de fibras lignificadas constituídas de 2 até 8 a 10 camadas celulares. Na região externa do xilema, observam-se de 2 a 3 camadas de fibras (**Figura 41**). Adjacentes ao xilema, encontram-se de 1 a 3 dutos secretores de tamanhos diferentes, contendo substâncias lipofílicas.

FIGURA 41 – *Artemisia annua* L. Pecíolo. Secção transversal com detalhe do feixe vascular colateral. [f.:fibras, fl.: floema, xi.: xilema, c.:câmbio fascicular]

A região alada do pecíolo (expansões laterais) apresenta estrutura semelhante àquela do mesófilo foliar, com células clorofiladas, em paliçada, alongadas no sentido radial e os feixes vasculares são de menor porte e circundados de bainha parenquimática constituída de estrato único (**Figura 39**).

Raque

Em secção transversal, o contorno da raque apresenta-se irregular e com uma expansão em cada uma das extremidades laterais opostas (**Figura 42**). A região central, desta secção, mostra-se plana, na face adaxial, e convexa, com proeminência arredondada a angular, na face abaxial.

Os estômatos encontram-se, em ambas as faces, ocorrendo no mesmo nível das demais células epidérmicas ou em nível superior, podendo ser proeminentes.

***Artemisia annua* L. Raque.** Secção transversal mostrando disposição geral dos tecidos. Detalhes dos dutos secretores (setas) e dos estômatos (e.)

FIGURA 42 - *Artemisia annua* L. Raque. Secção transversal mostrando disposição geral dos tecidos. Detalhes dos dutos secretores (setas) e dos estômatos (e.)

Na mesma secção, observa-se que, as células epidérmicas da raque são aproximadamente isodiamétricas (**Figura 42**), com paredes periclinais espessadas, dispondo-se em um único estrato, mostrando cutícula irregular.

Tricomas tectores, em “T”, ou remanescências de células dos mesmos, no caso da droga, podem ser observados em ambas as faces.

FIGURA 43 - *Artemisia annua* L. Raque. Secção transversal. Detalhe do tricoma tector em forma de “T” (seta).

Na região subepidérmica, observa-se a presença de uma camada de colênquima angular, na face adaxial. Na face abaxial, este tecido limita-se à região central, onde se dispõe em 1 a 2 camadas celulares.

Os estômatos são mais numerosos na face abaxial (**Figura 42**), ocorrendo desde a porção alada da raque. Na face adaxial observam-se na região lateral, não sendo vistos na porção alada e, também não, na plana (**Figura 42**).

O parênquima fundamental constitui-se de células arredondadas havendo meatos.

O sistema vascular é constituído de 3 feixes vasculares alinhados, sendo um central, de maior porte e dois laterais menores, separados por 2 a 3 faixas de células parenquimáticas alongadas no sentido radial. Externamente ao xilema observam-se dutos secretores de dimensões distintas, distribuindo-se em número de 1 e 2, respectivamente localizados nas proximidades dos feixes vasculares de menor e de maior calibres (**Figura 42**).

Em cada expansão lateral da raque ocorre 1 feixe colateral, apresentando bainha parenquimática constituída de uma camada celular. O parênquima é constituído de células clorofiladas em paliçada, na face adaxial e arredondadas; na abaxial.

Na região subepidérmica da extremidade terminal de cada expansão lateral observa-se a presença de 1 a 2 estratos de colênquima angular (**Figura 42**).

6 DISCUSSÃO

Na busca por espécies vegetais e produtos naturais com potencial atividade antiprotozoária, principal missão do grupo de Pesquisa ao qual este trabalho está atrelado, surgiu o interesse pelas duas espécies de Asteraceae, conhecidas popularmente, entre outras, pela ação antiparasitária.

Numerosas pesquisas realizadas com *A. annua* comprovaram a atividade antimalárica do vegetal, que passou a ser fonte de um dos mais importantes fármacos de origem natural empregado, no tratamento desta doença (KLAYMAN *et al*, 1984, LIERSCH *et al*, 1986, SINGH *et al*, 1988, LIU *et al*, 1989, TAWFIQ *et al*, 1989, ELSOHLY *et al*, 1990, HIEN & WHITE, 1993, FERREIRA *et al*, 1995a,b, JAIN *et al*, 1996, GUPTA *et al*, 1996, GELDRE *et al*, 1997, KAWAMOTO *et al*, 1999, WALLAART *et al*, 1999, 2000, MUELLER *et al*, 2000, BILIA *et al*, 2002, RÄTH *et al*, 2004, MUELLER *et al*, 2004, QUISPE-CONDORI *et al*, 2005, LOMMEN *et al*, 2006, RODRIGUES *et al*, 2006, BILIA *et al*, 2006a,b).

No caso de *B. pilosa*, o uso tradicional como antimalárico (N'DOUNGA *et al*, 1983, BRANDÃO *et al*, 1997, KRETTLI *et al*, 2001, OLIVEIRA *et al*, 2004, ANDRADE-NETO *et al*, 2004) e antimicrobiano, levou ao direcionamento, por parte de diversos pesquisadores, para estas atividades (CAMM *et al*, 1975; WAT *et al*, 1979, ARNASON *et al*, 1980, WAT *et al*, 1980, MINAMI & OLIVEIRA, 1986, MACHADO *et al*, 1988, RABE & STADEN, 1997).

Neste contexto, a extensa revisão bibliográfica realizada, permitiu constatar que não houve abordagem prévia ou aprofundada do potencial da atividade antileishmania de ambas as espécies, o que despertou o interesse para o presente trabalho.

Adicionalmente, considerando os diferentes parâmetros que interferem na composição química dos vegetais, buscou-se avaliar a influência de alguns deles, como: fase fenológica, órgão vegetal e estado de conservação do mesmo, no nível de atividade antileishmania *in vitro* de extratos preparados, com base nestas diferentes condições. Desta forma, procurou-se verificar aquelas mais adequadas à obtenção de extratos mais ativos como agentes antiprotozoários potenciais.

6.1 Fenofases e espécies consideradas

Na escolha das fenofases para a pesquisa de *A. annua*, tomaram-se por base estudos anteriores direcionados àquelas tidas como sendo de referência para o acompanhamento da variação dos teores de artemisinina (1) (LIERSCH *et al*, 1986, SINGH *et al*, 1988, FERREIRA *et al*, 1995, JAIN *et al*, 1996, GUPTA *et al*, 1996, KAWAMOTO *et al*, 1999, WALLAART *et al*, 1999, WALLAART *et al*, 2000, LOMMEN *et al*, 2006). Este composto foi cogitado como marcador, em função de sua alta concentração em todas as fenofases e órgãos avaliados, além da atividade apresentada frente a formas promastigotas de algumas espécies de *Leishmania* (YANG & LIEW, 1993; AVERY *et al*, 2003; MISHINA *et al*, 2007; LEZAMA-DAVILA *et al*, 2007). Sendo assim, foram consideradas, para este estudo, as partes aéreas coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena.

Por ser um vegetal anual, o ciclo de vida completo de *A. annua* é relativamente curto, apresentando mudanças de fenofases em intervalos de tempo reduzidos, geralmente, de alguns dias. Assim, ao longo das diferentes coletas, as partes aéreas estudadas sofreram variação de acordo com a sazonalidade da ocorrência dos órgãos vegetais considerados. Desta forma, nas fenofases vegetativa e de pré-floração, foram coletadas folhas e, na fenofase de floração plena, com a queda destas, o material em estudo foi composto somente das inflorescências (capítulos florais). Posteriormente, buscaram-se relacionar os parâmetros avaliados, aos órgãos aéreos presentes, nas diferentes fenofases.

Adicionalmente, considerando-se estudos anteriores, voltados para a atividade antimalárica (HIEN & WHITE, 1993), os órgãos vegetais selecionados, para o presente estudo, foram aqueles que se mostraram ricos em artemisinina.

Com relação à *B. pilosa*, em uma única coleta puderam ser abrangidas todas as fenofases do estudo, uma vez que os exemplares coletados apresentaram-se nos diferentes estágios analisados, ou seja: vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação (frutos maduros). Além disto, com base no uso tradicional da espécie, como antimalárico, folhas, raízes e o vegetal inteiro foram objeto deste estudo (BRANDÃO *et al*, 1997; KRETLI *et al*, 2001).

6.2 Estudo químico

No estudo químico efetuado, os extratos hidroetanólico e infuso (Tabelas 1 e 2) foram selecionados por serem formas extrativas simples, além de visar à possível utilização como medicamento com ação antileishmania. Os extratos avaliados objetivaram a aproximação com as formas de uso tradicional destas espécies, como

no caso de *A. annua* (MUELLER *et al*, 2000, MUELLER *et al*, 2004, RÄTH *et al*, 2004, RODRIGUES *et al*, 2006). No tocante a *B. pilosa*, há referência do uso de partes do vegetal transformadas em droga, no preparo de garrafadas (BRANDÃO *et al*, 1997, KRETTLI *et al*, 2001), além do emprego das folhas na forma fresca e de decocto, pelos povos indígenas da África do Sul (LINDSEY *et al*, 2002).

Com base nestes dados, buscou-se avaliar, adicionalmente, as formas de conservação do material vegetal de origem, *in natura* e droga, ou seja, do insumo usado para o preparo dos extratos. Outros parâmetros considerados foram os órgãos vegetais e as fenofases de coleta buscando otimizar a obtenção dos extratos e, posteriormente, estabelecer relação destes com a composição química e, por fim, com a atividade biológica testada.

Os dados experimentais obtidos mostraram que, o rendimento das extrações de *A. annua* (Tabela 5) foi maior pelo processo de infusão, em relação à percolação com etanol 96 °GL, o que foi observado, de forma geral, independentemente da forma de conservação do material de origem e da fenofase de coleta (Figura 44). Desta forma, o preparo, como medicamento, poderia ser feito de forma fácil, por exemplo, a partir de vegetal cultivado e coletado fresco, pelo próprio paciente, em seu jardim ou, mesmo, a partir do material seco, sem prejuízo do processo extrativo e aderindo ao propalado conceito das “farmácias vivas” (MATOS, 1994). Entretanto, na escolha da forma extrativa, também, deve ser avaliado qual dentre elas possibilita a extração mais eficiente dos compostos responsáveis pela atividade dos extratos.

FIGURA 44 - Comparação dos rendimentos da extração, por infusão e por percolação com etanol 96°GL, das partes aéreas (*in natura*, droga) de *A. annua* L., coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena.

Na pré-floração e na floração plena, o maior rendimento obtido, em geral, tanto no preparo do extrato hidroetanólico, como do infuso, ocorreu a partir de material transformado em droga (**Figura 44**). Em contraste, quanto à percolação do material coletado na fenofase vegetativa, o material *in natura* levou aos maiores rendimentos de extração do que a droga (**Tabela 5**). No caso do infuso, os rendimentos foram aproximadamente iguais para três dos quatro exemplares extraídos na forma *in natura* ou de droga, coletados na fenofase vegetativa (**Tabela 5**).

De forma geral, quanto à forma extrativa, os infusos de *A. annua* apresentaram maior rendimento, em relação às mesmas fenofases de coleta e estados de conservação do material vegetal, quando confrontados com o extrato hidroetanólico (**Tabela 5**).

Para *B. pilosa*, os maiores rendimentos de extração foram obtidos a partir da droga constituída tanto das folhas, quanto das raízes e do vegetal inteiro (**Figura 44**) independentemente da forma extrativa (**Tabela 6**). Tal constatação foi, em geral, igualmente invariável em relação à fenofase considerada.

FIGURA 45 - Comparação dos rendimentos da extração de folhas, vegetal inteiro e raiz (*in natura*, droga) de *B. pilosa* L. coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração, de floração plena e de frutificação, por infusão e por percolação com etanol 96°GL

No tocante ao fato de que, em geral, os maiores rendimentos de extração de *B. pilosa* foram aqueles do material conservado na forma de droga, deve-se ressaltar que empregou-se, para o cálculo dos dados relativos ao vegetal fresco (*in natura*), base comum, referente à massa seca dos órgãos vegetais considerados. Desta forma, não se pode atribuir à perda de água do material fresco, o maior rendimento extrativo verificado a partir da droga, o qual deve estar relacionado às condições empregadas na extração, como o maior grau de trituração ou outro fator que tenha otimizado a extração do conteúdo da droga, em relação àquele do vegetal fresco.

O uso do vegetal, na forma de droga, é reconhecidamente vantajoso, não somente por garantir a conservação do vegetal, reduzindo a atividade de água, responsável pela contaminação microbiana, mas também, por possibilitar a obtenção da forma extrativa, por tempo prolongado, em relação ao material *in natura* (OLIVEIRA *et al*, 1991).

Ainda que, até esta fase de análise, não tenha sido considerada a composição química, propriamente dita, os dados experimentais mostraram a influência dos diversos parâmetros analisados, apontando as condições mais

adequadas ao preparo dos extratos e, confirmando a importância do uso racional das plantas medicinais (OLIVEIRA *et al*, 1991).

Na determinação da perda de umidade de folhas de *A. annua* coletadas na fenofase vegetativa, verificou-se que houve redução de 75% (m/m) da massa seca, (Tabela 9) pela dessecação, estando dentro dos valores esperados para este órgão vegetal. Segundo OLIVEIRA *et al* (1991), o teor de umidade em folhas frescas varia de 60 a 98% (m,m).

Nas fenofases de pré-floração e de floração plena, os teores de umidade (65%, 52%, m/m) foram inferiores àqueles observados na fenofase vegetativa. Nestas fenofases, os órgãos vegetais ocorrentes em *A. annua* foram, respectivamente, folhas e inflorescências. O teor de umidade das inflorescências foi reduzido, em relação àqueles encontrados, normalmente, neste órgão vegetal (60-95%, m/m) (OLIVEIRA *et al*, 1991), podendo ser atribuído à morfologia do mesmo, que apresenta capítulos diminutos, com tecido parenquimático reduzido (item 5.9.2.2, Figura 32).

Os teores de umidade presentes nas drogas constituídas de folhas, vegetal inteiro e raízes de *B.pilosa* variaram, relativamente pouco, nas diferentes fenofases analisadas (Tabela 10), sendo que nas folhas, confirmaram-se os maiores valores (OLIVEIRA *et al*, 1991), em todas as fenofases, seguidas do vegetal inteiro e das raízes. Nestas últimas, transformadas em droga, verificaram-se os menores teores (4,6 a 12,8%, m/m) de umidade, estando de acordo com os limites tolerados para a conservação adequada das drogas constituídas deste órgão vegetal (8-14%, m/m) (OLIVEIRA *et al*, 1991).

No tocante ao conteúdo de cinzas totais de *A. annua*, verificou-se, que na fenofase vegetativa, foi maior, devendo estar constituído somente por material orgânico, uma vez que não houve cinzas insolúveis em ácido (Tabela 9). Entretanto, durante a pré-floração e na floração plena, os teores de cinzas totais foram inferiores e pouco variaram entre estas fenofases. Nestas, em que o material constituiu-se de folhas e inflorescências, respectivamente, verificou-se a presença de resíduo inorgânico no vegetal, indicando, possivelmente, a produção de silicatos ou de oxalatos, carbonatos ou outros sais (METCALFE & CHALK, 1950) durante estes estágios de desenvolvimento, diferentemente, da fenofase vegetativa.

No fracionamento dos extratos hidroetanólicos de *A. annua*, verificou-se a predominância de componentes de maior polaridade, o que foi caracterizado, pelos rendimentos obtidos para as frações em metanol (Tabela 7), que foram os maiores. Este perfil manteve-se constante, ao longo das três fenofases e foi independente do

estado de conservação do material de origem. Com relação à fração acetato de etila, apresentou o menor resíduo, em todas as épocas.

Desta forma, considerando-se a presença de flavonóides nesta espécie (**Quadro 2**), possivelmente, ocorreu predominância de formas glicosiladas, solúveis em metanol e outros solventes de maior polaridade, em relação às agliconas, melhor solubilizadas em acetato de etila, por exemplo. Entretanto, o enfoque do estudo não chegou a este nível de aprofundamento.

