



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas



**Efeito da infusão de *Artemisia annua* cultivada em solo com aplicação de silicato de cálcio e magnésio sobre o controle de *Toxoplasma gondii* in vitro**

**Cristina Rostkowska**

**Uberlândia, MG**

**2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas



**Efeito da infusão de *Artemisia annua* cultivada em solo com aplicação de silicato de cálcio e magnésio sobre o controle de *Toxoplasma gondii* in vitro**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

**Cristina Rostkowska**

Prof. Dr. José Roberto Mineo (Orientador)

Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva (Co-orientadora)

Prof. Dr. Gaspar Henrique Korndorfer (Co-orientador)

Uberlândia – MG

2012

Segunda folha de rosto

Dedico este trabalho aos meus pais, Rubens e Ivone.  
Aos meus avôs maternos, João e Rosa.  
Aos meus avôs paternos, Marcelino e Eurides.  
Ao meu esposo, Tomasz Rostkowski.  
À minha sogra e ao meu sogro, Janina e Stanislaw.  
Aos meus irmãos, Rubens, Adriana e Katarzina.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pela orientação, pelas oportunidades, pela dedicação, pela compreensão e pela paciência.

À Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela dedicação extraordinária ao trabalho, pela orientação e paciência.

Ao Prof. Dr. Gaspar Henrique Korndorfer, aos funcionários e amigos do LAFER, GPSi e LABAS, ICIAG-UFU.

A Dra. Lilian Aparecida Oliveira do ICIAG-UFU e ao Dr. Luiz Antônio Zanão Júnior do IAPAR, Paraná.

Ao Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães e ao pesquisador Dr. Jorge Ferreira pelo apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Carlos Machado dos Santos e aos funcionários e amigos do LASEM, ICIAG-UFU, especialmente ao Msc. Adílio de Sá Junior.

Especialmente, a amiga, Caroline Martins Mota pela grande ajuda na execução dos procedimentos experimentais, sem a qual a conclusão deste trabalho não teria sido possível e pela disposição em deixar seus próprios trabalhos para me auxiliar.

À Dra. Raquel Alves de Freitas e à Dra. Ana Cláudia Pajuaba, pela amizade, pelo carinho e suporte técnico em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, especialmente a Taísa Carrijo, Gabriele Garcias, Hercílio Higino da Silva Filho, Fernando Reis de Carvalho, Flávia B. Ferreira, Arlindo Gomes de Macêdo Junior, Murilo Vieira da Silva, Profa. Mônica Sopelete, Leandro Ynoue, Rafael Resende, Karine Cristine de Almeida, Mateus Silveira Freitas, Tamires Lopes, Silas Silva Santana e Lorenço Faria Costa.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Zilda, Marley, Edilge e Júnior.

A todos os demais colegas e professores, pela contribuição na minha formação e pela colaboração direta ou indireta na realização deste trabalho.

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao Tomasz Rostkowski, esposo, amigo, colaborador e companheiro de todas as horas.

## **PRECE DE GRATIDÃO**

Senhor Jesus! Pela benção  
De Tua doutrina santa  
Que nos apóia e levanta  
Para o Reino de Amor,  
Pela paz que nos ofertas,  
Pela esperança divina  
Que nos conforta e ilumina,  
Bendito sejas, Senhor!

Pela carícia do lar,  
-Doce templo de carinho-  
Que nos concedes por ninho,  
Céu na Terra, campo de flor.  
Pelo aconchego suave  
Da afeição que nos aquece,  
Pelo consolo da prece,  
Bendito sejas, Senhor!...

Pelo tesouro sublime  
De graças da natureza,  
Pela serena beleza  
Do mar, do jardim, da cor,  
Pela fonte que entretece  
Poemas de melodia;  
Pelo pão de cada dia,  
Bendito sejas, Senhor!

Em tudo o que nos reserves  
À luz de cada momento,  
O nosso agradecimento  
por tudo, sejas o que for...

Vivemos, Jesus Querido,  
Na alegria de encontra-Te,  
Cantando por toda a parte,  
Bendito sejas, Senhor!...

João de Deus

## **LISTA DE ABREVIASÕES**

ACTs: terapias combinadas com artemisinina

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

ATPase-Ca<sup>2+</sup>: enzima adenosina trifosfato transportadora de cálcio

B: boro

°C: graus Celsius

Ca: cálcio

cm: centímetro

CPRG: β-D-galactopiranosideo vermelho de clorofenol

CTC: capacidade de troca catiônica

Cu: cobre

DAD: detector de arranjo de diodos

d.C.: depois de Cristo

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Fe: ferro

FTE BR12: fertilizante fornecedor de micronutrientes

g: gramas

h: hora

ha: hectare

HCl: cloreto de hidrogênio

HEPES: ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-ELSD: cromatografia líquida de alta eficiência com detector evaporativo de espalhamento de luz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>: ácido monosilícico

IC<sub>50</sub>: metade da concentração inibitória

IFN-γ: interferon-gama

IL: interleucina

K: potássio

kg: quilograma

kV: quiloVolts

L: litro

LD<sub>50</sub>: metade da dose letal

Lsi 1: gene *low silicon Rice 1*

M: molar

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MIP: *major intrinsic protein*

Mg: magnésio

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

Mn: manganês

Mo: molibdênio

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

N: nitrogênio

NIPs: *nodulin intrinsic proteins*

nm: nanômetro

ORAC: capacidade de absorbância de radicais de oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

P: fósforo

PfATP6: Homólogo do SERCA

PIPs: *plasma membrane intrinsic proteins*

pK1: ponto constante de equilíbrio da dissociação do grupo carboxílico

Recmix: fertilizante, fonte de silicato

S: enxofre

SERCA: Sarcoplasmic/Endoplasmic-Reticulum Ca 2+-ATPase

SiO<sub>2</sub>: dióxido de silicato

SIPs: *small and basic intrinsic proteins*

TaLsi1: gene que controla o transporte de silicato em trigo

TIPs: *tonoplast intrinsic proteins*

TLC: cromatografia em camada fina

Zn: zinco

μg: micrograma

μM: micromolar

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Silício no solo e nas plantas.....	14
1.2 Uso de silício na agricultura.....	16
1.3 <i>Artemisia annua</i> e artemisinina.....	19
1.4 <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	23
1.5 Toxoplasmose e artemisinina .....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Delineamento experimental.....	29
3.2 Avaliação da altura da planta e coleta de amostras para análises .....	30
3.3 Análises de macro e micronutrientes em folhas de <i>Artemisia annua</i> .....	30
3.4 Quantificação do silício foliar.....	30
3.5. Análise dos tricomas glandulares nas folhas de <i>Artemisia annua</i> .....	31
3.6 Análise do conteúdo de artemisinina em folhas de <i>Artemisia annua</i> .....	32
3.7. Preparação da infusão de <i>Artemisia annua</i> .....	33
3.8 Análise do conteúdo de artemisinina na infusão de <i>Artemisia annua</i> .....	33
3.9 Avaliação dos efeitos da infusão de <i>A. annua</i> e artemisinina sobre a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> <i>in vitro</i> .....	34
3.9.1 Cultura de células.....	34
3.9.2 Ensaios de citotoxicidade.....	34
3.9.3 Parasitos.....	34
3.9.4 Condições experimentais de tratamento e infecção <i>in vitro</i> .....	35
3.9.4.1. Pré-tratamento dos parasitos antes da infecção de células hospedeiras.....	35
3.9.4.2. Tratamento das células hospedeiras após infecção parasitária.....	35
3.9.4.3. Tratamento das células hospedeiras simultaneamente à infecção parasitária.....	36

3.9.5 Quantificação da proliferação intracelular parasitária.....	<b>36</b>
3.10 Análise estatística.....	<b>37</b>
4. RESULTADOS.....	<b>38</b>
4.1 Análise das características agronômicas: macro e micronutrientes, altura da planta e silício foliar.....	<b>38</b>
4.2 Análise dos tricomas glandulares totais e intactos.....	<b>42</b>
4.3 Análise do teor de artemisinina.....	<b>45</b>
4.4 Análise de citotoxicidade das infusões de <i>A. annua</i> e artemisinina.....	<b>48</b>
4.5 Efeito da infusão de <i>A. annua</i> e artemisinina sobre a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> <i>in vitro</i> .....	<b>50</b>
5. DISCUSSÃO.....	<b>54</b>
6. CONCLUSÕES.....	<b>60</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	<b>61</b>
ANEXO 1.....	<b>70</b>
ANEXO 2.....	<b>71</b>
ANEXO 3.....	<b>72</b>

## RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose importante devido à capacidade de seu agente causal, *Toxoplasma gondii*, de infectar um grande número de vertebrados e ser associada com infecção congênita ou doença oportunista em pacientes imunocomprometidos. O tratamento tradicional mostra efeitos adversos levando à pesquisa de compostos de baixa toxicidade como a artemisinina, seus derivados e a infusão da planta *Artemisia annua*. A utilização de silício no solo de culturas de *A. annua* e seu papel no conteúdo de artemisinina ainda não foram estudados. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do silício sobre a fisiologia da planta *A. annua* e o papel da infusão destas plantas sobre o controle da infecção de *T. gondii* em cultura celular. Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso (DIC), no qual *A. annua* foi plantada em solo com aplicação de cinco diferentes dosagens de silicato de cálcio/magnésio (0, 200, 400, 800 e 1600 kg ha<sup>-1</sup>), em cinco repetições e mantida em casa de vegetação. A análise de macronutrientes foliares mostrou um aumento significativo apenas para o nitrogênio, na presença da maior dosagem de silicato no solo. As quantidades de micronutrientes e silício foliares bem como a altura da planta não foram significativamente alteradas em quaisquer dosagens de silicato no solo. A aplicação de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato induziu a maior área de tricomas glandulares totais que foi associada com os tricomas glandulares intactos, como observado por microscopia eletrônica de varredura, e com o mais alto conteúdo de artemisinina nas folhas e na infusão da planta, como determinado por cromatografia em camada fina (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), respectivamente. Os tratamentos de células HeLa, simultaneamente ou após a infecção por *T. gondii*, com infusão de *A. annua* cultivada sem ou com silicato (400 kg ha<sup>-1</sup>) aplicado ao solo, induziram decréscimo dependente da dose na proliferação parasitária, como também verificado para o tratamento das células com artemisinina pura. Em conclusão, o uso de silício teve efeito positivo sobre as áreas de tricomas glandulares e seu conteúdo de artemisinina, mas este resultado não foi associado com melhor eficácia da infusão de *A. annua* sobre a replicação intracelular de *T. gondii*. Estes resultados sugerem que outros componentes além da artemisinina poderiam contribuir para este efeito, como os flavonóides presentes nas folhas de *A. annua* que podem atuar em sinergismo com a artemisinina e melhorar a sua eficácia.

**Palavras chave:** *Toxoplasma gondii*, *Artemisia annua*, artemisinina, silício, alternativas fitoterápicas.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is an important zoonotic disease due to ability of its causal agent, *Toxoplasma gondii*, to infect large number of vertebrates and to be associated with congenital infection or opportunistic disease in immunosuppressed patients. As the traditional treatment has shown adverse effects, low-toxicity compounds including artemisinin and its derivatives have been researched, as well *Artemisia annua* tea infusion. The use of silicon in the soil of *A. annua* crops and its role on artemisinin content has not been studied yet. This study aimed to investigate the effects of silicon on *A. annua* plant physiology and the role of the tea infusion obtained from these plants in the control of *T. gondii* infection in cell culture. The experimental design was a completely randomized design (CRD), in which *A. annua* was planted in the soil with five different doses of calcium/magnesium silicate (0, 200, 400, 800 and 1600 kg ha<sup>-1</sup>) and five replications, and maintained in a greenhouse. Analysis of foliar macronutrients showed a significant increase only for nitrogen, in the presence of the highest dose of silicate in the soil. The foliar micronutrient and Si concentrations as well the plant height were not significantly changed with any silicate doses in the soil. The use of 400 kg ha<sup>-1</sup> of silicate induced the highest total glandular trichome area that was also associated with the intact glandular trichomes, as observed by scanning electron microscopy, and with the highest artemisinin content in plant leaves and tea infusion, as determined by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. HeLa cell treatments along with or after *T. gondii* infection, with infusion of *A. annua* grown in the soil without or with silicate (400 kg ha<sup>-1</sup>), induced a decrease of parasite proliferation in a dose-dependent manner, as also seen for cell treatment with pure artemisinin. In conclusion, the use of silicon had positive effect on the glandular trichome areas and artemisinin contents, but this outcome was not associated with a better efficacy of *A. annua* tea infusion on *T. gondii* replication. These findings suggest that other components rather than artemisinin could be contributing to this effect, such as flavonoids present in its leaves, which may act in synergism with the artemisinin and improve its efficacy.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, *Artemisia annua*, artemisinin, silicon, herbal alternatives.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Silício no solo e nas plantas**

O silício é o segundo elemento mais abundante na superfície da terra, respondendo por mais de 31% da crosta terrestre em peso. Devido à sua forte afinidade com o oxigênio, existe na natureza sempre na forma de sílica ou de silicato, que são combinados com vários metais (CHEN et al., 2000).

Embora não seja essencial, do ponto de vista fisiológico, para o crescimento e desenvolvimento das plantas, a sua absorção traz inúmeros benefícios. Efeitos benéficos da adubação com silício são observados em várias espécies vegetais, especialmente quando estas são submetidas a estresse biótico ou abiótico (KORNDÖRFER et al., 1999; DATNOFF et al., 2001).

Entre os vários benefícios da aplicação do silício no solo, pode-se destacar a diminuição na susceptibilidade a fungos patogênicos e insetos; amenização de estresses abióticos (componentes não vivos do ambiente) de várias formas; redução do estresse à salinidade e à transpiração; e na cana-de-açúcar, pode atuar na proteção das folhas contra os danos da radiação ultravioleta (TISDALE et al., 1993; EPSTEIN, 1994; MARSCHNER, 1995). Todos esses efeitos benéficos são na sua maioria atribuídos a sua deposição em diferentes órgãos. Contudo, para a planta beneficiar-se do silício, um alto acúmulo é necessário (MA et al., 2011).

Várias plantas são capazes de absorver o ácido monosilícico [ $H_4SiO_4$  ou  $Si(OH)_4$ ], também denominado de ácido ortosilícico ou simplesmente ácido silícico, em quantidades que dependem da espécie, de sua concentração na solução do solo e da água disponível para planta (DATNOFF et al., 1991). A sílica é a forma em que o ácido silícico pode ser irreversivelmente desidratado e formar sílica estável,  $SiO_2$  ou dióxido de silício.

O dióxido de silício ( $SiO_2$ ) é o mineral primário mais abundante nos solos, constituindo a base da estrutura da maioria dos argilominerais. Todavia, a maior parte do silício encontrado em solos das regiões tropicais está na forma de quartzo, opala ( $SiO_2.nH_2O$ ) e outras formas não-disponíveis às plantas em razão do seu avançado grau de intemperização. Assim, apresenta sérias limitações químicas para o desenvolvimento das plantas, podendo ser citadas elevada acidez, baixa capacidade de troca catiônica (CTC), baixa saturação por bases e alta capacidade de fixação do fósforo (BARBOSA FILHO et al., 2001). Presente na solução do

solo na forma de ácido monosilícico, a maior parte do silício está na forma não dissociada ( $pK_1 = 9,6$ ), a qual é prontamente absorvida pelas plantas (RAVEN, 1983; WERNER; ROTH, 1983).

Os principais drenos são a precipitação do silício em solução, formando minerais; a polimerização do ácido silícico; a lixiviação; a adsorção em óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio; e a absorção pelas plantas (LIMA FILHO et al., 1999). A quantidade de silício disponível para as plantas pode ser reduzida também pela compactação do solo, pois aumenta o nível de ácidos polissilícicos, diminuindo o teor de ácido monossilícico (MATYCHENKOV et al., 1995).

As fontes de silício normalmente utilizadas em pesquisas são os metassilicatos de sódio e potássio, além do ácido silícico. Na Europa, principalmente os produtores de pepino e roseiras usam o metassilicato de potássio no controle de míldio por meio de pulverização foliar (BÉLANGER et al., 1995). As escórias básicas de siderurgia (silicatos de cálcio e magnésio) são usadas comercialmente como corretivos do solo devido à sua basicidade e como fontes de silício. Os termofosfatos magnesianos (silicofosfatos de magnésio) também se caracterizam como fontes de silício (LIMA FILHO et al., 1999).

O dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) representa de 50 a 70% da massa de solo. A maioria dos solos tem silício na solução entre 100 e 500  $\mu\text{M}$  na forma de ácido monosilícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ). Portanto, todas as plantas cultivadas em solo irão conter algum silício em seus tecidos, embora a concentração de silício na parte aérea varie de 0,1% a 10% sobre o peso seco entre as espécies de plantas, apesar de algumas plantas apresentarem conteúdos maiores (EPSTEIN; BLOOM, 2006; MA et al., 2011).

As dicotiledôneas são conhecidas como não acumuladoras de silício e tendem a ter concentrações teciduais iguais ou menores que 0,5% (MARSCHNER, 1995). As acumuladoras contêm mais de 1% de silício e a taxa de Si/Ca maior que 1. As plantas que contêm de 0,5-1% ou mais de 1% de silício, mas a taxa Si/Ca menor que 1 são intermediárias (DATNOFF et al., 2001). Só as plantas conhecidas como acumuladoras de silício tendem a ter concentrações relativamente altas, maiores que 5% (EPSTEIN, 1994).

Em termos de matéria seca, as espécies de plantas são consideradas acumuladoras quando a concentração de silício representa mais de 1  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria seca. Bons exemplos de acumuladoras são trigo, aveia, cevada, sorgo, milho, cana-de-açúcar e o arroz que têm em torno de 10  $\text{g kg}^{-1}$ . Algumas espécies aquáticas apresentam melhor desempenho de acumulação chegando a ter um conteúdo acima de 50  $\text{g kg}^{-1}$  (KORNDÖRFER et al., 1998).

## **1.2. Uso de silício na agricultura**

A partir do decreto lei Nº 4.954, de 14 de janeiro de 2.004 (regulamenta a lei 6894 de 16/01/1980) que dispõe sobre a legislação de fertilizantes, o silício foi considerado pela legislação brasileira como micronutriente benéfico às plantas. O silicato de potássio é a única fonte de silício solúvel regulamentada para uso na agricultura.

Na agricultura, o silício é considerado um dos principais constituintes inorgânicos da planta e através de sua aplicação no solo há melhora no crescimento das mesmas pelo equilíbrio na absorção, no transporte e distribuição de nutrientes e no aumento da resistência a doenças (CHEN et al., 2000; MA et al., 2011).

Os efeitos positivos do acúmulo de silício variam e diferem entre as espécies de plantas, o que é atribuído à presença de genes específicos que primeiramente foram descritos em arroz e posteriormente em milho e cevada, e estão envolvidos na absorção de silício (BÉLANGER et al., 2003). O trigo é uma espécie de planta conhecida por acumular concentrações relativamente grandes de silício e por se beneficiar com o tratamento feito com este elemento. A partir dessa premissa, buscou-se identificar e caracterizar a presença de genes transportadores de silício no trigo, e também determinar a sua funcionalidade e localização (BÉLANGER et al., 2003).

Os resultados destas pesquisas permitiram a identificação e clonagem de um gene de transporte de silício que apresentou alta homologia (> 80%) com a proteína de influxo de silício em arroz conhecida como Lsi. O gene (TaLsi1), transportador Lsi1 de silício em trigo, foi localizado na membrana plasmática, característica típica de outros membros da família Lsi1. A atividade do transportador TaLsi1 foi confirmada em um sistema heterólogo, e sua eficiência no transporte de silício foi comparável à do gene transportador em arroz Lsi1. A descoberta desses transportadores proporciona uma oportunidade única para a compreensão e otimização da absorção de silício como estratégia de controle de doenças de plantas (MONTPETIT et al., 2012; BÉLANGER et al., 2003).

