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

ASPECTOS FARMACOGNÓSTICOS
DE
Mikania smilacina DC

VICENTE DE OLIVEIRA FERRO

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. FERNANDO DE OLIVEIRA

São Paulo
1991

Aos meus pais

Ao PROF. DR. FERNANDO DE OLIVEIRA, meu agradecimento pela orientação científica, confiança e incentivo, fatores importantes para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A PROFa. DRA. ELIZABETH IGNE FERREIRA colaboradora em todas as horas, pelo auxílio e valiosas sugestões na revisão do texto, pela amizade e pelo constante apoio, fundamentais para minha formação e crescimento.

Ao PROF. DR. SEIZI OGA, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela colaboração e auxílio durante a realização dos ensaios farmacológicos apresentados neste trabalho.

Ao PROF. DR. WOLFGANG F. SEIDEL, pela amizade e ajuda oferecida por ocasião da interpretação dos dados químicos deste trabalho.

A PROFa. DRA. TAKAKO SAITO, por sua colaboração prestada na realização dos ensaios microbiológicos efetuados em seu laboratório, juntamente com os colegas de Pós-graduação.

A DRA. MARIA INÊS DE ALMEIDA GONÇALVES, pela amizade e pelo auxílio na realização e interpretação dos espectros apresentados.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela obtenção dos espectros de massa e de ^{13}C .

A PROFa. DRA. AURA KAMIGUTI, do Instituto Butantan de São Paulo, pelo auxílio prestado para realização dos ensaios de atividade anticoagulante.

Ao PROF. DR. ANTONIO ALTAIR MAGALHÃES OLIVEIRA, pela colaboração no oferecimento dos recursos de microscopia para obtenção e confecção das fotografias que ilustram este trabalho.

A SRA. AURILUCE MISSIANO DE OLIVEIRA, pelo profissionalismo e pela ajuda na fase de preparação deste trabalho em computador.

Aos professores e funcionários do setor de Farmacognosia, especialmente à IRACI DE OLIVEIRA e LIGIA M. T. GODOY, pela colaboração nas práticas de laboratório.

A bibliotecária INÊS M. M. IMPERATRIZ, pela revisão das referências bibliográficas e normalização das mesmas.

A SRTA. ELAINE DE SOUZA NASCIMENTO, pela colaboração na fase experimental deste trabalho em laboratório de química.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

CAPÍTULO I

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Generalidades	1
1.2- Objetivos	2

CAPÍTULO II

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1- Aspectos botânicos	4
2.1.1- Considerações Gerais	4
2.1.2- Posição taxonômica da espécie <i>Mikania smilacina</i> DC	5
2.1.3- Descrição da família	6
2.1.4- Descrição do gênero	7
2.1.5- Descrição original da espécie	7
2.1.6- Características microscópicas da família e do gênero	8
2.1.6.1- Caracteres anatômicos da família <i>Compositae</i> Gaertner.	8
2.1.6.2- Caracteres anatômicos do gênero <i>Mikania</i> Willdenow	9
2.2- Aspectos químicos.....	9
2.3- Aspectos farmacológicos	15

CAPÍTULO III

3- MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1-Material	16
3.1.1- Material destinado ao estudo morfológico	16
3.1.1.1- Material de herbário	16
3.1.1.2- Material destinado a uso em laboratório de botânica	17
3.1.1.3- Material destinado a estudo químico e farmacológico	18

3.2- Métodos	19
3.2.1- Métodos utilizados no estudo botânico	19
3.2.2- Métodos utilizados no estudo químico	20
3.2.2.1- Reações genéricas de identificação	20
3.2.2.2- Isolamento dos componentes químicos	21
3.2.2.3- Análise das frações em cromatografia em camada delgada	23
3.2.2.4- Caracterização cromatográfica dos extratos fluidos	26
3.2.2.5- Quantificação de cumarina no extrato fluido de <i>Mikania smilacina</i> DC	27
3.2.2.6- Determinação do teor de óleo essencial na planta fresca	28
3.2.2.7- Análise das substâncias isoladas	28
3.2.3- Métodos utilizados nos estudos farmacológicos	29
3.2.3.1- Atividade antibacteriana	29
3.2.3.2- Toxicidade subaguda	29
3.2.3.3- Atividade anticoagulante	30
3.2.3.4- Atividade antiinflamatória	31