No caso das frações do extrato hidroetanólico de *B. pilosa*, os valores das massas das fenofases determinadas: vegetativa e de frutificação, mostraram diferenças entre os órgãos vegetais analisados.

Nas folhas, houve predominância de componentes de baixa polaridade, solubilizados na fração em *n*-hexano, seguidos daqueles presentes na fração acetato de etila, que foi a segunda a apresentar maior rendimento (**Tabela 10**). Estas constatações estão de acordo com a composição da espécie, rica em poliacetilenos e em agliconas de flavonóides (**Quadros 3 e 4**), provavelmente, solubilizados em maior extensão, respectivamente, nas frações *n*-hexano e acetato de etila.

Nas raízes de *B. pilosa*, por sua vez, ocorreu o inverso, pois apresentaram maior teor de resíduo nas frações em metanol, nas mesmas fenofases (**Tabela 10**), seguidas das frações em *n*-hexano. Possivelmente, as raízes, nestas fenofases (vegetativa e frutificação) produzem compostos de maior polaridade, como glicosídeos de flavonóides, solúveis em metanol, além dos poliacetilenos (fração *n*-hexano), em maior e menor extensão, respectivamente. Além disto, é muito provável que, os sítios de biossíntese ou a distribuição das duas classes de metabólitos, sejam diferenciados nestes órgãos (HARBORNE, 1988).

Considerando a possibilidade de emprego futuro das duas espécies, como medicamento com ação antileishmania, a caracterização química das mesmas foi realizada, sendo que, as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o registro de medicamentos fitoterápicos (RESOLUÇÃO-RDC Nº 48, de 16 de março de 2004) preconizam a realização de análises, como o doseamento de marcadores, quando os princípios ativos não estão elucidados. Por sua vez, a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2003), recomenda a obtenção de perfil cromatográfico ("fingerprint") como ferramenta para confirmação da identidade de um extrato.

Assim, a determinação dos teores de flavonóides totais e o acompanhamento da variação qualitativa e quantitativa de marcadores específicos

foram realizados, nos extratos de órgãos vegetais (*in natura* e droga), nas diferentes fenofases, a partir de exemplares de ambas as espécies, tendo-se empregado as técnicas de CLAE e de espectrofotometria. Os marcadores artemisinina (*A. annua*), quercetina e rutina (*A. annua* e *B. pilosa*) (**Quadros 2 e 3**) foram selecionados, em função da sua presença reconhecida, nas espécies.

Posteriormente, para a caracterização das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos bioativos de *A. annua*, foi obtido o perfil cromatográfico, por CCD. Entretanto, frente à inviabilidade da aquisição dos padrões de poliacetilenos, não foi obtido o perfil cromatográfico das frações dos extratos de *B. pilosa*, neste trabalho.

Em relação à quantificação de flavonóides totais nos extratos hidroetanólicos de *A. annua* e na droga (**Tabela 11**), a fenofase de maior teor foi aquela de floração plena. Tal resultado está de acordo com o fato de que, nesta fenofase, as inflorescências estão completamente desenvolvidas, havendo maior necessidade de atração de polinizadores para os órgãos reprodutivos do vegetal, sendo compatível com o aumento da biossíntese de flavonóides (HARBORNE, 1988).

Em contraste, no caso dos infusos, preparados a partir do material *in natura*, verificou-se maior teor dos flavonóides totais, na fenofase vegetativa. Tal diferença pode ser atribuída ao processo de extrativo, uma vez que, nesta fenofase o material constituiu-se de folhas fragmentadas, facilitando a extração dos flavonóides, pelo aumento da superfície de contato com a água fervente. Em paralelo, na fenofase de floração plena, os infusos das inflorescências *in natura* apresentaram o menor teor.

É provável que a diferença encontrada entre os teores dos infusos dos capítulos florais preparados, *in natura* e na forma de droga, tenha ocorrido em função dos graus diferentes de cominuição do material de origem, favorecendo a extração dos flavonóides, sendo que, a infusão foi realizada, respectivamente, com inflorescências grosseiramente fragmentadas e finamente pulverizadas.

Comparando-se os teores de flavonóides totais dos diferentes extratos de *A. annua*, referentes às fenofases e formas de conservação das partes aéreas similares, a porcentagem, nos infusos de *A. annua*, foi inferior (0,0015 a 0,22%, m/m) (**Tabela 11**), não somente àquela dos extratos hidroetanólicos (0,04 a 4,68%, m/m), mas também, àqueles obtidos em metanol 70% (m/v) (0,05 a 0,16%) o que está de acordo com resultados de BILIA *et al* (2006), devendo estar relacionado à polaridade dos flavonóides presentes, nesta espécie (**Quadro 2**).

Para *B. pilosa*, não foi possível estabelecer um perfil definido do comportamento dos rendimentos dos extratos hidroetanólicos, uma vez que, diversas

determinações deixaram de ser realizadas, em função da falta de material disponível. No caso dos infusos, para os quais as determinações abrangeram a maioria dos parâmetros avaliados, pôde-se constatar que em extratos obtidos em condições equivalentes, aqueles da folha e do vegetal inteiro foram superiores ao de raízes (**Tabela 6**), sugerindo maior acúmulo de material extrativo, nas partes aéreas.

No confronto dos teores de flavonóides totais, encontrados nas duas formas extrativas provenientes de ambas as espécies, os valores mostraram claramente (**Tabelas 11 e 12**), que o processo de percolação em etanol 98° GL foi mais eficiente na extração dos flavonóides totais do que a infusão. Neste caso, não se pode atribuir os resultados, unicamente, aos solventes utilizados, mas possivelmente; às técnicas extrativas adotadas, tendo em vista que, a percolação foi realizada, por um período de 24 h, e o infuso foi preparado deixando o material em contato com água fervente, por 15 minutos. Sendo assim, é possível que o tempo de infusão tenha sido insuficiente para a total solubilização dos flavonóides presentes, tendo resultado nos teores reduzidos dos infusos.

Considerando o método usado para a quantificação dos flavonóides totais por espectrofotometria, foi adotada a metodologia farmacopêica modificada (SANTOS *et al*, 1998 e FUNARI *et al*, 2006), que se baseia na propriedade dos flavonóides de formarem complexos estáveis com o cátion alumínio, em metanol.

Após a reação de formação de complexo, ocorre um deslocamento batocrômico (para maior comprimento de onda) do sinal do flavonóide, no espectro UV, para maiores comprimentos de onda e uma intensificação das absorções (WOLLENWEBER & JAY, 1988).

Para a construção da reta analítica, foi obtida previamente a curva de Ringbom, com o intuito de encontrar a faixa de linearidade dos valores de absorbância em relação às concentrações do padrão de quercetina. Na construção da curva de Ringbom, o ponto de saturação dos cátions de alumínio do reativo empregado (cloreto de alumínio) deve estar aquém da faixa de trabalho, para que não interfira nos resultados

Na pesquisa dos padrões de artemisinina, quercetina e rutina, selecionados para o presente estudo, foi constatada a sua presença, nos extratos hidroetanólicos e infusos de *A. annua*, ao longo de todo o período considerado, independentemente do estado de conservação das partes aéreas extraídas e da fenofase (**Tabelas 15 e 16**). A presença dos flavonóides acima referidos, em todas as fenofases e órgãos de *A. annua* foi anteriormente verificada (KLAYMAN *et al*, 1984,

SHILIN *et al*, 1989, MARCO *et al*, 1990). Desta forma, mostram marcadores químicos viáveis, aliando-se a facilidade de sua obtenção, nas análises de rotina.

Em relação a *B. pilosa*, os infusos de folhas, vegetal inteiro e das raízes *in natura*, apresentaram quercetina em todas as fenofases de coleta do material vegetal (**Tabela 17**), estando de acordo com as constatações de outros autores, que detectaram-na, nestas partes vegetais (ZHAO *et al*, 2004, CHIANG *et al*, 2004).

Quanto aos infusos de *B. pilosa*, preparados a partir da droga, somente para as raízes, foi realizada a pesquisa de quercetina, em todas as fenofases, e pôde-se constatar a presença da aglicona, em todas elas (**Tabela 17**). Nos infusos das folhas (droga), o mesmo foi constatado, exceto na fenofase de pré-floração, não tendo sido determinada. O mesmo ocorrendo para todos os infusos da droga referente ao vegetal inteiro.

Quanto à rutina, nos infusos das partes *in natura* de *B. pilosa*, pode-se verificar a ausência do glicosídeo em folhas, na fenofase vegetativa e, em raízes, nas fenofases de pré-floração e de frutificação (**Tabela 17**). A presença da aglicona (quercetina), e a ausência do seu glicosídeo (rutina), nestes casos, deve estar relacionada ao mecanismo de distribuição diferencial da forma mais hidrossolúvel do flavonóide, no vegetal, possivelmente, em função das necessidades diferenciadas de flavonóides, nos diferentes órgãos, nas fenofases distintas (HARBORNE, 1988). Tal hipótese pode ser confirmada pelas determinações realizadas nos extratos correspondentes dos infusos do vegetal inteiro *in natura*, que apresentaram rutina, ao longo de todas as fenofases (**Tabela 17**).

Tendo em vista a determinação dos teores dos padrões flavonoídicos em somente cinco extratos hidroetanólicos de *B. pilosa* (**Tabela 17**), não foi possível tecer considerações mais aprofundadas sobre os resultados. Entretanto, comparando-se os resultados obtidos, de forma pontual, para os extratos hidroetanólicos, com aqueles dos infusos preparados em condições equivalentes, algumas constatações foram realizadas.

Sendo assim, tanto no extrato hidroetanólico, quanto no infuso de folha (*in natura* e droga), em fenofase de frutificação (**Tabela 17**), a quercetina foi detectada. O mesmo ocorrendo com a rutina, exceto no extrato hidroetanólico das folhas preparadas na forma de droga. Desta forma, é provável que, a extração do glicosídeo, por percolação da droga com etanol 96 °C, não tenha sido tão eficiente na solubilização do flavonóide quanto aquela por meio da infusão. E, também, em relação à percolação das folhas frescas, a rutina pode não ter sido extraída em função do baixo grau de

umectação da droga ou, ainda, da menor solubilidade do glicosídeo, no solvente (hidroetanólico) usado, comparativamente à água fervente (infusão).

Comparando-se os extratos hidroetanólicos e infusos das raízes coletadas na fenofase de frutificação (**Tabela 17**), verificou-se coincidência de perfil, ou seja, a quercetina foi detectada, em ambos, independentemente do estado de conservação. Entretanto a rutina, determinada nos infusos e, somente, no extrato hidroetanólico das raízes, na forma de droga, não foi encontrada, nos dois extratos, confirmando a ausência do glicosídeo, nas raízes, nesta fenofase.

No tocante ao extrato hidroetanólico do vegetal inteiro, na forma de droga, coletado na fenofase vegetativa, e àquele das raízes, *in natura*, na pré-floração, somente a quercetina foi detectada (**Tabela 17**). Em confronto com o infuso correspondente, pode-se dizer que os resultados referentes àqueles das raízes *in natura* estão coerentes, tendo apresentado o mesmo perfil (**Tabela 17**). Para o vegetal inteiro não houve determinação referente ao infuso

A quantificação da artemisinina nos extratos de *A. annua*, preparados a partir das partes aéreas frescas, mostrou que os maiores teores, para ambos os extratos ocorreram naqueles obtidos a partir da fenofase vegetativa. Nesta, o material vegetal foi constituído de folhas, sendo que, na fenofase seguinte (**Figura 46**), o teor apresentou redução do valor. Enquanto que, os extratos das inflorescências *in natura* (fenofase de floração plena) apresentaram o segundo maior teor do sesquiterpeno (**Figura 46**), indicando que os capítulos florais podem ser utilizados, alternativamente, como fonte importante, na obtenção de artemisinina, que atualmente é extraída, principalmente das folhas (WHO, 2004).

Com relação às determinações efetuadas, nos extratos obtidos da droga, os maiores teores de artemisinina foram observados, na fenofase de floração plena, confirmando o potencial das inflorescências como fonte do terpeno (**Figura 46**). É interessante notar que os extratos obtidos a partir da droga, nessa fenofase, acusaram teores superiores àqueles preparados com o material *in natura*. Este aumento poderia ser atribuído ao fato de que, segundo WALAART *et al* (1999), após o processo de secagem, a biossíntese da artemisinina continua ocorrendo, por outras vias metabólicas.

FIGURA 46 – Avaliação comparativa dos teores médios de artemisinina em infusos e extratos hidroetanólicos de partes aéreas (*in natura*, droga) de *A. annua* L. coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena

No confronto dos teores de artemisinina, nos extratos hidroetanólicos e infusos de *A. annua* (Tabela 15) (Figura 46), verificou-se o maior poder extrator do terpeno pelo etanol 96°GL (percolação), em relação à água fervente (infusão), ratificando os resultados de BILIA et al. (2006). O mesmo ocorrendo para os flavonóides totais desta espécie (Figura 47).

Em paralelo, constatou-se que, para extratos obtidos nas mesmas condições, os valores dos teores da artemisinina foram, em geral, superiores àqueles dos flavonóides totais (Figura 47).

FIGURA 47 – Confronto dos teores médios de flavonóide totais e de artemisinina em infusos e extratos hidroetanólicos de partes aéreas (*in natura*, droga) de *A. annua* L. coletadas nas fenofases vegetativa, de pré-floração e de floração plena

Na análise, por CLAE, empregou-se a reação de derivatização da artemisinina, considerando que esta não possui grupos cromóforos em sua estrutura, apresentando pouca absorvidade (216 nm), além de que muitos compostos presentes nos extratos de *A. annua* absorvem em comprimentos de onda entre 210 e 220 nm podendo sobrepor-se, parcial ou totalmente, ao sinal de artemisinina (ELSOHLY *et al*, 1987). Com o intuito de modificar a estrutura molecular da artemisinina, para um composto espectrofotometricamente ativo (cromóforo), o sesquiterpeno foi tratado com solução alcalina para a obtenção do composto Q260 (XUANKUN *et al*, 1983) (**Figura 48**), que absorve no comprimento de onda de 260 nm.

FIGURA 48 – Conversão de artemisinina no composto Q292, por tratamento com NaOH 2% (m/v) e, em Q260, após o tratamento com ácido acético 0,1 M (CLAE/UV) (ZHAO & ZENG, 1986).

Considerando a estequiometria da reação de derivatização (1:1), os resultados obtidos para o composto Q260 corresponderam à artemisinina.

Em relação ao método adaptado de Zhao & Zeng (1985), empregado nas determinações da artemisinina por CLAE, os resultados foram confiáveis, uma vez que o coeficiente de linearidade foi muito próximo de 1 ($r = 0,999$). Entretanto, a precisão do método (CV entre 1,70 a 6,60%) não ocorreu dentro dos parâmetros internacionais (RIBANI *et al*, 2004) para os extratos das fenofases vegetativa e de floração plena, onde o CV, para métodos que quantificam macroquantidades, devem estar entre os intervalos de 1 a 2%, necessitando melhoramentos como o aumento do número de réplicas.

Os valores obtidos no ensaio de recuperação para os extratos das três fenofases foram confiáveis (81,09 a 94,31%, com CV de 1,81 a 2,88%), já que se encontram dentro dos padrões internacionais (70 a 120%, com CV de até 20%) (RIBANI *et al*, 2004).

O método de CLAE/UV foi considerado o mais adequado para a determinação do teor de artemisinina em extratos brutos da espécie (QIAN *et al*, 2005).