Na cultura do arroz, o transporte de silicato do solo para as panículas é mediado por diferentes genes que controlam o acúmulo de silicato e alguns já foram identificados (MA et al., 2011). O gene Lsi 1 (*Low silicon Rice 1*), codifica uma proteína da família das aquaporinas. As aquaporinas pertencem à família de proteínas MIP (*major intrinsic protein*) e encontram-se presentes em todas as formas de vida. Nas plantas as aquaporinas são agrupadas em 4 sub-famílias, PIPs (*plasma membrane intrinsic proteins*), TIPs (*tonoplast intrinsic*

*proteins*), NIPs (*nodulin intrinsic proteins*) e SIPs (*small and basic intrinsic proteins*), localizadas na membrana plasmática de células radiculares. Lsi1, pertencente a um grupo NIP da família aquaporina, é responsável pela absorção de silício do solo para as células da raiz em ambas as dicotiledôneas e monocotiledôneas, embora seus padrões de expressão e localização celular diferem para diferentes espécies de plantas. O transporte subsequente de silício para fora das células da raiz em direção ao cilindro central do caule é mediado por um transportador de efluxo ativo, Lsi2. Lsi1 e Lsi2 são polarmente localizadas nos lados proximal e distal, respectivamente, de ambas exoderme e endoderme na raiz do arroz. O silício na seiva do xilema é apresentado na forma de ácido monosilícico e é descarregado pelo Lsi6, um homólogo de Lsi1 em arroz. Lsi6 também está envolvido na transferência intervascular de silício no nó, o que é necessário para a distribuição preferencial de silício para as panículas (MA; YAMAJI, 2006). Raízes laterais contribuem para a absorção do silício, mas os pêlos radiculares, que são formados a partir de células epidérmicas, não. Isto pode explicar à falta de um sistema transportador de silício nestas estruturas (MA et al., 2001).

Trabalhando com morangos, Wang e Galleta (1998) viram que através da aplicação foliar de silício que houve aumento no teor de clorofila e no conteúdo de ácidos orgânicos e declínio do conteúdo de carboidratos solúveis, bem como aumento nos níveis de glicolipídios e fosfolipídios, o que pode contribuir para a manutenção da permeabilidade da membrana, induzindo à expansão celular e favorecendo o crescimento da planta.

Outros autores como Tesfagiorgis e Laing (2011) pesquisando a aplicação foliar de silício solúvel em abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), verificaram o efeito da concentração, da frequência de aplicação e do escorrimento foliar na severidade de oídio (*Podosphaera xanthii*). Os melhores resultados foram obtidos quando a frequência de pulverização foi aumentada, e quando foi permitido que o silício alcançasse a zona de raiz das plantas. Quando o silício foi aplicado nas folhas, o contato direto entre o spray e o patógeno apareceu ser o principal mecanismo de ação envolvido no controle da doença, e parte do silício aplicado foi absorvida pelas raízes das plantas, desempenhando, portanto, um importante papel na saúde das plantas.

A deposição de silício na parede celular de folhas de trigo foi correlacionada com a localização de sílica nos tricomas, dando a rugosidade e a dureza das folhas, atuando desta forma, como uma barreira física que impede a penetração de herbívoros e agentes patogênicos através da parede celular (RAFI et al., 1997; EPSTEIN, 2009). Duas hipóteses podem explicar como o silício aumenta a resistência das plantas contra a infecção pelo patógeno: na primeira

a camada de silício insolúvel é depositada em células epidérmicas impedindo a penetração pelo patógeno ("hipótese da barreira mecânica") e na segunda o silício afeta a resposta do vegetal em nível bioquímico e molecular, onde uma série de estudos tem mostrado aumento em compostos de defesa das plantas, como os fenólicos, fitolexinas e proteínas de resistência das plantas (EPSTEIN, 2009).

Vários estudos de genoma em *Arabidopsis*, arroz e trigo suplementados com silício comparados a plantas controles (sem adição de silício) também tem mostrado uma expressão diferenciada de um grande número de genes envolvidos nos mecanismos de defesa da planta hospedeira. Com base no exposto, este elemento pode desempenhar um papel importante no alívio de estresses bióticos de plantas cultivadas em casa de vegetação e no campo (DATNOFF, 2011).

Arnon e Stout (1939) estabeleceram conceitos de essencialidade que são utilizados até hoje por nutricionistas e fisiologistas de plantas. A essencialidade para estes pesquisadores pede que os três princípios ocorram ao mesmo tempo. O primeiro estabelece que a deficiência torne impossível para a planta completar o estádio vegetativo ou reprodutivo do seu ciclo de vida; o segundo que tal deficiência seja específica para o elemento em questão, podendo ser corrigida ou impedida somente com o seu fornecimento; e o terceiro que o elemento esteja diretamente envolvido na nutrição da planta, sendo constituinte de um metabólito essencial ou exigido para a ação de um sistema enzimático, independentemente dos possíveis efeitos em corrigir alguma condição microbiológica ou química desfavorável do solo ou outro meio de cultura.

Por estes critérios, o silício não foi reconhecido como um elemento essencial para o crescimento das plantas. A principal razão é que não há nenhuma evidência de seu envolvimento com o metabolismo das plantas, exceto para *Equisetum arvense* ('cavalinha' ou 'rabo de cavalo') que dentre as espécies terrestres, é a única para qual a essencialidade para o silício foi demonstrada. As dificuldades e limitações encontradas pelas plantas, em retirar o silício do meio nutritivo devem ser consideradas (HOFFMAN; HILLSON, 1979; EPSTEIN, 1994).

No entanto, os pesquisadores Epstein e Bloom (2006) trazem um novo critério de essencialidade. Segundo eles, um elemento é essencial se preenche pelo menos um dos critérios citados a seguir: o primeiro estabelece que o elemento seja parte de uma molécula que é um componente intrínseco da estrutura ou do metabolismo da planta e o segundo que a planta possa ser tão severamente privada do elemento que exiba anormalidades em seu

crescimento, desenvolvimento ou reprodução, isto é, seu desempenho em comparação com plantas menos privadas.

A carência de silício pode resultar em diminuição da capacidade biológica da planta em resistir às condições adversas do meio ambiente (RAFI et al., 1997). Entretanto, não são conhecidos os mecanismos bioquímicos responsáveis pelos efeitos da deficiência de silício, não havendo, portanto, evidência para qualquer ligação orgânica (BIRCHALL et al., 1996). Mesmo sendo difícil comprovar a essencialidade do silício devido à sua abundância na biosfera, seu fornecimento é benéfico em determinadas circunstâncias, para a maioria das plantas superiores (WERNER; ROTH, 1983; MARSCHNER, 1995).

### **1.3 *Artemisia annua* e artemisinina**

A planta *Artemisia annua* L. pertence à família Asteraceae que abrange mais de 300 espécies. Pertencem a este gênero importantes plantas com atividade terapêutica, tais como *A. absinthium*, *A. dracunculus*, *A. vulgaris* e *A. ponticum* (LEE, 2002).

*Artemisia annua* é uma espécie anual, herbácea e sua altura pode variar entre 30 e 250 cm, dependendo da sua localização e de caracteres agronômicos implicados em seu crescimento. A planta possui flores heterogâmicas, amarelas que variam de 2 a 3 mm (FERREIRA et al., 2010b). As folhas são simples, alternadas e possuem a maior concentração e síntese do princípio ativo principal, a artemisinina, havendo pequenas concentrações nos caules e nenhuma produção nas raízes (LOMMEN et al., 2007).

Os tricomas glandulares e não glandulares de *A. annua* diferem em suas funções. Os tricomas não glandulares são encontrados nas superfícies aéreas da planta e agem como uma barreira mecânica contra temperaturas extremas, alta intensidade de luz e perda excessiva de água, mas não produzem nem armazenam artemisinina (FERREIRA; JANICK, 1996). Por outro lado, os tricomas glandulares são estruturas secretoras que produzem e armazenam os óleos essenciais em plantas e a artemisinina é acumulada nestas glândulas, atingindo seu máximo conteúdo imediatamente antes da floração (FERREIRA; JANICK 1996; IIJIMA et al., 2004; TEOH et al., 2006; COVELLO et al., 2007; OLSSON et al., 2009). Duke e Paul (1993) monitoraram o desenvolvimento dos tricomas glandulares nas folhas de *A. annua* que iniciaram com a diferenciação das células foliares em células glandulares. A folha mais jovem foi diferenciada pela formação de uma estrutura bisseriada de 10 células, consistindo de duas células-tronco, duas células basais e três pares de células secretoras, cujas cutículas separam

da parede celular para formar um saco bilobado que eventualmente se rompe para liberar seu conteúdo. A propagação da planta dá-se naturalmente por fecundação cruzada, mas pode também propagar-se vegetativamente através de técnicas artificiais de propagação *in vitro* (MAGALHÃES, 1996).

Apesar de ser conhecida pelos homeopatas chineses desde 340 d.C. no tratamento da febre, a infusão de *Artemisia* descrita no livro Zhou Hou Bei Ji Fang (*Handbook of Prescriptions for Emergency Treatment*) somente foi introduzida na alopatia atual entre 1970 e 1980 (OU-YANG et al., 1990; RIDLEY, 2003). Em pesquisa científica realizada na China na década de 1970, a planta mostrou ter atividade anti-malária. Naquele país, a planta cresce com facilidade e tem altos teores de artemisinina, que chegam a 1,2% do peso da planta seca (LEE, 2002). Mais precisamente em 1972, foi isolado o princípio ativo, a artemisinina ou qinghaosu, um composto cristalino identificado como terpeno, utilizado na cura da malária (*Plasmodium berghei*, Filo Apicomplexa) em diversos países, nos continentes da África, Ásia e América do Sul (WHO, 2001). Outras espécies do gênero *Artemisia* também já foram avaliadas, mas somente *A. aspiacea* e *A. capillares* demonstraram atividade anti-malária (LEE, 2002). A fórmula empírica da artemisinina é C<sub>5</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub> e a estrutura é conhecida como sesquiterpeno com um anel de lactona.

A artemisinina e seus derivativos semi-sintéticos (arteeter, artemeter e artesunato) tem sido usados em associação com outros medicamentos para controle da malária, consistindo as terapias combinadas com artemisinina (ACTs) que são recomendadas pela Organização Mundial de Saúde desde o ano de 2001, visando evitar a resistência do parasito (WHO, 2006). Segundo Mutabingwa (2005), as ACTs agem com eficácia e diminuem a taxa na qual a resistência emerge e se espalha. A artemisinina tem ação rápida e não há relatos de resistência do parasito da malária (*Plasmodium falciparum*) a este composto e seus derivados. No corpo humano, os derivados da artemisinina são metabolizados a dihidroartemisinina, que é o principal agente ativo (RIDLEY, 2002). O metabolismo de derivados da artemisinina tem meia-vida curta (1-2 horas) no sangue quando ingeridos pela via oral, mas meia-vida maior (7-9 horas) quando administrados por via intramuscular (FERREIRA et al., 2010a).

O preparo de uma dose diária de 4,5 a 9 g de folhas secas de *A. annua* em 1 litro de água fervente (infusão) é recomendado pela atual farmacopéia da República da China como remédio para febre e malária (RÄTH et al., 2004). Estudos realizados na China mostram que a utilização de 72 a 125 g de folhas secas por dia durante três dias consecutivos são altamente eficientes. Outros estudos demonstraram que a infusão de *A. annua* é segura para o tratamento

de malária em gestantes, sendo a DL<sub>50</sub> de 162,5 g Kg<sup>-1</sup> (WILLCOX et al., 2007). O estudo da utilização da infusão de *A. annua* preparada de acordo com farmacopéia chinesa no tratamento da malária demonstrou um eficiente controle do parasitismo; entretanto, foi observada recrudescência da infecção, sugerindo a utilização de uma combinação com outros antimaláricos (MUELLER et al., 2004).

O mecanismo de ação da artemisinina na malária está relacionado com sua ligação com o grupo heme, que na presença de células vermelhas, oxida as proteínas e destrói a membrana celular do plasmódio de forma seletiva. Assim, sua ação é limitada ao parasito, acarretando pouco ou nenhum efeito colateral ao paciente. Outro efeito benéfico que pode ser citado é gerado pela lactona presente em sua fórmula molecular que quando transformada em dihidroartemisinina, é mais eficaz que a artemisinina além de ser capaz de originar outros derivativos, como o artemeter (solúvel em lipídeos) e o artesunato (artesunato solúvel em água) (KLAYMAN, 1985; BALINT, 2001). Eckstein-Ludwig e colaboradores (2003) obtiveram dados que evidenciaram a ação da artemisinina pela inibição de PfATP6 (única seqüência similar a ATPase-Ca<sup>2+</sup> (SERCA) no genoma do parasito) fora do vacúolo alimentar depois de ativação pelo ferro.

Para a planta produzir óleos essenciais e princípios ativos com funções terapêuticas é necessário um manejo adequado da cultura visando condições ideais para a sua fisiologia (estado metabólico, diferenciação dos tecidos de síntese), bem como condições ecofisiológicas e ambientais apropriadas para o seu desenvolvimento (SANGWAN et al., 2001). Vários fatores bióticos e abióticos podem afetar de forma negativa a produção de artemisinina e outros metabólitos secundários na planta. Estudando o efeito da deficiência hídrica e da temperatura no acúmulo da artemisinina e produção de fitomassa em *A. annua*, Marchese (1999) concluiu que apesar de um acúmulo significativo de artemisinina na planta sob estas condições de estresse, houve redução significativa na massa da matéria seca foliar, não resultando em maior acúmulo de artemisinina por planta.

Segundo Ferreira (2004), a produção de artemisinina pode ser feita tanto em culturas *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, as melhores fontes *in vitro* são aquelas culturas em que a planta toda ou a parte aérea da plântula apresenta tricomas glandulares. Outros fatores que foram observados em culturas *in vitro* são a necessidade de transferência das plântulas do escuro para o claro (16h/dia), sugerindo que a fotossíntese e os cloroplastos consequentemente estão envolvidos na biossíntese da artemisinina (RAO; NARASU, 1998). A quantidade de artemisinina é mínima ou completamente ausente em cultura de calos e

células vegetais e seu nível caiu significativamente em culturas onde houve o aumento da parte aérea e diminuição do crescimento das raízes através do uso de hormônios (FERREIRA; JANICK, 1996). Delabays (1997) relatou que o material genético (planta), as condições de cultivo, o clima e as variações geográficas levam a diferentes níveis de artemisinina nas folhas e flores variando de 0,01 a 1,4% do peso de matéria seca.

No Brasil, o estudo da *Artemisia* teve início em 1988, no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, quando foi estabelecido um intercâmbio entre o CPQBA e o governo buscando através do melhoramento genético a obtenção de híbridos com maiores teores do princípio ativo e posteriormente com o isolamento da artemisinina (MAGALHÃES et al., 1999; LEE, 2002). Os pesquisadores brasileiros trouxeram sementes da China, do Vietnã e de outras regiões da Ásia desenvolvendo um híbrido adaptado e atualmente patentearam o princípio ativo isolado através de tecnologia totalmente desenvolvida pelos mesmos.

Atualmente, a planta é considerada fonte rica em terpenos, hidroxilatados e flavonóides metoxilados (FERREIRA et al., 2010a), fazendo com que o uso da infusão de *A. annua* represente uma alternativa viável e segura como solução em países onde o princípio ativo ou seus derivativos não chegam à população carente que necessita da medicação. Assim, não só a artemisinina tem chamado à atenção dos pesquisadores, como também vários flavonóides que já foram isolados da planta. Entretanto, somente alguns destes flavonóides foram testados para sua atividade antimalária, anticancerígena, antioxidante ou outras funções biológicas relevantes em ensaios *in vivo* e *in vitro* (FERREIRA et al., 2010a).

O conteúdo dos flavonóides parece acumular em maiores quantidades durante o florescimento (FERREIRA et al., 2010a). A infusão clássica da planta é uma fonte rica em compostos fenólicos antioxidantes e artemisinina (RÄTH et al., 2004; WILLCOX et al., 2007). Já foi demonstrado que *A. annua* é uma dentre um grupo de quatro plantas medicinais que contem os mais altos níveis de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e a alta capacidade antioxidante da planta está relacionada ao alto conteúdo de compostos fenólicos (BRISIBE et al., 2009).

Nas últimas décadas tem sido sugerido que a eficácia de *A. annua* é devido ao efeito sinérgico de seus vários componentes (artemisinina e flavonóides) presentes no extrato, que podem colaborar com a artemisinina no controle da malária causada por *P. falciparum* (BHAKUNI et al., 2001; BILIA et al., 2006; BRISIBE et al., 2009). Carbonara e colaboradores (2012) analisaram o perfil químico da infusão aquosa de *A. annua* preparada

com as partes aéreas da planta por 1, 24 e 48 horas. Os autores analisaram o conteúdo de artemisinina por HPLC-ELSD e dos outros compostos pela combinação de diversas técnicas, concluindo que o conteúdo de artemisinina pouco variou entre os três diferentes extratos (em torno de 0,12%), além de serem identificados vários outros compostos, inclusive alguns flavonóides.

Muitas polimetoxiflavonas (casticina, artemetina, crisosplenetina e cirsilineol) presentes no extrato podem colaborar com a artemisinina no controle da doença causada por *P. falciparum* (BHAKUNI et al., 2001; BILIA et al., 2006). A preparação aquosa da planta contendo baixa concentração de artemisinina possui a vantagem de reduzir o risco do parasito em criar resistência à substância pura que já é utilizada em associação com outros medicamentos no controle da malária (ACTs), podendo mesmo ser mais eficiente em sua função no tratamento da doença (LIU et al., 1989; RÄTH et al., 2004; MUELLER et al., 2004; PRAYGOD et al., 2008;).

A infusão de *A. annua* também é utilizada em medicina veterinária. Lans e colaboradores (2007) utilizaram a infusão para o tratamento de verminoses e giardíase em porcos e verificaram diminuição de 81,6% a 83,2% do desenvolvimento de *Cryptosporidium parvum* em camundongos. Bhakuni e colaboradores (2001) demonstraram atividades biológicas do extrato de *A. annua* no controle de infecções bacterianas causadas por *Salmonella typhi*, *Proteus vulgares*, *Staphylococcus aureus*, como também sua atividade alergênica.

Em outro estudo, Wang e colaboradores (2007) verificaram que um derivativo de artemisinina (SM905) apresentou alta atividade inibitória na proliferação de células do baço e da reação linfocitária mista, bem como da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , por meio de inibição da fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Deste modo este derivativo demonstrou potente atividade imunossupressora *in vitro* e *in vivo*. No entanto, quando foi utilizado o extrato total de *A. annua*, obteve-se um efeito mais estimulatório que inibitório enfatizado pela alta produção de IL-12.

#### **1.4 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose**

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo protozoário do Filo Apicomplexa, *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1908). Esta enfermidade acomete todos os vertebrados de sangue quente (mamíferos e aves) inclusive humanos, mas

seus hospedeiros definitivos são membros da família dos Felídeos (DUBEY et al. 2005). Atualmente, estima-se que mais de um terço da população adulta do mundo, tenha sido exposta ao protozoário *T. gondii*, embora a maioria das infecções seja assintomática em indivíduos adultos imunocompetentes (RHOTOVA, 1993; TENTER et al., 2000).

Durante o ciclo de vida, *T. gondii* apresenta quatro formas principais de desenvolvimento: taquizoítas, bradizoítas, merozoítas e esporozoítas (LEKUTIS et al., 2001), com duas fases no seu ciclo de vida: uma assexuada, que ocorre na maioria dos hospedeiros vertebrados e uma sexuada que ocorre somente em hospedeiros felinos domésticos. A forma taquizoíta apresenta características antigênicas peculiares, induzindo uma forte resposta inflamatória que causa danos teciduais importantes e que é responsável pelas manifestações clínicas da doença (BLACK; BOOTHROYD, 2000; TENTER et al., 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Com a pressão da resposta imune do hospedeiro pode haver conversão em bradizoítas que são as formas de multiplicação lenta, persistindo no hospedeiro dentro de cistos teciduais sem ativar a resposta inflamatória do hospedeiro (DUBEY et al., 1998). No entanto, são característicos de infecções crônicas, podendo ser identificados nos músculos cardíaco e esquelético, cérebro e retina.