CAPÍTULO IV

4- RESULTADOS	32
4.1- Botânica	32
4.1.1- Caracterização macroscópica de <i>Mikania smilacina</i> DC	32
4.1.2- Morfologia interna da folha	34
4.1.3- Estudo da região do limbo propriamente dito	36
4.1.4- Estudo do pecíolo	38
4.1.5- Anatomia do caule	41
4.1.6- Anatomia do capítulo floral	44
4.2- Química	54
4.2.1- Reações genéricas de identificação	54
4.2.2- Extrato hexânico	55
4.2.2.1- Análise da fração 30-35	56
4.2.2.2- Análise da fração 37-40	59
4.2.2.3- Análise da fração 45-48	62
4.2.3- Análise cromatográfica do extrato fluido	64
4.2.4- Determinação quantitativa de cumarina no extrato fluido	66
4.2.5- Análise do óleo essencial	68

4.3- Farmacologia	83
4.3.1- Atividade anticoagulante	83
4.3.2- Toxicidade subaguda	84
4.3.3- Atividade antimicrobiana	86
4.3.4- Atividade antiinflamatória	87

CAPÍTULO V

5- DISCUSSÃO	88
5.1- BOTÂNICA	88
5.1.1- Considerações gerais	88
5.1.2- Morfologia externa e anatomia de <i>Mikania smilacina</i> DC	89
5.2- Química	92
5.2.1- Reações genéricas de identificação	92
5.2.2- Análise do extrato hexânico	93
5.2.3- Análise cromatográfica do extrato fluido e quantificação de cumarina	97
5.2.4- Óleo essencial	98
5.3- Farmacologia	100
5.3.1- Atividade anticoagulante	100
5.3.2- Toxicidade subaguda	100
5.3.3- Atividade antimicrobiana	100
5.3.4- Atividade antiinflamatória	101
6 - CONCLUSÕES	102
7 - RESUMO	104
8 - SUMMARY	105
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

CAPÍTULO I

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Generalidades

Em maio de 1978, através da resolução WHO nº 3133, aprovada na XXXL Assembléia Geral, a Organização Mundial da Saúde, OMS, órgão das Nações Unidas, determinou o início de um programa mundial com o fim de avaliar e utilizar os métodos da medicina popular. Nesta reunião, ressaltou-se a grande importância do estudo das plantas medicinais, adotando-se como uma das metas prioritárias, a saúde para todos até o ano 2000.

Os medicamentos industrializados apresentam como principal obstáculo o alto custo tanto para o consumidor individual como para as entidades previdenciárias. As plantas medicinais ou as drogas vegetais, em função do custo mais baixo, poderiam estar ao alcance de todos.

Entre as plantas medicinais, o gênero *Mikania* Willdenow, tem contribuído com muitas espécies de importância relevante. Este gênero, pertencente a família *Compositae* Gaertner, foi criado por Willdenow e tem suas espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais das Américas. No Brasil, ocorrem pelo menos 150 espécies das 300 pertencentes a este taxon no mundo.

O primeiro autor a se preocupar mais efetivamente com a organização de *Mikania* Willdenow foi Baker (1), ao estudar as espécies brasileiras deste gênero para a Flora Brasiliensis de Martius. Este autor divide as micânias em três seções, baseando-se no tipo de inflorescência

Robinson, em 1922 (68) e Barroso, em 1960 (3), estudaram igualmente o gênero *Mikania* Willdenow, dividindo-o em seções. As micânias, do ponto de vista, utilitário, gozam de grande prestígio como plantas medicinais. Segundo Cruz e Liberalli (22), a grande maioria, das espécies deste gênero, em especial as denominadas de guaco, é empregada em terapêutica popular. Outro fato não menos importante é a observação de Cattorini(17,18), segundo o qual desconhecem-se efeitos indesejáveis decorrentes do uso dos

guacos. Embora as espécies de *Mikania* Willdenow denominadas de guaco gozem de grande prestígio tanto na medicina popular como na medicina oficial, a maioria de suas espécies não foi estudada do ponto de vista do seu uso medicinal.