Em estudos anteriores, diversos autores mostraram a variação da fenofase de maior teor em artemisinina (LIERSCH *et al*, 1986; SINGH *et al*, 1988; WOERDENBAG *et al*, 1994; GUPTA *et al*, 1994; FERREIRA *et al*, 1995; KAWAMOTO *et al*, 1999; BARALDI *et al*, 2008). Sabe-se que, entre os fatores envolvidos estão aqueles inerentes ao próprio clone cultivado e/ou aos fatores edáficos (OLIVEIRA *et al*, 1991; FERREIRA *et al*, 2005).

O híbrido estudado *A. annua* cv. *Silves-1* (CPQBA) foi desenvolvido dentro de um programa de melhoramento e adaptação da espécie às condições climáticas brasileiras, para obtenção de altos rendimentos de artemisinina e aumento da biomassa (MAGALHÃES, 2002; MARCHESE *et al*, 2005). Os resultados confirmaram que o híbrido está entre aqueles de maior teor de artemisinina (MUELLER *et al*, 2000; BHANDARI *et al*, 2005; REALE *et al*, 2008)

Os perfis cromatográficos em CCD dos compostos terpênicos de *A. annua* presentes nas frações bioativas selecionadas do extrato hidroetanólico das inflorescências (floração plena), em *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila, apresentaram mancha correspondente à artemisinina, enquanto que a quercetina não foi detectada naquela em *n*-hexano (**Figuras 17 a 19**), o que está de acordo com as polaridades do marcador, que não foi solúvel neste solvente. Os sistemas cromatográficos empregados permitiram a visualização de outros componentes terpênicos e flavonoídicos, cujos R_fs foram determinados nas condições da análise e auxiliam na caracterização das frações, embora não tenham sido identificados. O perfil em cromatografia planar é uma ferramenta simples e importante sendo recomendada pela OMS e diversas Farmacopéias (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV), pela agilidade que oferece no reconhecimento de extratos vegetais.

No caso de *B. pilosa*, os principais componentes caracterizados por outros autores (BRANDÃO *et al*, 1997; KRETLI *et al*, 2001) e, aos quais foi atribuída atividade antimalárica, foram os acetilenos. Estes se mostraram muito instáveis e não estão disponíveis comercialmente, o que inviabilizou o seu uso na caracterização dos extratos e frações, diferentemente dos marcadores flavonoídicos, que foram empregados nas análises, por CLAE (**Tabela 17**).

Apesar de, até o momento, não terem sido realizadas as análises das frações ativas de *B. pilosa*, pretende-se dar continuidade ao estudo, com a caracterização dos componentes antileishmaniais, efetuando análises, por CG-EM, de forma a obter um perfil dos mesmos para, futuramente, efetuar o refração visando identificar as substâncias responsáveis pela importante atividade constatada. O mesmo valendo para *A. annua*.

6.3 Estudo biológico

Na pesquisa de novos agentes antileishmania, metabólitos secundários de diversas classes químicas, como sesquiterpenos, flavonóides e poliacetilenos têm demonstrado resultados promissores (YANG & LIEW, 1993, RASMUSSEN *et al*, 2000,

SENN *et al*, 2005, TASDEMIR *et al*, 2006, MISHINA *et al*, 2006; LEZAMA-DÁVILA *et al*, 2007).

Somente duas espécies do gênero *Artemisia*, ou seja, *A. indica* e *A. herba-alba*, tiveram seus extratos brutos e óleos voláteis avaliados frente aos parasitas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. major*, tendo mostrado atividade (GANGULY *et al* 2006, HATIMI *et al*, 2001).

A. annua tem sido muito investigada por sua atividade antimalárica, bem como o seu principal componente bioativo artemisinina (FERREIRA *et al*, 2005). Entretanto, apesar deste terpeno ter sido testado por diversos pesquisadores, frente às diferentes espécies de *Leishmania*, como: *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum* e *L. mexicana* (YANG & LIEW, 1993; AVERY *et al*, 2003; MISHINA *et al*, 2007; LEZAMA-DAVILA *et al*, 2007), até o momento, os extratos da espécie não foram avaliados quanto à atividade antileishmania, o que motivou o presente estudo.

De forma similar, segundo a literatura disponível até o momento, os extratos brutos e os acetilenos da espécie *B. pilosa*, não foram avaliados quanto à atividade antileishmania (TOWERS & WAT, 1978, WAT *et al*, 1979, ARNASON *et al*, 1980, N'DOUNGA *et al*, 1983, ALVAREZ *et al*, 1996, BRANDÃO *et al*, 1997, PEREIRA *et al*, 1999, KRETTLI *et al*, 2001, OLIVEIRA *et al*, 2004, GROMBONE-GUARATINI *et al*, 2005, CHIANG *et al*, 2007) apesar da potente atividade frente a patógenos, como: *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Plasmodium falciparum* e *Faciola hepatica* (TOWERS & WAT, 1978; ARNASON *et al*, 1980; MINAMI & OLIVEIRA, 1986; MACHADO *et al*, 1988; BRANDÃO *et al*, 1997, VALDÉS & REGO, 2001), tendo estimulado sua investigação.

Com relação à atividade antimalárica, diversas pesquisas com ambas as espécies demonstraram que, os principais compostos bioativos, como o sesquiterpeno artemisinina, de *A. annua* e os poliacetilenos de *B. pilosa*, tiveram a atividade intensificada pelos flavonóides presentes nos extratos brutos (TASDEMIR *et al*, 2006). Desta forma, o presente trabalho, buscou investigar a atividade leishmanicida e a existência de possível sinergismo entre estes metabólitos, à semelhança daquele constatado frente ao plasmódio.

Para tanto, os extratos brutos foram fracionados (item 4.4.3) e testados frente aos parasitas de *L. amazonensis in vitro*, visando obter indicação das classes de constituintes que, isolada ou conjuntamente, poderiam ter contribuído para a ação verificada (**Tabelas 22 e 23**).

Com base em estudos anteriores de YANG & LIEW (1993) e LEZAMA-DÁVILA *et al* (2007), sobre a atividade *in vitro* e *in vivo* de artemisinina frente a cepas de *L. major* e *L. donovani* e no gráfico de viabilidade dos parasitas frente às diferentes concentrações de artemisinina (log) em função do tempo, foi estabelecido o período de tempo de incubação de 48 h para a realização dos testes dos extratos de *A. annua*.

Na avaliação do padrão de quercetina, constatou-se que o período de incubação em que ocorreram as maiores percentagens de morte foi de 72 h. É possível que, em função da baixa solubilidade da quercetina em DMSO, a concentração testada efetivamente tenha sido inferior àquela esperada, tendo interferido no tempo de ação do flavonóide. O mesmo pode ter ocorrido nos testes para a determinação da CI_{50} , cujo valor foi superior a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 18). Este resultado mostra-se semelhante àquele de TALEB-CONTINI *et al*, 2004, que verificaram atividade antileishmania da quercetina frente a *L. amazonensis* (CI_{50} : 123,50 $\mu\text{g/mL}$).

Nos ensaios preliminares, realizou-se comparação entre os métodos de contagem dos parasitas, por determinação direta e pela técnica do MTT (itens 4.8.1.1 e 4.8.1.2), tendo havido concordância de resultados, optou-se pela segunda.

Em relação aos infusos, o estudo não prosseguiu, em função da maioria deles ter sido inativa, para ambas as espécies, sendo que, somente aqueles de raízes de *B. pilosa* mostraram algum nível de atividade antileishmania *in vitro*, tendo sido baixo, até mesmo na elevada concentração testada (1.600 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 19).

Parte dos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa* (Tabela 21) não foram obtidos ou testados *in vitro*, deixando lacuna a ser preenchida em estudos futuros. O mesmo valendo para parte das frações dos extratos hidroetanólicos de ambas as espécies (Tabelas 20 e 21).

Considerando os extratos hidroetanólicos de *A. annua*, verificou-se que o nível de atividade foi maior para aqueles preparados com material coletado na fenofase vegetativa, independentemente do estado de conservação do mesmo (Tabela 20). O teor de artemisinina, neste material, foi o menor das três fenofases (0,60 $\pm$ 0,03%, m/m) (Tabela 13). Uma vez que a concentração final deste composto, nos extratos testados *in vitro* (1.600 $\mu\text{g/mL}$), foi inferior àquela dos testes nos quais, unicamente, o padrão de artemisinina (90 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliado, tendo levado à morte de 100% dos parasitas (Tabela 18). Sendo assim, pode-se inferir que, outros componentes dos extratos contribuíram para a atividade leishmanicida (Tabela 20).

Por sua vez, os extratos hidroetanólicos de *A. annua* menos ativos foram obtidos, a partir de material coletado na fenofase de pré-floração, sendo que o material seco (droga) levou ao menor índice de mortes ($20,5 \pm 4,2 \%$), podendo ter ocorrido perda e/ou degradação de componentes bioativos, durante o processo de secagem (**Tabela 20**).

No tocante aos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa*, ainda que não tenham sido avaliados todos os órgãos vegetais, em todas as fenofases, tendo sido preparados somente aqueles referentes às fenofases vegetativa e de frutificação, excetuando-se os extratos de folhas e de raiz, na forma de droga, em fenofase vegetativa (**Tabela 21**), alguns comentários tornaram-se possíveis.

De forma geral, os níveis de atividade dos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa* (**Tabela 21**) foram inferiores àqueles dos extratos de *A. annua* (**Tabela 20**). Além disto, quando possível estabelecer a comparação entre extratos de *B. pilosa* correspondentes, preparados com o material vegetal fresco (*in natura*) e seco (droga), verificou-se que, os primeiros foram mais ativos (**Tabela 21**), sugerindo ter havido interferência do processo de secagem sobre os compostos bioativos, à semelhança da outra espécie estudada.

Na etapa inicial de estudo, o número de frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos, que apresentaram atividade leishmanicida, foi de: 20 e 12, respectivamente, para *A. annua* e *B. pilosa* (**Figuras 20 e 21, Tabelas 20 e 21**), não podendo ser analisados sob o ponto de vista dos valores absolutos, uma vez que houveram diferenças nos parâmetros avaliados entre as espécies, no que tange aos órgãos vegetais e fenofases considerados.

As frações menos ativas de *A. annua* foram aquelas em metanol, cuja percentagem de morte se aproximou de 50%, enquanto as demais frações, de polaridade inferior ao referido solvente, tiveram percentagens próximas de 100%, à concentração de 300 µg/mL.

A polaridade dessas frações, com maior nível de atividade frente às formas promastigotas do parasita estudado, está de acordo com a solubilização, nestas, de compostos terpênicos e de agliconas de flavonóides, cujas ações antileishmania foi anteriormente relatada (YANG & LIEW, 1993; TALEB-CONTINI *et al*, 2004; TASDEMIR *et al*, 2006).

Os cromatogramas das frações clorofórmio e acetato de etila confirmaram a presença de artemisinina e de quercetina, simultaneamente, enquanto que a fração *n*-hexano apresentou somente artemisinina (**Figuras 17 a 19**). No entanto, os dados

obtidos não são suficientes para permitir conclusões acerca do sinergismo destas classes de substâncias na atividade antileishmania, devendo-se aprofundar a pesquisa.

No tocante a *B. pilosa*, deve-se ressaltar que os testes foram realizados a partir de frações dos extratos hidroetanólicos provenientes de material coletado, somente, em duas fenofases (vegetativa e frutificação) (**Tabela 21**), o que explica o menor número de frações bioativas selecionadas, comparando-se com *A. annua* (**Tabela 20**).

De forma geral, as menores percentagens de morte foram obtidas com as frações de *B. pilosa* em acetato de etila e em metanol. Tal fato indica que os compostos bioativos de *B. pilosa* foram solubilizados, sobretudo, pelo *n*-hexano e pelo diclorometano, uma vez que, estas, foram as frações mais ativas, o que é compatível com a solubilidade dos poliacetilenos presentes na espécie, e estando de acordo com BRANDÃO *et al* (1997), que comprovaram a ação antiprotozoária destes compostos.

Na etapa seguinte, visou-se à seleção das frações orgânicas mais ativas de ambas as espécies, para a determinação das concentrações inibitórias de 50% e de 90% dos parasitas (CI₅₀ e CI₉₀) e das concentrações citotóxicas de 50% das células epiteliais humanas (HEP-2) (CC₅₀). Para isto, adotaram-se critérios diferentes a cada espécie, em função dos níveis de atividade apresentados, por elas (**Figuras 21 e 22**).

Apesar da determinação destes parâmetros ser usualmente realizada para compostos isolados, também, pode fornecer subsídios à triagem de extratos vegetais mais ativos frente a agentes de doenças de origem protozoária, priorizando o seu estudo em relação aos menos ativos. Este direcionamento foi aplicado para as frações das espécies pesquisadas.

No caso de *A. annua*, das 20 frações ativas (**Figura 21**), doze levaram à morte em média 99,5 ($\pm$ 2,89) %, ou mais das formas promastigotas de *L. amazonensis* (**Tabela 20**). Entre estas, três foram selecionadas, entre as mais ativas, para a determinação das CI₅₀ e CI₉₀, tendo sido: *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila dos extratos hidroetanólicos das partes aéreas secas (droga) de *A. annua*, em fenofase de floração plena (**Tabela 22**).

Para *B. pilosa*, das 12 frações obtidas e que apresentaram diferentes níveis de atividade leishmanicida (**Tabela 21**), seis foram selecionadas, tendo levado ao percentual de mortes de 90,75 ($\pm$ 2,89) %, ou mais, dos parasitas (**Figura 22**). E, entre estas, passaram por etapa de determinação das concentrações inibitórias (CI₅₀, CI₉₀) e citotóxica (CC₅₀), as seguintes: *n*-hexano, diclorometano e metanol de folha *in*

natura (fenofase vegetativa), *n*-hexano de raiz *in natura* (fenofase vegetativa) e na forma de droga (fenofase de frutificação).

De forma geral, à semelhança dos extratos hidroetanólicos, as porcentagens de morte dos parasitas, tratados com as frações mais ativas de *A. annua*, foram superiores em relação àqueles tratados com *B. pilosa*.

É interessante notar que, para ambas as espécies estudadas (**Tabelas 20 e 21**) as frações mais ativas apresentaram nível de atividade superior àquele do extrato hidroetanólico de origem. Desta forma, confirmou-se o fato conhecido de que, classes de substâncias e/ou substâncias isoladas, encontradas em baixa concentração no extrato, podem ser altamente ativas, quando presentes de forma mais concentrada, por exemplo, nas frações dos mesmos, ou ainda na forma purificada.

Portanto, apesar da triagem fitoquímica ser uma estratégia que agiliza o processo de pesquisa de novos compostos bioativos, deve-se ponderar acerca de suas limitações, inclusive considerando a possibilidade de que a atividade dos extratos seja resultado de efeito sinérgico entre classes de compostos e/ou de componentes presentes em uma espécie vegetal, conforme foi verificado para a atividade antimalárica de *A. annua* atribuída à ação sinérgica de artemisinina e dos flavonóides (ELFORD *et al*, 1987), devendo ser avaliada com maior profundidade, em relação à atividade antileishmania.

Entre as frações orgânicas com menor CI_{50} , destacaram-se duas, cujo valor coincidiu e foi o menor de todos (CI_{50} $8,87 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$). As frações foram: acetato de etila do extrato hidroetanólico das partes aéreas (droga) de *A. annua* em fenofase de floração plena (**Tabela 22**) e a fração *n*-hexano do extrato hidroetanólico de raízes (*in natura*) de *B. pilosa*, em fenofase de frutificação (**Tabela 23**). Para ambas as frações o nível de citotoxicidade *in vitro* foi muito reduzido ($CC_{50} > 1,1 \text{ mg/mL}$) (**Tabelas 22 e 23**), tendo-lhes garantido o menor Índice de Seletividade (IS), entre todas as frações. Os baixos de IS (0,008, 0,007) (**Tabelas 22 e 23**) sugeriram maior seletividade da ação leishmanicida, em relação à citotoxicidade sobre as células HEP-2, tornando estas frações, particularmente, interessantes para futuros estudos.

