



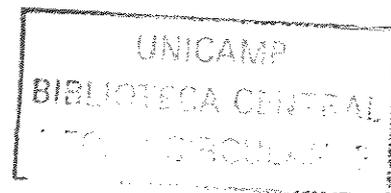
FABIO FERREIRA PERAZZO

Atividade de *Artemisia annua* L. sobre o Sistema Nervoso Central.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Mestre em Odontologia – Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

**PIRACICABA
2002**

I
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



UNIDADE BE
Nº CHAMADA T/UNICAMP
P411a
V EX
TOMBO BCI 50765
PROC 16.837102
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 11/09/02
Nº CPD _____

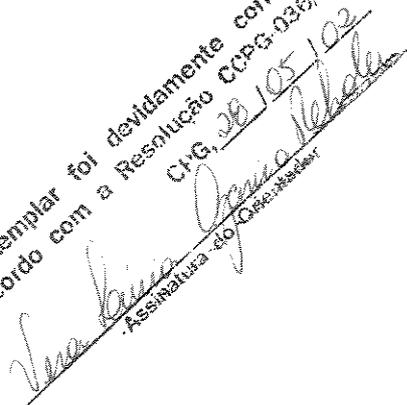
CM00172664-1

313 1D 255940

FABIO FERREIRA PERAZZO

Atividade de *Artemisia annua* L. sobre o Sistema Nervoso Central.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 28/05/02
Assinatura do Orientador



Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção de grau de Mestre em
Odontologia – Área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho
Prof. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Suplente:

Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade

PIRACICABA
2002

Ficha Catalográfica

P411a	<p>Perazzo, Fabio Ferreira. Atividade de <i>Artemisia annua</i> L. sobre o sistema nervoso central. / Fabio Ferreira Perazzo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002. xvi, 88f : il.</p> <p>Orientadora : Profª Drª Vera Lúcia Garcia Rehder. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Farmacologia. 2. Plantas medicinais. 3. Essências e óleos essenciais. I. Rehder, Vera Lúcia Garcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 01 de Março de 2002, considerou o candidato FÁBIO FERREIRA PERAZZO aprovado.

1. Profa. Dra. VERA LÚCIA GARCIA REHDER

2. Prof. Dr. JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO

3. Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO

8927420011

A minha mãe **Maria Amélia Ferreira Perazzo**, que me ensinou sobre a importância que o estudo exerce sobre a sociedade, e meu pai, **Cleonísio Vicente Perazzo**, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, que confiou em meu trabalho nos momentos mais difíceis, como uma amiga durante tormentas e calmarias. Meu agradecimento pela amizade que seja eterna.

Ao Dr. João Ernesto de Carvalho e Dr. José Carlos Tavares Carvalho, por abrirem seus laboratórios para que assim pudesse seguir meus experimentos “in vivo”.

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, meu eterno agradecimento por orientar meus primeiros passos na Iniciação Científica, pelos ensinamentos oferecidos e pelas oportunidades que me fizeram seguir a carreira acadêmica. Meu mais sincero agradecimento por esta “paternidade científica” e pela amizade em todos os momentos.

Ao novo irmão que a vida me deu, Marcelo Junqueira, por todo aprendizado que foi ter dividido a “Gambiarra” com você durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, meu agradecimento pelos ensinamentos ministrados dentro e fora da sala de aula. Professores essenciais na minha formação pessoal profissional nesta fase da vida. Muitíssimo obrigado.

A todos os professores da PPGO, em especial para todos aqueles que me ensinaram o que eu quero ser como docente. E também aqueles que me ensinaram o que eu não quero ser.

Aos amigos da PPGO: Marcelo, Rogério, Carina, Vanessa, Simone, Patrícia e Karla. Por tudo que aprendemos e sofremos juntos na convivência disciplinar.

A Elisa, por todo seu trabalho na organização de nossa vida burocrática.

Aos amigos do Laboratório de Química orgânica e Farmacêutica do CPQBA: Adilson, Sinézio, Marili, Adriana, Michelle, Amanda, Aline, Leandro, Zezão e Diogo. Pelos momentos de amizade durante as horas juntas no laboratório.

A Adilson Sartoratto e Adriana da Silva Santos pelas análises cromatográficas.

Aos grandes amigos que conheci nesta nova fase de minha vida: José Mauricio S. Ferreira da Silva e Mariana, bem como Alessandro e Arahya. Muito obrigado por sua amizade sem cobranças em todos os momentos, fossem bons ou ruins.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as abaixam para a terra.”

Leonardo Da Vinci

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	XI
Resumo	XIII
Abstract	XV
1. Introdução	01
2. Revisão de Literatura	05
2.1 Estudo de Mecanismos Centrais	05
2.2 Compostos terpênicos	07
2.3 <i>A. annua</i>: visão etnofarmacológica	15
3. Objetivo	23
4. Material e Métodos	24
4.1 Reagentes, solventes e drogas	24
4.2 Obtenção do material vegetal	24
4.3 Fitoquímica	24
4.3.1 Obtenção do óleo essencial	24
4.3.2 Preparação do extrato etanólico	25
4.4 Métodos analíticos	26
4.4.1 CG-EM	26
4.4.2 CG-FID	27

4.4.3	CLAE/UV	27
4.5	Ensaio Farmacológico	30
4.5.1	Animais	30
4.5.2	Determinação da DE₅₀	30
4.5.3	Determinação da DL₅₀	31
4.5.4	Influência sobre o sono induzido por PBS.	32
4.5.5	Influência sobre convulsões quimicamente induzidas	32
4.5.6	Rota-rod	33
4.6	Atividade comportamental	34
4.6.1	Nado forçado	34
4.6.2	Campo aberto	34
4.7	Análise estatística	35
5.	Resultados	36
5.1	Avaliação da composição química do óleo essencial de <i>A. annua</i>	36
5.2	Avaliação da composição química do extrato etanólico de <i>A. annua</i>	39
5.3	Determinação do teor de artemisinina no EAA por CLAE	40
5.4	Determinação da DE₅₀	42
5.5	Determinação da DL₅₀	44

5.6	Convulsões quimicamente induzidas	45
5.6.1	Picrotoxina	45
5.6.2	Pilocarpina	46
5.6.7	Pentilenotetrazol	47
5.6.4	Estricnina	48
5.6.5	Sono induzido por PBS	49
5.6.7	Coordenação motora	51
5.7	Ensaio comportamentais	54
5.7.1	Nado forçado	54
5.7.2	Campo aberto	56
6.	Discussão	59
7.	Conclusões	71
8.	Referências Bibliográficas	73

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. annua</i>	<i>Artemisia annua</i>
CG	Cromatografia gasosa
CG - MS	Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas
CG-FID	Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
d.p.	Desvio-padrão
DE	Dose efetiva
DL	Dose letal
EAA	Extrato etanólico de <i>A. annua</i>
EtOH	Etanol
FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
G	Grama
GABA	Ácido γ -amino butírico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE - UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultra-violeta
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilograma

Kg/ha	Kilos por hectare
mg	Miligrama
mL	mililitro
OEAA	Óleo essencial de <i>A. annua</i>
P.	Plasmodium
P/V	Peso / volume
PBS	Pentobarbital sódico
PIC	Picrotoxina
PL	Pilocarpina
PTZ	Pentilenotetrazol
r.p.m.	Rotações por minuto
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
STC	Estricnina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

O presente trabalho propôs avaliar a atividade central e o efeito comportamental em animais tratados com o óleo essencial e extrato bruto etanólico de *Artemisia annua*. As folhas de *A. annua* foram coletadas no campo experimental de plantas medicinais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP - na cidade de Paulínia, SP. O extrato etanólico (EAA) foi preparado a partir da planta fresca em etanol absoluto, sob turbolização à temperatura ambiente. O óleo essencial (OEAA) foi obtido por arraste a vapor d'água. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* – albinus, Wistar) e camundongos (albinus, Swiss) machos, pesando entre 150 – 200 g e 20 – 25 g, respectivamente. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), com controle automático de claro/escuro a cada doze horas, ração e água “ad libitum”. Os seguintes ensaios foram realizados: dose efetiva média; dose letal média; convulsões induzidas por picrotoxina (6 mg/kg i.p.), pentilenotetrazol (85 mg/kg i.p.), estriquinina (2 mg/kg s.c.) e pilocarpina (300 mg/kg i.p.); rota-rod; sono induzido por pentobarbital sódico; nado forçado e campo aberto. Os dados foram expressos em média \pm D.P. e a análise estatística empregada foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Resultados com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A DE_{50} encontrada foi de 470 mg/kg para o OEAA e 450 mg/kg do EAA. A toxicidade aguda apresentou uma DL_{50} de 790 mg/kg do OEAA. No EAA, não houve mortes até a dose de 2,0 g/kg, sendo sua DL_{50} superior a esta. Os resultados obtidos para as convulsões quimicamente induzidas foram: PIC: OEAA ($14,27 \pm 1,75$ min), EAA ($10,42 \pm 1,46$ min) e controle ($18,05 \pm 1,55$ min); PILO: OEAA ($7,39 \pm 0,55$ min), EAA ($7,22 \pm 0,67$ min) e controle ($10,54 \pm 0,65$ min); PTZ: OEAA ($12,36 \pm 1,18$ min), EAA ($11,17 \pm 1,59$ min) e controle ($1,59 \pm 0,26$ min); STC: OEAA ($3,41 \pm 0,40$ min), EAA ($2,66 \pm 0,36$ min) e controle ($1,18 \pm 0,07$ min). No ensaio de sono induzido por barbitúricos, os tempos obtidos foram: tempo de perda dos reflexos: OEAA ($0,8 \pm 0,37$ min), EAA ($4,6 \pm 0,54$ min) e controle ($5,6 \pm 0,42$ min); tempo total de sono: OEAA ($219,0 \pm 7,34$ min), EAA ($137,5 \pm 6,39$ min) e controle ($78,6 \pm 3,31$ min). No ensaio de nado forçado, pode-se notar um tempo total de nado de $0,47 + 0,86$ min para o OEAA, $3,0 + 0,47$ min e para o EAA e $4,3 +$

0,15 min para o grupo controle. O tempo de flutuação dos animais foi de: OEAA (4,30 + 1,10 min), EAA (1,2 + 0,21 min) e controle (0,2 + 0,15 min). No ensaio de campo aberto os resultados obtidos para os diferentes parâmetros (em unidade) avaliados foram: deambulação: OEAA (4,3 + 3,60), EAA (76,2 + 7,69) e controle (87,0 + 31,5); exploração OEAA (0,60 + 0,89), EAA (12,6 + 3,43) e controle (20,8 + 5,60); levante: OEAA (zero), EAA (14,2 + 1,48) e controle (20,4 + 4,39); asseio: OEAA (zero), EAA (5,2 + 0,83) e controle (20,2 + 9,20). Pode-se sugerir com base nos resultados uma alta toxicidade aguda e uma possível ação colinérgica do OEAA. No EAA, não notou-se uma toxicidade aguda significativa e podemos sugerir uma ação colinérgica e dopaminérgica junto ao SNC.

Abstract

The purpose of the present study is to evaluate the central activity and the behavioral effect in animals of the essential oil and the ethanolic extract of *Artemisia annua* L. The plant was collected in the experimental field of medicinal plants of the Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP, located in Paulínia, SP, Brazil. The extract was prepared with fresh leaves with ethanol P.A., at room temperature. The essential oil was obtained by hidrodestilation. Were used male rats (*Rattus norvegicus* – albinus, Wistar) and male mice (albinus, Swiss), weighing 150 – 200 g and 20 – 25 g, respectively. The animals were kept in a climatic environment, in 12 hour/shifts with dark/light control, with food and water “ad libitum”. The following assays were done: average effectively dose; average lethal dose; chemically convulsion induced by: picrotoxine (6 mg/kg i.p.), pentylenotetrazole (85 mg/kg i.p.), strychnine (2 mg/kg s.c.) and pilocarpine (300 mg/kg i.p.); sleeping time induced by pentobarbital; forced swimming and open field tests. Data were presented by means of \pm S.D. and statistical analysis were made using ANOVA followed by Tukey – Kramer multiple comparison test. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant. The ED_{50} for the essential oil was 470 mg/kg and 450 mg/kg for the EAA. The acute toxicity showed a LD_{50} of 790 mg/kg for the OEAA and more than 2 g/kg for the EAA. The results obtained for the chemically induced convulsions were: PIC: OEAA ($14,27 \pm 1,75$ min), EAA ($10,42 \pm 1,46$ min) and control ($18,05 \pm 1,55$ min); PILO: OEAA ($7,39 \pm 0,55$ min), EAA ($7,22 \pm 0,67$ min) and control ($10,54 \pm 0,65$ min); PTZ: OEAA ($12,36 \pm 1,18$ min), EAA ($11,17 \pm 1,59$ min) and control ($1,59 \pm 0,26$ min); STC: OEAA ($3,41 \pm 0,40$ min), EAA ($2,66 \pm 0,36$ min) and control ($1,18 \pm 0,07$ min). In the sleeping time assay, the times presented were: lost of reflex OEAA ($0,8 \pm 0,37$ min), EAA ($4,6 \pm 0,54$ min) and control ($5,6 \pm 0,42$ min); total sleeping time: OEAA ($219,0 \pm 7,34$ min), EAA ($137,5 \pm 6,39$ min) and control ($78,6 \pm 3,31$ min). In the forced swimming test, the total swimming time for OEAA was $0,47 + 0,86$ min; and for EAA $3,0 + 0,47$ min. The immobility time was: OEAA ($4,30 + 1,10$ min), EAA ($1,2 + 0,21$ min) and control ($0,2 + 0,15$ min).

The open field test presented the following results for the evaluated parameters (units) : deambulation: OEAA (4,3 + 3,60), EAA (76,2 + 7,69) and control (87,0 + 31,5); exploration: OEAA (0,60 + 0,89), EAA (12,6 + 3,43) and control (20,8 + 5,60); upper: OEAA (zero), EAA (14,2 + 1,48) and control (20,4 + 4,39); cleaning: OEAA (zero), EAA (5,2 + 0,83) and control (20,2 + 9,20). According to the results obtained, we suggest that the OEAA have a high acute toxicity and a possible colinergic action, and the EAA showed a dopaminergic and colinergic action, but it did not present a significant acute toxicity.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Existem relatos na literatura sobre diversas plantas que apresentam toxicidade sobre o Sistema Nervoso Central (SIMÕES et SPITZER, 2001). Um exemplo de um composto químico encontrado em diversos gêneros é a cânfora. A dose letal desta foi reportada entre 50 a 500 mg/kg. Homens adultos sobreviveram à ingestão de até 30 gramas deste composto por via oral. São características da intoxicação aguda por cânfora náuseas, vômitos, excitabilidade muscular (tremor), tonturas, alucinações, podendo promover convulsões (RABL et al., 1997).

De acordo com CHEYMOL (1950), convulsões são respostas a uma excessiva e rápida descarga de neurotransmissores na matéria cinzenta do cérebro. Drogas convulsivantes podem agir tanto por alterar a permeabilidade da membrana para diferentes íons como modificar a concentração de neurotransmissores no cérebro. Uma diminuição da concentração do neurotransmissor inibitório ácido γ -amino butírico (GABA) ou também a alteração da concentração de serotonina ou glicina é observada durante a ação destas drogas.

INTRODUÇÃO

A cânfora é encontrada no gênero *Artemisia*, juntamente com outros compostos neuroativos, como o 1,8 cineol.

A planta *Artemisia annua* L. (Asteraceae), está listada na farmacopéia Chinesa como um medicamento para febres causadas por malária e contém um composto ativo já estudado, a artemisinina. O composto isolado em 1920 de *Chinchona* ssp., conhecido como quinina, é um fármaco protótipo da categoria terapêutica dos antimaláricos. Os chineses possuem muitas informações sobre plantas medicinais e o isolamento deste composto estimulou a pesquisa de plantas como fontes potenciais de drogas antimaláricas, possibilitando assim a descoberta de princípios ativos naturais como a artemisinina.

Os constituintes químicos de algumas espécies deste gênero são compostos terpênicos, presentes em óleos essenciais, como α -tujona e cânfora (CARNAT et al, 1985), encontrados nas espécies *A. annua* e *A. camphorata*. Estes compostos freqüentemente apresentam toxicidade elevada. Os efeitos tóxicos dos óleos voláteis não incluem somente aqueles decorrentes de uma intoxicação aguda, mas também da sua utilização crônica, geralmente apresentando-se de forma dose-dependente. Alguns óleos essenciais ricos em tujona,

INTRODUÇÃO

cânfora, fenchona e pinocanfona são neurotóxicos em altas doses, podendo provocar crises epileptiformes ou tetaniformes (convulsões), distúrbios sensoriais e até psíquicos (SIMÕES & SPITZER, 2001).

O risco de efeitos tóxicos provenientes do uso desta planta parece ser limitado, considerando sua inserção na farmacopéia da Republica Popular da China, com recomendações em termos de dosagem e uso terapêutico, estabelecido pela medicina atual. Efeitos adversos do composto ativo isolado, artemisinina, são mínimos, mas como medicação experimental (preparo caseiro), deve ser dada atenção aos possíveis riscos e efeitos colaterais quando utilizadas preparações com *A. annua* (VREIS & DIEN, 1996).