Mikania smilacina DC, vulgarmente denominada de guaco-de sete-sangrias, é utilizada como planta medicinal nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Espírito Santo (65).

No sul de Minas Gerais, especialmente na região de Poços de Caldas e no norte de São Paulo, região de Ribeirão Preto, é empregada no tratamento de hipertensão arterial, no tratamento de urticária e como antiinflamatório buco-dentário (64). Nos Estados de Espírito Santo e Goiás costuma ser empregada com maior frequência como diurético e como anti-hipertensivo. Em todas estas localidades a parte empregada são as folhas, com as quais se preparam infusos ou decoctos.

A utilização deste vegetal continua ainda sendo totalmente empírica. Há carência de trabalhos que tratem de sua atividade farmacodinâmica, de sua composição química e de sua caracterização farmacobotânica.

1.2 - Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos estudar a espécie *Mikania smilacina* DC, sobre os seguintes aspectos:

1. Caracterização morfo-histológica da droga.
2. Isolamento e identificação de constituintes químicos do vegetal.
3. Caracterização cromatográfica da droga e do extrato fluido.
4. Quantificação da cumarina na droga e no extrato fluido.
5. Atividade antimicrobiana do extrato e do ácido caurenóico obtido da droga.
6. Verificação da toxicidade subaguda, da atividade anticoagulante e atividade antiinflamatória.

CAPÍTULO II

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para maior facilidade de exposição e melhor entendimento, este capítulo foi dividido em três subcapítulos, a saber: aspectos botânicos, aspectos químicos, aspectos farmacodinâmicos e usos.

2.1 - Aspectos botânicos

2.1.1. Considerações gerais

A família *Compositae* Gaertner, também denominada de *Asteraceae*, a qual pertence a espécie *Mikania smilacina* DC possui cerca de 1100 gêneros e aproximadamente 25000 espécies (4,46). Esta família de plantas apresenta ampla distribuição geográfica, sendo bem representada nas regiões tropicais, sub-tropicais e temperadas do mundo. Apresenta grande número de espécies com propriedades medicinais, entre as quais se destacam :

Matricaria chamomila L., *Chrysanthemum parthenium* Bernhardt, *Tannacetum vulgare* L., *Artemisia absinthium* L., *Arnica montana* L., *Inula elenium* L., *Tagetes minuta* L., *Calendula officinalis* L., *Arthium lappa* L., *Cynara scolymus* L., *Sylibum marianus* Gaertner, *Achillea millefolium* L., *Cichorium intybus* L. e *Taraxacum officinalis* Weber (25).

O Brasil é bastante rico em espécies medicinais de *Compositae* Gaertner. Neste particular merece realce o gênero *Mikania* Willdenow, ao qual pertencem, diversas espécies de guaco (65), entre elas : *Mikania hirsutissima* DC, o cipó cabeludo, e *Mikania glomerata* Sprengel, o guaco comum, ambas encontradas na Farmacopéia Brasileira 1º edição.

2.1.2. Posição taxonômica da espécie *Mikania smilacina* DC

Mikania smilacina DC possui a seguinte classificação taxonômica de acordo com o sistema de Hutchinson (1969):

DIVISÃO : *MAGNOLIOPHYTA* Cronquist, Takhtajan e Zimmermann.

CLASSE 1: *MAGNOLIOPSIDA*

SUB-CLASSE 6 : *ASTERIDAE*

ORDEM 11 : *ASTERALES*

FAMÍLIA 1 *COMPOSITAE* Gaertner (*ASTERACEAE*) (4)

J. Gaertner, *Fruct et Sem.*, 2 (3): 353. 1791

Compositiflorae

SUBFAMILIA

TRIBO: *EUPATORIAE* Cassini

A. H. G. Cassini, *J. Physiol*, 88 :202,1818.

SUBTRIBO: *EUPATORIINAE* Wagenitz

G. Wagenitz, in Melchior, *Engler Syllab Pflanzenf*

ed. 12. 2 : 1964, p. 487

GÊNERO *Mikania* Willdenow

Sp. Pl. ed 4 3 (7): 1742. 1803.

SECÇÃO *GLOBOSAE* ROBINSON

B.L. Robinson Contr. Gray Herb. Cambridge 21: 216 1922.