A infecção pode ocorrer por ingestão de carnes ou derivados mal cozidos contendo cistos tissulares de *T. gondii* ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados provenientes de fezes de felídeos e por vetores mecânicos como cães, moscas, baratas, ratos (NEVES et al., 1995; DUBEY, 1996). Já a transmissão vertical, ocorre pela transferência de taquizoítas através da infecção transplacentária, geralmente associada à infecção ou reinfecção durante o curso do período gestacional (TENTER et al., 2000; CARRUTHERS, 2002). Ainda é citada a transmissão pelo contato com secreções como saliva, urina, esperma e leite, ou ainda por órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (NEVES et al., 1995; DUBEY, 1998).

A doença quando adquirida após o nascimento é de baixa morbidade e letalidade, mas quando adquirida durante a gravidez pode acarretar danos ao conceito, como lesões no sistema nervoso central e retina, podendo ainda, levar à morte fetal ou ao abortamento (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Os riscos da infecção e as consequências clínicas da transmissão estão diretamente associados ao período de gestação da infecção, do estado imunológico da gestante e do número e virulência dos parasitos transmitidos ao feto (TENTER et al., 2000). Em relação à transmissão congênita estima-se que entre 1 e 10 recém-

nascidos são infectados em cada 10.000 nascimentos (TENTER et al., 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A doença também é uma importante infecção oportunista em indivíduos imunossuprimidos (TOMAVO et al., 1992; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003; LÜDER et al., 2003), onde a reativação da infecção latente pode causar doença sintomática como a encefalite toxoplasmica grave levando o paciente ao óbito (LUFT; REMINGTON, 1992). Em pacientes com câncer ou transplantados sob terapia imunodepressora, também é importante, principalmente devido à reativação de cistos teciduais (AMBROISE-THOMAS; PELLOUX, 1993).

De acordo com sua patogenicidade a camundongos existem pelo menos três linhagens clonais de *T. gondii* (genótipos I, II e III) (HOWE; SIBLEY, 1995). As cepas do genótipo I são extremamente virulentas para camundongos, enquanto as do genótipo II são pouco patogênicas para camundongos (BOHNE et al., 1993). A transmissão vertical de *T. gondii* parece ter uma maior importância epidemiológica na linhagem virulenta a camundongos (genótipo I), enquanto que animais e humanos clinicamente sadios infectados com a linhagem do genótipo II parecem desempenhar o papel de reservatórios para toxoplasmose. Linhagens clonais do tipo II em humanos são mais comumente isoladas de infecções crônicas e congênitas na Europa, enquanto que linhagens isoladas de pacientes com toxoplasmose ocular na América do Sul são predominantemente do tipo I e linhagens do tipo III são mais comumente isoladas de animais (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; PETERSEN, 2007).

Resultados falso-negativos podem ocorrer nos métodos de diagnóstico fetal, levando a erros no diagnóstico da doença em crianças recém-nascidas. Assim, todas as crianças nascidas de mães com toxoplasmose aguda devem ser submetidas a exames sorológicos e clínicos para a detecção de possível infecção e sequelas. Havendo a confirmação do diagnóstico materno e/ou neonatal, o tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível (LOPES et al., 2009).

O tratamento mais utilizado é a associação de sulfadiazina com a pirimetamina, mas estão disponíveis sulfonamidas triplas (sulfamerazina, sulfametazina e sulfapirazina), clindamicina, dapsona e atovaquona (HILL et al., 2005), tanto para o tratamento de humanos como animais. No entanto, esses medicamentos podem causar efeitos adversos tais como a supressão da medula óssea e alergias devido ao uso das sulfonamidas, especialmente em pacientes com AIDS (HOLFELS et al., 1994).

## 1.5 Toxoplasmose e artemisinina

Devido à importância da toxoplasmose e os efeitos adversos da terapia tradicional disponível para seu tratamento, torna-se evidente a necessidade do uso de novos agentes efetivos e alternativos no tratamento da doença. Como os agentes que causam a malária e a toxoplasmose são do mesmo Filo (Apicomplexa), alguns compostos antimicrobianos são efetivos no tratamento de ambas as doenças. A infusão de *Artemisia* pode ser uma destas alternativas, desde que sua eficácia no controle de *T. gondii* seja demonstrada.

Ou-Yang e colaboradores (1990) demonstraram que o crescimento de *T. gondii* foi inibido pelo uso de artemisinina. O experimento *in vitro* testou a habilidade da artemisinina em inibir a formação de placas em fibroblastos por *T. gondii*. O tratamento com 1,3 µg mL<sup>-1</sup> de artemisinina durante 14 dias eliminou o parasito por completo, sendo que sua utilização no pré-tratamento das células hospedeiras ou de *T. gondii* não teve efeito sobre o crescimento do parasito. Aparentemente, estudos prolongados com fibroblastos humanos demonstraram não haver nenhuma toxicidade. Dos seis derivativos da artemisinina analisados, a dihidroartemisinina 1- propil-eter-artemisinina e 1-butil-artemisinina tiveram resultados comparáveis ao da artemisinina. O arteeter e o artemeter foram mais efetivos, contudo o artemeter demonstrou ser 10 vezes mais potente que a artemisinina.

Em 1994, Holfels e colaboradores, estudaram o efeito de diferentes agentes microbicidas sobre taquizoítas de *T. gondii*, inclusive o arteeter (artemisinina éter) que na dose de ≥ 0,5 µg mL<sup>-1</sup> teve efeito inibitório da replicação intracelular de *T. gondii* *in vitro*.

O efeito do artesunato, dihidroartemisinina e a combinação de artesunato e dihidroartemisinina na infecção por *T. gondii* foram analisados por Sarciron e colaboradores (2000) *in vivo* e *in vitro*. Eles concluíram que a inibição do crescimento do parasito *in vitro* chegou a 70% com 0,1 a 0,5 µg mL<sup>-1</sup> de dihidroartemisinina por 96 horas. Contudo, o número de taquizoítas diminuiu de 40% a 50% com artesunato, dihidroartemisinina e a combinação de ambos (1:1). *In vivo*, a combinação entre artesunato e dihidroartemisinina (1:1) diminuiu os cistos cerebrais em torno de 40% após somente 5 dias de tratamento.

Jones-Brando e colaboradores (2006) trabalharam com quatro derivativos de artemisinina que diminuíram a atividade de *T. gondii* e a citotoxicidade em comparação ao trimetoprim, um dos compostos de relativa baixa toxicidade que é usado para o tratamento da toxoplasmose em seres humanos. Outros compostos, tais como a pirimetamina, apresentam uma maior atividade anti-*Toxoplasma*, entretanto a toxicidade é elevada, particularmente ao

longo de períodos prolongados de administração (GEORGIEV, 1994). A disponibilidade de compostos de baixa toxicidade, capazes de prevenir e tratar *T. gondii* nos seres humanos, representaria um grande avanço no tratamento de infecções para indivíduos imunocomprometidos. Além disso, a disponibilidade de tais compostos também permitiria definir o papel de *T. gondii* em ensaios clínicos dirigidos.

Os efeitos da infusão de *A. annua* sobre a infecção *in vitro* e *in vivo* de *T. gondii* investigados por Oliveira e colaboradores (2009) mostraram que a infusão da planta pode ser uma ferramenta terapêutica útil no controle da infecção devido a sua baixa toxicidade e sua ação inibitória direta no parasito.

Hencken e colaboradores (2010), trabalhando com 23 novos derivativos de trioxanos de dehidroartemisinina (DART), encontraram oito derivativos de tiazol e dois de carboxamida, ou seja, todos derivativos de artemisinina que efetivamente exerceram uma inibição de crescimento de *T. gondii*, com IC<sub>50</sub> variando de 0,25-0,42 µM, comparável em eficácia com artemeter (IC<sub>50</sub> = 0,31 µM) e 100 vezes mais inibitórios que drogas de uso corrente, como o trimetoprim (IC<sub>50</sub> = 46 µM).

Como *T. gondii* é responsável por um número considerável de infecções congênitas e abortamentos em animais e humanos, além de despertar grande preocupação como infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos, estudos que enfatizam os aspectos básicos da biologia do parasito que possam trazer avanços no tratamento, diagnóstico e prevenção da toxoplasmose são intensamente estimulados (TENTER et al., 2000; CARRUTHERS, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Considerando-se a conveniência de tentar aprimorar o tratamento da toxoplasmose, que apresenta semelhanças taxonômicas com o parasito causador da malária, foi considerado oportuno verificar se a infusão de *A. annua* cultivada em solo com diferentes aplicações de silicato é eficaz no controle da infecção por *T. gondii* em cultura celular. Os efeitos benéficos da adubação do solo com silício têm sido observados em várias espécies vegetais, especialmente quando estas são submetidas a estresses biótico ou abiótico. Como o princípio ativo principal (artemisinina) é depositado em tricomas glandulares da planta *A. annua* e o silício também se acumula nestas estruturas da planta, o uso do silício no solo pode melhorar o armazenamento de artemisinina, melhorando sua eficácia no controle de algumas patologias. Até o presente momento, a influência do uso de silício |DI|no solo sobre a planta *A. annua* ou sobre seu princípio ativo, a artemisinina, ainda não foi investigada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da infusão de *Artemisia annua* cultivada em solo com aplicação do silicato de cálcio e magnésio sobre o controle de *Toxoplasma gondii* *in vitro*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do silicato de cálcio e magnésio aplicado ao solo em diferentes dosagens sobre as características agronômicas (altura da planta, conteúdo de macro e micronutrientes, e de silício nas folhas), área dos tricomas glandulares e conteúdo de artemisinina nas folhas de *A. annua*.
- Avaliar a absorção e acúmulo de silício no solo após a aplicação de diferentes dosagens de silicato no solo.
- Avaliar o efeito da infusão de *A. annua* cultivada em solo com aplicação de silicato de cálcio e magnésio em diferentes dosagens, comparativamente à artemisinina pura, sobre a replicação intracelular de taquizoítas de *T. gondii* em cultura celular.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Delineamento experimental**

A etapa experimental da aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo foi conduzida na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG até a coleta final do material vegetal.

O solo a ser utilizado nos experimentos foi primeiramente analisado no Laboratório de Análises de Solos do ICIAG – UFU (ANEXOS 1 e 2). O solo foi caracterizado como latossolo vermelho eutroférrego, pH ácido, baixa fertilidade, classe textural muito argilosa. Após peneiração foram adicionados 10 kg de solo nos vasos e os seguintes macronutrientes: 1,11g/vaso de nitrogênio (N, uréia, 45% N), 2,5 g/vaso de fósforo (P, SSP, 18% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 8,33g/vaso de potássio (K, KCl, 60% K<sub>2</sub>O). Também foi adicionada uma mistura de micronutrientes (FTE BR12 contendo 9% de zinco [Zn], 1,8% de boro [B], 2% de manganês [Mn], 0,8% de cobre [Cu], 0,1% de molibdênio [Mo] e 3% de ferro [Fe]) na dosagem de 0,5 g/vaso. Todos estes fertilizantes foram adquiridos de Heringer Fertilizantes, Uberaba, MG.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC), com 5 tratamentos e 5 repetições. Os tratamentos diferiram nas dosagens de silício aplicado na forma de silicato de cálcio e magnésio (Recmix, 11,24% silício; Agronelli Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários Ltda, Uberaba, MG) no solo, como segue: T1 = 0 kg ha<sup>-1</sup>, T2 = 200 kg ha<sup>-1</sup>, T3 = 400 kg ha<sup>-1</sup>, T4 = 800 kg ha<sup>-1</sup> e T5 = 1600 kg ha<sup>-1</sup> de silicato de cálcio/magnésio, correspondendo a T1 = 0 g/vaso, T2 = 8,90 g/vaso, T3 = 17,79 g/vaso, T4 = 35,59 g/vaso e T5 = 71,17 g/vaso de silicato, respectivamente.

Em seguida, procedeu-se à semeadura e plantio de *Artemisia annua*. As sementes de *Artemisia annua* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Pedro Melillo Magalhães do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP e são provenientes de híbridos que passaram pelo processo de melhoramento genético por cruzamentos controlados. Para a semeadura foram utilizadas bandejas plásticas de 72 células em substrato Plantmax (Eucatex Agro, Paulínia, SP, Brazil) com o intuito de melhorar a germinação das sementes.

Após a obtenção de germinação satisfatória, as plântulas com cerca de 4 a 8 semanas e 15 cm de altura foram transplantadas para vasos com capacidade de 10 Kg de solo de acordo com o delineamento experimental citado, sendo plantada uma planta por vaso. As plântulas

foram aleatoriamente distribuídas na casa de vegetação (ICIAG - UFU) e irrigadas periodicamente de acordo com o cálculo da capacidade de retenção de água do solo.

### **3.2 Avaliação da altura da planta e coleta de amostras para análises**

As folhas foram coletadas aleatoriamente em todas as plantas de todos os tratamentos e todas as repetições quando as plantas tinham em torno de 6 a 8 meses, antes do estágio de florescimento quando o conteúdo de artemisinina geralmente diminui. Imediatamente antes da coleta das folhas, a altura das plantas de cada repetição em todos os tratamentos de aplicação de silicato no solo foi determinada, com o auxílio de uma fita métrica graduada em milímetros, do colo da planta (ponto onde a raiz e o caule se encontram) ao broto terminal (ápice da planta).

O material coletado (folhas) foi lavado com detergente e água destilada, seco em estufa de circulação forçada (45°C, 48 h), moído em moinho tipo Willey, embalado em sacos plásticos identificados e conservado em temperatura ambiente. Posteriormente, parte do material foi submetido às análises de macro e micronutrientes e quantificação do silício foliar e outra parte foi colocado em infusão e liofilizado para análise do conteúdo de artemisinina.

### **3.3 Análises de macro e micronutrientes em folhas de *Artemisia annua***

A análise de macro e micronutrientes foi realizada em folhas de *A. annua* em todos os tratamentos de aplicação de silicato no solo de acordo com protocolos padronizados (EMBRAPA, 1999) no Laboratório de Análises de Solos, ICIAG - UFU.

### **3.4 Quantificação do silício foliar**

A análise do silício foliar foi realizada no Laboratório de Fertilizantes (LAFER), ICIAG - UFU, seguindo os protocolos de Elliott e Snyder (1991) e adaptado por Korndörfer et al. (2004). As folhas secas e moídas de todos os tratamentos foram submetidas ao Método Amarelo, onde o silício é extraído a partir da oxidação da matéria orgânica, isto é, da eliminação do carbono do tecido vegetal com água oxigenada (digestão). Em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio à solução digestora com a finalidade de melhorar a eficiência do oxidante ( $H_2O_2$ ) e aumentar o pH da solução, visando manter o silício do tecido vegetal em

solução (ELLIOTT; SNYDER, 1991). As amostras foram autoclavadas e no sobrenadante foi adicionado HCl a 50% e molibdato de amônio a 20% (pH 7,0-8,0). Após 5 a 10 minutos, foi adicionado ácido oxálico e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 410 nm onde é obtida uma curva padrão de silício na planta após desenvolvimento da coloração amarela. Em paralelo, foi realizada uma curva padrão de silício variando de 0 a 8 mg L<sup>-1</sup> e os dados foram calculados em relação a esta curva de referência. Os resultados foram expressos como percentagem de silício foliar em relação ao peso seco das folhas (mg planta<sup>-1</sup>).

### **3.5 Análise dos tricomas glandulares nas folhas de *Artemisia annua***

Como a artemisinina e o silício depositam-se nos tricomas glandulares, foi verificado se os tratamentos com aplicações de silicato no solo alteravam o tamanho de tricomas, principalmente os glandulares. O estado de integridade dos tricomas glandulares de *A. annua* foi analisado em micrografias eletrônicas de varredura. Primeiramente, foi coletada uma folha no terço médio de cada planta em todos os tratamentos com aplicação de silicato no solo. As folhas coletadas pela manhã, foram lavadas, secas, cortadas em pedaços menores e imediatamente fixadas em Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2%, tampão cacodilato de sódio a 0,05 M, pH 7,2) (KARNOWSKY, 1965). Este material foi enviado ao Laboratório de Histopatologia Vegetal e Biologia Estrutural das Plantas no Centro de Energia Nuclear da Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP sob a responsabilidade da Profa. Dra. Neusa L. Nogueira.

A análise ultraestrutural das folhas de *A. annua* foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, de acordo com método descrito por Kitajima e Leite (1999). A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M, pH 7,2, por 1 hora. Após este procedimento, as amostras foram imersas 3 vezes em água destilada e desidratadas em concentrações crescentes de álcool (30%, 50%, 70% e 80%). Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com álcool 100% e as amostras foram secas ao ponto crítico através de dióxido de carbono líquido (Balzers CPD 030, Balzer Union Inc., Hudson, NH, EUA). As amostras secas foram montadas em pequenos cilindros de metal, banhadas em ouro 20 nm no evaporador (Balzers MED 010 vacum evaporator; Balzer Union Inc.). As imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss LEO 435 VP, Zeiss Leica, Cambridge, Inglaterra) a 20 kV foram digitalizadas. Parte deste material foi coberto

com carbono para as microanálises de raio X em microscópio de varredura (Zeiss 940 DSM-A, Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha).

As medidas das áreas dos tricomas glandulares totais e intactos foram obtidas pelo software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, EUA) das imagens provenientes da microscopia de varredura, como anteriormente descrito (CORNELISSEN et al., 2003).

### **3.6 Análise do conteúdo de artemisinina em folhas de *Artemisia annua***

A análise do conteúdo de artemisinina em folhas de *A. annua* foi realizada por cromatografia de camada fina (TLC) de acordo com a metodologia descrita por Quennoz et al. (2010). As folhas secas e moídas foram enviadas ao Centro de Pesquisa em Plantas Medicinais Mediplant, Conthey, Suíça. Inicialmente, 5 mL de tolueno foram adicionados a 100 mg de cada amostra em um homogeneizador (Ultra-Turrax, Polytron PT 20.00, Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Sweden) por 30 segundos e então procedeu-se a centrifugação das amostras a  $2,000 \times g$  por 5 minutos. Um microlitro do extrato da planta foi imediatamente aplicado a 15 mm da borda inferior da placa de TLC pré-recoberta por sílica gel (60F254, Merck, Darmstadt, D, 10X20 cm).

Padrões (100 ng de artemisinina pura) foram aplicados nas bordas da placa evitando-se assim, erros que pudessem ocorrer nas posições 1 e 15. Uma amostra conhecida, previamente analisada por HPLC, foi aplicada na segunda posição, possibilitando checar a qualidade da placa utilizada. Uma segunda amostra desconhecida (posição 4) foi aplicada novamente na posição 11 com o intuito de determinar a precisão da corrida. A placa de TLC foi considerada inutilizável quando obtido um valor da amostra conhecida muito diferente do esperado. As placas também foram descartadas quando o desvio padrão foi maior que 10%. A cromatografia foi realizada na placa de sílica usando-se n-hexano e dietil-eter (6:5, v/v) como eluentes em tina gêmea de imersão (Camag). A distância de migração foi de 60 mm e o tempo de migração em torno de 6 minutos. O pré-equilíbrio com a tina de fundo plano (Camag) levou 30 minutos, sendo a migração ascendente e linear. A placa de desenvolvimento foi seca por 3 minutos, imersa por 1 s na solução de ácido acético, ácido sulfúrico e anisaldeído (100:2:1, v/v/v) e então aquecida (TLC III, Camag) a 105°C por aproximadamente 5 minutos para a derivação termal *in situ* dos pontos de artemisinina.

A leitura foi realizada em um scanner de TLC (Camag, Muttens, Suíça) em absorbância de 530 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (gramas de artemisinina por 100 g de matéria seca).

### **3.7 Preparação da infusão de *Artemisia annua***

A partir desta etapa, todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Immunoparasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UFU. A infusão de *A. annua* em todos os tratamentos de aplicação de silicato no solo foi preparada como descrito por Oliveira et al. (2009). Em resumo, 10 g de folhas secas e moídas foram adicionadas a 100 mL de água destilada fervente, sendo a mistura agitada e mantida coberta por 10 minutos à temperatura ambiente. O material da planta foi removido por filtração e a infusão foi resfriada em temperatura ambiente. Uma parte da solução estoque de infusão de *A. annua* (100 mg/mL) foi distribuída em alíquotas de 1 mL, liofilizada e armazenada a 4°C até ser analisada quanto ao seu conteúdo de artemisinina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Outra parte da solução estoque da infusão foi filtrada (poro da membrana de 0.2 µm; Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) e imediatamente utilizada em ensaios de citotoxicidade.