Os resultados anteriores são ainda mais promissores, quando se considera que os valores das CI_{50} destas frações foram inferiores àqueles das substâncias-padrão avaliadas (**Tabela 18**).

Deve-se lembrar que, na floração plena de *A. annua*, foram consideradas, no estudo, as inflorescências, uma vez que as folhas não estão presentes no vegetal,

nesta fase. Portanto, pode-se dizer que, este órgão vegetal mostrou importante atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (**Tabela 22**) consistindo fonte potencial de droga vegetal leishmanicida. O mesmo ocorrendo para as raízes de *B. pilosa* (**Tabela 23**).

Contudo, apesar dos maiores valores das CI_{50} das demais frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos de folhas e de raízes de *B. pilosa*, em fenofase vegetativa, estas mostraram-se, igualmente, promissoras em função de sua baixa citotoxicidade *in vitro* (**Tabela 23**), justificando o maior aprofundamento nas pesquisas. O mesmo pode ser dito quanto às frações *n*-hexano e clorofórmio dos extratos hidroetanólicos das inflorescências (droga) de *A. annua* (**Tabela 22**).

Na determinação das concentrações inibitórias de 50% (CI_{50}) dos padrões de artemisinina, quercetina e rutina frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, somente a primeira apresentou valor definido (CI_{50} : $13,79 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 18**), tendo mostrado nível de atividade razoável, e que se aproximou daqueles obtidos em ensaios frente a outras espécies de *Leishmania* (YANG & LIEW, 1993; AVERY *et al*, 2003; MISHINA *et al*, 2007; LEZAMA-DÁVILA *et al*, 2007; SEN *et al*, 2007). Em contraste, para os padrões flavonoídicos, até a máxima concentração testada (100 $\mu\text{g/mL}$), os percentuais de morte dos parasitas foram inferiores a 50% dos parasitas (**Tabela 18**), tendo inviabilizado a determinação da CC_{50} e do IS.

6.4 Estudo morfoanatômico

Neste trabalho, não foi abordado o aspecto botânico da espécie *B. pilosa*, uma vez que, os estudos morfológico e anatômico foram realizados, anteriormente, de forma detalhada, por outros autores (VALDÉS & REGO, 2001; SOUZA, 2007; DUARTE & ESTELITA, 1999).

Em contraste, decidiu-se realizar o estudo de *A. annua*, tendo em vista que, somente, alguns aspectos morfoanatômicos foram descritos e constam da literatura (DUKE & PAUL, 1993; DUKE *et al*, 1994; FERREIRA & JANICK, 1995; MARCHESE *et al*, 2005), porém de forma incompleta. Além disto, face ao conhecimento de que a droga deverá ser comercializada, em breve, por sua atividade antimalárica, há necessidade da descrição detalhada de elementos de diagnose.

Considerando, igualmente, o potencial uso como leishmanicida, a importância deste estudo ganhou reforço, sendo necessária para o registro, como fitoterápico ou como insumo vegetal, junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, na obtenção de subsídios para a sua identificação, de acordo com as resoluções da RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Com este objetivo, foi elaborada a descrição

minuciosa das folhas e das inflorescências, as quais demonstraram atividade leishmanicida.

Os exemplares coletados de *A. annua* apresentaram em média 2 m de altura, tendo-se observado homogeneidade de caracteres (**Figura 23**), em função de o híbrido ter sido mantido, em condições uniformes de cultivo (de MAGALHÃES, 2002). Entretanto, há relatos de outros autores de exemplares com 0,3 a 2,5 m altura. Esta variação foi atribuída às diferenças de variedade, local de plantio e outras condições agrônômicas (LAUGHIN et al *apud* KEYS, 1976).

No tocante aos caracteres morfológicos de *A. annua*, a ocorrência de capítulos em inflorescências compostas, constituindo panícula (**Figuras 30 e 32**), sendo providos de floretas gamopétalas e de receptáculo cônico, além da presença de brácteas involucrais, de floretas marginais femininas e centrais hermafroditas, mostraram ser carctere comum a outras espécies de *Artemisia* (METCALFE & CHALK, 1950; BREMER, TORRELL, 1999), além de terem sido descritas, anteriormente, para a mesma espécie (FERREIRA & JANICK, 1995, LAUGHLIN *et al*, 2002 *apud* KEYS, 1976). Entretanto, a disposição das brácteas involucrais em fileira dupla (**Figuras 31 A e C**), não foi relatada, previamente.

Quanto à corola denteada das floretas hermafroditas, foi observado que o ápice se divide em cinco lóbulos (**Figura 32E**), conforme descrito por FERREIRA & JANICK (1995), entretanto para as floretas femininas constatou-se número de lóbulos de dois a três, no ápice da corola, semelhantemente, ao que foi descrito por FERREIRA & JANICK (1995) e diferentemente de KEYS (1976), que relatou a presença de quatro.

Em descrições anteriores do limbo da espécie foram constatadas controvérsias, quanto à composição foliar, sendo que MAGALHÃES *et al* (1997) descreveram-no como simples, enquanto LAUGHIN *et al* (2002) consideraram as folhas compostas pinatisectas. As diferenças na descrição deste caractere são perfeitamente compreensíveis, em função da complexidade morfológica constatada das folhas de *A. annua* (**Figuras 25, 26, 28 e 29**).

Sob observação mais atenta, verifica-se a ocorrência de folíolos de primeira e de segunda ordens (**Figuras 26 A, 26 B e 28**), com os respectivos pecíolos (folíolos basais e medianos) e peciólulos.

Em relação à complexidade dos folíolos de primeira ordem, o fato de serem constituídos por lâmina segmentada, mas com folíolos independentes (GONÇALVES & LORENZI, 2007), o que se verifica pela facilidade em destacá-los

(Figura 28), confirma serem compostos por folíolos de segunda ordem, e não por simples subdivisões do limbo.

Desta forma, folhas de *A. annua*, mostraram-se compostas e os limbos dos folíolos de segunda ordem mostraram padrões variados de subdivisão da lâmina foliar, podendo ser lobados, fendidos e partidos, em um mesmo folíolo (Figura 25)

É interessante notar que, no gênero *Artemisia*, as folhas foram descritas, simplesmente, como sendo dissecadas (METCALFE & CHALK, 1950; BREMER, TORRELL, 1999).

Características observadas em *A. annua* como: folhas alternas, consistência membranácea, inflorescências em capítulos, por sua vez agrupados em inflorescências compostas na forma de panícula, são comuns à família Asteraceae (CRONQUIST, 1981, HEYWOOD, 1993, JUDD, 2002).

Entre os caracteres morfológicos de folha, que se mostraram peculiares à espécie, em relação ao gênero *Artemisia* e que não foram anteriormente descritos, fornecendo elementos importantes para a identificação da mesma, citam-se: a distribuição diferencial do indumento, por toda a face adaxial e circunscrito à região das nervuras, na face abaxial. As nervuras são salientes na face abaxial. A nervura mediana dos folíolos de segunda ordem apresentam ramificações de porte reduzido acompanhando a margem, onde se anastomosam (Figura 26C). Os folíolos apicais de primeira ordem são sésseis, enquanto que, os basais e medianos são peciolados (Figuras 25A, 28A e 28 B). A ráquis, o pecíolo e pecíolulo são alados (Figuras 25 A, 28A e 28B). Os folíolos de segunda ordem apresentam padrão de subdivisão do limbo variando de lobado a partido, em um mesmo folíolo.

O odor exalado pelos espécimes de *A. annua* foi caractere marcante, por ser intenso, até mesmo na área de cultivo, onde se dissemina. A forte disseminação dos compostos voláteis de outra espécie (*A. californica*) encontra-se descrita na literatura, sendo responsável, inclusive pela distribuição de terpenos que produzem o conhecido efeito alelopático (HARBORNE, 1988).

O odor peculiar (característico) e canforáceo de *A. annua*, de fácil reconhecimento, permaneceu na droga sendo, portanto, característica auxiliar importante na identificação da mesma, assim como o dobramento dos folíolos em direção à face abaxial (Figura 28B), após a secagem do material.

A análise das floretas de *A. annua*, em montagem direta, sob observação através de microscópio de luz, em função do tamanho reduzido, revelou a presença de tricomas glandulares bisseriados dispersos sobre a superfície da corola das mesmas,

seja das hermafroditas ou das femininas (**Figuras 32B, E e 33C**), estando de acordo com a descrição de FERREIRA & JANICK (1995).

O número de floretas marginais (femininas) e centrais (hermafroditas), no capítulo foi de, respectivamente, 3-10 e 10-20, em contraste ao que foi descrito pelos mesmos autores (FERREIRA & JANICK, 1995) os quais relataram a presença de 12 floretas marginais e de 12 centrais.

Do ponto de vista anatômico, as folhas de *A. annua* apresentaram mesofilo dorsiventral (**Figura 34**), à semelhança de outras espécies de *Artemisia* (FAHN, 1990) e conforme verificado, anteriormente, por outros autores (DUKE *et al*, 1994, MARCHESE *et al*, 2005). A estreita semelhança entre os parênquimas paliádico e esponjoso da espécie foi, igualmente, comentada por MARCHESE *et al*. (2005) e verificada, no presente estudo (**Figura 34**), uma vez que predominam células de formato alongado no parênquima esponjoso.

A presença das células coletoras (**Figura 34**) não havia sido relatada em *A. annua*. Estas células facilitam a translocação de nutrientes, entre os dois parênquimas clorofilianos (ESAU, 1959).

No tocante aos tricomas de *A. annua*, foram detalhadamente documentados, tanto por microscopia, quanto por ultramicroscopia, em estudos anteriores (DUKE & PAUL, 1993; DUKE *et al*, 1994; FERREIRA & JANICK, 1995; MARCHESE *et al*, 2005). Entre estes, encontram-se os tricomas glandulares bisseriados típicos da família Asteraceae (METCALFE & CHALK, 1950), sendo constituídos de duas fileiras de cinco células (**Figura 33C**). Tais tricomas foram, igualmente, descritos por DUKE & PAUL, 1993; DUKE *et al*, 1994 e FERREIRA & JANICK, 1995, na espécie, que os consideraram local de armazenamento de artemisinina.

Com relação aos tricomas tectores, foram descritos no gênero (METCALFE & CHALK, 1950) como sendo constituídos de pedicelo unicelular ou pluricelular unisseriado e providos de célula terminal longa, em formato de chicote ou bifurcada e na espécie, simplesmente, como filamentosos (DUKE & PAUL, 1993), dispondo-se abaixo do nível das demais células epidérmicas.

No presente estudo, em *A. annua*, constatou-se a ocorrência de numerosos tricomas tectores que apresentaram pedicelo unisseriado constituído de três a oito células e ramificação terminal filamentosa, unicelular, conferindo-lhes aspecto de letra "T" (**Figura 36**). Estes tricomas encontraram-se dispostos, no mesmo nível das demais células epidérmicas, ou em nível inferior.

A disposição em nível inferior às células epidérmicas foi descrita por DUKE & PAUL (1993), que verificaram, adicionalmente, a formação de fileiras de tricomas, por todo o limbo foliar, nesse mesmo nível. Entretanto, não foram observadas fileiras, no presente estudo. Apesar disto, verificou-se a ocorrência destes tricomas, com maior frequência, na nervura mediana.

MARCHESE *et al* (2005) relataram a ocorrência de estômatos em ambas as faces de *A. annua*, o que foi confirmado (**Figura 34**). Entretanto, não descreveram a ocorrência de estômatos anomocíticos, em ambas as faces (**Figura 35**), e anisocítico, na face abaxial, localizando-se no mesmo nível ou acima das demais células epidérmicas (**Figura 34**). METCALFE & CHALK (1950) reportaram a ocorrência de estômatos anisocíticos na família Asteraceae.

Outras características, observadas na região do sistema vascular da folha de *A. annua*, relacionaram-se àquelas da família vegetal (METCALFE & CHALK, 1950), como: a presença de dutos secretores próximos aos feixes vasculares e de bainha de células parenquimáticas ao redor dos mesmos (**Figuras 34 e 38**).

O pecíolo e a raque de *A. annua* não haviam sido descritos, anteriormente, tendo mostrado numerosos caracteres relevantes para a identificação da espécie. Entretanto, no tocante ao pecíolo, a disposição dos feixes vasculares, em arco descontínuo, foi característica relatada anteriormente, no gênero *Artemisia*, por METCALFE & CHALK (1950).

Frente às observações inéditas realizadas acerca da anatomia da lâmina foliar de *A. annua*, que se mostraram peculiares à espécie e fundamentais à identificação, enumeraram-se, resumidamente: mesofilo dorsiventral, número de estratos (1-2) dos parênquimas clorofilianos, presença de estômatos anisocíticos, além dos anomocíticos, somente na face abaxial do limbo, disposição dos estômatos no mesmo nível ou acima das demais células epidérmicas, presença de células coletoras na região mediana, células epidérmicas menores na face abaxial, cutícula estriada em ambas as faces, pedicelo de 3 a 8 células dos tricomas tectores em "T", tricomas glandulares bisseriados característicos de Asteraceae constituídos de duas fileiras de cinco células, em ambas as faces.

No pecíolo, destacaram-se os caracteres anatômicos seguintes: secção transversal biconvexa com expansões laterais providas de clorênquima, contorno irregular da região central, presença dos tricomas tectores na face adaxial, estômatos em ambas as faces, no mesmo nível e acima daquele das demais células epidérmicas, colênquima angular na região subepidérmica da região do sistema vascular

constituindo camada única na face adaxial e 1-2 estratos na face abaxial. sistema vascular constituído de 1-3 feixes vasculares colaterais, 1-3 dutos secretores de tamanhos distintos externamente ao xilema, calota de fibras lignificadas externamente ao floema (3-10 camadas). Região alada com anatomia similar àquela do mesófilo foliar, com parênquima clorofiliano em paliçada e bainha parenquimática envolvendo os feixes vasculares de pequeno porte.

Em relação à raque, destacaram-se as seguintes características anatômicas, como elementos de importância na diagnose: contorno irregular, expansões laterais opostas, contorno plano na face adaxial, contorno convexo na face abaxial, presença de estômatos em ambas as faces, em maior número na abaxial, estômatos na face adaxial presentes somente na região lateral, células epidérmicas isodiamétricas dispostas em um estrato único e com paredes celulares periclinais espessas, presença de tricomas tectores em ambas as faces, 1 camada de colênquima angular na face adaxial e 1-2 camadas; na região central da face abaxial, 3 feixes vasculares de diferentes dimensões alinhados, sendo o maior ao centro, dutos secretores externos ao xilema, ocorrendo em número de um (feixes vasculares menores) e de dois (feixe vascular central). Nas regiões de expansão lateral, ocorre 1 feixe vascular por expansão, sendo envolto por bainha uniestratificada de células parenquimáticas. Nesta região, há clorênquima e colênquima angular, nas extremidades.

No tocante às inclusões celulares caracterizadas nas folhas de *A. annua* foram observados os compostos fenólicos e as substâncias lipofílicas. Estas últimas, apesar de terem sido encontradas, de forma dispersa, certamente originaram-se dos dutos secretores e dos tricomas glandulares presentes na espécie. Tais estruturas secretoras, por apresentarem paredes celulares delicadas, são facilmente rompidas durante a manipulação do material, no preparo das lâminas. No caso das floretas, foi caracterizado o óleo essencial presente nos tricomas glandulares da corola, que reagiu com o Sudam III.

