

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT

ESTUDO DE MARCADORES QUÍMICOS DE
***Ambrosia artemisiifolia* L. (ASTERACEAE)**

HYELEN BEZERRA GOUVÊA VALDIVINO

MANAUS – AMAZONAS

2005

HYELEN BEZERRA GOUVÊA VALDIVINO

**ESTUDO DE MARCADORES QUÍMICOS DE
Ambrosia artemisiifolia L.(ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais oferecido pela Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sergio Massayoshi Nunomura

MANAUS – AMAZONAS

2005

HYELEN BEZERRA GOUVÊA VALDIVINO

**ESTUDO DE MARCADORES QUÍMICOS DE *Ambrosia artemisiifolia* L
(ASTERACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais oferecido pela Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Utilização Sustentável de Recursos da
Biodiversidade

DATA DA APROVAÇÃO: _____

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Sergio Massayoshi Nunomura (INPA)

Dra. Maria Rosa Lozano Borrás (FF/UFAM)

Dr. Massayoshi Yoshida (CBA/UEA)

VALDIVINO, Hyelen Bezerra gouvêa

Estudo de marcadores químicos de *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae)/ Hyelen Bezerra Gouvêa Valdivino – Manaus, 2005.

152 p.

Dissertação de Mestrado – UEA, 2005.

1. Ambrosina. 2. Damsina. 3. Lactonas sesquiterpênicas. 4. Antiúlcera
5. Fitoterápico

Sinopse:

Ambrosia artemisiifolia L. é uma espécie anual (Asteraceae), que cresce em clima quente e úmido e ocorre em toda a região amazônica de forma abundante. Dentre os seus usos populares destaca-se o seu emprego no combate de males do estômago. Neste trabalho, realizou-se o isolamento de lactonas sesquiterpênicas (LS), presentes nos extratos aquoso e clorofórmico das partes aéreas e que foram ativos em ensaios antiulcerogênicos. Realizou-se também um estudo de perfis cromatográficos, via CLAE, a partir dos marcadores isolados e dos extratos ECA e EA produzidos de quatro diferentes indivíduos, coletados em quatro diferentes localidades. Considerando os perfis cromatográficos obtidos dos extratos por CLAE e dos óleos essenciais por CG, e os resultados dos testes antiulcerogênicos *in vivo*, considera-se que as LS isoladas são excelentes marcadores químicos dessa espécie.

Palavras-chave: Ambrosina, Damsina, lactonas sesquiterpênicas.

DEDICATÓRIA

*Ao meu filho **Eduardo**, por sua compreensão e amor em tantos momentos de ausência, dedico-lhe essa conquista como prova de que com esforço e dedicação podemos colher bons frutos.*

Confie a Javé o que você faz e seus projetos se realizarão.

Provérbios, 16:3

Posso todas as coisas naquele que me fortalece.

Filipenses, 4:13

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder saúde e persistência, permanecendo ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

À Fundação Centro de Análise, Pesquisa e Inovação Tecnológica (FUCAPI) pelo apoio e por valorizar o desenvolvimento profissional do ser humano, à Dra. Isa Assef dos Santos, pelo incentivo maior e por acreditar no meu potencial e, também, ao amigo Evandro Vieiralves pelo apoio dispensado.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) que concedeu a oportunidade desse curso de mestrado, nesta área de grande importância para o Estado.

À SUFRAMA pelo apoio financeiro destinado ao curso de mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais oferecido pela UEA.

Às agências de fomento, CNPq (Editais Fitomedicamentos e CTPetro) e FAPEAM/MCT (Edital PPP), pelo apoio financeiro destinado ao projeto.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), que possibilitou a realização desse trabalho de pesquisa, disponibilizando recursos técnicos e financeiros.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) pela obtenção de Cromatogramas de Ions Totais de constituintes dos óleos voláteis.

Ao meu orientador e amigo Dr. Sergio Massayoshi Nunomura, a quem devo uma colaboração de valor imensurável e nunca negada, consubstanciada na participação constante no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Juan Revilla pelo apoio e pelas contribuições dadas durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, pela dedicação na missão de educar.

À Prof^a. Dra. Caden Soucar de Prof.Dr.Antônio José Lapa pela contribuição e orientação nos testes de atividade anti-úlceras dos extratos EA e ECA avaliados.

Aos meus pais, Eliana e Gouvêa, por terem dedicado suas vidas a mim, pelo amor, pelo exemplo de vida, carinho e estímulo que sempre me ofereceram.

Ao meu amado Airton, pelo companheirismo de todas as horas, compreensão e por seu amor incondicional.

Aos meus irmãos, sobrinhos e familiares, pelos momentos de felicidade.

Aos meus colegas e amigos da FUCAPI, em especial Denise, Jason, Rafaella e Rogério pelo incentivo e apoio.

Aos colegas do Curso de Mestrado, em especial aos amigos Ângela, Francisca, Júnior e Laura, por todas as colaborações nesta conquista.

A todos os companheiros de laboratório do INPA, por fazerem parte desse momento especial.

Aos irmãos de caminhada da Equipe 28, Nossa Senhora dos Navegantes e ao Padre Edson, por suas orações e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste.

MEU MUITO OBRIGADA

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico
ACN	acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC	coluna cromatográfica
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CEME	Central de Medicamentos
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografo gasoso acoplado a espectrômetro de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	correlation spectroscopy
di	diâmetro interno
<i>d</i>	dubleto
DCM	diclorometano
<i>dd</i>	duplo dubleto
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DP	desvio padrão
EA	extrato aquoso
EA ₀	estágio de oxidação
EAs	especialidade do esqueleto
ECA	extrato clorofórmico livre de clorofila
EM	espectro de massas

Ext.	extrato
FPP	pirofosfato de farnesila
Fr.	fração
h	altura
H	número de hidrogênio
H ₂ O	água
HBBD	hydrogen broad-bondenig decoupled
HETCOR	espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹³ C- ¹ H
Hex	hexano
HMBC	espectro de correlação à longa distância heteronuclear ¹³ C- ¹ H
HOMOCOSY	espectro de correlação homonuclear ¹ H- ¹ H
IL	Índice de úlceras
Int. rel.	Intensidade relativa
IPP	Pirofosfato de isopropila
i-PrOH	iso-propanol
IR	Índice de retenção
J	constante de acoplamento
LS	lactona(s) sesquiterpênica(s)
m	massa
<i>m</i>	multiplete
MeOH	Metanol
NU	número de úlceras
AcOEt	acetato de etila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGE	prostaglandinas
ppm	partes por milhão
PPPM	Programa de pesquisa de plantas medicinais
PVDF	Polivinil de fluoreto

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Ref.	Referência
R _F	fator de retenção
RP-18	reverse phase (fase reversa)
RMN	ressonância magnética nuclear
s	singleto
s.c.	subcutânea
TFA	ácido trifluoracético
TMS	tetrametilsilano
UV-VIS	Ultravioleta- visível
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Plantas medicinais.....	5
1.2 Fitoterápicos.....	10
1.3 <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.....	18
1.3.1 Aspectos botânicos.....	18
1.3.2 Aspectos agrônômicos.....	20
1.3.3 Usos populares.....	21
1.3.4 Aspectos químicos.....	23
1.3.4.1 Lactonas sesquiterpênicas.....	23
1.3.4.2 Atividade biológica.....	30
1.3.5 Aspectos fitoquímicos.....	38
2.OBJETIVOS.....	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
3.1 Materiais e métodos.....	43
3.1.1 Solventes.....	43
3.1.2 Equipamentos.....	43
3.1.3 Coleta de material.....	44

3.1.4	Secagem de material vegetal.....	45
3.1.5	Métodos cromatográficos.....	45
3.1.6	Métodos espectroscópicos.....	46
3.2	Estudo fitoquímico.....	47
3.2.1	Preparação dos extratos aquosos.....	47
3.2.2	Preparação dos extratos clorofórmicos.....	48
3.2.2.1	Eliminação de clorofila dos extratos clorofórmicos.....	48
3.2.3	Preparação dos extratos metanólicos.....	49
3.2.4	Fracionamento cromatográfico do extrato ECA	51
3.2.5	Fracionamento de 37-5 + 70-9.....	53
3.2.6	Fracionamento de 22-20.....	55
3.2.7	Recristalização das frações 22-21 a 24 e 22-25 a 26.....	56
3.2.8	Fracionamento de 70-5 + 70-6.....	57
3.2.9	Fracionamento de 86-2 + 86-3.....	58
3.2.10	Fracionamento de 70-7 + 70-8.....	60
3.2.11	Fracionamento de 92-3.....	60
3.3	Obtenção dos óleos essenciais.....	62
3.3.1	Análise quantitativa das amostras de óleo em CG e CG-EM.....	62
3.4	Análise semi-quantitativa dos extratos clorofórmicos (ECA), extratos aquosos (EA) e marcadores por CLAE.....	63
3.4.1	Preparação das amostras.....	63
3.4.2	Condições de análise.....	64
3.4.3	Curva de calibração para LacA, LacB e LacD.....	64
3.4.4	Quantificação dos marcadores nos extratos EA e ECA.....	65
3.5	Testes para avaliação da atividade anti-úlceras.....	65
3.5.1	Lesão gástrica induzida por etanol.....	66
3.5.2	Lesão gástrica induzida por estresse.....	68
3.5.3	Lesão gástrica induzida por indometacina.....	68
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1	Identificação dos marcadores isolados.....	70
4.1.1	Identificação de LacA.....	70
4.1.2	Identificação de LacB.....	82
4.1.3	Identificação de LacC.....	93
4.1.4	Identificação de LacD.....	95
4.2	Análise dos marcadores isolados.....	100
4.2.1	Indivíduos estudados.....	101
4.2.2	Comparação dos perfis cromatográficos dos indivíduos estudados.....	105
4.2.3	Análise semi-quantitativa dos marcadores isolados	112
4.2.3.1	Análise de pureza dos marcadores.....	112
4.2.3.2	Análise semi-quantitativa de LacA, LacB e LacD.....	114
4.3	Análise dos óleos nos diferentes indivíduos.....	125
4.3.1	Óleos obtidos.....	125

4.3.2 Análise qualitativa dos óleos.....	127
4.4 Atividade antiulcerogênica.....	134
4.4.1 Efeitos dos extratos EA e ECA nas lesões gástricas induzidas por etanol.....	134
4.4.2 Efeito dos extratos EA e ECA (fração livre de clorofila) nas lesões gástricas induzidas por estresse.....	135
4.4.3 Efeitos dos extratos EA e do ECA de <i>A. artemisiifolia</i> nas lesões gástricas induzidas por indometacina.....	137
5. CONCLUSÕES.....	139
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de espécies cujos efeitos terapêuticos foram comprovados cientificamente (Fitoterápicos Tradicionais) Resolução – n.º 17/MS – 24/02/2000.....	13
Tabela 2. Espécies consideradas com potencial para fitoterápicos ou fitocosmético selecionadas pelo grupo de trabalho da Plataforma do Arranjo Produtivo de Fitoterápicos e fitocosméticos (SUFRAMA).....	17
Tabela 3. Exemplos de estudos de atividade antiulcerogênica de LS.....	35
Tabela 4. Efeito Citoprotetor de lactonas sesquiterpênicas na dose de 40 mg/kg.	36
Tabela 5. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância LacA	71
Tabela 6. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância LacA.....	72
Tabela 7. Correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) e ^{13}C - ^1H (HETCOR) observadas nos espectros da substância LacA.....	73
Tabela 8. Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância ($J^{2, 3}$) (HMBC) observadas para LacA.....	73
Tabela 9. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância LacB.....	82
Tabela 10. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância LacB.....	83
Tabela 11. Correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) e ^{13}C - ^1H (HETCOR) observadas nos espectros da substância LacB.....	84
Tabela 12. Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância ($J^{2, 3}$) (HMBC) observadas para LacB.....	85

Tabela 13. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância LacC.....	93
Tabela 14. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância LacD.....	96
Tabela 15. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância LacD.....	96
Tabela 16. Teor extrativo dos indivíduos estudados.....	102
Tabela 17. Rendimento do extrato livre de clorofila (ECA).....	105
Tabela 18. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (1 ^a coleta	115
Tabela 19. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (2 ^a coleta).....	115
Tabela 20. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (3 ^a coleta).....	115
Tabela 21. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (4 ^a coleta).....	115
Tabela 22. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (1 ^a coleta).	116
Tabela 23. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (2 ^a coleta).	116
Tabela 24. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (3 ^a coleta).	116
Tabela 25. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (4 ^a coleta).	116
Tabela 26. Resultados médios obtidos das soluções padrões de LacA.....	117
Tabela 27. Resultados médios obtidos das soluções padrões de LacB.....	118
Tabela 28. Resultados médios obtidos das soluções padrões de LacD.....	119
Tabela 29. Resultados das concentrações dos marcadores no extrato ECA.....	121
Tabela 30. Resultados das concentrações dos marcadores no extrato EA.....	122
Tabela 31. Teor extrativo de óleo dos indivíduos estudados.....	126
Tabela 32. Substâncias identificadas no indivíduo da 1 ^a coleta.....	131
Tabela 33. Substâncias identificadas no indivíduo da 2 ^a coleta.....	131

Tabela 34. Substâncias identificadas no indivíduo da 3 ^a coleta.....	132
Tabela 35. Substâncias identificadas no indivíduo da 4 ^a coleta.....	132
Tabela 36. Percentagem de áreas das substâncias identificadas no óleo de cada indivíduo estudado.....	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Camptotheca acuminata</i> e o camptotecina (1).....	2
Figura 2. <i>Catharanthus roseus</i> e vincristina (2) e vimblastina (3).....	3
Figura 3. <i>Podophyllum peltatum</i> e podofilotoxina (4).....	3
Figura 4. <i>Taxus brevifolia</i> e o taxol (5).....	3
Figura 5. Destaques morfológicos de <i>A. artemisiifolia</i> L.....	19
Figura 6. Exemplos de LS isoladas do gênero <i>Ambrósia</i>	28
Figura 7. Exemplos de esqueletos de lactonas sesquiterpênicas (BRUNETON, 1991).....	29
Figura 8. Exemplos de lactonas sesquiterpênicas biologicamente ativas (UGAZ, 1994).....	32
Figura 9. Exemplos de lactonas sesquiterpênicas com atividade antiulcerogênica comprovada.....	33
Figura 10. Exemplos de lactonas sesquiterpênicas isoladas de <i>A. artemisiifolia</i>	41
Figura 11. Administração dos extratos por gavagem.....	69
Figura 12. Exemplo de contensor individual utilizado no teste de úlceras induzidas por estresse.....	69
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de LacA	76
Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (HBBD) (75 MHz, CDCl_3) de LacA....	77

Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) (75 MHz, CDCl_3) de LacA.....	78
Figura 16. Espectro de correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) de LacA.....	79
Figura 17. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H (HETCOR) de LacA.....	80
Figura 18. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H à longa distância (HMBC) de LacA.....	81
Figura 19. Algumas correlações à longa distância ^{13}C - ^1H observadas no espectro HMBC da substância LacA.....	74
Figura 20. Estrutura da lactona sesquiterpênica Ambrosina.....	75
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de LacB.....	87
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (HBBD) (75 MHz, CDCl_3) de LacB....	88
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) (75 MHz, CDCl_3) de LacB.....	89
Figura 24. Espectro de correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) de LacB.....	90
Figura 25. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H (HETCOR) de LacB.....	91
Figura 26. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H à longa distância (HMBC) de LacB.	92
Figura 27. Algumas correlações à longa distância ^{13}C - ^1H observadas no espectro HMBC da substância LacB.....	85
Figura 28. Estrutura da lactona sesquiterpênica damsina.....	86
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de LacC.....	94
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de LacD.....	97
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (HBBD) (75 MHz, CDCl_3) de LacD...	98
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) (75 MHz, CDCl_3) de LacD.....	99
Figura 33. Destaque do mapa da região amazônica, mostrando as áreas de coleta dos indivíduos (IBGE, 2002).....	101
Figura 34. Gráfico dos teores (g/g) de extrato aquoso (EA) dos indivíduos estudados.....	103

Figura 35. Gráfico dos teores (g/g) de extrato clorofórmico dos indivíduos estudados.....	104
Figura 36. Gráfico dos rendimentoa (g/g) do extrato clorofórmico livre de clorofila (ECA) dos indivíduos estudados.....	105
Figura 37. Perfis cromatográficos dos diferentes indivíduos de <i>A.artemisiifolia</i> analisados por CLAE, no extrato ECA em 254 nm (esquerda) e 225 nm (direita).....	106
Figura 38. Perfis cromatográficos da fração ECA (4 ^a coleta) e o de coinjeção da substância LacA com o extrato ECA (4 ^a coleta) de <i>A. artemisiifolia</i> analisados por CLAE (254 e 225 nm).....	107
Figura 39. Perfis cromatográficos da fração ECA (4 ^a coleta) e o de coinjeção da substância LacB com o extrato ECA (4 ^a coleta) de <i>A. artemisiifolia</i> analisados por CLAE em (254 e 225 nm).....	108
Figura 40. Perfis cromatográficos da fração ECA (4 ^a coleta) e o de coinjeção da substância LacC com o extrato ECA (4 ^a coleta) de <i>A. artemisiifolia</i> analisados por CLAE em (254 e 225 nm).....	108
Figura 41. Perfis cromatográficos da fração ECA (4 ^a coleta) e o de coinjeção da substância LacD com o extrato ECA (4 ^a coleta) de <i>A. artemisiifolia</i> analisados por CLAE em (254 e 225 nm).....	109
Figura 42. Perfis cromatográficos dos diferentes indivíduos de <i>A. artemisiifolia</i> analisados por CLAE das frações EA em 254 nm (esquerda) e 225 nm (direita).....	111
Figura 43. Perfis cromatográficos de LacA, LacB, LacC e LacD.....	113
Figura 44. Curva de calibração de LacA em 254 e 225 nm.....	117
Figura 45. Curvas de calibração de LacB em 254 e 225nm.....	118
Figura 46. Curva de calibração de LacD em 254 e 225 nm.....	119
Figura 47. Gráfico da concentração dos marcadores químicos na fração ECA (254 nm).....	122
Figura 48. Gráfico da concentração dos marcadores químicos no extrato EA (254 nm).....	123
Figura 49. Gráfico da variação do teor de óleo essencial.....	126
Figura 50. Análise cromatográfica (coluna apolar) dos óleos de <i>A. artemisiifolia</i> L.....	128

Figura 51. Análise cromatográfica (coluna polar) dos óleos de <i>A. artemisiifolia</i> L.....	129
Figura 52. Estruturas das substâncias identificadas no óleo de <i>A. artemisiifolia</i>	133
Figura 53. Gráfico da variação da A% de cada substância nos indivíduos estudados.....	133
Figura 54. Efeito da administração oral de EA de <i>A. artemisiifolia</i> , nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por etanol (75 %, v.o) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.....	134
Figura 55. Efeito da administração oral de ECA de <i>A. artemisiifolia</i> , nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por etanol (75 %, v.o) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.....	135
Figura 56. Efeito da administração oral de EA de <i>A. artemisiifolia</i> , nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por estresse (imobilização a 4 °C/ 1 h) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.....	136
Figura 57. Efeito da administração oral de ECA de <i>A. artemisiifolia</i> L nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por estresse por imobilização a 4 °C/ 1 h em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.....	137
Figura 58. Efeito da administração oral de EA de <i>A. artemisiifolia</i> , nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por indometacina (30 mg/kg, s. c.) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.....	138
Figura 59. Efeito da administração oral de ECA de <i>A. artemisiifolia</i> , nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por indometacina (30 mg/kg, s. c.) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.....	138

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Formação de sesquiterpenos (DEWICK, 2002).....	24
Esquema 2. Formação do precursor dos sesquiterpenos (DEWICK, 2002).....	25
Esquema 3. Seleção de reações padrões de carbocátions que explicam a maioria dos esqueletos dos sesquiterpenos (DEWICK, 2002).....	26
Esquema 4. Formação do anel das lactonas sesquiterpênicas (UGAZ, 1994).....	27
Esquema 5: Preparação dos extratos aquosos de <i>A. artemisiifolia</i>	47
Esquema 6: Preparação dos extratos ECA e metanólico de <i>A. artemisiifolia</i>	50
Esquema 7: Fracionamento do extrato ECA livre de clorofila de <i>A. artemisiifolia</i> (1 ^o coluna).....	52
Esquema 8: Fracionamento do extrato ECA livre de clorofila de <i>A. artemisiifolia</i> (2 ^o coluna).....	53
Esquema 9: Fracionamento das frações 37- 5 + 70 -9.....	55
Esquema 10: Fracionamento de 70- 5 + 70 -6 e 86- 2 + 86 -3.....	59
Esquema 11: Fracionamento de 70 -7 + 70 -8 e purificação de 92-3	61

RESUMO

Ambrosia artemisiifolia L é uma espécie anual pertencente à família Asteraceae, que cresce em clima quente e úmido, erva daninha, ocorrendo em toda a região amazônica de forma abundante em áreas de terrenos argilosos e alagadiços, margens de rios e igarapés de águas barrentas onde ocupa longas extensões. É conhecida popularmente por catinga-de-bode, artemísia, arquemijo e artemija. Dentre os seus usos populares destaca-se o seu emprego no combate de males do estômago. Neste trabalho é descrito o isolamento das lactonas sesquiterpênicas ambrosina e damsina, sendo esse o primeiro relato de isolamento destas na espécie *A. artemisiifolia*, a partir do extrato clorofórmico de partes aéreas da planta. Os extratos aquosos e clorofórmico foram avaliados em três modelos de lesões gástricas (etanol, estresse e indometacina) induzidas agudamente e apresentaram atividade protetora. Também foi realizado um estudo dos perfis cromatográficos do extrato clorofórmico e aquoso, similar ao chá comumente utilizado na medicina popular, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, bem como dos óleos essenciais, por cromatografia gasosa de alta resolução, obtidos de diferentes indivíduos, coletados em quatro localidades: Iranduba (AM), Juruti (PA), Manaus (AM) e Itacoatiara (AM), buscando desenvolver metodologia analítica para o monitoramento dos marcadores químicos isolados, de acordo com as exigências da resolução RDC nº . 48.

ABSTRACT

Ambrosia artemisiifolia L. (Asteraceae) is an annual species, normally considered a weed, that grows well in tropical areas, including the Amazon region. It is popularly known in Brazil as “catinga-de-bode”, “artemisia”, “arquemijo” and “artemija”. Traditionally, the tea of *A. artemisiifolia* leaves is used for the treatment of stomach illness. This work describes the isolation of the sesquiterpene lactones, ambrosin and damsine, for the first time in this species. Aqueous and chloroform extracts were evaluated in three different models of gastric lesions (ethanol, stress and indomethacin) induced acutely and showed significant protective activity. Chromatographic fingerprints of aqueous and chloroform extracts by high performance liquid chromatography and also essential oil analysis by high resolution gas chromatography were obtained from four different individuals collected in different locations in the Amazon region, Iranduba (AM), Juruti (PA), Manaus (AM) and Itacoatiara (AM), in order to develop chromatographic methods to be used in the quality control of the isolated chemical markers, accordingly to the resolution RDC N. 48.

1. INTRODUÇÃO

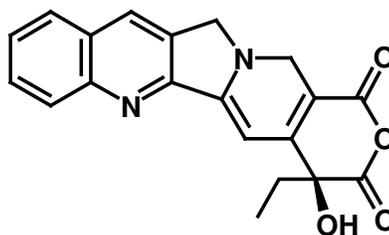
A Amazônia é uma das regiões mais ricas do planeta em biodiversidade e recursos naturais, esse fato tem gerado grande cobiça econômica e mercadológica inclusive internacionais, principalmente quando nos referimos a plantas medicinais. Grande parte do desenvolvimento futuro da Amazônia, encontra-se, atualmente, determinado pelo dinamismo das atividades vinculadas ao aproveitamento do potencial desses recursos.

Um dos fatores estratégicos que explicam uma preocupação cada vez maior em concentrar estudos científicos na região ao aproveitamento econômico dos recursos naturais de modo sustentável é a existência de uma grande área florestal preservada, especialmente no Estado do Amazonas.

A Amazônia representa quase 60% do território nacional e nela estão contidas mais de 33.000 espécies de plantas superiores, sendo pelo menos um terço dessas medicinais, aromáticas e 300 espécies de frutas comestíveis (FERREIRA, 1998). Dada as limitações da investigação botânica, não conhecemos o número real de espécies vegetais existentes, mas estima-se que pode chegar a 80 mil espécies de plantas superiores, das quais a medicina popular selecionou mais de 3 mil como medicinais (SILVA, 2000). Um número muito reduzido foram investigados quanto à composição química e propriedades farmacológicas.

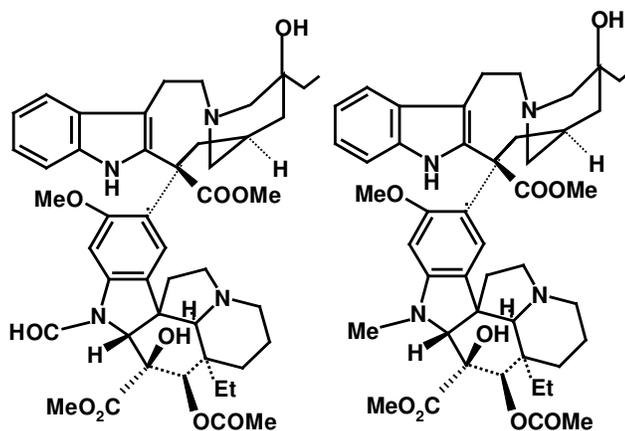
Para a maioria delas existem apenas levantamentos etnobotânicos e etnofarmacológicos; e eventualmente limitadas investigações fitoquímicas. Portanto, em sua maioria, os constituintes químicos responsáveis pela atividade farmacológica das plantas medicinais amazônicas ainda não foram descritos. Acredita-se ainda que a ação farmacológica desses produtos possam envolver a interação de inúmeras moléculas presentes no extrato (YUNES & CALIXTO, 2001).

O interesse de todo o mundo por recursos naturais deve-se ao encurtamento da rota que leva ao desenvolvimento de novos medicamentos, através da pesquisa de produtos naturais. Cerca de 25% dos medicamentos disponíveis atualmente no mercado farmacêutico foram extraídos ou sintetizados a partir de substâncias presentes em plantas tidas como medicinais (CRAGG, NEWMAN & SNADER, 1997). Como exemplos temos os agentes neoplásicos camptotecina (1) isolada de *Camptotheca acuminata* (Figura 1), a vincristina (2) e vimblastina (3) isolados de *Catharanthus roseus* (Figura 2), podofilotoxina (4) isolada de *Podophyllum peltatum* (Figura 3) e o taxol (5) isolado das cascas de *Taxus brevifolia* (Figura 4).



(1)

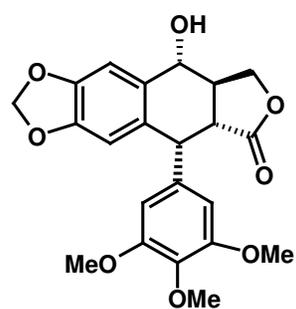
Figura 1. *Camptotheca acuminata* e o camptotecina (1)



(2)

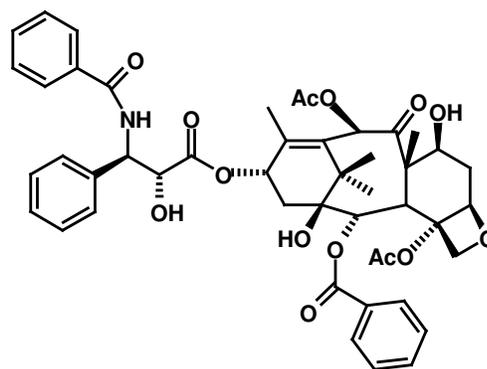
(3)

Figura 2. *Catharanthus roseus* e vincristina (2) e vimblastina (3)



(4)

Figura 3. *Podophyllum peltatum* e podofilotoxina (4)



(5)

Figura 4. *Taxus brevifolia* e o taxol (5)

Tem-se verificado que nos últimos anos ocorreu um considerável avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais visando obter novas substâncias com propriedades terapêuticas. Isto pode ser observado pelo aumento de trabalhos publicados nessa área, tanto em congressos, periódicos nacionais e internacionais, como no surgimento de novos periódicos específicos (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Levando-se em consideração todos esses fatores e explicações para o aproveitamento da grande contribuição dos recursos naturais para o desenvolvimento da medicina moderna, acredita-se que a exploração racional da imensa biodiversidade amazônica para a produção de medicamentos, além de gerar divisas para o país, irá constituir-se numa melhoria das condições de vida da população.

A cultura e os conhecimentos populares do uso das plantas existentes na Amazônia, acumulados ao longo dos anos, representam também um fator muito importante sobre a potencialidade e cobiça pela biodiversidade da região, pois estão incluídas nessa, um grande número de plantas com propriedades terapêuticas de importância na medicina popular. O estudo dessas representa uma grande oportunidade de descoberta e desenvolvimento de novas drogas com potencial farmacológico, uma vez que plantas usadas na medicina popular têm constituído fontes de novos compostos biologicamente ativos (PÉREZ *et al.*, 1997).

1.1. Plantas Medicinais

O uso terapêutico de plantas medicinais é uma prática comum no país e um dos traços mais característicos da espécie humana. Há relatos que a utilização de plantas para fins medicinais é comum desde a Idade Média, mas os primeiros registros remontam a milênios (STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). É uma prática encontrada em quase todas as civilizações ou grupos culturais conhecidos. Por exemplo, a etnobotânica brasileira é originária de várias tradições diferentes, criando um sistema heterogêneo de plantas medicinais e esse uso tem sido transmitido de geração em geração (SCARDA *et al.*, 2004). Tem sua origem na cultura dos diversos grupos indígenas que habitavam o Brasil e das influências dos imigrantes europeus, africanos e orientais que para cá imigraram, que introduziram plantas e tradições de uso de plantas medicinais, as quais posteriormente foram difundidas por todo o território nacional (SIMÕES *et al.*, 1998).

Desde essa época, a administração ou o uso das plantas ditas como medicinais são, conforme o caso, preparações diversas para serem ingeridas. Por exemplo, como os chás preparados por infusão, característicos em diversas tribos indígenas, cozimentos para aplicações na pele ou nas mucosas das cavidades naturais, ditas de uso externo.

Os primeiros médicos que vieram para o Brasil, diante das dificuldades da época, por não disporem de medicamentos empregados na Europa na colônia, desde muito cedo foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas. Em 1587, um dos cronistas da época, Gabriel Soares de Souza, autor de

“Tratado Descritivo do Brasil” denominava os remédios indígenas de “as árvores e ervas da virtude” (PINTO *et al.*, 2002).

Já em 1808, diante da vinda da Corte Real para o Brasil e o decreto de D. João VI, que abriu os portos brasileiros às nações amigas, chegaram as primeiras expedições científicas, cujo principal objetivo era dar conhecimento e coletar espécies de plantas para os europeus. Na mesma época, a Europa já tinha, há muito tempo, conhecimento de plantas medicinais brasileiras, através da obra “*Histórias Naturalis Brasiliae*”. Três homens foram responsáveis pelo conteúdo do livro: Georg Marcgrave, originário da Alemanha, mas tendo estudado em Leiden; Johannes de Laet, que editou a contribuição de Marcgrave e acrescentou comentários próprios, e o médico de Maurício de Nassau. O farmacêutico Theodoro Peckolt, em 1847, veio para o Brasil especificamente para estudar a flora, sendo considerado o pai da fitoquímica brasileira pelo seu trabalho realizado na época, e patriarca de uma das famílias de cientistas mais notáveis que realizaram inúmeros estudos químicos de plantas brasileiras. Em 1838, o farmacêutico Ezequiel Correia dos Santos isolou, em uma farmácia localizada no Rio de Janeiro, o alcalóide pereirina das cascas do pau-pereira, sendo um dos primeiros alcalóides, se não o primeiro a ser isolado puro no Brasil (PINTO *et al.*, 2002).

Um dos trabalhos mais significativos dessa época foi atribuído à Karl Freidrich Philipp von Martius (1794-1868) – editor da obra “*Flora Brasiliensis*” sendo considerada a mais completa obra da botânica jamais publicada no Brasil, com o livro “*Systema Materiae medicae Vegetabilis brasiliensis*” publicado em 1843 e relatando as virtudes medicinais das plantas que aqui existiam o qual foi

considerada a primeira publicação sobre o assunto no Brasil. Vários outros trabalhos foram realizados por outros pesquisadores que surgiram posteriormente, dando sistematização ao conhecimento de plantas medicinais em nosso país (STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Entre as plantas valiosas, nativas e exóticas no Brasil para fins medicinais podem ser citadas o curare indígena (*Chondodendron tomentosum*) a dedaleira (*Digitalis purpurea*), utilizada na preparação do chá contra a hidropisia provocada pela insuficiência cardíaca, antes mesmo de ser descoberta a ação da digitalina sobre o músculo cardíaco. A casca d'anta (*Drimys brasiliensis*) com propriedades estomacais. A quina (*Cinchona calisaya*) utilizada na cura da malária, a ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha*) utilizada para tratar diarréias, disenteria amebiana, catarros crônicos, hemorragias e asma, e a sapucainha (*Carpotrochoche brasiliensis*) com efeitos antiinflamatórios comprovados cientificamente e cujo óleo extraído da semente é empregado no tratamento da lepra (SILVA *et al.*, 2002).

Como observado, plantas medicinais e seu uso são temas recorrentes na pauta da ciência brasileira. Um levantamento realizado em 1992 estimou que um total de 402 plantas (em 969 espécimens armazenadas, de 286 gêneros, distribuídas em 93 famílias) tinham sido estudadas ao longo dos anos. Espécies pertencentes às famílias Asteraceae (10,2%) e Leguminosae (13,9%), compreenderam mais de 25% do número total de espécies estudadas. Cerca de 106 atividades farmacológicas foram investigadas em plantas tidas como medicinais, sendo agrupadas em 13 classes terapêuticas, entre elas as mais citadas foram as com atividade anti-inflamatória, anti-microbiana, analgésica e depressora do sistema nervoso central, entre outras.

11,1% das plantas estudadas tiveram relatos de efeitos tóxicos. Com exceção dos diuréticos, mais de 40% dos efeitos populares de plantas alegados, foram confirmados por laboratórios de pesquisas indicando uma boa correlação entre o uso popular e a atividade farmacológica experimental, sendo até considerada alta. Um total de 93 compostos com um ou mais efeitos farmacológicos foram isolados da flora brasileira e estão registrados em bancos de dados, mas menos que 10% de 402 espécies diferentes que estão registradas em banco de dados, foram submetidas a investigações químicas ou tiveram compostos isolados e suas atividades farmacológicas testadas (BRITO & BRITO, 1992).

Apesar do extenso conhecimento que possa existir sobre o uso das plantas medicinais do Brasil, pouco se sabe sobre quais são as espécies medicinais nativas que são objeto de uso e comércio significativos, tanto em nível local como internacional, e sobre o impacto que a atividade comercial está causando sobre estes recursos naturais e sobre a população humana (SILVA *et al.*, 2002).

É consenso entre químicos e farmacólogos brasileiros de reconhecida expressão internacional, que os estudos com plantas medicinais no Brasil, ainda não receberam a atenção que o tema merece, embora já exista uma massa de pesquisadores qualificados trabalhando na área (BRITO & BRITO, 1992). No entanto, o Brasil vem articulando esforços para ampliar cada vez mais o desenvolvimento de novos estudos de plantas medicinais, porém baseados em conquistas e avanços da medicina oriundos de estudos com plantas medicinais no exterior. Como exemplo, temos a descoberta da reserpina, o primeiro tranqüilizante de origem natural de uso terapêutico, que conduz eventualmente para uma

revolução no cuidado e tratamento de doentes mentais e de pessoas que sofrem de hipertensão (TYLER, 1987).

É importante citar também que a evolução dos equipamentos, o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas e cromatográficas para estudos de plantas ao longo dos anos, proporcionou o isolamento e a elucidação de estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas e que resultou na obtenção de várias moléculas de relevante ação farmacológica, como o taxol, a forskolina, a artemisinina, a morfina, a emetina, a vincristina, a rutina entre outras drogas de primordial relevância na medicina mundial (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Todos esses aspectos somados ao potencial de mercado na área de exportações de produtos naturais para cura de doenças está ocasionando uma ascensão nas expectativas de investimentos e apoio para estudos de plantas, visto que uma das prioridades da política industrial tecnológica e de comércio exterior do Governo Federal é o setor de biotecnologia, que engloba as áreas de fitoterápicos, fitocosméticos, nutracêuticos, essências para bebidas não alcoólicas, a qual foi contemplado na Federação das Industrias do Estado do Amazonas (FIEAM) com a instalação do Fórum de Competitividade da cadeia produtiva, inclusive, dispendo de uma previsão no plano orçamentário do Governo Federal, da ordem de R\$ 11 milhões para o exercício de 2005.

1.2. Fitoterápicos

Um dos produtos mais promissores oriundos dos recursos naturais da Amazônia são os fitoterápicos, medicamentos originados exclusivamente de plantas ou derivados de vegetais (extratos, sucos, óleos, ervas, etc.), hoje definido como medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Fitoterápicos devem ser caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (RDC nº 48, 2004). São usados com o propósito de tratamento médico para curar males da saúde e que passaram a ser oficialmente reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1978, que passou a recomendar sua difusão, em nível mundial dos conhecimentos necessários para o uso concreto dos mesmos (SILVA *et al.*, 2002).

De acordo com dados da OMS, entre 65 e 80% da população dos países em desenvolvimento não tem acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças (SILVA *et al.*, 2002).

O uso e comércio destes, como em outros países, foram estimulados pelas necessidades de uma crescente população que demanda cada vez mais plantas medicinais para o cuidado de sua saúde, seja pela facilidade de acesso devido aos custos elevados da medicina alopática, seja pelos efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos, além da demanda de novos produtos pela indústria farmacêutica (BERG, 1993; CARRARA, 1995; SIMÕES *et al.*, 1998). Somente nos

EUA, estima-se que o uso de plantas para fins medicinais, aumentou em 380% entre 1990 e 1997 (MAHADY, 2001).

O uso de formulações de medicamentos de origem de plantas medicinais expandiram globalmente na última década e ganharam popularidade, ao ponto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos, por exemplo, gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares (YUNES *et al.*, 2000).

No Brasil, existem estatísticas que indicam que os laboratórios privados produzem cada vez mais produtos, com um aumento estimado de 20% ao ano (SOLER, 2001).

Na região amazônica, cresce a cada dia o uso informal de produtos originados de plantas medicinais, através de trabalhos de comunidades, tratamentos realizados pelas freiras na atenção a pessoas de baixa renda que procuram auxílio na igreja; curandeiros que administram extratos de plantas em geral, as chamadas garrafadas; feirantes e mercadores de ervas com suas formulações orientadas na hora da venda, etc. assim como os próprios pequenos empresários de indústrias locais que já oferecem produtos mais elaborados e controlados. Contudo, sem uma política consistente de regulamentação de fitoterápicos, não será possível garantir a segurança da população usuária desses produtos.

No entanto, no Brasil, ao contrário de outros países, como nos Estados Unidos, os fitoterápicos são reconhecidos como medicamentos e portanto a comercialização desses é regulada por normas rígidas que exigem atestados de eficácia, segurança e qualidade. Dessa forma, para o desenvolvimento do setor de fitoterápicos ainda

existem inúmeras dificuldades, pois para um mercado consolidado é necessário produzir fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade controlada. Essas características promovem confiabilidade ao medicamento (RDC nº 48, 2004). Pode-se afirmar também que apesar do vasto uso desses medicamentos em todo o mundo, poucos foram até o momento estudados cientificamente para comprovação de sua eficácia clínica e para avaliação de sua segurança (MAHADY, 2001).

A partir da publicação da Portaria nº 06 de 31.01.95, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS), iniciou-se um processo de organização do mercado de fitoterápicos no país, com a exigência de comprovação científica, sobre a biossegurança e bioeficiência terapêutica do produto fitoterápico, além do estabelecimento de prazos para a revalidação de registros desses produtos. Em 23.12.98, foi publicado no Diário Oficial da União a Portaria SVS nº 1.029 de 21.12.98, propondo a criação de um registro simplificado. Esse procedimento de registro cria a categoria de Produtos Fitoterápicos Tradicionais, definido como o medicamento elaborado a partir de plantas medicinais de uso baseado na tradição popular e comprovado por décadas. Uma comissão nomeada pela ANVISA elaborou uma lista dos Fitoterápicos Tradicionais, considerando as características regionais e o conhecimento atual (SILVA *et al.*, 2002). Foram também elaborados dados referentes à realização, pelo menos, da Fase II dos ensaios clínicos, conforme normas preconizadas pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) e trabalhos científicos e evidências de outros, que comprovam a segurança e a eficácia (Tabela 1) (RDC nº 17, 2000).

Tabela 1. Lista de espécies cujos efeitos terapêuticos foram comprovados cientificamente (Fitoterápicos Tradicionais) Resolução – n.º 17/MS – 24/02/2000.

N.º	Nome científico	Nome popular	Indicação terapêutica
01	<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofra	Colerético, colagogo
02	<i>Allium sativum</i> L.	Alho	Coadjuvante no tratamento de hiperlipidemia e hipertensão arterial leve; prevenção da arterosclerose
03	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.fi.	Babosa	Tratamento de queimaduras térmicas (1º e 2º graus) e de radiação
04	<i>Peumus boldus</i> Molina	Boldo	Colerético, colagogo
05	<i>Calendula officinalis</i> L.	Calêndula	Cicatrizante, anti-inflamatório e antisséptico
06	<i>Matricaria recutita</i> L.	Camomila	Antiespasmódico, anti-inflamatório
07	<i>Symphytum officinale</i> L.	Confrei	Cicatrizante
08	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Erva-doce	Antiespasmódico, carminativo e expectorante
09	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Gengibre	Profilaxia de náuseas causadas pelo movimento (cinetose), e pós-cirúrgicas
10	<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã-pimenta	Carminativo, expectorante
11	<i>Melissa officinalis</i> L.	Melissa	Carminativa, antiespasmódico, sedativo
12	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Maracujá	Sedativo
13	<i>Senna alexandrina</i> Mill	Sena	Laxante suave

Hoje no Brasil para o registro de um medicamento fitoterápico novo, medicamento cuja eficácia, segurança e qualidade, sejam comprovados cientificamente junto ao órgão federal competente, podendo servir de referência para registro de similares (Resolução – RDC N^o. 48, 18/03/2004 – ANVISA); faz-se necessário a apresentação de relatórios técnicos que contenham informações diversas a respeito do produto.

A RDC N^o. 48 (2004), que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, foi publicada no Diário Oficial da União, Poder Executivo, em 18 de março de 2004, emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, revogando as resoluções RDC n^o 17, de 25 de fevereiro de 2000 e a RDC n^o 134, de 28 de maio de 2003, art. 18, e é atualmente aquela que regulamenta e normaliza o registro de medicamentos fitoterápicos. Nela estão citados todos os documentos e relatórios necessários para o registro. Entre eles, exige-se relatório com informações referente a análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie visando estabelecer parâmetros de controle da qualidade para produtos finais.