A literatura a respeito das propriedades farmacológicas sobre o SNC da *A. annua* é escassa, merecendo um estudo mais detalhado de sua atividade tóxica e sua capacidade de causar distúrbios sensoriais, sendo necessário avaliar este possível potencial neurotóxico do extrato bruto etanólico e do óleo essencial provenientes desta planta.

INTRODUÇÃO

Assim, o presente trabalho propôs avaliar a atividade sobre o SNC e o efeito comportamental (em animais) do óleo essencial e extrato bruto etanólico de *A. annua*, frente a modelos convulsivos provocados por diferentes agentes e ensaios comportamentais, bem como seu envolvimento na resposta farmacológica, avaliando o seu provável mecanismo de ação.

REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão de Literatura

2.1 Estudo de mecanismos centrais

O desenvolvimento de novos fármacos que atuem no SNC é realizado com base no conhecimento de mecanismos centrais. Os produtos naturais podem exercer ação neurotóxica, devendo ser estudados com base em drogas que possuem seu mecanismo de ação conhecido ou efeitos comportamentais.

Assim, visando saber quais os efeitos centrais que esses medicamentos exercem, a literatura traz diversas drogas e seus respectivos mecanismos de ação.

A picrotoxina é um antagonista seletivo reversível para receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), os quais tem uma relação estreita com epilepsia (LEIDENHEIMER et al., 1991; GALE, 1992). O GABA é o neurotransmissor inibitório mais importante no SNC, e a inibição de sua transmissão é considerada como um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de epilepsia (GALE, 1992).

O mecanismo de ação do pentilenotetrazol foi estudado por BROWNING & NELSON (1986), que demonstraram considerando

REVISÃO DE LITERATURA

duas rotas neurais distintas, uma inicial que está localizada no córtex cerebral, diminuindo a atividade gabaérgica, que posteriormente transmite este sinal para o centro respiratório através de uma rede neural que estaria envolvida na resposta convulsiva.

Outra via que pode ser estudada na resposta convulsiva é a colinérgica. A pilocarpina é um agente colinérgico de ação central utilizado para estudar respostas de drogas sobre o Sistema Nervoso Autônomo, possibilitando saber a atividade da droga como agonista ou antagonista deste sistema (LIMA et al, 1993).

Uma via que também pode causar ataques convulsivos está relacionada com a inibição da atividade dos interneurônios inibitórios medulares (células de Renshaw) por antagonistas de glicina, responsável pela regulação desta via, que coordenam o feed-back positivo para depressão deste sistema, evitando a liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios. O processo convulsivo associado à estriçnina é causado por antagonismo de receptores glicinérgicos destas células, que quando bloqueados ficam impedidas de regular esta via, promovendo convulsões sob qualquer estímulo, seja

REVISÃO DE LITERATURA

visual, auditivo ou físico. Em casos de intoxicação, é sabido que a administração de doses altas de glicina podem inibir este processo, bem como o repouso (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Para avaliar o potencial depressor de uma droga podemos realizar o ensaio de sono induzido por barbitúricos. Estas drogas aumentam o tempo de abertura dos canais de íons cloreto, causando hiperpolarização neuronal e depressão como consequência. Drogas depressoras aumentam o tempo de sono induzido por este tipo de droga (LIMA et al, 1993).

2.2 Compostos terpênicos

Todos organismos vivos podem ser considerados como laboratórios biossintéticos não só relacionados a compostos utilizados como fonte alimentar (proteínas, carboidratos, ácidos graxos) para os seres humanos e animais, mas também como produtores de uma enorme quantidade de compostos químicos que podem exercer potentes efeitos fisiológicos.

Assim, o Reino Vegetal acumula diversas substâncias orgânicas em quantidade suficiente para serem utilizadas economicamente como precursores químicos ou matérias primas

REVISÃO DE LITERATURA

para aplicações científicas, tecnológicas ou comerciais (SIMÕES & SPITZER, 2001).

Estes produtos de origem natural são empregados, direta ou indiretamente por muitas indústrias e são figuras proeminentes na área de química fina. Sua importância econômica está relacionada como fonte de óleos industriais, resinas, taninos, saponinas, gomas, ceras, fitoterápicos, entre outros diversos produtos (DUKE et al., 2000).

Remédios preparados à base de ervas medicinais tem sua origem tão antiga quanto à humanidade. Para o tratamento dos diversos males que os acometiam, nossos antepassados utilizavam-se, por tentativa e erro, de diversas espécies vegetais obtendo, às vezes, o sucesso da cura (CALIXTO, 2000). Dentro dos compostos que possuem atividade farmacológica e podem ser isolados de plantas, os óleos essenciais destacam-se por sua forte eficácia, em especial, quando tratadas disfunções do SNC (SIMÕES & SPITZER, 2000).

Estes óleos têm revelado compostos pouco usuais e atividades farmacológicas inesperadas (GOBEL et al., 1995). São utilizados na prática médica como sedativo, carminativo,

REVISÃO DE LITERATURA

diurético, expectorante, anti-séptico, desinfetante ou antimicrobiano (ADESINA, 1982).

Terpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais, podendo ser definidos como produtos naturais que possuem unidades isoprênicas (C_5H_8). Durante sua biossíntese, as unidades isoprênicas são condensadas de maneira cabeça - cauda, e o número destas unidades incorporadas servem como base de classificação. Quando da condensação de duas unidades isoprênicas ($C_{10}H_{16}$) são chamados de monoterpenos. Os sesquiterpenos por três destas unidades ($C_{15}H_{24}$) e os diterpenos são formados por quatro unidades isoprênicas ($C_{20}H_{32}$). As unidades de isopreno originam-se biogeneticamente do acetato por via do ácido mevalônico e tem cadeias ramificadas, com cinco unidades de carbono que contém duas duplas ligações (ROBBERS & TYLER, 1996).

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância em vegetais superiores. Fungos também são capazes de produzir compostos desta classe, e organismos marinhos são uma fonte de terpenóides pouco comuns. Esses compostos também são encontrados em feromônios

REVISÃO DE LITERATURA

de insetos e em suas secreções de defesa (HARBONE et al., 1991).

O número de compostos isolados desta classe é muito superior ao de qualquer outro grupo de produtos naturais (mais de 20.000 compostos). Os terpenóides vegetais têm papel essencial na discussão de ecologia química, pois exercem importantes funções como aleloquímicos, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, fitoalexinas, defesa contra herbívoros, hormônios vegetais e moléculas de sinalização. Esta classe de compostos está envolvida em quase todas as interações possíveis entre plantas, planta - animais e planta - microrganismos (TERANISHI et al, 1993).

Os compostos terpênicos, devido a seu grande espectro de ação biológica e extensa informação a respeito de suas ações farmacológicas, correlaciona a heterogeneidade de suas estruturas químicas com suas diversas propriedades terapêuticas, tem sido de considerável interesse para os laboratórios de química medicinal.

Quando estes compostos foram pesquisados para avaliar seu potencial sobre o SNC, pode-se notar que pela sua elevada

REVISÃO DE LITERATURA

lipossolubilidade apresentam facilidade em atravessar membranas biológicas, como a barreira hemato-encefálica. O óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* produziu depressão em modelos animais para avaliação da atividade anticonvulsivante (POURGHOLAMI et al., 1999). OCCHIUTO et al. (1995) mostraram que o resíduo não volátil do óleo essencial de *Citrus bergamia* possui ação depressora junto ao SNC. ELISABETSKY et al. (1995) concluíram que o linalol, um monoterpene majoritário de diversos óleos essenciais de espécies aromáticas possui alta atividade depressiva, bem como a galphimina B, um triterpene isolado da *Galphimia glauca* (TORTORIELLO & ORTEGA, 1995). O óleo essencial de *Anacardium occidentale* se mostrou um potente depressor do SNC com base em estudos comportamentais (GARG & KASERA, 1983).

Compostos desta classe são reconhecidos por serem neuroativos e algumas lactonas presentes no café (*Coffea arabica*) estão relacionadas à atividade opióide (FERRENDELI et al, 1989) e também podem estar vinculadas com efeito de recompensa em animais (BLOOM & KUPFER, 1995). É válido salientar que compostos lactônicos são comuns em óleos essenciais (COELHO de SOUZA et al., 1997).

REVISÃO DE LITERATURA

Entre estes compostos, as lactonas sesquiterpênicas representam uma classe de substâncias que têm sido utilizadas como fonte de compostos com atividade biológica. Entre estas atividades, encontram-se relatos na literatura como antimalárica (KLAYMAN, 1985), inseticida, herbicida, antimicrobiana e/ou citotóxica (TELLEZ et al., 2000), entre outras.

Os compostos lactônicos sesquiterpênicos diferem quimicamente de sesquiterpenos pela presença de um sistema α -metileno γ -lactona, e muitos apresentam carbonilas α,β -insaturadas. Esses grupos funcionais representam sítios reativos para grupamentos tiol e grupos amino de enzimas. Como consequência, um grande espectro de atividades biológicas foi reportado para esta classe de compostos, sendo que alguns deles são altamente tóxicos para mamíferos (ROBBERS & TYLER, 1996).

KUBO et al. (1996) relataram que alguns sesquiterpenos possuem atividade citotóxica e antioxidante. Outros pesquisadores demonstraram a atividade de lactonas sesquiterpênicas sobre citoproteção da mucosa gástrica, evitando o aparecimento de processos ulcerativos em ratos

REVISÃO DE LITERATURA

(GUARDIA et al, 1994; GIORDANO et al, 1992; GIORDANO et al, 1995). HALL et al. (1987) mostraram a relação estrutura atividade de lactonas sesquiterpênicas esterificadas em processos inflamatórios.

Relatos sobre a composição química do óleo essencial da *A. annua* demonstram grande variabilidade relacionados com sazonalidade e origem geográfica, destacando a presença de cânfora em todos óleos pesquisados. Outros compostos terpênicos identificados foram 1,8-cineol, α e β pineno, carvona, mirceno, entre outros (FOGLIO, 1996). CARNAT et al. (1985) demonstraram que o óleo essencial de *A. annua* possui compostos terpênicos como a α -tujona e cânfora. É sabido que estes compostos são neurotóxicos e possuem atividade depressora em baixas doses, uma ação freqüentemente observada em plantas ricas em óleos essenciais que possuem terpenos como compostos majoritários (Silva, 1998).

A cânfora é um monoterpeno que apresenta em sua estrutura um grupo cetona, podendo ser obtida por extração de plantas (e.g. *Cinnamomun camphora* L.) ou por síntese orgânica. É utilizada para conter irritações provenientes de fibrose e nevralgia relacionada com inflamações das

REVISÃO DE LITERATURA

articulações. Também estimula as terminações nervosas da pele e induz a um alívio da dor por inibir nociceptores. Sua utilização tópica é segura e a inalação de vapores aromáticos causa anestesia local nas vias respiratórias (ROBBERS & TYLER, 1996). Existem relatos na literatura sobre a toxicidade da cânfora. A dose letal foi reportada entre 50 a 500 mg/kg. Humanos adultos sobreviveram à ingestão de até 30 gramas deste composto. São características da intoxicação aguda por cânfora náuseas, vômitos, excitabilidade muscular (tremor), tonturas, alucinações, podendo promover convulsões (RABL et al., 1997).

O 1,8 cineol, também conhecido como eucaliptol, é um monoterpene obtido do óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) e encontrado em outras fontes naturais como o óleo essencial de *A. annua* (ROBBERS & TYLER, 1996). Classificado como um flavorizante, é utilizado em uma variedade de produtos, tais como inaladores e sprays nasais, anti-séptico ou anestésico fraco de nariz e garganta. Também é utilizado como expectorante em casos de bronquite, além de apresentar uma potente ação irritante da pele quando utilizado topicamente.

REVISÃO DE LITERATURA



Figura 1: Estrutura química da cânfora e 1,8 cineol.

2.3 *Artemisia annua*: visão etnofarmacológica.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a malária é a mais importante doença parasitária tropical e mata mais pessoas que todas as outras doenças parasitárias registradas, excetuando-se a tuberculose. A estimativa mundial de ocorrência da doença é da ordem de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano e a mortalidade causada pela malária é superior a 1 milhão de mortes/ano (WHO, 1998a). No Brasil, em 1996, foram reportados aproximadamente 450 mil casos clínicos da doença (80% na região amazônica), 100 mil a menos que nos anos anteriores. Destes, 13.500 óbitos foram registrados (YNTERIAM, 1996; LUCÍRIO, 1997; WHO, 1998a).

REVISÃO DE LITERATURA

A malária humana é causada pela invasão de um parasita protozoário da classe *Plasmodium* no corpo humano. O *P.falciparum* é a causa da maioria das infecções e também é o mais letal (causa a malária cerebral), predominando na África Tropical, Amazônia, sudeste da Ásia e Oceania. O *Plasmodium* passa parte do seu ciclo vital nas células do fígado e do sangue humano e parte no corpo de um mosquito. O vetor que transmite os parasitas de uma pessoa para a outra é a fêmea do mosquito *Anopheles* (WHO, 1998b).

Muitos são os fatores que contribuem para o aumento alarmante dos casos de malária no mundo, dentre eles, podem ser citadas as mudanças climáticas, a deterioração dos serviços de saúde e a resistência às drogas antimaláricas.

Nos últimos 50 anos, as principais estratégias para o controle da malária foram à utilização de inseticidas contra o vetor *Anopheles* e o uso de drogas antimaláricas para a profilaxia e tratamento da doença (WHO, 1998a).

REVISÃO DE LITERATURA

Até o momento, a melhor alternativa para o tratamento da malária causada pelo *P.falciparum*, é a utilização dos derivados semi-sintéticos da artemisinina, que demonstra comprovada eficácia no controle das cepas de *P. falciparum* resistentes às múltiplas drogas, além de apresentar pouco ou nenhum efeito colateral (KLAYMAN, 1985; WHO, 1998a).

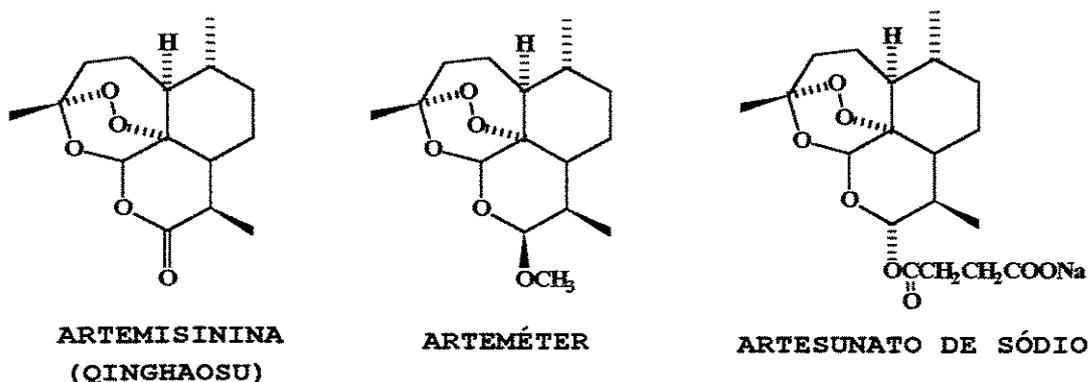


FIGURA 2: Artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos antimaláricos.

A *A. annua* é utilizada há séculos na medicina tradicional chinesa, para o tratamento de febre e malária (KLAYMAN, 1985; SIMON *et al.*, 1990). Em 1971, químicos chineses isolaram das folhas das plantas a substância reputada pela ação medicinal. Este composto do metabolismo secundário vegetal, chamado artemisinina ou qinghaosu (em

REVISÃO DE LITERATURA

chinês: *su* = de extrato e *qing hau* = erva verde), é uma lactona sesquiterpênica que possui um grupo endoperóxido-1,2,4-trioxano e, diferentemente de outros antimaláricos, não possui nitrogênio na sua estrutura. O composto tem sido usado com sucesso em milhares de pacientes na China, incluindo aqueles acometidos com ambas as cepas do *P.falciparum*, a resistente e a sensível a cloroquina (KLAYMAN, 1985).

Quando a droga vegetal é preparada na forma de infusão, apresenta concentrações consideráveis deste princípio ativo, indicando que outros constituintes da planta (e.g. flavonóides, saponinas ou glicosídeos) podem ajudar a manter compostos lipofílicos em solução aquosa. Sabendo que este composto é termossensível, sua extração por decocção se mostra ineficiente comparada ao método de infusão (MUELLER et al., 2000).

Estudos recentes propõem que o mecanismo de ação da artemisinina é a formação de um peróxido orgânico que é reduzido por parasitas ricos em ferro, gerando intermediários radicalares citotóxicos, causando a morte do parasita (KLAYMAN, 1985).

REVISÃO DE LITERATURA

A síntese química da artemisinina é complexa, envolvendo inúmeras etapas e apresentando baixos rendimentos (CHAN *et al.*, 1995; GELDRE *et al.*, 1997). Corroborando, os altos custos da síntese da molécula tornam o isolamento a partir da planta de *A. annua* a melhor forma para obtenção do fitofármaco (WOERDENBAG *et al.*, 1991; FERREIRA & JANICK, 1996a; GELDRE *et al.*, 1997).