7 CONCLUSÕES

- 1) O rendimento das extrações de *Artemisia annua* L. foi maior por infusão, independentemente da forma de conservação e da fenofase de coleta do material extraído
- 2) Em relação a *A. annua* L., não houve tendência uniforme entre os extratos, quanto ao estado de conservação do material de origem, que possibilitou maior rendimento de extração em cada fenofase de coleta
- 3) O rendimento das extrações de *Bidens pilosa* L. foi superior para a droga, em relação aos órgãos *in natura*, independentemente do processo extrativo e da fenofase considerada
- 4) A forma extrativa, que mostrou maiores rendimentos na extração de flavonóides totais de *A. annua*, foi o extrato hidroetanólico independentemente das fenofases de coleta e estados de conservação do material extraído, confirmando a melhor solubilização destes, na mistura etanol-água (96° GL), do que na água fervente empregada no preparo dos infusos.
- 5) Os extratos hidroetanólicos de *A. annua in natura* apresentaram maiores teores de flavonóides totais em relação àqueles obtidos a partir da droga, entretanto, não foram investigados os fatores que influenciaram, neste resultado.
- 6) A presença de artemisinina, quercetina e rutina foi constatada em todos os extratos de *A. annua*. e, portanto, foi independente de: forma extrativa, fenofase, órgão vegetal (folhas e inflorescências) e forma de conservação (*in natura*, droga) do material vegetal de origem, sendo viáveis como marcadores químicos nas análises desta espécie.
- 7) O teor de artemisinina foi maior nos extratos hidroetanólicos em relação aos infusos, independentemente das fenofases e formas de conservação do material vegetal empregado no preparo, apontando para esta forma extrativa, como preferencial, para a obtenção de maior concentração do composto que apresentou atividade antileishmania promissora.
- 8) Os maiores teores de artemisinina ocorreram nos extratos preparados na fenofase de floração plena, independentemente do estado de conservação do material, sendo o período em que predominam as inflorescências no vegetal, confirmando-

as como importante fonte deste composto, além das folhas que são empregadas, usualmente.

- 9) Tanto os infusos quanto os extratos hidroetanólicos, apresentaram valores dos teores de artemisinina superiores àqueles dos flavonóides totais, exceto para o extrato hidroetanólico das partes aéreas *in natura*, coletados na floração plena, em que se deu o inverso.
- 10) A quercetina foi encontrada em todos os infusos de *B. pilosa* preparados a partir de material vegetal *in natura* (folhas, vegetal inteiro e raízes), coletados nas quatro fenofases (vegetativa, pré-floração, floração plena e frutificação). Enquanto que, a rutina não foi detectada nos infusos de folhas, em fenofase vegetativa e naqueles de raízes, nas fenofases de pré-floração e de frutificação, evidenciando diferenças na distribuição e/ou biossíntese da aglicona e de seu glicosídeo, nestes órgãos, nas diferentes fenofases.
- 11) Nos infusos de *B. pilosa*, obtidos a partir das raízes, em forma de droga, a quercetina ocorreu em todos, independentemente da fenofase. Naqueles de folhas, excetuando-se a fenofase de pré-floração, para a qual não foram realizadas as determinações, a quercetina, também, foi detectada, mostrando que o estado de conservação, em geral, não interferiu na detecção da aglicona. Restando a ser avaliada a possível influência do ponto de vista quantitativo. Os infusos do vegetal inteiro, na forma de droga, igualmente, deverão ser analisados.
- 12) A detecção de rutina, em relação a um mesmo órgão vegetal, no caso de infusos de folhas e de raízes, apresentou os mesmos resultados entre as duas formas de conservação (*in natura*, droga), confirmando que a diferença na ocorrência do glicosídeo relaciona-se à variação de fenofase do vegetal.
- 13) A detecção de rutina nos infusos do vegetal inteiro *in natura*, em todas as fenofases, diferentemente daqueles das folhas e das raízes, considerados em separado, confirma a distribuição diferencial do glicosídeo no vegetal, nas diferentes fenofases.
- 14) Os infusos de *A. annua* e a maioria daqueles de *B. pilosa* foram inativos à concentração de 1.600 µg/mL, nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/ BR/73/M2269).
- 15) Os extratos hidroetanólicos mais ativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* de *A. annua* (1.600 µg/mL) foram obtidos do material vegetal

coletado na fenofase vegetativa (folhas), independentemente do estado de conservação (*in natura*, droga).

- 16) Em geral, os níveis de atividade antitripomastigota, frente a *L. amazonensis*, dos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa* foram inferiores àqueles dos extratos de *A. annua*.
- 17) A maioria dos extratos equivalentes obtidos dos órgãos vegetais de *B. pilosa* (folha, vegetal inteiro, raiz), coletados na fenofase de frutificação, foram mais ativos quando preparados a partir de material vegetal *in natura*, indicando interferência do processo de secagem sobre os compostos responsáveis pela atividade nas formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- 18) À concentração de 300 µg/mL, as frações em *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila dos extratos hidroetanólicos de *A. annua* levaram às percentagens de morte próximas de 100% das formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo compatíveis com as polaridades dos terpenos e de agliconas de flavonóides, cujas atividades antileishmania foram comprovadas.
- 19) À concentração de 300 µg/mL, as frações em *n*-hexano e diclorometano dos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa* foram as mais ativas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, estando de acordo com a polaridade dos poliacetilenos ocorrentes na espécie.
- 20) Entre as 20 frações obtidas dos extratos hidroetanólicos de *A. annua*, foram doze as frações mais ativas que levaram à morte porcentagem igual ou superior a 99,5 ($\pm 2,89$) % dos parasitas de *L. amazonensis*, à concentração de 300 µg/mL, sendo todas promissoras para o futuro isolamento de constituintes, apesar de terem sido selecionadas somente três, visando à determinação das CI_{50} , que foram: as frações *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila das partes aéreas (inflorescências), transformadas em droga, e coletadas na fenofase de floração plena.
- 21) Considerando-se as 12 frações obtidas dos extratos hidroetanólicos de *B. pilosa*, foram seis as frações mais ativas que levaram à morte porcentagem igual ou superior a 90,75 ($\pm 2,89$) % dos parasitas de *L. amazonensis*, à concentração de 300 µg/mL, citando-se as frações em: *n*-hexano, diclorometano e metanol de folha *in natura* (fenofase vegetativa), *n*-hexano de raiz *in natura* (fenofase vegetativa) e

droga (fenofase de frutificação), sendo promissoras para futuro isolamento dos compostos bioativos.

- 22) De forma geral, os valores das porcentagens de morte das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com as frações mais ativas de *A. annua*, foram superiores em relação àsquelas dos parasitas testados com *B. pilosa*.
- 23) As frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos, de ambas as espécies, apresentaram maior nível de atividade leishmanicida, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* quando comparadas aos extratos de origem, motivando a continuação do estudo, com o refractionamento das mesmas, para a identificação dos compostos bioativos.
- 24) A fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das partes aéreas (droga) de *A. annua*, em fenofase de floração plena, e a fração *n*-hexano do extrato hidroetanólico de raízes (*in natura*) de *B. pilosa*, em fenofase de frutificação, apresentaram praticamente valor idêntico de CI_{50} ($8,87 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$), tendo-se revelado o menor entre todas as frações determinadas. Concomitantemente, apresentou baixo nível de citotoxicidade *in vitro*, em células epiteliais humanas (HEP-2) ($CC_{50} > 1,1 \text{ mg/mL}$), indicando haver seletividade para a atividade leishmanicida.
- 25) As frações acetato de etila do extrato hidroetanólico das partes aéreas (droga) de *A. annua*, em fenofase de floração plena, e *n*-hexano do extrato hidroetanólico de raízes (*in natura*) de *B. pilosa* apresentaram valor de CI_{50} inferior àquele do padrão de artemisinina ($13,79 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$).
- 26) Apesar de terem apresentado valores maiores de CI_{50} , as cinco outras frações orgânicas de *B. pilosa* [*n*-hexano, diclorometano e metanol de folha *in natura* (fenofase vegetativa) e *n*-hexano de raiz *in natura* (fenofase vegetativa)] possuem atividade leishmanicida, igualmente, promissora, considerando a baixa citotoxicidade apresentada sobre as células epiteliais humanas (HEP-2).
- 27) A concentração inibitória de 50% dos parasitas de *L. amazonensis* do padrão de artemisinina, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, mostrou-se razoável (CI_{50} : $13,79 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$), à concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, estando de acordo com resultados verificados, anteriormente, frente a outras espécies de *Leishmania*.

- 28) Os padrões de quercetina e rutina foram pouco ativos, tendo causado percentagens de morte inferiores a 50%, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, até a máxima concentração testada (100 µg/mL).
- 29) Em relação à morfologia das folhas de *A. annua*, são caracteres importantes, à diagnose do vegetal: -Folhas compostas apresentando folíolos de primeira e de segunda ordem a distribuição diferencial do indumento, por toda a face adaxial e circunscrito à região das nervuras, na face abaxial; -Nervuras salientes na face abaxial, -A nervura mediana dos folíolos de segunda ordem mostrando ramificações de porte reduzido que acompanham a margem, onde se anastomosam; -Os folíolos apicais sésseis de primeira ordem, os folíolos basais e medianos peciolados. -Ráquis, pecíolo e peciólulo alados; -Folíolos de segunda ordem com padrão de subdivisão do limbo variando de lobado a partido, em um mesmo folíolo; -Odor característico forte e levemente canforáceo.
- 30) De acordo com o estudo anatômico foliar realizado, destacaram-se os seguintes caracteres de *A. annua*, para a sua identificação: Lâmina foliar: - mesófilo dorsiventral; -1 a 2 estratos dos parênquimas clorofilianos; - predominância de células do parênquima esponjoso com formato alongado;- folhas anfiestomáticas, com estômatos anomocíticos, em ambas as faces, e anisocíticos, somente na face abaxial, em mesmo nível ou acima das demais células epidérmicas;- células coletoras na região mediana do mesófilo;- células epidérmicas menores na face abaxial, cutícula estriada em ambas as faces; - tricomas tectores apresentando pedicelo unisseriado constituído de três a oito células com ramificação terminal filamentosa, unicelular, conferindo aspecto de letra “T”, dispostos no mesmo nível ou abaixo das demais células epidérmicas, sendo mais frequentes na região da nervura mediana; - tricomas glandulares bisseriados constituídos de duas fileiras de cinco células, em ambas as faces. Nervura mediana: formato biconvexo, com proeminência maior na face adaxial; - bainha parenquimática ao redor do sistema vascular com uma a três estratos celulares; - um feixe vascular colateral único; - um a três dutos secretores na região externa ao xilema;- tecido fundamental compacto constituído de prolongamento do parênquima clorofiliano, com células alongadas no sentido anticlinal. Pecíolo: - secção transversal biconvexa e contorno irregular, na região central; - presença de expansões laterais providas de clorênquima; - tricomas tectores na face adaxial; - presença de estômatos em ambas as faces, no mesmo nível e acima daquele das demais células epidérmicas; - colênquima angular constituído de um estrato na face adaxial e de 1 a 2 estratos na face abaxial; - presença de 1 a 3 feixes vasculares colaterais na região central;

- 1-3 dutos secretores de tamanhos distintos externamente ao xilema; - calota de fibras lignificadas externamente ao floema (3-10 camadas); - expansões laterais constituídas de parênquima clorofiliano em paliçada e bainha parenquimática envolvendo os feixes vasculares. Raque: - contorno irregular; - expansões laterais opostas; - contorno plano na face adaxial, contorno convexo na face abaxial; - presença de estômatos em ambas as faces, sendo em maior número, na abaxial; - na face adaxial, presença de estômatos, somente, na região lateral; - epiderme uniestratificada com células isodiamétricas, e paredes celulares periclinais espessas; - presença de tricomas tectores, em ambas as faces, sendo similares aos descritos, anteriormente; - 1 camada de colênquima angular na face adaxial e 1-2 camadas; na região central da face abaxial; - 3 feixes vasculares alinhados, de diferentes dimensões, sendo o maior ao centro; - dutos secretores externos ao xilema de calibres diferentes, ocorrendo em número de um (feixes vasculares menores) e de dois (feixe vascular central); - feixe vascular único em cada expansão lateral, acompanhado de bainha parenquimática uniestratificada; - presença de clorênquima e colênquima angular, nas extremidades das expansões laterais.

- 31) São caracteres morfológicos e anatômicos de diagnose das inflorescências de *A. annua*: panículas constituídas de capítulos florais apresentando floretas tubulosas femininas e hermafroditas de tamanho diminuto (1-1,2 mm), receptáculo floral cônico provido de 3 a 10 floretas marginais (femininas) e de 10 a 20 floretas centrais (hermafroditas), brácteas involucrais escariosas, castanho-amareladas, oval a oblongas, com ápice obtuso e inteiro, dispostas em duas fileiras, tricomas glandulares bisseriados com séries de cinco células, similares àqueles encontrados nas folhas desta espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAJO, C.; BOFFILL, M.A.; CAMPO, J.; MÈNDEZ, M.A.; GONZÁLEZ, Y.; MITJANS, M.; VINARDELL, M.P. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 93, p. 319-23, 2004.
- ACTON, N.; KLAYMAN, D.L. Artemisitene, a new sesquiterpene lactone endoperoxide from *Artemisia annua*. *Planta Medica*. n. 5, p. 441-442, 1985.
- AGARWAL, P.K.; SINGH, A.K.; BHAKUNI, R.S.; JAIN, D.C. Studies on medicinal plants. 43. Characterization of a coumarin from *Artemisia annua*: Correlation of assigned chemical shifts with its hydrated form. *Current Research on Medicinal and Aromatic Plants*. v.17, n. 3 and 4, p. 321-325, 1995.
- AHMAD, A.; MISRA, L. Terpenoids from *Artemisia annua* and constituents of its essential oil. *Phytochemistry*. v. 37, n.1, p. 183-6, 1994.
- ALVAREZ, A.; POMAR, F.; SEVILLA, M.A.; MONTERO, M.J. Gastric antisecretory and antiulcer activities of an ethanolic extract of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Schult. Bip. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 67, p. 333-40, 1999.
- ALVAREZ, L.; MARQUINA, S.; VILLARREAL, M.L.; ALONSO, D.; ARANDA, E.; DELGADO, G. Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa*. *Planta Medica*. v. 62, p. 355-357, 1996.
- AMATO, V.S. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. Tópicos em terapêutica. *Revista Brasileira de Medicina*.v. 53, p. 202-212, 1998.
- AMICO, A. Medicinal plants of Southern Zambesia. *Fitoterapia*. v. 48, p. 101-136, 1977.
- ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; OLIVEIRA, F.Q.; CASALI, V.W.D.; NJAINE, B.; MARIANO, G.Z.; OLIVEIRA, L.A.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in húmus soil. *Phytother. Res*. v. 18, p. 634-39, 2004.
- ANTHONY, J.-P.; FYFE, L.; SMITH H., Plant active components – a resource for antiparasitic agents, *Trends in Parasitology*, v.21, n.10, 2005.
- ANVISA. Legislação In: ANVISA, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/> (Acesso: 02/11/2007).
- ARMOND, C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; REIS, E.L. FILHO, L.N.C.; LISBOA, S.P.; ARRUDA, V.M.; DUARTE, E.S.M.; MOREIRA, A.M.; SILVA, C.V.; BRANDÃO, M.G.L. Teor de óleo essencial e compostos antimaláricos em plantas de *Bidens pilosa* L. tratadas com a homeopatia China. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v. 7, n. 3, p. 18-24, 2005.
- ARNASON, T.; WAT, C-K.; DOWNUM, K.; YAMAMOTO, E.; GRAHAM, E.; TOWERS, G.H.N. Photosensitization of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by phenylheptatriene from *Bidens pilosa*. *Can. J. Microbiol.* V. 26, p. 698-705, 1980.
- ARRUDA, D.C.; D'ALEXANDRI, F.L.; KATZIN, A.M.; ULIANA, S.R.B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.
- ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of Medical Microbiology* . v. 56, p. 143–153,2007.
- ASPREY, G.F.; THORNTON,P. Medicinal plants of Jamaica part 1. *West Indian Medical Journal*. v. 2, p. 233-252, 1953.
- AVERY, M.A.; MURALEEDHARAN, K.M.; DESAI, P.V.; BADIYOPADHYAYA, A.K., FURTADO, M.M.; TEKWANI, B.L. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 8. design, synthesis, and CoMFA studies toward the development of artemisinin-based drugs

against leishmaniasis and malaria. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 46, n. 20, p. 4244-4258, 2003.