O controle de qualidade, a padronização e a estabilidade dos medicamentos fitoterápicos são exigidos pela legislação vigente no país e constituem uma tarefa bastante complexa, principalmente em nossa região, sendo considerados um dos gargalos para os empresários do setor, que necessitam a cada dia de mais conhecimentos a respeito de plantas medicinais para viabilizar o desenvolvimento de seus produtos. Em função dos avanços crescentes alcançados nos métodos analíticos de alta resolução, hoje já é possível estabelecer critérios para padronizar

e garantir um controle de qualidade satisfatório. Essas técnicas permitem o isolamento e a identificação de constituintes químicos presentes em baixas concentrações nas plantas (FILHO & YUNES, 1997).

São várias as mudanças que vem ocorrendo na Legislação Brasileira no que se refere às plantas medicinais e aos produtos originados das mesmas. Existe um esforço governamental que está sendo realizado para a regulamentação do tema e reduzir os riscos envolvidos no processo de comercialização de produtos originados de plantas medicinais no país. Como exemplo de outras experiências que foram importantes para o desenvolvimento da pesquisa e do controle de fitoterápicos no país, podem ser citadas duas iniciativas (SILVA *et al.*, 2002).

Primeiro o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais (PPPM), estabelecido em 1983, pela Central de Medicamentos (CEME), órgão do Ministério da Saúde criado pelo Decreto n.º 68.806, de 25 de junho de 1971, responsável pela distribuição de remédios. Esse programa foi criado com o objetivo de promover a pesquisa científica das propriedades terapêuticas potenciais das espécies vegetais utilizadas pela população, visando o futuro desenvolvimento de medicamentos ou preparações que sirvam como suporte para o estabelecimento de uma terapia alternativa. Infelizmente a CEME foi extinta em 1997 e sem dúvida representou uma perda para o tema, visto que várias espécies nativas foram selecionadas para o trabalho, e não se pode deixar de reconhecer que o programa deixou sua parcela de contribuição especialmente na formação de recursos humanos (SILVA *et al.*, 2002).

Outra importante iniciativa foi a publicação do Manual de Boas Práticas para Fabricação de Produtos Farmacêuticos pela Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde em 1994. Esse documento regulamenta de forma bem clara as condições adequadas para a produção de produtos farmacêuticos, incluído fitoterápicos, com segurança, qualidade e eficácia comprovada (SILVA *et al.*, 2002).

O governo brasileiro tem recentemente estimulado os chamados arranjos produtivos locais e projetos instituídos como iniciativas numa dada região para fomentar uma determinada atividade econômica com base científica e tecnológica. No Estado do Amazonas, um dos arranjos produtivos voltou-se para a questão dos fitoterápicos e iniciou com a escolha de algumas plantas amazônicas prioritárias para servir de insumos de fitoterápicos e fitocosméticos já efetivamente comercializadas no Brasil e no exterior. De algumas, já se conhece de forma isolada informações nos campos de fitoquímica, estudos farmacológicos, inventário florísticos, estudos agrônômicos, manejo, mercado ou comércio. De outras, somente se dispõe de conhecimentos da medicina tradicional, amplamente aplicados na região, cuja eficácia tem sido constatada em relatos populares. Conforme o relatório do Projeto de Plataformas Tecnológicas para a Amazônia Ocidental do Estado do Amazonas de 2001, referente ao grupo nomeado como grupo 4, da Reunião Técnica da Plataforma do Arranjo Produtivo de Fitoterápicos e Cosméticos, coordenado pelo farmacêutico Evandro Silva, professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e também micro empresário do setor, muitos problemas foram citados pelos participantes, considerados gargalos para o setor produtivo, e entre eles incluídos o controle de qualidade dos produtos e a padronização de princípios ativos ou marcadores das plantas utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies com potencial para fitoterápicos ou para fitocosméticos selecionadas pelo grupo de trabalho da Plataforma do Arranjo Produtivo de Fitoterápicos e Fitocosméticos (SUFRAMA).

Nome popular	Nome científico
Andiroba	<i>Carapa guianensis</i> Aublet
Artemísia	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.
Breu-branco	<i>Protium heptaphyllum</i> March.
Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i> L.
Crajiru	<i>Arrabidaea chica</i> Verlot.
Chichuá	<i>Maytenus guianensis</i> Klot.
Cipó-alho	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A. Gentry.
Cipó-cravo	<i>Tynnanthus fasciculatus</i> Miers
Copaíba	<i>Copaifera multijuga</i> Hayne.
Cubiu	<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal.
Cumarú	<i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd.
Erva-de-jararaca	<i>Dracontium lorentense</i> Engl.
Fava-bolacha	<i>Vatairea guianensis</i> Aubl.
Guaraná	<i>Paullinia cupana sorbilis</i> (Kunth) Ducke
Ipê-roxo	<i>Tabebuia impetiginosa</i> Mart.
Japécanga	<i>Smilax regelii</i> Killip & Morton
Jatobá	<i>Hymenaea courbaril</i> L.
Muirapuama	<i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth
Mulateiro	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook
Murumuru	<i>Astrocaryum murumuru</i> Mart.
Patauá	<i>Oenocarpus bataua</i> Mart.
Pedra-ume-cáa	<i>Myrcia citrifolia</i> (Aubl.) Urb.
Sangue-de-dragão	<i>Croton lechleri</i> Muell. Arg.
Unha-de-gato	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC
Uxi-amarelo	<i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatr.

O incentivo para pesquisas, tanto na área farmacológica, fitoquímica, médica e nutricional, como na área agrônômica e botânica, como também o empenho de universidades, institutos de pesquisas e pesquisadores, é de fundamental importância para a produção adequada de fitoterápicos. Tais fatores podem gerar subsídios para o registro dos mesmos, dessa forma contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos, com menores custos, com competitividade no mercado, abrindo novas alternativas de tratamento para a sociedade, em geral, assim como também abrindo novos horizontes para o desenvolvimento regional.

1.3. *Ambrosia artemisiifolia* L

Dentre as mais variadas plantas de interesse econômico e de potencial elevado de seu aproveitamento para o desenvolvimento de nossa região, está a espécie anual ***Ambrosia artemisiifolia* L**. Pertence à família Asteraceae, cresce em clima quente e úmido, considerada erva daninha, ocorrendo em várias regiões do planeta inclusive em toda a região amazônica de forma abundante em áreas de terrenos argilosos e alagadiços, margens de rios e igarapés de águas barrentas onde ocupa longas extensões. São citados como nomes vulgares os seguintes: catinga-de-bode, artemísia, ambrosia-americana, arquemijo, losna-do-campo, carpineira, cravo-de-roça, artemija, cravorana, flor-de-diana, erva-de-são-joão, artemigem, artemisia verdadeira (português), ajenjo, absintio, incieso (espanhol) (REVILLA, 2000; VIEIRA, 1992).

1.3.1 Aspectos botânicos

É classificada taxonomicamente como pertencente ao Reino Vegetal, Divisão Magnoliophyta, da Classe Magnoliopsida, Sub-classe Asteridae, Ordem Asterales,

Família Asteraceae, Sub-família Asteroideae, Tribo Heliantheae, Gênero *Ambrosia*, Espécie *Ambrosia artemisiifolia* L (HEYWOOD, 1993). Trata-se de uma planta com média de um metro de altura, espécie herbácea e subarborescente, anual, muito ramificada, caule mais ou menos piloso; folhas esbranquiçadas sedosas, divididas, pecioladas, aromáticas; flores numerosas, amareladas alternas, deltóideas, membranáceas, verdes, pilosas ou quase sem pêlos; racemos cheios de panículas, com raquis pilosos; capítulos masculinos dobrados, curtamente pedicelados, sem brácteas; capítulos femininos sésseis, aglomerados nas axilas das folhas simples, reduzidas, lanceoladas ou apoiadas em lineares (Figura 5) (REVILLA, 2000). Possui cheiro forte e penetrante, os talos apresentam tons purpúreos, as folhas desabrocham-se em capítulos densamente agrupados. As raízes têm sabor amargo enquanto que o das flores é adocicado (VIEIRA, 1992).



Folhas



Inflorescência



Flores



Tronco e galhos

Figura 5. Destaques morfológicos de *A. artemisiifolia* L

Uma revisão do gênero *Ambrosia* realizada na África e áreas próximas, cobrindo todas as características morfológicas principais, revelou que não há nenhuma característica diagnóstica qualitativa para distinguir *A. maritima* e *A. artemisiifolia* L. (GEERTS *et al.*, 1991).

Há uma grande variedade de diferentes espécies de *Ambrosia* que ocorrem no continente americano, o que sugere que também ocorra essa variedade em outras localidades, mas distinguir essas diferenças não é uma tarefa fácil. Sildhon e Geerts (1983, 1984) realizaram uma comparação de espécies, que recebem o nome *ambrosia*, do Egito e Senegal e consideraram-nas como sendo a mesma espécie. Um outro conceito é apontado por Ducan (1985), citando Dr. G. Wickens (Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.) que considera a *A. senegalensis* como sendo uma espécie intermediária entre a *A. maritima* e *A. artemisiifolia*. W. W. Payne (citado por Mabry, 1970) considera *A. maritima* uma subespécie de *A. artemisiifolia* e a *A. senegalensis* como uma espécie separada. Estudos que buscam esclarecer essa variabilidade, pela análise de lactonas sesquiterpênicas (LS) podem ajudar na identificação das espécies de regiões diferentes. As variações importantes em LS em nível de indivíduo e populacional foram observadas também para *A. maritima* de diferentes países africanos (GEERTS *et al.*, 1991).

1.3.2 Aspectos agronômicos

Segundo REVILLA (2000), *A. artemisiifolia* é uma planta que não necessita de muitos cuidados em seu método de cultivo, pois é uma planta agressiva e colonizadora, considerada em outros países uma praga, com propriedades

alelopáticas. Pode ser plantada em qualquer época do ano em terra firme, várzeas somente na vazante, recomendando-se um distanciamento de 20x25 cm e sua propagação é feita mediante sementes e galhos. Sofre ameaças naturais como de fungos, quando a planta encontra-se no seu período jovem e de gafanhotos, quando em fase de mudas. A coleta efetua-se pelo corte dos ramos mais desenvolvidos para possibilitar novas ramificações e rebrotas, prolongando dessa forma o período de colheita. Em terra firme, as plantas estão em condições de ser coletadas 60 a 70 dias após o plantio e pode ser colhida o ano todo. O material vegetal colhido deve ser seco à sombra para ter uma melhor conservação e uma vez desidratado, pode ser conservado por 3 a 6 meses. Considerada uma planta com alto potencial extrativista, pois ocorre naturalmente em grande quantidades, ficando os indivíduos próximos um do outro, proporcionando uma alta produtividade. A planta é comercializada no varejo em mercados e feiras da cidade e, em menor escala, no atacado para pequenas empresas produtoras de fitoterápicos locais, regionais e nacionais. A planta é comercializada de várias formas, a planta viva, ramos frescos, caules e folhas desidratadas e em pó e em outras formas já com valor agregado que são em forma de cápsulas, tinturas, xaropes, incenso e velas. A produção pode atingir 2 a 3 ton/ha/ano, produto de duas ou mais colheitas peso seco. É relatado um ganho líquido anual de aproximadamente de R\$ 3.500,00 a R\$ 5.500,00/ ha /ano.

1.3.3 Usos populares

Muitos são os usos na medicina tradicional, entre eles tem-se a utilização no tratamento de anemia, dor de estômago, diarréia, enterite, epilepsia, flatulência, gastrite, hidropisia, icterícia, verminoses, menstruação deficiente, nervosismo, nevralgia, reumatismo, malária, febres e leucorréia (VIEIRA, 1991; SILVA *et al.*,

1977). Normalmente toda a planta é usada como medicinal. Flores e folhas são aromáticas, tidas como tônicas, febrífugas, utilizadas contra verminoses e seus vapores como provocadores da menstruação, etc (MORS *et al.*, 2000).

Na cidade de Salvador, onde diversas espécies botânicas são usadas como medicamentos na medicina popular, comercializa-se *A. artemisiifolia*, conhecida popularmente na região como “o verdadeiro artemijo”, e recomendada para todas as doenças estomacais (DAVID *et al.*, 1999).

O óleo essencial deve ser utilizado com cautela, quando administrado por via oral, altas doses provocam intoxicação, via sistema nervoso, ocasionando tremores, tonturas, dores-de-cabeça e perda de memória. Não devendo ser usado em casos de gravidez ou por mães que se encontram no período de amamentação. É incompatível com ferro, zinco e acetato de chumbo (REVILLA, 2000).

O chá de folhas, obtido por meio de infusão (5%) e administrado 3 vezes ao dia, é largamente utilizado na medicina tradicional, como digestivo estomacal e no tratamento de inflamações estomacais. É também indicado para infecção hepática com falta de apetite, nas infecções nos olhos é utilizado infuso ou chá em compressas ou como colírio, no alívio de cólicas durante o período de menstruação, em infusão das folhas (5%), três vezes ao dia. O chá de folhas e caules possui atividade abortiva quando administrado nos os primeiros meses de gravidez. São relatados usos também como repelente para pulgas, traças e carapanãs, dito como aliado dos pescadores que utilizam como repelente esfregando as folhas no corpo (REVILLA, 2000).

Relata-se que as folhas de *A. artemisiifolia* são utilizadas como remédio na medicina popular mexicana como uma droga antiinflamatória. Informações obtidas de comunidades locais no Estado de Vera Cruz, mostrou que a população local usa o suco das folhas para tratar estados diferentes de artrite e reumatismo seguindo administrações externas e sistêmicas. O extrato etanólico forneceu lactonas sesquiterpênicas e apresentou atividades antiinflamatória e antiartrítica quando testado em vários modelos de inflamação, em roedores (PÉREZ, 1996).

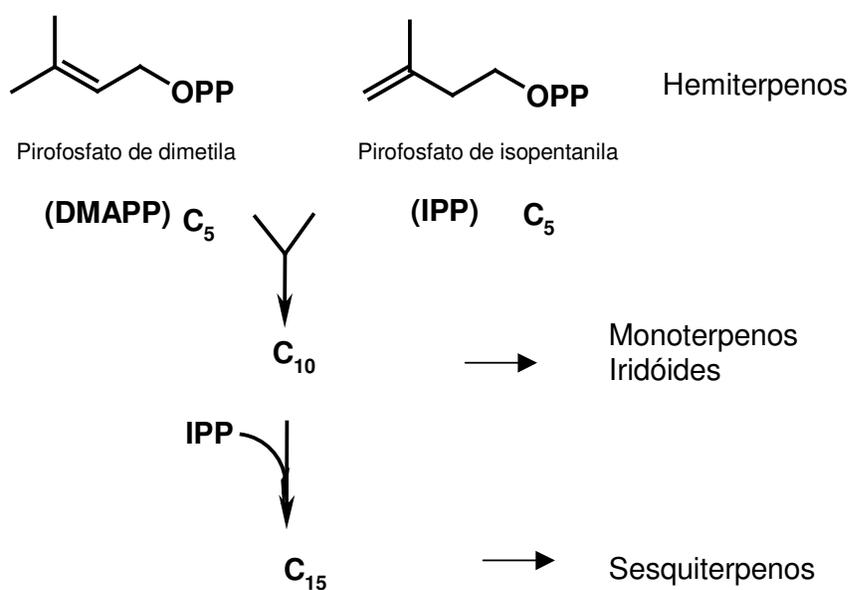
1.3.4 Aspectos químicos

Freqüentemente ocorrem nas espécies pertencentes à família Asteraceae lactonas sesquiterpênicas (LS), de onde entre 25 a 80% dessas são espécies notavelmente dos gêneros *Ambrosia* (Figura 6) e *Artemisia*. Existem vários estudos fitoquímicos envolvendo a espécie *Ambrosia artemisiifolia* L, em sua maioria descrevendo o isolamento de lactonas sesquiterpênicas (Figura 10).

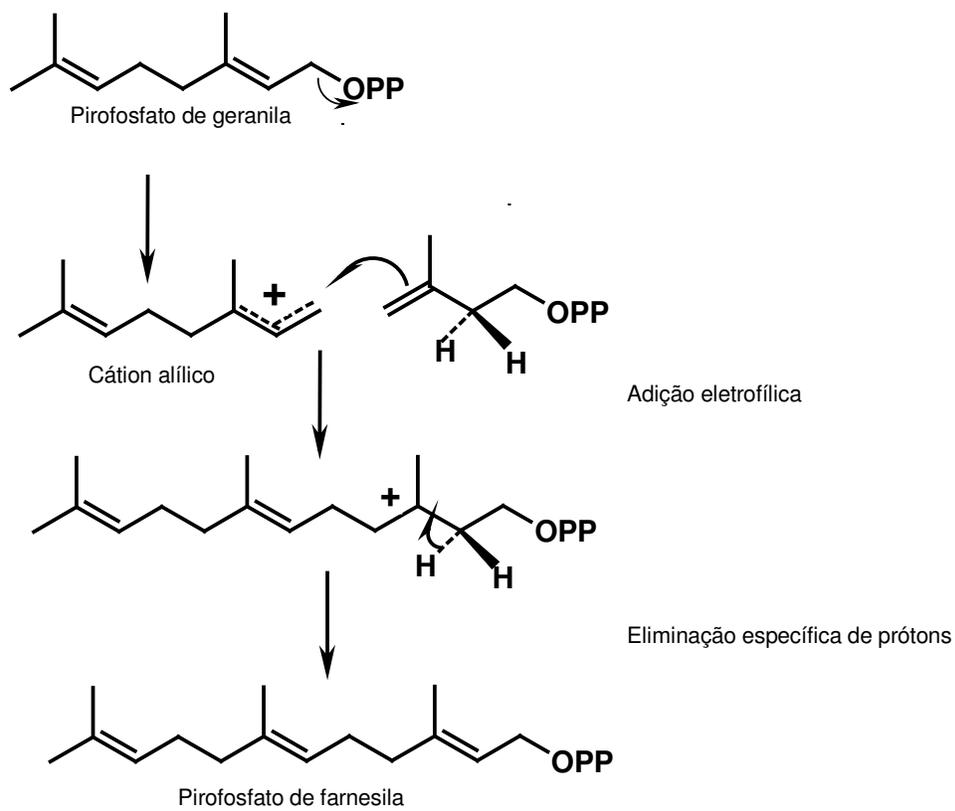
1.3.4.1 Lactonas sesquiterpênicas

Lactonas sesquiterpênicas é uma subclasse de metabólitos secundários derivados biogeneticamente de esqueletos carbônicos de sesquiterpenos, que são terpenóides com 15 carbonos, em geral, têm como precursor fundamental o pirofosfato de farnesila (FPP), onde ocorre uma extensão da cadeia por adição de uma unidade C5 de pirofosfato de isopropila (IPP), catalisada por uma feniltransferase. Por causa do alongamento da cadeia e da presença de ligações duplas há um aumento da possibilidade da ciclização desses, originando estruturas mono-, bi-, tricíclicas, características das lactonas sesquiterpênicas (esquemas 1, 2

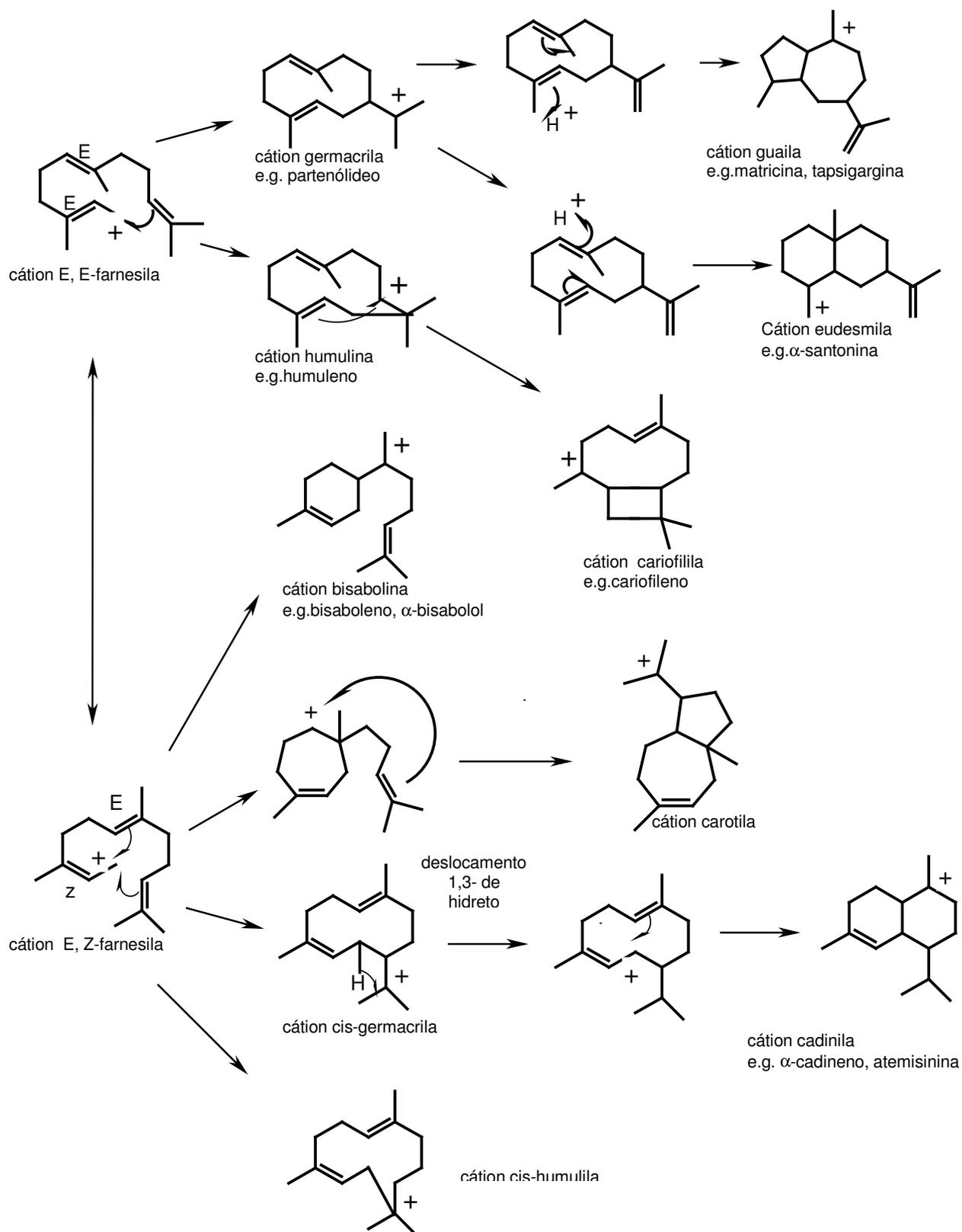
e 3). Geralmente o anel da lactona é derivado da oxidação de um dos metila do grupo isopropila, como demonstrado no esquema 4 (BICCHI & RUBIOLLO, 1996; DEWICK, 2002).



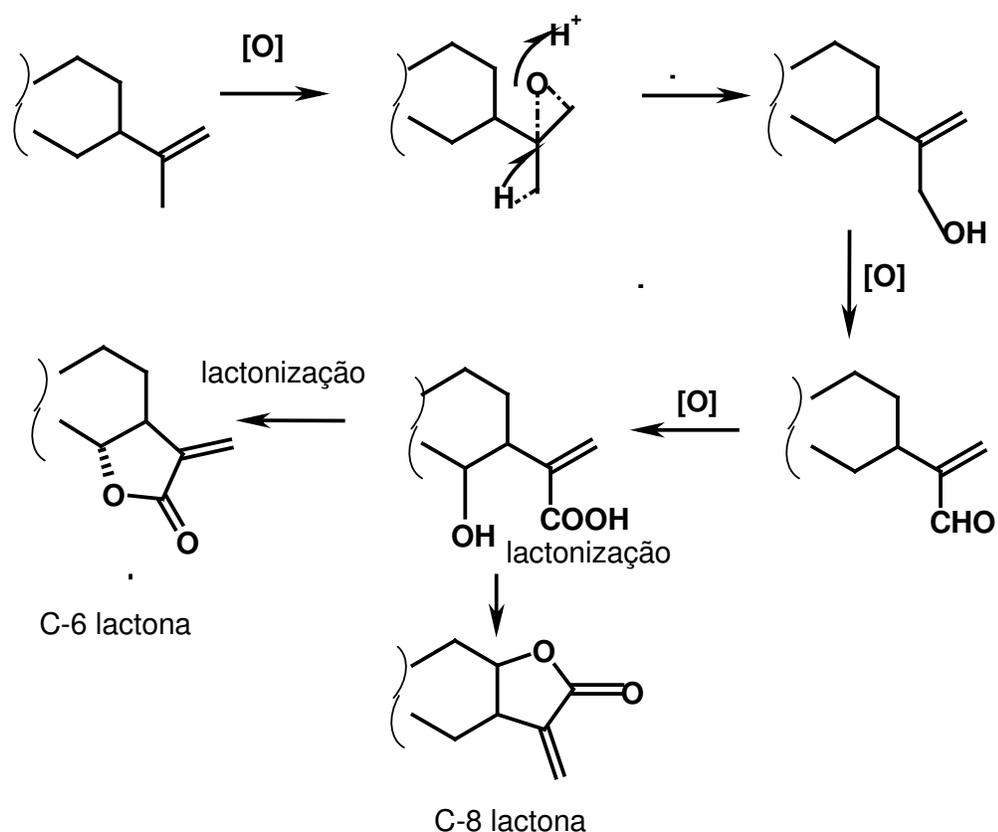
Esquema 1. Formação de sesquiterpenos (DEWICK, 2002)



Esquema 2. Formação do precursor dos sesquiterpenos (DEWICK, 2002)



Esquema 3. Seleção de reações padrões de carbocations que explicam a maioria dos esqueletos dos sesquiterpenos (DEWICK, 2002)



Esquema 4. Formação do anel das lactonas sesquiterpênicas (UGAZ, 1994).

Normalmente as LS são classificados com base em seus esqueletos como germacranolídeos, guaianolídeos, eudesmanolídeos, pseudoguaianolídeos, ambrosanolídeos, entre outros (Figura 7).

Constituem um grupo numérico muito importante de substâncias, como já mencionado, geralmente encontrados em Asteraceae, notavelmente nos gêneros de *Artemisia* e *Ambrosia* (UGAZ, 1994), mas também em Umbelíferae, Magnoliaceae e Hepaticae (BICCHI & RUBIOLLO, 1996; BRUNETON, 1991).

Apenas do gênero *Ambrosia*, podemos citar várias lactonas sesquiterpênicas isoladas como a chamissonina (6), artemissifolina (7), partenólídeo (8), isoalantolactona (9), confertiflorina (10), desacetilconfertiflorina (11), ambrosina (12), ambrosiolina (13), cumanina (14), entre outras (HIGO *et al.*, 1970; PORTER & MABRY, 1968; NATHAN & ROMO, 1965; SLACANIN *et al.*, 1988; HERZ *et al.*, 1968).

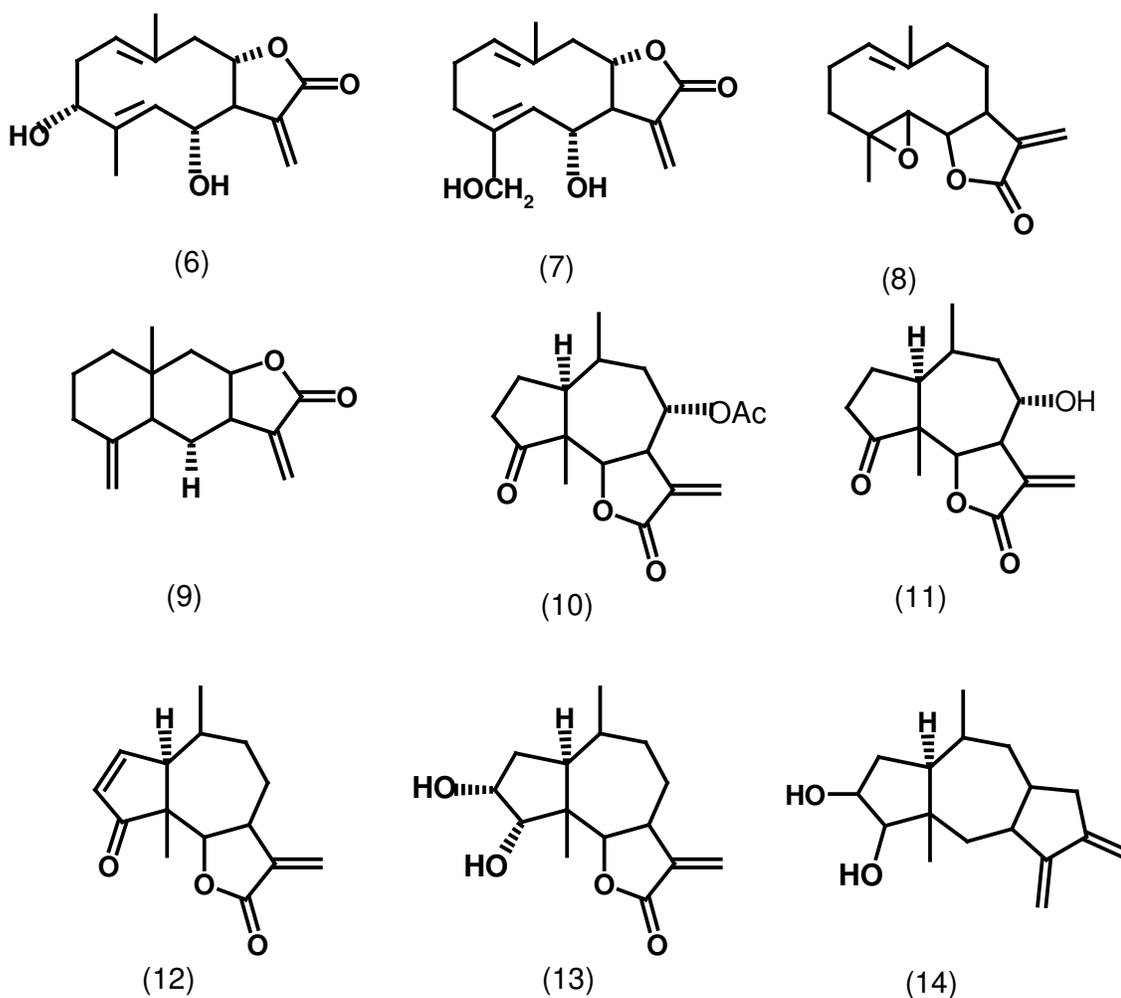


Figura 6. Exemplos de LS isoladas do gênero *Ambrosia*

Por sua ocorrência restrita, as lactonas sesquiterpênicas são utilizadas em estudos quimiotaxonômicos e são base para estudos de caracterização de linhagens sucessivas de Asteraceae, utilizando parâmetros de evolução de tribos em relação ao estágio de oxidação (EA_O) e especialização do esqueleto (EAs). A validade desses estudos podem ser avaliados pela análise baseada em aproximadamente 750 ocorrências de lactonas sesquiterpênicas publicadas em cerca de 150 trabalhos realizados com espécies de Asteraceae (EMERENCIANO *et al.*, 1986; COSTA *et al.*, 2005).

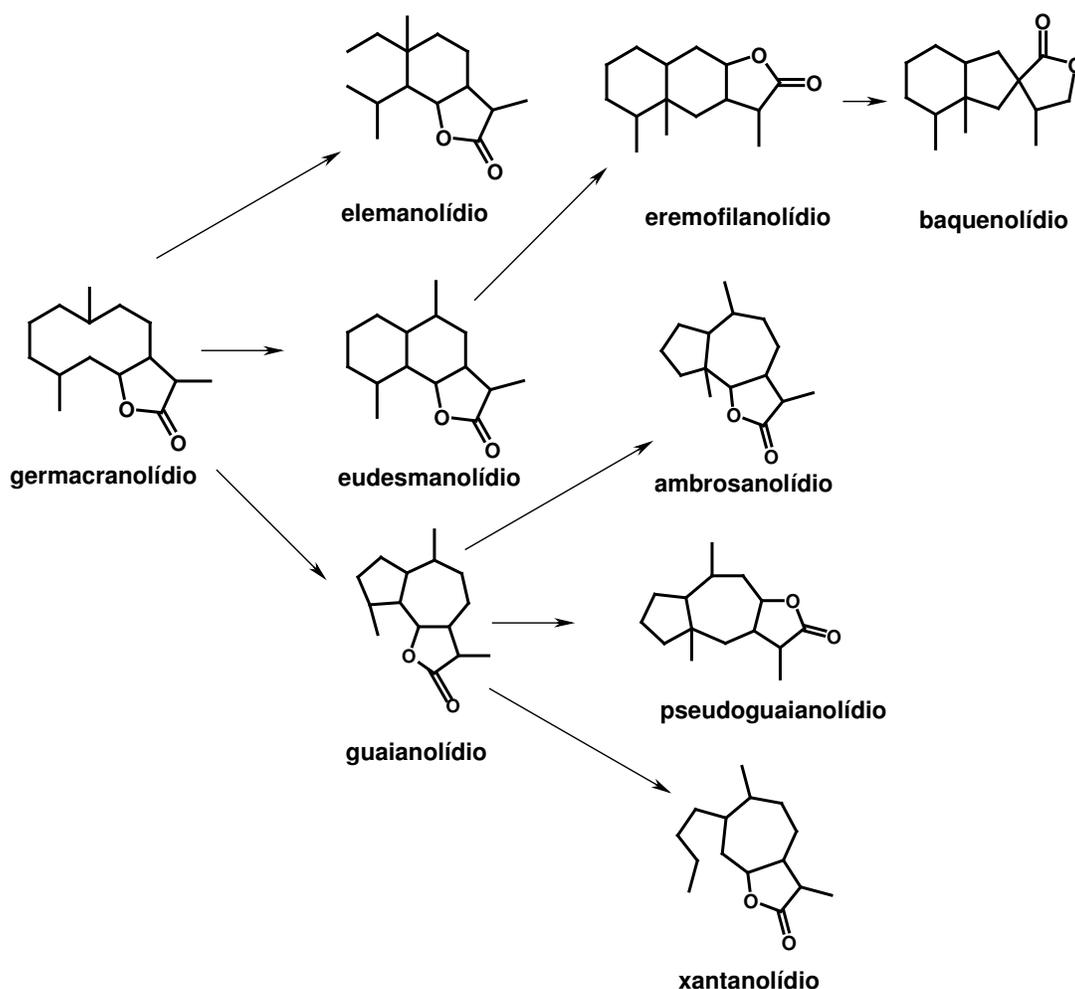


Figura 7. Exemplos de esqueletos de lactonas sesquiterpênicas (BRUNETON, 1991).

A maior parte das lactonas sesquiterpênicas são substâncias termolábeis e estão presentes em concentrações traços na planta. Geralmente possuem massa molecular que varia de 230 a 500 g/mol. Essas características fazem da técnica de cromatografia de alta eficiência (CLAE), entre as existentes hoje, como a técnica analítica de escolha para sua análise de LS em extratos crus de planta. A CLAE tem sido a técnica mais aplicada na análise comparativa e quantitativa desses metabólitos, onde são citadas cerca de 3000 lactonas sesquiterpênicas já isoladas utilizando CLAE nas duas últimas décadas. A automatização apresentada pela técnica proporcionou grande evolução no número de LS hoje já conhecidas, por apresentar alta resolução, mesmo misturas complexas de LS já foram analisadas com sucesso, a técnica também proporciona trabalhar com quantidades muito pequenas de material, além de permitir a análise de amostras em fase líquida, fator importante em análise de LS (MERFORT, 2002; BICCHI & RUBIOLO, 1996; SPRING, 1989; ZHOU *et al.*, 1999; SPRING *et al.*, 2000; MARCHAND *et al.*, 1983).

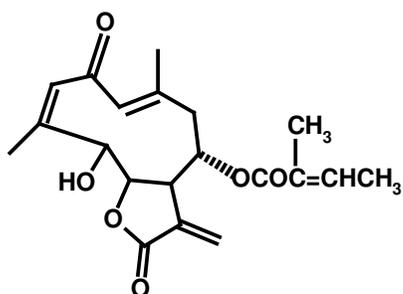
1.3.3.2 Atividade biológica

As lactonas sesquiterpênicas são consideradas um grupo de substâncias de muito interesse por causa de suas diversas atividades biológicas e terapêuticas, incluindo entre elas atividades antiinflamatórias, antitumoral, antimicrobiana, antihelmínticas, antiulcerogênicas, moluscicida e até no tratamento do combate à desnutrição (PÉREZ, 1996; DAVID *et al.*, 1999; SLACANIN *et al.*, 1988; GIORDANO *et al.*, 1992; PICMAN *et al.*, 1985; AHMED & KHATER, 2000). As moléculas estudadas que demonstraram atividades biológicas, possuem em geral, grupos

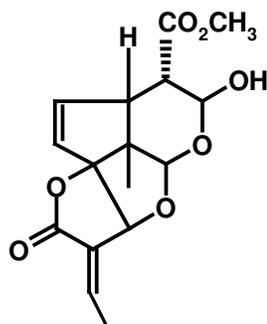
funcionais reativos como epóxidos, ésteres ou cetonas α , β -insaturadas (Figura 8) (MERFORT, 2002; BRUNETON, 1991).

Estudos realizados com a espécie *A. artemisiifolia* descrevem atividades como antimalárica e potencial inibitório do crescimento de células cancerígenas de paulitina e a isopaulitina, lactonas sesquiterpênicas isoladas na espécie, onde os graus de atividades significativos foram correlacionados com grupos, α , β insaturada- γ -lactona e α -exo-metileno presentes nas moléculas (DAVID *et al.*, 1999). Também da espécie são descritos estudos que comprovam propriedades anti-artrite e antiinflamatórias significativas do extrato etanólico da mesma, confirmando os usos da medicina popular para a planta (PÉREZ, 1996).

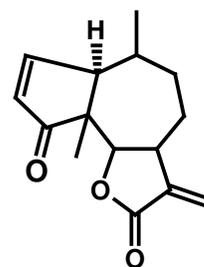
citotóxico e/ou antitumoral



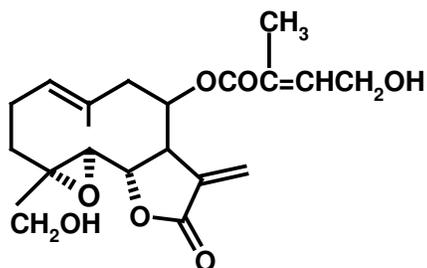
molefantinina
Elephantus mollis



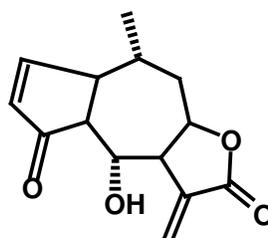
allamandina
Allamanda cathartica



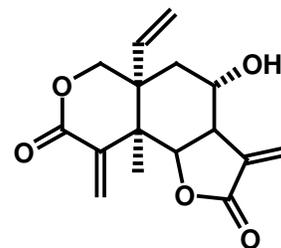
ambrosina
Ambrosia cumanensis



eupahisopina
Eupatorium hyssopifolium

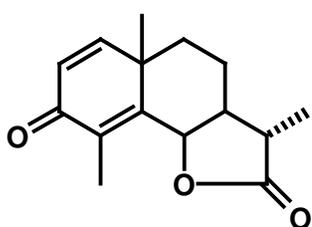


helenalina
Helenium autumnale

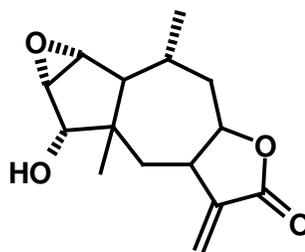


Vernolepina
vernonia hymenolepsis

Analésico

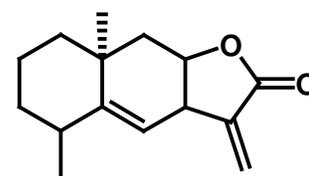


santonina



amatolina

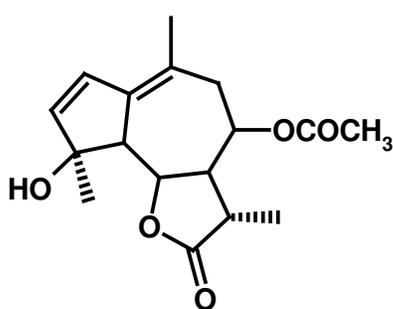
Inibidor do crescimento



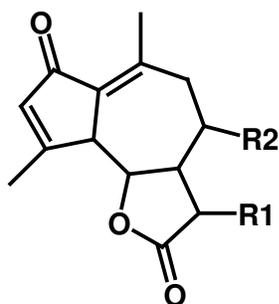
alantolactona
(Inula sp)

Figura 8. Exemplos de lactonas sesquiterpênicas biologicamente ativas (UGAZ, 1994).

Em relação a atividade antiulcerogênica, muitos são os estudos envolvendo outras espécies de Asteraceae com atividade antiulcerogênica comprovada (Tabela 3). Esses demonstraram que essa atividade está relacionada com a presença de lactonas sesquiterpênicas, como é o caso da matricina isolada de *Matricaria recutita* e achilina e leucodina de *Achilea millefolium* (FIGURA 9) (WAGNER, 1999; WAGNER e WIESENAUER, 1995).



**matricina
(proazuleno)**



leucodina: R1 = CH₃ α ; R2 = H β
matricarina: R1 = CH₃ α ; R2 = OCOCH₃ β
achilina: R1 = CH₃ α ; R2 = H β

Figura 9. Exemplos de lactonas sesquiterpênicas com atividade antiulcerogênica comprovada.

Em estudos de avaliação da atividade antiulcerogênica de diferentes lactonas sesquiterpênicas, os resultados demonstraram a presença do grupo α -metileno- γ -lactona como sendo a exigência principal para a atividade antiulcerogênica observada. Esse grupo está presente na desidroleucodina (Tabela 3 e 4), que possui esqueleto do tipo guaianolídeo, que no estudo impediu significativamente a formação de lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Todos os

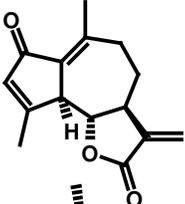
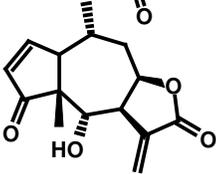
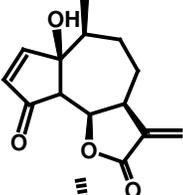
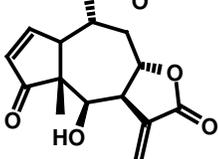
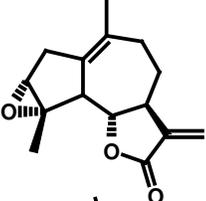
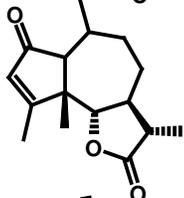
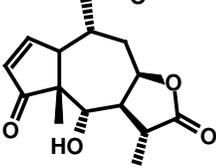
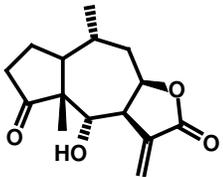
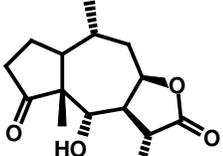
pseudoguainolídeos estudados que demonstraram atividade antiulcerogênica possuem o anel da ciclopentanona α,β -insaturado e o grupo funcional α - metileno- γ -lactona. Apenas a 9-0-desacetilpatulina-2-0-angelata possui exclusivamente em sua molécula o grupo α - metileno- γ -lactona (GIORDANO *et al.*, 1990).