Pesquisadores chineses estudaram diversas espécies do gênero *Artemisia* visando confirmar a atividade antimalárica das mesmas. Porém só a *A. annua* L. e a *A. apiecea* provaram ser eficazes contra o *Plasmodium falciparum* e o *Plasmodium vivax* (KLAYMAN, 1985). A peculiaridade sobre as outras espécies do gênero é que tanto a *A. annua* L. como a *A. apiecea* apresentam artemisinina, responsável por essa atividade. Este composto foi identificado a partir do extrato etéreo dessas espécies, que quando submetido a ensaios farmacológicos, apresentou atividade antimalárica (VRIES & DIEN, 1996).

A *A. annua* L. (figura 3), vulgarmente chamada de "Absinto Chinês", pertencente à família das Compostas (Asteraceae), nativa de regiões de clima temperado, ocorrendo

REVISÃO DE LITERATURA

naturalmente como parte da vegetação das planícies ao norte da China (40° N e 109° E), acima de 1000 metros de altitude. Atualmente a planta é cultivada em países do Sudeste da Europa (Bulgária, Hungria, Turquia, Romênia e antiga Iugoslávia), em Piemonte (Itália), França, Espanha, Moldavia e América Latina (Brasil e Argentina) não só como fonte de artemisinina, mas também óleo essencial. Na literatura, até o momento, estão descritas 400 espécies deste gênero (MAGALHÃES, 1996; GELDRE et al., 1997).

No Brasil, a introdução da *A. annua* ocorreu em 1987, por pesquisadores do CPQBA/UNICAMP (FERREIRA, 1995). Atualmente, através de seleção para aumentar o teor de artemisinina, o programa de melhoramento da *A. annua* L. do CPQBA/UNICAMP conta com genótipos selecionados (híbridos) que chegam a produzir 25 kg/ha da molécula, enquanto que nas populações base o rendimento é apenas de 5 kg/ha (MAGALHÃES et al., 1997).

A. annua (figura 3) é uma planta herbácea altamente aromática, com odor característico, hábito de crescimento determinado e altura variando entre 0,8 e 2,0 metros (FERREIRA & JANICK, 1996a). A planta reproduz-se naturalmente

REVISÃO DE LITERATURA

por fecundação cruzada e multiplica-se por sementes, além de propagar-se vegetativamente (MAGALHÃES, 1996).

A diversidade de compostos descritos na literatura para a *A. annua* e seus constituintes majoritários no OEAA e EAA podem apresentar atividades centrais relacionados com a presença de cânfora, 1,8 cineol e compostos lactônicos sesquiterpênicos, como a artemisinina. Analisando por este prisma, o estudo do óleo e extrato etanólico (OEAA e EAA) desta planta sobre o SNC foi alvo deste trabalho, sendo que a literatura é muito escassa sobre esta atividade proveniente desta planta, merecendo um estudo mais amplo.

REVISÃO DE LITERATURA



Figura 3: Híbrido de *A. annua* (Ch x Viet 55) cultivada no CPQBA.

PROPOSIÇÃO

3. Objetivo

Visando o estudo da atividade psicofarmacológica do óleo essencial e extrato bruto etanólico de *Artemisia annua* sobre modelos animais, foram objetivos deste trabalho:

1. Avaliar a possível atividade do OEAA e EAA sobre o SNC.
2. Determinar a toxicidade aguda deste produto natural.
3. Avaliar os mecanismos centrais pelo qual o OEAA e o EAA exercem sua atividade.

MATERIAL E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos:

4.1- Reagentes, solventes e drogas.

Os reagentes e solventes utilizados durante o trabalho foram de grau analítico. As drogas utilizadas foram procedentes da Sigma CO. (picrotoxina, pentilenotetrazol, pilocarpina e estriçnina) e Cristália Indústria Farmacêutica (pentobarbital sódico).

4.2- Obtenção do material vegetal

As folhas de *Artemisia annua* L. - 39 x 5 - foram coletadas no campo experimental de plantas medicinais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP - na cidade de Paulínia, interior do estado de São Paulo. Uma exsicata está depositada no herbário do CPQBA (CPQBA 12.46).

4.3- Fitoquímica

4.3.1 - Obtenção do óleo essencial por Arraste a

Vapor:

Cerca de 35 Kg de folhas frescas e talos pequenos de *A. annua* L., coletadas em 24/04/2001, foram adicionados em uma

MATERIAL E MÉTODOS

dorna acoplada a um condensador de serpentina de aço inox com capacidade para 230 L (50 Kg de folhas), seguido da passagem de vapor de água, gerado em caldeira com capacidade de 40Kg de vapor/hora e vazão de operação 6,0 L/hora

A destilação foi mantida por 2 horas e o óleo essencial recolhido em vaso separador de aço inox de 10L. Em seguida, o óleo foi separado da fase aquosa em um funil de separação de 2,0L.

4.3.2 - Preparação do Extrato Etanólico

Foi preparado a partir de 450 g de folhas frescas e finamente divididas de *A. annua* coletadas em 21/03/2000. A droga vegetal foi extraída com etanol absoluto (4,0L), sob agitação mecânica e a temperatura ambiente por 3 horas. Após filtração, o processo de turbolização foi repetido com o resíduo da planta. Os extratos foram agrupados e o resíduo da planta foi lavado com etanol (1,0 L) e evaporado em evaporador rotativo, mantendo a temperatura do banho inferior a 35 °C.

MATERIAL E MÉTODOS

4.4 Métodos Analíticos:

4.4.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) .

A análise do óleo essencial foi realizada por CG-EM utilizando Cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 Série II (Palo Alto, CA, USA) equipado com detetor seletivo de massas Hewlett-Packard 5971, injetor *split/splitless*, utilizando-se coluna capilar HP-5 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μm). Temperaturas: injetor = 220°C, detetor = 280°C, coluna = 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C (7 min). Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹. As amostras foram dissolvidas em acetato de etila na concentração de 20 mg/mL.

A identificação dos principais constituintes do OEAA e EAA foi realizada por comparação entre os espectros de massas com os espectros das espectrotecas Wiley e Nist 98 instaladas no computador.

MATERIAL E MÉTODOS

4.4.2 Cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização em chama (CG-FID).

O óleo essencial também foi analisado utilizando Cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 Série II (Palo Alto, CA, USA) equipado com detector por ionização em chama, injetor *split/splitless*, utilizando-se coluna capilar HP-5 (25 m x 0,20 mm x 0,33 μm). Temperaturas: injetor = 220°C, detector = 280°C, coluna = 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C (7 min). Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹. As injeções foram feitas em modo *splitless*, usando He super seco como gás de arraste.

A identificação dos principais constituintes do OEAA e EAA foi realizada por comparação dos índices de retenção (IR) (ADAMS, 1995).

4.4.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV).

A quantificação de artemisinina por CLAE/UV foi realizada de acordo com o método proposto por ZHAO & ZHENG (1986) com adaptações. Este método utiliza tratamento de derivatização da artemisinina, com solução alcalina (NaOH

MATERIAL E MÉTODOS

0,2%), para a produção do composto Q292, que em meio ácido se torna Q260, este último detectável em UV.

Para a derivatização da artemisinina, foram adicionados em um tubo de reação, alíquotas (em duplicata) do extrato (1,0 mL, 10,0 mg/mL), etanol 95% (1,0 mL) e solução aquosa de NaOH 0,2% (4,0 mL). Os tubos foram fechados com tampas de borracha e a mistura aquecida a 40 °C durante 15 minutos (com agitação magnética), para depois ser rapidamente resfriada em banho de gelo e neutralizada com 4,0 mL de uma solução de ácido acético 0,1M em etanol 20%. Para a derivatização dos padrões de artemisinina, substituiu-se o etanol 95% por 1,0 mL da solução de extração (0,5 mg de acetofenona em 1,0 mL de acetonitrila).

Duas concentrações de artemisinina foram utilizadas com padrão, respectivamente 0,04 e 0,2 mg/ ml de artemisinina em etanol 95%. O teor de artemisinina foi avaliado por comparação da área dos picos dos padrões com os das amostras. Anteriormente a injeção, a mistura foi filtrada em filtro WATERS GVWP 0,2 µm.

MATERIAL E MÉTODOS

O equipamento utilizado para o doseamento do Q260 por CLAE/UV constituiu-se em um cromatógrafo WATERS modelo M-45 de pistão simples, com injeção manual e um compartimento de aquecimento para a coluna, sendo a temperatura mantida a 47 °C. A separação foi efetuada em uma coluna WATERS/ NOVA-PAK® C18/4µm/ 3,9 x 150 mm. Como fase móvel, utilizou-se solução tampão fosfato 10 mM mais acetonitrila (80:20), com vazão de 1,0 ml/min. Nestas condições, o tempo de retenção para Q260 foi aproximadamente 3 minutos e para o padrão interno (acetofenona), aproximadamente 8,5 minutos. O tempo necessário para análise de cada amostra foi aproximadamente 50 minutos, já que após a detecção de Q260 e acetofenona o fluxo era mantido por 40 minutos, visando limpar a coluna para a próxima análise. A detecção foi realizada no modo absorvância, com comprimento de onda de 260 nm, através de detetor WATERS/LANBDA MAX-481. O volume injetado foi de 10 µl.

MATERIAL E MÉTODOS

4.5 Ensaaios farmacológicos:

4.5.1 - Animais:

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* - albinus, linhagem Wistar) e camundongos (*Mus musculus* - albinus, linhagem Swiss) machos, "specific pathogen free", pesando entre 150 - 200 g e 20 - 25 g, respectivamente. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp - CEMIB.

No CPQBA estes animais permaneceram cerca de 10 dias em fase de adaptação. Durante este período, foram mantidos em ambiente climatizado ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com controle automático de claro/escuro a cada doze horas, ração balanceada comercial Nuvilab e água "ad libitum".

4.5.2 - Determinação da DE₅₀

A determinação da Dose Efetiva Média (DE₅₀) foi realizada tendo como base à convulsão provocada por picrotoxina. Grupos de camundongos machos (n = 6) com peso entre 20 - 25 gramas foram utilizados. Estes animais receberam, via i.p., doses únicas de diferentes concentrações (300, 400, 500 e 600 mg/kg) do óleo essencial ou extrato 30 minutos antes de ser administrado a dose de 6 mg/kg de

MATERIAL E MÉTODOS

microtoxina via i.p., e o tempo de latência entre a administração da droga e a convulsão analisado. Com estes resultados foi possível estabelecer a DE₅₀, através de uma curva de potenciação do efeito estimulante expresso considerando a porcentagem do efeito em função da dose, constituindo na plotagem direta das doses utilizadas e as respectivas porcentagens de potenciação no software Microcal Origin.

4.5.3 - Determinação da DL₅₀

Para a determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) foram utilizados grupos de camundongos machos (n = 6) com peso entre 20 - 25 gramas. Estes animais receberam, via i.p., doses únicas de diferentes concentrações (500, 750, 1000, 1250, 1500 e 2000 mg/kg) do óleo essencial ou extrato para posteriormente serem observados após 30 minutos, 1, 2, 24 e 48 horas após a administração. O número de animais mortos foi expresso em porcentagem e a DL₅₀ estabelecida graficamente através de regressão linear no software Microcal Origin.

MATERIAL E MÉTODOS

4.5.4 - Influência sobre o sono induzido por pentobarbital (LIMA et al., 1993).

Foram utilizados três grupos de camundongos machos (n = 8), tratados via i.p. com o óleo essencial (470 mg/kg), extrato (450 mg/kg) ou solução Tween 5% (grupo controle). Trinta minutos depois foi administrado pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p., Cristália). O tempo entre a perda e a recuperação dos reflexos (permanência em decúbito dorsal) foi considerado como o tempo de sono, limitado a um máximo de cinco horas.

4.5.5 - Influência sobre convulsões quimicamente induzidas.

Nestes experimentos, grupos de camundongos machos (n = 8) foram tratados com o óleo essencial (470 mg/kg), extrato (450 mg/kg) ou solução Tween 5%, via i.p., 30 minutos antes da administração dos agentes convulsivantes. O tempo de latência entre a primeira convulsão (maior que 5 segundos) foi observado e o tempo máximo utilizado de 30 minutos àqueles animais que não apresentaram resposta ao estímulo. Também foi analisado o número de óbitos causados pelas drogas. As doses dos agentes convulsivantes empregados foram:

MATERIAL E MÉTODOS

- 85 mg/kg de pentilenotetrazol i.p. (LIMA et al, 1993);
- 300 mg/kg de pilocarpina i.p. (LIMA et al, 1993);
- 6 mg/kg de picrotoxina i.p. (ABDUL-GHANI et al, 1987) e;
- 2 mg/kg estriçnina s.c (VOHORA, 1990).

4.5.6 - Rota-rod (LIMA et al, 1993)

Para a determinação da atividade motora, foram utilizados grupos de ratos machos (n = 8) previamente selecionados pelas suas habilidades em permanecer numa esteira rolante de um aparelho "Rota-rod" (2,5 cm de diâmetro, 12 r.p.m., 25 cm de altura) por mais de dois minutos. Esses animais foram divididos em três grupos, tratados com o óleo essencial (470 mg/kg), extrato (450 mg/kg) ou solução de Tween 5% e testados no aparelho "Rota-rod" em intervalos de 15 minutos durante três horas após o tratamento. O parâmetro utilizado foi o tempo em que o animal permaneceu na esteira após diferentes intervalos de tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

4.6 Atividade Comportamental:

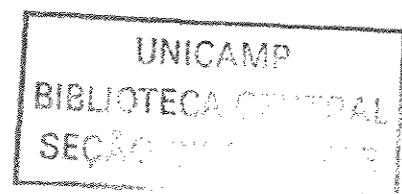
4.6.1 - Nado forçado em ratos (PORSOLT, 1977):

Três grupos constituídos por ratos machos (n = 6) foram tratados com o óleo essencial (470 mg/kg), extrato (450 mg/kg) e Tween 5%. Um pré-teste de 15 minutos foi realizado com cada animal 24 horas antes do experimento, sem analisar nenhum parâmetro. Seis horas antes do experimento outra dose foi administrada, assim como 30 min. antes do experimento.

Os animais foram colocados em uma caixa de vidro (50 x 100 x 50 cm) contendo água aquecida (25 ± 2 °C), a uma profundidade de 35 ± 2 cm, o que os impossibilitava de apoiarem suas patas no fundo. A segunda exposição foi de cinco minutos, onde se observou: 1) tempo de nado; 2) tempo de flutuação e; 3) número de mergulhos.

4.6.2 - Campo aberto (BORSINI & MELI, 1986):

Os animais foram colocados em uma caixa de madeira (100 x 100 x 50 cm) através de uma porta em guilhotina. A caixa possui o piso branco, dividido por linhas azuis em intervalos de 20 cm e duas fontes luminosas dispostas no centro do campo a 40 cm de altura. Quatro objetos diferentemente coloridos



MATERIAL E MÉTODOS

foram dispostos em quatro regiões distintas do campo para analisar o instinto exploratório dos animais. Os parâmetros analisados foram deambulação (número de quadrados percorridos pelo animal), exploração (interesse do animal em se aproximar de diferentes objetos), levante (repetições da retirada das patas dianteiras do solo) e asseio (repetições de limpeza no corpo). Os animais foram filmados para que não houvesse interferência humana e os resultados analisados posteriormente.

4.7 Análise Estatística:

Os dados foram expressos em média \pm d.p. e analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer com o software GraphPadInstat. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

5. Resultados:

5.1 - Avaliação da Composição Química do óleo essencial de *A. annua* L.

A partir de 35Kg de folhas frescas de *A. annua* obteve-se 99,40g do óleo essencial, apresentando um rendimento de 0,28%. O óleo apresentou coloração levemente amarela e aroma adocicado.

A avaliação da composição química do OEAA foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Estes resultados são apresentados na tabela 1.

Os constituintes foram identificados por comparação dos espectros de massa com os das bibliotecas espectrais Wiley-138 e Nist-98, bem como por comparação dos dados de Índice de Retenção e espectros de massa da literatura (ADAMS, 1995), coletada em condições cromatográfica similares.

Os índices de retenção foram obtidos através da análise do cromatograma no CG - FID (Anexo).

RESULTADOS

Tabela 1: Principais constituintes identificados no óleo essenciais de *A. annua* L. Tempo de retenção (Tr); Compostos identificados; Índice de retenção (Ir); % relativa dos compostos.

#	Tempo de Retenção	Identificação	IR	% Relativa
1	7,557	α -pineno	934,4	3,67
2	8,045	canfeno	949,5	5,31
3	8,835	sabibeno	974,0	5,44
4	8,980	β -pineno	978,6	0,51
5	9,337	p-cimeno	989,8	12,21
6	10,987	cineol	1032,0	20,42
7	12,069	α -terpineno	1057,9	1,28
8	13,739	linalol	1098,1	3,82
9	15,873	cânfora	1146,5	22,68
10	17,900	α -terpineol	1192,0	0,78
11	25,489	eugenol	1359,4	0,20
12	28,388	trans cariofileno	1425,0	2,08
13	29,844	farneseno	1458,8	1,90
14	31,053	germacreno D	1486,8	3,54
15	31,286	Biciclo germacreno	1492,0	0,19
		Compostos não identificados		15,97

Os principais constituintes do OEAA são monoterpenos, dentre os quais o 1,8-cineol 6 (20,42%) e a cânfora 9 (22,68%) são majoritários. Os principais sesquiterpenos identificados foram o trans-cariofileno 12 (2,08%) e o germacreno D 14 (3,54%). Na figura 4 está apresentado o Cromatograma Gasoso do OEAA.