ESPÉCIE *Mikania smilacina* DC

Prodr. 5: 192. 1836

2.1.3 Descrição da Família

A família *Compositae* é constituída de espécies vegetais de hábito muito variado. Apresenta grande número de espécies herbáceas e subarborescentes e número reduzido de árvores. Plantas trepadeiras ocorrem também com certa frequência. Porém, a grande maioria dos gêneros, cerca de 95%, é constituída de plantas de pequeno porte. Laticíferos ocorrem em alguns gêneros. As folhas apresentam também bastante variação. Podem ser inteiras, lobadas, fendidas, dessecadas, simples ou compostas e de disposição alterna ou oposta. As flores aparecem caracteristicamente reunidas em capítulos. Apresentam um ou muitos planos de simetria, podendo ser hermafroditas ou apresentar sexos separados. As flores são pentâmeras, apresentando geralmente o cálice profundamente modificado, ou seja, transformado no papus, formação que favorece a disseminação do fruto pelo vento. O papo, papus ou papilho pode ser piloso, paleáceo, formado por pequenas cerdas, transformado em aristas ou ainda ser bem reduzido. A corola é pentâmera, provida de cinco lacínias iguais ou então ligulada ou bilabiada. O androceu é isostemone com cinco estames, sinantereo com anteras introrsas e filetes epipétalos. O ovário é infero, bicarpelar, unilocular, provido de um único óvulo. O estilete, freqüentemente provido de anel de pêlo logo abaixo da bifurcação estigmática, geralmente se abre em estigma bífido. O estilete atravessa o tubo formado pelo conjunto constituído pelas anteras. O fruto é seco indeiscente, do tipo aquênio, adaptado à dispersão pelo vento, provido de uma única semente, presa em um só ponto.

Os capítulos podem apresentar somente flores liguladas, somente flores tubulosas ou ambas. Podem ser hermafroditas ou unissexuadas.

2.1.4 Descrição do Gênero

Plantas eretas, decumbentes ou volúveis, involúcro constituído de 4 brácteas involucrais, flores hermafroditas, 4 em cada capítulo ; corola com tubo e limbo bem delimitado, de formas variadas ; ramos do estilete longos, mais ou menos crassos, subulados, papilosos, com exceção de *Mikania divaricata*, onde esta parte do gineceu é cilíndrica, aguda e hirsuta ; aquênio com 5 arestas, truncado no ápice; papus uniseriado, de cerdas providas de filamentos, com exceção de *Mikania parodii* que as apresenta como elementos lineares, lisos.

As espécies subarborescentes eretas distinguem-se das do gênero *Kanimia*, justamente pelo aquênio, que nestas é provido de 8 a 10 arestas.

2.1.5 Descrição original da espécie *Mikania smilacina* DC Prodr. 5 : 192. 1836

Volubilis glaberrima, ramis striatis, foliis breviter petiolatis ovali-lanceolatis callose-acuminatis rigidis integerrimis basi 5-7 nerviis caeterim reticulatis, panícula terminali distanter et opposita ramosa, ramis apice capitula congesta sessilia gerentibus, invol. squamis ovalibus obtusis, bracteoli squamis simili in Brasiliae prov. Minarum General legit cl. Vauthier (pl. exs. n. 290). Petiol. 5 lin. longus Limb. fol. 3 1/2 poll. longus, 15 lin. latus. Capit 8-10 arete congesta, 3 lin longa Pappus albus crassus (v.s. comm. à cl. inv.)