Posteriormente estudos de continuidade da avaliação da atividade antiulcerogênica de lactonas sesquiterpênicas, demonstraram que a helenina e a desidroleucodina impediam significativamente a formação das lesões gástricas induzidas por vários agentes agressores da mucosa gástrica. No mesmo estudo, a atividade citoprotetora foi demonstrada também em outras lactonas sesquiterpênicas que têm uma característica em comum, um grupo carbonílico α, β -insaturado em sua estrutura, correlacionando a presença desse grupo como uma exigência estrutural essencial para esta atividade (RODRÍGUEZ *et al.*, 1996). Estão apresentadas na Tabela 4 exemplos de lactonas sesquiterpênicas que apresentam atividades antiulcerogênicas e que possuem em sua estrutura o grupo carbonílico α, β -insaturado.

Tabela 3. Exemplos de estudos de atividade antiulcerogênica de LS

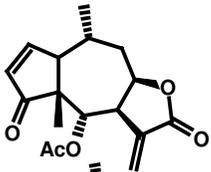
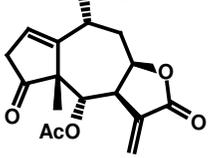
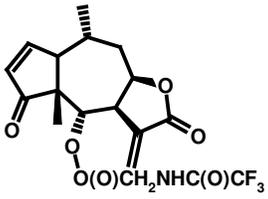
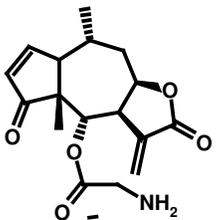
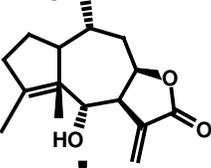
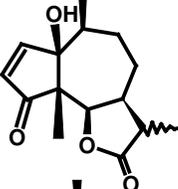
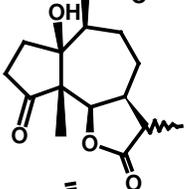
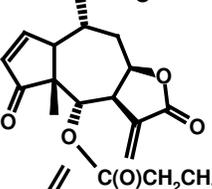
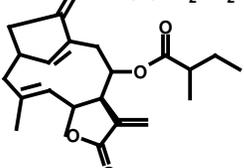
Nome da LS	Espécie estudada	Atividade biológica	Referência
- Clorjanerina - 13-acetil solstitialina - solstitialina	<i>Centaurea solstitialis</i> L. ssp	Antiulcerogênica	YESILADA <i>et al.</i> , 2004
- desidroleucodina	<i>Artemisia douglasiana</i>	Inibição significativa de lesões gástricas induzidas por EtOH, HCl 0,6 N, NaOH 0,2 N e outros agentes indutores de úlceras gástricas. Efeito citoprotetor Atividade citoprotetora gástrica, inibição de NO <i>in vitro</i> . e inibição de PGE <i>in vitro</i> .	GIORDANO <i>et al.</i> , 1990; GIORDANO <i>et al.</i> , 1994; GUARDIA, <i>et al.</i> , 1994 RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 1996 MARIA, <i>et al.</i> , 1998
- desacetoximatricarina	<i>Artemisia mendozonia</i> <i>var. paramillonensis</i>	Efeito citoprotetor	GIORDANO <i>et al.</i> , 1994;
- lutartina	<i>Stevia yacomensis</i> <i>var. subeglandulosa</i>	Efeito citoprotetor	
- 8-angeloiloxi-3-hidroxi guaia 3(15), 10(14), 11(13)-trieno-6,12-olide	<i>Veronia nitidula</i>	Efeito citoprotetor	
- himenina		Efeito citoprotetor	
- mexicanina I e helenalina	<i>Parthenium bysterophorus</i>	Efeito citoprotetor	
- 9-O-desacetilpatulina-2-O-angelato	<i>Gaillardia megapotamica</i> <i>var. scabiosoides</i>	Efeito citoprotetor	
	<i>Helenium alternifolius</i>		
- cumanina	<i>Ambrosia psilostachya</i>	Potente inibição da produção de NO com uma baixa citotoxicidade	LASTRA <i>et al.</i> , 2004
- partenolídeo	<i>Tanacetum parthenium</i>	Inibição <i>in vitro</i> dos efeitos da serotonina	BÉJAR, 1996

Tabela 4. Efeito Citoprotetor de lactonas sesquiterpênicas na dose de 40 mg/kg

Nome da substância	estrutura	Efeito citoprotetor
desidroleucodina		0,25 ±0,045
helenalina		0,33 ±0,059
himentina		0,25 ±0,035
mexicanina I		0,25 ±0,05
ludartina		0,5 ±0,079
11, 13-dihidro-desidroleucodina		3,5 ±0,308
11, 13-dihidrohelenalina		0,66 ±0,055
2,3-dihidrohelenalina		1,00 ±0,158
2,3,11,13--tetrahidrohelenalina		3,70 ±0,21

Cada ponto de dados representa a média ± desvio padrão p/ um número de 5 ratos (GIORDANO *et al.*,1992)

Tabela 4. Efeito Citoprotetor de lactonas sesquiterpênicas na dose de 40 mg/kg (Cont.)

Nome da substância	estrutura	Efeito citoprotetor
6-acetato helenalina		1,00 ± 0,245
6-acetato mexicanina A		0,90 ± 0,173
6-O-[N-(trifluoroacetila) glicinila helenalina		0,95 ± 0,11
6-O-glicinilahelenalina		0,85 ± 0,11
guaianolídeo		0,70 ± 0,164
11, 13-dehidrohimenina		4,00 ± 0,38
2,3,11,13-tetrahidrohimanina		4,50 ± 0,5
succinato helenalina		1,50 ± 0,35
desacilisodeoxielepantopina 2-metilbutirato		4,00 ± 0,79

Cada ponto de dados representa a média ± desvio padrão p/ um número de 5 ratos (GIORDANO *et al.*,1992)

1.3.5 Aspectos fitoquímicos de *Ambrosia artemisiifolia*

Espécies do gênero *Ambrosia* que ocorrem na América do Norte e México são bastante conhecidas por concentrarem lactonas sesquiterpênicas pertencentes ao grupo dos ambrosanolídeos, seco-ambrosanolídeos e eudesmanolídeos. Em estudos realizados com plantas dessas localidades foi descrita a ocorrência das LS cumanina (14), coronopilina (15), diidroscumanina (16), peruvina (17), artemisiifolina (7) e isabelina (18) bem como derivados da guanidina, agmatina, um flavonóide – isorhamnetina e alguns alcalóides, os quais não foram identificados, na espécie *A. artemisiifolia* coletada na América do Norte (RASZEJA & GILL, 1997).

Existem vários estudos fitoquímicos envolvendo a espécie *A. artemisiifolia* e maior parte desses descrevem o isolamento de lactonas sesquiterpênicas (STEFANOVIC, ALJANCICSOLAJA e MILOSAVIJEVIC, 1986). Foi relatada nessa espécie a primeira ocorrência natural da LS diidroscumanina (16), onde analisando o extrato clorofórmico de folhas secas da espécie, coletada próximo das cachoeiras do Chippawa Falls, Wisconsin, resultou em três substâncias cristalinas, duas dessas idênticas com as já conhecidas lactonas sesquiterpênicas cumanina (14), peruvina (17) e a diidroscumanina (16) (pseudoguaianolídeos), sendo essa última, uma substância que anteriormente só tinha sido identificada como um produto de redução da cumanina (14) (PORTER & MABRY, 1968).

A partir de investigações sistemáticas de gêneros de *Ambrosia* (Asteraceae), em 1969, foi descrito o isolamento e a determinação de estrutura de uma nova lactona sesquiterpênica, de esqueleto germacronolídeo. Analisando o extrato clorofórmico de folhas secas ao ar de *A. artemisiifolia* coletada em Austin, Texas. O extrato forneceu 1,5 % de rendimento de uma substância, a qual foi nomeada de artemisiifolina (7). Também foi isolado como uma substância minoritária a isabelina (11) (PORTER *et al.*, 1969).

Em outro estudo, foram relatados o isolamento de cinco lactonas do extrato clorofórmico obtido da planta inteira, coletada próximo de Pancevo, Iugoslávia, onde quatro das LS foram atribuídas, de acordo com a evidência espectral, como sendo os compostos já conhecidos cumantina (14), o diacetato de cumantina (19), o 4-hydroxi-3-oxo-pseudoguaianolídeo-6, 12 (20) e a psilostachina C (21). A lactona cristalina demonstrou ser uma nova substância, correspondente a fórmula molecular $C_{15}H_{22}O_5$, identificada como 3,4-seco-ambrosanolídeo (22) (STEFANOVIC, 1987).

De um indivíduo coletado na Austrália, em estudo posterior, foi isolada e identificada uma dilactona sesquiterpênica, psilostachina A (23), a qual não foi isolada anteriormente nos trabalhos com indivíduos coletados na América do Norte. Baseados nesses aspectos, que indicavam que a localização geográfica influenciava na presença de diferentes lactonas sesquiterpênicas; pesquisas foram direcionadas para o estudo de lactonas sesquiterpênicas presentes em diferentes espécimens coletadas durante o período de florescência, no jardim de plantas da Academia Médica em Gdansk, Polônia. Os resultados dessa pesquisa descreveram a

presença psilostachina B (24), a qual não foi encontrada na mesma espécie nas plantas coletadas na América do Norte, México e Austrália (RASZEJA & GILL, 1977).

Apesar do grande número de estudos já realizados de *A. artemisiifolia* (HERZ & HOGENAUER, 1961; PORTER & MABRY, 1969; POTER *et al.*, 1970), em 1999 foi descrito o isolamento e purificação de duas lactonas sesquiterpênicas, a paulitina (25) e a isopaulitina (26), de partes aéreas de amostras de *A. artemisiifolia* compradas na cidade de Salvador (BA), até então desconhecidas para a espécie (DAVID *et al.*, 1999).

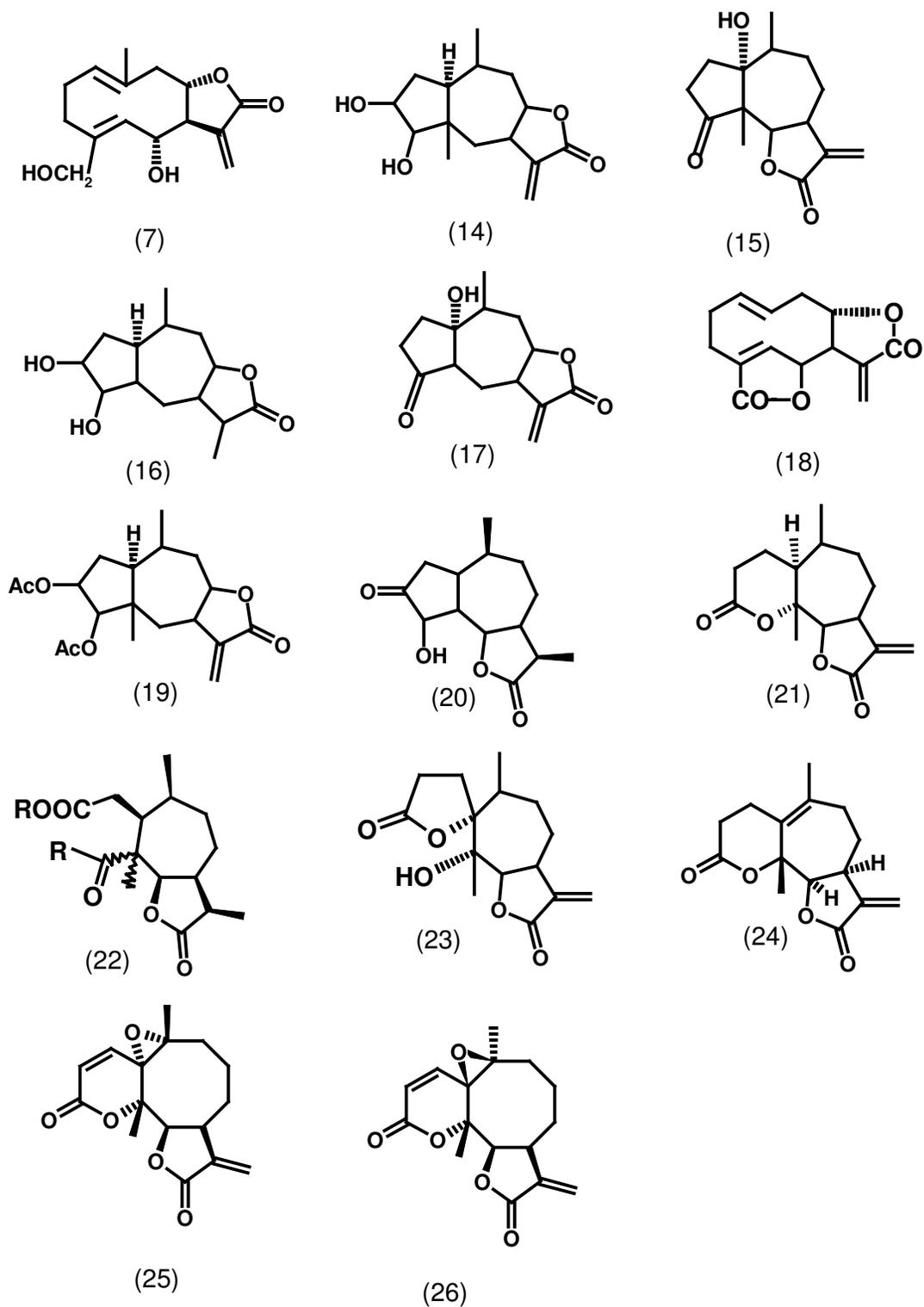


Figura 10. Exemplos de lactonas sesquiterpênicas isoladas de *A. artemisiifolia* (RASZEJA & GILL, 1997; STEFANOVIC, ALJANCICSO LAJA e MILOSAVIJEVIC, 1986; PORTER & MABRY, 1968; PORTER *et al.*, 1969; STEFANOVIC, 1987; DAVID *et al.*, 1999)

2 . OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar marcadores químicos da espécie medicinal *Ambrosia artemisiifolia* L.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar extrato clorofórmico buscando isolar os marcadores químicos de interesse (lactonas sesquiterpênicas), caracterizar as lactonas sesquiterpênicas isoladas das partes aéreas de *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae) e avaliar atividade antiulcerogênica;
- Coletar amostras de *Ambrosia artemisiifolia* L. de localidades diferentes para avaliação da variabilidade química;
- Preparar extrato aquoso buscando simular o chá comumente utilizado na medicina popular e avaliar atividade antiulcerogênica;
- Desenvolver metodologia analítica, baseada em CLAE, para monitoramento dos marcadores químicos, de acordo com as exigências da ANVISA conforme resolução RDC N^o. 48/ 2004.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e métodos

3.1.1. Solventes

Para análise em CCD e CC foram utilizados solventes orgânicos purificados por destilação e quando necessário, secos com sais de sulfato de sódio ou magnésio anidros, depois de destilados.

Para análises em CLAE foram utilizados solventes de grau cromatográfico ultrafiltrados (Merck ou EM Science).

3.1.2. Equipamentos

- Moinho tipo WILLYE, modelo TE – 650, marca TECNAL;
- Balança analítica, modelo E01140, marca OHAUS;
- Balança semi-analítica, modelo BG 2000, marca QUIMIS;
- Estufa de secagem, modelo 315 SE, marca FANEM;
- Placas aquecedoras, modelo 753 A, marca FISATOM;
- Rota evaporador, modelo 802, marca FISATOM;

- Liofilizador, modelo Beta 1-8 K, marca CHRIST;
- Câmera de revelação de CCD com lâmpadas de UV a 254 nm e 366 nm;
- Lavadora ultra-sônica, modelo USC 1400, marca UNIQUE;
- Pipetas automáticas, modelos P100 e P1000, marca Eppendorf;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC-10, marca SHIMADZU, equipado com detector ultravioleta/visível, modelo 10AVP, com duplo canal marca SHIMADZU;
- Cromatógrafo gasoso de alta resolução, modelo HP 6890 Plus, marca HEWLETT-PACHARD, equipado com sistema “dual-column” (coluna polar Innowax –30 m x 0,320 mm e filme de 0,25 µm; colunar apolar HP-5 - 30 m x 0,320 mm e filme de 0,25 µm), detectores de ionização de chama e gás de arraste hidrogênio;
- Cromatógrafo gasoso de alta resolução, modelo CG-2010, acoplado ao Espectrômetro de Massas, modelo GCMS-QP2010, com injetor automático, modelo AOC-20, marca SHIMADZU, coluna BB-5MS (25 m x 0,25 mm), detector quadrupolo e gás de arraste hélio;

3.1.3. Coleta de material

O material vegetal foi constituído de partes aéreas de *A. artemisiifolia* L, coletado em 04 diferentes localidades e datas: Iranduba, município do Amazonas, em 04 de maio de 2003 (margem de rio); Juruti, município do estado do Pará, em 27 de julho de 2003 (margem de rio); Manaus, capital do Amazonas, em 27 de fevereiro de 2004 (praia de rio) e em Itacoatiara, também município do Amazonas,

em 03 de agosto de 2004. De cada material coletado foi preparada uma exsicata da planta e posteriormente depositadas no herbário do INPA.

3.1.4. Secagem

A secagem do material vegetal (partes aéreas) foi efetuada ao ar, durante 07 dias, para evitar perda de constituintes termoláveis, nas dependências do laboratório da CCPN do INPA. Depois de seco, o material foi então picotado e moído em moinho de facas, utilizando peneira com Mesh 30, para a obtenção das serragens.

3.1.5. Métodos cromatográficos

Para fracionamento do extrato clorofórmico e das frações foram utilizadas colunas cromatográficas, sob vácuo, de fase normal em sílica gel 60 Merck (63 – 200 μm), em sílica gel 60 Merck (45 – 65 μm) ; sílica gel 60 de fase reversa Merck derivatizada tipo C-18 (25 – 40 μm), todas empacotadas a seco.

Para as análises das frações obtidas por cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas prontas de sílica gel 60 com WF_{254} em alumínio e placas de fase reversa RP-18 F_{254}S de marca Merck.

As placas de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) empregadas na purificação de frações, foram preparadas com sílica gel 60 PF_{254} , MERCK, com 1 mm de espessura, em placas de vidro de 20 x 20 cm.

Para a revelação de placas de CCD e CCDP foi utilizada revelação com luz UV a 254 nm e 366 nm, vapores de iodo e pulverização de solução de anisaldeído com aquecimento (WAGNER & BLAD, 1995).

Os experimentos com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no monitoramento e na análise dos marcadores químicos, presentes nos extratos aquosos e extrato clorofórmico, foram realizados com uma coluna de fase reversa sílica gel 60 Select B de 5µm e dimensões de 250 x 4 mm. O sistema de eluentes adotado foi gradiente ACN/H₂O (0 min-35:65, 5 min-35:65, 15 min-55:45, 17 min-100:0 e 27 min-100:0), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL (volume loop) e detector UV-VIS nos comprimentos de onda de 254 e 225 nm.

3.1.6. Métodos espectroscópicos

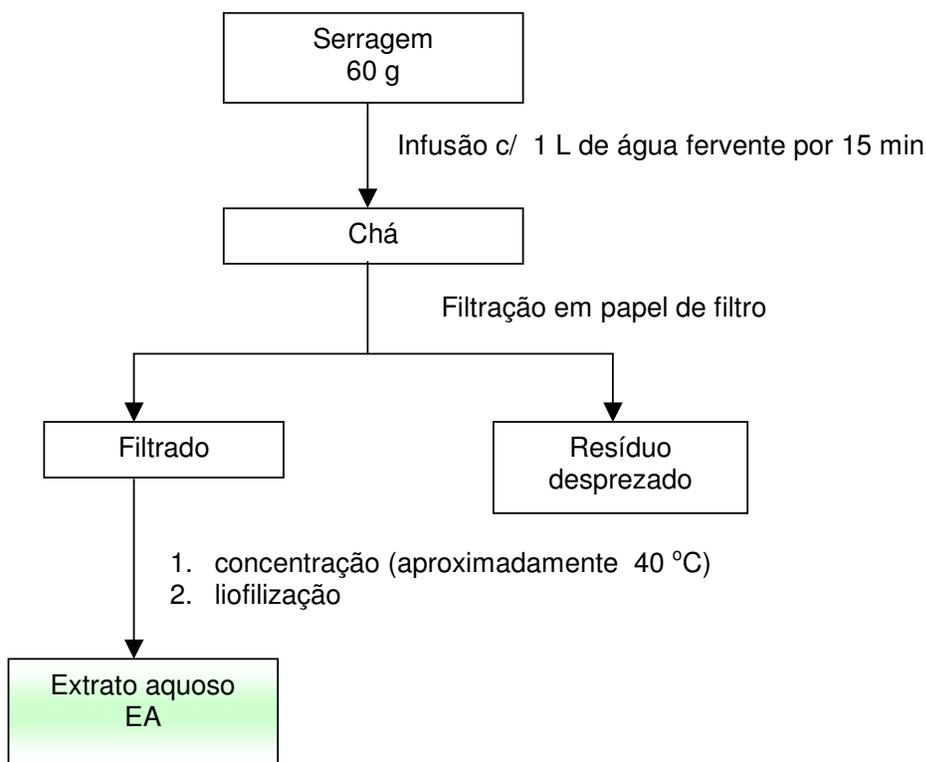
Para a identificação e elucidação das estruturas das substâncias isoladas foram utilizadas as facilidades da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados nos espectrômetros Bruker AC-200, operando em 200 e 50 MHz, Bruker DPX-300, operando em 300 e 75 MHz e Bruker DRX-500, operando em 500 e 125 MHz, respectivamente para ¹H e ¹³C. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

3.2 Estudo Fitoquímico

3.2.1 Preparação dos extratos aquosos

Conforme descrito no Esquema 5, os extratos aquosos (EA) foram obtidos partindo-se de 60 g de cada serragem das partes aéreas de *A. artemisiifolia*, provenientes das coletas efetuadas. As serragens foram submetidas à extração por infusão, utilizando 1 L de água destilada fervente, mantendo o recipiente tampado por um período de 15 min para cada extração. A seguir, os chás obtidos foram filtrados em papel de filtro e os filtrados foram então concentrados em rotaevaporadores, em condições brandas de temperatura. Os concentrados foram então ressuspensos com água destilada e em seguida liofilizados.



Esquema 5: Preparação dos extratos aquosos de *A. artemisiifolia*

3.2.2 Preparação dos extratos clorofórmicos

Os extratos clorofórmicos (Ext. CHCl_3) foram obtidos a partir de massas diferentes de serragem de partes aéreas de *A. artemisiifolia*, provenientes das coletas efetuadas, utilizando a mesma metodologia de extração para todos os extratos clorofórmicos obtidos. As serragens foram submetidas a extração por maceração a frio, em frascos tipo Mariote com capacidade de 2 L cada, com clorofórmio suficiente para cobrir toda a serragem, por um período de 5 dias corridos, durante o qual realizou-se ocasionalmente agitações do material em maceração. Após o período de extração, os materiais foram então filtrados em gaze. Os filtrados foram concentrados em rotaevaporador, em condições brandas (aproximadamente 40 °C), e os resíduos que permaneceram nos frascos Mariotes foram submetidos a uma segunda extração com metanol.

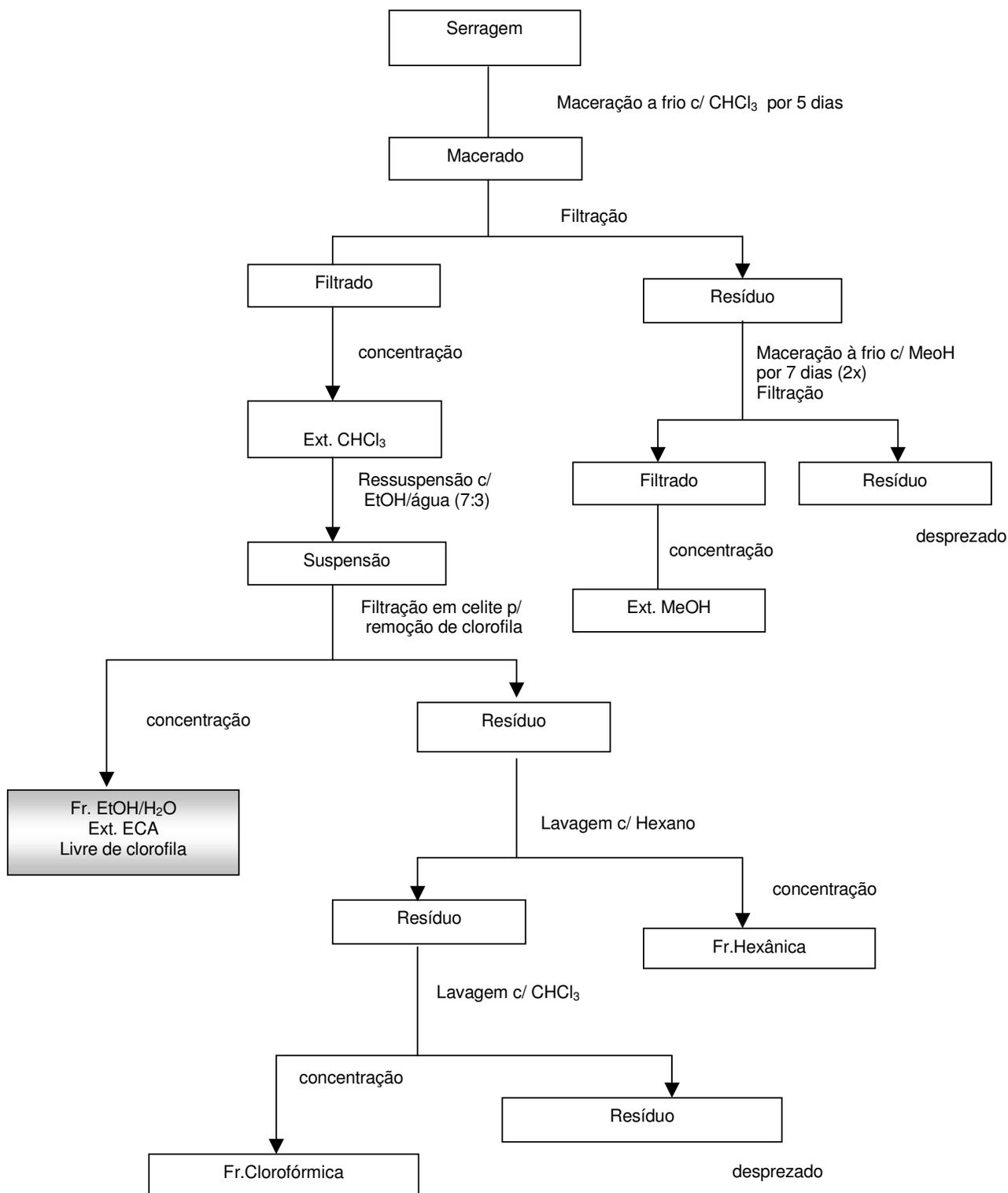
3.2.2.1 Eliminação de clorofila dos extratos clorofórmicos

Os extratos clorofórmicos, após concentrados, foram ressuspensos em solução de EtOH/H₂O na concentração 7:3, previamente preparada. As suspensões obtidas foram então submetidas a filtração em celite auxiliada por vácuo e o celite foi lavado com um volume (1V) de solução de EtOH/H₂O (7:3), com o objetivo de eliminar a clorofila presente no material. Os filtrados foram concentrados em rotaevaporadores, em condições brandas (aproximadamente 40 °C), e então foram obtidas as frações clorofórmicas (ECA) livres de clorofila. Os resíduos da filtração em celite foram submetidos a lavagem com 1 volume (1V) de hexano onde os filtrados foram concentrados obtendo-se as frações hexânicas. Os resíduos

resultantes da lavagem com hexano foram submetidos a nova lavagem com um volume (1V) de clorofórmio e onde os filtrados foram também concentrados e então obtidas as frações clorofórmicas.

3.2.3 Preparação dos extratos metanólicos

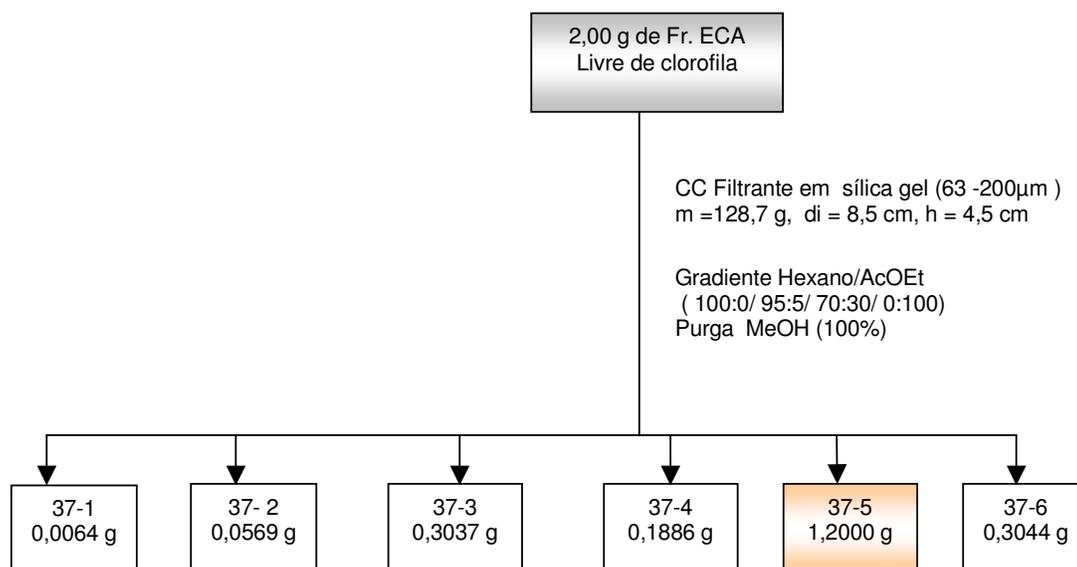
Os extratos metanólicos foram obtidos por maceração a frio, durante um período de 07 dias corridos, a partir dos resíduos provenientes de macerações com clorofórmio (CHCl_3) que foram reservados nos frascos Mariotes, onde foi adicionado MeOH o suficiente para cobrir todo o resíduo. Os materiais durante a maceração foram por várias vezes agitados e depois desse período de extração os mesmos foram filtrados em gaze e transferidos para erlenmeyers com capacidades de 2 L cada. Os mesmos foram então reservados e nos resíduos das filtrações que permaneceram nos frascos mariotes foi adicionado novamente mais MeOH na quantidade suficiente para cobrir os resíduos, e assim permaneceram em maceração por mais 07 dias para extração exaustiva. Após o período da segunda extração com MeOH, os materiais foram novamente filtrados em gaze e reunidos aos seus respectivos filtrados da primeira maceração. Os filtrados então foram concentrados em rotaevaporador resultando nos extratos metanólicos (Esquema 6).



Esquema 6: Preparação dos extratos ECA e metanólico de *A. artemisiifolia*

3.2.4. Fracionamento cromatográfico do extrato ECA

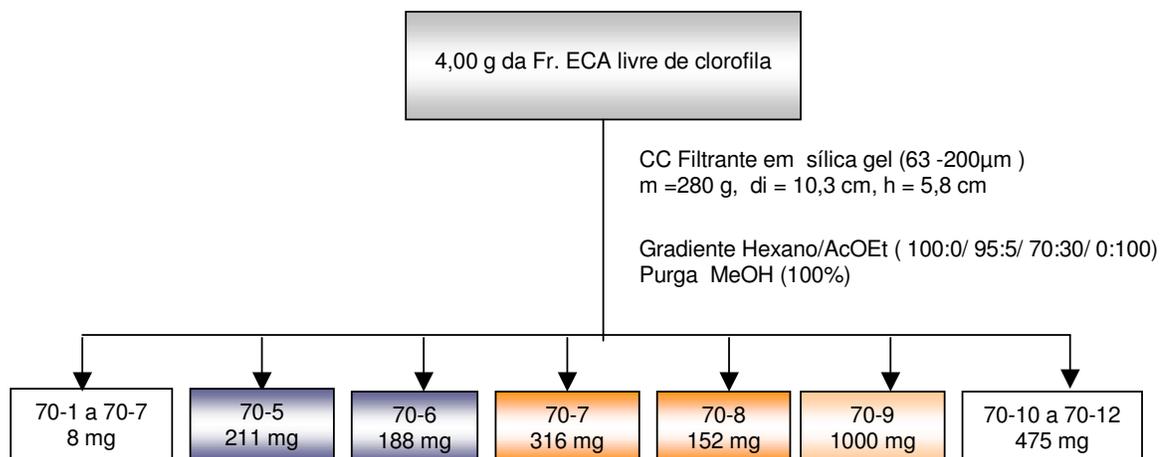
Foi retirada uma alíquota de 2,00 g do extrato clorofórmico livre de clorofila concentrado, referente à primeira coleta, e a mesma foi fracionada em coluna filtrante, com 128,7 g de sílica gel (63 - 200 μ m), 8,5 cm de diâmetro e altura de 4,5 cm. A eluição foi realizada usando gradiente de Hexano/AcOEt, nas proporções de 100:0 (1 L), 95:5 (1 L), 70:30 (2 L), 0:100 (1 L), seguido de purga com MeOH num volume de 1 L. Foram recolhidas frações de 1 L num total de 06 frações, que posteriormente foram concentradas em rotaevaporador, em condições de temperatura branda. As frações obtidas foram analisadas por CCD em fase normal utilizando sistema de eluição Hex/AcOEt (7:3), revelação UV₂₅₄, vapores de iodo e solução de anisaldeído. As frações apresentaram pesos conforme esquema 7. As frações priorizadas para serem trabalhadas foram as 37-3, 37-4 e 37-5 e baseadas na polaridade e na quantidade disponível. Essas frações foram analisadas em CCD em diversos sistemas de eluição para definir o melhor sistema de separação dos constituintes presentes.



Esquema 7: Fracionamento do extrato ECA livre de clorofila de *A. artemisiifolia* (1^o coluna)

Uma maior quantidade de fração clorofórmica foi submetida ao procedimento de eliminação de clorofila (item 3.2.2.1) resultando em mais 4,00 g de extrato clorofórmico livre de clorofila. Esse material foi submetido a fracionamento utilizando uma nova coluna filtrante, com massa de 280 g de sílica gel (63 - 200 μ m), de 10,3 cm de diâmetro e com 5,8 cm de altura. O sistema de eluição utilizado foi igual ao apresentado anteriormente apenas houve um aumento do volume de cada sistema utilizando as proporções de Hexano/AcOEt de 100: (2 L), 95:5 (2 L), 70:30 (4 L), 0:100 (2 L) e em seguida foi realizada purga com MeOH num volume de 2 L. As frações foram recolhidas em volumes de 1 L cada, totalizando 12 frações. As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador, em condições de temperatura aproximada de 40°C e analisadas em CCD de fase normal no sistema Hex/AcOEt (7:3), com revelação em UV₂₅₄, vapores de iodo e solução de anisaldeído com aquecimento, para a caracterização das frações. Os pesos obtidos estão descritos no esquema 8. Novamente as frações foram selecionadas para serem

trabalhadas considerando as análises em CCD, em comparação com as frações da coluna filtrante mostrada anteriormente (Esquema 7).



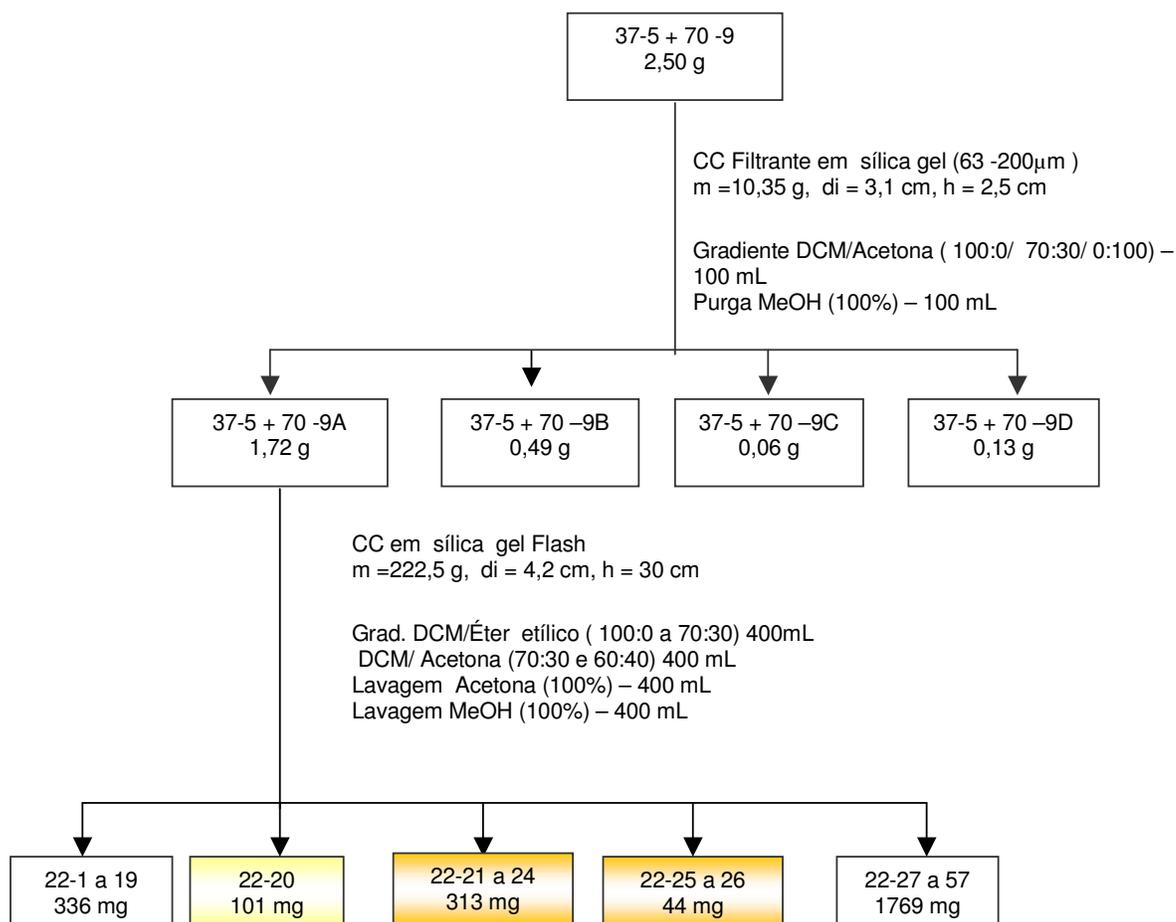
Esquema 8: Fracionamento do extrato ECA livre de clorofila de *A. artemisiifolia* (2º coluna)

As frações obtidas das duas colunas (esquemas 7 e 8) foram comparadas por CCD e as frações semelhantes e de interesse foram então trabalhadas conjuntamente.

3.2.5 Fracionamento de 37 - 5 + 70 - 9

As frações 37-5 e 70-9 foram reunidas, por serem cromatograficamente semelhantes, resultando em 2,50 g. Como a fração resultante, ainda era composta de constituintes de polaridades bem distintas, decidiu-se pelo emprego de um novo fracionamento por coluna filtrante. Utilizou-se uma coluna de 3,1 cm de diâmetro interno com 2,5 cm de altura, e 10,35 g de sílica gel (63 – 200 µm). A eluição foi iniciada utilizando diclorometano na concentração de 100% num volume de 100 mL, seguida de 100 mL de eluente DCM/acetona (70:30), posteriormente seguida de

100 mL de acetona 100% e para finalizar eluiu-se com 100 mL de metanol 100%. As frações foram coletadas num volume de 100 mL cada resultando num total de 4, as quais foram concentradas em rotaevaporador, em temperatura branda. As frações foram analisadas em CCD de fase normal utilizando o sistema DCM/acetona (6:4). A fração codificada como 37-5+70-9A de peso 1,72 g foi selecionada para ser trabalhada. Foi então submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de diâmetro interno de 8,5 cm de 30 cm de altura de 222,5 g de sílica Flash (45 - 63 μm), iniciando a eluição com 100 % de diclorometano, seguido um gradiente de DCM/éter etílico aumentando de 5 em 5 % a concentração de éter etílico, num volume de 400 mL até DCM/éter etílico (70:30). Em seguida, a coluna foi eluída com 400 mL de DCM/acetona (70:30) e 400 mL (60:40). Finalmente eluiu-se a coluna com 400 mL de acetona 100 % seguido de purga com MeOH 100 %. As frações foram recolhidas num volume aproximado de 50 mL cada, sendo que a lavagem com acetona 100 % e MeOH 100 % foram recolhidos em seus volumes totais, resultado em 57 frações. As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador e, após definidos os pesos, foram então analisadas em CCD. Baseado nas análises em CCD, as frações foram reunidas resultando em 5 frações. As frações obtidas codificadas como 22-1 a 19, 22-20, 22-21 a 24, 22-25 a 26 e 22-27 a 30, apresentaram pesos consideráveis e boa pureza porém ainda se fazia necessária uma maior purificação (Esquema 9).



Esquema 9: Fracionamento das frações 37- 5 + 70 -9

3.2.6 Fracionamento de 22-20

A fração 22-20, de massa igual a 101,4 mg, foi submetida a fracionamento por CCD preparativa de sílica gel, utilizando sistema de eluição DCM/Acetona (85:15), que quando reveladas em UV demonstraram boa separação e a presença de 3 manchas. Após extração da sílica com acetato de etila, filtração e concentração em rotaevaporador, a baixa temperatura, obteve-se 3 frações codificadas como 22-20 A, 22-20 B e 22-20 C. Análises em CCD de fase normal no sistema DCM/Acetona

(85:15) demonstrou que a fração 22-20 B apresentou boa pureza e então a amostra da mesma foi encaminhada para obtenção de espectros de RMN e EM.