RESULTADOS

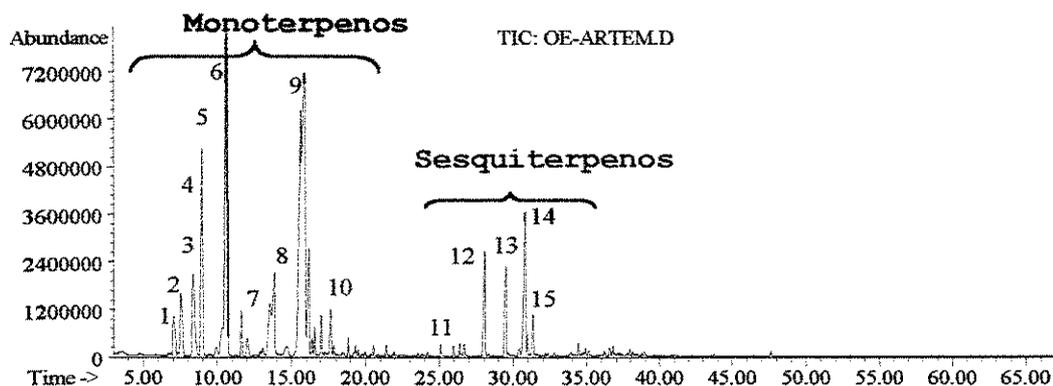


Figura 4: Cromatograma gasoso do óleo essencial de *A. annua* L. e seus principais constituintes.

Os espectros de massas de alguns constituintes do OEAA como o 1,8-cineol 6, da cânfora 9 e do germacreno D 14, estão apresentados nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

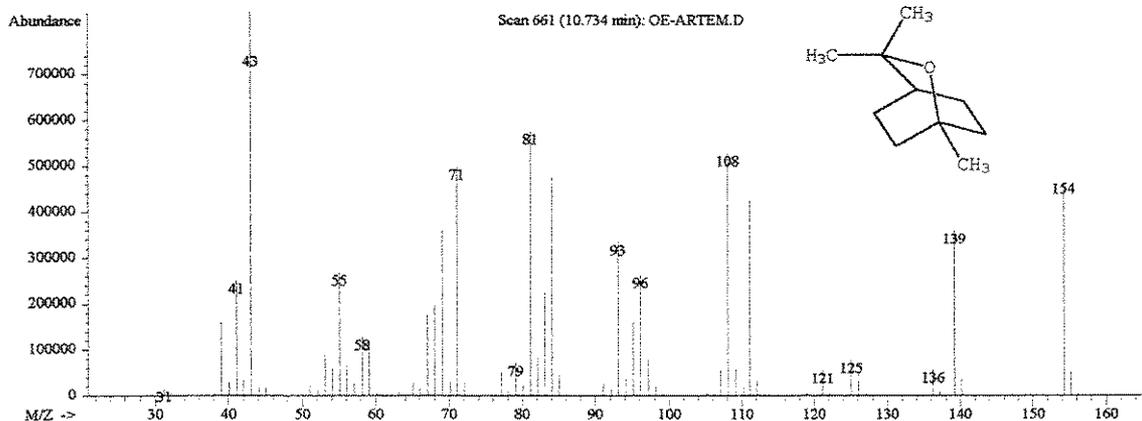


Figura 5: Espectro de massas do 1,8-cineol ($C_{10}H_{18}O$; PM = 154).

RESULTADOS

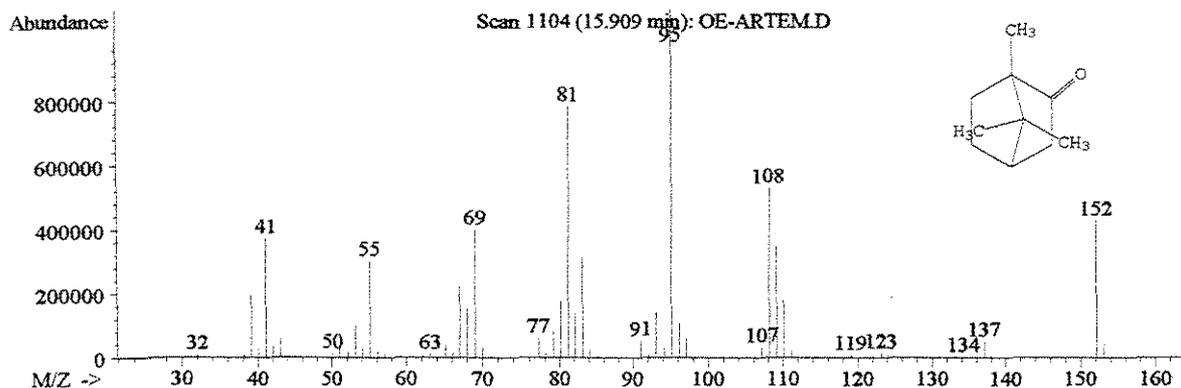


Figura 6: Espectro de massas da cânfora ($C_{10}H_{16}O$; PM = 152).

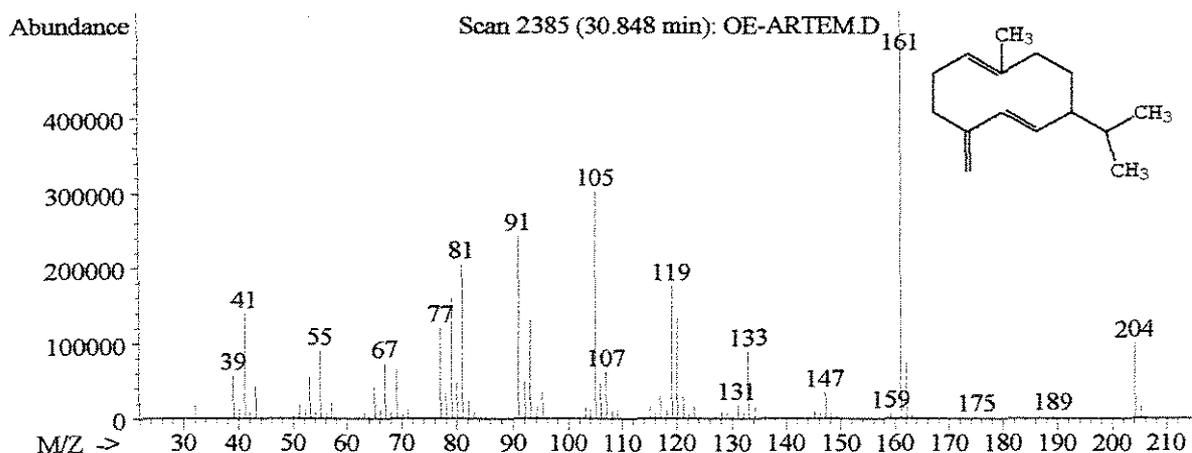


Figura 7: Espectro de massas do germacreno D ($C_{15}H_{24}$; PM= 204).

5.2 Avaliação da Composição Química do extrato etanólico (EAA) de *A. annua* L.

O EAA foi analisado por CG-EM para identificação dos principais constituintes voláteis e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para determinação do teor de artemisinina.

RESULTADOS

Observa-se pela análise do cromatograma abaixo que o EAA apresentou poucas substâncias detectáveis por CG, sendo possível identificar a cânfora (Tr 4,24 min), o β - cubebeno (Tr 10,7 min) e o trans-cariofileno (Tr 9,40 min). O composto majoritário identificado foi o 2-hexadeceno 1-ol 3,7,11,15 tetrametil (Tr 24,14). Na figura 8 está apresentado a Cromatograma Gasoso do EAA.

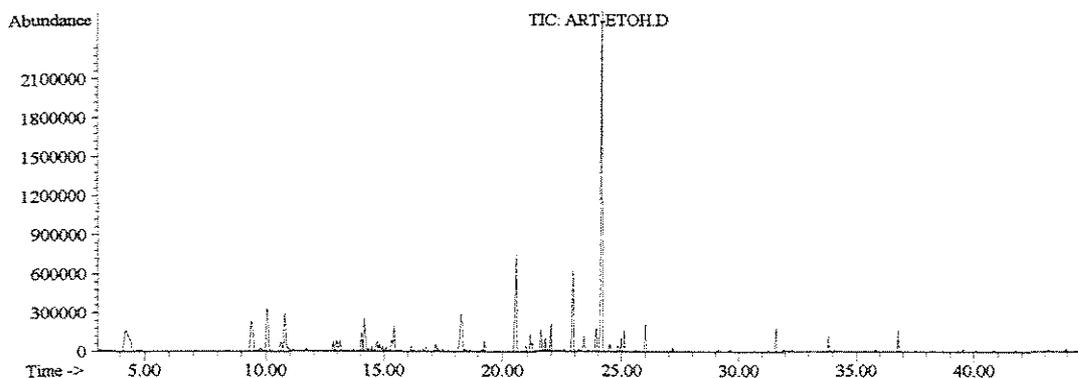


Figura 8: Cromatograma gasoso do extrato etanólico de *A. annua* L.

5.3 Determinação do teor de artemisinina no extrato etanólico de *A. annua* L. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

O teor de artemisinina foi determinado no extrato etanólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RESULTADOS

utilizando detector de ultravioleta 260 nm e acetofenona com padrão interno. Para tanto, uma curva-padrão foi obtida com a artemisinina isolada no CPQBA utilizando diferentes concentrações. Esta curva pode ser visualizada abaixo.

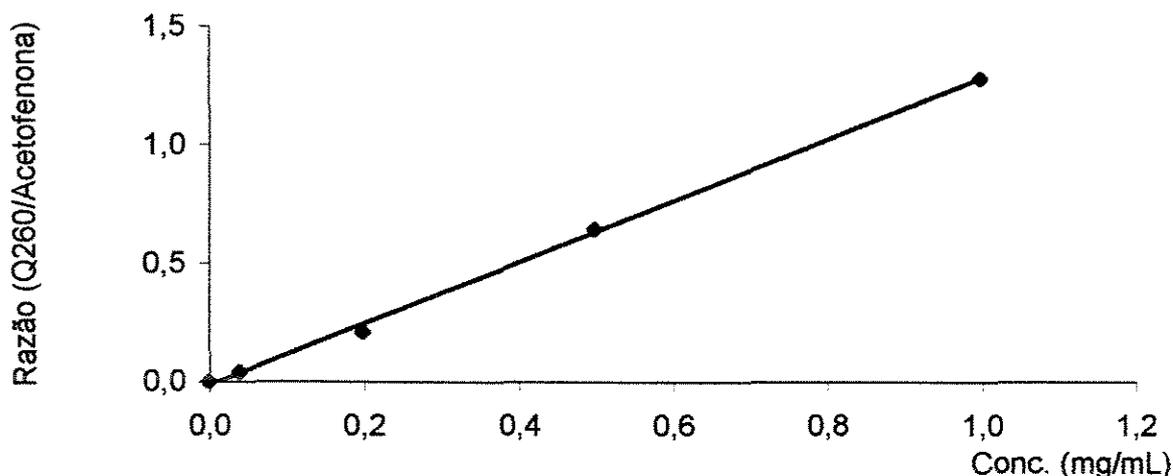


Figura 9: Curva-padrão da quantificação de artemisinina por CLAE / UV.

Os resultados encontrados para esta determinação podem ser analisados no quadro abaixo.

Quadro I: Teor de artemisinina no EAA por CLAE.

Amostra	Massa extrato seco (mg)	Área Q260	Área Acetofenona	Razão	Conc. (mg/mL)	Teor (%)	Teor Médio (%)
Amostra 1	50,6	0,075761	0,396762	0,191	0,16	1,57	1,54
Amostra 2	50,7	0,074019	0,404918	0,183	0,15	1,51	

RESULTADOS

5.4 - Determinação da Dose Efetiva Média (DE₅₀) para atividade estimulante central do OEAA e EAA.

O tratamento com OEAA produziu um efeito dose-resposta cujo $R=0,97333$ (coeficiente de correlação) e equação da reta $y= -26,52x + 0,158$ e a DE₅₀ encontrada de 470 mg/kg para o OEAA (figura 8).

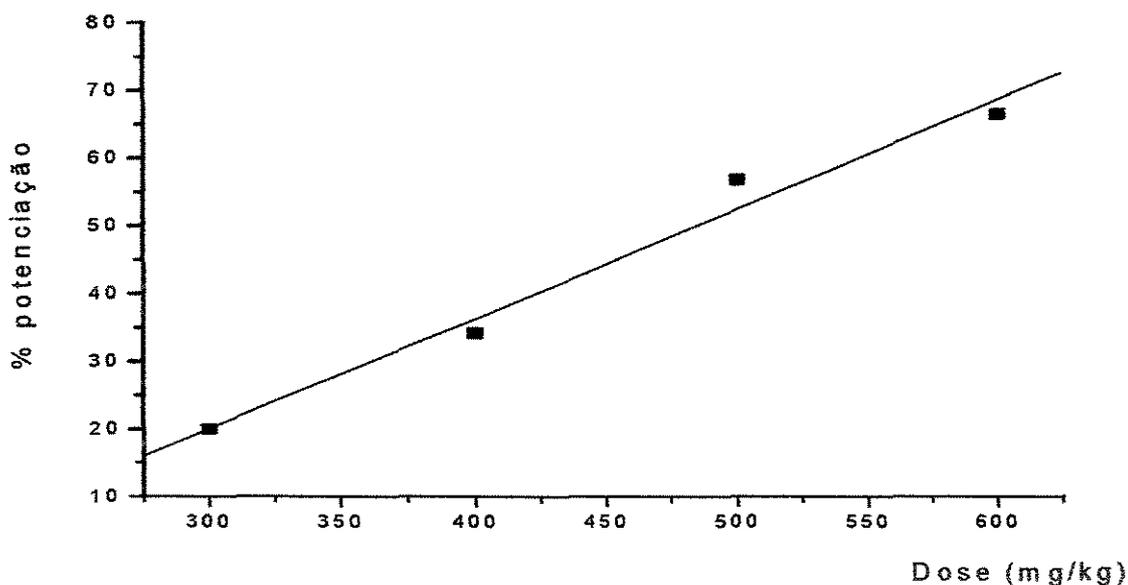


Figura 10: Dose Efetiva Média. Regressão linear da relação dose-efeito do OEAA na convulsão induzida por picrotoxina. Coeficiente de correlação $r = 0,97333$. Regressão linear $y = 26,52x + 0,158$.

O mesmo procedimento foi realizado para a determinação da dose-efetiva média do extrato bruto etanólico de *A. annua*. O tratamento realizado também produziu efeito dose-dependente

RESULTADOS

cujo $R = 0,99266$ e equação da reta $y = -27,34 + 0,156x$, e a DE_{50} encontrada de 450 mg/kg (figura 11).

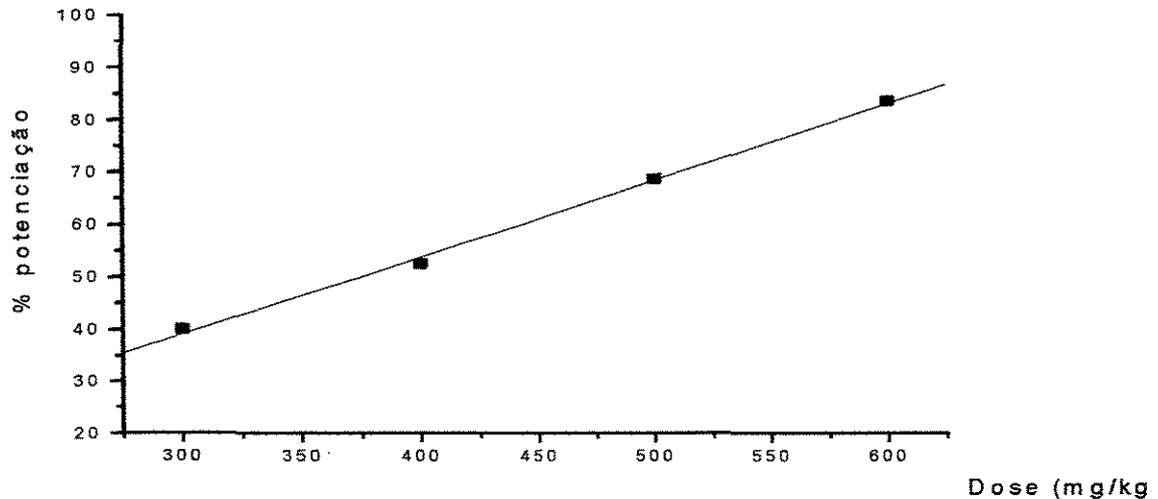


Figura 11: Dose Efetiva Média. Regressão linear da relação dose-efeito do EAA na convulsão induzida por picrotoxina. Coeficiente de correlação $r = 0,99266$. Regressão linear $y = -27,34x + 0,156$.

A partir da determinação da dose efetiva média, foram traçados experimentos utilizando drogas que atuam no Sistema Nervoso Central e que possuem seus mecanismos de ação conhecidos, e também ensaios comportamentais, visando o esclarecer os possíveis neurotransmissores envolvidos na resposta produzida pelo OEAA e EAA.

RESULTADOS

5.5 - Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀)

A administração por via i.p. de diferentes doses do OEAA causou reações de salivação, tremor e, nas doses mais altas, convulsões. Acima da dose de 1000 mg/kg, todos os animais vieram ao óbito em menos de 6 horas. A DL₅₀ encontrada para o OEAA foi de 790 mg/kg.