2.1.6 Características microscópicas da Família e do Gênero

2.1.6.1 Caracteres anatômicos da Família *Compositae* Gaertner

A família *Compositae*, constituída principalmente por plantas de porte herbáceo, esta localizada entre as famílias mais evoluídas filogeneticamente que se conhece. Do ponto de vista da anatomia vegetal, esta família de plantas caracteriza-se por apresentar caules com estrutura eustélica e feixes vasculares do tipo colateral aberto. As raízes geralmente apresentam pequeno número de arcos de xilema. Tanto os órgãos reprodutivos como os vegetativos, apresentam com frequência, canais secretores. A presença de canais secretores, junto à endoderme, em raízes de plantas pertencentes à família *Compositae* é citada como freqüente por Tetley(76). No caule, canais secretores podem aparecer tanto na região cortical como na região da medula. Hoehne *et al* (44) descrevem a presença de canais secretores de origem endodérmica em *Calea pinnatifida* Banks. Miyake (57) confirma a presença deste tipo de estrutura no vegetal citado. Células esclerosadas podem estar presentes tanto na região cortical de caules como na de raízes. Grotta (32,33), menciona a presença de células pétreas de parede pouco espessada na região cortical de *Achyrocline satureoides* DC. Scavone(72) encontrou células esclerenquimáticas na região cortical de *Senecio brasiliensis* Lessing var. *tripartitus* Baker.

As espécies de *Compositae* Gaertner pertencentes à subfamília *Liguliflorae* apresentam com bastante frequência laticíferos. Pêlos glandulares bisseriados com geralmente oito células ocorrem freqüentemente na família *Compositae* sendo por isto chamados de pêlos glandulares de Compostas. Outro tipo de tricoma freqüente nas compostas são os pêlos tectores flageliformes.

2.1.6.2 Caracteres anatômicos do gênero *Mikania* Willdenow.

Metcalf e Chalk (53), referindo-se aos caracteres da família *Compositae* Baker, não incluíram o gênero *Mikania* Willdenow entre os gêneros descritos. O gênero *Mikania* Willdenow possui espécies trepadoras e espécies erectas. As espécies estudadas por Oliveira (65) apresentam todas estruturas eustéllicas com feixe vascular colateral aberto. Nas espécies estudadas por este autor, não foi observada a presença de cristais de oxalato de cálcio.

A presença de anel esclerenquimático na região cortical do caule foi assinalada em *Mikania hirsutissima* DC (64). Um conjunto de células esclerenquimáticas foi, por outro lado, observado tanto em *Mikania glomerata* Sprengel como em *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker.

Em todas as espécies de *Mikania* Willdenow estudadas por Oliveira (65), observou-se a presença de canais secretores tanto em órgãos reprodutivos como em órgãos vegetativos. A presença de pêlos tectores longos pluricelulares e unisseriados constitui característica importante na diagnose de *Mikania hirsutissima* DC. Também, a presença de pêlo glandular, de pêlos glandulares curvos providos de pedicelo unisseriado com duas a cinco células e glândula unicelular foi observada em quase todas as espécies de *Mikania* estudadas por Oliveira (65). Este tipo de pêlo glandular algumas vezes se localiza em depressões existentes na epiderme.

2.2 Aspectos químicos.

Cerca de 35 espécies desse gênero foram investigadas sob o ponto de vista químico. Nelas foram encontradas lactonas sesquiterpênicas do tipo germacranolídeo e altas concentrações de diterpenos, principalmente derivados de cauranos, pimaranos e labdanos.

Apresentamos, a seguir, levantamento da bibliografia do gênero *Mikania*, salientando os principais componentes químicos presentes em cada espécie.

Mikania alvimii K et R (1982) (Brasil) (7)(70)

Diterpenos, norditerpenos, ent-labdano, gama-humuleno, beta-selineno, isocomeno, beta-isocomeno, fitol, timol, derivado de rudbeckianona, cromona, ácido pimarênico, linolenoato de metila.

Mikania amara Baker (1984) (Brasil) (74)

Álcoois alifáticos, aldeídos e ácidos, *p*-cimeno, timol.

Mikania arrojadoi Mattf. (1982) (Brasil) (8)

Germacreno D, isocomeno, beta-isocomeno, ent-caurenos.

Mikania banisteriae DC (1985) (Costa Rica) (14)

Ent-caur-16-en-18-al, 18-acetoxi-ent-caureno, 18-hidroxi-16 alfa, 17 epoxi-ent-caurano, 4 beta, 19 epoxi-18-nor-ent-caureno.

Mikania batatifolia DC (1969) (USA) (41)

Flavona, batatifolina, 4,5,6,7-tetraidroxi-3-metoxi-flavona.

Mikania belemii K et R (1981) (Peru) (11)

Cariofileno, alfa-humuleno, gurjuneno.