3.2.7 Recristalização das frações 22-21 a 24 e 22-25 a 26

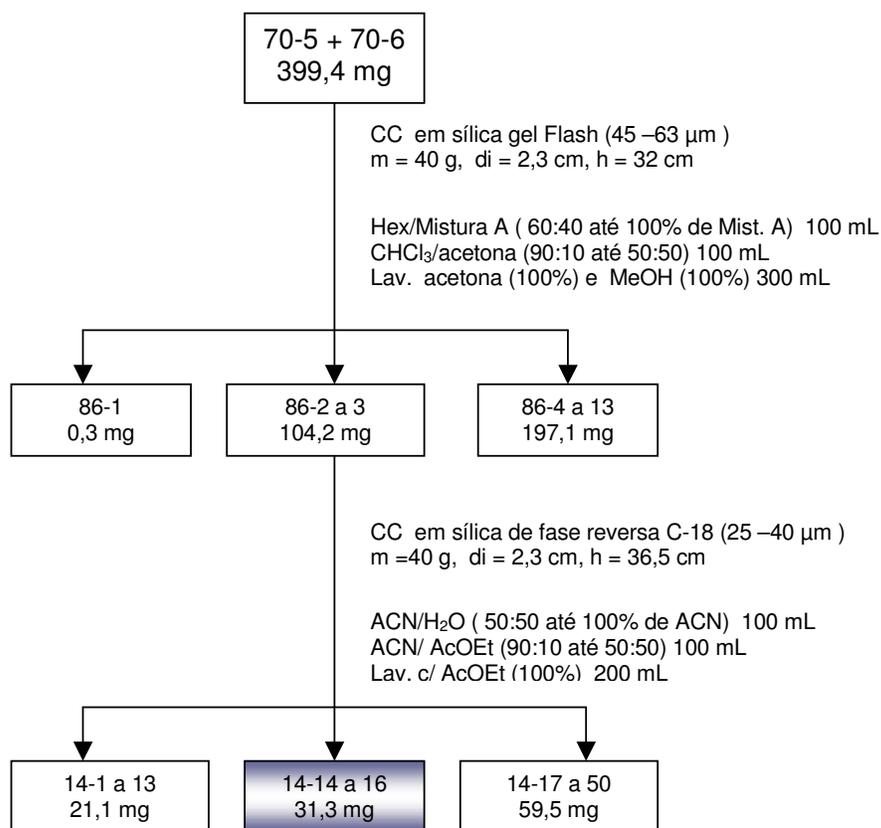
Foi observado que durante a concentração das frações 22-21 a 24 e 22-25 a 26, ocorreu a formação de cristais. Dessa forma, a fração 22-21 a 24 foi submetida a um processo de recristalização com metanol à quente. Após dissolução da fração em metanol à quente deixou-se a fração em repouso na geladeira durante 5 horas, não ocorrendo a recristalização. Em seguida, tentou-se uma nova recristalização com adição de água à quente, na proporção final de MeOH/H₂O (4:1). Esse mesmo procedimento foi utilizado para a fração 22-25 a 26, com uma proporção final de MeOH/H₂O (10:3). Em seguida as frações foram deixadas em repouso no freezer durante um período aproximado de 48 horas até o surgimento de cristais. Houve a formação de cristais brancos em forma de agulha que foram purificados através de lavagem com mistura MeOH/H₂O (75:25) gelado para 22-21 a 24 e MeOH/H₂O (70:30) gelado para 22-25 a 26 e separados por filtração. Os cristais purificados foram então reunidos em uma única fração codificada como 22-25 a 26. Análise por CCD demonstrou que a amostra estava pura e a mesma foi então encaminhada para obtenção de espectros de RMN e EM.

3.2.8 Fracionamento de 70 -5 + 70 - 6

As frações 70-5 e 70-6 foram reunidas após análise em CCD somando 399,4 mg de amostra. A fração resultante foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna Flash, de 2,3 cm diâmetro interno e altura de sílica de 32 cm, utilizando 40 g de sílica. A eluição foi iniciada com 200 mL do sistema hexano/mistura A na proporção de 60:40, onde mistura A representa o sistema CHCl_3 /acetona (96:4). Em seguida deu-se seqüência a eluição, em volumes de 200 mL cada, com gradiente crescente de 10 % de mistura A até atingir 100% somente da mistura A. Em seguida, a eluição foi continuada num gradiente crescente de 10 % de acetona do sistema CHCl_3 /acetona até a proporção de 50:50, em volumes de 100 mL. Finalmente foi realizada uma lavagem com 100% de acetona num volume de 300 mL seguida de 100% de metanol também num volume de 300 mL. As frações foram coletadas em volumes aproximados de 50 mL, sendo que as purgas foram coletadas em seus volumes totais, obtendo-se ao final um total de 33 frações. As frações assim obtidas foram analisadas em CCD de fase normal no sistema Hex/mistura A em diferentes proporções. Após análise em CCD, decidiu-se pela união de algumas frações devido as suas semelhanças cromatográficas, resultando em 13 frações com massas conforme esquema 10.

3.2.9 Fracionamento de 86-2 + 86 - 3

As frações 86 – 2 e 86 – 3 , após análise em CCD de sílica de fase reversa nos sistemas ACN/H₂O, ACN/metanol e ACN/AcOEt, foram reunidas somando uma massa de 104,2 mg e submetidas a fracionamento em coluna cromatográfica com 40 g de sílica gel de fase reversa derivatizada C-18 (25 – 40 µm), (diâmetro interno de 2,3 cm e altura de sílica de 36,5 cm). Foi dado início a eluição utilizando o sistema ACN/H₂O na proporção de 50:50, num volume de 100 mL. Deu-se seqüência à eluição, usando um volume de 100 mL de eluente, num gradiente de ACN/H₂O, aumentando acetonitrila na proporção de 10% a cada 100 mL de eluente até a proporção de 100% de acetonitrila. Posteriormente, utilizou-se como eluente o sistema ACN/AcOEt (90:10) aumentando a proporção de acetato de etila na proporção de 10% a cada 100 mL de eluente até a proporção de ACN/AcOEt (40:60). Em seguida foi efetuada lavagem da coluna utilizando 100% de acetato de etila num volume de 200 mL. As frações foram coletadas num volume aproximado de 25 mL e a lavagem foi coletada em seu volume total, obtendo-se dessa forma um total de 50 frações. Após concentradas, em rotaevaporadores sob temperatura aproximada de 40 °C, as frações foram analisadas em CCD de fase reversa utilizando os sistemas ACN/H₂O (90:10), ACN/AcOEt (60:40) e ACN/AcOEt (40:60). As frações foram reunidas em 17 frações. As frações codificadas como 14-14, 14-15 e 14-16, conforme resultados da análise em CCD de fase reversa, apresentaram boa pureza. As mesmas foram então reunidas (14-14 a 16) e uma amostra da mesma foi encaminhada para obtenção de espectros de RMN e EM (Esquema 10).



Esquema 10: Fracionamento de 70- 5 + 70 -6 e 86- 2 + 86 -3

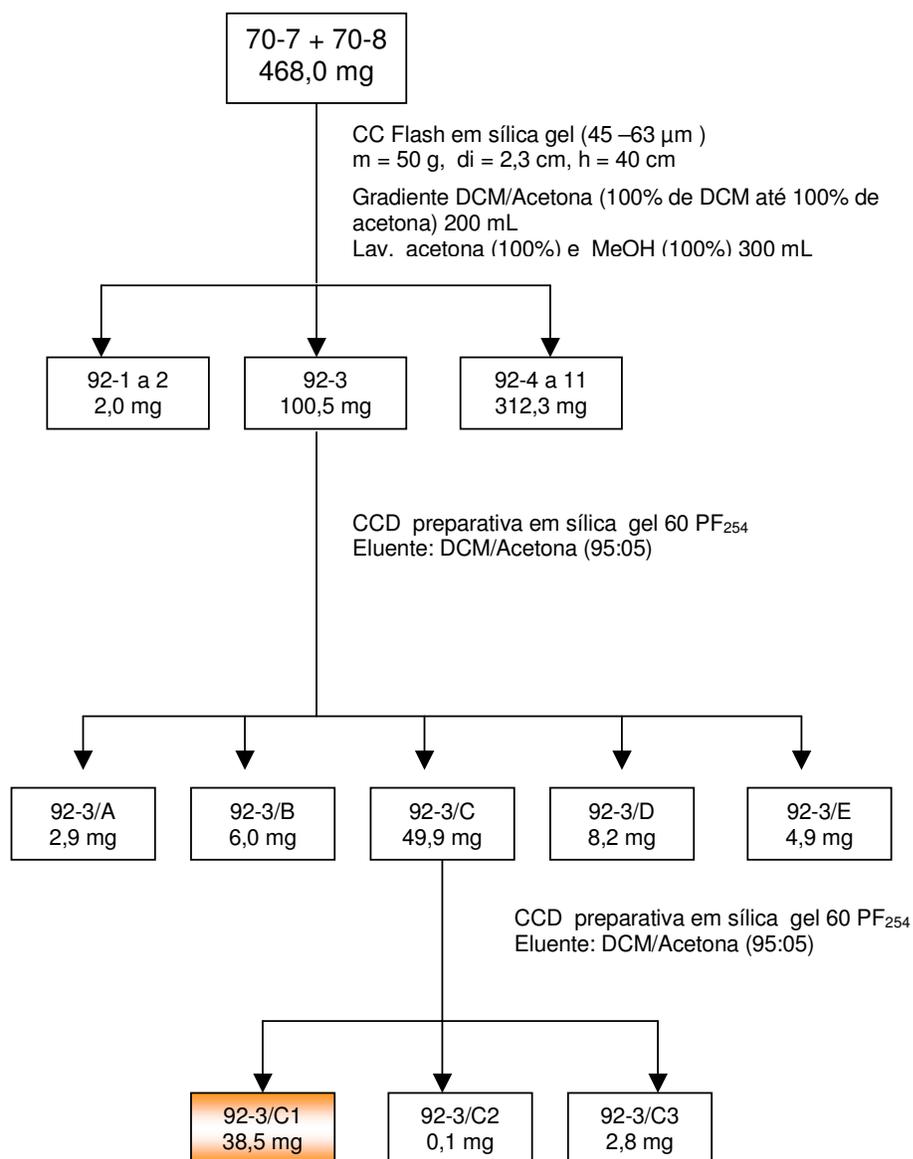
3.2.10 Fracionamento de 70 -7 + 70 - 8

As frações 70-7 e 70-8 foram reunidas após análise em CCD somando 468 mg de amostra e então foram submetidas a fracionamento por cromatografia em coluna Flash utilizando 50 g de sílica, com 2,3 cm diâmetro interno e altura de sílica de 40 cm. A eluição foi iniciada com 200 mL de DCM a 100%, seguida do gradiente DCM/Acetona (98:2), aumentando-se a proporção a cada 200 mL em 2% até a proporção de DCM/Acetona(90:10), em seguida a eluição foi seguida com 100% de acetona num volume de 200 mL e finalmente lavagem com metanol 100%. As frações foram coletadas nos volumes aproximados de 50 mL até eluição com DCM/Acetona(98:2) e 25 mL até DCM/Acetona (90:10). A lavagem com acetona 100% foi coletada em seu volume total e a lavagem com 100% metanol foi desprezada. Foram obtidas 29 frações que posteriormente foram concentradas em rotaevaporador, em temperatura aproximada de 40 °C. As frações foram analisadas em CCD de fase normal e decidiu-se então por reunir algumas frações resultando em 11 frações, conforme apresentado no esquema 11.

3.2.11 Fracionamento de 92-3

A fração 92-3, resultante do fracionamento das frações 70-7 e 70-8, com peso de 100,5 mg, foi submetida a fracionamento por CCD preparativa de sílica gel no sistema de eluição DCM/Acetona (95:05) em cinco placas. Após revelação em UV, observou-se 5 manchas com boa separação. As frações foram então codificadas como 92-3/A, 92-3/B, 92-3/C, 92-3/D e 92-3/E. Análises em CCD de fase normal no sistema DCM/Acetona (95:05) demonstrou que a fração codificada como 92-3/C,

apresentou boa pureza. Finalmente esta fração foi resubmetida a um fracionamento por CCD preparativa de sílica gel com o mesmo sistema de eluição anterior. Foi então obtida uma fração, codificado como 92-3/C1, com boa pureza e massa igual a 38,5 mg, conforme apresentado no esquema 11, que foi encaminhada para análises espectroscópicas na central analítica da USP.



Esquema 11: Fracionamento de 70 -7 + 70 -8 e purificação de 92-3

3.3 Obtenção dos óleos essenciais

40 g de serragem de partes aéreas secas, em temperatura ambiente, de *A. artemisiifolia*, de cada coleta realizada, foram submetidas a extração de óleo essencial utilizando processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, durante um período de 4 horas. Ao final do período de extração, foi realizada uma lavagem do hidrolato obtido com diclorometano, o qual foi coletado em frasco erlenmeyer. O óleo foi separado do hidrolato por centrifugação, depois separado com auxílio de uma pipeta e então após a evaporação do DCM tiveram suas massas e teores determinados (Tabela 31). Os óleos obtidos foram codificados como óleo-1 (1^a coleta), óleo-36 (2^a coleta), óleo-10 (3^a coleta) e óleo-40 (4^a coleta).

3.3.1 Análise quantitativa das amostras de óleo em CG e CG-EM

Para determinação do perfil cromatográfico de cada óleo obtido, referente as coletas realizadas, as amostras foram diluídas em DCM e então analisadas em CG, nas seguintes condições: coluna capilar polar Innowax de 30 m com 0,320 mm de diâmetro e filme de 0,25 µm e coluna capilar apolar HP-5 de 30 m x 0,320 mm e filme de 0,25 µm, detector de ionização de chama, gás de arraste hidrogênio, temperatura do injetor 220 °C, modo split na razão de 20:1, volume de injeção de 1 µL, programação de temperatura em 60 °C – 240 °C, gradiente linear de 3 °C/min, com fluxo de 1,8 mL/min, tempo de análise de 60 min.

Para a identificação dos picos majoritários presentes em cada cromatograma utilizou-se dois procedimentos. O primeiro consistiu na análise dos índices de retenção das substâncias de interesse obtidos a partir da coinjeção do óleo com padrões de alcanos (C9 – C24) e análise por CG/FID em duas colunas (polar e apolar). Os índices obtidos foram comparados com os valores tabelados por Adams (1995) e Davies (1990).

Um segundo procedimento envolveu a análise dos óleos por CG-EM nas seguintes condições: coluna capilar DB-5MS (25 m x 0,25 mm; 0,25 µm de espessura de filme), gás de arraste hélio, temperatura do injetor de 220 °C, temperatura de interface de 230 °C, modo split com razão de 20:1, volume de injeção de 1 µL, programação de temperatura de 60 °C - 240 °C com um gradiente linear de 3 °C/min, fluxo de 1,8 mL/min e 60 min de corrida. Para a análise as amostras foram preparadas na concentração de 4 mg/mL, utilizando-se acetato de etila como solvente.

3.4 Análise semi-quantitativa dos extratos clorofórmicos (ECA), extratos aquosos (EA) e marcadores por CLAE

3.4.1 Preparação das amostras

As amostras analisadas de extratos clorofórmicos livres de clorofila (ECA) e dos marcadores isolados (codificados como LacA, LacB, LacC e LacD), foram todas preparadas na concentração de 1 mg/mL, em metanol e depois filtradas em filtro de membrana tipo PVDF com 0,2 µm de porosidade.

As amostras dos extratos aquosos (EA) foram submetidas a um processo de preparação de amostra para eliminar constituintes polares por filtração em SEPPAK de fase reversa, o qual foi previamente condicionado com água milli-Q. Para a preparação das amostras foram utilizados os sistemas a seguir, obtendo-se duas frações: primeira fração obtida de 2 mL de EA eluidos com 10 mL de MeO/H₂O (5:95) e segunda fração da eluição com 1 mL de MeOH/ACN (50:50)

3.4.2 Condições de análise

As análises dos extratos ECA e EA, bem como os marcadores isolados, foram realizadas utilizando coluna LiChrospher 60 RP- Select B (5 µm , 250x4 mm), em modo gradiente com ACN/ H₂O (0 min – 35:65, 5 min – 35:65, 15 min – 55:45, 17 min – 100:0 e 27 min – 100:0), um fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL (volume de loop) e monitoramento com detector de ultravioleta em 225 e 254 nm.

3.4.3 Curva de calibração para LacA, LacB e LacD

Partindo-se das soluções na concentração de 1 mg/mL, foram preparadas por diluição, 4 soluções de cada marcador, em concentrações diferentes. A faixa de concentração para obtenção das curvas de calibração adotada para cada marcador, foi aquela que abrangia a concentração observada para os mesmos nos extratos ECA analisados. As soluções padrões preparadas foram injetadas em duplicata.

3.4.4 Quantificação dos marcadores nos extratos EA e ECA

A quantificação dos marcadores isolados nos extratos EA e ECA foi realizada por CLAE utilizando o método do padrão externo. As amostras EA e ECA preparadas foram injetadas em triplicata nas mesmas condições de análise. A partir de cada valor médio de área obtido, para cada marcador nos extratos EA e ECA, foi realizada uma extrapolação na respectiva curva de calibração, obtendo-se daí os valores presentes de cada marcador nas soluções analisadas.

3.5 Testes para avaliação da atividade anti-úlceras

Foi realizada avaliação da atividade anti-úlceras em três modelos de lesões gástricas induzidas agudamente em camundongos: lesões produzidas pelo antiinflamatório não esteroide indometacina, por etanol e estresse produzidas por imobilização a 4 °C. Os ensaios foram realizados em colaboração com o setor de Produtos Naturais do Depto. de Farmacologia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, sob supervisão da Prof^a. Dra. Caden Souccar e Prof. Dr. Antônio José Lapa. Tais modelos são os mais utilizados porque representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na patologia da úlcera gástrica humana. Em todos esses modelos, além de se contar o número de úlceras e medir o seu tamanho, são avaliadas também, de forma semi-quantitativa, as lesões da mucosa gástrica que precedem a ulceração. O etanol em concentrações elevadas como 75% ou mais, induzem uma proporção significativa de úlceras independentes da secreção ácida. Os antiinflamatórios não-esteroidais como a indometacina, induzem lesões

gástricas por inibirem a biossíntese de prostaglandinas (PGE₂). Já o modelo de úlcera por estresse envolve mecanismos nervosos centrais, principalmente hipotalâmicos (GLAVIN e SZABO, 1992) .

3.5.1 Lesão gástrica induzida por etanol

Seis animais previamente pesados e identificados, em jejum de sólidos de 16 horas e com fornecimento livre de água, foram tratados, exceto o controle, por via oral (gavagem) (Figura 11), com os extratos (EA nas doses 0,1; 0,3 e 1g/kg e ECA nas doses 0,1 e 0,3g/kg). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais receberam etanol a 75% (1 mL/100g, v.o.). Uma hora após a administração do etanol, os animais foram mortos por anestesia etérea profunda e seus estômagos foram removidos e seccionados com tesoura ao longo da curvatura menor, lavados com solução salina gelada e fixados em placas de isopor para exposição da mucosa gástrica e avaliação das lesões sob microscópio óptico (método de ROBERT *et al.*, 1979). O grau de lesão gástrica foi quantificado considerando o número total de úlceras e a média dos índices de lesão determinados de acordo com o tipo de lesão e a seguinte pontuação:

- perda de pregas da mucosa1 ponto
- descoloração da mucosa.....1 ponto
- edema
 - leve.....1 ponto
 - moderado.....2 pontos
 - intenso.....3 pontos
- hemorragia
 - leve.....1 ponto
 - moderada.....2 pontos
 - intensa.....3 pontos
- Número de petéquias
 - leve (até 25% do estômago).....1 ponto
 - moderado (até 50% do estômago).....2 pontos
 - intenso (75% do estômago ou mais).....3 pontos
- Intensidade de ulceração
- úlceras ou erosões de até 1 mmnx2 pontos
- úlceras ou erosões maiores que 1 mm ...nx3 pontos
- úlcera perfurada.....nx4 pontos
- Perda de muco
 - leve.....1 ponto
 - moderada.....2 pontos
 - intensa.....3 pontos

3.5.2 Lesão gástrica induzida por estresse

Camundongos albinos machos tratados mantidos em jejum de sólidos de 16 horas e com fornecimento de água, foram tratados, exceto o controle, por via oral (gavagem) (Figura 11), com os extratos mais o veículo (EA nas doses 0,1; 0,3 e 1 g/kg e ECA nas doses 0,1 e 0,3 g/kg). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram anestesiados com éter, imobilizados com fita crepe e colocados em contêntores individuais (Figura 12), e mantidos em câmara fria (a 4° C) por 1 hora. Ao final desse período, os animais foram liberados das amarras e sacrificados sob anestesia etérea e seus estômagos foram removidos e seccionados com tesoura ao longo da curvatura menor, lavados com solução salina gelada e fixados em placas de isopor para exposição da mucosa gástrica e avaliação das lesões sob microscópio óptico. As avaliações e determinações do número de úlceras e índice de lesões foi realizado conforme já descrito anteriormente no item 3.5.1.

3.3.3 Lesão gástrica induzida por indometacina

Camundongos albinos machos mantidos em jejum de sólidos de no mínimo 16 horas e com fornecimento de água, foram tratados, exceto o controle, por via oral (gavagem) (Figura 11), com os extratos mais veículo (EA nas doses 0,1; 0,3 e 1 g/kg e ECA nas doses 0,1 e 0,3 g/kg). Após 1 hora todos os animais receberam indometacina (30 mg/kg, s.c.). Após 3 horas da administração da indometacina, repetiu-se os tratamentos com os extratos. Após outras 3 horas todos os animais foram mortos por anestesia etérea profunda, seus estômagos foram removidos e seccionados com tesoura ao longo da curvatura menor, lavados com solução salina

gelada e fixados em placas de isopor para exposição da mucosa gástrica e avaliação das lesões sob microscópio óptico (método de DJAHANGURI, 1979). As avaliações e determinações do número de úlceras e índice de lesões foram realizadas conforme descrito no item 3.5.1.

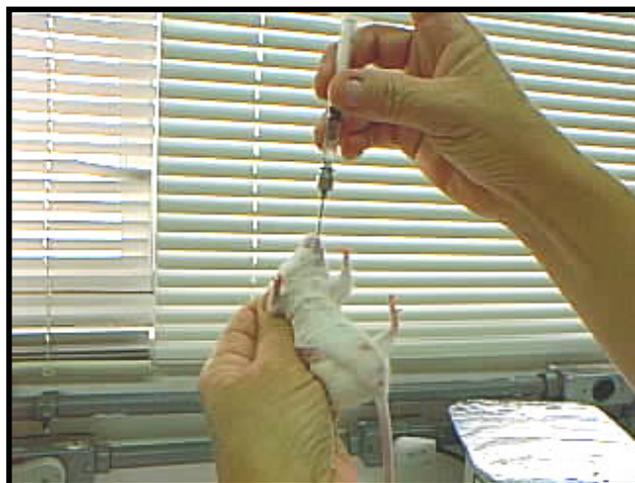


Figura 11. Administração dos extratos por gavagem



Figura 12. Exemplo de contêntor individual utilizado no teste de úlceras induzidas por estresse

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos marcadores isolados

4.1.1 Identificação de LacA

A substância isolada das frações 22-21 a 24 e 22-25 a 26, codificada como LacA, após purificação apresentou-se como cristais brancos na forma de agulhas e teve seu ponto de fusão entre 132,8-136,1^o C. A substância quando analisada em CCD de fase normal no sistema DCM/éter etílico (7:3) apresentou um R_F igual a 0,68 e coloração alaranjada, quando revelada com solução de anisaldeído com aquecimento.

Analisando o espectro de RMN de ¹H (Figura 13) (Tabela 5), observou-se sinais com deslocamentos típicos de hidrogênios de insaturações δ 7,48 (dd), 6,30 (dd), 6,15 (dd) e 5,50 (d).

O sinal em dubleto observado em δ 4,66 foi atribuído ao hidrogênio ligado a carbono ligado a oxigênio, que pode ser atribuído à presença de um anel lactônico na estrutura da substância, por ter sido isolado de uma ambrosia.

Os sinais observados em δ 1,20 (s) e 1,05 (d) foram atribuídos a hidrogênios de metilas.

Tabela 5. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância LacA .

H	δ (ppm)	multiplicidade	J (Hz)	Nº de H
H-1	2,99	<i>m</i>	-	1
H-2	7,48	<i>dd</i>	5,9; 1,9	1
H-3	6,15	<i>d</i>	2,9	1
H-6	4,66	<i>d</i>	8,5	1
H-7	3,45	<i>m</i>	-	1
H-8	2,24/1,90	<i>m</i>	-	2
H-9	1,90/1,72	<i>m</i>	-	2
H-10	2,43	<i>m</i>	-	1
H-13	6,30	<i>dd</i>	3,2; 0,3	1
H-13'	5,50	<i>d</i>	3,2	1
H-14	1,20	<i>s</i>	-	3
H-15	1,05	<i>d</i>	7,4	3

Através da análise dos espectros de RMN ^{13}C (HBBD e DEPT135) (Figuras 14 e 15), observou-se a presença de 15 carbonos, indicando possivelmente tratar-se de um sesquiterpeno. Dos carbonos observados, 4 são carbonos quaternários, 6 metínicos, 3 metilênicos e duas metilas (Tabela 6).

A presença de um sinal em δ 120,0, correspondente a um metileno (CH_2), indicou a presença de uma ligação dupla exocíclica (dupla terminal) muito comum em lactonas sesquiterpênicas.

Os sinais observados em δ 170,4 (C), 138,2 (C), 120,0 (CH_2) e 80,2 (CH), caracterizou a presença de um anel α -metileno- γ -lactona. Por sua vez, os sinais em

δ 210,6 (C), 131,2 (CH) e 163,2 (CH), evidenciaram a presença de uma cetona α - β -insaturada. Esses sinais são característicos de lactonas sesquiterpênicas.

Tabela 6. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância LacA.

Carbono	δ (ppm)	Multiplicidade	δ (ppm) Literatura
C1	47,9	CH	47,4
C2	163,2	CH	163,4
C3	131,2	CH	130,9
C4	210,6	C	210,5
C5	56,2	C	56,0
C6	80,2	CH	80,1
C7	44,6	CH	44,5
C8	24,9	CH_2	29,6
C9	29,8	CH_2	24,7
C10	33,8	CH	33,7
C11	170,4	C	170,3
C12	138,2	C	138,0
C13	120,0	CH_2	119,8
C14	17,2	CH_3	17,4
C15	17,4	CH_3	17,2

Para a definição do esqueleto e atribuição dos hidrogênios e carbonos, analisou-se os espectros de correlação ^1H - ^1H (HOMOCOSY)(Figura 16), ^{13}C - ^1H (J^1) (HETCOR) (Figura 17) e espectro de correlação ^{13}C - ^1H à longa distância ($J^{2,3}$) (HMBC) (Figura 18), o que permitiu estabelecer as conectividades necessárias para definir o esqueleto da estrutura (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) e ^{13}C - ^1H (HETCOR) observadas nos espectros da substância LacA.

δ ^1H - ^1H (ppm)	δ ^{13}C - ^1H (ppm)
7,48-6,15	163,4-1,48
7,48-2,99	131,2-6,15
6,30-3,45	120,0-6,30
6,15-2,99	120,0-5,50
5,50-3,45	80,2-4,66
4,66-3,45	47,9-2,99
3,45-2,24	44,6-3,45
3,45-1,90	33,8-2,43
2,99-2,43	29,8-1,90
2,43-1,05	29,8-1,72
2,43-1,90	24,9-2,24
2,43-1,72	24,9-1,90
2,24-1,90	17,4-1,05
1,90-1,72	17,2-1,20

Tabela 8. Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância ($J^{2, 3}$) (HMBC) observadas para LacA.

δ ^{13}C - ^1H (ppm)	δ ^{13}C - ^1H (ppm)
210,6 - 7,48	47,9 - 1,20
210,6 - 6,15	47,9 - 1,05
210,6 - 4,66	44,6 - 4,66
170,4 - 6,30	44,6 - 2,24
170,4 - 5,50	44,6 - 1,90
170,4 - 4,66	33,8 - 2,99
138,2 - 6,30	33,8 - 2,24
138,2 - 1,90	33,8 - 1,90
131,2 - 7,48	29,8 - 2,43
80,2 - 2,24	29,8 - 1,05
80,2 - 1,90	24,9 - 1,90
56,2 - 7,48	17,4 - 2,43
56,2 - 2,43	17,2 - 4,66
56,2 - 1,20	17,2 - 2,99
47,9 - 1,90	

A partir das correlações observadas, procurou-se estabelecer as conectividades C-C, através dos sinais típicos correspondentes ao sistema α - β -insaturado de cetona (δ 210,6; 131,2 e 163,2). Foi então possível atribuir o esqueleto tipo pseudoguaianolídeo com anel lactônico entre os carbonos 6 e 7.

Estão apresentadas na Figura 19 algumas correlações que definiram as conectividades dos carbonos quaternários presentes na estrutura da substância LacA.

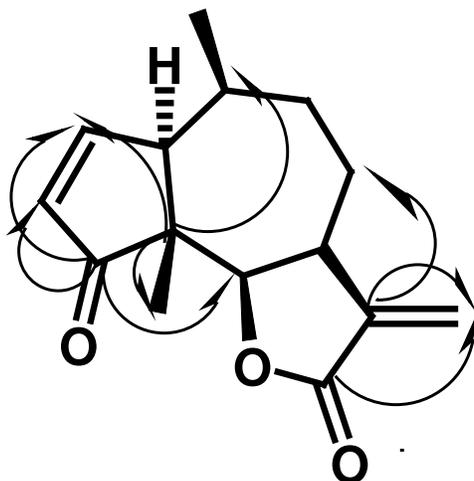


Figura19. Algumas correlações à longa distância ¹³C-¹H observadas no espectro HMBC da substância LacA.

A análise dos dados espectroscópicos permitiram a identificação da substância isolada como sendo a lactona sesquiterpênica ambrosina (Figura 20). A comparação dos dados da literatura (UGAZ, 1994) com os obtidos durante esse estudo mostraram estar em acordo (Tabela 6). Foi possível inclusive reatribuir os sinais dos metilenos C8 e C9, assim como das metilas C14 e C15.

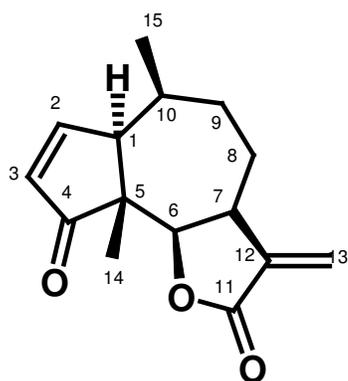


Figura 20. Estrutura da lactona sesquiterpênica ambrosina

A ambrosina é um pseudoguaianolídeo com propriedade moluscicida comprovada por Shoeb e El Emam (1976) (GEERTS *et al.*, 1991). Também são descritas atividades citotóxica e antitumoral da substância (RODRÍGUEZ *et al.*, 1976). A presença dos grupo α -metileno- γ -lactona foi associado como exigência estrutural essencial de LS para a atividade antiulcerogênica (RODRÍGUEZ *et al.*, 1996; GIORDANO *et al.*, 1990). Esse é o primeiro relato de seu isolamento em *A. artemisiifolia*.

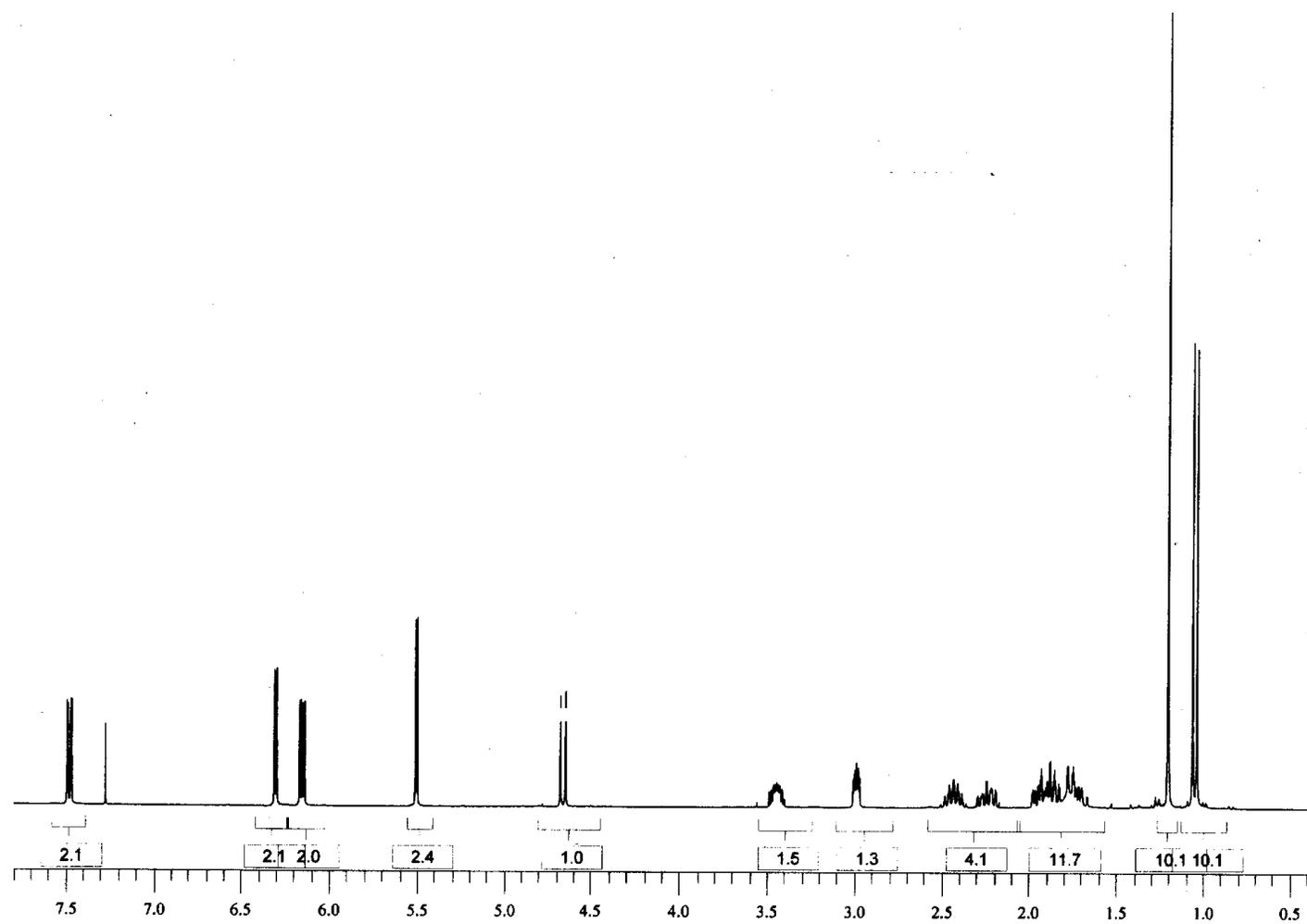


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de LacA .

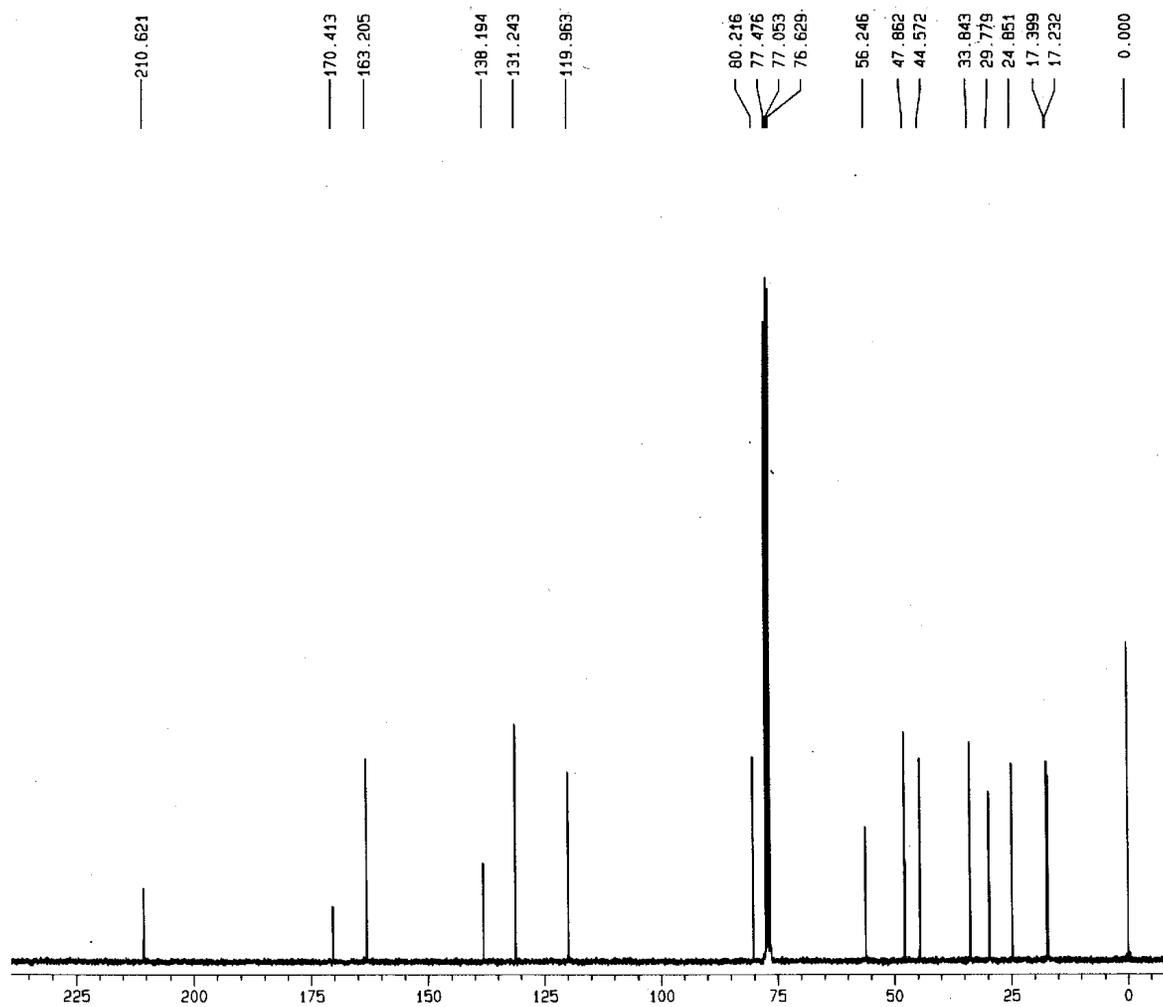


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (HBB) (75 MHz, CDCl_3) de LacA.

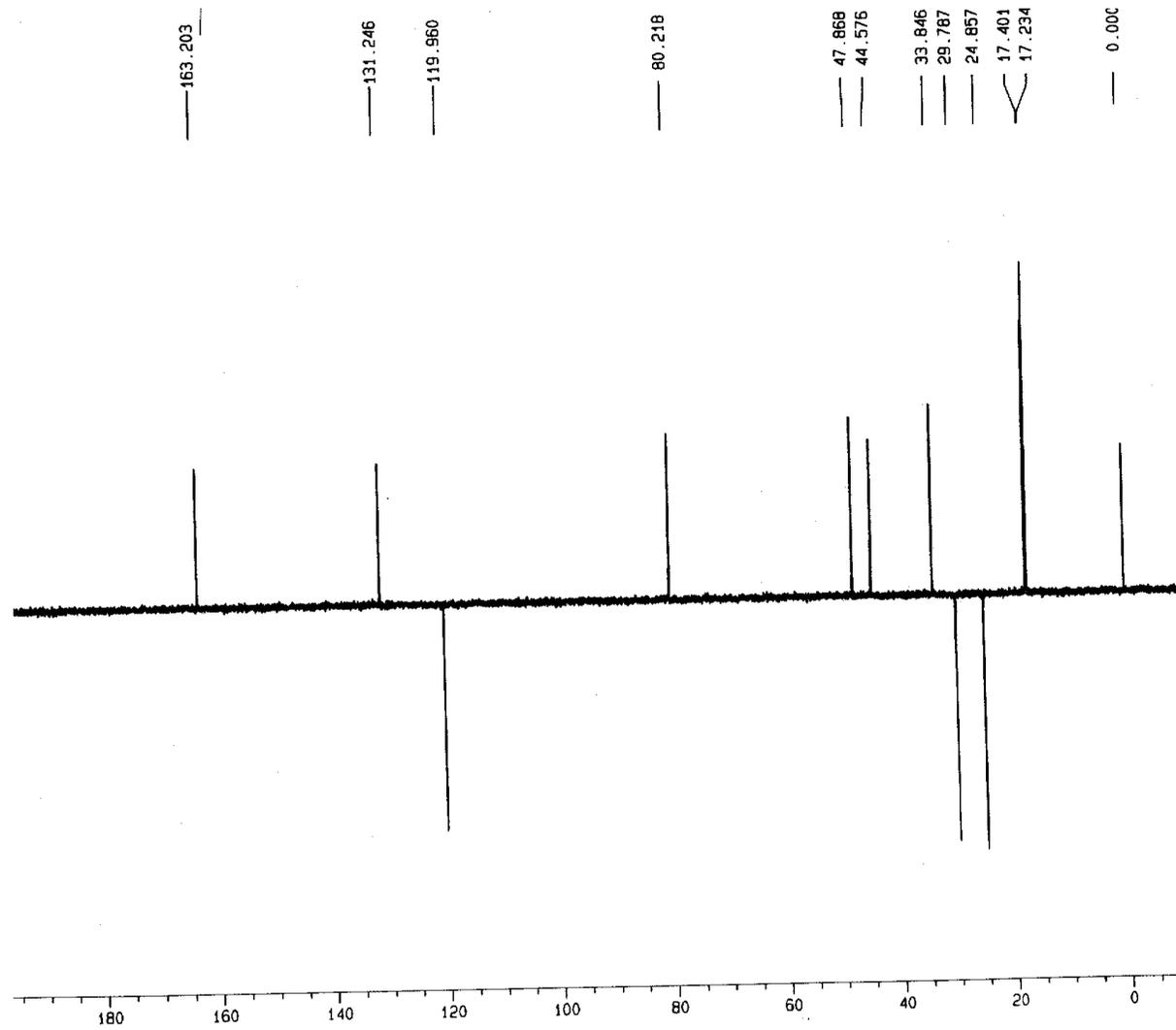


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) (75 MHz, CDCl_3) de LacA.

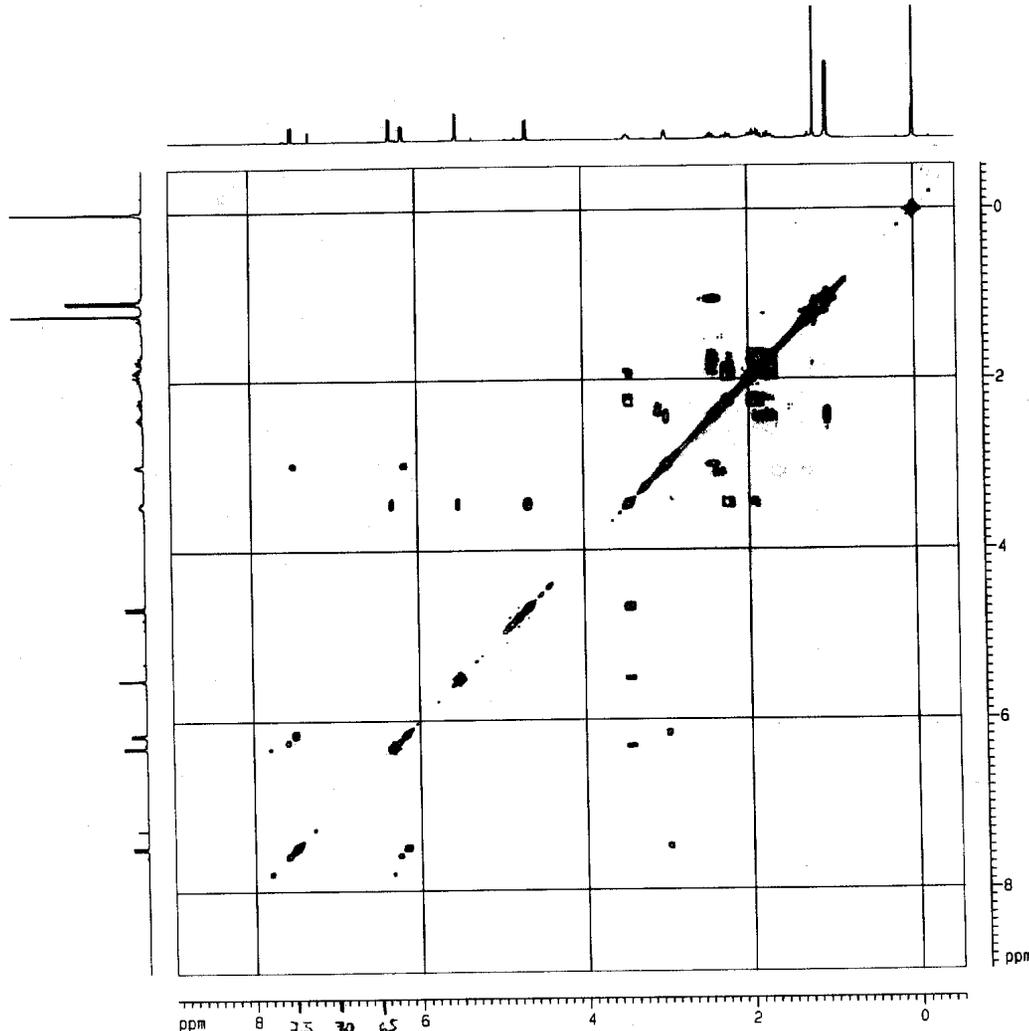


Figura 16. Espectro de correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) de LacA.