AZEREDO-COUTINHO, R.B.G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L.P.; MADEIRAE, M.F.; PACHECO, R.S.; VALETE-ROSALINO, C.M.; MENDONÇA, S.C.F., First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.101, p.735-737, 2007.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmac.* v. 30, n. 4, p.435-443.

BARALDI R, ISACCHI B, PREDIERI S, MARCONI G, VINCIERI FF, BILIA AR. Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. *Biochem Syst Ecol*; v. 36, n. 340, 2008.

HABERLANDT, G. Physiological plant anatomy. London: Mac Millan Press, 1928.

BARATA, R. C. B.; BRICEÑO-LEÓN, R. *Doenças endêmicas: abordagens sociais, culturais e comportamentais*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000.

BARRETT, M.P.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C., Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmaniasis. *Trends in Microbiology*. v. 7, n. 2, p. 82-88, 1999.

BERLYN, G.P., MIKSCH, J.P. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University, p.121-276, 1976

BERMAN, J.D.; LEE, L.S. Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages *in vitro*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 32, n. 5, p. 947-951, 1983.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*. v. 24, p. 684-703, 1997.

BERSIER, J.D.; BOCQUET, G. La valeur systématique de l'ovule: développements tératologiques. *Archives de Sciences*. v. 13, p. 475-496, 1960.

BHAKUNI, R.S.; JAIN, D.C.; SHUKLA, Y.N. Lipid constituents from *Artemisia annua*. *Journal Indian Chemical Society*. v. 67, p.1004-5, 1990.

_____; SHARMA, R.P.; KUMAR, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*. V. 80, n. 1, p. 35-48, 2001.

BHATTACHARYYA, B. Flowering plants: taxonomy and phylogeny. New York: Narosa Publishing House, p. 526-529, 1998.

BILIA, A.R.; LAZARI, D.; MESSORI, L.; TAGLIOLI, V.; TEMPERINI, C.; VINCIERI, F.F. Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin. *Life Sciences*. v. 70, p.769-78, 2002.

_____; MAGALHÃES, P.M.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and selected cultivar. *Phytomedicine*. v. 13, p. 487-493, 2006.

_____; GABRIELE, C.; BERGONZI, M.C.; MAGALHÃES, P.M.; VINCIERI, F.F. Variation in artemisinin and flavonoid content in different extracts of *Artemisia annua* L. *Natural Product Communications*. v. 0, n. 0, p. 1-6, 2006.

BISSING, D.R. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Technology*. v. 49, p. 116-117, 1974.

- BORDOLOI, M.; SHUKLA, V.S.; NATH, S.C.; SHARMA, R.P. Naturally occurring cadinenes. *Phytochemistry*. v. 28, n. 8, p. 2007-2037, 1989.
- BRANDÃO, M.G.L.; BOTELHO, M.G.A.; KRETTLI, A.U. Quimioterapia experimental antimalárica com produtos naturais: uma abordagem mais racional? *Ciência e Cultura*. v. 37, n. 7, 1985.
- _____.; GRANDI, T.S.M.; ROCHA, E.M.M.; SAWYER, D.R.; KRETTLI, A.U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* v. 36, 1992.
- _____.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C.; MARINUZZI, H.C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *J. Ethnopharmacol.* v. 57, p. 131-8, 1997.
- _____.; NERY, C.G.C.; MAMÃO, M.A.S.; KRETTLI, A.U. Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa*. *Phytochem.* v. 48, n. 2, p. 397-99, 1998.
- BREMER, K. *Tribe Anthemideae*. p. 435-453. In: BREMER, K. *Asteraceae: cladistics and classification*. Oregon: Tember Press, 1994.
- BROWN, G.D. Two new compounds from *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*. v. 55, n. 12, p.1756-60, 1992.
- _____. Annulide, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 32, n. 2, p.391-3, 1993.
- _____.; Secondary metabolism in tissue culture of *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*. v. 57, n. 7, p. 975-977, 1994.
- _____. Cadinanes from *Artemisia annua* that may be intermediates in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry*. v. 36, n. 3, p. 637-641, 1994.
- _____. Phytene-1,2-diol from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 36, n.6, p.1553-4, 1994.
- _____.; LIANG, G-Y.; SY, L-K. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 64, p. 303-323, 2003.
- BUKATSCH, F. Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*. v. 61, p. 255, 1972.
- CABRERA, A.L.; RAGONESE, A.M. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). *Darwiniana*. v. 21, n. 2-4, p. 185-257, 1978.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. *Bioestatística –Princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- CAMM, E.L.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. UV-mediated antibiotic activity of some compositae species. *Phytochemistry*. v. 14, p. 2007-2011, 1975.
- CANTONWINE, E.G.; DOWNUM, K.R. Phenylheptatriyne variation in *Bidens alba* var. *radiata* leaves. *Journal of Chemical Ecology*. v. 27, n. 2, 313-326, 2001.
- 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 *P. berghei*-infected mice and in vitro against *P. falciparum* in culture. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v. 24, p. 1113-23, 1991.
- de CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis: what do we know about its chemotherapy? *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 36, n. 1, p. 69-96, 2000.

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

CDC, 2007. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/> (Acesso: 23/10/2008).

CHAI, Y.; YAN, S.; WONG, I.L.K.; CHOW, L.M.C.; SUN, H. Complexation of antimony (Sbv) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-Dmannose: Formation of both mono- and bis-adducts. *Journal of inorganic Biochemistry*.v. 99, p. 2257-2263, 2005.

CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*. v. 18, p. 674-688, 2001.

CHANG, S-L.; CHANG, C. L-T.; CHIANG, Y-M.; HSIEH, R-H.; TZENG, C-R.; WU, T-K.; SYTWU, H-K.; SHYUR, L-F.; YANG, W-C. Polyacetylenic compounds and butanol fraction from *Bidens pilosa* can modulate the differentiation of helper T cells and prevent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Planta Medica*. v. 70, p. 1045-1051, 2004.

CHANG, C. L-T.; CHANG, S.-L.; LEE, Y.-M.; CHIANG, Y.-M.; CHUANG, D.-Y.; KUO, H.-K.; YANG, W.-C. Cytopiloyne, a polyacetylenic glucoside, prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *The Journal of Immunology*.v. 178, p. 6984-6993, 2007.

CHEN, P.K.; LEATHER, G.R. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *Journal of Chemical Ecology*. v. 16, n. 6, 1990.

CHIANG, Y.; CHUANG, D.; WANG, S.; KUO, Y.; TSAI, P.; SHYUR, L. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *J. Ethnopharmacol*. v. 95, p. 409-19, 2004.

CHIANG, Y-M.; CHANG, C.L-T.; CHANG, S-L.; YANG, W-C.; SHYUR, L-F. Cytopiloyne, a novel polyacetylenic glucoside from *Bidens pilosa*, functions as a T helper cell modulator. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 110, p. 532-538, 2007.

CHIANG-SU. New Medical Institute, *Chinese Materia Medica*, Shanghai Scientific Technology Publishing Co., China, p. 906, 1977.

COLAKOGLU, M.; YAYLALI; FIDAN, G.; COLAKOGLU, N.Y.; YILMAZ, M. Successful treatment of visceral leishmaniasis with fluconazole and allopurinol in a patient with renal failure. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. v. 38, n. 3, p. 208-210, 2006.

COORDINATING GROUP FOR RESEARCH ON THE STRUCTURE OF QING HAU SAU. A new type of sesquiterpene lactone - Qing Hau Sau. People Republic of China. *Kexue Tongbao*. v. 22, n. 3, p. 142, 1977.

COSTA, C.H.N.; STEWART, J.M.; GOMES, R.B.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.S.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSANAYAKIM S.; SANTOS, R.S.; SILVA, N.R.B.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H., Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*, *American Journal Trop. Med. Hyg*, v.66, n.4, p.334-337, 2002.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*. v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CRONQUIST, A. *Introductory botany*. 2.ed. New York : Harper & Row, 1977

_____. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, p. 1021-1028, 1981.

_____. *The evolution and classification of flowering plants*. 2 ed. Bronx, N.Y., USA : New York Botanical Garden, p. 446-448, 1988.

- DEBA, F.; XUAN, T.D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*. v. 19, n. 4, p. 346-352, 2007.
- DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUVEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1570, p. 192-198, 2002.
- DIAS, P.C.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; NOGUEIRA, D.C.F.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Phytotherapy Research*. v.15, p.670-5, 2001.
- DIMO, T.; RAKOTONIRINA, S.; KAMGANG, R.; TAN, P.V.; KAMANYI, A.; BOPELET, M. Effects of leaf aqueous extract of *Bidens pilosa* (asteraceae) on KCl- and norepinephrine-induced contractions of rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 60, p. 179-82, 1998.
- DJERMANOVIC, M.; JOKIC, A.; MLADENOVIC, S.; STEFANOVIC, M. Quercetagenin 6,7,3',4'-tetramethyl ether: a new flavonol from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 14, p. 1873, 1975.
- DJERMANOVIC, M.; STEPANOVIC, M.; DJERMANOVIC, V.; MILOVANOVIC, M. Some new constituents from domestic plant species of *Artemisia monogyna* W. & K. and *Artemisia annua* L. *Journal of the Serbian Chemical Society*. v. 62, n. 2, p. 113-116, 1997.
- DOERIG, C.; MEIJER, L.; MOTTRAM, J.C., Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends in Parasitology*. v.18, n. 8, p. 366-71, 2002.
- DUARTE, M.R.; ESTELITA, M.E. Caracteres anatômicos de *Bidens pilosa* L., Asteraceae. *Hoehnea*, v.26, n.1, 15-27, 1999.
- DUKE, M.V.; PAUL, R.N.; ELSOHL, H.N.; STURTZ, G.; DUKE, S.O. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *International Journal of Plant Sciences*. v. 155, n.3, p. 365-72, 1994.
- DUKE, S.O.; PAUL, R.N. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *International Journal of Plant Sciences*. v. 154, n. 1, p. 107-118, 1993.
- EL-FERALY, F.S.; AL-MESHAL, I.A.; KHALIFA, S.I. Epi-deoxyarteannuin B and 6,7-dehydroartemisinic acid from *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*. v. 52, n. 1, p. 196-8, 1989.
- ELDRIDGE, J. Bush medicine in the Exumas and Long Island, Bahamas. A field study. *Economy Botany*. v. 29, p. 307-332, 1975.
- ELFORD, B.C.; ROBERTS, M.F.; PHILLIPSON, J.D.; WILSON, R.J.M. Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 81, p. 434-436, 1987.
- ELSOHL, H.N.; CROOM JR., E.M.; EL-FERALY, F.S.; EL-SHEREI, M. A large-scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*. v.53, n.6, p. 1560-4, 1990.
- ESAU, K. *Anatomia Vegetal*. 2. ed. Barcelona : Ediciones Omega, 1959.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. 4. ed. New York : Pergamon Press, 1990.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV ed. (I). São Paulo: Atheneu. p. V.2.5-V.4.2.7, 1988.
- FERREIRA, J.F.S.; JANICK, J. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Sciences*. v.156, n.6, p. 807-15, 1995.
- _____.; SIMON, J.E.; JANICK, J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta medica*. v. 61, p. 167-70, 1995.

_____. Relationship of artemisinin content of tissue-cultured, greenhouse-grown, and field-grown plants of *Artemisia annua*. *Planta medica*. v. 61, p. 351-55, 1995.

_____.; LAUGHLIN, J.C.; DELABAYS, N.; de MAGALHÃES, P.M. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increased production of the antimalarial artemisinin. *Plant Genetic Resources*. v. 3, n. 2, p. 206-229, 2005.

FIOCRUZ, 2007. As leishmanioses. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/> (Acesso: 02/11/2007).

FOSTER, A.S. *Practical plant anatomy*. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, p. 218, 1950

FOGLIO, M.A. *Um estudo químico da Artemisia annua L. aclimatada no Brasil*. Campinas, 1996. 185f. Tese de doutorado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas.

FRANKLIN, G.L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, London, v.155, n.3924, p.51, 1945.

FREISE, F.W. Plantas medicinales brasileiras. *Boletim de Agriculture*. v. 34, p. 252-494, 1933.

FUNARI, C.S. *Análise de própolis da serra do Japi, determinação de sua origem botânica e avaliação de sua contribuição em processos de cicatrização*. São Paulo, 2005. 124f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.26, n.1, 2006.

FURLAN, C. M. Efeitos de poluentes atmosféricos na composição química de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn e *Psidium guajava* L. São Paulo, 2004. Tese de doutorado- Instituto de Botânica- Universidade de São Paulo.

GANGULY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; BERA, A.; CHATTERJEE, M. Antipromastigote activity of an ethanolic extract of leaves of *Artemisia indica*. *Indian Journal of Pharmacology*. v. 38, n. 1, p. 64-65, 2006.

van GELDRE, E.; VERGAUWE, A.; VAN DEN EECKHOUT, E. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Molecular Biology*. v. 33, p. 199-209, 1997.

GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *Acta Tropica*. v. 48, p. 251-61, 1991.

GIL, E.S.; CUNHA, L.C.; de PAULA, J.R.; BEZERRA, J.C.B.; AGUIAR, F.A. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. *Vita et Sanitas*. v. 1, n. 1, 2007.

GONÇALVES, E.G., LORENZI, H. *Morfologia vegetal*. São Paulo: Plantarum, 2007

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, n. 1, p.:71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 7, n. 3, p. 388-349, 2004.

GROMBONE-GUARATINI, M.T.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. Reproductive biology in species of *Bidens* L. (asteraceae). *Science Agronomical*. v.61, n.2, p.185-9, 2004.

GROMBONE-GUARATINI, M.T.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J.; TRIGO, J.R. Sesquiterpene and polyacetylene profile of *Bidens pilosa* complex (asteraceae: heliantheae) from southeast of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 33, p. 479-86, 2005.

- GUPTA, M.M.; JAIN, D.C.; MATHUR, A.K.; SINGH, A.K.; VERMA, R.K.; KUMAR, S. Isolation of a high artemisinic acid containing plant of *Artemisia annua*. *Planta Medica*. v. 62, p. 280-1, 1996.
- HAERDI, F. Die eingeborene-heilpflanzen des Ulanga-Distriktes Tanganijikas (Ostafrika). *Acta Tropica*.Suppl. v. 8, p. 165, 1964.
- HAN, X.; MA, X.; ZHANG, T.; ZHANG, Y.; LIU, Q.; ITO, Y. Isolation of high-purity casticin from *Artemisia annua* L. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 1151, p. 180-182, 2007.
- HAN, J.; YE, M.; QIAO, X.; XU, M.; WANG, B., GUO, D., Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.47, p.516-525, 2008.
- HARBORNE, J.B. *The flavonoids: advances in research since 1980*. London, New York: Champman and Hall, 1988.
- HATIMI, S.; BOUDOUA, M.; BICHICHI, M.; CHAIB, N.; IDRISSE, N.G. Evaluation *in vitro* de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* v. 94, n. 1, p. 29-31, 2001.
- HEYWOOD, V.H. *Flowering plants of the world*. New York : Oxford University, p. 263-267, 1993.
- HIEN, T.T.; WHITE, N.J. Qinghaosu. *Lancet*. v. 341, n. 6, p. 603-8, 1993.
- HOFFMANN, B.; HÖLZL, J. New chalcones from *Bidens pilosa*. *Planta Medica*. p. 52-4, 1988.
- _____ A methylated chalcone glucoside from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*. v. 27, n.11, p.3700-3701, 1988.
- _____ Weitere acylierte chalkone aus *Bidens pilosa*. *Planta Medica*.p. 450-451, 1988.
- _____ Chalcone glucosides from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*. v. 28, n.1, p. 247-249, 1989.
- _____ Acylated compounds from *Bidens pilosa*. *Planta Medica*.v. 55,p. 108-109, 1989.
- HORIUCHI, M.; SEYAMA, Y. Antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. radiata Scherff. *Journal of Health Science*. v. 52, n. 6, p. 711-717, 2006.
- HSU, E. The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 100, n. 6, p. 505-508, 2006.
- JAIN, D.C.; MATHUR, A.K.; GUPTA, M.M.; SINGH, A.K.; VERMA, R.K.; GUPTA, A.P.; KUMAR, S. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 43, n. 5, p. 993-1001, 1996.
- JERIC, D.; JOKIC, A.; BEHBUD, A.; STEFANOVIC, M. A new type of sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia annua* L.: arteannuinB. *Tetrahedron Letters*. n. 32, p. 3039-3042, 1973.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw Hill Book, p. 41-193, 1940.
- JUDD, W.S. *Plant systematics : a phylogenetic approach*., 2nd ed. Sunderland, Mass., U.S.A.: Sinauer Associates, p. 480-487, 2002.
- KAPLER, G.M.; COBURN, C.M.; BEVERLEY, S.M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania* *Cellular Biology*. v. 10, n. 3, p. 1084-1094, 1990.
- KARIS, P.O.; RYDING, O. *Tribe Heliantheae*. p. 559-569. In: BREMER, K. *Asteraceae: cladistics and classification*. Oregon: Tember Press, 1994.