Mikania congesta DC (1985) (Peru) (39)

Lactonas sesquiterpênicas, escopoletina, geranilnerol, *O*-geranilescopoletina, ácido 9,16-dioxooctadece-10,12,14,

-trienólico.

Mikania cordata Burm. f. BL Robinson (1978) (Asia) (6)

Micanina (flavona), epifriedelinol, ácido fumárico, micanolídeo, diidromicanolídeo, estigmasterol, friedelina, glicose e frutose.

Mikania cordifolia Willd. (1989) (Costa Rica) (15)

Germacranolídeos, lactonas sesquiterpênicas e melampolídeos.

Mikania diversifolia DC (1984) (Brasil) (80)

Diterpenos, ác. caurenóico, fredelina, lupeol, estigmasterol.

Mikania cynanchifolia Hook et Arn. (1984) (Brasil) (12)

Lactonas sesquiterpênicas, micanolídeo, miscandenina.

Mikania glomerata Sprengel (1984) (Brasil) (66)

Diterpenos, ácido caurenóico, ácido cinamoilgrandiflórico, cumarina, estigmasterol.

Mikania goyazensis BL Robins K et R (1982) (Brasil) (9)

Germacreno D, desacetil-laurenobiólido, sitosterol, estigmasterol, lup-12-en-3-beta-ol, ácidos linoléico e linolênico, isocomeno, beta-isocomeno, fitol, geranilnerol, 16-hidroxigeranilgeraniol, germacranolídeos, eudesmanolídeo, lactona dimérica.

Mikania grazielae K et R (1982) (Brasil) (10)

Lactonas sesquiterpênicas, germacranolídeos, 2α acetoxieupatolídeo, α -acetoxilaurenobiolideo, α copaeno, longifoleno, aloaromadendreno, cariofileno, germacreno D, α -humuleno, esqualeno, fitol, espatulenol, lup-12-en-3-beta-ol, estigmasterol, ácido oleanólico, naringenina e o respectivo éster metílico.

Mikania guaco Hum. et Bonpl (1986) (Costa Rica) (16)

quatro eudesmanolídeos.

Mikania hirsutissima DC (1977) (Brasil) (56)

Flavonóis, ácido caurenólico.

Mikania hoehnei Robinson (1984) (Brasil) (80)

Triterpenos, lupeol, estigmasterol.

Mikania holwayana BL Robins (1989) (Costa Rica) (15)

Germacranolídeos, lactonas sesquiterpênicas e melampolídeos.

Mikania laevigata Schultz Bip ex Baker (1984) (Brasil) (66)(75).

Diterpenos, ácido caurenólico, cinamoilgrandiflórico, cumarina, estigmasterol.

Mikania luetzelburgii Mattf (1981) (Brasil) (11)

Germacreno D, acetato de lupeila

Mikania micrantha H B K (1975) (Panamá) (43)

Terpenóides, ácido caur-15-en-19-óico, cauren-16-beta-ol, taraxasterol, germacradienolídeos, micanolídeo, diidromicanolídeo, desoximicanolídeo e miscandenina.

Mikania monagasensis DC (1975) (Venezuela) (51)

Micanolídeo, diidromicanolídeo, caur-16-en-19-óico, beta/ pineno, acetato de lupeila, beta sitosterol.

Mikania mongenansis DC (1973) (Venezuela) (50)

Terpenos, ácido caurenóico, diidromicanolídeo.

Mikania oblongifolia DC (1977) (Brasil) (79)

ácido cinamoilgrandiflórico, éster diterpênico.

Mikania officinalis Mart (1981) (Brasil) (11)

Gama-humuleno, esqualeno, fitol, geranilinalol, geranilnerol.

Mikania periplocifolia Hook et Arn (1985) (Argentina) (34)

Micanolídeo, miscandenina, geranilnerol, desoximicanolídeo, escandenolídeo, 3-beta-idroxisabelina.

Mikania pohlii Baker K et R (1982) (Brasil) (9)

Lactonas sesquiterpênicas, germacranolídeos, eudesmanolídeos,
germacranolídeos diméricos, geranilgeraniol.

Mikania purpurascens Sch Bip ex Baker (1982) (Brasil) (8)

Timol, germacreno D, 12-hidroxinerolidol, flavanona, purpurascenolídeo.