Os resultados podem ser avaliados na figura 12 para o OEAA.

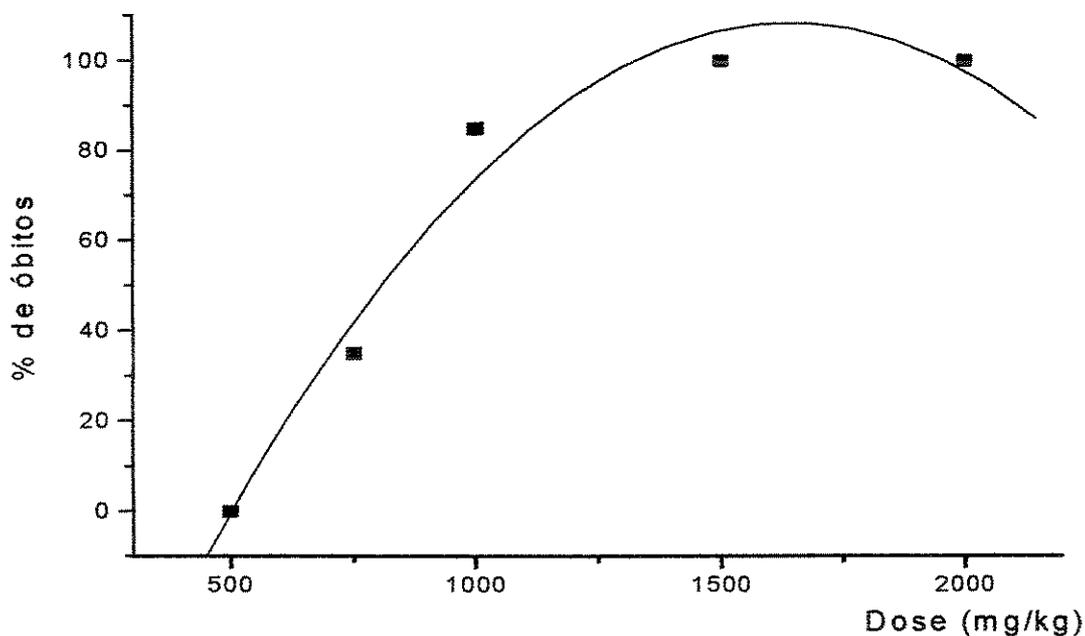


Figura 12: Dose Letal Média. Regressão linear da relação dose - % de óbitos do OEAA. Equação da reta $Y = -116,75373 + 0,27396X - 8,32836E-5 X^2$ e $R=0,97235$.

RESULTADOS

Para o EAA foram testadas diferentes doses (500, 750, 1000, 1250, 1500 e 2000 mg/kg, via i.p.) e o resultado obtido não apresentou toxicidade aguda significativa, sendo que uma dose inferior a 2,0 g/kg não levou nenhum animal ao óbito. Foi possível notar que os animais permaneceram inquietos durante as 12 horas iniciais do período de observação.

5.6 Convulsões quimicamente induzidas por:

5.6.1 - Picrotoxina

Na figura 13 pode ser avaliado o tempo de latência para a produção de convulsão quando utilizado um agente antagonista de receptores GABA (picrotoxina).

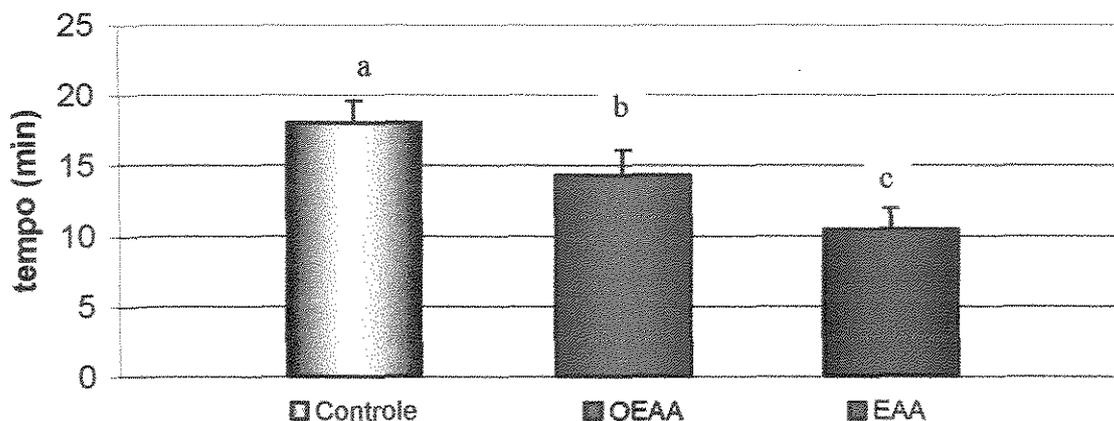


Figura 13: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) na convulsão induzida por picrotoxina (6 mg/kg i.p.). Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

RESULTADOS

O grupo controle apresentou um tempo de latência significativamente maior ($18,05 \pm 1,55$ seg.) em termos de ocorrência de ataques convulsivos em relação ao grupo tratado com o OEAA ($14,27 \pm 1,75$ seg.) e EAA ($10,42 \pm 1,46$ seg.). Os tratamentos também apresentaram diferenças significativas entre si.

5.6.2 - Pilocarpina

A figura abaixo apresenta os resultados de potenciação do efeito convulsivante quando os animais foram tratados com pilocarpina na dose de 300 mg/kg.

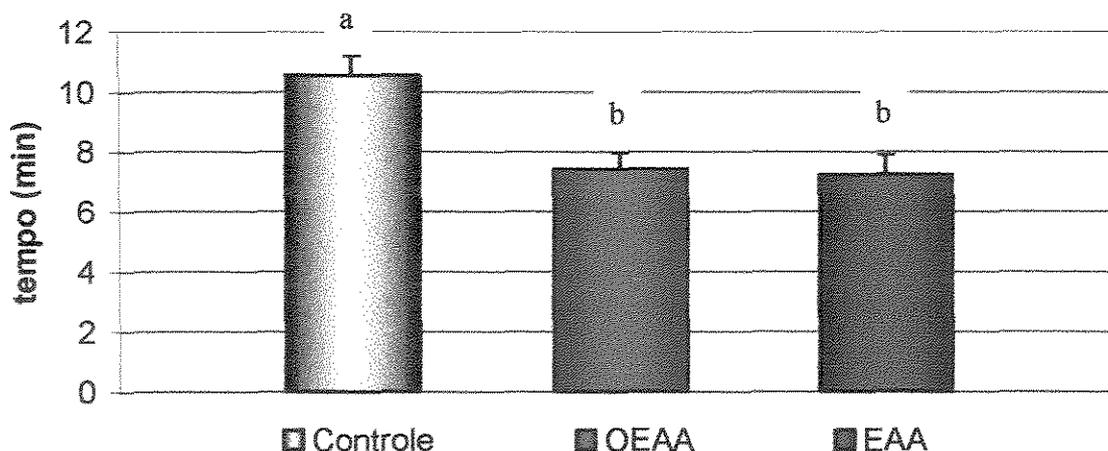


Figura 14: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) na convulsão induzida por pilocarpina (300 mg/kg i.p.). Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

RESULTADOS

Avaliando estes resultados, pode-se observar que não existe diferença entre os grupos tratados tanto com o OEAA ($7,39 \pm 0,55$ seg.) quanto o EAA ($7,22 \pm 0,67$ seg.), mas ambos os grupos são significativamente diferentes do grupo controle ($10,54 \pm 0,65$ seg.) relacionado com o tempo de latência para promoção da convulsão, levando a uma possível interação sinérgica dessas drogas com mecanismos colinérgicos.

5.6.3 - Pentilenotetrazol:

As drogas em estudo retardaram o tempo de latência para convulsão induzida por PTZ. Pode-se notar novamente que os grupos tratados com OEAA ($12,36 \pm 1,18$ seg.) e EAA ($11,17 \pm 1,59$ seg.) não apresentam diferenças entre si, mas são significativamente diferentes do grupo controle ($1,59 \pm 0,26$ seg.). Estes resultados podem ser observados na figura 15.

RESULTADOS

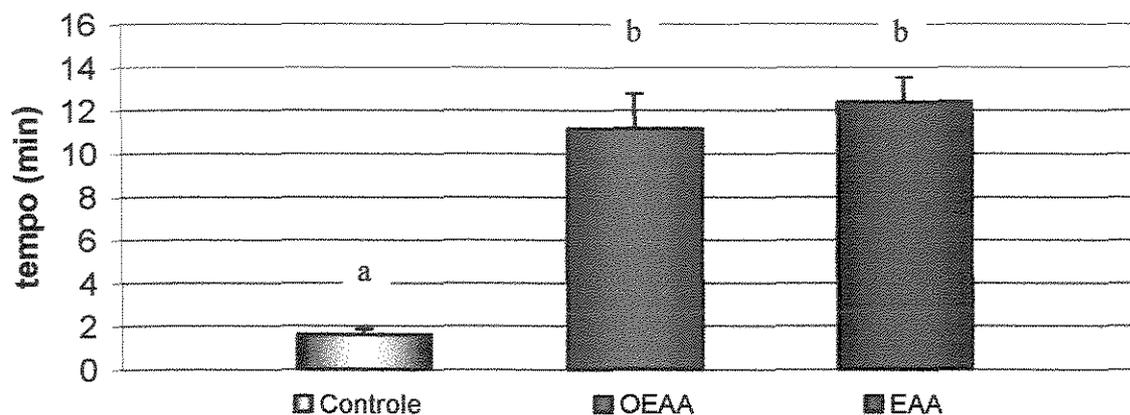


Figura 15: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) na convulsão induzida por pentilenotetrazol (85 mg/kg i.p.). Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

5.6.4 - Estricnina:

Os resultados obtidos quando os animais foram tratados com estriçnina mostram uma diferença significativa entre os grupos tratados com OEAA (3,41 \pm 0,40 seg.), EAA (2,66 \pm 0,36 seg.) e o controle (1,18 \pm 0,07 seg.). Também foi notada uma diferença significativa para os tratamentos realizados entre os grupos OEAA e EAA.

Os resultados obtidos podem ser avaliados na figura 16.

RESULTADOS

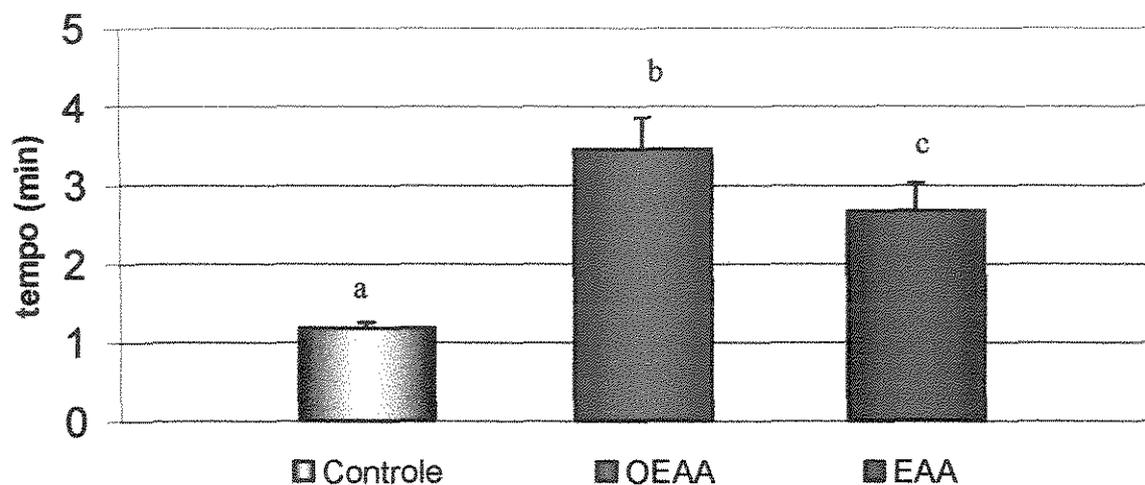


Figura 16: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) na convulsão induzida por estriknina (2 mg/kg s.c.). Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

5.6.5 – Sono induzido por pentobarbital sódico

Estes resultados podem ser visualizados nas figuras abaixo, sendo avaliados o tempo de latência entre a administração do agente anestésico e a perda de reflexos (Figura 17) e o tempo total de sono (Figura 18) limitado a um máximo de 5 horas.

RESULTADOS

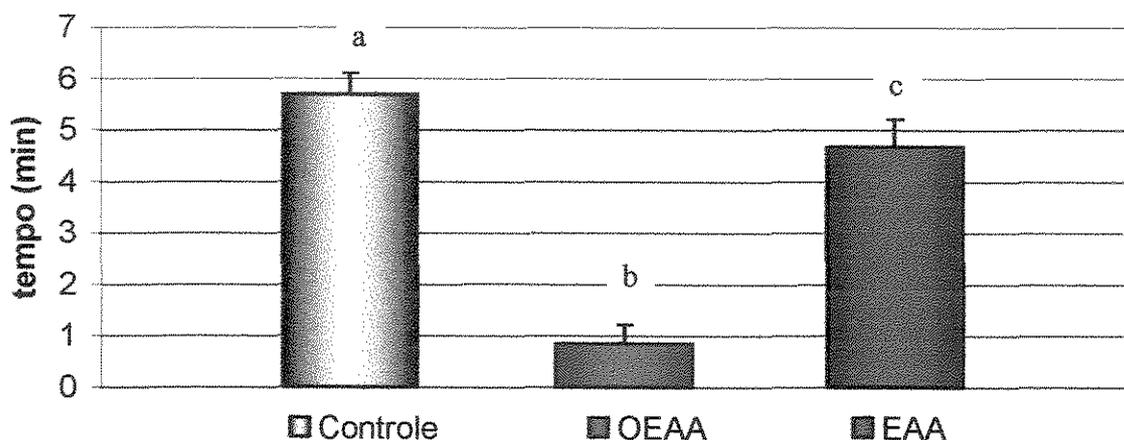


Figura 17: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no tempo de perda de reflexos induzido por pentobarbital sódico (40 mg/kg). Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

Os resultados do tempo de latência mostram que tanto o grupo tratado com o OEAA ($0,8 \pm 0,37$ min.) como o grupo tratado com EAA ($4,6 \pm 0,54$ min.) apresentaram um início da ação depressora do anestésico em um tempo menor que quando comparado ao grupo controle ($5,6 \pm 0,42$ min.). O EAA apresentou também diminuição deste tempo de latência significativa quando comparado ao grupo OEAA.

RESULTADOS

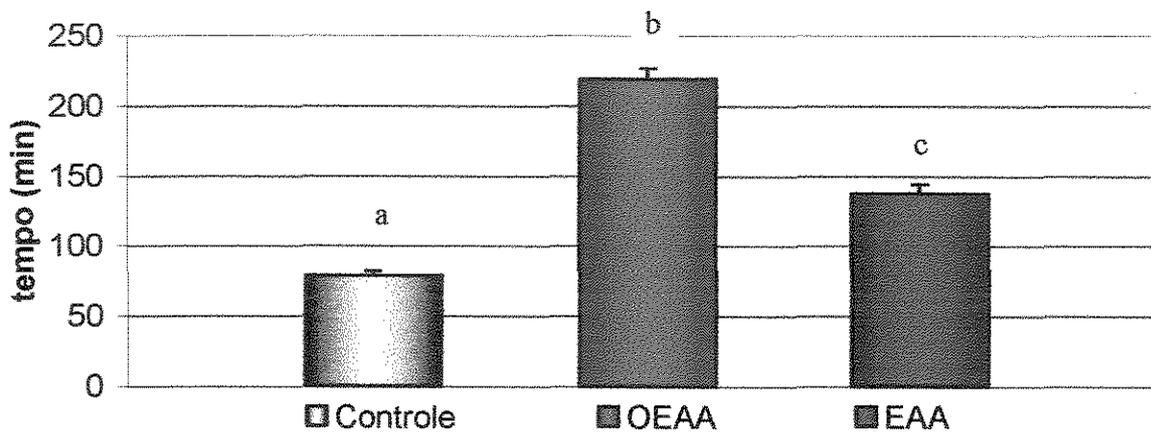


Figura 18: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no tempo total de sono induzido por pentobarbital sódico (40 mg/kg). Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

Quando analisados o tempo total de sono nos grupos, nota-se diferenças significativas entre os grupos. O grupo tratado com o OEAA (219,0 \pm 7,34 min.) apresentou maior tempo de sono, sendo estatisticamente diferente do grupo controle (78,6 \pm 3,31 min.) e também do grupo tratado com o EAA (137,5 \pm 6,39 min.). O grupo tratado com EAA foi estatisticamente diferente do grupo controle.

5.6.6 - Coordenação motora

O ensaio de coordenação motora foi realizado utilizando aparelho Rota-rod. Os resultados encontram-se na tabela 2.

RESULTADOS

Tabela 2: Efeito da administração i.p. de OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) sobre o tempo de permanência dos animais em esteira rolante.