### **3.8 Análise do conteúdo de artemisinina na infusão de *Artemisia annua***

A solução estoque liofilizada de *A. annua* (100 mg mL<sup>-1</sup>) foi ressuspensa em 1 mL de acetonitrila (Sigma-Aldrich), vigorosamente agitada, centrifugada a 13.400 g por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado (filtro de 0.2 µm, Millipore Co.) antes de ser submetido em HPLC. O conteúdo de artemisinina nas amostras foi determinado utilizando o sistema Shimadzu Prominence HPLC com detecção UV/vis, (SPD-M20A, DAD) e o software LC Solution (Shimadzu Co., Kyoto, Japão).

As análises basearam-se na curva de calibração obtida com a artemisinina pura (Sigma-Aldrich) proveniente de diluições duplas seriadas variando de 500 a 31,25 µg mL<sup>-1</sup>. A coluna utilizada para separar a artemisinina nas amostras foi a Shimadzu Shim-pack VP-ODS; 150 mm × 4.6 mm, 5 µm. A taxa de fluxo foi estabelecida em 1 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção da amostra foi 20 µL. Os cromatogramas foram registrados de 0 a 12,5 minutos pelo sistema detector DAD. Os valores de área do pico cromatográfico foram utilizados para estimar os níveis de artemisinina nas amostras.

### **3.9 Avaliação dos efeitos da infusão de *A. annua* e artemisinina sobre a infecção por *Toxoplasma gondii* in vitro**

#### **3.9.1 Cultura de células**

As células HeLa utilizadas nestes experimentos foram provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra), suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (todos reagentes obtidos de Sigma-Aldrich) e 10% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Cutilab, Campinas, Brasil) - meio completo – em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.9.2 Ensaios de citotoxicidade**

A citotoxicidade das amostras de infusão de *A. annua* e artemisinina pura foi avaliada para a viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT como descrito por Mosmann (1983). As células HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) em triplicata na presença de diluições duplas seriadas da solução estoque de infusão de *A. annua* (10.000 a 156,25 µg mL<sup>-1</sup>) ou artemisinina (400 a 3.125 µg mL<sup>-1</sup>) em meio completo. O controle consistiu de células incubadas apenas com meio. Após 24 h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas e incubadas com 10 µL de brometo de tiazolil azul de tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) a 5 mg mL<sup>-1</sup> em 90 µL de meio completo, por 4 horas antes do término da cultura. Partículas de formazan foram solubilizadas em dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e N, N-dimetilformamida (DMF) 50%. Os valores de absorbância foram determinados a 570 nm após 30 minutos em leitor de placas (Titertek Multiskan plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade das células em relação aos controles.

#### **3.9.3 Parasitos**

Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (cepa 2F1, RH) foram propagados em células HeLa, mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cepa transgênica 2F1, que expressa constitutivamente β-galactosidase

citoplasmática foi gentilmente cedida pelo Dr. Vern Carruthers, University of Michigan Medical School, EUA.

### **3.9.4 Condições experimentais de tratamento e infecção *in vitro***

Após o cultivo de células HeLa em placas de 96 poços ( $2 \times 10^4$  células/poço/200 µL) em meio completo por 24 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, foram realizadas três condições experimentais:

#### **3.9.4.1. Pré-tratamento dos parasitos antes da infecção de células hospedeiras**

Taquizoítas 2F1 (RH) de *T. gondii* foram pré-tratados por 1 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> com diluições duplas seriadas da infusão de *A. annua* (2500 a 156 µg mL<sup>-1</sup>) obtida dos tratamentos sem silicato (T1 = 0 kg ha<sup>-1</sup>) ou com silicato (T3 = 400 kg ha<sup>-1</sup>) no solo ou com artemisinina pura (100 a 1,5 µg mL<sup>-1</sup>) ou com meio somente (controle). Em seguida, parasitos foram incubados com monocamadas de células HeLa em uma taxa de infecção de 3:1 (parasito:célula hospedeira) por 24 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A quantificação da proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico com β-galactosidase (JONES-BRANDO et al., 2006) descrito a seguir no item 3.9.5. Dois experimentos independentes foram realizados com quatro repetições para cada condição experimental.

#### **3.9.4.2. Tratamento das células hospedeiras após infecção parasitária**

As monocamadas de células HeLa foram lavadas com meio e infectadas com taquizoítas de *T. gondii* 2F1 (RH), com taxa de infecção de 3:1 (parasito:célula). Após 3 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram novamente lavadas para remover os parasitos não aderentes e, em seguida, tratadas com diluições duplas seriadas da infusão de *A. annua* (2500 a 156 µg mL<sup>-1</sup>) obtida dos tratamentos sem silicato (T1 = 0 kg ha<sup>-1</sup>) ou com silicato (T3 = 400 kg ha<sup>-1</sup>) no solo ou artemisinina pura (100 a 1,25 µg mL<sup>-1</sup>). Como controle, as células infectadas foram incubadas apenas com meio. Após 24 h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico com β-galactosidase (JONES-BRANDO et al., 2006) descrito a seguir no item 3.9.5. Dois experimentos independentes foram realizados com quatro repetições para cada condição experimental.

### **3.9.4.3. Tratamento das células hospedeiras simultaneamente à infecção parasitária**

As monocamadas de células HeLa foram lavadas com meio e infectadas com taquizoítas de *T. gondii* 2F1 (RH), com taxa de infecção de 3:1 (parasito:célula) e imediatamente tratadas com diluições duplas seriadas da infusão de *A. annua* (2500 a 156 µg mL<sup>-1</sup>) obtida dos tratamentos sem silicato (T1 = 0 kg ha<sup>-1</sup>) ou com silicato (T3 = 400 kg ha<sup>-1</sup>) no solo ou artemisinina pura (100 a 1,25 µg mL<sup>-1</sup>). Como controle, as células infectadas foram incubadas apenas com meio. Após 24 h de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico com β-galactosidase (JONES-BRANDO et al., 2006) descrito a seguir no item 3.9.5. Dois experimentos independentes foram realizados com quatro repetições para cada condição experimental.

### **3.9.5 Quantificação da proliferação intracelular parasitária**

A proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico com β-galactosidase (JONES-BRANDO et al., 2006). Em todas as condições experimentais de tratamento e infecção, foi preparada em paralelo uma curva de referência com diluições duplas seriadas de taquizoítas de *T. gondii* 2F1 (RH) variando de  $1 \times 10^6$  a  $15,625 \times 10^3$  parasitos em 100 µL de meio com 2% SFB. Após 24 h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as placas foram centrifugadas a 250 g durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e parasitos em excesso foram removidos das monocamadas por lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2) gelada. Logo após este procedimento, as células foram lisadas com 100 µL de tampão de lise gelado (HEPES a 100 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> a 1 mM, Triton X-100 a 0,1%, Ditiotreitol a 5 mM) por 15 minutos. Em seguida, foi removido o tampão de lise e adicionados 160 µL/poço de tampão de ensaio (tampão fosfato a 100 mM pH 7,3, β-mercaptoetanol a 102 mM e MgCl<sub>2</sub> a 9 mM) e 40 µL de CPRG (β-D-galactopiranosideo vermelho de clorofenol; Roche, Indianapolis, IN, EUA) a 3 mM foram adicionados. Após 30 min em temperatura ambiente no escuro, a atividade enzimática da β-galactosidase foi determinada a 570 nm em leitor de placas (Molecular Devices, Palo Alto, CA, EUA). Os resultados foram expressos como o número de taquizoítas calculados em relação à curva de referência com taquizoítas 2F1.

### **3.10 Análise estatística**

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Diferenças no conteúdo de macro e micronutrientes foram analisadas por ANOVA e pós-teste para tendência linear ou teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças estatísticas encontradas para a concentração de silício foliar, altura de planta, área dos tricomas glandulares, conteúdo de artemisinina e proliferação intracelular parasitária foram determinadas por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

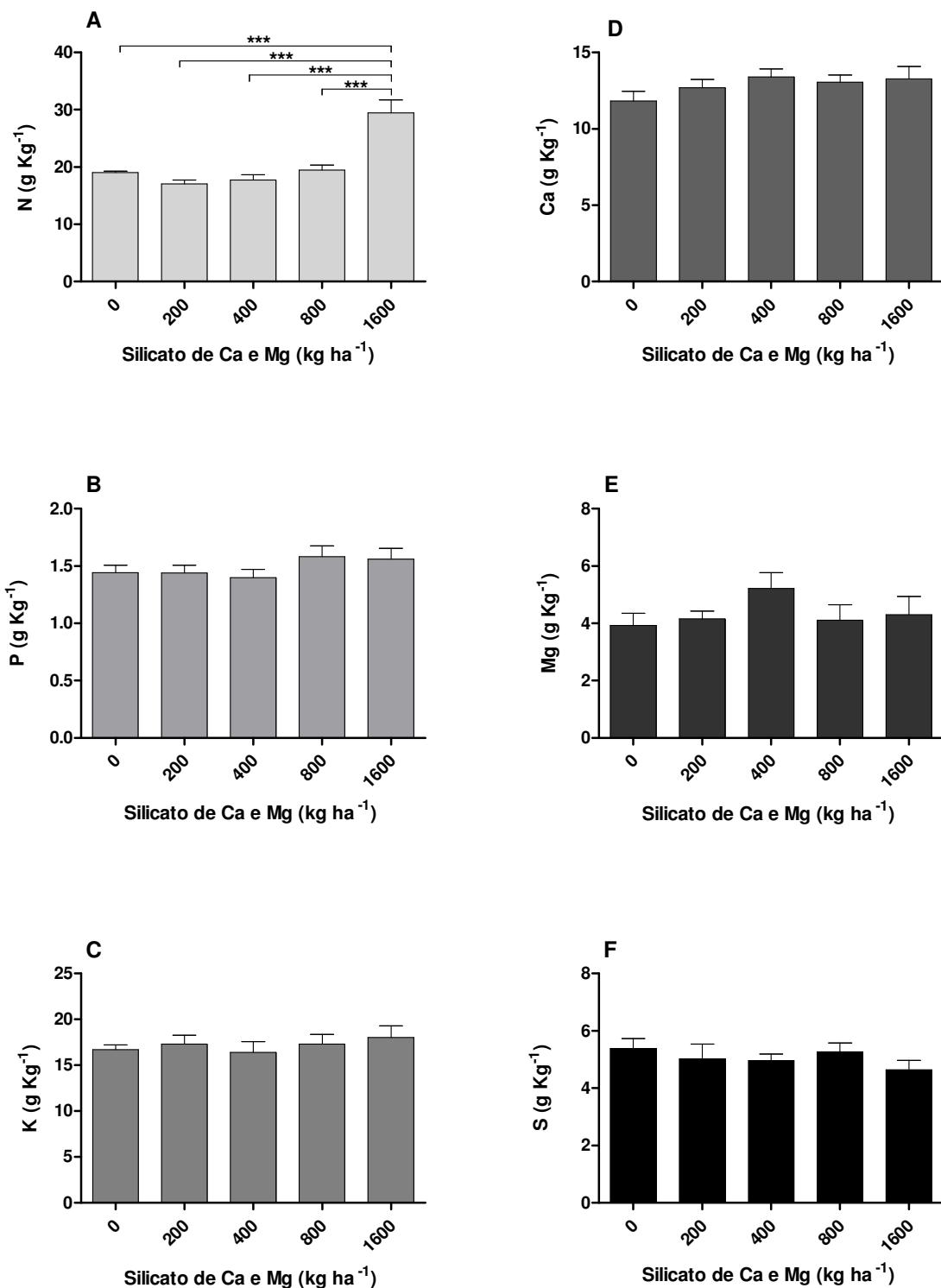
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Análise das características agronômicas: macro e micronutrientes, altura da planta e silício foliar**

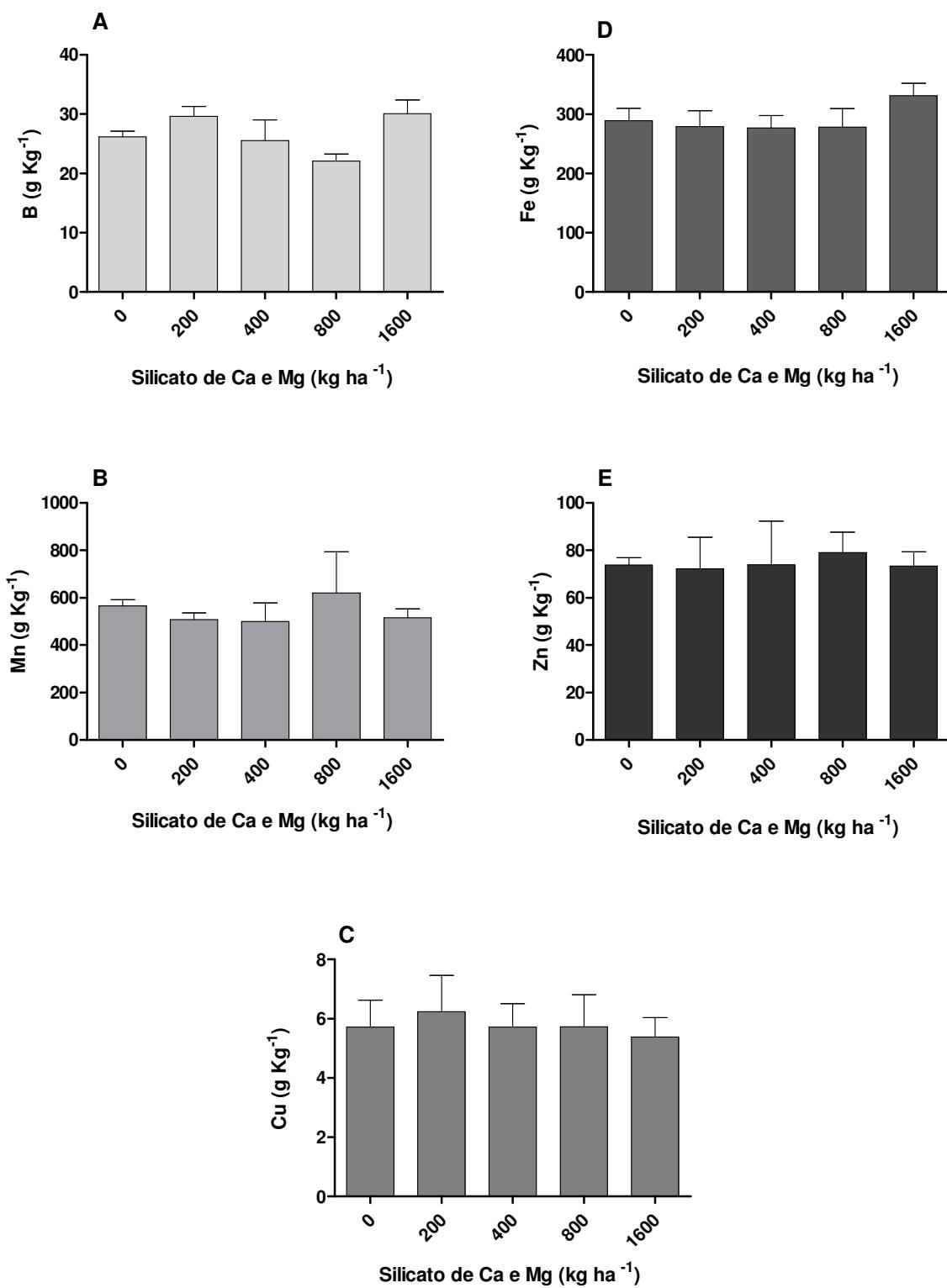
Na análise do teor de macronutrientes nas folhas de *A. annua* cultivadas com aplicação de diferentes dosagens de silicato no solo, o teor de nitrogênio aumentou apenas para a dosagem mais elevada de silicato ( $1600 \text{ kg ha}^{-1}$ ), em comparação com todos os outros tratamentos ( $p < 0,001$ ) (Fig. 1A). Os outros macronutrientes analisados (P, K, Ca, Mg e S) (Fig. 1), bem como todos os micronutrientes (B, Cu, Mn, Fe e Zn) (Fig. 2) não mostraram diferenças significativas para quaisquer das aplicações de silicato no solo.

A altura da planta não diferiu significativamente entre os tratamentos com aplicação de silicato em diferentes concentrações (Fig. 3A). Na análise do teor de silício foliar, foi observada uma tendência para maior teor de silício foliar com aplicação de  $400 \text{ kg ha}^{-1}$  de silicato no solo, embora sem significância estatística (Fig. 3B).

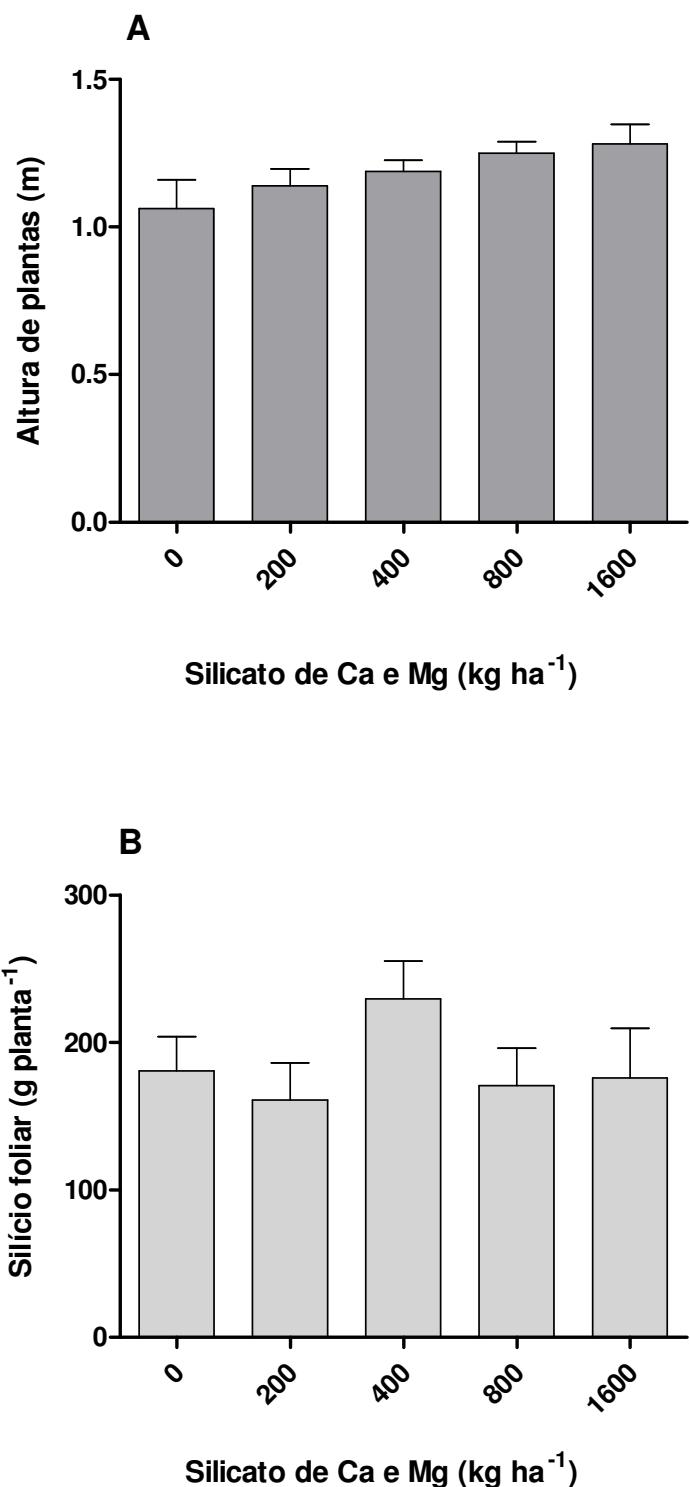
Após a aplicação de diferentes dosagens de silicato no solo, foi também realizada a análise de silício no solo (ANEXO 3). Foi observado um crescente aumento nos teores de silício no solo com as dosagens crescentes de silicato de cálcio e magnésio (0, 200, 400, 800 e  $1600 \text{ kg ha}^{-1}$ ).