Mikania pyramidata Dorm. Smith (1978) (Equador) (6)

Caurenos, labdanos, germacranolídeos, diterpenos, lactonas sesquiterpênicas.

Mikania scandens L Willd (1986) (USA) (40)(42)

Micanolídeo, diidromicanolídeo, escandenolídeo, diidroescan-denolídeo, desoximicanolídeo, miscandenina.

Mikania sessilifolia DC (1981) (Brasil) (11)

Germacreno D, *alfa*-humuleno, esqualeno, ent-caurenos, diterpenos.

Mikania shushunensis Holmes Mc Daniel (1988) (Peru) (35)

Timol, bisabolol, herniarina, criptomerion, 2,6 dimetoxiquinona.

Mikania triangularis Baker (1986) (Brasil) (47)

Diterpenos pimaradiênicos, friedelina, estigmasterol, metil-ent-pimara 9(11), 15-dien-19-ato, ent-pimara-9(11), 15-dien-19-ol, ent-pimara-9(11), 15 dien, metil-ent-pimara-9(11) en-19-ato.

Mikania urticifolia Hook et Arn (1988) (Argentina) (36)

Micanolídeo, desoximicanolídeo, miscandenina, anidroescandeno-lídeo, geranilnerol.

Mikania vitifolia DC (1986) (Costa Rica) (16)

Guaianolídeos, lactonas sesquiterpênicas, ácido ent-caurênico.

2.3 Aspectos farmacológicos

Harborne(38), em seu livro "Introdução à ecologia bioquímica", descreve vários aspectos químicos relacionados à interação entre as espécies vegetais e o ambiente, representados principalmente por um grupo enorme de substâncias isoladas e quimicamente definidas. Estas substâncias nada mais são que produtos derivados do metabolismo secundário das plantas (28). O autor apresenta estudo ligado aos princípios ativos e sua importância como mediadores de relações com o ambiente. Inúmeras outras informações sobre aspecto químico aparecem em outras obras, mas há poucos trabalhos farmacológicos que comprovam convenientemente a eficácia de tais substâncias.

Muitas espécies do gênero *Mikania* são utilizadas de forma empírica por seus efeitos curativos destacando-se entre outros os usos como diurético, antiinflamatório, expectorante, anti-hipertensivo, antitussígeno. Segundo Cattorini(18), diversas aplicações terapêuticas são relatadas para micânias. *Mikania glomerata* Sprengel é usada como tônico amargo, febrífugo, anti-helmíntico, emenagogo. Age ainda sobre o sistema respiratório, sendo empregada na forma de decocto para inflamações da garganta (55) *Mikania cordifolia* Willd.(15) é utilizada contra reumatismo e é muito popular no Brasil. *Mikania hirsutissima* DC é usada como diurético nas afecções renais e das vias urinárias (73).

Experimentos com *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker (60) foram feitos visando evidenciar possíveis efeitos antiinflamatórios. A atividade antibiótica dos extratos e de alguns constituintes de espécies de compostas, entre as quais figuram espécies de micânias, são mostradas nos trabalhos de Giesbrecht (29), (30), (31). A atividade biológica de extratos de *Mikania monagasensis* DC aparecem em trabalhos de Mathur (51). Recentemente, experimentos farmacológicos realizados por Moura *et al.* (55), com diversas frações obtidas de extratos de *Mikania glomerata* Sprengel, colocaram em evidência a ação dilatadora desses extratos em traquéia de cobaia. Esta atividade foi relacionada com a presença de certos componentes químicos nas folhas do vegetal, entre os quais a cumarina. Os autores trabalharam com extrato hidroalcoólico e de éter de petróleo de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel.