Tempo (min)	Controle (seg)	OEAA (seg)	EAA (seg)
0	120 \pm 0 ^a	120 \pm 0 ^a	120 \pm 0 ^a
15	120 \pm 0 ^a	110 \pm 4 ^b	120 \pm 0 ^a
30	120 \pm 0 ^a	96 \pm 6 ^b	109 \pm 5 ^b
45	120 \pm 0 ^a	60 \pm 5 ^b	100 \pm 3 ^c
60	120 \pm 0 ^a	48 \pm 7 ^b	92 \pm 4 ^c
75	120 \pm 0 ^a	44 \pm 5 ^b	88 \pm 5 ^c
90	120 \pm 0 ^a	40 \pm 8 ^b	86 \pm 7 ^c
105	120 \pm 0 ^a	42 \pm 5 ^b	84 \pm 6 ^c
120	120 \pm 0 ^a	49 \pm 3 ^b	82 \pm 5 ^c
135	120 \pm 0 ^a	53 \pm 5 ^b	83 \pm 4 ^c
150	120 \pm 0 ^a	60 \pm 5 ^b	86 \pm 5 ^c
165	120 \pm 0 ^a	58 \pm 6 ^b	90 \pm 7 ^c
180	120 \pm 0 ^a	54 \pm 7 ^b	94 \pm 8 ^c

Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

RESULTADOS

O grupo controle apresentou-se significativamente diferente do grupo tratado com o OEAA durante todo o período de experimentação. Quando analisado o grupo tratado com o EAA, notou-se diferenças significativas a partir de 30 minutos, que permaneceram até o final do ensaio. Foi possível perceber que o tempo de perda da motricidade dos animais foi maior entre 60 e 120 minutos após o tratamento com as drogas em estudo. Os grupos tratados com OEAA e EAA apresentaram diferenças entre si a partir de 45 minutos do tratamento, sendo que esta diferença se manteve até o final do tempo do ensaio.

RESULTADOS

5.7 Ensaio comportamentais:

5.7.1 - Nado forçado:

O tempo total de nado pode ser visualizado na figura 19.

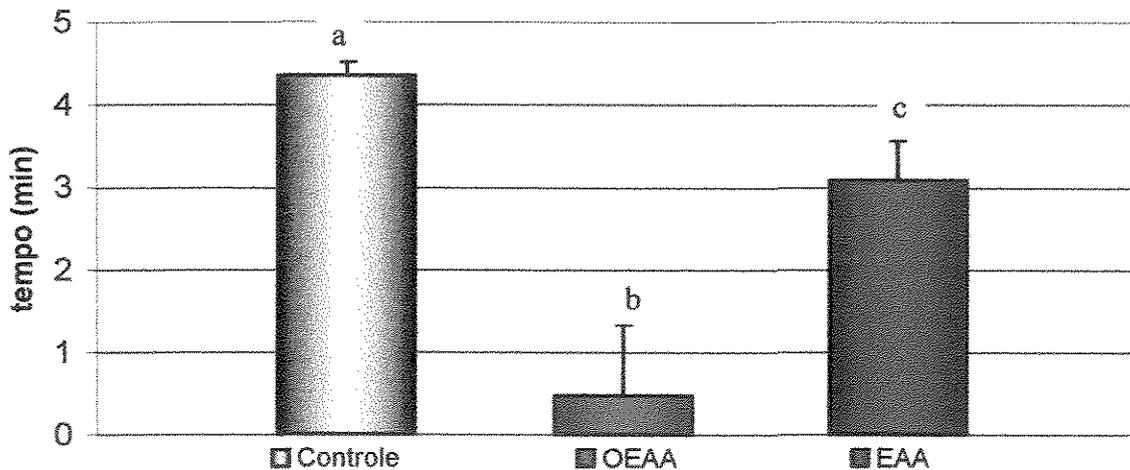


Figura 19: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no tempo total de nado. Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

Pode-se verificar que a administração do OEAA ($0,47 \pm 0,86$ min.) levou a uma diminuição significativa do tempo de nado comparado ao grupo controle ($4,3 \pm 0,15$ min.). Quando o grupo controle foi comparado ao grupo tratado com EAA ($3,0 \pm 0,47$ min.) pode-se notar uma diferença menor, porém significativa entre estes.

RESULTADOS

O grupo tratado com o OEAA permaneceu um tempo maior em imobilidade ($4,3 \pm 1,10$ min.) quando comparado ao grupo controle ($0,2 \pm 0,15$ min.) ou o grupo tratado com EAA ($1,2 \pm 0,21$ min.). Por outro lado, não se observou esta diferença entre o grupo controle e o grupo EAA.

Estes resultados podem ser visualizados na Figura 20 abaixo.

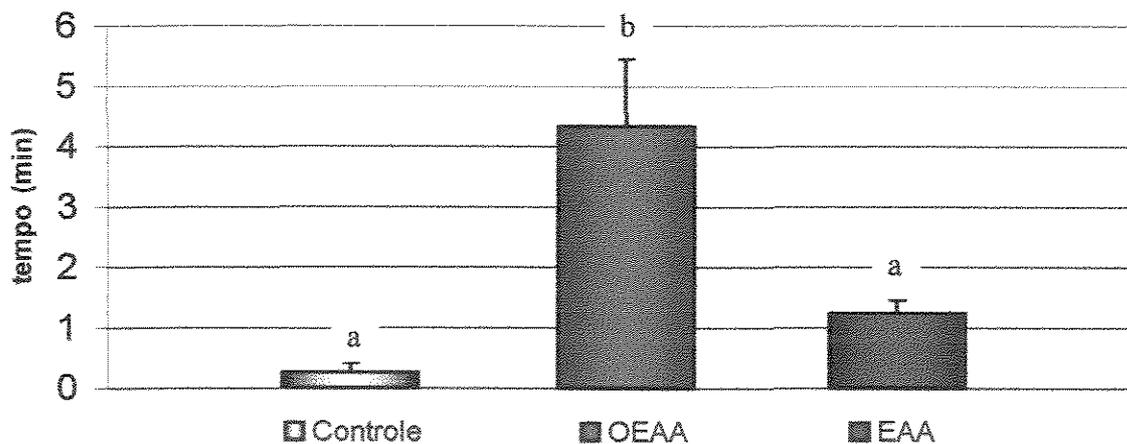


Figura 20: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no tempo de imobilidade. Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

O número de mergulhos por grupo também foi analisado, podendo verificar a total ausência no grupo controle e no

RESULTADOS

grupo tratado com OEAA. Por outro lado, não foi notada esta ausência no grupo tratado com o EAA. Na Figura 21 este resultado pode ser visualizado.

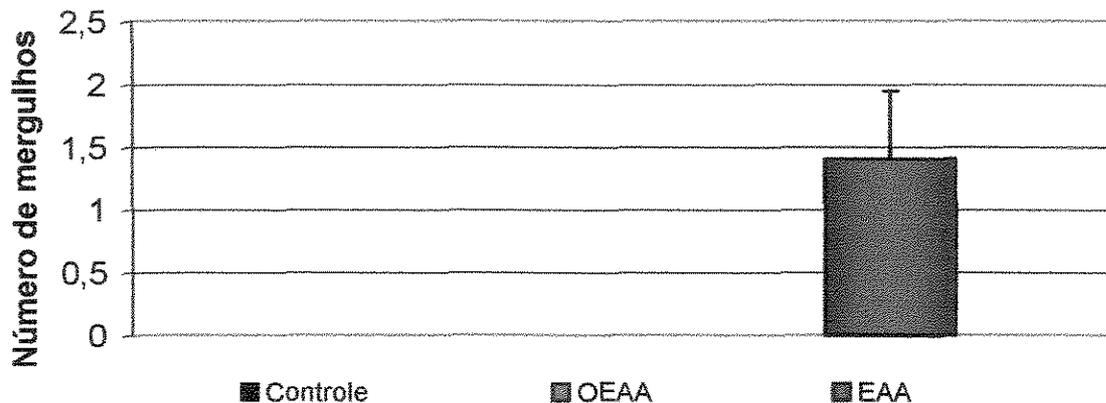


Figura 21: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no número de mergulhos apresentados.

5.7.2 - Campo aberto

Este ensaio foi filmado para que não ocorresse interferência humana. Na figura 22 pode ser visualizado o resultado do ensaio de campo aberto, quando os parâmetros analisados foram de deambulação, asseio, exploração e levante das patas dianteiras.

RESULTADOS

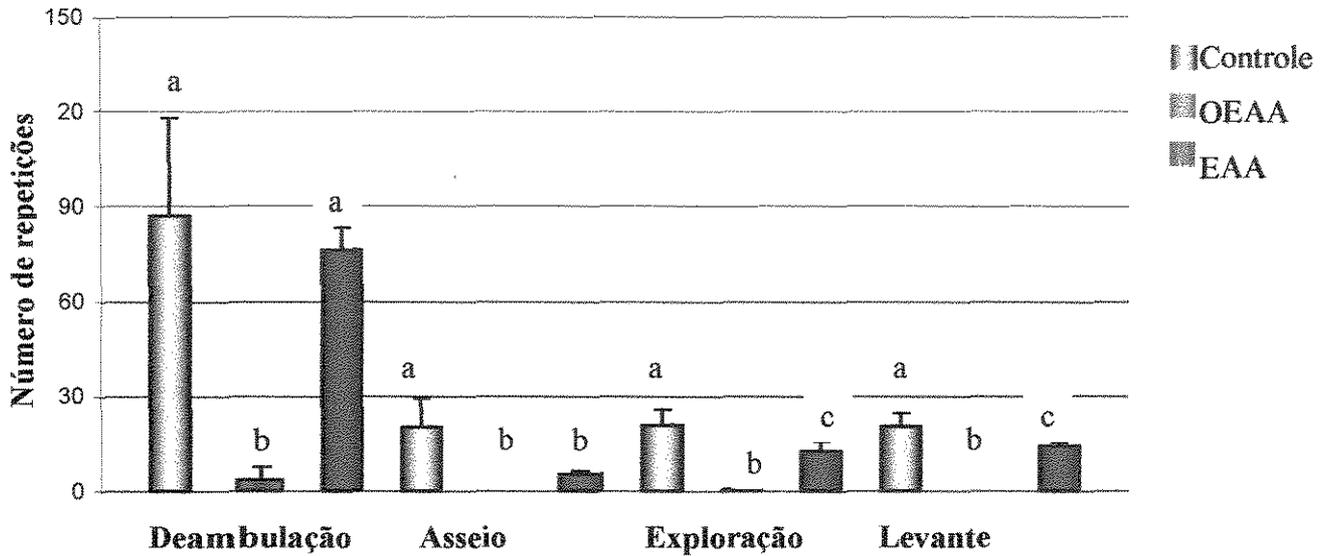


Figura 22: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no ensaio de campo aberto. Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

Verificou-se que o OEAA inibiu a atividade locomotora dos animais tratados ($4,3 \pm 3,60$), enquanto que o EAA ($76,2 \pm 7,69$) e o grupo controle ($87,0 \pm 31,5$) não apresentaram tal efeito. Quando avaliado o instinto exploratório dos animais, notou-se que todos os grupos apresentaram diferenças entre si, mas o grupo OEAA ($0,60 \pm 0,89$) apresentou uma menor atividade exploratória quando comparado ao controle ($20,8 \pm 5,60$), podendo ser verificada diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo controle ao tratado

RESULTADOS

com EAA (12,6 + 3,43). O número de levantamentos do grupo tratado com OEAA (0,0 + 0,00) foi estatisticamente diferente do grupo tratado com EAA (14,2 + 1,48). Ambos os grupos tratados diferiram do grupo controle (20,4 + 4,39). Os asseios foram mais intensos no grupo controle (20,2 + 9,20), que diferiram significativamente dos grupos tratados com OEAA (0,0 + 0,00) e EAA (5,2 + 0,83), mas não se podem notar diferenças entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

6. Discussão:

O óleo essencial de *A. annua* foi avaliado quimicamente por CG-EM e CG-FID tendo sido identificados 15 compostos terpênicos (tabela 1), dos quais os constituintes majoritários são monoterpenos, destacando-se o canfeno, sabineno, p-cimeno, α -pineno, 1,8 cineol e a cânfora. Entre sesquiterpenos, o composto majoritário identificado foi o germacreno D.

A análise do EAA foi realizada por CG-EM visando comparar sua composição com a do OEAA. Entre seus componentes voláteis, foram identificados quatro compostos: cânfora, β -cubebeno, trans-cariofileno e 2-hexadeceno 1-ol 3,7,11,15 tetrametil como majoritário. Dentre os compostos voláteis do EAA, a cânfora esta numa concentração de 6,7%, sendo pequena quando comparada a todos os componentes presentes no extrato, seja lipo ou hidrossolúvel. Mesmo sendo identificada tanto no OEAA como no EAA, a cânfora apresenta concentração menor no EAA que no OEAA.

No EAA também foi realizada a determinação do teor de artemisinina por CLAE-UV, utilizando derivatização em meio

DISCUSSÃO

alcalino (figura 23). Foi encontrado rendimento médio de 1,54% de artemisinina.

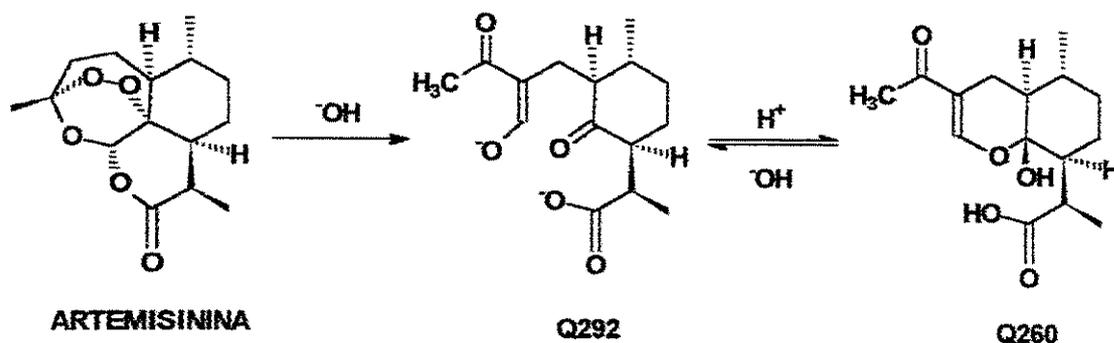


FIGURA 23: Conversão de artemisinina em Q260, segundo ZHAO & ZENG (1986).

Quando avaliada a atividade farmacológica, primeiramente foi realizado um ensaio para determinar a dose efetiva média que promoveria uma estimulação no SNC dos animais. Os valores obtidos demonstram que a dosagem estabelecida foi alta (470 mg/kg para OEAA e 450 mg/kg para o EAA), dificilmente atingida quando administrado um extrato fluido ou uma infusão a uma pessoa de peso normal (70 kg). Quando avaliou-se a dose letal média, nota-se que o OEAA apresentou uma toxicidade aguda significativa, diferentemente do EAA que apresentou uma DL₅₀ superior a 2,0 g/kg. Considerando a dose preconizada pela Farmacopéia da República da China (infusão de 5g de

DISCUSSÃO

folhas em 1L de água), para que um humano apresentasse efeitos indesejáveis sobre o SNC seria necessária a administração de grandes quantidades destes produtos naturais, embora neste trabalho tenha sido utilizado um híbrido desta planta.

Após estes ensaios, procuramos identificar quais neurotransmissores estariam envolvidos nesta resposta.

Para tanto, foram realizados com o OEAA e EAA ensaios comportamentais e também com drogas que atuam no SNC e tem seu mecanismo de ação conhecido, como o PBS, o PTZ, a pilocarpina, a estriçnina e a picrotoxina.

A picrotoxina é um antagonista seletivo reversível para receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), os quais tem estreita relação com epilepsia (LEIDENHEIMER et al., 1991; GALE, 1992). GABA é o neurotransmissor inibitório mais importante no SNC, e a inibição de sua transmissão é associada como um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de epilepsia (GALE, 1992).

DISCUSSÃO

A administração de picrotoxina 6 mg/kg é suficiente para inibir o SNC causando hiperpolarização neuronal pela entrada de íons cloreto, evitando a propagação do impulso nervoso, produzindo convulsões tônico - clônica em todos os animais. Essa dose foi letal, obtendo 100 % de óbitos após espasmos tônico - extensores das quatro patas do animal. A administração do OEAA como EAA diminuiu o tempo de latência das convulsões em 21% e 42%, respectivamente.

A potenciação da ação da picrotoxina pelo OEAA e EAA pode ser causada não pela ação em receptores GABA, pois houve interferência na resposta ao PTZ, mas por outros mecanismos centrais não relacionados com respostas gabaérgicas, mas que atuando sinergicamente podem levar a uma diminuição do limiar de excitabilidade, facilitando a resposta convulsiva. A presença de cânfora no OEAA pode estar relacionada com esta diminuição do limiar de excitabilidade, diminuindo o tempo de latência. Por outro lado esse efeito não pode ser atribuído a cânfora presente no EAA, por essa estar em baixa concentração. De qualquer maneira, ambas drogas parecem não apresentar afinidade por receptores gabaérgicos, sem interferir nesta via.

DISCUSSÃO

BROWNING & NELSON (1986) demonstraram o mecanismo de ação do PTZ considerando duas rotas neurais distintas, uma inicial que está localizada no córtex cerebral, diminuindo a atividade gabaérgica, que posteriormente transmite uma resposta para o centro respiratório através de uma rede neural que estaria envolvida na resposta convulsiva.

Considerando o efeito do OEAA e EAA sobre o ensaio com PTZ, ambos aumentaram o tempo de latência causado por esta droga, mas não reduziram a mortalidade, sendo que 100% dos animais vieram ao óbito, não inibindo a segunda fase da estimulação bulbar causada pelo PTZ.