**Fig. 1.** Teor de macronutrientes nas folhas de *Artemisia annua* após a aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo em diferentes dosagens (0, 200, 400, 800 e 1600 kg ha<sup>-1</sup>). (A) Nitrogênio (N), (B) Fósforo (P), (C) Potássio (K), (D) Cálcio (Ca), (E) Magnésio (Mg) e (F) Enxofre (S). As barras representam a média ± SEM de cinco repetições para cada condição experimental. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA e pós-teste para tendência linear e teste de comparação múltipla de Tukey (\*\*\*(p < 0,0001).



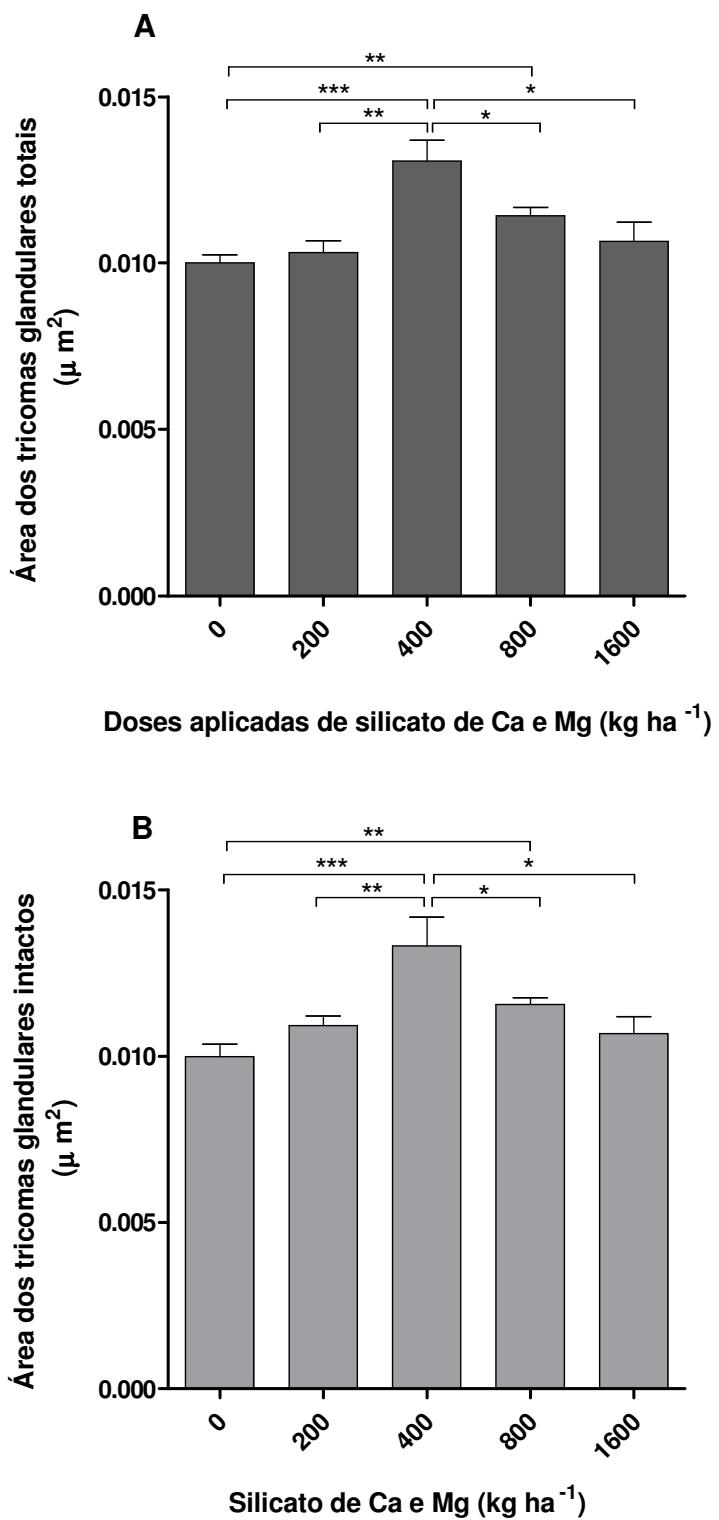
**Fig. 2.** Teor de micronutrientes nas folhas de *Artemisia annua* após a aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo em diferentes dosagens (0, 200, 400, 800 e 1600  $\text{kg ha}^{-1}$ ). (A) Boro (B), (B) Manganês (Mn), (C) Cobre (Cu), (D) Ferro (Fe) e (E) Zinco (Zn). As barras representam a média  $\pm$  SEM de cinco repetições para cada condição experimental. Não foram observadas diferenças estatísticas como determinado por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey.



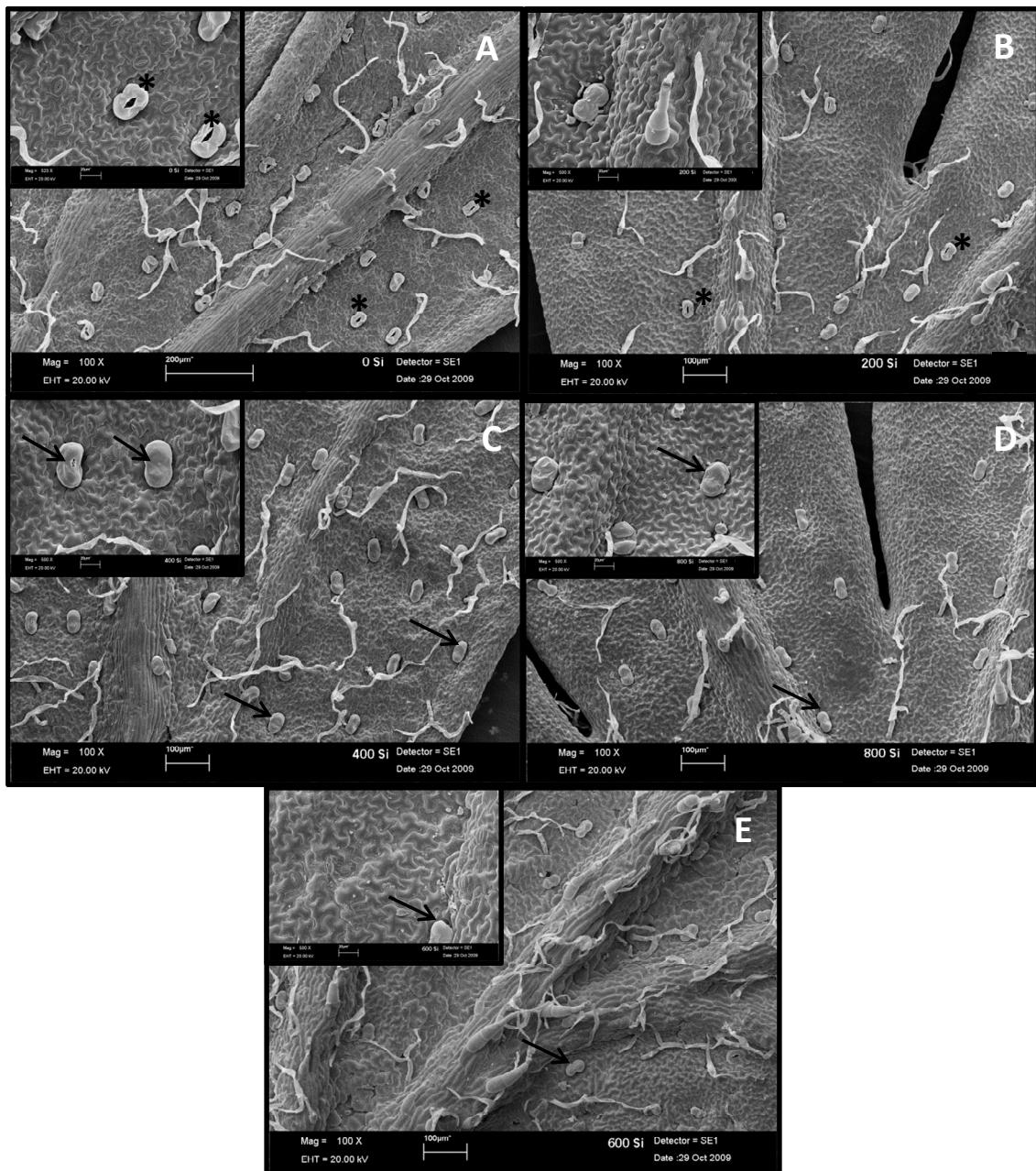
**Fig. 3.** Altura da planta (A) e teor de silício nas folhas (B) de *Artemisia annua* após a aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo em diferentes dosagens (0, 200, 400, 800 e 1600  $\text{kg ha}^{-1}$ ). As barras representam a média  $\pm$  SEM de cinco repetições para cada condição experimental. Não foram observadas diferenças estatísticas como determinado por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni.

#### **4.2 Análise dos tricomas glandulares totais e intactos**

Foi observado um aumento significativo na área de tricomas glandulares totais com aplicação de 400 e 800 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo, em comparação ao controle (sem silicato) ( $p < 0,01$ ) (Fig. 4A). Além disso, a maior área de tricomas glandulares totais foi verificada com a dosagem de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo (32,5 mg kg<sup>-1</sup> de silício) quando comparada a todos os outros tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Fig. 4A). Resultados semelhantes foram observados quando as áreas de tricomas glandulares intactos foram analisadas ( $p < 0,01$ ) (Fig. 4B). Estes resultados podem ser visualizados por microscopia eletrônica de varredura (Fig. 5), mostrando os tricomas glandulares rompidos (Fig. 5A, sem tratamento de silicato) e um número crescente de tricomas intactos ou não rompidos (Fig. 5B-E, 200-1600 kg ha<sup>-1</sup> de silicato), particularmente evidente para a aplicação de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo (Fig. 5C).



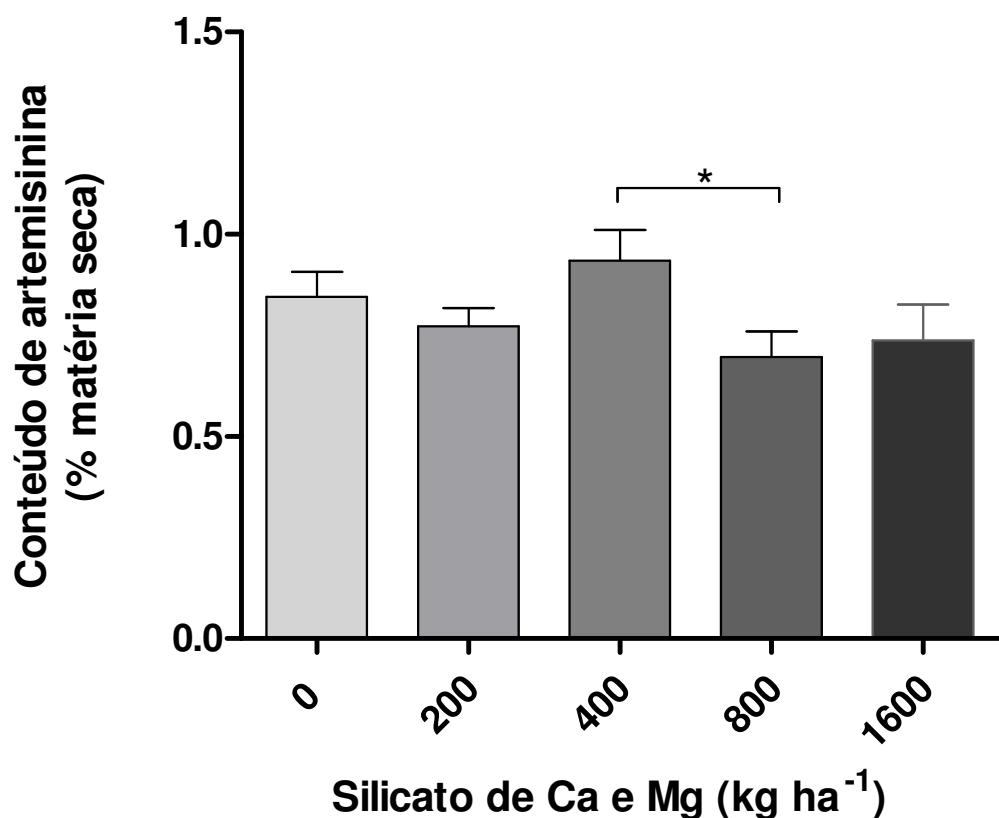
**Fig. 4.** Área dos tricomas glandulares totais (A) e intactos (B) de folhas de *Artemisia annua* após a aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo em diferentes dosagens (0, 200, 400, 800 e 1600  $\text{kg ha}^{-1}$ ). As barras representam a média  $\pm$  SEM de cinco repetições para cada condição experimental. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ).



**Fig. 5.** Fotomicrografia da superfície abaxial das folhas de *Artemisia annua* por microscopia eletrônica de varredura. As plantas foram cultivadas em solo sem aplicação de silicato (A) ou com 200 (B), 400 (C), 800 (D) e 1600 (E) kg ha<sup>-1</sup> de silicato de cálcio e magnésio no solo. Setas indicam tricomas glandulares intactos e asteriscos indicam tricomas glandulares rompidos. Painel A (ampliação de 100X; escala da barra de 200 µm). Painéis B-E (ampliação de 100X; escala da barra de 100 µm). Inserções no painel A (ampliação de 523X; escala da barra de 20 µm), painéis B-E (ampliação de 500X; escala da barra de 20 µm).

#### 4.3 Análise do teor de artemisinina

O teor de artemisinina em amostras de folhas de *A. annua* obtidas dos tratamentos com diferentes aplicações de silicato no solo foi avaliado por TLC. Foi observada uma tendência de maior concentração de artemisinina para o tratamento com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato, embora a significância estatística fosse encontrada apenas em comparação com a concentração de 800 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo (Fig. 6).

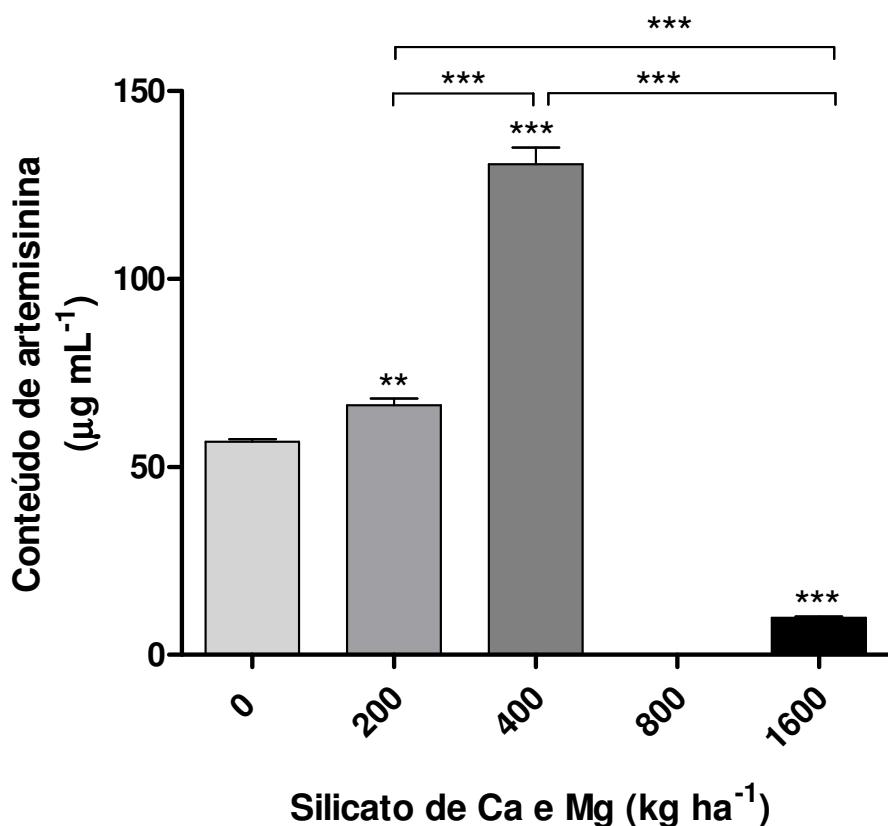


**Fig. 6.** Teor de artemisinina determinado por cromatografia de camada fina (TLC) em folhas de *Artemisia annua* cultivada em solo com aplicação de silicato de cálcio e magnésio em diferentes dosagens (0, 200, 400, 800 e 1600 kg ha<sup>-1</sup>). As barras representam a média ± SEM de cinco repetições para cada condição experimental. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ).

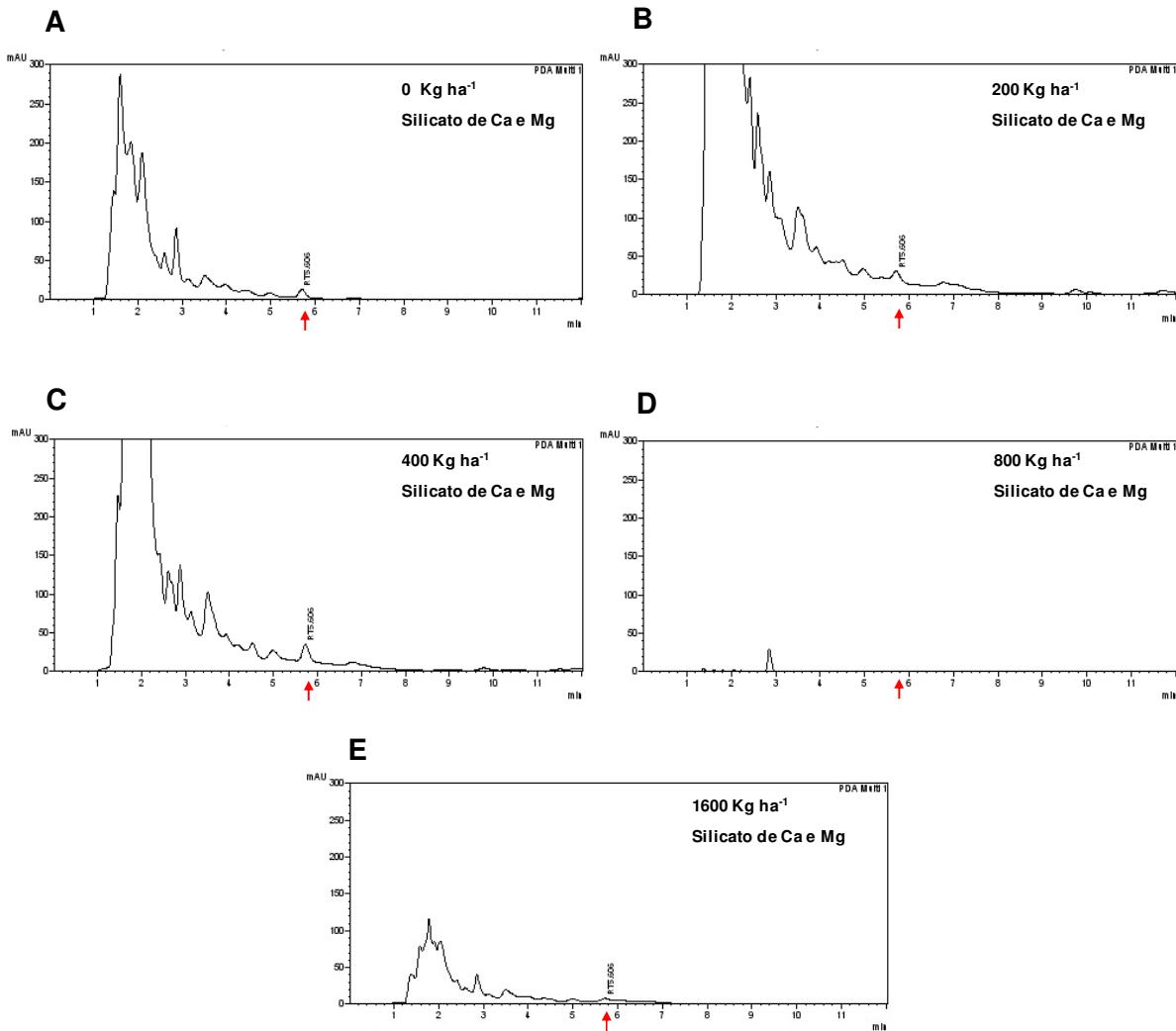
O teor de artemisinina em amostras de infusão de *A. annua* obtidas das diferentes aplicações de silicato no solo foi determinado por HPLC. As concentrações de artemisinina variaram de  $9,855 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $130,487 \mu\text{g mL}^{-1}$ , não sendo possível detectar artemisinina nas amostras obtidas para a concentração de  $800 \text{ kg ha}^{-1}$  de silicato no solo (Fig. 7).