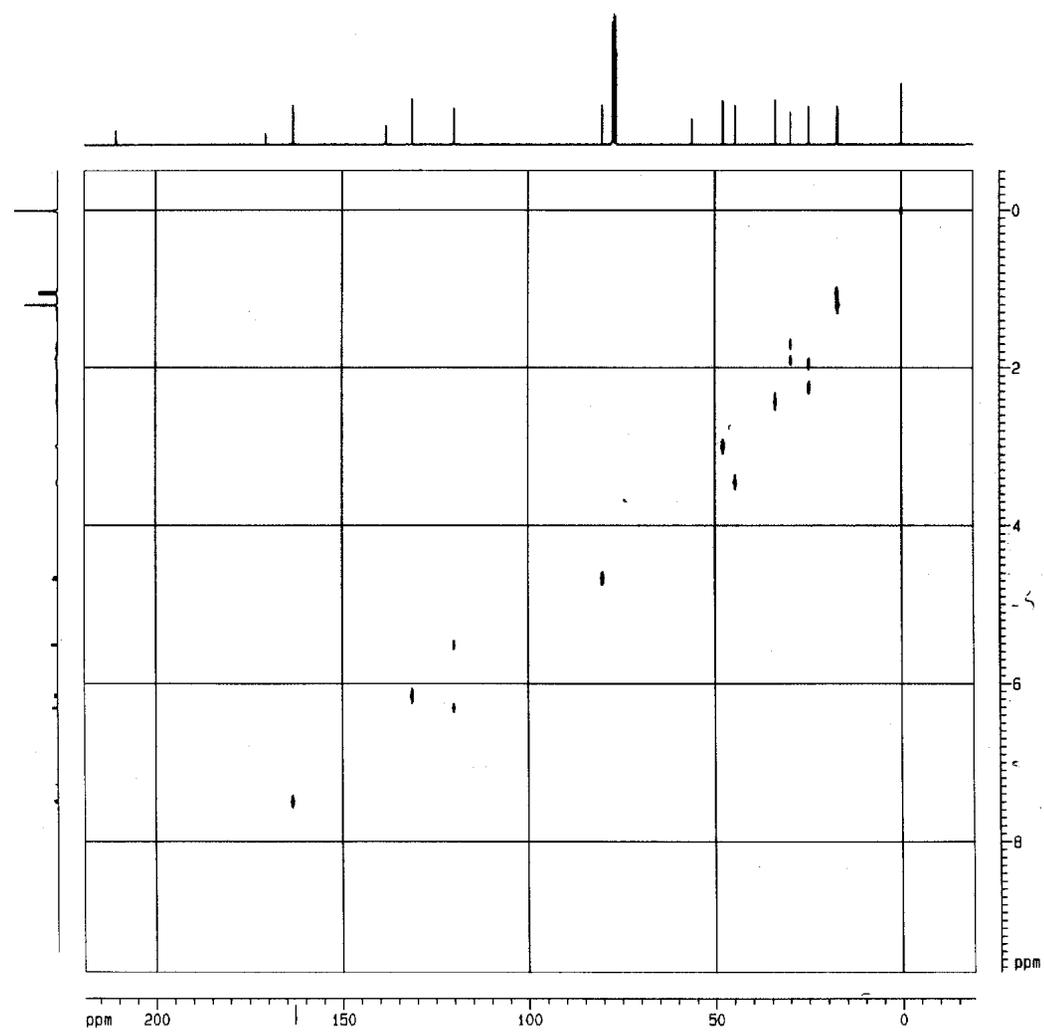


Figura 17. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H (HETCOR) de LacA.

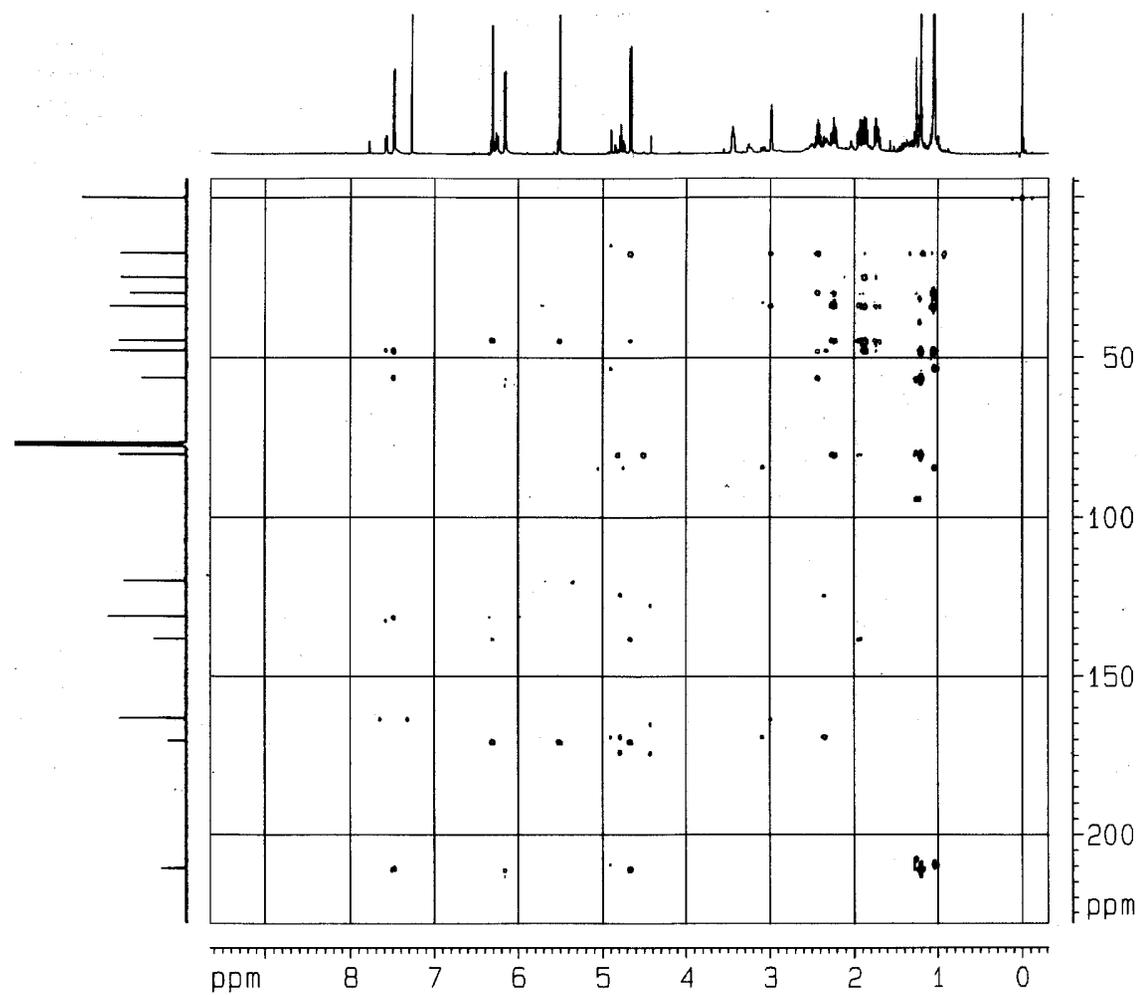


Figura 18. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H à longa distância (HMBC) de LacA.

4.1.2. Identificação de LacB

A substância isolada da fração 22-20, codificada como LacB, após purificação apresentou-se como cristais brancos na forma de estrelas e seu ponto de fusão foi observado entre 94,6-106,5 °C. Na análise em CCD de fase normal a substância apresentou R_F igual a 0,62, quando eluída em sistema DCM/Acetona (85:15) e coloração amarela, quando revelada com solução de anisaldeído com aquecimento.

Na análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 21), cujos dados estão apresentados na Tabela 9, observou-se sinais típicos de hidrogênios ligados a insaturações em δ 6,27 (d) e 5,54 (d).

Novamente o sinal observado em δ 4,54, em dubleto, foi atribuído a hidrogênio ligado a carbono ligado a oxigênio, o que sugere a presença de um anel lactônico na estrutura. Os sinais em δ 1,08 (s) e 1,07 (d) foram atribuídos a presença de duas metilas.

Tabela 9. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância LacB.

H	δ (ppm)	multiplicidade	J (Hz)	Nº de H
H-1	2,53	<i>m</i>	-	1
H-2	1,86/1,74	<i>m</i>	-	2
H-3	2,47	<i>m</i>	-	2
H-6	4,54	<i>d</i>	8,7	1
H-7	3,31	<i>m</i>	-	1
H-8	1,86/2,08	<i>m</i>	-	2
H-9	1,86/2,08	<i>m</i>	-	2
H-10	2,24	<i>m</i>	-	1
H-13	6,27/5,54	<i>d</i>	3,2;2,9	2
H-14	1,08	<i>s</i>	-	3
H-15	1,07	<i>d</i>	-	3

A análise dos espectros de RMN ^{13}C (HBBD e DEPT135) (Figuras 22 e 23), da substância LacB, evidenciou-se a presença de 15 carbonos, indicando tratar-se novamente de um sesquiterpeno. Foram observados 4 carbonos quaternários, 4 metínicos, 5 metilênicos e 2 metílicos. Em comparação com LacA, observou-se uma diminuição de carbonos metínicos e aumento de carbonos metilênicos (Tabela 10).

Novamente observou-se a presença de um sinal em δ 120,8, correspondente a um metileno (CH_2), indicando a presença de dupla ligação exocíclica (dupla terminal).

Os sinais observados em δ 170,2 (C), 139,7 (C), 120,8 (CH_2) e 81,8 (CH), caracterizou também a presença de um anel α -metileno- γ -lactona.

Observou-se também a presença de um sinal correspondente a carbono carbonílico de cetona δ 218,8 (C), contudo sem presença de uma dupla ligação conjugada.

Tabela 10. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância LacB.

Carbono	δ (ppm)	multiplicidade	δ (ppm) Literatura
C1	46,2	CH	47,4
C2	33,5	CH_2	163,4
C3	36,1	CH_2	130,9
C4	218,8	C	210,5
C5	55,0	C	56,0
C6	81,8	CH	80,1
C7	44,5	CH	44,5
C8	25,8	CH_2	29,6
C9	24,0	CH_2	24,7
C10	34,4	CH	33,7
C11	170,2	C	170,3
C12	139,7	C	138,0
C13	120,8	CH_2	119,8
C14	13,8	CH_3	17,4
C15	15,9	CH_3	17,2

Novamente para confirmação das atribuições, analisou-se os espectros de correlação ^1H - ^1H (HOMOCOSY) (Figura 24) e ^{13}C - ^1H (HETCOR) (Figura 25) e espectro de correlação ^{13}C - ^1H à longa distância (HMBC) (Figuras 26), permitindo estabelecer as conectividades necessárias para definir o esqueleto da estrutura e realizar a atribuição dos hidrogênios e carbonos.

Os dados observados nas análises dos espectros de correlação de ^1H - ^1H (HOMOCOSY) e ^{13}C - ^1H (J^1) (HETCOR) e espectro de correlação ^{13}C - ^1H à longa distância ($J^{2,3}$) (HMBC) estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Iniciou-se o estabelecimento de conectividades C-C, a partir do carbono com δ 81,8 e hidrogênio δ 4,54, típico de anel lactônico. Através das correlações observadas nos espectros citados foi possível atribuir os carbonos C7, C8, C9, C10, C15, C1, C2 e C3 e seus respectivos hidrogênios, evidenciando novamente um esqueleto do tipo pseudoguainolídeo, com anel na posição 6,7 cuja estrutura corresponde a LS, já previamente isolada em outra espécie, damsina (Figura 28).

Tabela 11. Correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) e ^{13}C - ^1H (HETCOR) observadas nos espectros da substância LacB.

δ ^1H - ^1H (ppm)	δ ^{13}C - ^1H (ppm)
6,27-3,31	120,8-6,27
5,54-3,31	120,8-5,54
4,53-3,31	81,8-4,54
3,31-2,08	46,2-2,53
3,31-1,86	46,2-2,47
2,47-2,25	44,5-3,31
2,47-2,08	36,1-2,47
2,25-2,08	34,4-2,24
2,25-1,86	33,5-1,86
2,25-1,07	33,5-1,72
	25,8-2,08
	25,8-1,86
	24,0-2,08
	24,0-1,86
	15,9-1,07
	13,8-1,08

Tabela 12. Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância ($J^{2,3}$) (HMBC) observadas para LacB.

δ ^{13}C - ^1H (ppm)	δ ^{13}C - ^1H (ppm)
218,8 - 4,54	46,2 - 2,08
218,8 - 2,53	46,2 - 1,74
218,8 - 2,47	46,2 - 1,08
218,8 - 1,86	44,5 - 6,27
218,8 - 1,08	44,5 - 5,54
170,2 - 6,27	44,5 - 4,54
170,2 - 5,54	36,1 - 1,86
170,2 - 4,54	36,1 - 1,74
139,7 - 6,27	34,4 - 2,08
81,8 - 2,08	34,4 - 1,07
81,8 - 1,08	25,8 - 4,54
55,0 - 1,86	25,8 - 1,86
55,0 - 1,08	24,0 - 2,08
46,2 - 2,47	

As correlações observadas no espectro de de correlação ^{13}C - ^1H à longa distância (HMBC) para alguns carbonos quaternários estão apresentadas na Figura 27.

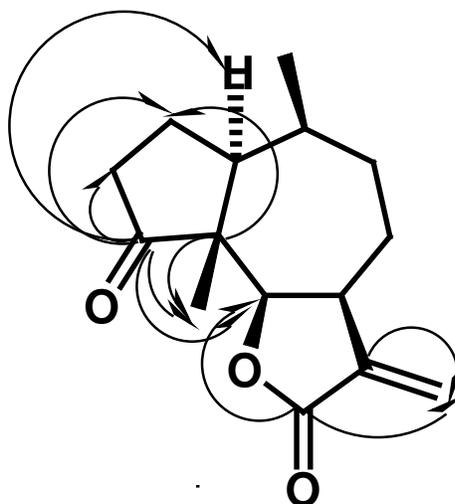


Figura 27. Algumas correlações à longa distância ^{13}C - ^1H observadas no espectro HMBC da substância LacB.

Foram utilizados os dados da literatura da substância ambrosina (UGAZ, 1994), pela semelhança da estrutura com a damsina, para comparação com os dados obtidos durante esse estudo para LacB. Os dados comparados estavam de acordo diferindo apenas nos carbonos C2 e C3 devido a ausência da ligação dupla conjugada a carbono carbonílico de cetona na estrutura da damsina, e que esta presente na estrutura da ambrosina.

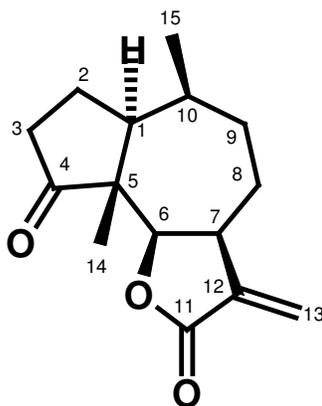


Figura 28. Estrutura da lactona sesquiterpênica damsina

A damsina também é um pseudoguaianolídeo com propriedade moluscicida comprovada por Shoeb e El Emam (1976) (GEERTS *et al.*, 1991). Também são descritas atividades citotóxica e antitumoral da substância (RODRÍGUEZ *et al.*, 1976). A lactona sesquiterpênica damsina também possui em sua estrutura o grupo funcional α -metileno- γ -lactona. Esse é o primeiro relato do seu isolamento de *A. artemisiifolia*.

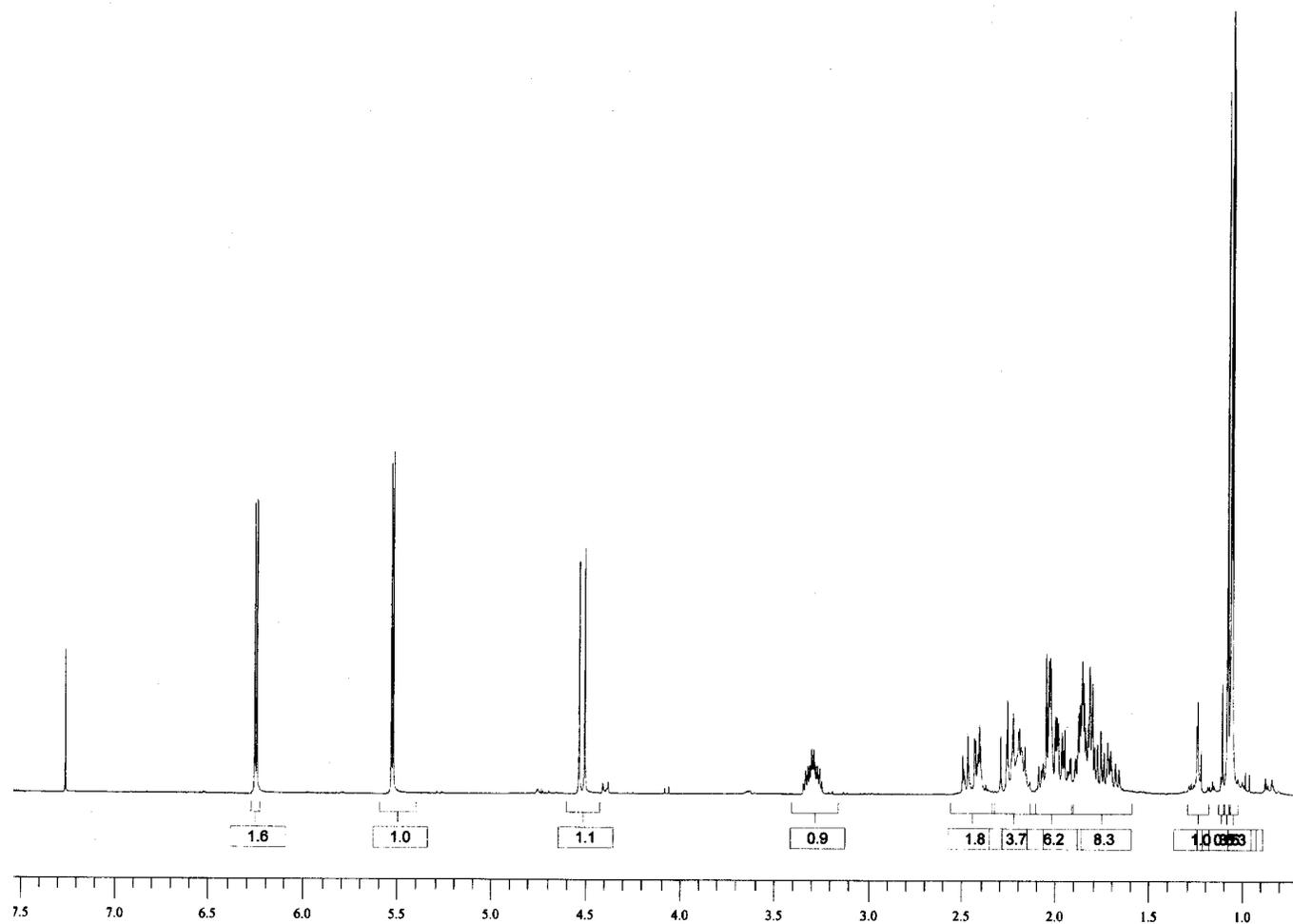


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de LacB.

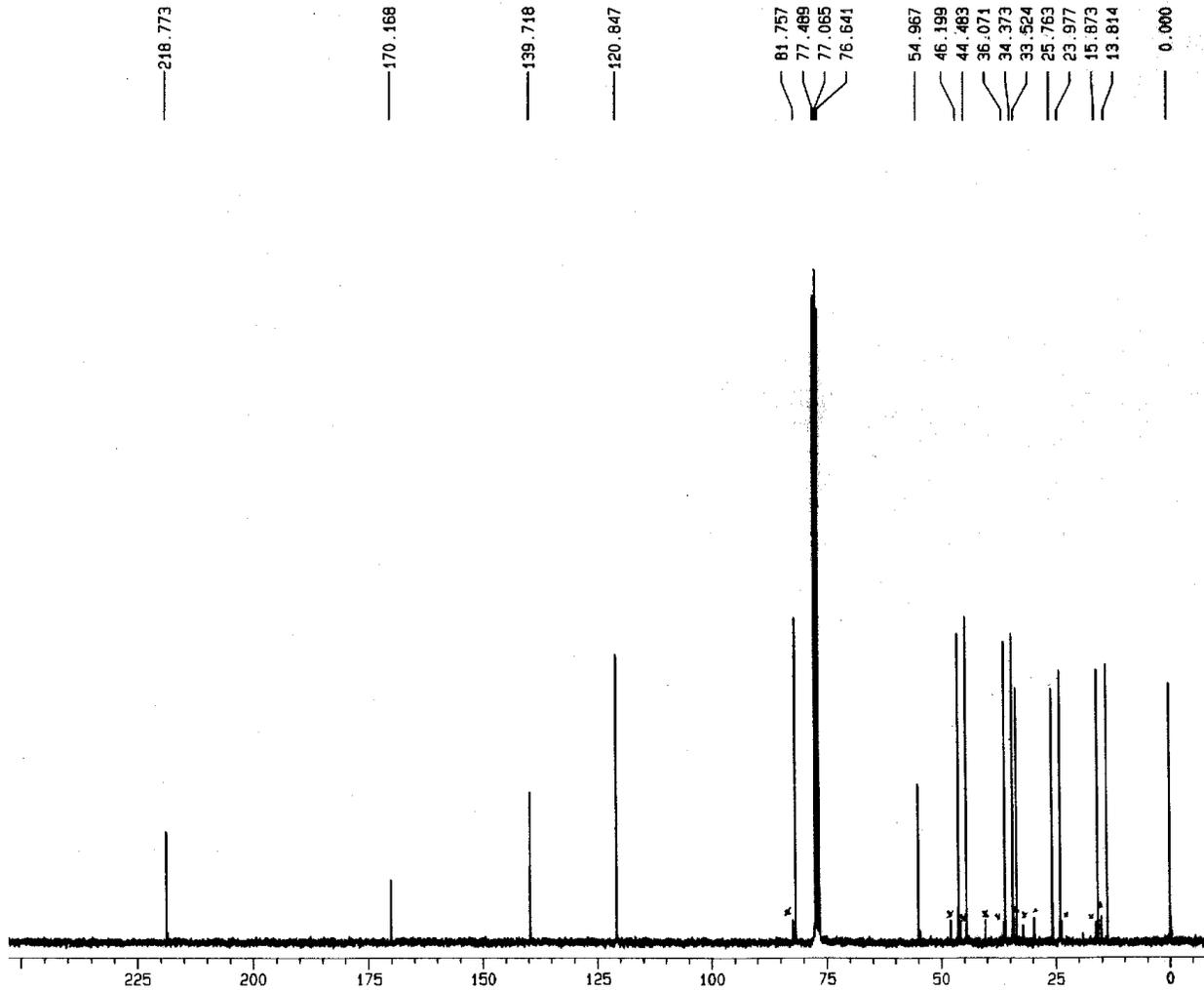


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (HBB) (75 MHz, CDCl_3) de LacB.

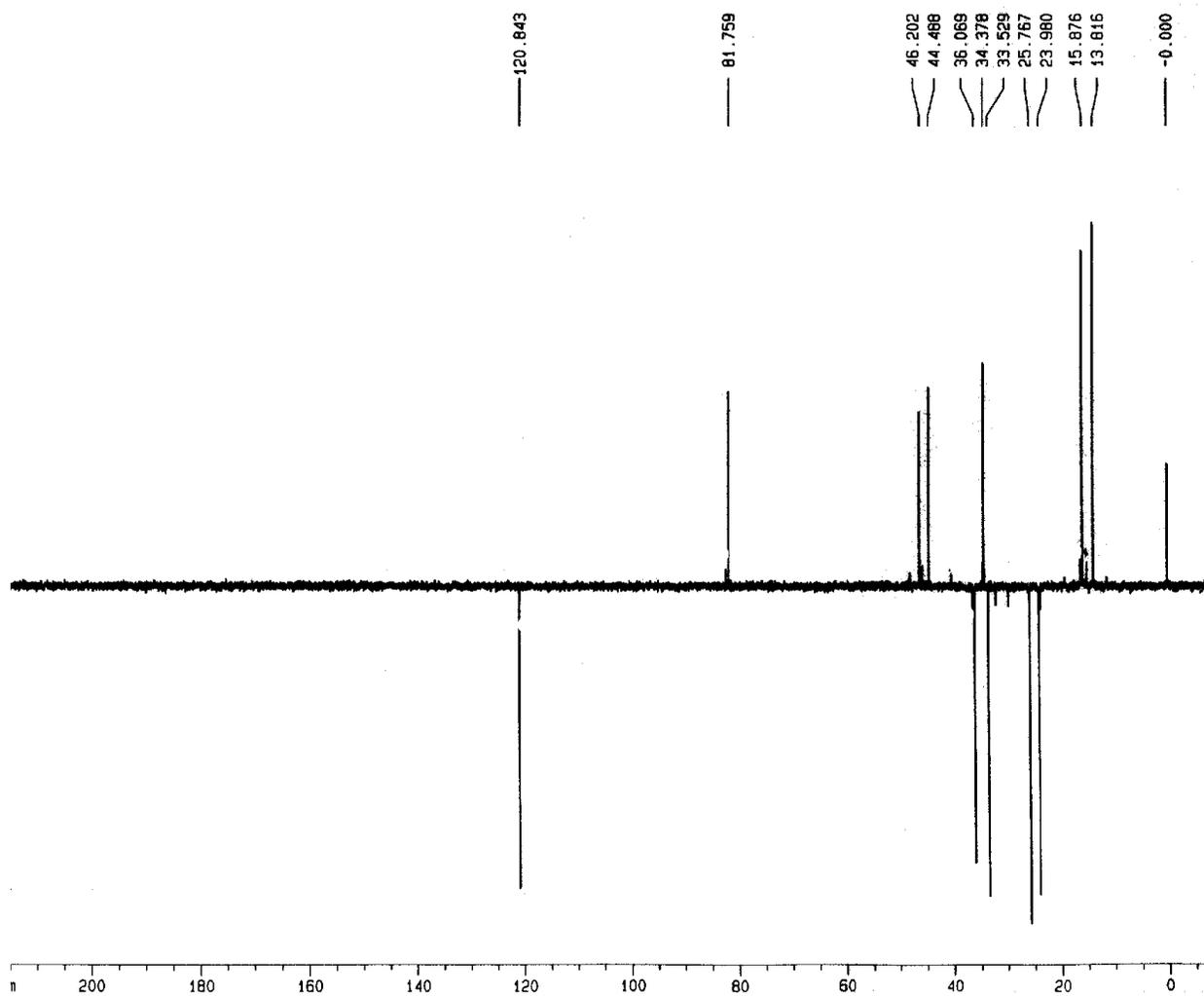


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) (75 MHz, CDCl_3) de LacB.

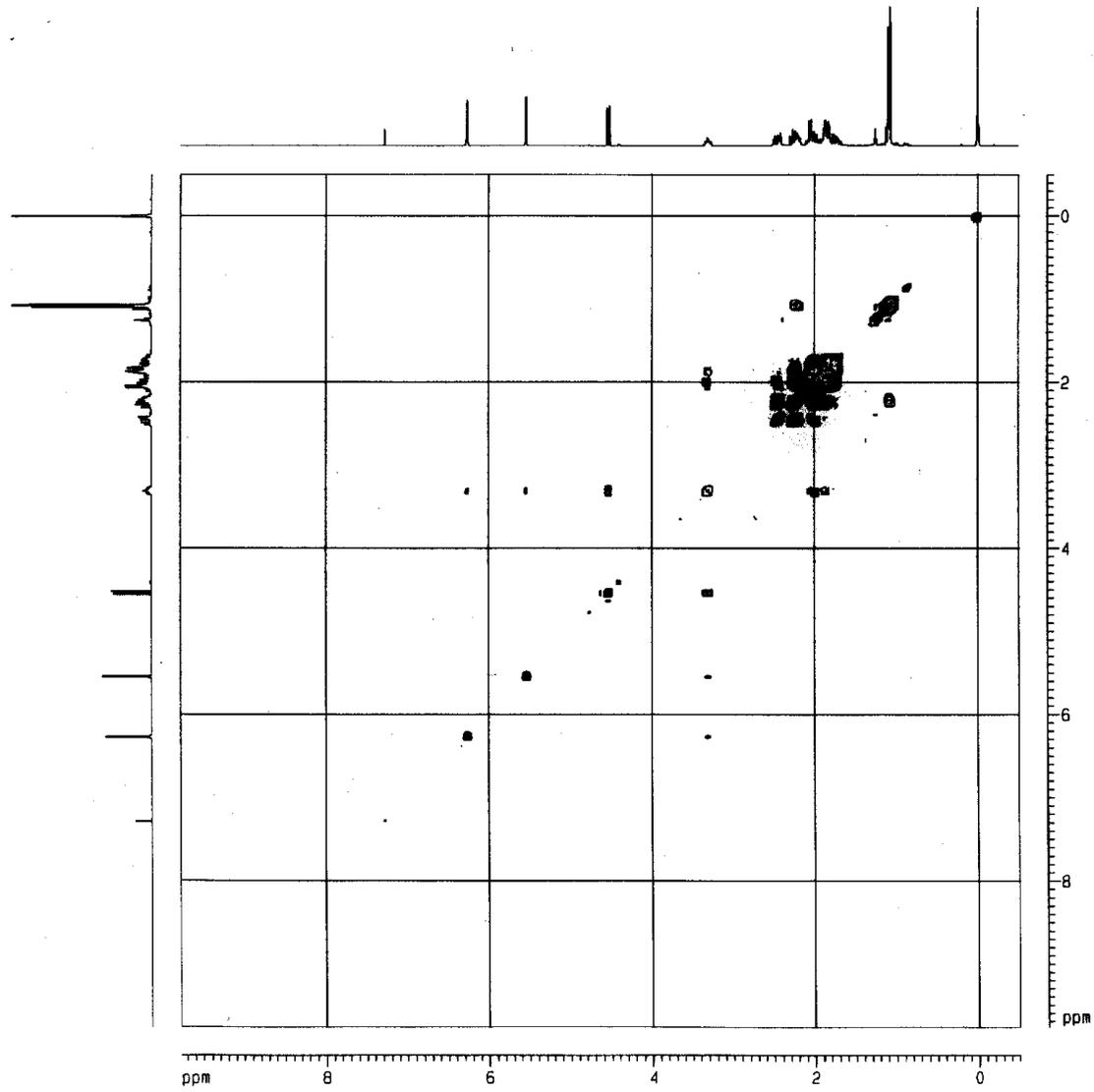


Figura 24. Espectro de correlações ^1H - ^1H (HOMOCOSY) de LacB.

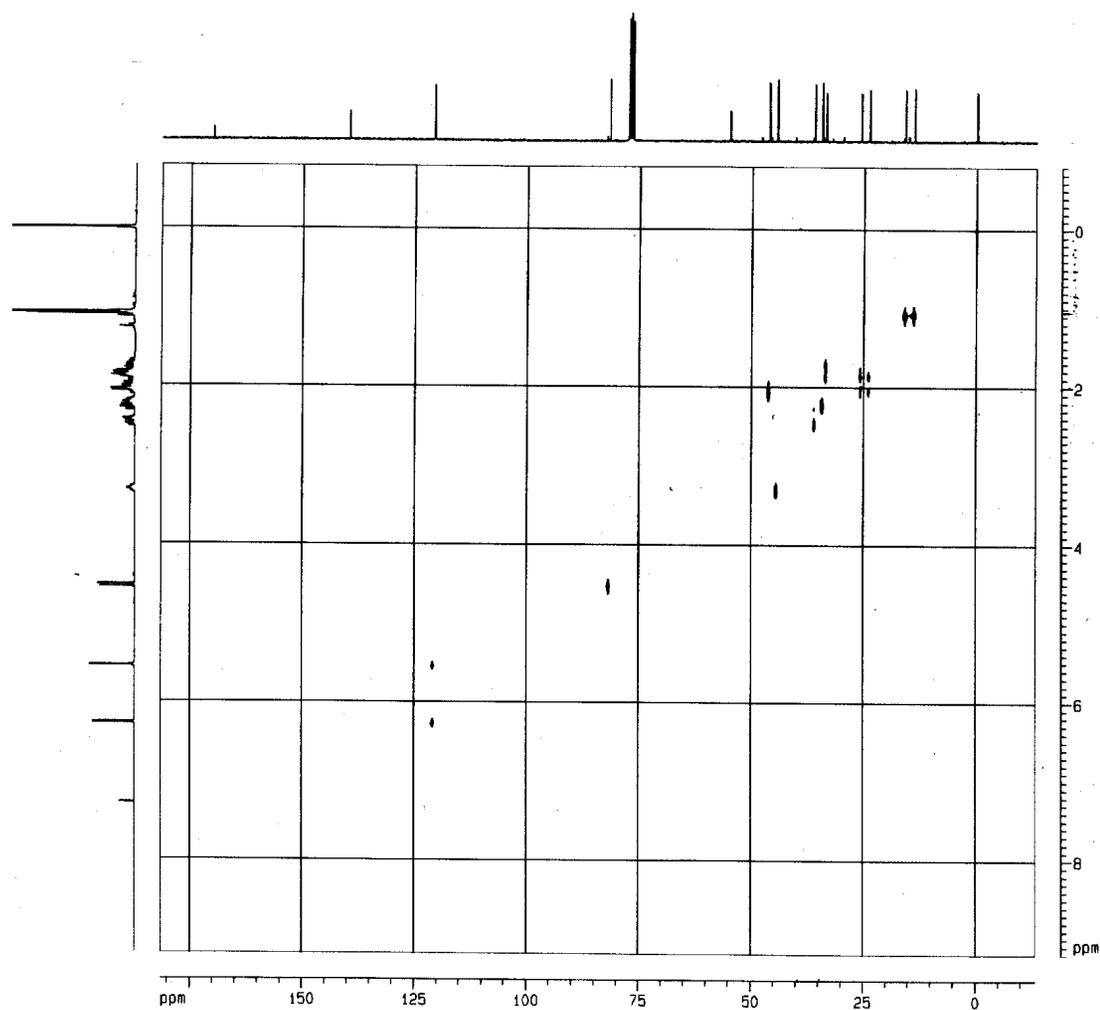


Figura 25. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H (HETCOR) de LacB.

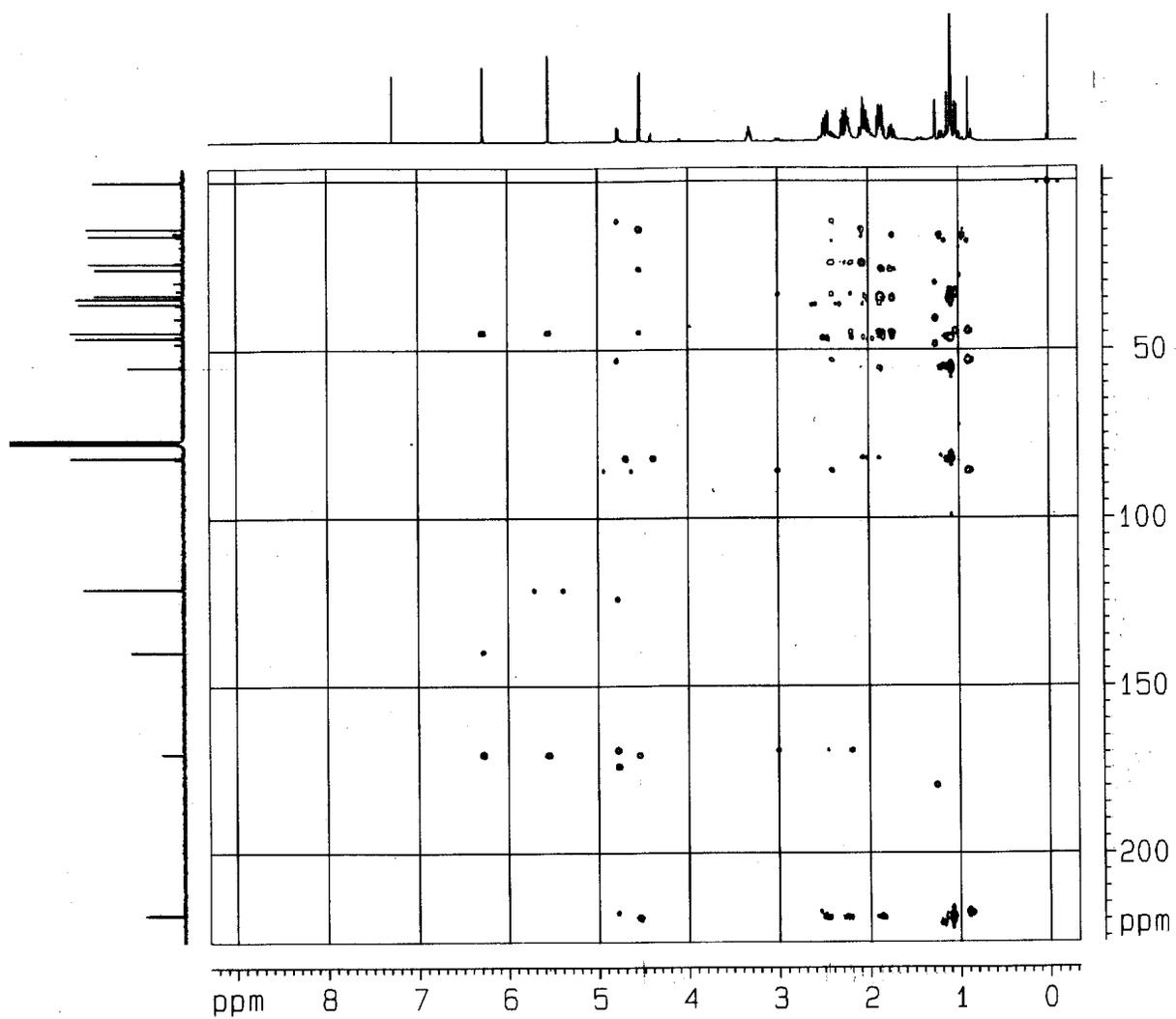


Figura 17. Espectro de correlações ^{13}C - ^1H à longa distância (HMBC) de LacB.

4.1.3. Identificação de Lac C

A fração 92-3/C1, codificada como LacC, após sua purificação apresentou-se sobre a forma de um sólido branco, característico de LS. Na análise de CCD em fase normal, a substância apresentou um R_F de 0,58, quando eluída em sistema DCM/Acetona (95:5) e apresentando coloração alaranjada escura quando revelada com solução de anisaldeído após aquecimento.

Foi obtido um espectro de RMN de ^1H (200 MHz) (Figura 29), onde os dados obtidos estão apresentados na Tabela 13. A substância no decorrer das análises degradou-se, fato esse que pode ser confirmado posteriormente por análises em CCD e CLAE (Figura 43). Tal fato impossibilitou a realização de outras análises espectroscópicas necessárias para a sua identificação.

Tabela 13. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância LacC.

δ (ppm)	multiplicidade	J (Hz)	Nº de H
6,26	<i>d</i>	3,5	1
5,97	<i>s</i>	-	1
5,53	<i>d</i>	3,1	1
4,42	<i>d</i>	8,8	1
3,28	<i>m</i>	-	1
3,10	<i>s</i>	-	1
2,94	<i>d</i>	5,7	2
2,88	<i>t</i>	3,1	2
2,75	<i>d</i>	2,2	1
2,05	<i>m</i>	-	3
1,76	<i>m</i>	-	3

Contudo pôde-se observar alguns sinais típicos de LS como δ 4,42 em dubleto, que indica a presença de anel lactônico, δ 6,26 (*d*) e 5,97 que correspondem presença de insaturações. Esses sinais indicam que a substância LacC trata-se de uma outra LS.

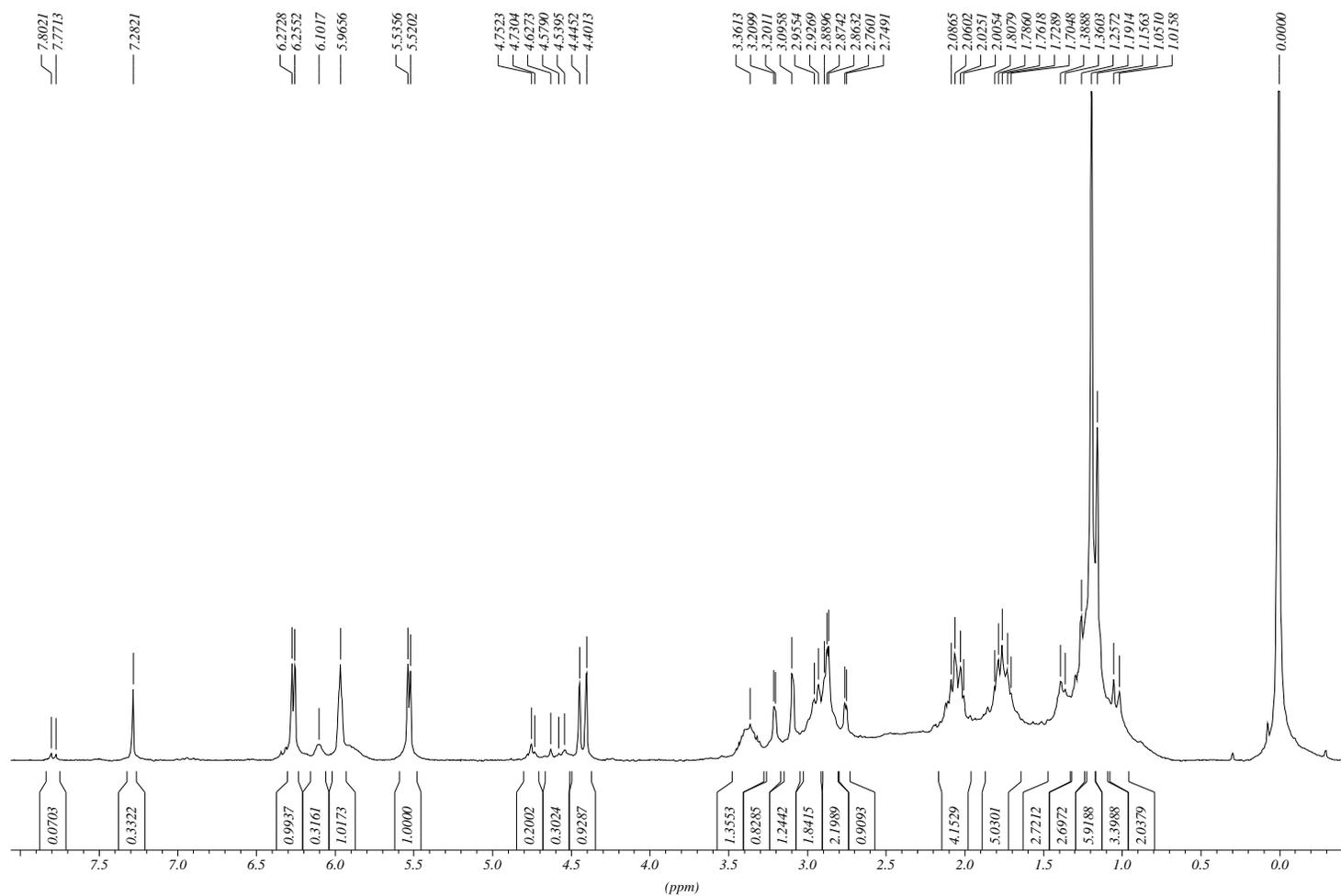


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de LacC.