- KASYMOV, Sh. Z.; OVEZDURDYEV, A.; YUSUPOV, M.I. SHAM'YANOV, I.D.; MALIKOV, V.M. Lactones of *Artemisia annua*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. v. 5, p. 636, 1986.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural Products as potential antiparasitic drugs studies in natural product research. *Atta-Ur-Rahman*. v. 26, p. 779-848, 2002.
- _____.; KIDERLEN, A.F., CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res.* V. 90, p. S55-S62, 2003.
- KAWAMOTO, H.; SEKINE, H.; FURUYA, T. Production of artemisinin and related sesquiterpenes in Japanese *Artemisia annua* during a vegetation period. *Planta Medica*. v.65, p.88-9, 1999.
- KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E., Leishmania vaccines: progress and problems, *Parasitology*, v.133, p.S87-S112, 2006.
- KELSEY, R.G.; SHAFIZADEH, F. Sesquiterpene lactones and systematic of the genus *Artemisia*. *Phytochemistry*. v. 18, 1591-1611, 1979.
- KEYS, J.D. *Chinese Herbs, Their Botany, Chemistry, and Pharmacodynamics*. 1976
- KLAYMAN, D.L.; LIN, A.J.; ACTON, N.; SCOVILL, J.P.; HOCH, J.M.; MILHOUS, W.K.; Theoharides, A.D. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *Journal of Natural Products*. v. 47, n. 4, p. 715-17, 1984.
- KOKWARO, J.O. Medicinal plants of east Africa. East African literature Bureau, Kampala, Nairobi, Dar es Salaam, p. 61, 1976.
- KOTHARI, H; KUMAR, P.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. *Parasitology International*. v.56, p. 77-80, 2007.
- KRAMP, K.L.; DEWITT, K.; FLORA, J.W.; MUDDIMAN, D.C.; SLUNT, K.M.; HOUSTON, T.A., Derivatives of pentamidine designed target the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 695-698, 2005.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Rural, 1997.
- KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem.Inst. Osw. Cruz*. v. 96, n. 8, p. 1033-42, nov. 2001.
- LAI, J-P.; LIM,Y.H.; SU, J.; SHEN, H-M.; ONG, C.N. Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three *Compositae* plants by LC/DAD-APCI/MS. *Journal of Chromatography B*. v. 848, n. 2, p.215-225, 2007.
- LASTRA, H.; VALDÉS, I.; PONDE DE LEÓN, R.H. *Bidens pilosa* Linné. *Revista Cubana de Planta Medica*. v. 1, p.232-233, 2001.
- LAUGHLIN, J.C. Post-harvest drying treatment effects on antimalarial constituents of *Artemisia annua* L. *Acta Horticulturae*, v. 576, p. 315-320, 2002.
- LEON, L.L.;MACHADO, G.M.;PAES, L.E.;GRIMALDI Jr, G., Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.84, p.678-680, 1990.
- LEZAMA-DAVILA, C.M.; SATOSKAR, A.R.; UC-ENCALADA, M.; ISAAC-MARQUEZ, R.; ISAAC-MARQUEZ, A.P. Leishmanicidal activity of artemisinin, deoxoartemisinin, artemether and arteether. *Natural Product Communications*. V. 2, n. 1, p. 1-4, 2007.
- LIERSCH, R.; SOICKE, H.; STEHR, C.; TÜLLNER, H.U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Medica*. v. 52, p. 387-90, 1986.

de LIMA, E.B.; PORTO, C.; da MOTTA, J.O.C.; SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol.* v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LIN, A.J.; KLAYMAN, D.L.; HOCH, J.M. Thermal rearrangement and decomposition products of artemisinin (qinghaosu). *Journal of Organic Chemistry.* v. 50, p. 4504-8, 1985.

LINDSEY, K.I.; MOTSEI, M.L.; JAGER, A.K. Screening of South African food plants for antioxidant activity. *Journal of food science.* v. 67, n.6, p. 2129-31, 2002.

LING, Y-R. *The new world Artemisia L.* p. 255-281. In: HIND, D.J.N.; JEFFREY, C.; POPE, G.V. *Advances in compositae systematics.* Kew : Royal Botanic Gardens, p. 255-281, 1995.

LIU, H-M.; LI, K-L.; WO, W-C. Studies on the constituents of *Artemisia annua*. *Yaoxue Tongbao.* v. 15, n. 10, p. 39, 1980.

LIU, K.C.S.; YANG, S.L.; ROBERTS, M.F.; ELFORD, B.C.; PHILLIPSON. The contribution of flavonoids to the antimalarial activity of *Artemisia annua*. *Planta Medica.* v.55, p.654-5, 1989.

LOMMEN, W.J.M.; SCHENK, E.; BOUWMEESTER, H.J.; VERSTAPPEN, F.W.A. Trichome dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua*. *Planta Medica.* v. 72, p. 336-45, 2006.

LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais.* 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, p. 59-60, 1991.

_____; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.* Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 140,144, 2002.

MA, Y.; LU, D-M.; LU, X-J.; LIAO, L.; HU, X-S. Activity of dihydroartemisinin against *Leishmania donovani* both in vitro and vivo. *Chinese Medical Journal.* V. 117, n. 8, p. 1271-1273, 2004.

MACHADO, J.O.; SANTOS, E.; LEFÈVRE, A.F.V. Atividade antibacteriana de extratos de *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas.* V. 10, p. 55-62, 1988.

MACHUCA, C.; RODRIGUEZ, A.; HERRERA, M.; SILVA, S.; PONTE-SUCRE, A. *Leishmania amazonensis*: Metabolic adaptations induced by resistance to an ABC transporter blocker. *Experimental Parasitology.* disponível online, 2006.

de MAGALHÃES, P.M.; DELABAYS, N. SARTORATTO, A. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. *Ciência e Cultura.* V. 49, n. 5/6, p.413-415, 1997.

_____. Agrotecnologia para o cultivo de *Artemisia*. *Monografias sobre Agrotecnologia de Plantas Medicinais.* 2002.

MANNS, D.; HARTMANN, R. Annuadietoxide, a new polyacetylene from the aerial parts of *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products.* v. 55, n. 1, p. 29-32, 1992.

MARCHESE, J.A.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A. Quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* L. – uma comparação entre as técnicas de cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais.* v. 4, n. 1, p. 81-7, 2001.

_____; BROETTO, F.; MING, L.C.; DUCATTI, C.; RODELLA, R.A.; VENTRELLA, M.C.; GOMES, G.D.R.; FRANCESCHI, L. Carbon isotope composition and leaf anatomy as a tool to characterize the photosynthetic mechanism of *Artemisia annua* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology.* v. 17, n. 1, p. 187-199, 2005.

MARCO, J.A.; SANZ, J.F.; BEA, J.F.; BARBERA, O. Phenolic constituents from *Artemisia annua*. *Pharmazie.* v. 45, p. 382-383, 1990.

MARKLE, W.H.; MAKHOUL, K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *American Family Physician.* v. 69, n. 6, p. 1455-1460, 2004.

MATOS, F.J.A.; SOUZA, M.P.; BARROS, M.; LIMA, M.A. Marcha sistêmica de abordagem fitoquímica. *Revista Brasileira de Farmácia*. v. 46, n. 3, p. 151-61, 1965.

MATOS, F.J.A.. *Farmácias vivas. Sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 2.ed., Fortaleza: EUFC, 1994

METCALFE, C.R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons*. 1. ed. Oxford: Clarendon Press, v. 1, p. 782-803, 1950.

MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; ANDREOLI, W.K.; MORTARA, R.A.; ULIANA, S.R.B., Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces arapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.60, p.526-534, 2007.

MINAMI, P.S.; OLIVEIRA, F. Atividade antifúngica de *Bidens pilosa* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. V.1, n. 2, p. 118-122, 1986.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2.^a Ed. Brasília – DF, 2007.

MISHINA, Y.V.; KRISHNA, S.; HAYNES, R.K.; MEADE, J.C. Artemisinins inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 51, n. 5, p. 1852-4, 2007.

MISRA, L.N. Arteannuin-C, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 25, n. 12, p. 2892-2893, 1986.

MISRA, L.N.; AHMAD, A.; THAKUR, R.S.; JAKUPOVIC, J., Bisnor-cadinanes from *Artemisia annua* and definitive ¹³C NMR assignments of j3-ARTEETHER *Phytochemistry*, v.33, n.6, p.146-1, 1993.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2008. Disponível em : <http://www.mobot.org/> (Acesso em: 21/04/2008)

MITTAL, M.K.; RAI, S.; RAVINDER, A.; GUPTA, S.; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* . v. 76, n. 4, p. 681-688, 2007.

MUELLER, M.S.; KARHAGOMBA, I.B.; HIRT, H.M.; WEMAKOR, E. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J. Ethnopharmacol.* v. 73, p. 487-93, 2000.

MUELLER, M.S.; RUNYAMBO, N.; WAGNER, I.; BORRMANN, S.; DIETZ, K.; HEIDE, L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood) in the treatment of malaria. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg.* v. 98, p. 318-21, 2004.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G., Advances in leishmaniasis, *Lancet*, v.366, p.1561-1577, 2005

MUZITANO, M.F.; TINOCO, L.W.; GUETTE, C.; KAISER, C.R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*. v. 67, n. 18, p. 2071-2077, 2006.

NAIR, M.S.R.; ACTON, N.; KLAYMAN, D.L.; KENDRICK, K.; BASELI, D.V. Production of artemisinin in tissue cultures of *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*. v. 49, n. 3, p. 504-507, 1986.

NAKAJIMA, J.N. 2000. *A família Asteraceae no Parque Estadual da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil*. 467f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas - Campinas.

- N'DOUNGA, M.; BALANSARD, G.; BABADJAMIAN, A.; DAVID, P.T.; GASQUET, M.; BOUDON, G. Contribution a l'etude de *Bidens pilosa* L. identification et activite antiparasitaire de la phenyl-1 heptatriyne-1,3,5. *Plantes medicinales et phytotherapie*. v. 17, n. 2, p. 65-75, 1983.
- NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MOREIRA, M.S.; CARVALHO, S.J.P.; SCARPARI, L. Alternativas de manejo para as populações de picão-preto (*Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*) resistentes aos herbicidas inibidores das ALS *Revista Brasileira de Herbicidas*. v.5, n.3, p.7-13, 2006.
- NIKOLOVA M.N. GEVRENOVA, R.; KAIVANCHEVA, S., High-performance liquid chromatographic separation of surface flavonoid aglycones in *Artemisia annua* L. and *Artemisia vulgaris* L. *Journal of Serbian Chemical Society*, v.69, n.7, p.571-574, 2004.
- OGAWA, K.; SASHIDA, Y. Caffeoyle derivatives of a sugar lactone and its hydroxy acid from the leaves of *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*. v. 31, n. 10, p. 3657-58, 1992.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. *Fundamentos de farmacobotânica*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1991.
- OLIVEIRA, C.M.; FERRACINI, V.L.; FOGLIO, M.A.; MEIJERE, A.; MARSAIOLI, A.J. Detection, synthesis and absolute configuration of (+)-nortaylorione, a new terpene from *Artemisia annua*. *Tetrahedron: Asymmetry*. v. 8, n. 11, p. 1833-1839, 1997.
- OLIVEIRA, F.Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A.U.; BRANDÃO, M.G.L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. *J. Ethnopharmacol.* v. 93, p. 39-42, 2004.
- de OLIVEIRA, J.P.C.; FERNANDES, F.; CRUZ, A.K.; TROMBELA, V.; MONTEIRA, E.; CAMARGO, A.A., Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping, *Kinetoplastid Biology and Disease*, v.6, n.5, p., 2007.
- OPAS. Leishmaniose In: OPAS, 2007. Disponível em: <http://www.opas.org.br/> (Acesso: 23/11/2007).
- OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J., PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments *Drug Resistance Updates*. v. 7, p. 257-266, 2004.
- PAIZ, L.; LÓPEZ, I.; RODRÍGUEZ, E. Química y distribución de poliacetilenos bioactivos de las asteráceas. *Revista Latinoamericana de Química*. v. 20, n. 3-4, p. 120-125, 1989.
- PENNA, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Kosmos. 1946.
- PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V.L.G. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Pharmacological Research*. v. 48, p. 497-502, 2003.
- PEREIRA, R.L.C.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L.; SILVA, A.J.R.; MORAES, V.L.G. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. *Immunopharmacology*. v. 43, p. 31-37, 1999.
- PHAM, G.D., Coumarin and its derivatives in *Artemisia annua* L. in Vietnam, *Tap Chi Duoc Hoc*, v.11, p.11-13, 2002.
- PHILLIPSON, J.D.; WRIGHT, C.W. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *Journal of Ethnopharmacology*. v. 32, p.155-65, 1991.
- PICMAN, A.K.; RANIERI, R.L.; TOWERS, G.H.N.; LAM, J. Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylenes on thin-layer chromatograms. *Journal of Chromatography*. v. 189, p.187-198, 1980.
- PRUSKI, J.F.; SANCHO, G. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V. *Flowering plants of the neotropics*. New Jersey: Princeton University Press. p. 33-39, 2004.

- PURVIS, M.J.; COLLIER, D.C.; WALLS, D. Laboratory techniques in botany. London, Butterwoths, p. 371, 1964.
- QIN, J.; CHEN, T.; CHEN, S.; LU, Q. Analysis of essential oil of *Bidens pilosa* L. by GC-MS. *Fenxi Ceshi Xuebao*. v. 22, n. 5, p. 85-7, 2003.
- QUISPE-CONDORI, S.; SÁNCHEZ, D.; FOGGIO M.A.; ROSA, P.T.V.; ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M.A.A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*. v. 36, p. 40-8, 2005.
- RABE, T.; STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 56, p.81-7, 1997.
- RASMUSSEN, H.B.; CHRISTENSEN, S.B.; KVIST, L.P.; KHARAZMI, A.; HUANSI, A.G. Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. *Journal of Natural Products*. v. 63, p. 1295-1296, 2000.
- RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; de JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C.; JÚNIOR, H.F.A.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*. v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.
- RÄTH, K.; TAXIS, K.; WALZ, G.; GLEITER, C.H.; LI, S.M.; HEIDE, L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 70, n. 2, p. 128-32, 2004.
- REALE, S., PACE, L., MONTI, P., de ANGELIS, F.; MARCOZZI, G. A rapid method for the quantification of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants cultivated for the first time in Burundi, *Natural Product Research*. v. 22, n.4, p. 360-364, 2008.
- REHDER, V.L.G.; RODRIGUES, M.V.N.; SARTORATTO, A.; FOGGIO, M.A. Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.12, supl., p.116-18, 2002.
- REITHINGER, R., DUJARDIN, J-C, LOUZIR, H, PIRMEZ, C, ALEXANDER, B., BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Diseases*. v. 7, p. 581-596, 2007
- REY, L. *Parasitologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova*. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004 (2004).
- RIDLEY, R.C. Evaluating diagnostics: VL. *Nature reviews*. S1, 2007.
- RODRIGUES, R.A.F.; FOGGIO, M.A.; BOAVENTURA JR., S.; SANTOS, A.S.; REHDER, V.L.G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. *Química Nova*. v. 29, n.2, p.368-372, 2006.
- RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*. v. 15, p. 1573-80, 1976.
- ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; RODRIGUES, I.A.; SOARES, R.M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S. Antileishmanial activity of linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.
- ROTH, R.J.; ACTON, N. Isolation of epi-deoxyarteannuin B from *Artemisia annua*. *Planta Medica*. v. 53, p. 576, 1987.
- _____. Isolation of arteannuic acid from *Artemisia annua*. *Planta Medica*. v. 53, p. 501-502, 1987.