As amostras obtidas da planta sem aplicação de silicato no solo apresentaram  $56,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  de artemisinina e valores crescentes foram detectados com  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de silicato no solo ( $66,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de artemisinina). O maior teor de artemisinina ( $130,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi detectado em amostras de folhas provenientes da aplicação de  $400 \text{ kg ha}^{-1}$  de silicato no solo ( $p < 0,01$ ).

Os cromatogramas obtidos mostrando o pico de artemisinina (5,7 min) em cada amostra de infusão estão ilustrados na Figura 8.



**Fig. 7.** Teor de artemisinina determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em amostras de infusão de *Artemisia annua* cultivada em solo com aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo em diferentes dosagens ( $0, 200, 400, 800$  e  $1600 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Diferenças significativas foram obtidas comparando-se com o controle ( $0 \text{ kg ha}^{-1}$  de silicato) ou quando indicado por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

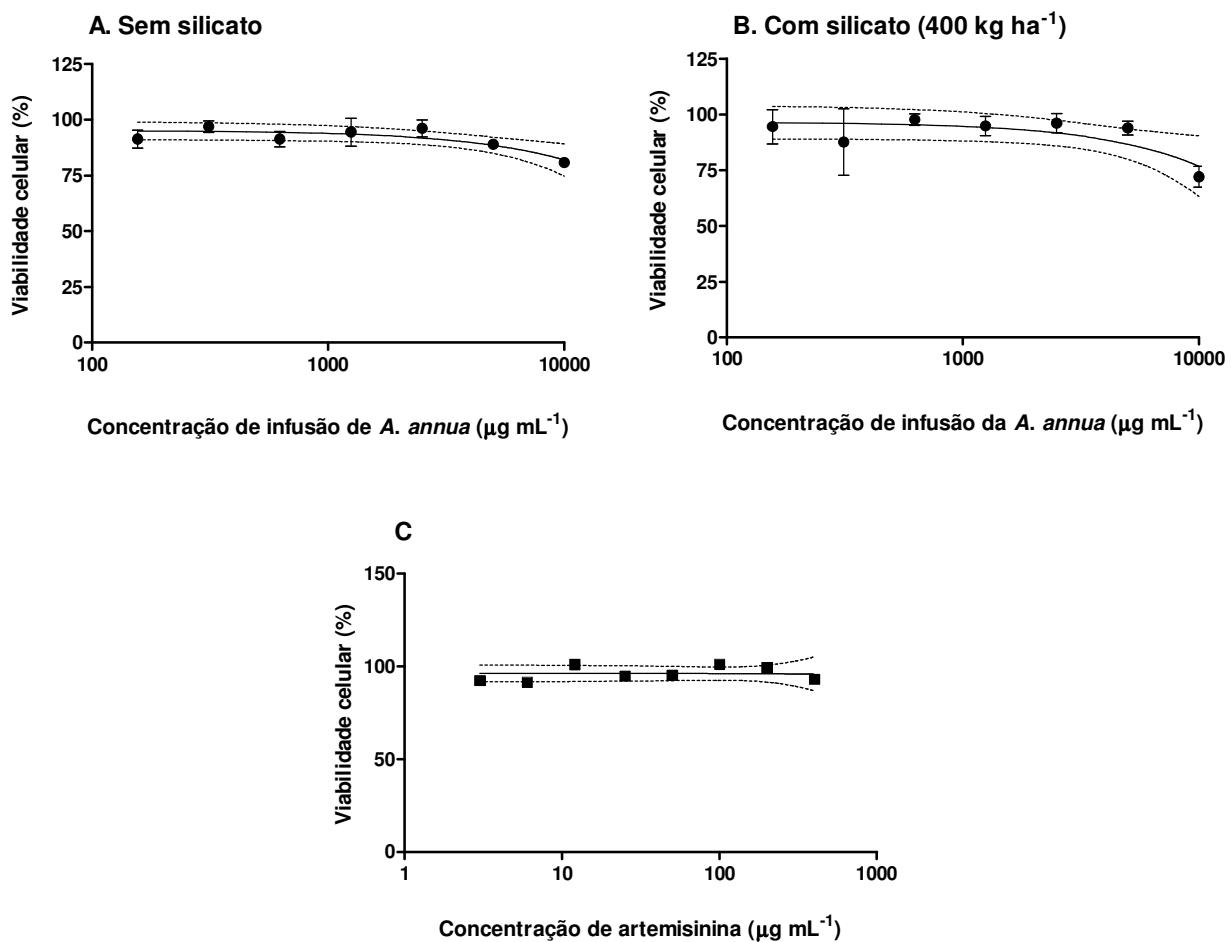


**Fig. 8.** Cromatogramas representativos da purificação de amostras de infusão de *Artemisia annua* cultivada em solo com aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo em diferentes dosagens, em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). (A) 0 kg ha<sup>-1</sup> de silicato; (B) 200 kg ha<sup>-1</sup> de silicato; (C) 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato; (D) 800 kg ha<sup>-1</sup> de silicato; (E) 1600 kg ha<sup>-1</sup> de silicato. Setas indicam o pico de artemisinina (5,7 min) de acordo com a curva de referência

#### **4.4 Análise de citotoxicidade das infusões de *A. annua* e artemisinina**

Considerando-se que o maior teor de artemisinina foi determinado por ambas as análises (TLC e HPLC) em amostras obtidas da aplicação de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo, foi avaliada a citotoxicidade das amostras de infusão de *A. annua* somente para aquelas obtidas com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato comparativamente a aquelas sem silicato no solo bem como à artemisinina pura. Foram utilizados ensaios de MTT a fim de estabelecer as concentrações ótimas a serem utilizadas nos experimentos de infecção por *T. gondii* *in vitro*.

A viabilidade celular foi superior a 90% para a artemisinina pura (Fig. 9C), 80% para a infusão obtida da planta sem aplicação de silicato no solo (Fig. 9A) e 70% para a infusão obtida com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato (Fig. 9B) em qualquer uma das concentrações analisadas. Visando a continuidade dos experimentos com infecção por *T. gondii* *in vitro*, as concentrações da infusão de *A. annua* que variaram de 156 a 2500 µg mL<sup>-1</sup> foram estabelecidas por corresponderem à viabilidade celular acima de 87%. Como controle, as concentrações de artemisinina pura variando de 1,25 a 100 µg mL<sup>-1</sup> foram estabelecidas, correspondendo à viabilidade celular acima de 90%.



**Fig. 9.** Ensaio de citotoxicidade determinado pelo ensaio de MTT. As células HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de infusão de *Artemisia annua* cultivada em solo sem silicato (A) ou com  $400 \text{ kg ha}^{-1}$  de silicato de cálcio e magnésio no solo (B), variando de  $156$  to  $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  por 24 horas. Em paralelo, células foram cultivadas na presença de artemisinina pura, variando de  $3$  a  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  (C) ou somente com meio de cultura (controle). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

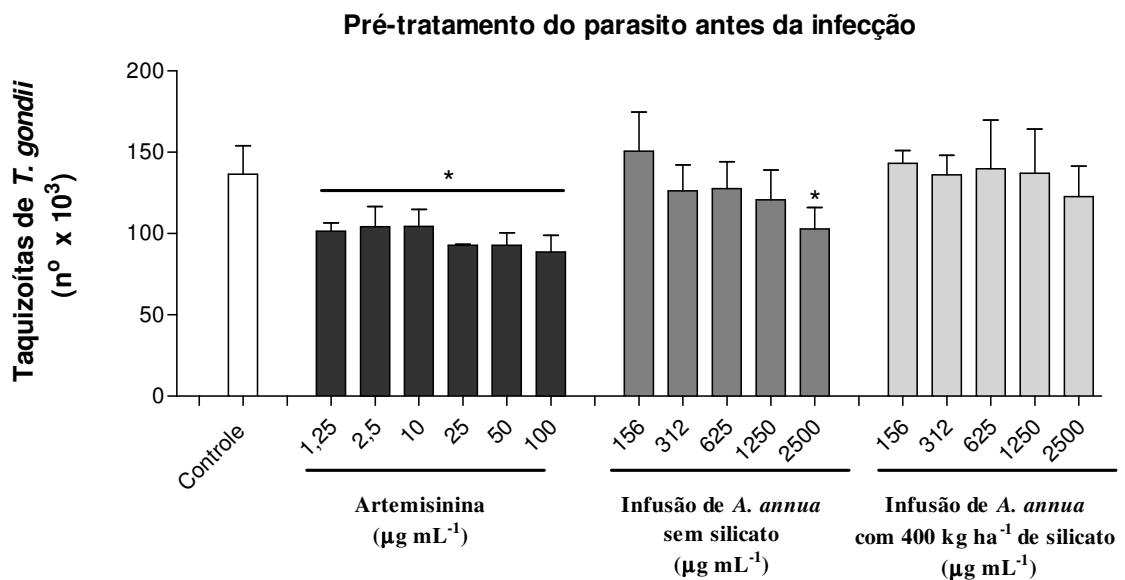
#### **4.5 Efeito da infusão de *A. annua* e artemisinina sobre a infecção por *Toxoplasma gondii* *in vitro***

Os efeitos das amostras de infusão de *A. annua* obtidas sem silicato e com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo, comparativamente à artemisinina pura, sobre a proliferação intracelular de *T. gondii* foram avaliados sob três condições experimentais (Figs. 10-12).

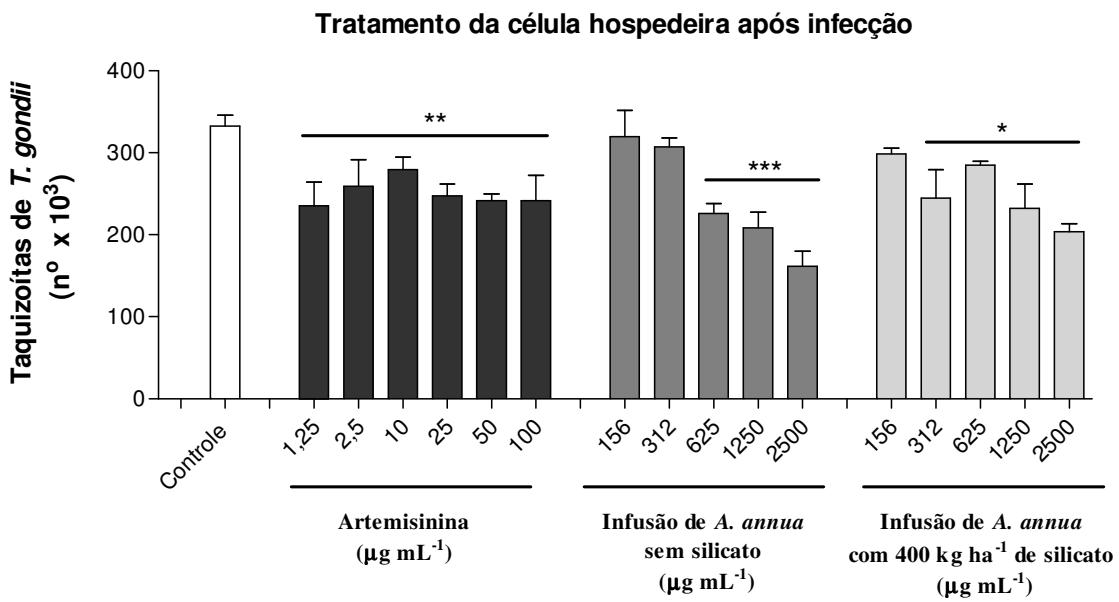
Em um primeiro experimento, foram analisados os efeitos dos tratamentos da infusão e artemisinina sobre o parasito antes da infecção da célula hospedeira (Fig. 10). As amostras de infusão obtidas sem aplicação de silicato no solo foram capazes de diminuir a proliferação parasitária apenas na concentração mais elevada (2500 µg mL<sup>-1</sup>) em relação ao controle infectado e não tratado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 10). Por outro lado, as amostras de infusão obtidas com aplicação de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato foram incapazes de alterar o crescimento do parasito em qualquer das concentrações analisadas. A proliferação intracelular do parasito foi diminuída pelo tratamento com artemisinina pura em todas as concentrações analisadas ( $p < 0,05$ ), embora sem resposta dependente da dose.

Em um segundo experimento, os efeitos dos tratamentos da infusão e artemisinina sobre a célula infectada com *T. gondii* foram analisados (Fig. 11). Os resultados mostraram que a proliferação intracelular parasitária foi reduzida de maneira dose-dependente para ambas as infusões com e sem silicato, a partir das concentrações de 312 e 625 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em relação ao controle infectado e não-tratado ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ). Mais uma vez, o tratamento com artemisinina também inibiu o crescimento do parasito ( $p < 0,01$ ), embora sem resposta dependente da dose.

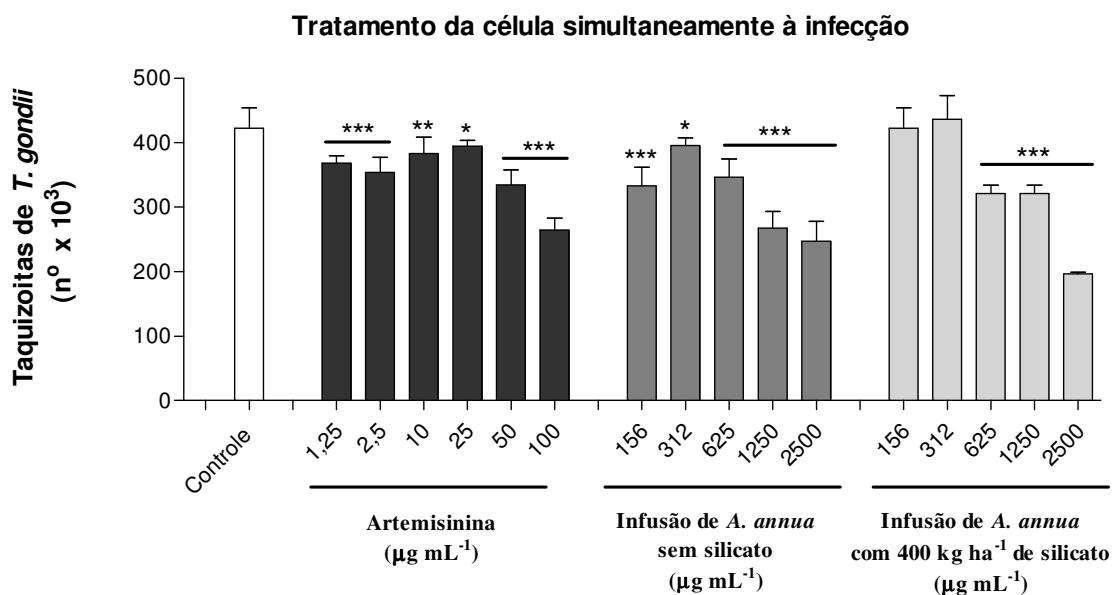
Em um terceiro experimento, os efeitos dos tratamentos da infusão e artemisinina sobre a célula simultaneamente à infecção foram investigados (Fig. 12). O tratamento com a infusão sem silicato foi capaz de diminuir a replicação do parasito em todas as concentrações analisadas em comparação ao controle infectado e não tratado, mas uma resposta dose-dependente foi observada somente a partir da concentração de 312 µg mL<sup>-1</sup> em diante ( $p < 0,001$ ). Para o tratamento da infusão com silicato, houve uma redução dose-dependente somente a partir da concentração de 625 µg mL<sup>-1</sup> ( $p < 0,001$ ). A artemisinina também reduziu o crescimento do parasito de forma dose-dependente em todas as concentrações analisadas ( $p < 0,001$ ).



**Fig. 10.** Quantificação da proliferação intracelular de *Toxoplasma gondii* (cepa 2F1 expressando  $\beta$ -galactosidase) por ensaio colorimétrico na condição experimental de pré-tratamento do parasito antes da infecção. Taquizoítas 2F1 foram pré-tratados por 1 hora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> com artemisinina (1,25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou infusão de *Artemisia annua* (156 a 2500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) cultivada sem silicato ou com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato de cálcio e magnésio no solo. Em seguida, taquizoítas foram incubados com monocamadas de células HeLa na proporção de 3:1 (parasito: célula hospedeira) por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase foi revelada pela adição do substrato CPRG e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em leitor de placas. Os dados foram expressos em média  $\pm$  SEM do número de taquizoítas em relação a uma curva de referência e são representativos de dois experimentos independentes realizados com quatro repetições.



**Fig. 11.** Quantificação da proliferação intracelular de *Toxoplasma gondii* (cepa 2F1 expressando  $\beta$ -galactosidase) por ensaio colorimétrico na condição experimental de tratamento das células hospedeiras após a infecção. Células HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e então infectadas com taquizoítas 2F1 na proporção de 3:1 (parasito: célula hospedeira) por 3 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após lavagem, as células foram tratadas com artemisinina (1,25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou infusão de *Artemisia annua* (156 a 2500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) cultivada sem silicato ou com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato de cálcio e magnésio no solo por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase foi revelada pela adição do substrato CPRG e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em leitor de placas. Os dados foram expressos em média  $\pm$  SEM do número de taquizoítas em relação a uma curva de referência e são representativos de dois experimentos independentes realizados com quatro repetições.



**Fig. 12.** Quantificação da proliferação intracelular de *Toxoplasma gondii* (cepa 2F1 expressando  $\beta$ -galactosidase) por ensaio colorimétrico na condição experimental de tratamento das células hospedeiras simultaneamente à infecção. Células HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então infectadas com taquizoítas 2F1 na proporção de 3:1 (parasito: célula hospedeira) e tratadas com artemisinina (1,25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou infusão de *Artemisia annua* (156 a 2500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) cultivada sem silicato ou com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato de cálcio e magnésio no solo por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase foi revelada pela adição do substrato CPRG e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em leitor de placas. Os dados foram expressos em média  $\pm$  SEM do número de taquizoítas em relação a uma curva de referência e são representativos de dois experimentos independentes realizados com quatro repetições.

## 5. DISCUSSÃO

Como os medicamentos aprovados para a prevenção e tratamento da toxoplasmose apresentam limitações em eficácia e podem ter vários efeitos adversos, há um interesse crescente na pesquisa de novas drogas antimicrobianas menos tóxicas aos humanos. Entre elas, destacam-se os produtos naturais de plantas com propriedades medicinais devido a sua ampla faixa de atividades biológicas (GEORGIEV, 1994; JONES-BRANDO et al., 2006). Neste contexto, foi avaliado no presente estudo o papel da infusão de *A. annua* obtida de plantas cultivadas em solo com aplicação de diferentes dosagens de silicato sobre o controle da infecção por *T. gondii* *in vitro*.

O efeito das diferentes dosagens de silicato no solo sobre o teor de macronutrientes nas folhas de *A. annua* foi verificado apenas para o nitrogênio, que mostrou quantidades aumentadas em amostras provenientes da maior dosagem de silicato no solo ( $1600 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Sabe-se que o nitrogênio é um importante componente de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, pigmentos, hormônios e muitos outros compostos (HÖRTENSTEINER; FELLER, 2001). Ferreira (2007), investigando o papel dos macronutrientes em folhas de *A. annua*, demonstrou que o nitrogênio foi o elemento mais importante enquanto que o potássio foi o menos requerido para o crescimento da planta e acúmulo de biomassa foliar. Em outro estudo similar, o nitrogênio foi aplicado ao solo e foi verificado um aumento na porcentagem de biomassa, óleos essenciais e teor de artemisinina (SINGH; LAI, 2001). No presente estudo, entretanto, o aumento no conteúdo de nitrogênio induzido pela maior dosagem de silicato no solo não teve influência na altura da planta bem como no teor de artemisinina. Além disso, Figueira (1996) verificou que o não fornecimento de macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) em quantidades adequadas à planta *A. annua*, limitou a produção de artemisinina e ácido artemisinílico. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a planta *A. annua* apresentou um crescimento adequado mesmo em condições de baixa fertilidade do solo, como determinado pela sua caracterização química inicial, e seu conteúdo do princípio ativo não foi significativamente afetado. Além disso, *A. annua* mostrou-se tolerante à acidez do solo.