Desta maneira, parece que ambos OEAA e EAA não possuem capacidade de diminuir o limiar da convulsão iniciada no córtex por interferir na resposta gabaérgica através de seus receptores, afetando a propagação desta resposta ao centro respiratório, implicado na geração de convulsões tônicas causados pelo PTZ, promovendo um aumento no tempo de latência da convulsão causada por essa droga.

Outra via que pode ser estudada na resposta convulsiva é a colinérgica. A pilocarpina é um agente colinérgico de ação

DISCUSSÃO

central utilizado para estudar respostas de drogas sobre o Sistema Nervoso Autônomo, possibilitando saber a atividade da droga como agonista ou antagonista deste sistema.

Quando utilizado pilocarpina, agente agonista de receptores colinérgicos, pode-se notar novamente uma diminuição do tempo de latência entre a administração das drogas em estudo e a convulsão causada por esta. Em geral, a administração de pilocarpina induz a sintomas colinérgicos tanto no SNC (tremor) como periférico (salivação), que pode ser observado nos animais tratados com OEAA e EAA.

Os resultados obtidos para este ensaio sugerem que a atividade estimulante causada tanto pelo OEAA como EAA pode estar envolvida com mecanismos colinérgicos, pois o tempo de latência causado pela convulsão induzida por pilocarpina foi diminuído, bem como um aumento no tempo de nado dos animais.

Uma via que também pode causar ataques convulsivos está relacionada com a inibição da atividade dos interneurônios inibitórios medulares (células de Renshaw) por antagonistas de glicina, responsável pela regulação desta via, que coordenam o feed-back positivo para depressão deste sistema,

DISCUSSÃO

evitando a liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios. O processo convulsivo associado a estriçnina é causado por antagonismo de receptores glicinérgicos destas células, que quando bloqueados ficam impedidas de regular esta via, promovendo convulsões sob qualquer estímulo, seja visual, auditivo ou físico. Em casos de intoxicação, é sabido que a administração de doses altas de glicina podem inibir este processo, bem como o repouso (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Considerando que tanto OEAA como EAA inibiram este processo convulsivo, podemos notar que essas drogas não possuem capacidade de ligação a receptores glicinérgicos, podendo atuar como antagonistas, aumentando a resposta convulsiva. Por outro lado, o aumento do tempo de latência para a resposta convulsiva pode ser gerado por uma atividade depressora do sistema nervoso central que não esteja relacionada com mecanismos gabaérgicos.

Para avaliar a possibilidade de um potencial depressor das drogas em estudo, também foi realizado o ensaio de sono induzido por pentobarbital sódico, pois drogas com propriedades sedativas potenciam o tempo de sono induzido por barbitúricos.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados demonstram que a administração i.p. do OEAA produziu significativo aumento no tempo de sono de 278%, enquanto o EAA também aumentou significativamente esse tempo em 175%, ambos comparados ao grupo controle. Os resultados obtidos para este ensaio levam a uma possível atividade sedativa, considerando que ambas drogas aumentaram este tempo de sono e comparado ao resultado obtido pelo ensaio com estriçnina. A duração do tempo de perda dos reflexos foi diminuída em ambos grupos tratados. É possível que o tempo de sono tenha sido maior no grupo tratado com OEAA pela diferença farmacocinética de metabolismo do mesmo, que é mais lento que o EAA, que contém maior quantidade de compostos polares que o OEAA. Também podemos sugerir que compostos presentes somente no OEAA, como o 1,8 cineol, um monoterpeneo com potencial depressor do SNC encontrado em alta quantidade neste óleo, sejam responsáveis pela observada entre as drogas.

Para comprovar se existe alguma atividade depressora, foi realizado o ensaio de atividade miorelaxante. Para tanto o rota-rod foi utilizado como modelo experimental. Foi possível notar diminuição na atividade motora com as doses de

DISCUSSÃO

OEAA e EAA administradas. Houve uma diminuição da atividade motora na primeira hora, que mostrou-se maior na segunda hora após o tratamento. Após esse período, os animais voltaram a desenvolver suas habilidades sobre a esteira. O grupo tratado com o OEAA apresentou diminuição na coordenação motora quando comparado ao grupo tratado com o EAA. Ainda assim, ambos grupos tratados mostraram menor tempo de atividade quando comparados ao grupo controle. Esses resultados podem ser comparados com drogas ansiolíticas, como benzodiazepínicos, que possuem atividade miorelaxante marcante (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Ensaio comportamentais também estão relacionados com neurotransmissão. Assim, foi realizado o ensaio de nado forçado sendo possível observar o efeito das drogas em estudo numa situação de estresse, possibilitando o esclarecimento de alguns neurotransmissores envolvidos nesta resposta.

BARTHOLINI et al. (1985) atribuem ao ensaio de nado forçado um aumento da imobilidade (flutuação) e diminuição do tempo de nado por drogas colinérgicas. Os resultados obtidos pela administração do OEAA mostram aumento no tempo de imobilidade que pode ser explicado por um aumento da

DISCUSSÃO

atividade colinérgica (HERMAN et al., 1981) e também demonstrado pela diminuição do tempo de latência para convulsão causada por pilocarpina. BORSINI et al. (1986) atribuíram diminuição no tempo de imobilidade em animais tratados com agonistas gabaérgicos. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos nas convulsões quimicamente induzidas pois a pilocarpina teve seu tempo de latência diminuído enquanto que não houve alteração em respostas gabaérgicas.

Outro parâmetro analisado foi o tempo de flutuação, que é afetado pelo sistema dopaminérgico, pois este quando estimulado aumenta a atividade motora (KITADA et al., 1986). Baseado nas informações acima e apresentadas em outros estudos, à diminuição do tempo de flutuação no ensaio de nado forçado quando administrado o EAA, pode aumentar a liberação de dopamina no córtex cerebral, diminuindo este tempo de imobilidade.

KIRBY & LUCKI (1997) demonstraram que drogas antidepressivas como a fluoxetina (inibidor da recaptção de serotonina) aumentam o tempo de nado, diminuindo o tempo de

DISCUSSÃO

flutuação, não apresentando efeitos sobre o número de mergulhos.

Alguns animais apresentaram mergulhos durante o ensaio e o único grupo que apresentou um resultado estatisticamente significativo foi o tratado com EAA.

Considerando a dopamina um neurotransmissor excitatório e a possibilidade de sua liberação por alguma substância presente no EAA, esta poderia estar associada ao aumento da exploração e à diminuição do tempo de latência das convulsões causadas pela picrotoxina.

As drogas em estudo que foram efetivas em diminuir o tempo de nado dos animais, também foram avaliadas quanto a habilidade de estimular atividade locomotora, possibilitando uma correspondência com os resultados do ensaio de nado forçado.

Quando o ensaio de nado forçado foi comparado com o campo aberto, pode-se analisar a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivo. A análise dos dados mostra que o OEAA inibiu a atividade locomotora e exploratória quando

DISCUSSÃO

comparado ao grupo controle. Este resultado sugere uma ação depressora deste produto. Por outro lado, o EAA não apresentou diferença estatisticamente significativa na atividade locomotora no ensaio de campo aberto, apresentando uma possível atividade excitatória.

Desta maneira, sugere-se uma pequena ação em termos de atividade inibitória para o EAA, considerando o tempo de sono menor que aquele produzido pelo OEAA, enquanto que este apresentou atividade depressora não relacionada a mecanismos gabaérgicos.

CONCLUSÕES

6. Conclusões:

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que o OEAA apresentou toxicidade aguda, com a DL₅₀ encontrada de 790 mg/kg. Sobre o SNC, sugere-se que este produto natural apresentou atividade colinérgica na dose utilizada (470 mg/kg).

O EAA não apresentou toxicidade aguda significativa, sendo esta superior a dose de 2,0 g/kg. Na dose de 490 mg/kg, este extrato causou atividade colinérgica e dopaminérgica.

As doses utilizadas de ambos produtos são altas quando comparadas à dose preconizada pela Farmacopéia da República da China. Assim, a dose recomendada pela Farmacopéia Chinesa, com base neste estudo, dificilmente produziria efeitos colaterais junto ao SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ABDUL-GUANI, A.S.; EL-LATI, S.G.; SACAAN, A.I.; SULEIMAN, M.S.; AMIN, R.M. Anticonvulsant effects of some arab medicinal plants. *Int. Journal of Crude Drug Research*, 1, 25, p.39 - 43, 1987.

ACTON, N., KLAYMAN, D.L. & ROLLMAN, I.J. Reductive eletrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). *Planta Med.* 5:445-446, 1985.

ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy*. 1^a ed., Allured Publishing Corp., Illinois, USA, 1112 p., 1995.

ADESINA, S.K. Studies on some plants used as anticonvulsants in Amerindian and African traditional medicine. *Fitoterapia*, v. 53 (5 - 6), p. 147 - 162, 1982.

BARTHOLINI, G., LLOYD, K.G., SCATTON, B., ZIVKOVIC, B., MORSELLI, P.L. The GABA hypothesis of depression and antidepressant drug action. *Psychopharmacol. Bulletin*, 21, p. 385 - 387, 1985.

BLOOM, F., KUPFER, D.J. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Raven Press, NY, 1699 p., 1995.

BORSINI, F., EVANGELISTA, S., MELI, A. Effect of GABAergic drugs in the behavioral despair test in rats. *European Journal of Pharmacology*, 121, p. 265 - 268, 1986.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORSINI, F., NOWAKOWSKA, E., SAMANIN, R. Effect of repeated treatment with desipramine in the behavioral "despair" test in rats: antagonist by "atypical" but not "classical" neuroleptics or antiadrenergic drugs. **Life Science**, 34, p. 1171 - 1176, 1984.

BROWNING, R.A. & NELSON, O.K. Modification of electroshock and pentylenetetrazole seizure pattern in rats after precollicular transection. **Experimental Neurology**, 93, p. 546 - 556, 1986.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1, p. 179 - 189, 2000.

CARNAT, A.P., GUEUGNOT, J., LAMAISON, J.L., GUILLOT, J., POURRAT, H. Ann. **Pharmaceutiques Françaises**, 43, p. 397 - 405, 1985.

CHAN, K.L., TEO, C.K.H., JINADASA, S. & YUEN, K.H. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. **Planta Med.**, 61:285-287, 1995.

CHARLES, D.J., SIMON, J.E., SHOCK, C.C., FEIBERT, E.B.G. & SMITH, R.M. Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. IN: **Proceedings of the Second National Symposium: New crops**,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

exploration, research and commercialization. Indiana, USA, pp.640-643, 1993.

CHEYMOL, J. Experimental convulsions and anti-epileptic drugs. *Actulites Pharmacologiques*, v.2, p. 1 - 55, 1950.

COELHO DE SOUZA, G.P., ELISABETSKY, E., NUNES, D.S., RABELO, S.K.L., DA SILVA, M.N. Anticonvulsant properties of γ - decanolactone in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 58, p. 175 - 181, 1997.

CONTAR, J.D.P.; CARLINI, E.A. Psychopharmacology of medicinal plants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 20, p. 495 - 510, 1987.

de VRIES, P.J.. DIEN, T.K. Clinical pharmacology and therapeutic potential of artemisinin and its derivatives in treatment of malaria. *Drugs*, 52, p. 818 - 836, 1996.

DUKE, S.O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F.E. natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, 1, p. 583 - 589, 2000.

ELISABETSKY, E., COELHO DE SOUZA, G.P., DOS SANTOS, M.A.C., SIQUEIRA, I.R., AMADOR, T.A.. Sedative properties of linalool. *Fitoterapia*, vol. LXV, N.5, p. 407-414, 1995.

FERREIRA, J.F.S. & JANICK, J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. IN: *Progress in new crops* (J.Janick ed.). ASHS Press, Arlington, pp. 579-584, 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, J.F.S., SIMON, J.E. & JANICK, J. Developmental Studies of *Artemisia annua*: Flowering and Artemisinin Production Under Greenhouse and Field Conditions. **Planta Med.** 61:167-170, 1995.

FERRENDELI, J.A., HOLLAND, K.D., McKEON, A.C., COVEY, D.F. Comparison of anticonvulsant activities of ethosuximide, valproato and a new anticonvulsant, thiobutyrolactone. **Epilepsia** 30, p. 617 - 622, 1989.

FOGLIO, M.A. **Estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996, Brasil, tese de Doutorado - Química Orgânica.

GALE, K. GABA and epilepsy: basic concepts from preclinical research. **Epilepsia**, 33 (Supl. 5, p. S3 - 12), 1992.

GARG, S.C. & KASERA, H.L. Neuropharmacological studies of the essential oil of *Anacardium occidentale*. **Fitoterapia**, vol.LV, N. 3, 131-136, 1984.

GELDRE, E.V., VERGAUWE, A. & EEKHOUT, E.V. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plant. **Plant Mol. Biol.** 33:199-209, 1997.

GILMAN, A.G., LIMBIRD, L.E. **The pharmacological basis of therapeutics**, 9^o ed., McGraw Hill, NY, USA, 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GIORDANO, O.S., GUERREIRO, E., PESTCHANKER, . M.J., GUZMAN, J., PASTOR, D., GUARDIA, T. The gastric cytoprotective effects of several sesquiterpene. **Journal of Natural Products**, 53 (4), p. 803 - 809, 1995.

GIORDANO, O.S., GUERREIRO, E., PESTCHANKER, . M.J., GUZMAN, J., SAAD, J.R., ENRIZ, R.D., RODRIGUEZ, A.M., JAUREGUI, E.A., MARIA, A.O., WENDEL, G.H. Structure-activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. **Journal of Medicinal Chemistry**, 35 (13), p. 2452 - 2458, 1992.

GOBEL, H., SCHMIDT, G., DWORSCHAK, M., STOLZE, H. HEUSS, D. Essential oils and headache mechanisms. **Phytomedicine**, 2, 93 - 102, 1995.

GUARDIA, T., GUZMAN, J., PESTCHANKER, . M.J., GUERREIRO, E., GIORDANO, O.S. Muçus synthesis and sulfhydryl groups in cytoprotection mediated by dehydroleucodine, a sesquiterpene lactone. **Journal of Natural Products**, 57(4), p. 507-509, 1994.

HALL, I.H., LEE, K.H., SYKES, H.C. Anti-inflammatory agents; IV. Structure activity relationship ps sesquiterpene lactone esters derived from helenalin. **Planta Medica**, 53 (2), p. 153 - 156, 1987.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. Second Edition, Chapman & Half, London, 288 pp., 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HERMAN, Z.S., PLECH, A., BIEN, E., WIELOCH-DEPTA, L., JEZ, W. Effect of cholinomimetics, cholynolitics and atypical antidepressants in the behavioral despair test in the rat. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 33, 485 - 489, 1981.

KIRBY, L.G. & LUCKI, I. Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracelular 5 - hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282, p. 967 - 976, 1997.

KITADA, Y. MIYAUCHI, T., COSAZA, T., SATOH, S. The significance of β -adrenoceptor down regulation in the desipramine action in the forced swimming test. *Neuropharmacology*, 22, p. 1055 - 1060, 1983.

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

KUBO, I., CHAUDHURI, S.K., KUBO, Y., SANCHEZ, Y., OGURA, T., SAITO, T., ISHIKAWA, H., HARAGUCHI, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica*, 62 (5), p. 427 - 430, 1996.

LAUGHLIN, J.C. The influence of distribution of antimalarial constituents in *Artemisia annua* L. on time and method of harvest. *Acta Hortic.* 390:67-73, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LEIDENHEIMER, N.J., BROWNING, M.D., HARRIS, R.A. GABA_a receptor phosphorylation: multiple sites, actions and artifacts. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, p. 84 - 87, 1991.

LIERSCH, R., SOICKE, H., STEHR, C. & TÜLLNER, H.U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Med.* 52:387-390, 1986.

LIMA, T.C.M.; MORATO, G.S.; TAKAHASHI, R.N. Evaluation of the Central Properties of *Artemisia verloturum*. *Planta Méd.*, 59, p. 326 - 29, 1993.

LUCÍRIO, I.D. À sombra do mosquito. *Revista Super Interessante*, Editora Abril, 118:42-48, 1997.

MAGALHÃES, P.M. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal, 1996.

MAGALHÃES, P.M., DELABAYS, N. & SARTORATTO, A. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. *Ciência e Cultura*, 49:413-415, 1997.

MORALES, M.R., CHARLES, D.J. & SIMON, J.E. Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Acta Hortic.* 344:416-420, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MUELLER, M.S., KARHAGOMBA, I.B., HIRT, H.M. & WEMAKOR E. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, 73, p. 487 - 493, 2000.

OCCHIUTO, F., LIMARDI, F., CIRCOSTA, C. Effect of the non-volatile residue from the essential oil of *Citrus bergamia* on the central nervous system. **Int. J. Of Pharmacognosy**, vol. 33, n. 3, p. 198 - 203, 1995.

POURGHOLAMI, M.H., KAMALINEJAD, M., JAVADI, M., MAJZOOB, S., SAYYAH, M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 64, p. 167 - 171, 1999.

PORSOLT, R.D., LePICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, 266, 730 - 732, 1977.

PRAS, N., VISSER, J.F., BATTERMAN, S., WOERDENBAG, H.J. & MALINGRÉ, T.M. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. **Phytochem. Anal.** 2:80-83, 1991.