_____. The isolation of sesquiterpenes from *Artemisia annua*. *Journal of Chemical Education*. v. 66, n. 4, 1989.

RUPASHREE, S.; SAMIRAN, B.; AVIJIT, D.; GOUTAM, M.; SUDIPTO, G.; PIU, S.; MITALI, C. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology*. V. 56, n. 9, p.1213-1218, 2007.

SALAY, G.; DORTA, M. L.; SANTOS, N. M.; MORTARA, R. A.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C. I.; BARBIÉRI, C.L.; RODRIGUES, M.M. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the new world. *Clinical and Vaccine Immunology*. v. 14, n.9, p. 1173-1181, 2007.

SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*.v.21, n.2, 1998.

SARKER, S.D.; BARTHOLOMEW, B.; NASH, R.J.; ROBINSON, N. 5-O-methylhoslundin: an unusual flavonoid from *Bidens pilosa* (asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 28, p. 591-3, 2000.

SASHIDA, Y.; OGAWA, K.; KITADA, M.; KARIKOME, H.; MIMAKI, Y.; SHIMOMURA, H., New aurone glucosides and new phenylpropanoid glucosides from *Bidens pilosa*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.39, n.3, p.709-711, 1991.

SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. 2. ed. Ames: Iowa State College, p. 97, 1951.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A* v.920, p.265-273, 2001.

SEN, G.; MANDAL, S.; ROY, S.S.; MUKHOPADHYAY, S.; BISWAS, T. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 38, p. 1257-1264, 2005.

SEN, R.; BANDYOPADHYAY, S.; DUTTA, A.; MANDAL, G.; GANGULY, S.; SAHA, P. CHATTERJEE, M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology*.v. 56, p. 1213-1218 2007.

SEN, G.; MUKHOPADHYAY, S.; RAY, M.; BISWAS, T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 61, n. 5, p. 1066-1075, 2008.

SHILIN, Y.; ROBERTS, M.F.; PHILLIPSON, J.D. Methoxylated flavones and coumarins from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v.28, n.5, p.1509-11, 1989.

SHISHAN, Z.; MEI-YI, Z. Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma. *Analytical Chemistry*. v. 58, n. 2, p. 289-92 1986.

SHUKLA, A.; FAROOQI, A.H.A.; SHUKLA, Y.N. A new adenine derivative from *Artemisia annua*. *Journal of the Indian Chemical Society*. v. 74, n. 1, p. 59, 1997.

SIMPSON, M. G. *Plant systematics*. Amsterdam; Boston : Elsevier/Academic Press, p. 326-331 2006.

SINGH, A.; VISHWAKARMA, R.A.; HUSAIN, A. Evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. *Planta Medica*. p. 475-6, 1988.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis *Journal of Infection Chemotherapy*. v. 10, p. 307-315, 2004.

SINGH, T.; BHAKUNI, R.S. A new sesquiterpene lactone from *Artemisia annua* leaves. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*. v. 43B, n. 12, p. 2734-2736, 2004.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 40, n. 2, 2004

SOUZA, F.O. *Asteraceae no parque estadual da Ilha do Cardoso*. São Paulo, 2007. 147f. Dissertação de mestrado – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente.

STEFANOVIC, M.; SOLUJIC, S.; JEREMIC, D.; JOKIC, A.; MILJKOVIC, D.; VELIMIROVIC, S., Chemical transformations of arteannuin B - cadinane sesquiterpenic lactone - isolated from *Artemisia annua* L., *Glasnik Hemijskog Drustva Beograd*, v.42, n.3, p.227-236, 1977.

SY, L-K.; BROWN, G.D. Three sesquiterpenes from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 48, n. 7, p. 1207-1211, 1998.

_____. A novel endoperoxide and related sesquiterpenes from *Artemisia annua* which are possibly derived from allylic hydroperoxides, *Tetrahedron*, v.54, 4345-4356, 1998.

_____. Deoxyarteannuin B, dihydro-deoxyarteannuin B and trans-5-hydroxy-2-isopropenyl-5-methylhex-3-en-1-ol from *Artemisia annua*, *Phytochemistry*, v.58, p.1159-1166, 2001.

_____.; CHEUNG, K.-K.; ZHU, N.-Y., BROWN, G.D., Structure elucidation of arteannuin O, a novel cadinane diol from *Artemisia annua*, and synthesis of arteannuins K, L, M, and O., *Tetrahedron*, v.57, p.8481-8493, 2001.

TAKHTAJAN, A. *Systema Magnoliophytorum*. Leningrad: Nauka, 1987.

TALEB-CONTINI, S.H.; SALVADOR, M.J.; BALANCO, J.M.F.; ALBUQUERQUE, S.; de OLIVEIRA, D.C.R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*. v. 18, p. 250-254, 2004.

TAN, R.X.; ZHENG, W.F.; TANG, H.Q. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Medica*. v. 64, p. 295-302, 1998.

TANG, H.Q.; HU, J.; YANG, L.; TAN, R.X. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Medica*. v. 66, p. 391-393, 2000.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RUEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TAWFIQ, N.K.; ANDERSON, L.A.; ROBERTS, M.F.; PHILLIPSON, J.D.; BRAY, D.H.; WARHURST, D.C. Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. *Plant Cell Reports*. v. 8, p. 425-428, 1989.

TDR. Leishmaniasis. In: Seventeenth Programme Report, TDR: 2005. Disponível em: <<http://www.rbm.who.int/cmc>> .Acesso em: 04/11/2007.

TELLEZ, M.R.; CANEL, C.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*. v. 52, p. 1035-40, 1999.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE Jr, H.F.; GUALDA, N.C.A.; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomed*. v. 12, p. 382-90, 2005.

- TEWARI, A.; BHAKUNI, R.S. Terpenoid and lipid constituents from *Artemisia annua*. *Indian Journal of Chemistry*. v. 42B, n. 7, p.1782-1785, 2003.
- TONK, S.; BARTARYA, R.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, S.S.; KUMARI, K.M. Quantification of artemisinin in different parts of *Artemisia annua* by HPLC method. *Acta Ciencia Indica, Chemistry*. v. 33, n. 1, 69-74, 2007.
- TORRELL, M.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; VALLÈS, J. Phylogeny in *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae) inferred from nuclear ribosomal DNA (ITS) sequences. *Taxon*. v. 48, p. 721-735, 1999.
- TOWERS, G.H.N.; WAT, C.K. Biological activity of polyacetylenes. *Revista Latinoamericana de Química*. v. 9, p. 162-70, 1978.
- TU, Y-Y.; NI, M-Y.; ZHONG, Y-R.; LI, L-N.; CUI, S-L.; ZHANG, M-Q.; WANG, X-Z.; JI, Z.; LIANG, X-T. Studies on the constituents of *Artemisia annua* part II. *Planta Medica*. v. 44, p. 143-145, 1982.
- TU, Y-Y.; YIN, J.; JI, L.; HUANG, M.; LIANG, X. Chemical constituents of sweet wormwood (*Artemisia annua*) (III). *Zhongcaoyao*. v. 16, n. 5, 200-201, 1985.
- UBILLAS, R.P.; MENDEZ, C.D.; JOLAD, S.D.; LUO, J.; KING, S.R.; CARLSON, T.J.; FORT, D.N., Antihyperglycemic acetylenic glucosides from *Bidens pilosa*, *Planta Medica*, v.66, n.1, p.82-83, 2000.
- UL'CHENKO, N.T.; KHUSHBAKTOVA, Z.A.; BEKKER, N.P.; KIDISYUK, E.N.; SYROV, V.N.; GLUSHENKOVA. Lipids from flowers and leaves of *Artemisia annua* and their biological activity. *Chemistry of Natural Compounds*. v. 41, n. 3, p. 280-4, 2005.
- ULUBELEN, A.; HALFON, B. Phytochemical investigation of the herba of *Artemisia annua*. *Planta medica*. v. 29, p. 258-60, 1976.
- VALDÉS, H.A., L.; REGO, H.P.L. *Bidens pilosa* Linné. *Revista Cubana Plant Med*. v. 1, p. 28-33, 2001.
- VAVILOV, N. I. *Origin and geography of cultivated plants*. New York : Cambridge University, p. 274-282, 1994.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer. p. 384, 1996.
- WALLAART, T.E.; PRAS, N.; QUAX, W.J. Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type. *Planta Medica*. v. 65, p. 723-728, 1999.
- WALAART, T.E.; van UDEN, W.; LUBBERINK, G.H.M.; WOERDENBAG, H.J.; PRAS, N.; QUAX, W.J., Isolation and Identification of Dihydroartemisinic Acid from *Artemisia annua* and Its Possible Role in the Biosynthesis of Artemisinin, *Journal Natural Product*, v.62, p.430-433, 1999.
- _____; BEEKMAN, A.C.; QUAX, W.J. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. *Planta Medica*. v. 66, p. 57-62, 2000.
- WANG, J.; YANG, H.; LIN, Z.W.; SUN, H.D. Flavonoids from *Bidens pilosa* var. *radiata*. *Phytochemistry*. v.46, n.7, p.1275-78, 1997.
- WANG, M.; PARK, C.H.; WU, Q.; SIMON, J.E. Analysis of artemisinin in *Artemisia annua* L. by LC-MS with selected ion monitoring. *J. Agric. Food. Chem*. v. 53, p. 7010-13, 2005.
- WANG, S.; YANG, B.; LI, L.; ZHU, D.; HE, D.; WANG, L., Active components of *Bidens pilosa* L., *Zhongcaoyao*, v.36, n.1, p.20-21, 2005

- WAT, C-K.; BISWAS, R.K.; GRAHAM, E.A.; BOHM, L.; TOWERS, G.H.N. Ultraviolet-mediated cytotoxic activity of phenylheptatriene from *Bidens pilosa* L. *Journal of Natural Products*. v. 42 n. 1, p.103-111, 1979.
- _____; JOHNS, T.; TOWERS, G.H.N. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the asteraceae used in folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*.v. 2, p. 279-90, 1980.
- WATT, J.M.; BREYER-BRANDWILK, M.G. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, 2 nd edn. E&S Livingstone, Edinburgh, 1962.
- WEJ, Z.; PAN, J.; LI, Y. Artemisinin G: a sesquiterpene from *Artemisia annua*. *Planta Medica*. v. 58, n. 3, p. 300, 1992.
- WHO. The International Pharmacopoeia. 3 ed. Geneva, 2004
- WHO. Facts on ACTs (Artemisinin-based combination therapies). <http://www.rbm.who.int/cmc>. Acesso em: 14 nov 2005.
- WHO. TDR News n. 79, december, 2007. <http://www.who.int/en/>. Acesso em 03 mar 2009
- WHO. Epidemics and emergencies. <http://www.who.int/en/>. Acesso em 12 jan 2008
- WHO. Herbal medicines. <http://www.who.int/en/>. Acesso em 03 mar 2009
- WILLIAM, H.; MARKLE, M.D.; KHALDOUN MAKHOUL, M.D. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *American Family Physician*. v. 69, n. 6, 2004.
- WOLLENWEBER, E.; JAY, M.; Flavones and flavonols. In: HARBORNE, J.B. The flavonoids: advances in research since 1980. 1 ed. London: Chapman and Hall, 1988. p. 233-302.
- WOERDENBAG, H.J.; J.F.J. LÜERS, W. VAN UDEN, N. PRAS, T.M. MALINGRÉ, AND A.W. ALFERMANN. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. v. 32, p. 247-257, 1993.
- WOERDENBAG, H.J.; PRAS, N.; CHAN, N.G.; BANG, B.T.; BOS, R.; UDEN, W.; Y, P.; BOI, N.; BATTERMAN, S.; LUGT, C.B. Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Planta Medica*. v. 60, p. 272-275, 1994.
- WONG-LEUNG, Y.L. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. *Fitoterapia*. v. 59, p. 11-16, 1988.
- WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.*, v. 2, p. 209-18, 2002.
- WU, L.; CHIANG, Y.; CHUANG, H.; WANG, S.; YANG, G.; CHEN, Y.; LAI, L.; SHYUR, L., Polyacetylenes function as anti-angiogenic agents, *Pharmaceutical Research*, v.21, n.11, p.2112-2119, 2004
- WU, Z.; WANG, Y., Structure and synthesis of arteannuin and related compounds. XI. Identification of epoxyarteannuinic acid, *Huaxue Xuebao*, v.42, n.6, p.596-598, 1984.
- WU, L-W.; CHIANG, Y-M.; CHUANG, H-C.; LO, C-P.; YANG, K-Y.; WANG, S-Y.; SHYUR, L-F. A nove polyacetylene significantly inhibits angiogenesis and promotes apoptosis in human endothelial cells through activation of the CDK inhibitors and caspase-7. *Planta Medica*. v. 73, p. 655-661, 2007.
- YANG, D.M.; LIEW, F.Y. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. v. 106, p.7-11, 1993.
- YANG, S-L.; ROBERTS, M.F.; O'NEILL, M.J.; BUCAR, F.; PHILLIPSON, D. Flavonoids and chromenes from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. v. 38, n. 1, p. 255-257, 1995.
- YANG, H-L.; CHEN, S-C.; CHANG, N-W.; CHANG, J-M.; LEE, M-L.; TSAI, P-C.; FU, H-H.; KAO, W-W.; CHIANG, H-C.; WANG, H.H.; HSEU, Y-C. Protection from oxidative damage using

Bidens pilosa extracts in normal human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*. v. 44, p. 1513-1521, 2006.

XUANKUN, S.; KEDONG, Y.; ZEYUAN, L.; YING, T.; M, ZENG. UV spectrophotometric determination of Qing Hao Su. *Yaowu Fenxi Zazhi*. v. 3, n. 1, p. 24-6, 1983.

ZHAO, A.; ZHAO, Q.; PENG, L.; ZHANG, J.; LIN, Z.; SUN, H. A new chalcone glycoside from *Bidens pilosa*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. v. 26, n. 1, p.121-126, 2004.

ZHAO, S-S.; ZENG, M-Y. Spektrometrische hochdruck-flüssigkeits-chromatographische (HPLC) untersuchungen zur analytik von qinghaosu. *Planta Medica*. p. 233-237, 1985.

ZHENG, G.Q. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica*.v.60, p. 54-7, 1994.

ZHU, D.; DENG, D.; ZHANG, S.; XU, R., Structure of artemislactone, *Huaxue Xuebao*, v.42, n.9, p.937-939, 1984.

ZOLLO, P.H.A.; KUIATE, J.R.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIERE, J.M.; CHALCHAT, J.C.; GARRY, R. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XX. The occurrence of 1-phenylhepta-1,3,5-triene in the essential oil of *Bidens pilosa* L. from Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*. v. 10, n. 2, p. 97-100, 1995.

ZULUETA, M.C.A.; TADA, M.; RAGASA, C.Y. A diterpene from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*. v. 38, n. 6, p. 1449-1450, 1995.