O teor dos micronutrientes analisados (boro, cobre, manganês, ferro e zinco) também não foram significativamente alterados sob quaisquer aplicações de silicato no solo, mostrando que a cultura de *A. annua* possuía quantidades suficientes de micronutrientes para permitir o seu crescimento e desenvolvimento, bem como a produção de seus princípios

ativos. De acordo com esses resultados, estudos anteriores avaliando o teor de micronutrientes em *A. annua* verificaram que a quantidade de artemisinina nas plantas foi diminuída na falta de cobre e, especialmente, do boro (SRIVASTAVA; SHARMA, 1990). Além disso, plantas deficientes em boro não floresceram, levando a uma redução de 50% no teor de artemisinina (BRISIBE et al., 2008).

A altura da planta, bem como o teor de silício nas folhas de *A. annua*, não mostraram alterações significativas com as diferentes aplicações de silicato no solo, embora fosse observada uma tendência para resposta dose-dependente na altura das plantas e maior teor de silício foliar para a dosagem de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato aplicado ao solo. Estes resultados sugerem que possivelmente pode haver uma concentração ótima de silicato, acima da qual os efeitos benéficos da aplicação de silicato no solo não são observados para a *A. annua*. Neste estudo a dose ótima para *A. annua* foi de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato que corresponde a 32,5 mg kg<sup>-1</sup> de silício. A absorção de silício no solo também mostrou aumento dose-dependente com as dosagens crescentes de silicato no solo. Assim, o silício pode ser útil no cultivo de *A. annua* como ocorre em muitas outras espécies de plantas, através da proteção das plantas de vários fatores bióticos e abióticos, agindo como uma barreira de defesa física ou química (EPSTEIN, 2009).

Até o presente momento não há dados na literatura mostrando o efeito da aplicação de silicato no solo sobre os tricomas de *A. annua* ou quaisquer outras plantas medicinais. Estudos anteriores mostraram a deposição de silício na parede celular em folhas de trigo (RAFI et al. 1997). Os tricomas foram identificados por microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios-X, mostrando a localização de sílica agindo como uma barreira física (EPSTEIN, 2009). Como a artemisinina é armazenada nos tricomas glandulares das partes aéreas de *A. annua* (DUKE; PAUL, 1993; BALINT, 2001), é possível investigar o efeito de silício sobre o teor de artemisinina na análise ultraestrutural destas estruturas.

Os resultados mostraram que a aplicação de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato de cálcio e magnésio no solo induziu a maior área de tricomas glandulares totais que foi também relacionada com os tricomas glandulares intactos, como observado por microscopia eletrônica de varredura como tricomas fechados ou não-rompidos. Estes tricomas intactos provavelmente continham maior teor de artemisinina que os tricomas abertos ou rompidos, os quais foram encontrados em abundância nas folhas obtidas sem aplicação de silicato no solo. Estes resultados foram confirmados quando o teor de artemisinina em folhas e infusão de *A. annua* foram avaliados

por TLC e HPLC, respectivamente, mostrando que o tratamento com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo induziu o maior teor deste princípio ativo.

As propriedades de solubilidade da artemisinina tem sido tema de recentes questionamentos sobre a utilidade terapêutica das infusões de *A. annua* (CARBONARA et al., 2012). A artemisinina apresenta baixa solubilidade em água, labilidade em condições ácidas ou básicas e baixa estabilidade em solventes neutros, o que deve estar em mente na análise de seus efeitos terapêuticos em infusões de folhas de *A. annua* (CARBONARA et al., 2012). A baixa quantidade de artemisinina (0,1 a 1% em peso seco) na planta tem representado outro fator importante que questiona a utilização das infusões. No entanto, foi recentemente descrito que vários constituintes fenólicos como ácidos clorogênicos têm papel no aumento da solubilidade de artemisinina e eficiência da extração em preparações aquosas (CARBONARA et al., 2012).

No presente estudo, foi detectado um elevado teor de artemisinina em preparações aquosas de *A. annua*, mesmo quando a planta foi cultivada sem aplicação de silicato no solo (56,7 µg mL<sup>-1</sup> de artemisinina), e valores crescentes foram detectados com 200 kg ha<sup>-1</sup> (66,5 µg mL<sup>-1</sup> de artemisinina) e 400 kg ha<sup>-1</sup> (130,5 µg mL<sup>-1</sup> de artemisinina) de silicato, como determinado por HPLC. Estes resultados foram superiores aos encontrados por Mueller e colaboradores (2000) (24,5 µg mL<sup>-1</sup>) e Jansen (2006) (24,2 µg mL<sup>-1</sup>), utilizando preparação de infusão e métodos de análise semelhantes. Além disso, o tratamento com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo induziu um maior teor de artemisinina que aqueles previamente relatados sem aplicação de silicato no solo (94,0 µg mL<sup>-1</sup>) (MUELLER et al., 2004; RÄTH et al., 2004). Estes resultados mostram claramente uma grande variação no teor de artemisinina nas preparações de infusão das folhas, indicando que muitos fatores, tais como temperatura, tempo de contato, proporção de material e solvente, genética da planta, podem influenciar a solubilidade da artemisinina e seus subsequentes efeitos terapêuticos (VAN DER KOOY; VERPOORTE, 2011). Neste contexto, é provável que as preparações de infusão de *A. annua* obtidas com a aplicação de 1600 kg ha<sup>-1</sup> de silicato e, especialmente, com 800 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo podem ter sido afetadas por alguns desses fatores que influenciaram a solubilidade da artemisinina, resultando em seu baixo teor. Estes problemas não foram evidenciados para as amostras analisadas por TLC, uma vez que o teor de artemisinina foi determinado em folhas secas de *A. annua* e expresso em percentagem de peso seco, embora as amostras provenientes da aplicação de 800 kg ha<sup>-1</sup> de silicato mostraram um menor teor de

artemisinina em comparação com aquelas obtidas da aplicação de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo.

Embora o uso da infusão de *A. annua* não seja comum para controlar a toxoplasmose, comparativamente com a malária, utilizando medicamentos não convencionais, esta alternativa terapêutica foi pesquisada no controle da proliferação intracelular de *T. gondii*, visto que a capacidade para controlar a replicação dos taquizoítas pode ser útil no tratamento da toxoplasmose aguda primária ou na reativação de infecção crônica. Além disso, esta alternativa terapêutica utilizando a infusão de *A. annua* pode representar uma tentativa para prevenir um possível risco de resistência do protozoário que poderia ocorrer através da utilização de artemisinina pura como acontece na malária (PHYO et al., 2012).

Antes dos ensaios de proliferação parasitária, foi analisada a citotoxicidade das amostras de infusão de *A. annua* obtidas da aplicação com 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato no solo, pois mostraram o maior teor de artemisinina, comparativamente às amostras obtidas sem aplicação de silicato no solo e à artemisinina pura, utilizando-se ensaios de MTT. Como a viabilidade celular foi superior a 90% para a artemisinina pura e 70-80% para as amostras de infusão em todas as concentrações analisadas, foram selecionadas as concentrações variando de 156 a 2.500 µg mL<sup>-1</sup> para as infusões e de 1,25 a 100 µg mL<sup>-1</sup> para a artemisinina pura a serem utilizadas nos experimentos com tratamento e infecção de *T. gondii in vitro*.

O tratamento das células hospedeiras infectadas com as amostras de infusão de *A. annua* (obtidas das culturas com ou sem aplicação de silicato no solo) foi capaz de diminuir a proliferação intracelular do parasito de maneira dose-dependente, sugerindo assim pouca influência da aplicação de silicato no solo. No entanto, este efeito inibidor foi alcançado com doses mais baixas da infusão das plantas obtidas da aplicação de silicato em comparação com aquelas obtidas sem aplicação de silicato no solo. De modo semelhante, quando o tratamento das células hospedeiras com as amostras de infusão foi realizado simultaneamente à infecção, também houve inibição da proliferação de *T. gondii*, embora mais pronunciada para o tratamento com a infusão obtida sem aplicação de silicato no solo. Por outro lado, o pré-tratamento do parasito com as amostras de infusão antes da infecção mostrou-se menos eficaz no controle da proliferação de *T. gondii* para ambas as infusões (obtidas de plantas com e sem aplicação de silicato no solo). No entanto, apenas a concentração mais elevada da infusão obtida sem aplicação de silicato mostrou significativa redução da proliferação parasitária. Finalmente, a artemisinina pura foi capaz de diminuir a proliferação intracelular do parasito em todas as condições experimentais, de acordo com vários relatos anteriores.

Jones-Brando e colaboradores (2006) investigaram quatro derivados de artemisinina que apresentaram um aumento da atividade anti-*Toxoplasma* e uma diminuição da citotoxicidade em comparação com trimetoprim. Os derivativos sintéticos insaturados, conhecidos como carba artemisinina, também mostraram capacidade de inibir as várias etapas do ciclo lítico de *T. gondii*, emergendo como agentes terapêuticos para a prevenção e tratamento da toxoplasmose em seres humanos (D'ANGELO et al., 2009).

O mecanismo de ação da artemisinina no parasito da malária é devido à inibição da ATPase-cálcio do retículo endoplasmático do sarcoplasma (SERCA) (WOODROW et al., 2005). Entretanto, Nagamune e colaboradores (2007) avaliando mutantes derivados quimicamente de *T. gondii* que eram resistentes à inibição da proliferação por artemisinina *in vitro*, concluíram que a resistência não foi devida às alterações moleculares na expressão de SERCA, mas na indução da secreção de proteínas do micronema, um processo cálcio-dependente que é desencadeado pela artemisinina. Estes estudos sugerem uma homeostase do cálcio no mecanismo de ação de artemisinina contra os parasitas apicomplexas (NAGAMUNE et al., 2007). Sarciron e Gherardi (2000) sugeriram, por sua vez, uma indução da produção de IL-12 por macrófagos, indicando que ocorre ativação de mecanismos da imunidade celular inata no hospedeiro que podem contribuir para o controle da infecção por *T. gondii*.

O uso da infusão de *A. annua* em *T. gondii* foi demonstrado pela primeira vez em estudo prévio deste grupo, mostrando que a infusão da planta pode ser potencial alternativa terapêutica para controlar o crescimento do parasito em ambas as condições experimentais *in vitro* e *in vivo* (OLIVEIRA et al., 2009). No presente estudo, foi demonstrado que a aplicação de silicato no solo teve efeito positivo sobre as áreas de tricomas glandulares e, consequentemente, nos teores de artemisinina, mas este resultado não foi associado com uma melhor eficácia da infusão de folhas de *A. annua* cultivada com aplicação de silicato no solo sobre a replicação de *T. gondii*. Estes dados sugerem que outros componentes, além da artemisinina, poderiam contribuir para o efeito da infusão. Neste contexto, sabe-se que a infusão de *A. annua* é rica em compostos fenólicos antioxidantes (principalmente flavonóides), mas os níveis de artemisinina são mais baixos em tais chás (RÄTH et al., 2004). Como o conteúdo da artemisinina nas folhas de *A. annua* é cerca de 1%, questiona-se se todos os efeitos benéficos do chá tradicional de *A. annua* são atribuídos exclusivamente à artemisinina (FERREIRA et al., 2010a). Além disso, a infusão de *A. annua* contém outros

compostos como os flavonóides presentes em suas folhas que podem atuar em sinergia com a artemisinina, melhorando assim a sua eficácia (FERREIRA et al., 2010a).

Entre as vantagens da utilização da infusão de *A. annua* destaca-se a possibilidade de cada país produzir e preparar os seus próprios medicamentos a partir da planta, sem a necessidade de purificação, o que provoca a perda de outros compostos valiosos das plantas, como por exemplo, os flavonóides flavonas e cumarinas. Além desta vantagem, há dados na literatura mostrando que o teor de artemisinina no sangue é alto o suficiente após se beber o chá de *A. annua* (MUELLER et al., 2004; RÄTH et al., 2004; FERREIRA et al., 2010a).

## **6. CONCLUSÕES**

A aplicação de silicato de cálcio e magnésio no solo sobre as características agronômicas da planta *A. annua* foi benéfica, tendo a dosagem de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato resultado em aumento das áreas dos tricomas glandulares totais e intactos, significando maior capacidade de armazenamento de artemisinina e em maior teor de artemisinina em folhas e infusão de *A. annua*.

A planta *A. annua* absorveu e acumulou maiores quantidades de silício em sua parte aérea na dosagem de 400 kg ha<sup>-1</sup> de silicato de cálcio e magnésio aplicado ao solo.

A infusão de *A. annua* cultivada com aplicação de silicato de cálcio e magnésio teve pouca influência no controle da replicação de *T. gondii* em cultura celular, uma vez que ambas as infusões obtidas com ou sem aplicação de silicato foram capazes de reduzir significativamente a proliferação parasitária.

Outros compostos presentes na infusão de *A. annua*, especialmente os flavonóides, podem estar contribuindo para a eficácia da infusão de *A. annua* no controle da infecção por *T. gondii in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. Toxoplasmosis – Congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitology Today**, v.9, n.2, p.61-63, 1993.
- ARNON, D.I.; STOUT, P.R. The essentiality of certain elements in minute quantities for plants with species reference to copper. **Plant Physiology**, v.14, p. 371-375. 1939.
- BALINT, G.A. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. **Pharmacology and Therapeutics**, v.90, n.2-3, p.261-5, 2001.
- BARBOSA FILHO, M.P.; SNYDER, G.H.; FAGERIA, N.K.; DATNOFF, L.E. & SILVA, O.F. Silicato de cálcio como fonte de silicato para o arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 325-30, 2001.
- BÉLANGER, R. R.; BOWEN, P. A.; EHRET, D. L.; MENZIES, J. G. Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops. **Plant Disease**, v. 79, n.4, p. 329-336, 1995.
- BÉLANGER, R.R., BENHAMOU, N.; MENZIES, J.G. Cytological Evidence of an Active Role of Silicon in Wheat Resistance to Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). **Phytopathology**, v.93, n.4, p.402-12, 2003.
- BHAKUNI, R. S.; JAIN, D. C.; SHARMA, R. P.; Kumar, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. **Current Science**, Bangalore. v. 80, n. 1, p. 35-48, 2001.
- BILIA, A. R.; MELILLO DE MALGALHAES, P.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. F.. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine**, v.13, n.1, p. 487-93, 2006.
- BIRCHALL, J.D.; BELLIA, J.P.; ROBERTS, N.B. On the mechanisms underlying the essentiality of silicon – interactions with aluminium and copper. **Coordination Chemistry Reviews**, v.149, p.231-240, 1996.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 607-623, 2000.
- BOHNE, W.; GROSS, U.; HEESEMANN, J. Differentiation between mouse-virulent and-avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.6, p.1641-1643, 1993.

<sup>1</sup>SILVA, M. A.; PINHEIRO, M. S.; FREITAS, N. E. **Guia para normatização de trabalhos técnicos – científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses**. 2. ed., Uberlândia, EDUFU, p. 159, 2002.

BRISIBE, E.A.; UMOREN, U.E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P.M.; FERREIRA, J.F.S.; LUTHRIA, D.; WU, X.; PRIOR, R.L. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. **Food Chemistry**, v.115, p. 1240–1246, 2009.

BRISIBE, E.A., UYOH, E.A., BRISIBE, F., MAGALHÃES, P.M., FERREIRA, J.F.S. Review: Building a golden triangle for the production and use of artemisinin derivatives against *falciparum* malaria in Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4884-4896, 2008.

CARBONARA, T., PASCALE, R., ARGENTIERI, M. P., PAPADIA, P., FANIZZI, F. P., VILLANOVA, L., AVATO, P. Phytochemical analysis of a herbal tea from *Artemisia annua* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 62, p. 79– 86, 2012.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81. p. 111-122, 2002.

CHEN, J.; CALDWELL, R. D.; ROBINSON, C. A.; STEINKAMP, R. Silicon: the estranged medium element. Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, **University of Florida**, Bulletin, n. 34, 2000.

CORNELISSEN, J. H. C.; LAVOREL, S.; GARNIER, E.; DIAZ, S.; BUCHMANN, N.; GURVICH, D. E. ; REICH, P. B.; ter STEEGE, H.; MORGAN, H. D. ; van der HEIJDEN, M. G. A.; PAUSAS, J. G.; POORTER, H. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, v. 51, p. 335-380, 2003.

COVELLO, P.S.; TEOH, K.H.; POLICHUK, D.R.; REED, D.W. Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin. **Phytochemistry**. v. 68, p.1864–1871, 2007.

D'ANGELO, J.G., BORDÓN, C., POSNER, G.H., YOLKEN, R., JONES-BRANDO, L. Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii* in vitro at multiple steps in the lytic cycle. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 146–150, 2009.

DATNOFF, L. E.; RAID, R. N.; SNYDER, G. H. ; JONES, D. B. Effect of calcium silicate on blast and brown spot intensities and yields of rice. **Plant Disease**, v.75, n.7, p.729-732, 1991.

DATNOFF, L.E., SNYDER, G.H., KORNDÖRFER, G.H. Silicon in Agriculture. **Elsevier Science B.V.**, Amsterdam, 2001.

DATNOFF, L.E. Silicon and biotic stress. **Proceedings of The 5 th International Conference on Silicon in Agriculture**, Beijing, China, September 13-18, 2011.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; DUBREMETZ, J. F.; GEYER, H.; GEYER, R.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; SCHWARZ, R. T. Roles of Glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*: induction of tumor necrosis factor-a production in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.35, p. 32987-32993, 2003.

DELABAYS, N. Biologie de la reproduction chez l'*Artemisia annua* L. et génétique de la reproduction en Artemisinine. Ph. D Thesis, **University of Lausanne**, 1997.

DUBEY, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **Journal of Parasitology**, v. 8., p. 957-961, 1996.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.267-299, 1998.

DUBEY, J.P.; GOMEZ-MARIN, J.E.; BODOVA, A.; LORA, F.; VIANNA, M.C.; HILL, D.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K., MARCET, P.L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**. v.134, n.1-2, p. 67-72, 2005.

DUKE, S.O., PAUL, R.N. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. **International Journal Plant Science**, v. 154, p. 107-118, 1993.

ECKSTEIN-LUDWIG, U.; WEBB, R.; VAN GOETHEM, I.; I. D. A.; EAST, J. M.; ELLIOTT, C. L.; SNYDER, G. H. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 61, p.424- 957, 2003.

EMBRAPA, 1999. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes; organizador Fábio César da Silva. – **Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**, p.370.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA. v.91, p.11-17, 1994.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. **Editora Planta**, Londrina, p. 403, 2006.

EPSTEIN, E. Silicon: its manifold roles in plants. **Annals of Applied Biology**, p. 155–160, 2009.

FERREIRA, J. F. S.; JANICK, J. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 211-217, 1996.

FERREIRA, J.F. Artemisia Annua L.: the Hope Against Malaria and Cancer. **Proceedings of the 2nd Annual Symposium, Appalachian Opportunities, Medicinal and Aromatic Plants: Production, Business and Applications**, Mountain State University/USDA, ARS, Appalachian Farming Systems Research Center. p. 56–61, 2004.

FERREIRA, J. F.S. Nutrient Deficiency in the Production of Artemisinin, Dihydroartemisinic Acid, and Artemisinic Acid in *Artemisia annua* L. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 1686-1694, 2007.

FERREIRA, J.F.S., LUTHRIA, D.L., SASAKI, T., HEYERICK, A. Review: Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. **Molecules**, v.15, n.5, p. 3135-3170, 2010a.

FERREIRA, J. F. S.; SIMON, J. E.; JANICK, J. *Artemisia annua*: Botany, Horticulture, Pharmacology. **Horticultural Reviews**, Chapter 6, v. 19, 2010b.

FIGUEIRA, G.M. Mineral nutrition, production and artemisinin content in *Artemisia annua* L. **Acta Horticulture**, v.426, p. 573-577, 1996.

GEORGIEV, V. S. Management of toxoplasmosis. **Drugs**, v. 48, 179-188, 1994.