4.1.4. Identificação de Lac D (14-14 a 16)

A substância isolada da fração 14-14-16, codificada como LacD, após purificação apresentou-se também como um sólido branco.

Na análise de CCD de fase reversa, utilizando o sistema de eluição ACN/H₂O (9:1), a substância apresentou R_F igual a 0,42 e coloração roxa quando revelada com solução de anisaldeído sob aquecimento. Em análise de CCD de fase normal utilizando sistema de eluição DCM/éter (95:5), a substância apresentou um R_F de 0,69 e coloração roxa mais clara, quando revelada com solução de anisaldeído sob aquecimento.

Foram obtidos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C (Figuras 30 e 31), onde pôde-se observar que a amostra não se encontrava pura. No entanto, observou-se a presença no espectro de RMN de ¹H de duas metilas em dubleto de 6,6 Hz (δ 1,06 e 0,96) indicando tratar-se de um grupo iso-propila, além de sinais referentes a insaturações (δ 8,00, δ 6,93, δ 5,51 e δ 5,30) e metoxila (δ 3,87).

Observou-se também a presença de um grupo carboxi-metila, devido aos sinais δ 165,9 (C) e δ 55,5 (CH₃).

Os dados obtidos (Tabelas 14 e 15) não permitiram apresentar uma proposta estrutural a substância, devido à sua pureza. Contudo os dados indicam não se tratar de uma LS.

Tabela 14. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância LacD.

δ (ppm)	multiplicidade	J (Hz)	N ^o de H
8,00	d	8,8	2
6,93	d	9,2	2
5,51	d	6,6	1
5,30	d	6,6	1
3,87	s	-	3
2,40	m	-	1
2,36	m	-	1
2,30	m	-	1
2,15	m	-	1
2,05	m	-	1
1,85	m	-	1
1,70	s	-	3
1,70	m	-	1
1,65	m	-	1
1,55	m	-	1
1,45	m	-	1
1,07	s	-	2
1,06	d	6,6	3
0,96	d	6,6	3

Tabela 15. Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância LacD.

δ (ppm)	multiplicidade
165,9	C
163,3	C
131,5	CH
123,2	CH
121,8	C
113,7	CH
83,3	C
77,9	CH
55,5	CH
53,6	C
36,1	CH ₂
35,6	CH ₂
30,3	CH ₂
26,7	CH
25,8	CH ₃
24,8	CH ₂
24,6	CH ₃
22,8	CH ₃
21,3	CH ₃

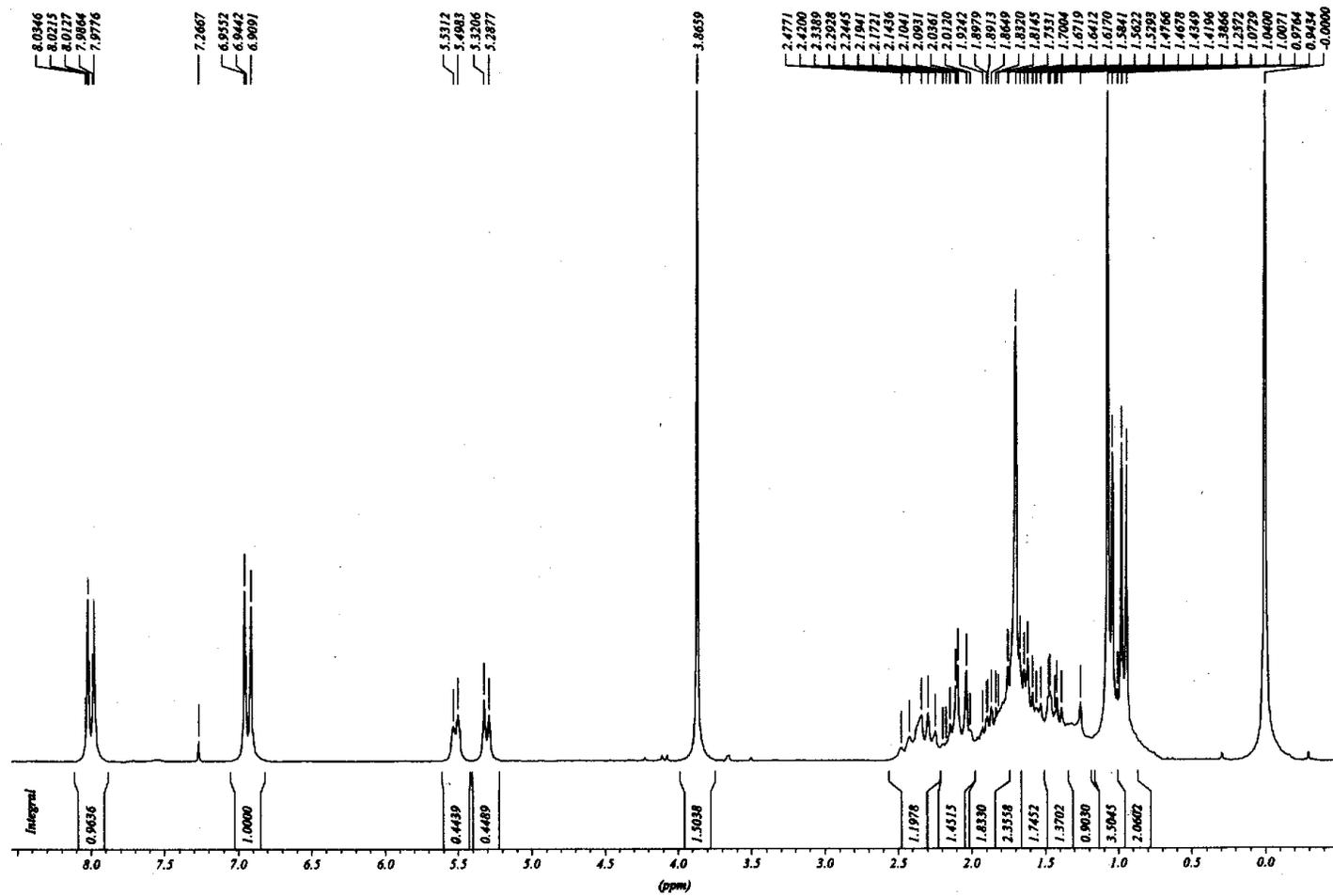


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de LacD.

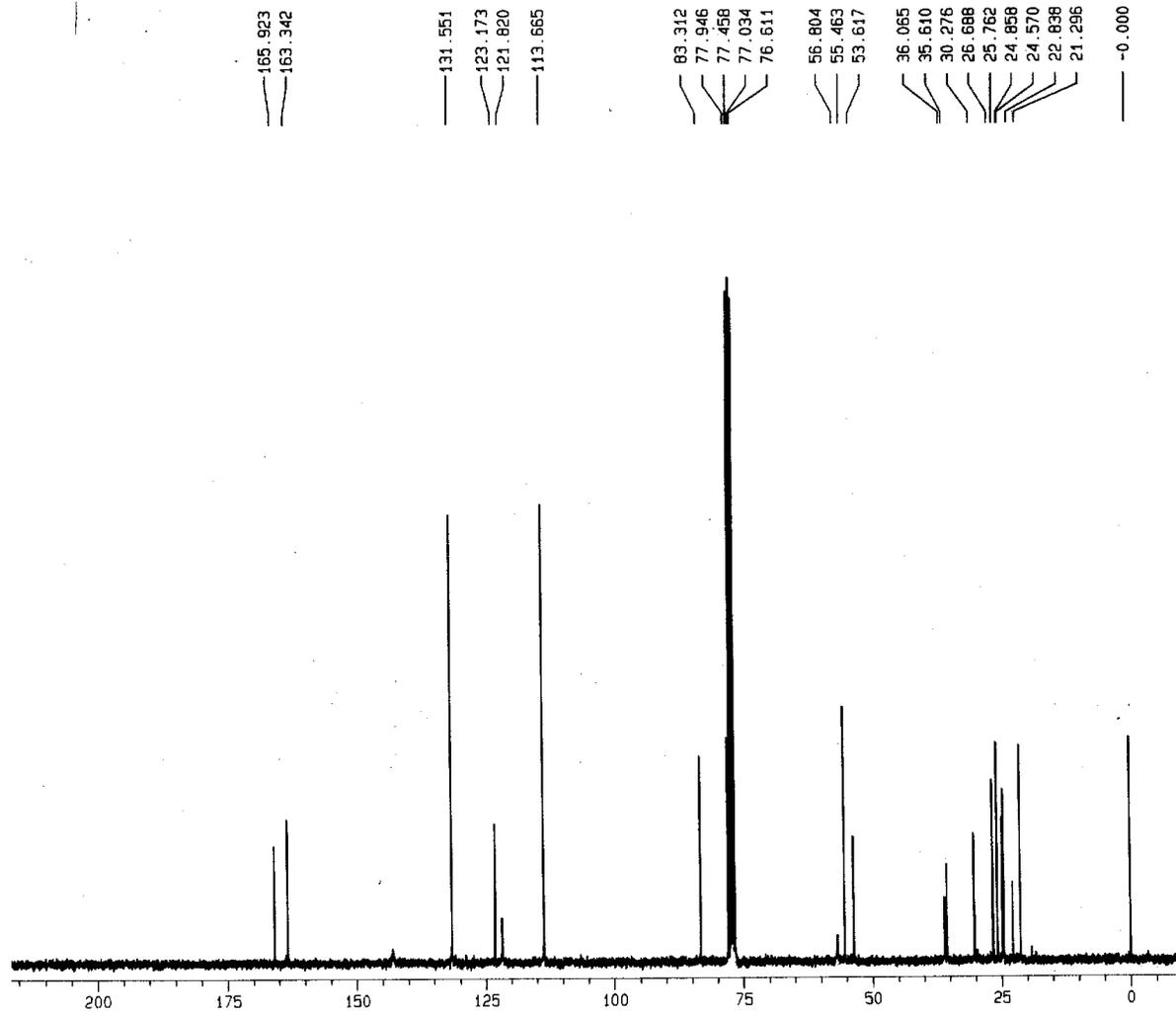


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (HBBD) (75 MHz, CDCl_3) de LacD.

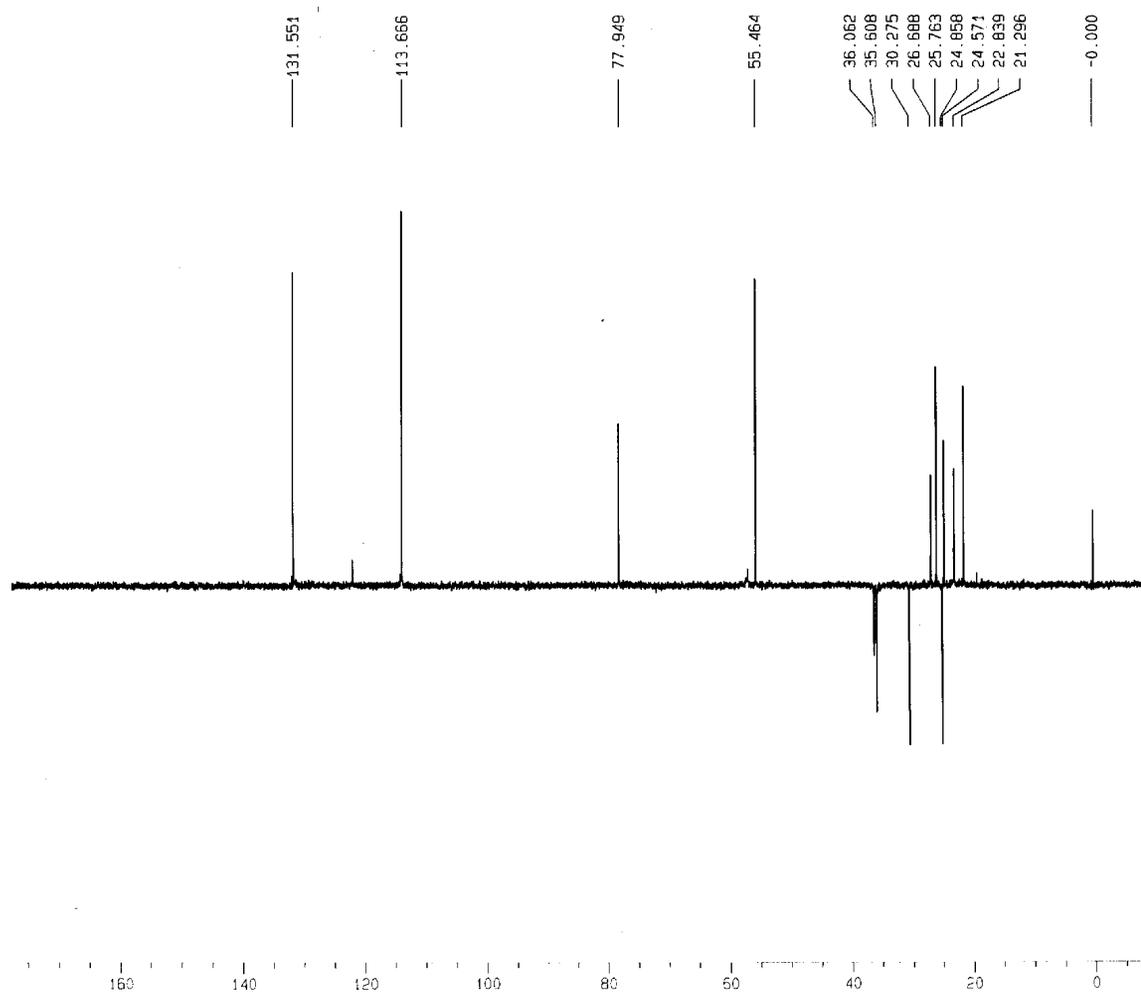


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) (75 MHz, CDCl_3) de LacD.

4.2. Análise dos marcadores isolados

O uso de uma planta medicinal como matéria-prima para elaboração de um fitoterápico, requer estudos prévios científicos que disponibilizem conhecimentos que possam caracterizar parâmetros para a avaliação da eficácia e segurança de seu uso. Assim como parâmetros para o monitoramento de reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Essa fundamentação para o desenvolvimento de um produto fitoterápico propriamente dito, o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular.

Os componentes ou classe de componentes químicos presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente o próprio princípio ativo, e que tenha correlação com o efeito terapêutico do fitoterápico, são denominados marcadores químicos. Esses são utilizados como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos originados da mesma (RDC 48, 2004).

Portanto, os marcadores isolados nesse estudo podem ser parâmetros importantes para o controle de qualidade da espécie estudada e parte fundamental para o desenvolvimento de um fitoterápico.

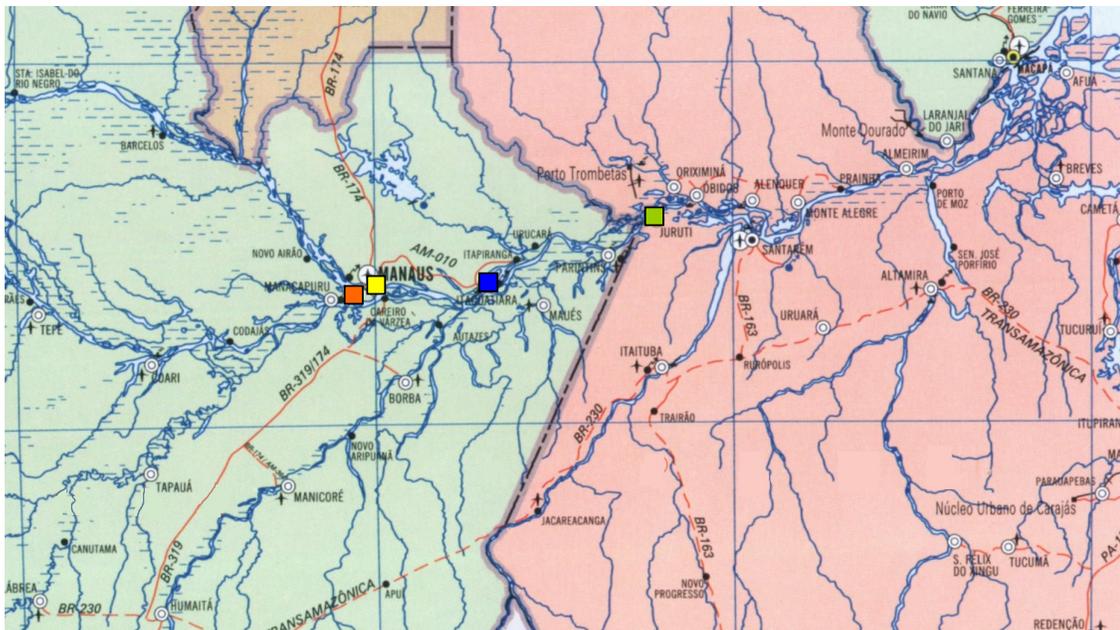
Estudos anteriores realizados com a espécie *A. artemisiifolia* (STEFANOVIC, ALJANCICSOLAJA & MILOSAVIJEVIC, 1986; PORTER & MABRY, 1968; PORTER *et al.*, 1969; STEFANOVIC, 1987; RASZEJA & GILL, 1997), descreveram o isolamento de diferentes LS, a partir de indivíduos coletados em diferentes localidades geográficas.

Neste estudo chegou-se também ao isolamento de LS não descritas anteriormente. Portanto procurou-se realizar o monitoramento da presença dessas LS em outros indivíduos coletados em diferentes localidades na Amazônia.

Esse monitoramento foi realizado por CLAE, nos extratos ECA e EA, visando avaliar a variabilidade entre eles, em relação às LS isoladas.

4.2.1. Indivíduos coletados

Os indivíduos foram coletados em diferentes localidades na região Norte (Figura 33), procurando sempre confirmar informações do uso da planta na localidade da coleta.



Legenda: ■ Iranduba, ■ Juruti, ■ Manaus e ■ Itacoatiara

Figura 33. Destaque do mapa da região amazônica, mostrando as áreas de coleta dos indivíduos (IBGE, 2002).

Tabela 16. Teor extrativo dos indivíduos estudados

Coletas	Data da coleta	serragem (g)	EA Ext.Aquoso		Serragem (g)	Ext.CHCl ₃		Ext.MeOH	
			Massa (g)	Teor %		Massa (g)	Teor %	Massa (g)	Teor %
Irاندuba (AM)	04/05/03	60	12,60	20,90	314,00	16,40	5,20	11,36	3,62
Juruti (PA)	27/07/03	60	9,10	15,17	387,30	14,60	3,77	15,51	4,00
Manaus (AM)	27/02/04	60	9,80	16,33	302,00	13,70	3,40	26,35	8,72
Itacoatiar (AM)	03/08/04	60	14,69	24,50	392,30	14,50	3,70	27,04	6,89

Através da análise do gráfico dos teores dos extratos aquosos obtidos (Figura 34), observou-se que o indivíduo coletado em Itacoatiara, apresentou o maior valor extrativo. Esse indivíduo foi coletado numa fase de crescimento em que o mesmo apresentava somente folhas. Os indivíduos os quais apresentavam grande quantidade de flores e inflorescência (Juruti e Manaus) apresentaram teores de EA similares e o indivíduo coletado em Irاندuba apresentou valor de teor de extrato EA um pouco mais alto que pode ser explicado pelo fato do mesmo apresentar estágio de crescimento intermediário entre os indivíduos (Tabela 16).

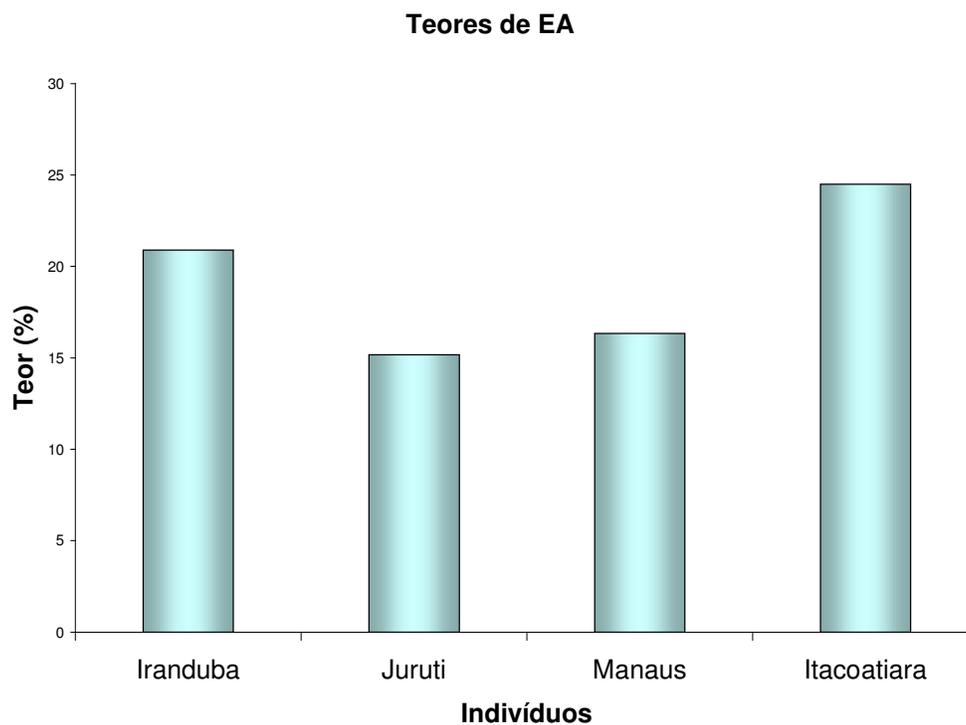


Figura 34. Gráfico dos teores (g/g) de extrato aquoso (EA) dos indivíduos estudados.

Como o material vegetal foi constituído de partes aéreas, a fase de crescimento dos indivíduos coletados, considerando a presença de folhas, flores e inflorescências, pode ser o fator responsável pelo teor extrativo dos indivíduos estudados.

Na avaliação do gráfico do valor do teor obtido de extrato clorofórmico (Figura 35), observou-se valores mais similares (Tabela 17) dos extratos obtidos a partir das partes aéreas dos indivíduos em estudo. Porém, observou-se uma pequena variação do valor do teor de extrato do indivíduo coletado em Iranduba.

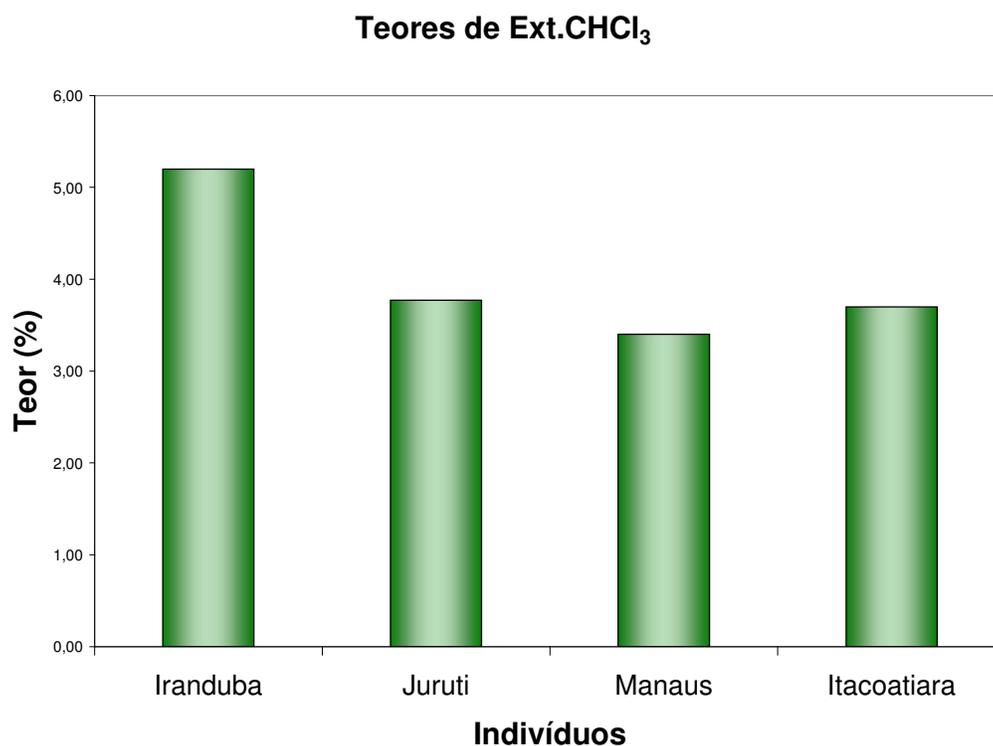
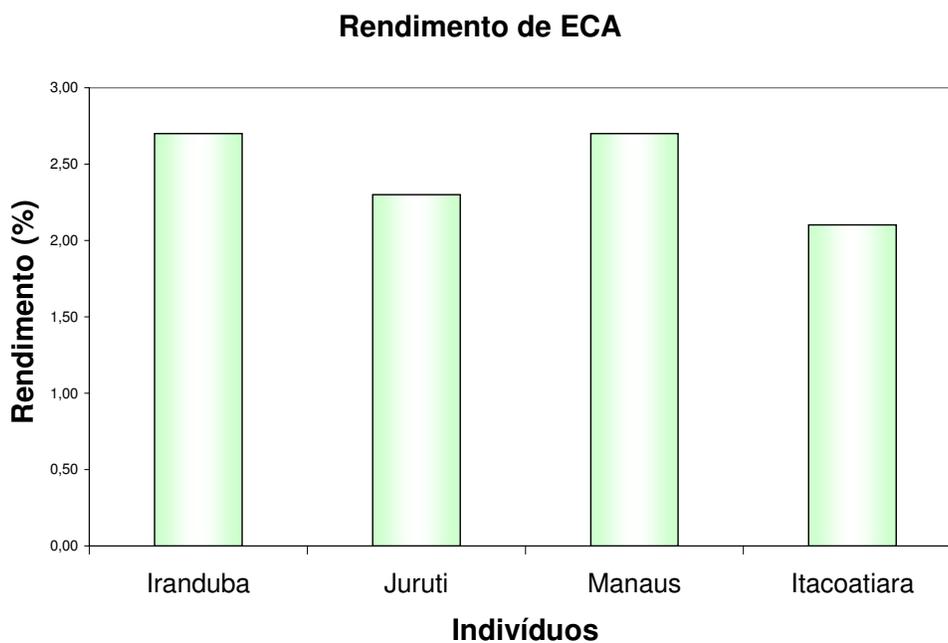


Figura 36. Gráfico dos teores (g/g) de extrato clorofórmico dos indivíduos estudados.

No gráfico de rendimento do extrato ECA (Figura 36) observou-se que os valores obtidos no processo de eliminação de clorofila dos extratos clorofórmicos (Ext.CHCl₃), foram bem similares entre si, obtendo-se cerca de 8 g de massa de extrato ECA de cada indivíduo em estudo (Tabela 17).

Tabela 17. Rendimento do extrato livre de clorofila (ECA)

Coletas	Datas da coleta	Peso Seco de serragem (g)	ECA	
			Massa (g)	Rendimento %
Irاندuba (AM)	04/05/03	314,00	8,60	2,74
Juruti (PA)	27/07/03	387,30	8,80	2,27
Manaus (AM)	27/02/04	302,00	8,20	2,72
Itacoatiara (AM)	03/08/04	392,30	8,20	2,09

**Figura 36.** Gráfico dos rendimentos (g/g) de extrato clorofórmico livre de clorofila (ECA) dos indivíduos estudados.

4.2.2 Comparação dos perfis cromatográficos dos indivíduos estudados

os perfis cromatográficos em 254 e 225 nm (Figura 37), obtidos das análises dos indivíduos estudados, observou-se tanto nos extratos ECA como nos extratos EA, principalmente os mesmos constituintes químicos, havendo apenas variação na

concentração dos mesmos. Observou-se uma boa separação entre os constituintes presentes.

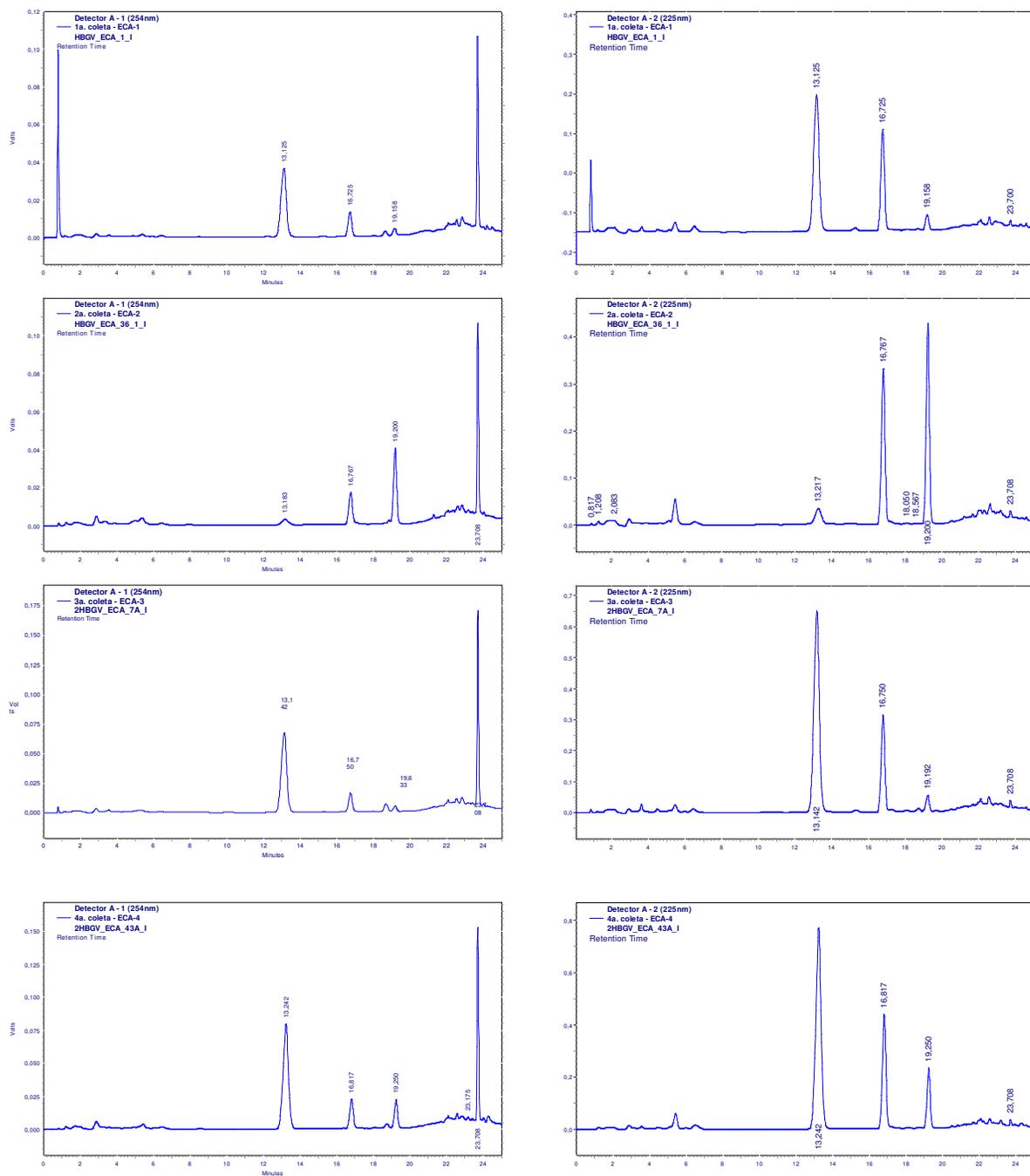


Figura 37. Perfis cromatográficos dos diferentes indivíduos de *A. artemisiifolia* analisados por CLAE, no extrato ECA em 254 nm (esquerda) e 225 nm (direita).

Através da coinjeção das substâncias isoladas com o extrato ECA (4^a coleta) (cromatogramas das Figuras 38, 39, 40 e 41), foi possível observar o aumento da intensidade dos picos correspondentes a cada marcador isolado, confirmando-se e identificando-se a presença de cada marcador no extrato analisado com tempos de retenção médios de 13,4 min para LacA, 16,6 min para LacB, 19,3 min para LacC e 23,7 para LacD.

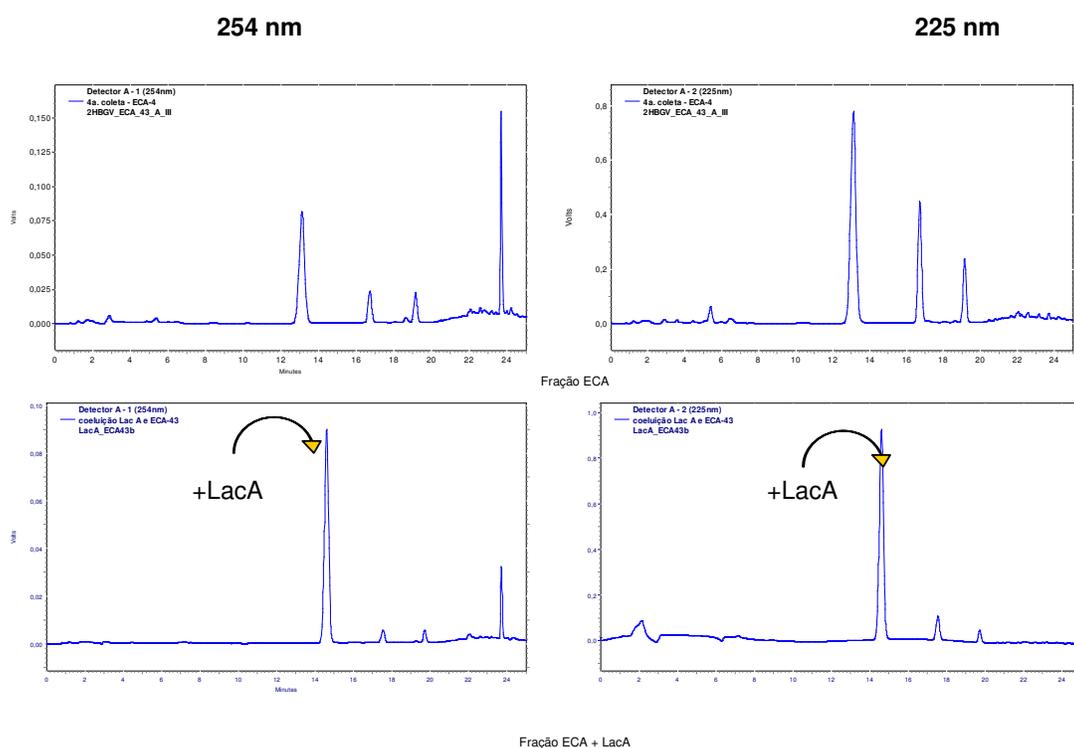


Figura 38. Perfis cromatográficos da fração ECA (4^a coleta) e o de coinjeção da substância LacA com o extrato ECA (4^a coleta) de *A. artemisiifolia* analisados por CLAE (254 e 225 nm).

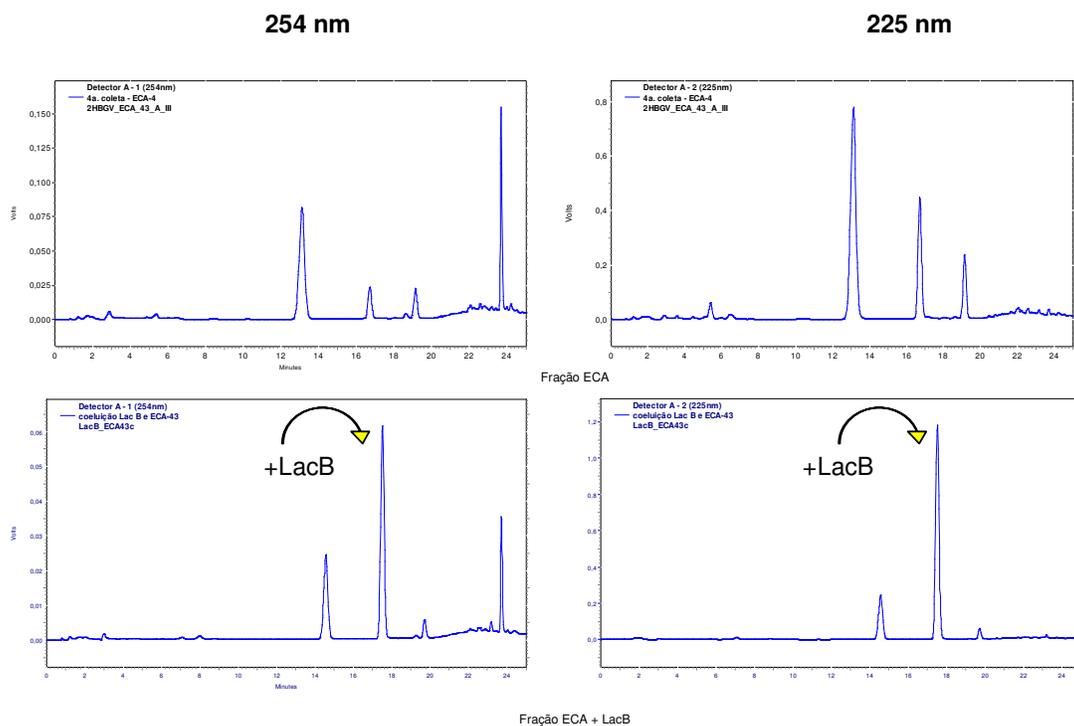


Figura 39. Perfis cromatográficos da fração ECA (4^a coleta) e o de coinjeção da substância LacB com o extrato ECA (4^a coleta) de *A. artemisiifolia* analisados por CLAE em (254 e 225 nm).

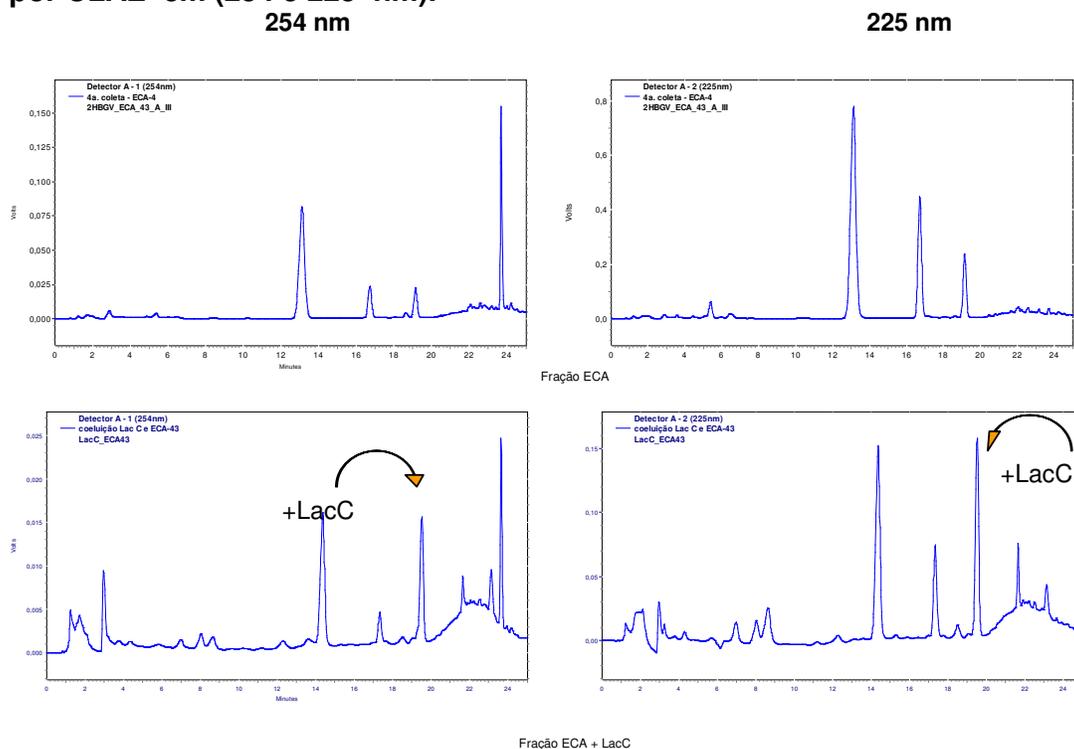


Figura 40. Perfis cromatográficos da fração ECA (4^a coleta) e o de coinjeção da substância LacC com o extrato ECA (4^a coleta) de *A. artemisiifolia* analisados por CLAE em (254 e 225 nm).

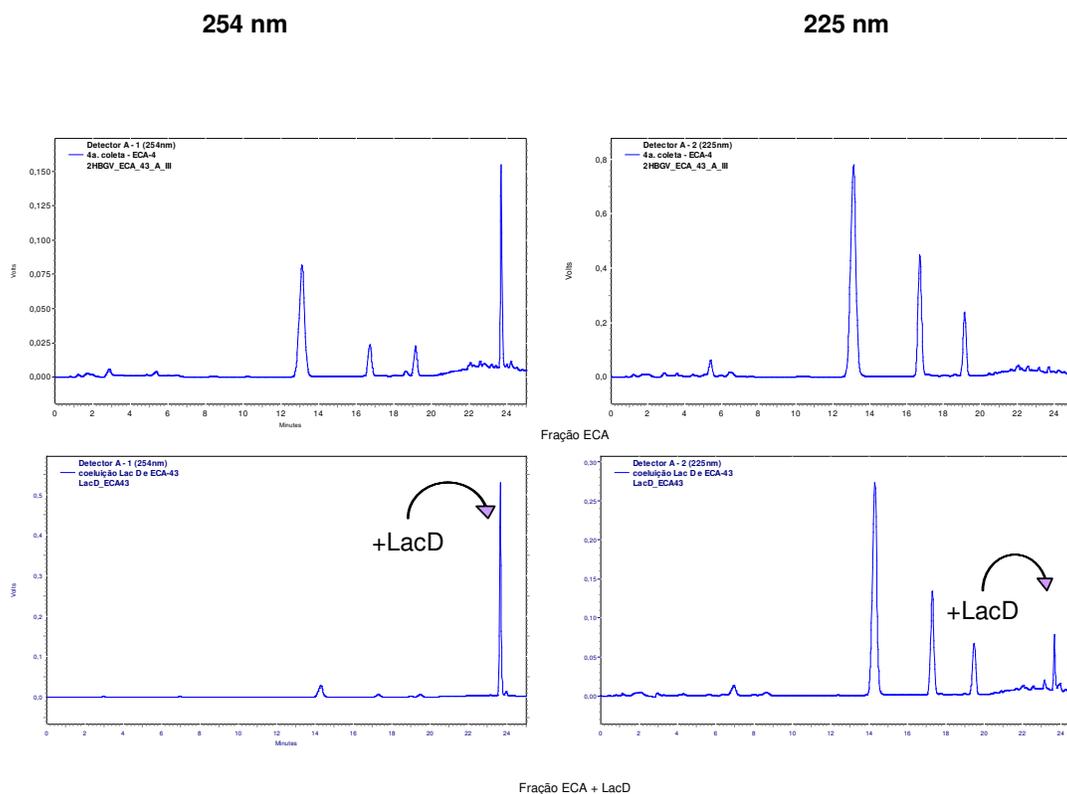


Figura 41. Perfis cromatográficos da fração ECA (4^a coleta) e o de coinjeção da substância LacD com o extrato ECA (4^a coleta) de *A. artemisiifolia* analisados por CLAE em (254 e 225 nm).