RABL, W.; KATZGRABER, F.; STEINLECHNER, M. Camphor ingestion for abort (case report). **Forensic Science International** 89, p. 137- 140, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. Terpenoids. In: **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Williams & Wilkins ed., NY, p. 79-104, 375p., 1996.

SILVA, A.R. "A química dos óleos essenciais", p.163 - 177. In: "**Tudo sobre aromaterapia: como usá-la para melhorar sua saúde física, emocional e financeira**". Ed. Roka, 163-176, 575 p., 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2ª ed. rev., Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ UFSC, 2000.

SIMON, J.E.; DENYS, C.; CEBERT, E.; GRANT, L.; JANICK, J. & WHIPKEY, A. *Artemisia annua* L. A promising aromatic and medicinal. **Advances in new Crops: proceedings of the First National Symposium New Crops, research, develop economics**, p.522-526, 1990.

TELLEZ, M.R.; DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; SCHRADER, K.E. Terpenoid-based defense in plants and other organisms in plant lipids, 2000. In press.

TERANISHI, E., BUTTERY, R.G., SUGISAWA, H. Bioactive volatile compounds from plants. Washington DC, **American Chemical Society**, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TORTORIELLO, J. & ORTEGA, A. Sedative effect of Galphimine B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca*. **Planta Med.**, vol. 59, p.398 - 400, 1993.

VOHORA, S.B.; SHAUKAT, A.S.; DANDIYA, P.C. Central nervous system studies on a ethanol extract of *Acorus calamus* rhizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, 28, p. 53 - 62, 1990.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Ver. Fac. Farm. Bioqui. USP** 1, p. 77 - 88, 1963.

WHO (World Health Organization), 1998a. "Malaria." *Fact Sheet* nº 94. 10/1998, <http://www.who.int/inffs/en/fact094.html> (31/01/1999).

WHO (World Health Organization), 1998b. "Malaria Prevention and Control." *Division of control of tropical diseases*. 1998, <http://www.who.int/ctd/html/malaria.html> (31/01/1999)

WOERDENBAG, J.H., PRAS, N., BOS, R., VISSER, J.F., HENDRIKS, H. & MALINGRÉ, T.M. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. **Phytochem. Anal.** 2:215-219, 1991.

YNTERIAN, C.G. Malária, o terror dos trópicos. **Inter-news**. 90:01, 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZENG, M.Y, LI, L.N., CHEN, S.F., LI, G.V., LIANG, X.J., CHEN, M. & CLARDY, J. Chemical transformations of qinghaosu, a peroxidic antimalarial. *Tetrahedron Lett.* 39:2941-2946, 1983.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 3: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) na convulsão induzida por picrotoxina (6 mg/kg i.p.), pilocarpina (300 mg/kg i.p.), pentilenotetrazol (85 mg/kg i.p.) e estriquinina (2mg/kg s.c).

	Controle	OEAA (470 mg/kg)	EAA (450 mg/kg)
Picrotoxina	18,05 ± 1,55 ^A	14,27 ± 1,75 ^B	10,42 ± 1,46 ^C
Pilocarpina	10,54 ± 0,65 ^A	7,39 ± 0,55 ^B	7,22 ± 0,67 ^B
Pentilenotetrazol	1,59 ± 0,26 ^A	12,36 ± 1,18 ^B	11,17 ± 1,59 ^B
Estriquinina	1,18 ± 0,07 ^A	3,41 ± 0,40 ^B	2,66 ± 0,36 ^C

Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média ± d.p..

Tabela 4: Dose Letal Média. % de óbitos do OEAA.

Dose OEAA (mg/kg)	Animais / Óbito	% de óbitos
500	6 / 0	0
750	6 / 2	33
1000	6 / 5	94
1500	6 / 6	100
2000	6 / 6	100

ANEXOS

Tabela 5: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no tempo de perda de reflexos induzido por pentobarbital sódico (40 mg/kg) e tempo total de sono.

	Controle	OEAA (470 mg/kg)	EAA (450 mg/kg)
Tempo de indução de sono (min)	$5,6 \pm 0,42^A$	$0,8 \pm 0,37^B$	$4,6 \pm 0,54^C$
Tempo de sono total (min)	$78,6 \pm 3,31^A$	$219,0 \pm 7,34^B$	$137,5 \pm 6,39^C$

Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

Tabela 6: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no tempo total de nado, imobilidade e número de mergulhos

	Controle	OEAA (470 mg/kg)	EAA (450 mg/kg)
Tempo de nado (min)	$4,3 + 0,15^A$	$0,47 + 0,86^B$	$3,0 + 0,47^C$
Tempo de flutuação (min)	$0,2 + 0,15^A$	$4,30 + 1,10^B$	$1,2 + 0,21^A$
Número de mergulhos	$0,0 + 0,00^A$	$0,00 + 0,00^A$	$1,40 + 0,5^B$

Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média \pm d.p..

ANEXOS

Tabela 7: Efeito da administração i.p. do OEAA (470 mg/kg) e EAA (450 mg/kg) no ensaio de campo aberto.

Parâmetro (unidade)	Controle	OEAA (470 mg/kg)	EAA (450 mg/kg)
Deambulação	87,0 + 31,5 ^A	4,3 + 3,60 ^B	76,2 + 7,69 ^A
Exploração	20,8 + 5,60 ^A	0,60 + 0,89 ^B	12,6 + 3,43 ^C
Levante	20,4 + 4,39 ^A	0,0 + 0,00 ^B	14,2 + 1,48 ^C
Asseio	20,2 + 9,20 ^A	0,0 + 0,00 ^B	5,2 + 0,83 ^B

Letras diferentes apresentam resultados estatisticamente significativos. $p < 0,05$ – ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer. Valores expressos em média d.p..

Anexo 2

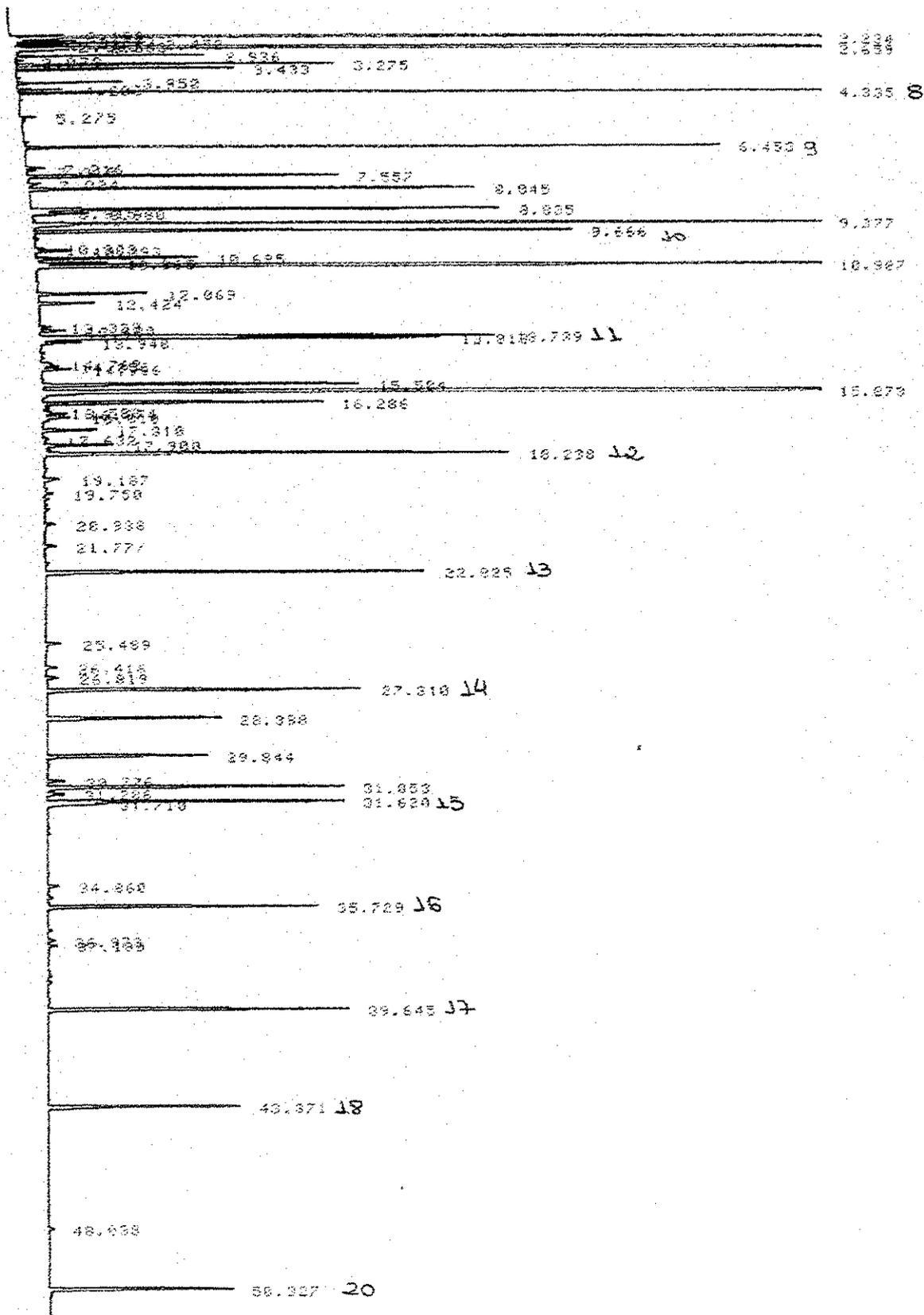


Figura 24: Cromatograma do OEAA por CG – FID.

Anexo 3

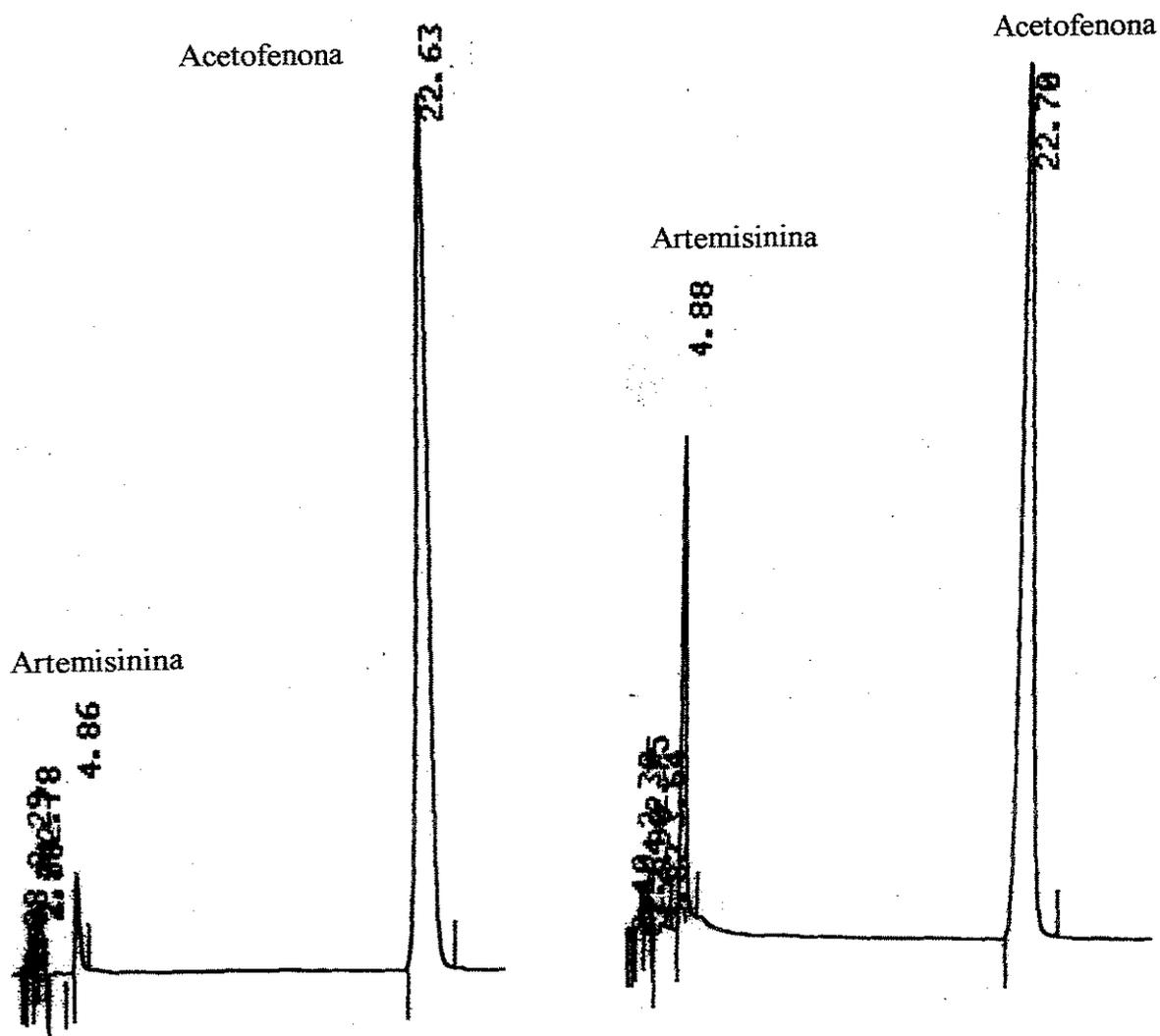


Figura 25: Cromatogramas dos padrões de artemisinina Q260 por CLAE.

Anexo 4

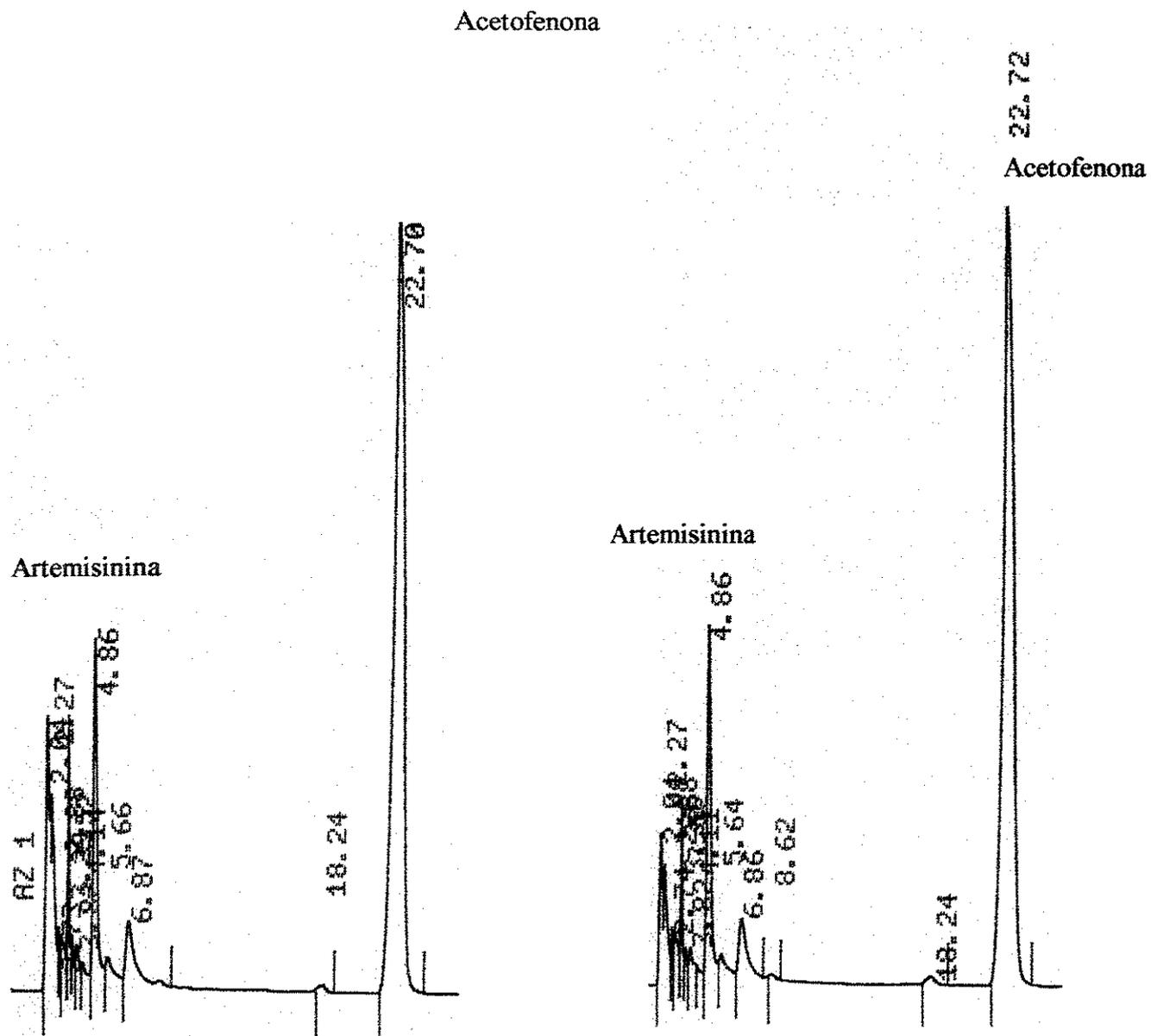


Figura 26: Cromatogramas do EAA por CLAE.