HENCKEN, C.P.; JONES-BRANDO, L.; BORDÓN, C.; STOHLER, R.; MOTT, B.T.; YOLKEN, R.; POSNER, G.H; WOODARD, L.E. Thiazole, oxadiazole, and carboxamide derivatives of artemisinin are highly selective and potent inhibitors of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 53, n. 9, p. 3594-601, 2010.

HILL, D.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 67-72, 2005.

HOLFELS, E.; McAULEY, J.; MACK, D.; MILHOUS, W. K.; McLEOD, R. In vitro effects of artemisinin ether, cycloguanil hydrochloride (alone and in combination with sulfadiazine), quinine sulfate, mefloquine, primaquine phosphate, trifluoperazine hychloride, and verapamil on *Toxoplasma gondii*. **American Society for Microbiology: antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1392- 1396, 1994.

HOFFMAN, F. M.; HILLSON, C. J. Effects of silicon on the life cycle of *Equisetum hyemale* L. **Botanical Gazette**, v.140, n.2, p.127-132, 1979.

HÖRTENSTEINER, S.; FELLER, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, n. 370, p. 927-937, 2001.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.1561-1566, 1995.

IIJIMA, Y; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; FRIDMAN, E.; GANG, D. R.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil.**Plant Physiology**, v. 136, p. 3724–3736, 2004.

JANSEN, F.H. The herbal tea approach for artemisinin as a therapy for malaria? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 285–286, 2006.

JONES-BRANDO, L., D'ANGELO, J., POSNER, G.H., YOLKEN, R. In vitro inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, 4206-4208, 2006.

LIMA FILHO, O.F.; LIMA, M.T.G.; TSAI, S.M. O silicato na agricultura. **Encarte Técnico – Informe Agronômico**, v. 87, p.1-7, 1999.

KARNOWSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137A, 1965.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura. 2 ed. Piracicaba. **Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária/ESALQ**, 1999.

KORNDÖRFER, G.H., COLOMBO, C.A.; RODRIGUES, L.L. Effect of thermo-phosphate as silicon source for sugarcane. **Inter-American Sugar Cane Seminar**, Miami, FL. p. 9-11, Sept., 1998.

KORNDÖRFER, G.H.; COELHO, N.M.; SNYDER, G.H.; MIZUTANI, C.T. Avaliação de métodos de extração de silicato para solos cultivados com arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.101-106, 1999.

KORNDÖRFER, G.H., PEREIRA, H.S., NOLA, A. Análise de silicato: solo, planta e fertilizante. Uberlândia: GPSi-ICIAG-UFG. **Boletim técnico**, v. 2, p. 34, 2004.

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

LANS, C.; TURNER, N.; KHAN, T.; BRAUER, G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. .148, n. 3-4, p. 325-340, Set. 2007.

LEE, M. R. Plants against malaria part 2: *Artemisia annua* (qinghaosu or the sweet wormwood). **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 32, n. 4, p. 300-305, 2002.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1285-1292, 2001.

LIU, K.C-S; YANG, S-L.; ROBERTS, M.F.; ELFORD, B.C.; PHILLIPSON, J.D. The contribution of flavonoids to the antimalarial activity of *Artemisia annua*. **Planta Medica**, v.55, p. 654–655, 1989.

LOMMEN, W.J.M.; ELZINGA, S.; VERSTAPPEN, F.W.A.; BOUWMEESTER, H.J. Artemisinin and sesquiterpene precursors in dead and green leaves of *Artemisia annua* L. crops. **Planta Medica**, v. 73, p. 1133-1139, 2007.

LOPES, F. M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; GONÇALVES, D. D.; FREIRE, R. L.; KARIGYO, C. J. T.; WEDY, G. F.; MATSUO, T.; REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.; CAPOBIANGO, J. D.; INOUE, I. T.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Factors associated with seropositivity for anti-Toxoplasma gondii antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 378-382, 2009.

LÜDER, C. G. K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GRO, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **International Journal for Parasitology**, v.33, p. 833-844, 2003.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infection Disease**, v. 15. p. 211-222, 1992.

MA, J. F.; YAMAJI, N.; MITANI-UENO, N. Transport of silicon from roots to panicles in plants. Review. **Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical and Biological Sciences**, v. 87, n.7, p.377-85, 2011.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in Plant Science**, v.11, n.8, 2006.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. **Silicon in Agriculture**, v. 8, p. 17–39, 2001.

MAGALHÃES, P.M. Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical. **Tese (Doutorado)** - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MAGALHÃES, P.M.; DELABAYS, N.; SARTORATTO, A. New hybrid lines of antimalarial species *Artemisia annua* L. In: Proceedings of the Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants. Gibreti G eds. **Acta Horticulture**, v. 502, p. 377-381, 1999.

MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. **Academic Press**, London, 1995.

MARCHESE, J. A. Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 97, 1999.

MATYCHENKOV, V.V.; PINSKLY, D.L.; BOCHARNIKOVA, Y.A. Influence of mechanical compaction of soils on the state and form of available silicon. **Eurasian Soil Science**, v.27, n.12, p.58- 67, 1995.

MONTPETIT, J.; VIVANCOS, J.; MITANI-UENO; N.; YAMAJI, N.; RÉMUS-BOREL, W.; BELZILE, F.; MA, J. F.; BÉLANGER, R. Cloning, functional characterization and heterologous expression of TaLsi1, a wheat silicon transporter gene. **Plant Molecular Biology**, v. 79, p. 35–46, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363. p. 1965-1976, 2004.

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**, v. 73, p. 487–493, 2000.

MUELLER, M.S.; RUNYAMBO, N.; WAGNER, I.; BORRMANN, S.; DIETZ, K.; HEIDE, L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 318-321, May. 2004.

MUTABINGWA, T. K. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): Best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy. **Acta Tropica**, 2005.

NAGAMUNE, K., MORENO, S.N. J., SIBLEY, L.D. Artemisinin-Resistant Mutants of *Toxoplasma gondii* Have Altered Calcium Homeostasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3816–3823, 2007.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. In: *Parasitologia Humana. Atheneu*, 9 ed., São Paulo, p. 524, 1995.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences**, v.147, p.763-766, 1908.

OLIVEIRA, T.C.; SILVA, D.A.O.; ROSTKOWSKA, C.; BÉLA, S.R.; FERRO, E. A.V.; MAGALHÃES, P.M.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii*: Effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**, v.122, n. 3, 233–241, 2009.

OLSSON, M.E.; OLOFSSON, L.M.; LINDAHL, A-L., LUNDGREN, A., BRODELIUS, M.; BRODELIUS, P.E. Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular trichomes of *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**. v.70, p. 1123–1128, 2009.

OU-YANG, K.; KRUG, E. C.; MARR, J. J.; BERENS, R. L. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* by qinghaosu and derivatives. **American Society for Microbiology: Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n.10, p. 1961-1965, 1990.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal Neonatal Medicine**, v.12, n. 3, p. 214-223, 2007.

PRAYGOD, G.; de FREY, A.; EISENHUT, M. Artemisinin derivatives versus quinine in treating severe malaria in children: a systematic review. **Malaria Journal**, v.7, p. 210–219, 2008.

PHYO, A.P.; NKHOMA, S.; STEPNEWSKA, K.; ASHLEY, E.A.; NAIR, S.; MCGREADY, R.; LER MOO, C.; AL-SAAI, S.; DONDORP, A.M.; LWIN, K.M.; SINGHASIVANON, P.; DAY, N.P.J.; WHITE, N.; ANDERSON, T.J.C.; NOSTEN, F. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. **The Lancet**, v. 379, n.9830, p. 1960 - 1966, 2012.

QUENNOZ, M., BASTIAN, C, SIMONNET, X., GROGG, A.F. Quantification of the total amount of artemisinin in leaf samples by thin layer chromatography. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 64, n. 10, p.755-757, 2010.

RAFI, M.M.; EPSTEIN, E.; FALK, R.H. Silicon deprivation causes physical abnormalities in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal Plant Physiology**, v.151, p.497-501, 1997.

RAO, K.V.; NARASU, M. L. Factors affecting artemisinin production. P.B. Kavi Kishor (Ed.), **Emerging Trends in Biotechnology**, Orient Longman, India, 1998.

RÄTH, K.; TAXIS, K.; WALZ, G.; GLEITER, C. H.; LI, S-M.; HEID, L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annuam wormwood). **American journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n.2 128-132, 2004.

RAVEN, J.A. The transport and function of silicon in plants. **Biological Reviews of Cambridge Philosophical Society**, v.58, p.179-207, 1983.

RHOTOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.77, p.371-377, 1993.

RIDLEY, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for malarial drugs. **Nature**, vol. 415, p. 686-6893, 2002.

RIDLEY, R. G. Malaria: To Kill a Parasite. **Nature**, vol. 424, p. 686-693, 2003.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, p.3-21, 2001.

SARCIRON, M. E.; SACCHARIN, C.; PETAVY, A. F.; PEYRON, F. Effects of artesunate, dihydroartemisinin, and an artesunate-dihydroartemisinin combination against *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 62, n. 1, p. 73-76, 2000.

SINGH, N. P.; LAI, H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. **Life Science**, v.70, p. 49-56, 2001.

SRIVASTAVA, N. K.; SHARMA, S. Influence of micronutrient imbalance on growth and artemisinin content of *Artemisia annua*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 225-227, 1990.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.1217-1258, 2000.

TEOH, K. H.; POLICHUK, D. R.; REED, D.W.; NOWAK, G.; COVELLO, P. S. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. **FEBS Letters**, v. 580, p. 1411-1416, 2006.

TESFAGIORGIS, H. B.; LAING, M. D. Effects of concentration, frequency of application and runoff of foliar-applied soluble silicon on powdery mildew of zucchini. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n.10, p. 2243-2248, 2011.

TISDALE, S. L.; W. J. NELSON; J. D. BEATON. Soil Fertility and Fertilizers. **Macmillan Publishing Company**, New York, 1993.

TOMAVO, S.; MARTINAGE, A.; DUBREMETZ, J. F. Phosphorylation of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Parasitology Research**, v. 78, p. 541-544, 1992.

WANG, S.Y.; GALLETTA, G.J. Foliar application of potassium silicate induces metabolic changes in strawberry plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 157-167, 1998.

WANG, J. X.; TANG, W.; YANG, Z. S.; WAN, J.; SHI, L. P.; ZHANG, Y.; ZHOU, R.; NI, J.; HOU, L.F.; ZHOU, Y.; HE, P. L.; YANG, I. F.; LI, Y.; ZUO, J. P. Suppressive effect of a novel water-soluble artemisinin derivative SM905 on T cell activation and proliferation in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 564, p. 211–218, 2007.

WERNER, D.; ROTH, R. Silica metabolism. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. **Encyclopedia of plant physiology, New Series, Berlin: Springer-Verlag**, v.15B, p.682-694, 1983.

WILLCOX, M.; FALQUET, J.; FERREIRA, J. F. S.; GILBERT, B.; HSU, E.; MELILLO de MAGALHÃES, P.; PLAIZIER-VERCARMEN, J.; SHARMA, V. P.; WRIGHT, C.W.; YAODE, W. *Artemisia annua* as a herbal tea for malaria. **The African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 1, p. 121-123, 2007.

WOODROW, C.J.; HAYNES, R.K.; KRISHNA, S. Artemisinins: Mechanism of action. **Postgraduate Medical Journal**, 81: 71-78, 2005.

VAN DER KOY, F., VERPOORTE, R. The Content of Artemisinin in the *Artemisia annua* Tea Infusion. **Planta Medica**, v. 77, p. 1754–1756, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimalarial drug combination therapy: report of a technical consultation. **WHO**, Geneva, 2001.

World Health Organization. WHO announces pharmaceutical companies agree to stop marketing single-drug artemisinin malaria pills. **WHO**, Geneva, 2006. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr23/en/print.html/>, (accessed on 1st July 2012).

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA  
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE SOLOS E CALCÁRIOS  
Av. Amazonas, s/nº - Bloco 4C Sala 102 - Campus Umuarama - Uberlândia - MG  
Fone; Fax (034) 3218-2225 Ramal 215 e-mail: labas@iuu.uberlândia.uol.com.br

### Laudo de Análise de Solo

Data 26/08/2009 Laudo N° 321/2009

Solicitante: PROF. GASPAR KORNDORFER  
Proprietário: CRISTINA ROSTKOWSKA  
Propriedade: CRISTINA ROSTKOWSKA  
Cod. Lab.: 1072/2009  
Amostra: 01

Município: UBERLÂNDIA - MG  
Telefone: ( ) -  
Convênio: PESQUISA  
Cultura:  
Talhão:

#### Resultados da Análise Química:

pH H <sub>2</sub> O 1 - 2,5	P meh-1 P rem. mg dm <sup>-3</sup>	P resina mg dm <sup>-3</sup>	Na <sup>+</sup> ns	K <sup>+</sup> ns	S-SO <sub>4</sub> 65	K <sup>+</sup> 8	Ca <sup>++</sup> 0,17	Mg <sup>++</sup> 0,1	Al <sup>++</sup> 0,1	H + Al 1,0	M.O. dag kg <sup>-3</sup> 3,3
4,4	3,4	ns	ns	ns	65	8	0,17	0,1	0,1	1,0	6,90
<b>Relação entre bases:</b>											
SB	V	m	%	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K	Ca/T	Mg/T	Na/T	K/T
0,37	1,37	7,27	73	1,0	0,6	0,6	1,2	1	1	ns	95
B	Cu	Fe	Mn	Zn	<b>Relação entre bases e T (%):</b>						
0,23	0,6	79	3,3	0,6	mg dm <sup>-3</sup>	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K	Ca/T	Mg/T

#### Observações:

ns - Não solicitado / SB - Soma de Bases / 1 - CTC efetiva / T - CTC a pH 7,0 /

V - Sat. Base / m - Sat. Alumínio,

P, K, Na - [HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125 mol L<sup>-1</sup>];

S-SO<sub>4</sub>=4 = [Fosfato Monobálico Cálcio 0,01 mol L<sup>-1</sup>];

Ca, Mg, Al - [KCl 1 mol L<sup>-1</sup>]; H + Al = [Solução Tampão SMPa pH 7,5];

M. O. - Método Colorimétrico;

B - [BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,125% à quente];

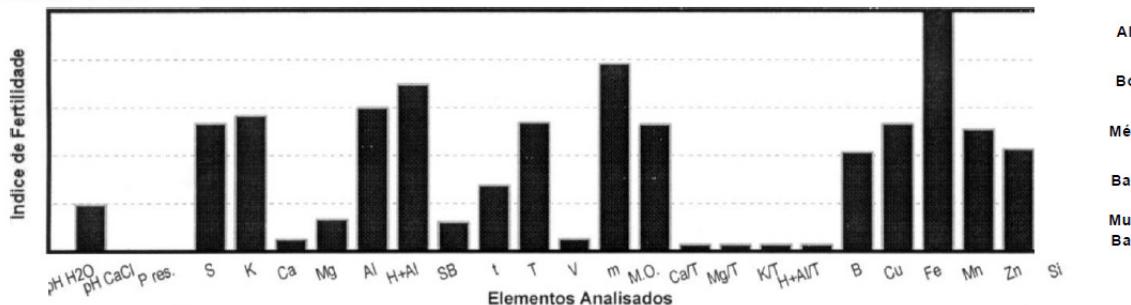
Cu, Fe, Mn, Zn - [DTPA 0,005 mol L<sup>-1</sup> + TEA 0,1 mol L<sup>-1</sup> + CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,3];

cmolc dm<sup>-3</sup> x 10 = mmolc dm<sup>-3</sup>; mg dm<sup>-3</sup> = ppm; dag kg<sup>-3</sup> = %

Níveis ideais de nutrientes no solo segundo Boletim de recomendação CFSEMG(1999). Obs: S-SO <sub>4</sub> , B, Cu, Fe, Mn, Zn fonte: Boletim Técnico 100, IAC (1997).								Argila	P meh "	P rem.	P meh "
pH Água		pH CaCl <sub>2</sub>	K <sup>+</sup>	S-SO <sub>4</sub>	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Al <sup>++</sup>	H+Al	SB	t	T
5,5-6,5		4,9-5,9	>80	>10	2,4-4,0	0,9 - 1,5	<0,2	<2,0	3,6-6,0	4,6 - 8,0	8,6-15,0
V		m	M.O.	P resina						15-35	15,1-20
60-80		<20	2,1 - 4,5	41 - 80						0-15	18,1-25

Argila	P meh "	P rem.	P meh "
60-100	4,1 - 6	0-4	6,1 - 9
4-10	8,5-12,5	4-10	8,5-12,5
10-19	11,5-17,5	10-19	11,5-17,5
19-30	15,9-24	19-30	15,9-24
30-44	29,1 - 33	30-44	29,1 - 33
44-60	30,1 - 60	44-60	30,1 - 60

#### Fertigrama do Solo:



#### Observações:

A interpretação de Al, H+Al, m e H+Al/T lê-se Alto e Muito Alto no lugar de Bom e Muito Bom  
Fertigrama apresentado como mera sugestão ilustrativa.

O laboratório não responsabiliza por interpretações dos resultados das análises.

Para recomendações de calagem e adubação, consulte um Engenheiro Agrônomo.

Este laudo não tem fins jurídicos.

Após noventa dias todas as amostras serão descartadas.

*J. Blumeyer*  
regina maria quintao lana  
Responsável Técnico  
CREA: 50.347/d

## ANEXO 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
LABORATÓRIO DE MANEJO DE SOLOS - LAMAS  
Av. Amazonas, s/n - Campus Umuarama; CP 593  
Bloco 2E, Sala 5 - Fone/Fax (034) 3218-2225 Ramal 234  
e-mail - [elias@ufu.br](mailto:elias@ufu.br)

PRODUTOR: CRISTINA ROSTKOWSKA

PROPRIADEADE: CRISTINA ROSTKOWSKA

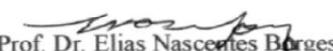
MUNICÍPIO: UBERLÂNDIA - MG

SOLICITANTE: PROF. GASPAR KORNDORFER

DATA: 25/08/09

IDENTIFICAÇÃO	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Classe Textural
PRODUTOR LABOR.	g		kg <sup>-1</sup>		XXXXXXXXXXXXXX
01	1072	72	26	252	650 MUITO ARGILOSA

Obs: Para obter textura em % basta dividir os resultados por 10. % = g<sup>-1</sup>/10

  
Prof. Dr. Elias Nascentes Borges

**Responsável Técnico**

**CREA 34425/D**

## ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

*INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - LAFER*

Grupo de Pesquisa "SILÍCIO NA AGRICULTURA"

Av. Amazonas, s/n.º - Bloco 4C sala 111

Caixa Postal: 593 38.400-902 - Uberlândia/MG - BRASIL

Fone: (034) 3218-2225 - Ramal 216 - E-mail: [laf@iciag.ufu.br](mailto:laf@iciag.ufu.br)



**SOLICITANTE:** Cristina / UFU

**LOCAL:** Uberlândia - MG

**IDENTIFICAÇÃO:** Experimento Artemísia

**DATA ENTRADA:** 18/08/2009

**IDENTIFICAÇÃO ARQUIVO:** C#(07623-07627)

**DATA SAÍDA:** 20/08/2009

**ANALISTA:** Giovanna viola

### ANÁLISE DE SILÍCIO NO SOLO

#	#LAFER	IDENTIFICAÇÃO AMOSTRA	PROFUN DIDADE	Faz/Município	Si CaCl <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
1	7623	Am 2C	-	UFU /Uberlândia MG	7,8
2	7624	Am 3C	-	UFU /Uberlândia MG	37,1
3	7625	Am 4C	-	UFU /Uberlândia MG	32,5
4	7626	Am 5C	-	UFU /Uberlândia MG	41,7
5	7627	Am 6C	-	UFU /Uberlândia MG	49,1

**OBSERVAÇÕES:** Valores de Si no solo < 6-8 mg dm<sup>-3</sup> indicam que pode haver resposta à aplicação de adubos contendo Si para cana-de-açúcar.

Sem mais para o momento,  
Atenciosamente,

Prof. Dr. Gaspar H. Korndörfer  
Grupo de Pesq. Silício na Agricultura - LAFER/ICIAG/UFU