O método utilizado para análise por CLAE dos marcadores isolados nos diferentes indivíduos coletados, mostrou-se adequado para a separação dos marcadores LacA, LacB e LacC, apresentando boa reprodutibilidade nas análises.

No caso do marcador LacD, devido à presença de constituintes com tempos de retenção muito próximo a LacD, que se encontravam presentes no extrato analisado, não se observou boa separação.

Nos perfis cromatográficos em 254 nm e 225 nm dos extratos ECA dos diferentes indivíduos estudados, observou-se como constituintes majoritários os próprios marcadores LacA, LacB, LacC e LacD isolados.

Observou-se, também, através da análise dos cromatogramas dos extratos ECA e EA dos diferentes indivíduos estudados, uma melhor absorção dos marcadores LacA, LacB e LacC no comprimento de onda de 225 nm, normalmente observado para outras LS (MERFORT, 2002). No entanto, o marcador LacD apresentou melhor absorção em 254 nm como pode ser observado na Figura 41.

Após o tratamento por Seppak de fase reversa das amostras de extrato aquoso foi possível observar a presença dos marcadores isolados em todos os extratos obtidos, a partir das partes aéreas dos indivíduos estudados (Figura 42). A substância LacD apresentou-se como um pico minoritário em todas as amostras de extrato EA analisadas, provavelmente por sua menor lipofilicidade e conseqüentemente menor solubilidade em água.

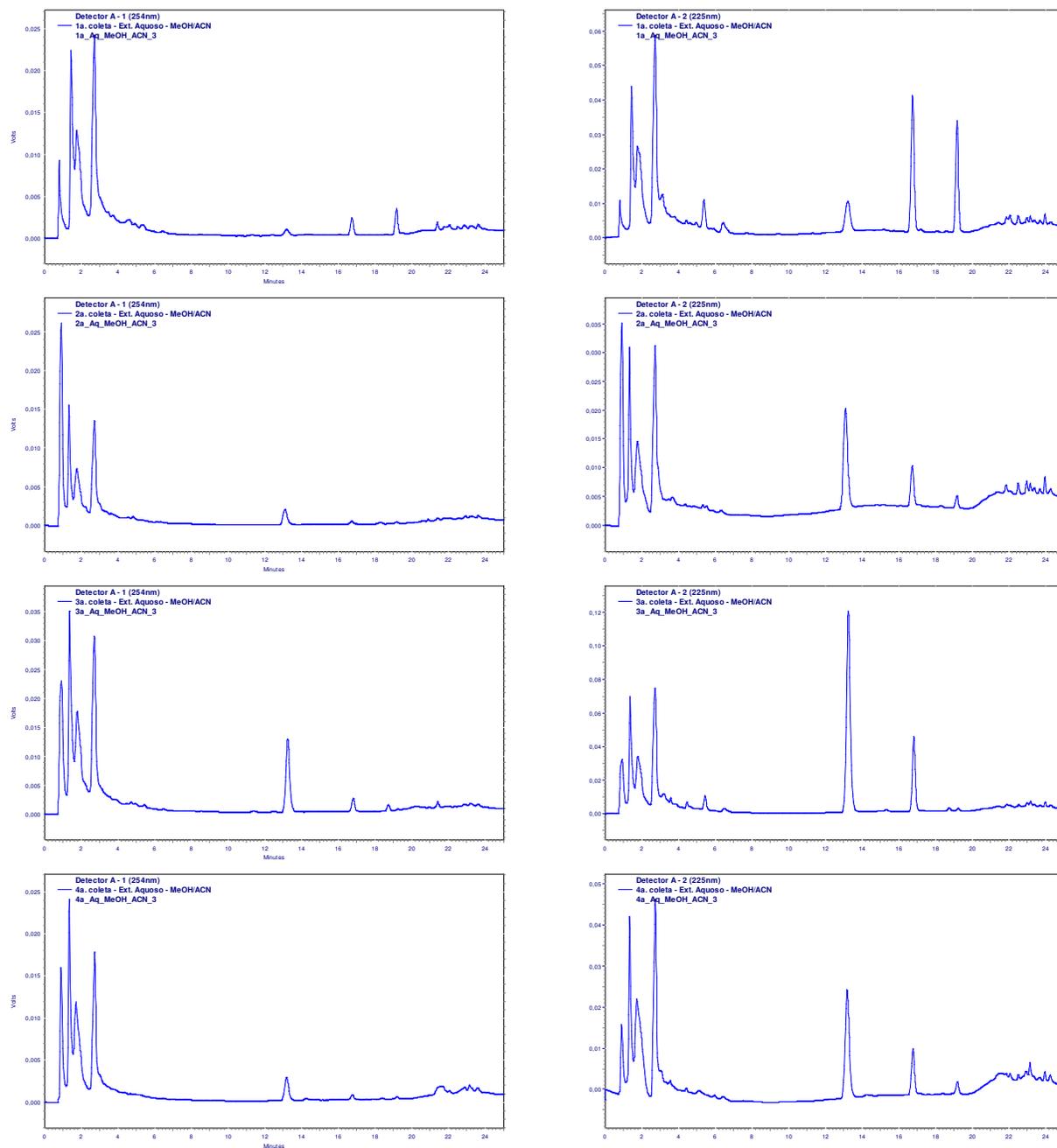


Figura 42. Perfis cromatográficos dos diferentes indivíduos de *A. artemisiifolia* analisados por CLAE das frações EA em 254 nm (esquerda) e 225 nm (direita).

4.2.2 Análise semi-quantitativa dos marcadores isolados

4.2.2.1 Análise de pureza dos marcadores

Processos de quantificação normalmente são dependentes da disponibilidade de padrões preferencialmente puros.

Através da análise por CLAE das soluções preparadas dos respectivos marcadores isolados, foi possível avaliar a pureza dos mesmos. Observou-se que a substância LacA, identificada como sendo a ambrosina, apresentou boa pureza no valor de 95,4% A (254 nm) e 95 % A (225 nm). A substância LacB, identificada como sendo a damsina, apresentou pureza de 78,4 %A (254 nm) e 88,7 %A (225 nm), enquanto LacD de 96,0%A (254 nm) e 55%A (225 nm). Os cromatogramas de análise de pureza das substâncias estão apresentados na Figura 43.

A substância LacC quando analisada em CCD de fase normal e fase reversa, logo depois de seu isolamento apresentou boa pureza, mas quando analisada por CLAE, depois de algum período apresentou-se impura, como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 43. Dos marcadores isolados a substância LacC demonstrou ser a mais instável. O espectro de RMN ^1H evidenciou sinais típicos de LS e sabe-se que essa classe de substância pode sofrer degradações (MERFORT, 2002).

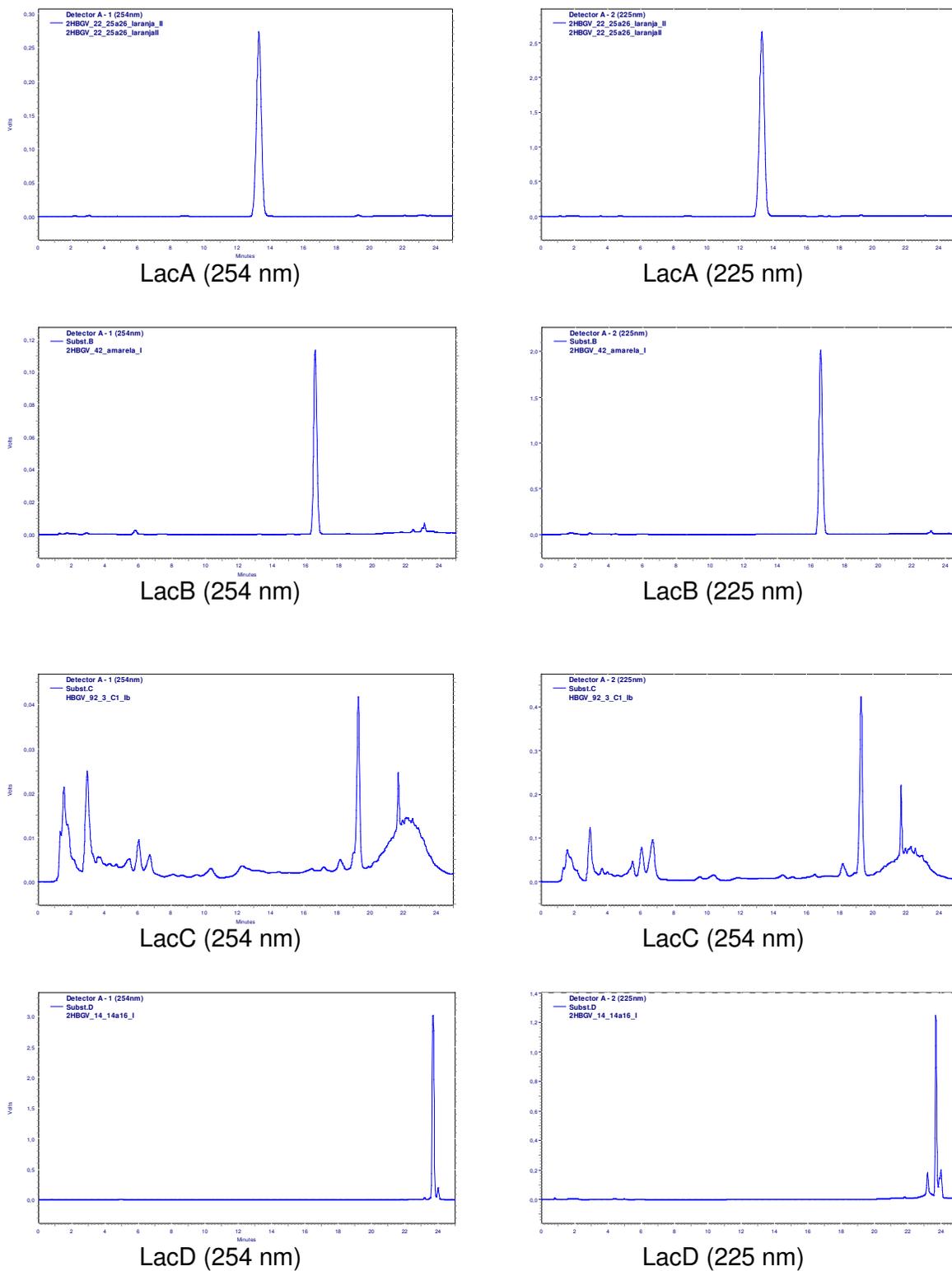


Figura 43. Perfis cromatográficos de LacA, LacB, LacC e LacD

4.2.3.2 Análise semi-quantitativa de LacA, LacB e LacD

Estudos de quantificação de LS, normalmente são realizados por CLAE, uma vez que LS são muitas vezes termoinstáveis, impedindo a sua quantificação por cromatografia gasosa (MERFORT, 2002).

Portanto, a quantificação dos marcadores foi realizada pelo método do padrão externo por CLAE.

Inicialmente realizou-se a injeção das soluções dos extratos ECA e EA, em triplicata, para verificar o intervalo de concentração dos marcadores isolados presentes nesses extratos (Tabelas 18 a 25). Em seguida, soluções de concentrações diferentes, preparadas a partir dos marcadores LacA, LacB e LacD, foram injetadas em duplicada. A partir dos resultados de áreas médias obtidos (Tabelas 26, 27 e 28), construiu-se as curvas para cada um dos marcadores. As concentrações das soluções padrões injetadas, abrangiam as concentrações médias observadas para os respectivos marcadores nos extratos ECA analisados previamente. As quantificações de cada marcador nos diferentes extratos foi obtida por extrapolação.

Tabela 18. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (1ª coleta)

Iranduba (AM) 04/ 05/ 03						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	769451	5696	0,74	7378528	188715	2,56
LacB	185688	3350	1,80	3652320	45328	1,24
LacD	714319	16161	2,26	97824	3318	3,39

Tabela 19. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (2ª coleta)

Juruti (PA) 27/ 07/ 03						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	77216	250	0,32	825321	62163	7,53
LacB	247500	403	0,16	4648873	35642	0,77
LacD	778237	16596	2,13	77801	3903	5,02

Tabela 20. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (3ª coleta)

Manaus (AM) 27/ 02/ 04						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	1425715	16876	1,18	13632491	78055	0,57
LacB	238834	3459	1,45	4461642	53088	1,19
LacD	1152870	4187	0,36	389889	12393	3,18

Tabela 21. Resultados médios dos marcadores no extrato ECA (4ª coleta)

Itacotiara (AM) 03/ 08/ 04						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	1652846	7095	0,43	15860958	15751	0,10
LacB	327271	1446	0,44	6232327	6788	0,11
LacD	1022057	25637	2,51	121127	1618	1,34

Tabela 22. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (1ª coleta)

Iranduba (AM) 04/ 05/ 03						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	12644	121	0,96	170821	5570	3,26
LacB	22801	327	1,43	423699	7254	1,71
LacD	3825	827	21,63	13292	2629	19,80

Tabela 23. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (2ª coleta)

Juruti (PA) 27/ 07/ 03						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	30663	248	0,81	257550	17582	6,83
LacB	5176	197	3,80	73674	5623	7,63
LacD	3955	734	18,55	7864	2779	35,33

Tabela 24. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (3ª coleta)

Manaus (AM) 27/ 02/ 04						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	184331	3529	1,91	1743929	31894	1,83
LacB	25439	534	2,10	486685	8784	1,80
LacD	2955	118	3,99	6827	378	5,53

Tabela 25. Resultados médios dos marcadores no extrato EA (4ª coleta)

Itacoatiara (AM) 03/ 08/ 04						
Marcadores	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
LacA	41678	1445	3,47	400017	10709	2,68
LacB	5897	178	3,01	119445	5029	4,21
LacD	2650	359	13,6	8644	262	3,03

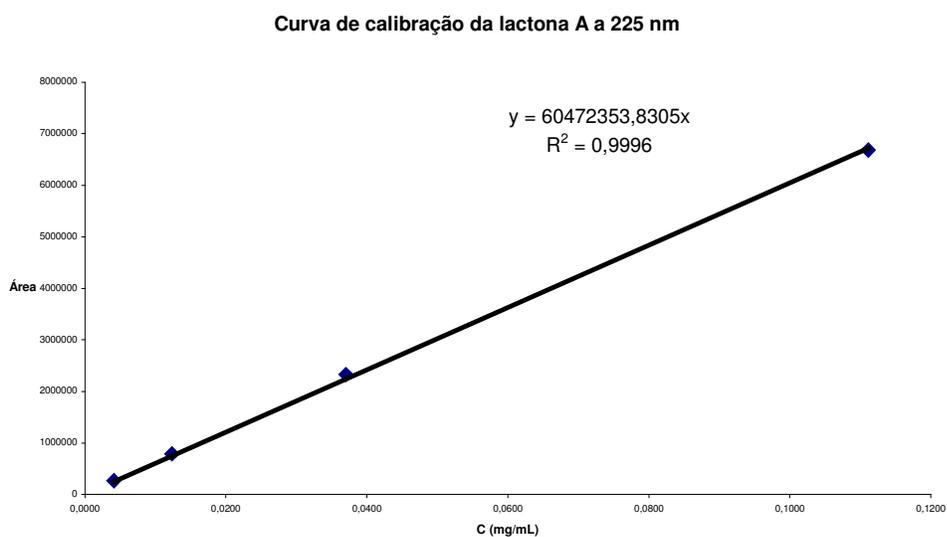
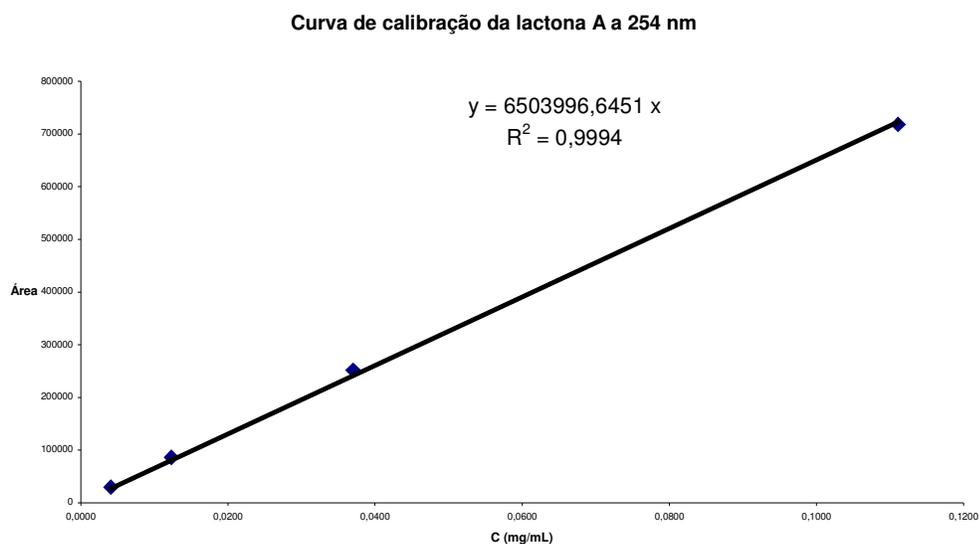


Figura 44. Curva de calibração de LacA em 254 e 225 nm

Tabela 26. Resultados médios obtidos das soluções padrões de LacA.

LacA (mg/mL)	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
0,1111	718308	20230	2,82	6685035	179107	2,68
0,0370	251649	2541	1,01	2325385	23465	1,01
0,0123	86356	2708	3,14	790797	28067	3,55
0,0041	29404	360	1,22	266302	2244	0,84

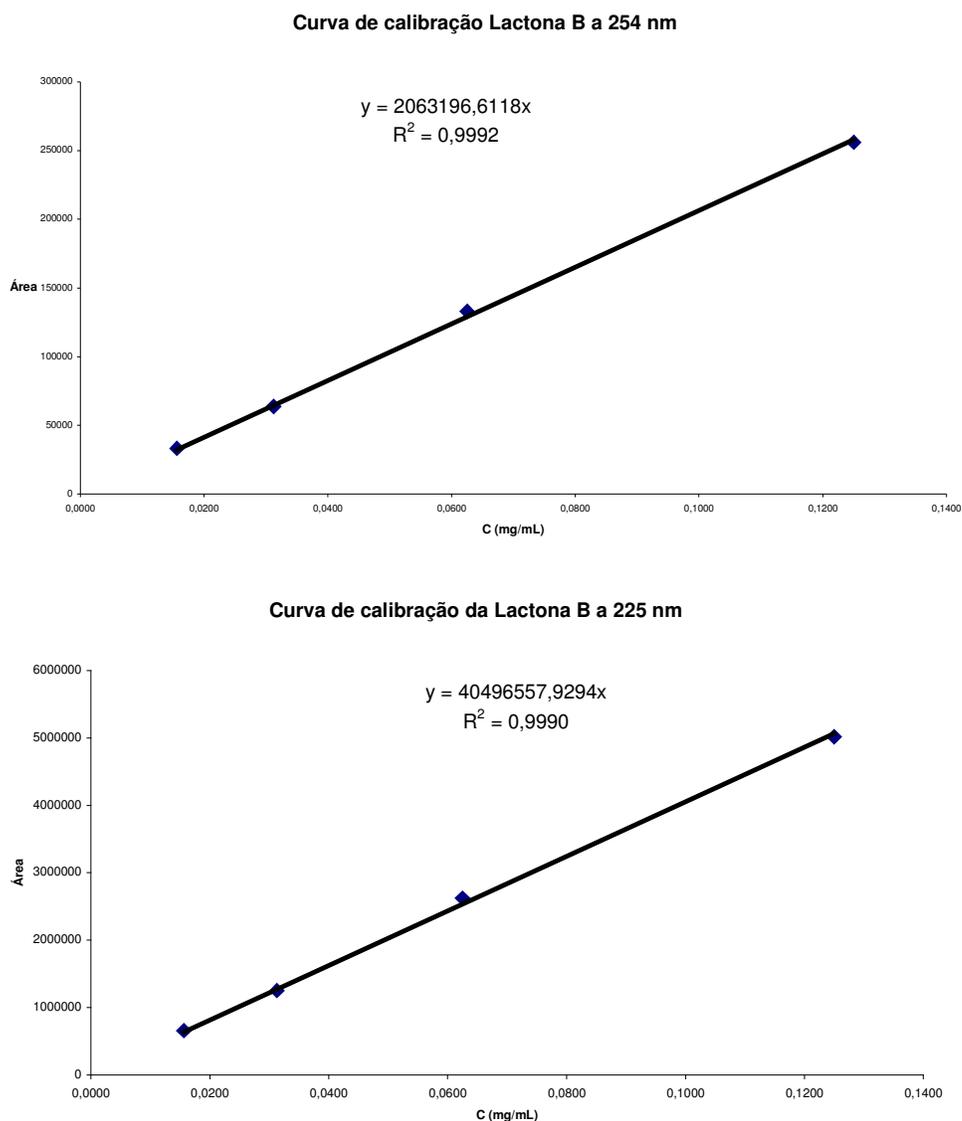


Figura 45. Curvas de calibração de LacB em 254 e 225nm

Tabela 27. Resultados médios obtidos das soluções padrões de LacB

LacB (mg/mL)	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
0,1250	255927	2311	0,90	5017922	71284	1,42
0,0625	133005	3716	2,79	2621287	65721	2,51
0,0313	63700	578	0,91	1249281	9949	0,80
0,0156	33345	1399	4,19	657411	34425	5,24

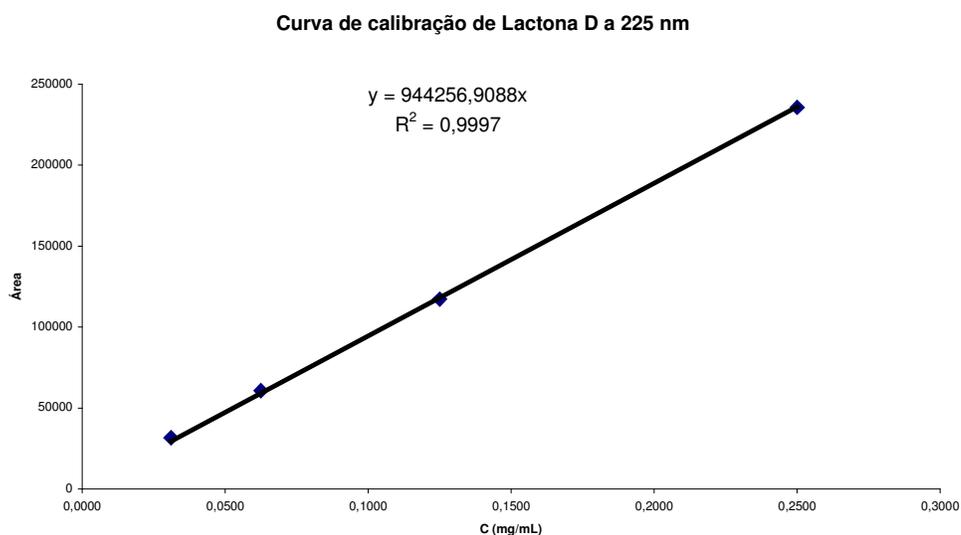
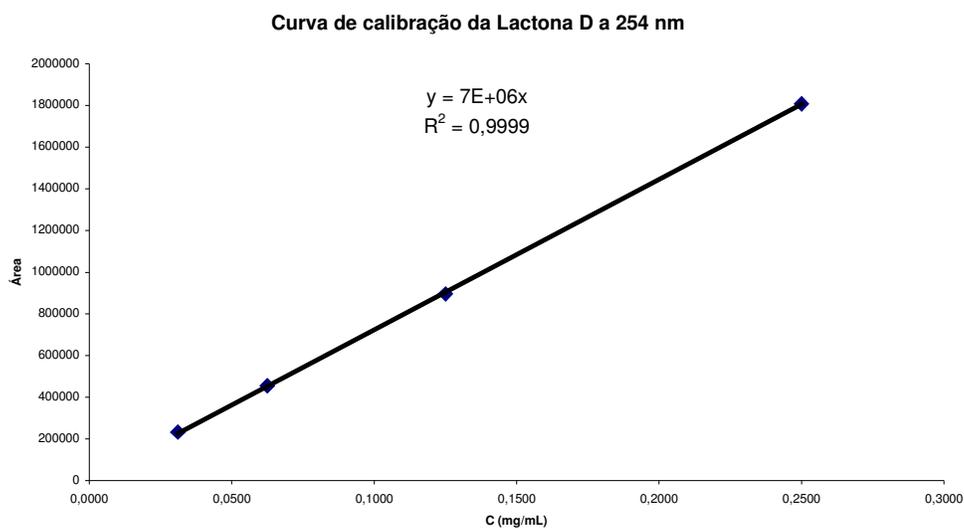


Figura 46. Curva de calibração de LacD em 254 e 225 nm

Tabela 28. Resultados médios obtidos das soluções padrões de LacD.

LacD (mg/mL)	Área (254 nm)			Área (225 nm)		
	Média	DP	Erro (%)	Média	DP	Erro (%)
0,2500	1808145	788	0,04	235754	910	0,39
0,1250	895470	38629	4,31	117298	4381	3,74
0,0625	455586	16987	3,73	60588	1970	3,25
0,0311	231906	1028	0,44	31669	941	2,97

Os coeficientes de correlação obtidos em todas as curvas de calibração, foram muito próximos de 1, o que demonstrou uma boa linearidade para cada uma das curvas obtidas, possibilitando uma confiável quantificação das concentrações dos marcadores nos extratos analisados. Observou-se também, que o erros resultantes das injeções das soluções para construção das curvas foram quase sempre inferiores a 5 % (Tabelas 26, 27 e 28).

Os erros obtidos entre as injeções das soluções dos extratos ECA, foram todos inferiores a 5%, o que demonstra um boa reprodutibilidade das injeções.

No extrato EA também foi observado para os valores de área média dos marcadores LacA e LacB, todos os erros inferiores a 5 % (Tabelas 22 a 25). No entanto, para o marcador LacD observou-se valores mais altos, o que novamente pode ser explicado devido a interferência de constituintes (impurezas) que estão presentes no extrato e que apresentam valores de tempo de retenção muito próximos a LacD.

Tabela 29. Resultados das concentrações dos marcadores no extrato ECA

Marcadores	Média da concentração ($\mu\text{g/ mL}$)							
	(254 nm)				(225 nm)			
	Irاندوبا	Juruti	Manaus	Itacoatiara	Irاندوبا	Juruti	Manaus	Itacoatiara
LacA	114,0	9,5	209,0	238,0	114,0	9,5	209,0	247,0
LacB	70,6	94,1	86,2	152,0	87,8	97,6	97,6	133,1
LacD	96,0	105,6	153,6	134,4	55,0	44,0	225,5	71,5

Tabela 30. Resultados das concentrações dos marcadores no extrato EA

Marcadores	Média da concentração ($\mu\text{g/ mL}$)							
	(254 nm)				(225 nm)			
	Irاندوبا	Juruti	Manaus	Itacoatiara	Irاندوبا	Juruti	Manaus	Itacoatiara
LacA	1,9	4,5	26,9	6,1	2,9	4,1	27,4	6,3
LacB	8,6	2,0	9,6	2,2	9,3	1,6	10,6	2,6
LacD	0,1	0,6	0,4	0,4	7,70	4,6	4,0	5,1

Na quantificação do marcador LacD observou-se uma variação grande dos valores obtidos nas regressões observados a 225 e 254 nm, fator que pode ser atribuído à impureza do padrão. Portanto, para uma melhor quantificação utilizou-se apenas os resultados a 254 nm, uma vez que as impurezas presentes absorviam pouco nesse comprimento de onda, enquanto que LacD possui forte absorção no mesmo.

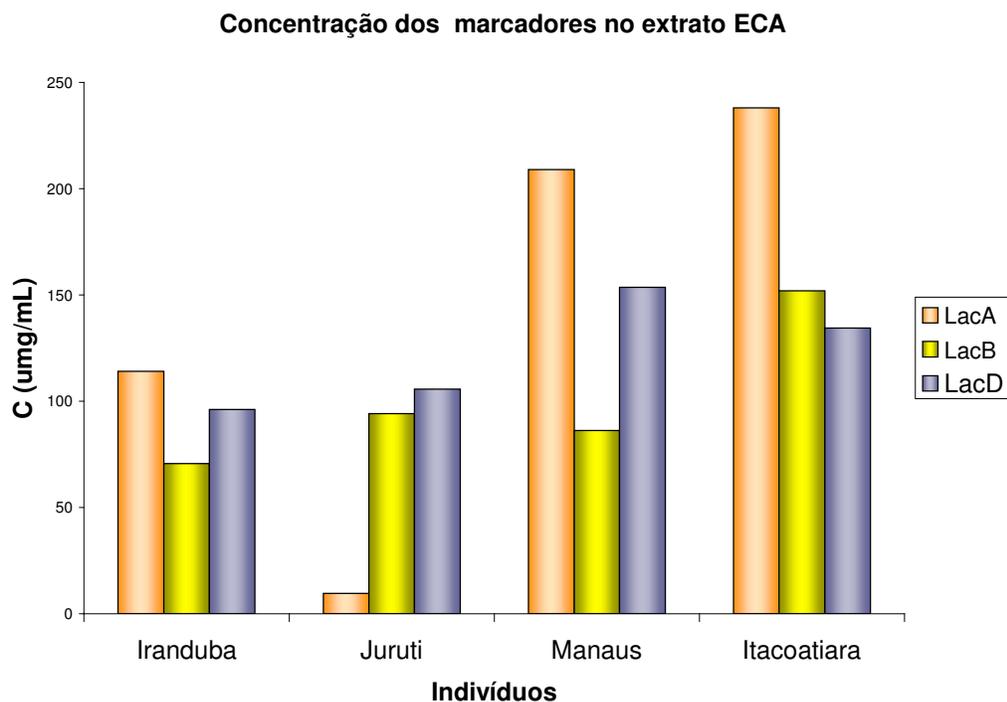


Figura 47. Gráfico da concentração dos marcadores químicos na fração ECA (254 nm).

Através da análise do gráfico (Figura 47) e dos valores obtidos na semi-quantificação dos marcadores no extrato clorofórmico livre de clorofila (ECA), foi possível verificar que nos indivíduos estudados o que apresentou maior concentração de LacA foi aquele coletado em Itacoatiara. Esse indivíduo apresentava apenas folhas e caules (talos) e portanto idade diferente dos demais. No entanto, o indivíduo coletado em Juruti (PA) apresentou uma concentração de LacA muito pequena, em relação aos demais estudados e, no momento da coleta, o mesmo encontrava-se com poucas inflorescências.

Já LacB nos 4 indivíduos estudados apresentaram variações bem menores no extrato ECA analisados.

Os valores obtidos para LacD nos extratos ECA mostraram-se relativamente semelhantes, quando analisados os valores obtidos a 254 nm.

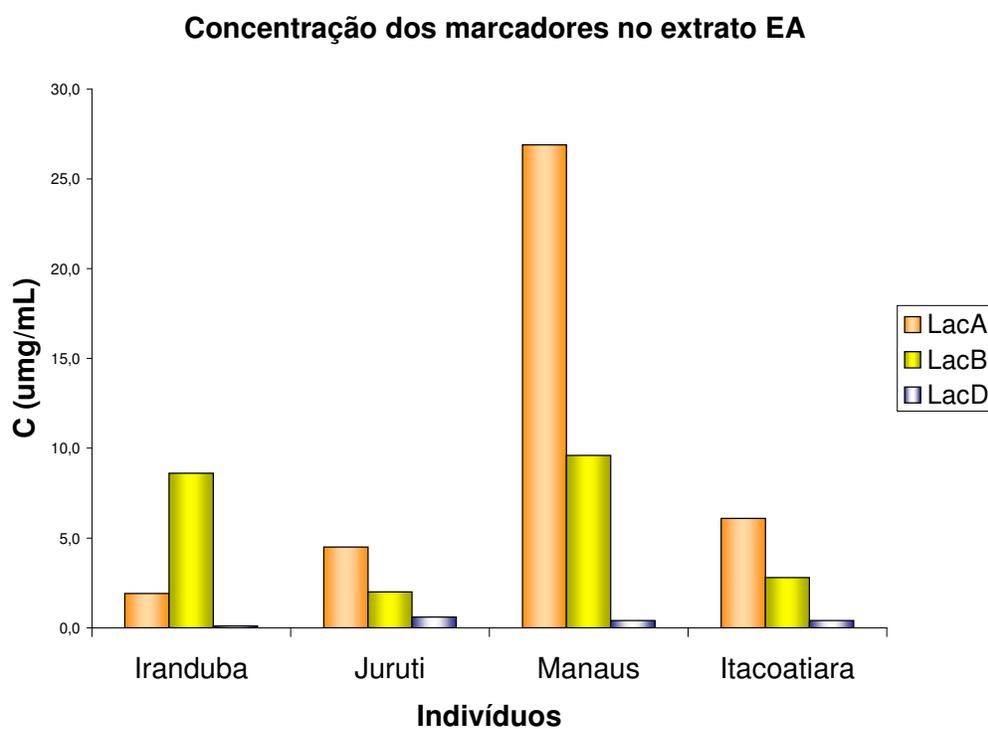


Figura 48. Gráfico da concentração dos marcadores químicos no extrato EA (254 nm).

Nos extratos aquosos (Figura 48) dos 4 indivíduos analisados, observou-se que o extrato preparado a partir do indivíduo coletado em Manaus, apresentou a maior concentração de LacA, enquanto os demais apresentaram concentrações bem inferiores. Os indivíduos coletados em Iranduba e Manaus apresentaram concentrações de LacB semelhantes. Observou-se também, que os extratos aquosos dos quatro indivíduos apresentaram concentrações de LacD muito pequenas, em relação a concentração dos demais marcadores, provavelmente por sua menor polaridade e solubilidade em água.

Novamente observou-se que nos extratos aquosos, os marcadores LacA (ambrosina) e LacB (damsina) são os componentes majoritários.

A variabilidade da concentração dos marcadores no extrato EA, pode ser explicada pelo fato de que os extratos liofilizados são muito higroscópicos, fato que pode ter influenciado na preparação das soluções analisadas.

Os resultados aqui apresentados demonstram uma grande variabilidade dos marcadores isolados nos indivíduos estudados, em todos extratos analisados. Essa variabilidade pode representar uma dificuldade na padronização dessa planta como um fitoterápico.

4.3 Análise dos óleos nos diferentes indivíduos

4.3.1 Óleos obtidos

Os óleos obtidos dos quatro indivíduos apresentaram características organolépticas semelhantes, ou seja, cor amarelada e odor forte desagradável.

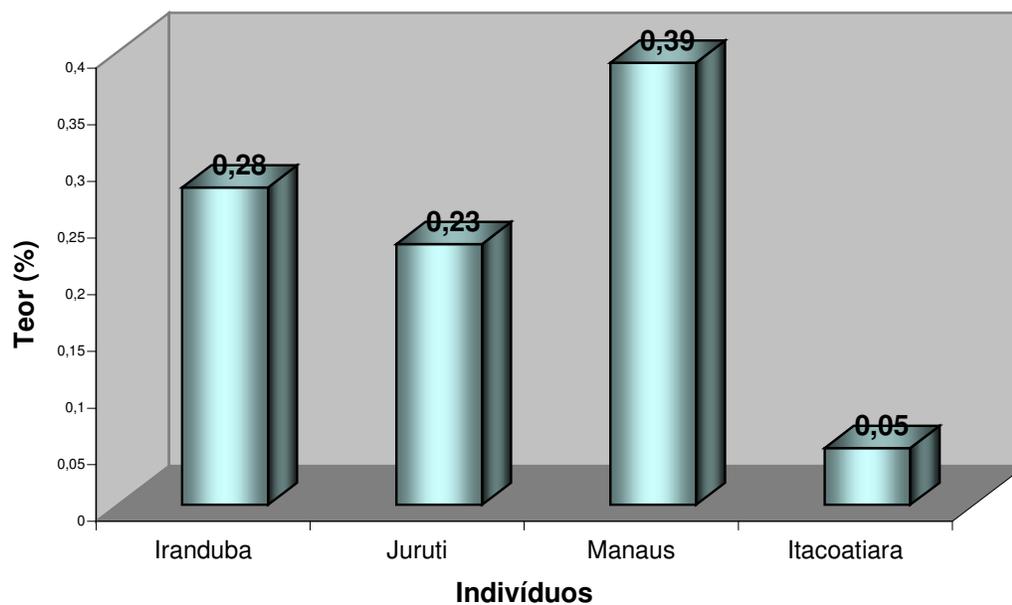
O indivíduo coletado em Manaus, durante o mês de abril, apresentou o maior teor de óleo extraído por hidrodestilação e o indivíduo coletado em Itacoatiara agosto de 2004 apresentou o menor teor de extração. Essas diferenças apresentadas nos teores de óleo de cada indivíduo (Tabela 31) podem ser explicadas pela diferença de fase de crescimentos dos mesmos.

Observou-se que os indivíduos que apresentavam flores e inflorescência, coletados em Iranduba, Juruti e Manaus, apresentaram teor de óleo essencial mais altos, em comparação com indivíduo coletado em Itacoatiara; que apresentava somente folhas e talos (Figura 49).

Em estudo anterior, comparando os teores dos compostos dos óleos essenciais da flor e folha de *A. artemisiifolia*, de indivíduos coletados na região, observou-se que a maior concentração de compostos estavam presentes nas flores (SANTOS, 2000).

Tabela 31. Teor extrativo de óleo dos indivíduos estudados

Coletas	Data	Massa de serragem (g)	Óleos	
			Seco (mg)	Teor (%) (g/g)
Irاندuba (AM)	04/05/03	40	111,4	0,28
Juruti (PA)	27/07/03	40	93,1	0,23
Manaus (AM)	27/02/04	40	154,7	0,39
Itacoatiara (AM)	03/08/04	40	18,7	0,05

**Figura 49.** Gráfico da variação do teor de óleo essencial

4.3.2 Análise qualitativa dos óleos

Muitos constituintes de óleos essenciais quando analisados por cromatografia acoplado a espectrômetro de massa, podem apresentar espectros idênticos, fato que pode ser explicado devido à similaridades das estruturas, ou devido aos vários fragmentos e rearranjos ocorridos após a ionização dos constituintes (DAVIES, 1990). Essas características estão presentes nos terpenos, predominantes em espécies de *Ambrosia* (SANTOS, 2000). Frequentemente para complementar os dados espectrais de massas em uma análise de óleo essencial é utilizada a análise por cromatografia gasosa em duas colunas de polaridades substancialmente diferentes (apolar e polar) procedendo a identificação de substâncias baseadas na comparação de índices de retenção (Kóvats) (DAVIES, 1990).

O perfil cromatográfico dos óleos analisados em CG e CG-EM dos indivíduos coletados em Iranduba, Juriti e Manaus são semelhantes, apresentando os mesmos picos majoritários comuns (Figuras 50 e 51), com diferenças apenas na proporção dos constituintes.

Os dados de tempo de retenção e índices de Kováts obtidos das substâncias identificadas no óleo dos indivíduos estudados estão relatados nas Tabelas 32, 33, 34 e 35.

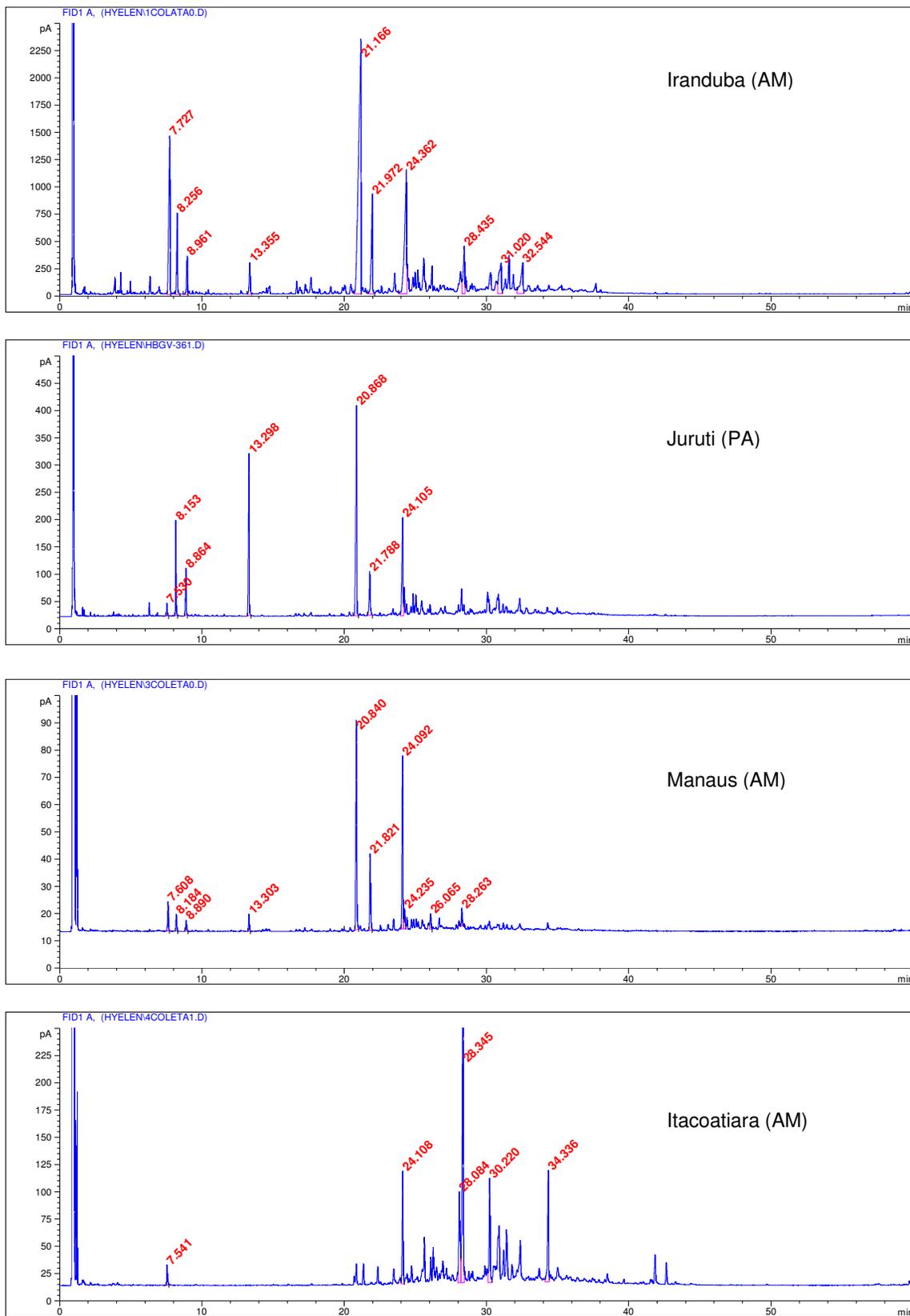


Figura 50. Análise cromatográfica (coluna apolar) dos óleos de *A. artemisiifolia* L.

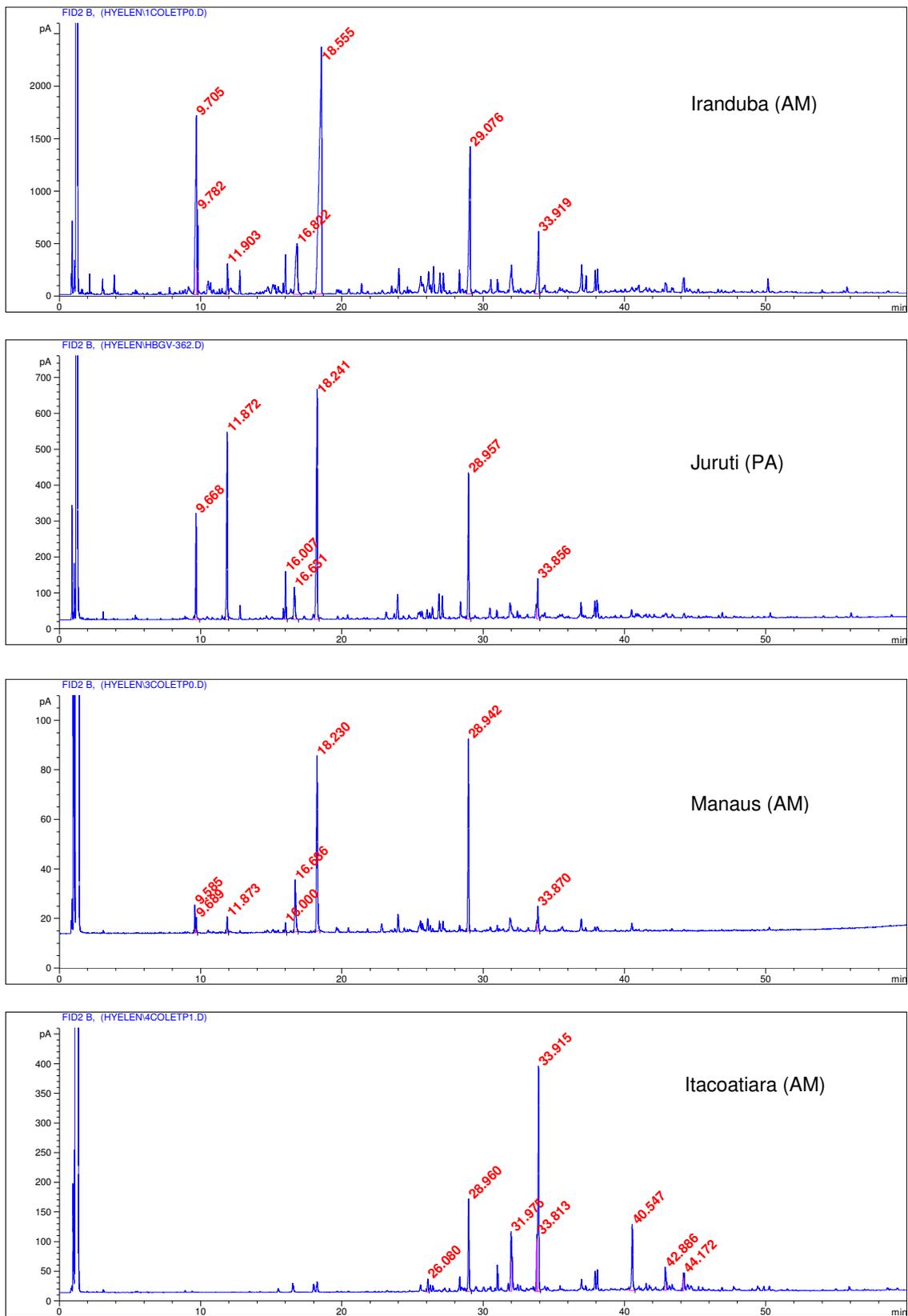


Figura 51. Análise cromatográfica (coluna polar) dos óleos de *A. artemisiifolia* L.

O indivíduo coletado em Iranduba apresentou como constituintes majoritários principais a crisantenona (7,62%), o Ar-curcumeno (21,02%) e o espatulenol (8,07%), somando 36,71% do óleo. O indivíduo coletado em Juruti apresentou como constituintes majoritários o acetato de bornila (10,15%), Ar-curcumeno (17,24%) e espatulenol (8,29%) somando 35,68%. No indivíduo coletado em Manaus os majoritários foram o Ar-curcumeno (27,64%), β -bisaboleno (10,78%) e espatulenol (22,30%) somando 60,72% do óleo.

O indivíduo coletado em Itacoatiara, apresentou um perfil cromatográfico diferente dos demais indivíduos (Figuras 50 e 51). Isso pode ser explicado devido ao fato de que no momento da coleta, o indivíduo não apresentava flores e inflorescência, mas sim somente folhas e talos.

Foi observado através da área percentual dos picos correspondente a cada substância identificada nos óleos dos indivíduos estudados (Tabela 36), que o sesquiterpeno Ar-curcumeno ($t_{R\text{médio}}$ 22,51 min) é o constituinte presente em maior concentração nos óleos dos indivíduos coletados em Iranduba, Juruti e Manaus, coletados com flores e inflorescências. Esse resultado está de acordo com o estudo anteriormente realizado por Santos (2000). O 8-cedrenol-13 (Cedrenol) ($t_{R\text{médio}}$ 30,30 min) foi o constituinte identificado em maior concentração no indivíduo coletado em Itacoatiara, que apresentava somente folhas na fase de crescimento em que foi coletado (Figura 53).

Observou-se também que o sesquiterpeno espatulenol ($t_{R\text{médio}}$ 25,95 min) está presente no óleo dos quatro indivíduos estudados em concentrações consideráveis,

apresentando-se em maior concentração no indivíduo coletado em Manaus (Figura 53) .

O indivíduo coletado em Itacoatiara apresentou como constituintes majoritários o espatulenol (8,22%), o 8-cedrenol-13 (17,58%) e o bisaboleno (5,30%), somando 31,10% do óleo.

Tabela 32. Substâncias identificadas no indivíduo da 1ª coleta

Iranduba (AM)								
Substâncias	Coluna apolar					Coluna polar		
	t _R (min)	IR (CBA)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (1)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (2)
Crisantenona	9,12	1117	7,65	1124	1123	9,63	1487	1518
Canfora	10,05	1141	8,21	1142	1143	9,73	1490	-
Borneol	11,03	1165	8,92	1163	1165	11,91	1559	1698
Acetato de bornila	15,72	1279	13,38	1284	1285	16,32	1691	1615
Ar – Curcumeno	24,10	1475	20,94	1478	1483	18,33	1753	1777
β - Bisaboleno	25,21	1496	22,08	1504	1509	18,33	-	1745
Espatulenol	27,76	1565	24,17	1565	1576	28,97	2049	-
8 – Cedrenol -13	32,22	1678	-	-	1688	-	-	-

(1). ADAMS (1995) (2).DAVIES (1990)

Tabela 33. Substâncias identificadas no indivíduo da 2ª coleta

Juruti (PA)								
Substâncias	Coluna apolar					Coluna polar		
	t _R (min)	IR (CBA)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (1)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (2)
Crisantenona	9,29	1122	7,58	1122	1123	-	-	-
Canfora	10,06	1141	8,21	1142	1143	9,71	1494	1518
Borneol	11,03	1166	8,92	1163	1165	11,91	1566	1698
Acetato de bornila	15,73	1279	13,36	1284	1285	15,99	1686	1615
Ar – Curcumeno	24,11	1475	20,92	1478	1483	18,28	1755	1777
β - Bisaboleno	25,22	1496	22,07	1507	1509	18,28	1755	1745
Espatulenol	27,77	1564	24,15	1566	1576	28,94	2028	-

(1). ADAMS (1995) (2).DAVIES (1990)

Tabela 34. Substâncias identificadas no indivíduo da 3ª coleta

Manaus (AM)								
Substâncias	Coluna apolar					Coluna polar		
	t _R (min)	IR (CBA)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (1)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (2)
Crisantenona	9,12	1117	7,64	1124	1123	-	-	1518
Canfora	10,06	1141	8,22	1142	1143	9,70	1496	-
Borneol	11,04	1166	8,92	1163	1165	11,89	1566	1698
Acetato de bornila	15,73	1279	13,34	1284	1285	15,99	1688	1615
Ar – Curcumeno	24,11	1475	20,87	1478	1483	18,24	1757	1777
β - Bisaboleno	25,23	1496	21,86	1504	1509	18,24	1757	1745
Espatuleno	27,78	1565	24,12	1565	1576	28,94	2051	-

(1). ADAMS (1995) (2).DAVIES (1990)

Tabela 35. Substâncias identificadas no indivíduo da 4ª coleta

Itacoatira (AM)								
Substâncias	Coluna apolar					Coluna polar		
	t _R (min)	IR (CBA)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (1)	t _R (min)	IR (INPA)	Ref. (2)
Espatuleno	27,77	1565	24,12	1567	1576	28,94	2051	-
8-Cedrenol-13	32,25	1679	28,36	1684	1688	33,88	2237	-
Bisaboleno<6R, 7R->*	34,28	1733	30,23	1739	1737	40,52	2460	-

(1). ADAMS (1995) (2).DAVIES (1990) * Tentativa de identificação

Tabela 36. Percentagem de áreas das substâncias identificadas no óleo de cada indivíduo estudado.

A%					
Substância	Classe	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Crisantenona	Monoterpeno oxigenado	7,62	0,74	3,32	-
Cânfora	Monoterpeno oxigenado	1,64	4,68	1,95	-
Borneol	Monoterpeno oxigenado	1,41	2,72	1,41	-
Acetato de bornila	Monoterpeno dioxigenado	1,28	10,15	2,01	-
Ar-curcumeno	Sesquiterpeno	21,02	17,24	27,64	-
β-bisaboleno	Sesquiterpeno	4,22	3,66	10,78	-
Espatuleno	Sesquiterpeno oxigenado	8,07	8,29	22,30	8,22
8-cedrenol - 13	Sesquiterpeno oxigenado	-	-	-	17,58
Bisaboleno<6R, 7R>	Sesquiterpeno	-	-	-	5,30
A% Total		45,26	47,48	69,41	31,1

Os óleos analisados evidenciaram ser compostos de substâncias (Figura 52) menos voláteis, o que explica o baixo rendimento de óleo obtido.

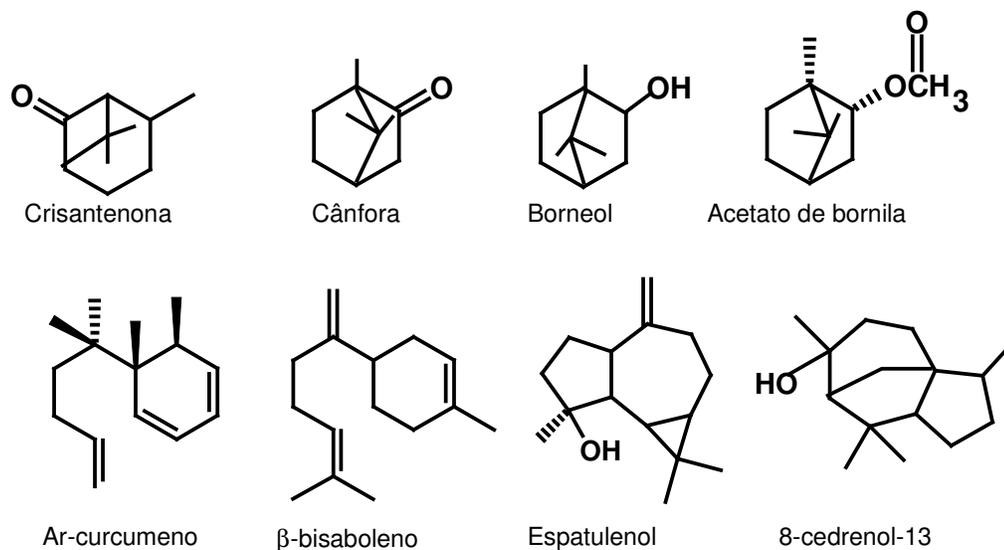


Figura 52. Estruturas das substâncias identificadas no óleo de *A. artemisiifolia*.

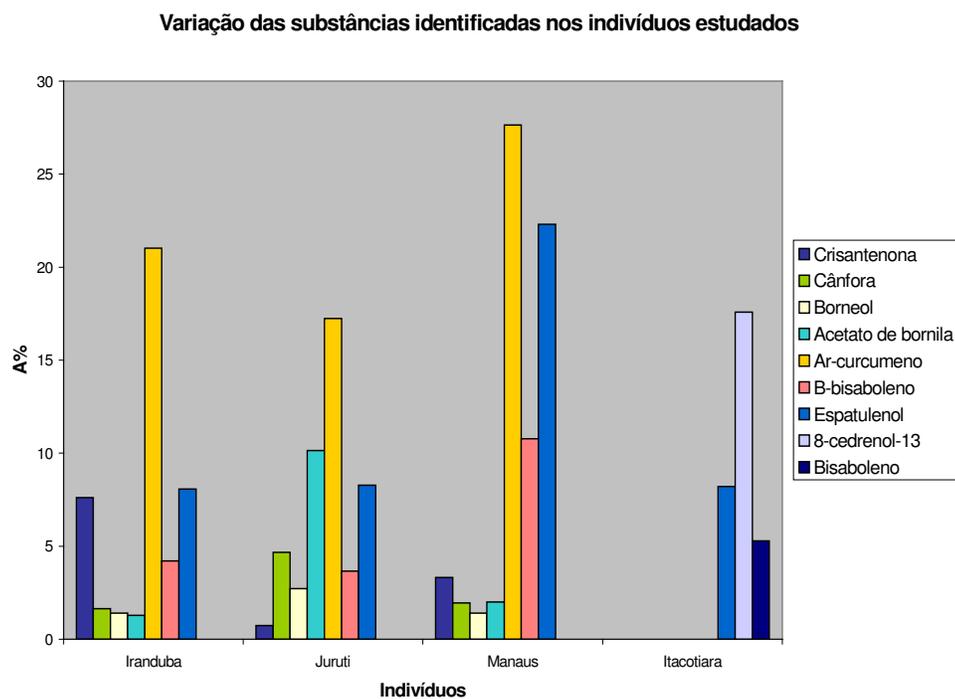


Figura 53. Gráfico da variação da A% de cada substância nos indivíduos estudados.

4.4 Atividade antiulcerogênica

4.4.1 Efeitos dos extratos EA e ECA nas lesões gástricas induzidas por etanol

Os animais tratados com o EA, nas doses de 0,1; 0,3 e 1g/kg, tiveram seus estômagos avaliados após 1 hora da administração de etanol a 75% e o índice de lesões e o número de úlceras determinadas em camundongos controles foram $7,2 \pm 3,0$ e $11,0 \pm 1,2$, respectivamente. O tratamento dos animais com o EA de *A. artemisiifolia*, reduziu o índice de lesões (IL) e o número de úlceras (NU) proporcionalmente as doses, de 42 a 71% e de 47 a 94% dos valores controles (Figura 54).

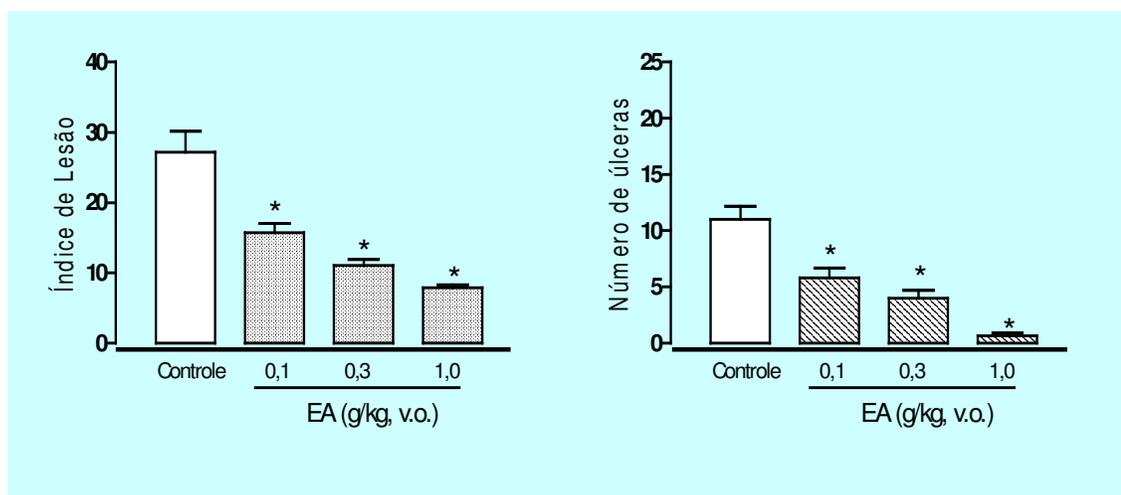


Figura 54. Efeito da administração oral de EA de *A. artemisiifolia*, nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por etanol (75 %, v.o) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.

* diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

Os animais tratados com a fração de extrato clorofórmico livre de clorofila (ECA), nas doses de 0,1 e 0,3 g/kg mais o veículo, também apresentaram uma redução do índice de lesão e do número de úlceras induzidas por etanol de 49 % a 56 % e de 60 % a 81 %, quando comparados aos tratados com o veículo (Tween 5 %) (IL = $20,9 \pm 3,9$; e NU = $13,3 \pm 1,5$) respectivamente (Figura 55).

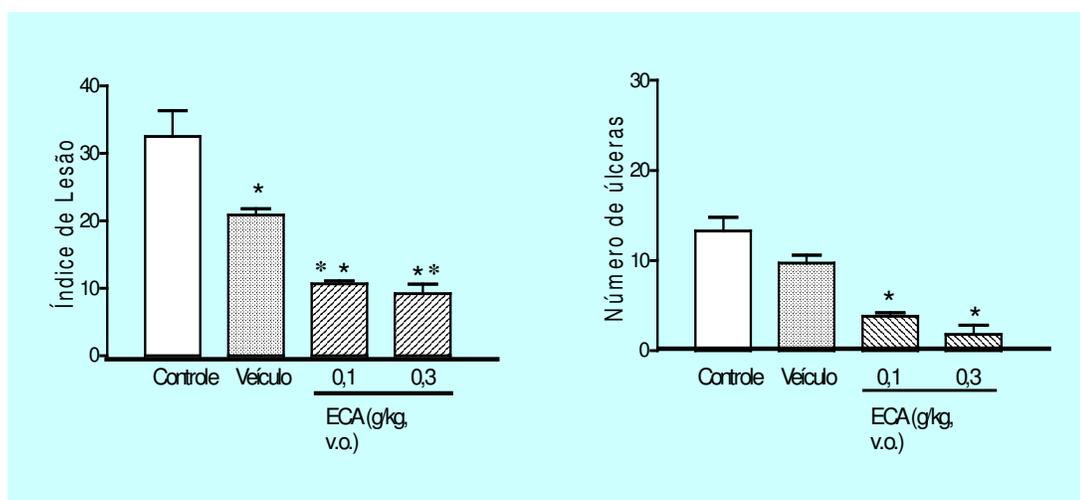


Figura 55. Efeito da administração oral de ECA de *A. artemisiifolia*, nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por etanol (75 %, v.o) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.

* diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

** diferente do controle tratado com o veículo ($p < 0,05$).

4.4.2 Efeito dos extratos EA e ECA (fração livre de clorofila) nas lesões gástricas induzidas por estresse.

Os camundongos tratados com o EA de *A. artemisiifolia* nas doses de 0,1; 0,3 e 1g/kg, p.o., antes da indução de estresse por imolização a frio ($4^{\circ}\text{C}/ 1 \text{ h}$), apresentaram redução do índice de lesões gástricas de 38 % a 51 % e do número de úlceras gástricas de 46% a 62% dos valores controles ($27,7 \pm 3,3$ e $14,3 \pm 1,8$; respectivamente) (Figura 56).

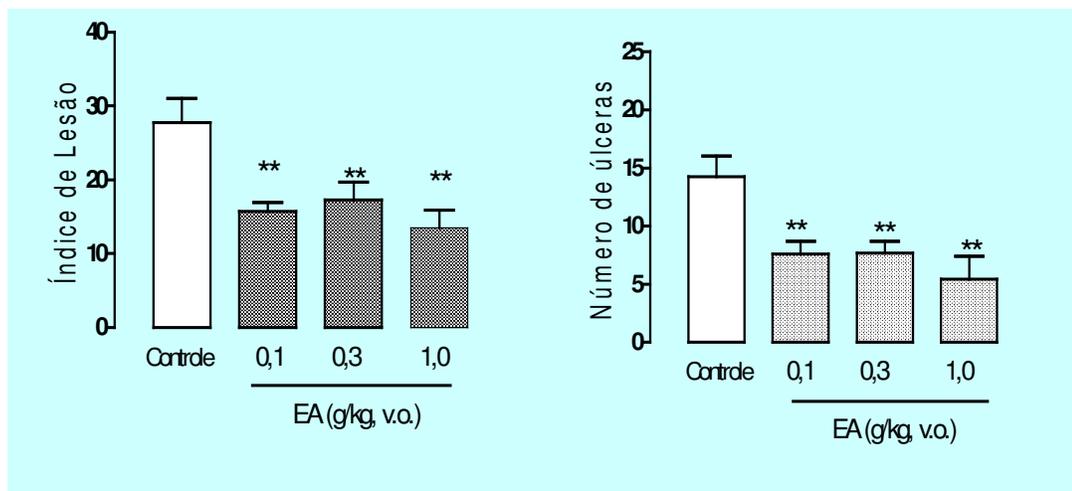


Figura 56. Efeito da administração oral de EA de *A. artemisiifolia*, nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por estresse (imobilização a 4 °C/ 1 h) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.

****** diferente do controle ($p < 0,01$).

Os animais tratados com o ECA nas doses de 0,1 e 0,3 g/kg, v.o. submetidos ao estresse por imolização a frio (4 °C/ 1 h), apresentaram redução do índice de lesões (46 %) e do número de úlceras gástricas (64 %), somente com a menor dose (0,1 g/kg). Na maior dose testada, a fração ECA (0,3 g/kg, v.o.) não influenciou as lesões da mucosa gástrica produzidas por estresse a 4 °C/ 1 h (Figura 57).

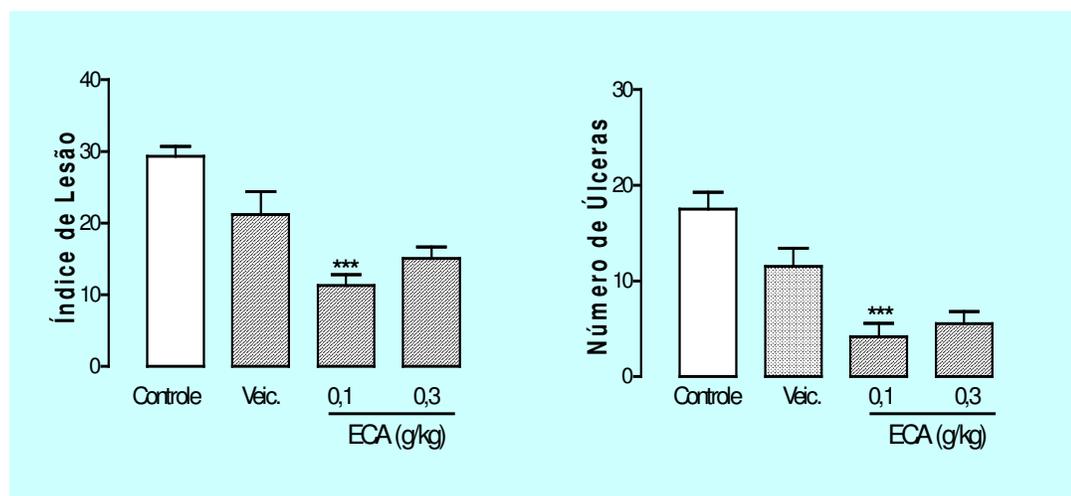


Figura 57. Efeito da administração oral de ECA de *A. artemisiifolia* L nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por estresse por imobilização a 4 °C/ 1 h em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.

*** diferente do grupo tratado com o veículo ($p < 0,01$).

4.4.3 Efeitos dos extratos EA e do ECA de *A. artemisiifolia* nas lesões gástricas induzidas por indometacina.

Nas lesões da mucosa gástrica induzidas pelo antiinflamatório não esteroide indometacina (30 mg/kg, s. c.), o tratamento prévio com o EA ou com a fração ECA não alteraram significativamente o índice de lesão e o número de úlceras comparativas ao grupo controle. Os animais tratados com a dose de 0,3 g/kg do EA porém, apresentaram menor número de úlceras induzidas por indometacina, em comparação ao grupo controle tratado com água (Figuras 58 e 59).

Os resultados indicam que a atividade anti-úlceras dos extratos estudados, envolve mecanismos aparentemente não relacionados à síntese de prostaglandinas.

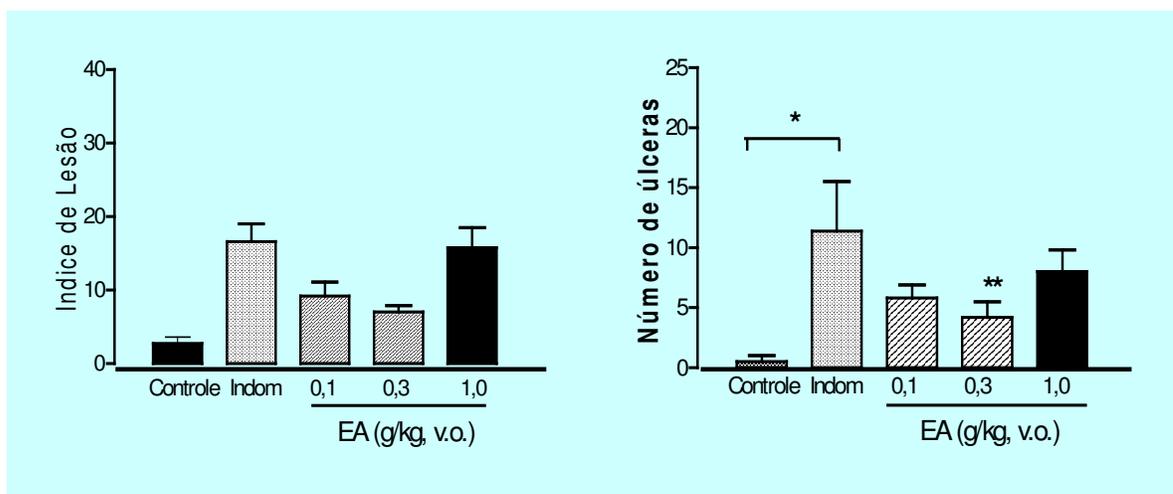


Figura 58. Efeito da administração oral de EA de *A. artemisiifolia*, nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por indometacina (30 mg/kg, s. c.) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.

* diferente do controle lesado tratado com água.

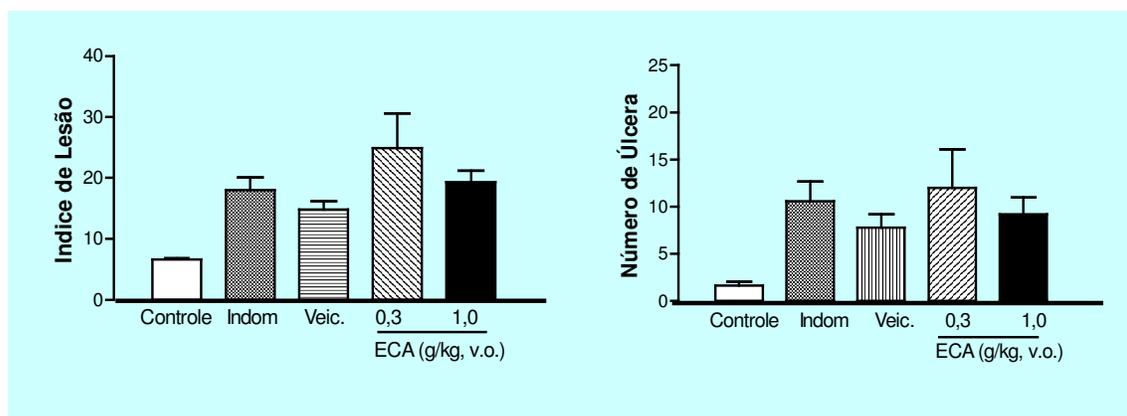


Figura 59. Efeito da administração oral de ECA de *A. artemisiifolia*, nas lesões da mucosa gástrica, induzidas por indometacina (30 mg/kg, s. c.) em camundongos. As colunas e barras verticais são médias \pm erro padrão das médias de 5 animais.

5. CONCLUSÕES

Considerando as avaliações e análises realizadas e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os fracionamentos empregados para o estudo fitoquímico da espécie estudada nesse trabalho, foram eficazes para o isolamento de lactonas sesquiterpênicas, principais constituintes químicos de interesse na espécie *A. artemisiifolia*.
- O extrato clorofórmico e o extrato aquoso preparado do indivíduo coletado em Iranduba (AM), apresentaram redução de úlceras gástricas produzidas por etanol e por estresse apresentando atividade antiulcerogênica, confirmando o uso popular no tratamento em males do estômago.
- Na avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos EA tratados, de todos os indivíduos, observou-se também a presença dos marcadores isolados como constituintes majoritários, porém em quantidades bem inferiores.
- O método desenvolvido para o monitoramento utilizando CLAE, mostrou-se adequado para a separação e quantificação dos marcadores isolados,

apresentando boa reprodutibilidade nas análises. Devido à presença de outros constituintes químicos nos extratos ECA e EA com tempos de retenção muito próximos, a LacD não foi possível observar boa separação do mesmo a 225 nm, utilizando o método desenvolvido para o monitoramento dos marcadores por CLAE.

- Na avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos ECA dos indivíduos estudados, os quatro marcadores químicos isolados são os constituintes químicos majoritários porém, apresentando variação da concentração dos mesmos. Essa variabilidade química existente pode representar uma dificuldade no emprego dessa espécie como medicinal ou fitoterápico.
- Os óleos essenciais dos indivíduos coletados com folhas, talos, flores e inflorescências, apresentaram uma concentração maior de monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos não oxigenados, já os indivíduos coletados apenas com folhas e talos apresentaram uma concentração maior de sesquiterpenos oxigenados e um rendimento de óleo menor.
- Considerando os perfis cromatográficos obtidos e os resultados dos testes antiulcerogênicos, os marcadores ambrosina e damsina são excelentes marcadores químicos para fins de controle de qualidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P., **Identification of Essencial Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy**. All Rights Reserved. p.468, 1995.

AHMED, M. B.; K.; KHATER, R. M., Evaluation of the protective potential of *Ambrosia maritima* extract on acetaminonophen-induced liver damage. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 75, p.169-174, 2001.

AKARELE, O. Medicinal Plants and Primary Health Care: An Agenda for Action. **Fitoterapia**, v.53, n. 5, p.355-363, 1988.

ALVAREZ, A.; LARIONOVA, M. Valoración de la actividad antiulcerosa de varias plantas medicinales. **Rev Cubana Farm**. vol.28(2); p.138-141. 1994.

BARATA, L. **Amazônia: interesses e conflitos. Produtos da Biodiversidade Amazônica**. Disponível em: <[http://www. Consciência. br/reportagens/ amazonia/ amaz22.htm](http://www.Consciência.br/reportagens/amazonia/amaz22.htm)>. Acesso em: 17 abr.2004.

BARREIRO, E.J. Desenho de Fármacos a Partir de Produtos Naturais. In: YUNES, A.R. e CALIXTO, J.B.(orgs.). **Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 237-297, 2001.

BDT. Biodiversidade: Perspectivas e oportunidades tecnológicas. Fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicacoes/padct/bio;cap10/elovi.html>> Acesso em: 26 mar. 2003.

BICCHI, C.; RUBIOLO, P. High-performance liquid chromatographic-particle beam mass spectrometric analysis of sesquiterpene lactones with different carbon skeletons. **Journal of Chromatography A**. v. 727. p.211-221. 1996.

BÉJAR, E. Parthenolide inhibits the contractile responses of rat stomach fundus to fenfluramine and dextroamphetamine but not serotonin. **Journal of Ethnopharmacology**. Irlanda. v. 50, p. 1-12, 1996.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, fev. 2000.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, mar. 2004.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda, v.39, p.53-67, 1993.

BRUNETON, J. **Elements de fitoquímica y de farmacognosia**. Traduzido por: Angel del Fresno ; Emilia Accame e Mercedes Lizabe. Zaragoza: Acribia, S.A., [1991].
Tradução de: Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, 1^a Ed. ACRIBIA, S. A. p.594, Zaragoza - SP, 1991.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Ciência e Cultura**, vol. 55, n.º3, p. 37-39. São Paulo, Julho/Setembro, 2003.

CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, A.R. e CALIXTO, J.B.(org). **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 297-317. 2001.

CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, A.R. e CALIXTO, J.B.(org). **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 297-317. 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo. v.21, n. 1, p.99-105, 1998.

COSTA, F. B.; TERFLOTH. L.; GASTEIGER. J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**. Frankfurt, Alemanha. v.66.p.345-353.2005.

DAVIES, N. W., Gas Chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**. Amsterdam. v. 503, p. 1-94, 1990.

DAVID, J.P.; SANTOS, J. O.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. M.; CHAI, H.B.; PEZZUTO, J. M.; ANGERHOFER, C. K.; CORDELL, G. A. Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia artemisiaefolia* (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**. Inglaterra. v.37.n.2.pp.165-168.1999.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2ed. Inglaterra. Wiley Editorial Offices. 2002.

EICEMAN, G.; HILL, H.; GARDEA-TORRESDAY, J. Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 12, p.137-144, jun. 2000.

EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R.; BONFANTI, M. R. M.; FERREIRA, Z. S.; COMEGNO, L. M. A. Evolution of Sesquiterpene Lactones in Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, Inglaterra, v. 14, n. 6, p. 585-589, 1986.

FERREIRA, S.H. (org). **Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciência, 1998. 132 p.

GEERTS, S.; BELOT, J.; SABBE, F.; TRIEST, L.; SIDHOM, M. *Ambrosia maritima*: effects on molluscs and non-target organisms. **Journal of Ethnopharmacology**. Irlanda. v.33.p.1-12.1991.

GIORDANO, O. S.; GUERREIRO, E.; PESTCHANKER, M. J.; GUZMAN, J.; PASTOR, D.; GUARDIA, T. The Gastric Cytoprotective Effect of Several Sesquiterpene Lactones. **Journal of Natural Products**. v. 53, n. 04, p. 803-809, 1990.

GIORDANO, O. S.; PESTCHANKER, M. J.; GUERREIRO, E.; SAAD, J. R.; ENRIZ, R. D.; RODRÍGUEZ, A. M.; JÁUREGUI, E. A.; GUZMÁN, J.; MARIA, A. O. M.; WENDEL, G. H. Structure-Activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. **Journal of Medicinal Chemistry**, Estados Unidos da América, v.35, n.13, p.2452-2458, 1992.

GUARDIA, T; GUZMAN, J. A.; PESTCHANKER, M. J.; GURREIRO, E.; GIORDANO, O. S. Mucus synthesis and sulfhydryl groups in cytoprotection mediated by dehydroleucodine, a sesquiterpene lactone. **Journal of Natural Products**. v. 57, n. 04, p. 507-509, 1994.

HERZ, W.; HOGENAUER G. Isolation and structure of coronopilin, a new sesquiterpene lactone. **J Org Chem**. v.26, p.5011-5013, 1961.

HERZ, W.; ANDERSON, G.; GIBAJA, S.; RAULAIS, D. Sesquiterpene Lactones of Some *Ambrosia* Species. **Phytochemistry**. Inglaterra. v.8, p.877-88, 1969.

HERZ, W. *et al.* Sesquiterpene Lactones from the Genus *Ambrosia*. **Phytochemistry**. v. 10, p. 2241-2244, 1971.

HIGO, A.; HAMMAM Z.; TIMMERMANN, B. N.; YOSHIOKA H.; LEE, J.; MABRY, T. J.; PAYNE, W. W. Sesquiterpene Lactones from the Genus *Ambrosia* (Compositae). **Phytochemistry**. Inglaterra. v.10. pp.2241-2244.1971.

IBGE. **Atlas geográfico escolar**. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.

LAINETTI, R. & BRITO, N.R.S. A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro. **Ed. Tecnoprint Ltda.**, p. 163. 1980.

LAPA, A.J. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 181-196.

LAPA, A.J. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais. **Sociedade Brasileira de farmacologia e Terapêutica Experimental**. Salvador-BA, 2001. P.74.

LASTRA, A. L.; RAMÍREZ, T. O.; SALAZAR, L.; MARTÍNEZ, M.; TRUJILLO-FERRARA, J. The ambrosinolide cumenin inhibits macrophage nitric oxide syntesis: some structural considerations. **Journal of Ethnopharmacology**. Noche Buena, Mexico. v. 95, p. 221-227, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.. **Plantas medicinais no Brasil. Nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis.** New York: Oxford New York Tokyo,p.92. 1994.

MARCHAND, B.; BEHL, H. M.; RODRIGUEZ, E. Application of High-performance Liquid Chromatography for Analysis and Isolation of Sesquiterpene Lactones. **Journal of Chromatography.** v. 265, p.97-104, 1983.

MARIA, A. O. M.; WENDEL, G. H.; GUZMAN, J. A.; GIORDANO, O. S.; GUERREIRO, E. Gastric cytoprotective activity of dehydroleucodine in rats. Role of nitric oxide. **Pharmacological Research.** Itália. v. 37, n. 04, p. 281-284, 1998.

MARIA, A. O. M.; FRANCHI, A. M.; WENDEL, G. H.; GIMENO, M.; GUZMAN, J. A.; GIORDANO, O. S.; GUERREIRO, E. Gastric cytoprotective activity of dehydroleucodine in rats. Role prostaglandins. **Bio. Pharm. Bull.** Japão, v. 21, n. 04, p. 335-338, 1998

MARRIOT, P.; SHELILE, R.; CORNWELL C. Charles. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A,** v.936, p. 1-22, 2001.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpenes lactone. **Journal of Chromatography A**, Freiburg, Alemanha. v. 967, p. 115-130, 2002.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, A. N. **Medicinal Plants of Brazil**. USA: Michigan: Reference Publications, Inc., P.501.2000.

NATHAN, P. J.; ROMO, J. Isolation and structure of peruvin. **Tetrahedron**. Irlanda do Norte, v.22, p. 1723-1728, 1966.

PAPPAS, P. J.; FALLEK, S. R., GARCIA, A.; ARAKI, C. T.; BACK, T. L.; DURÁN, W. N.; HOBSON II, R. W. Role of Leukocyte Activation in patients with Venous Stasis Ulcers. **Journal of Surgical Research**. v. 53, n. 05, p. 553-559, 1995.

PASSREITER, C. M.; ALDANA, B. E. M., Variability of Sesquiterpene Lactones in *Neurolaena lobata* of Different Origin. **Planta Medica**. Nova York. v. 64, p.427-430, 1998.

PÉREZ . G. R. M. Anti-inflammatory activity of *Ambrosia artemisiaefolia* and *Rhoeo spathacea*. **Phytomedicine**. Nova York.v.III(2). p.163-167.1996.

PICMAN, A. K.; ARNASON, J. T.; LAMBERT, J. D. H., Hymenin, Another Sesquiterpene Lactone in *Ambrosia maritima*. **Journal of Natural Products**. v. 49, n. 3, p.556, 1985.

PINTO, A.C.; SILVA D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, Supl. 1, 45-61,2002.

PORTER, T.H.; MABRY, T.J. Sesquiterpene Lactones. Constituents of *Ambrosia artemisiifolia* L. (Compositae). **Phytochemistry**. Inglaterra. v.8.pp.793-794.1969.

PORTER, T.H. MABRY, T. J.; YOSHIOKA, H.; FISCHER, N. H.. The Isolation and Structure determination of *Artemisiifolin*, a New Germacranolide from *Ambrosia artemisiifolia* L. (Compositae). **Phytochemistry**. Inglaterra. v.9.pp.199-204.1970.

RASZEJA. W.; GILL. ST. Isolation and Identification of Psilostachyn B from *Ambrosia artemisiifolia* L. **Departamento of pharmacognosy, Institute of Technology and Analisis of Drug, Medical Academy, Gdansk, Poland**. Gdansk. v.32.p.319-322.1997.

REVILLA, J. **Cultivando a saúde em hortas caseiras e medicinais**. Manaus: Sebrae, 2004.

REVILLA, J. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

RODRÍGUEZ, A. Structure-Cytoprotective Activity Relationship of Simple Molecules Containing na α , β - Unsaturated Carbonyl System. **Journal of Medicinal Chemistry**, Carolina do Norte, v. 40, n. 12, p. 1827-1834, 1997.

SALAM, N. A. A. *et al.*, Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia maritima* (Damssissa).

Phytochemistry. v. 23, n. 12. P2851-2853, 1984.

SANTANA, P. J. **Bioprospecção no Brasil: Contribuições para uma gestão ética.**

Brasília: Paralelo 15, 2002.

SANTOS. J. G. S.; CORDEIRO. M. S. C. Óleos Essenciais da Folha de *Ambrosia artemisiifolia* L. (Compositae). **21^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de**

Química - SBQ. São Paulo.V.2, p.179. 2000.

SILVA, S. *et al.* **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio.** P.44, 2002.

SLACANIN, I.; VARGAS, D.; MARSTON, A. HOSTETTMENN, K. Determination of molluscidal sesquiterpene lactones from *ambrosia maritima* (compositae). **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.457, p. 352-331, 1988.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL.

Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Salvador:

CYTED/ CNPq, 2001.

SPRING, O.; ZIPPER, R.; KLAIBER, I.; REEB, S.; VOGLER, B.; Microsampling: Na Alternative Approach Using Sesquiterpene Lactones for Systematics. **Biochemical Systematics and Ecology**. Stuttgart, Alemanha. v. 17, n .7/8, p. 509-517. 1989.

SPRING, O. *et al.*, Sesquiterpene lactones in *Viguiera eriophora* and *Viguiera puruana* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry**. v. 55, p. 255-261, 2000.

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

STEFANOVIC. M.; SOLAJA. I. A.; MILOSAVLJEVIC. S. A 3,4-seco-ambrosanolide from *Ambrosia artemisiifolia*. **Phytochemistry**. Grã-Betânea, Inglaterra. v.26.n.3.pp.850-852.1987.

STICHER, O. Quality of Ginkgo Preparations. **Planta Médica**. v. 59, p.3-11, 1993. vol.21, p.801, n.º 6.1995.

TYLER, V. E. Medicinal Plant Research. **Planta medica**. p.95-100, 1988.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica**. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2. Ed. Pontífica Universidad Católica del Peru. 213p, 1994.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Germany, 1996.

WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: na issue of nomenclature. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, local, n. 15, p. 135-8, 2002.

WALSH, Gary. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, local, v.55, p.3-10, 2003.

YESILADA, E.; GURBUZ, I.; BEDIR, E.; TATLI, I.; KHAN, I. A. Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Crntaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis* through boassay-guided fractionation procedures in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. Turquia. v. 35, p. 213-219, 2004.

YUNES, R.; PEDROSA, R.; CHECINEL, V. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, local, v.24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHOU, J. Z, KOU, X.; STEVENSON, D., Rapid Extraction and Hinh-Performance Liquid Chromatographic Determination of Parthenolide in Feverfew (*Tanacetum parthenium*). **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 1018-1022, 1999.