CAPÍTULO III

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

Diversos tipos de material botânico foram empregados na elaboração deste trabalho, a saber:

3.1.1 - Material destinado ao estudo morfológico

3.1.1.1 - Material de herbário

A morfologia externa de *Mikania smilacina* DC foi elaborada parcialmente com o auxílio da observação de exsicatas obtidas por empréstimo dos seguintes herbários:

- Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Sigla oficial RB

- Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo

Sigla oficial SP

Estes materiais foram utilizados principalmente na observação da forma e dimensões dos órgãos do vegetal. As exsicatas empregadas foram as seguintes :

- Estado de Minas Gerais, Caldas, leg. Regnelli s/n sem data da coleta; SP - 20791
- Brasília, Distrito Federal, Cidade Satélite, leg. A.P.Duarte nº 8278, coletado em 12/07/1964. SP 163.142
- Estado de Minas Gerais, Paraopeba, leg E.P. Heringer nº 4382 coletado em 5/05/1959 RB - 132.612
- Estado de Minas Gerais, Capão Grande, leg E.P. Heringer nº 7029 coletado em 20/06/1959 RB - 118.286
- Brasília, Distrito Federal, leg. E.P.Heringer nº 12.228, coletado em 10/09/1962, RB 122.012
- Estado de Minas Gerais , Sete Lagoas , leg E.P. Heringer nº 3906, coletado em 5/06/1955 RB - 117.482
- Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, leg L.O.Williams et Vicente de Assis nº 6928, coletado em 25/05/1945 RB - 96.786
- Estado do Paraná , Cerro Azul, leg. G. Hatschbach nº 8359 coletado em 3/10/1961 RB - 113.266
- Estado de Minas Gerais , Felixlandia, leg E.P. Heringer et Rizzini s/n coletado em 3/06/1960 RB - 107.385
- Estado de Minas Gerais, cidade não mencionada, leg. E.P. Heringer nº 3035, coletado em 2/03/1960. RB - 114.027
- Estado de Santa Catarina, Itajai, leg. Reitz et Klein nº 9159, coletado em 9/10/1959. RB - 106.736

3.1.1.2 - Material destinado a uso em laboratório de botânica.

Foram empregados para a complementação do estudo da morfologia externa e para o estudo anatômico materiais coletados pelo autor no Estado de Minas Gerais, cidade de Poços de Caldas, onde o vegetal cresce espontaneamente de preferência em terrenos localizados próximos a curso de rios.

Prepararam-se exsiccatas a partir deste material, as quais foram depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, onde receberam nº de registro SP 169.614 . Estas exsiccatas figuram no referido herbário como material de referência de estudo farmacognóstico (62).

3.1.1.3 Material destinado ao estudo químico e farmacológico.

Para o estudo químico e farmacológico foram efetuadas duas coletas de partes aéreas do vegetal durante o período de floração. As coletas foram efetuadas nas seguintes épocas: julho de 1986, e setembro de 1988. Desta oferta de julho de 1986, separou-se cerca de 1 quilo do vegetal para a determinação do teor de óleo essencial.

3.2 Métodos

3.2.1 Método utilizado no estudo botânico

A caracterização do vegetal e da droga com ele elaborada foi executada através de observação à vista desarmada ou com o auxílio de lupa estereoscópica. As medidas foram feitas com auxílio de régua comum ou com lamínula microscópica. As exsicatas foram estudadas comparativamente, com o intuito de se assinalar as características macroscópicas mais evidentes a serem empregadas na diagnose da droga.

Os desenhos que ilustram o trabalho foram executados pelo autor através de cópia do natural à vista desarmada com o auxílio de lupa e com microprojektor. As fotografias foram obtidas com auxílio de microscópio com câmera adaptada NIKON tipo OPTIPHOT 104 UFX-IIA . Os estudos anatômicos de folhas e de partes florais provenientes de exsicatas foram precedidos de amolecimento das peças mediante fervura em água ou com água glicerizada a 10% v/v .

O estudo anatômico do limbo foliar e de outras partes do vegetal foi efetuado mediante a elaboração de cortes à mão livre(45). Os cortes transversais foram feitos ao nível do terço médio inferior do limbo foliar. Os cortes paradérmicos foram executados tanto do lado da epiderme adaxial como abaxial. O pecíolo foi cortado em três regiões, a saber: região proximal, região mediana e região distal ao limbo foliar.

Os cortes transversais e longitudinais do caule foram efetuados ao nível do oitavo ao décimo nó. As floretas e brácteas foram estudadas através de montagens diretas (62). Todos os cortes empregados na elaboração de lâminas, destinadas ao estudo anatômico, bem como as floretas e as brácteas, foram previamente descorados pela solução de hipoclorito de sódio a 5%, lavados, a seguir, com água, corados, pela hematoxilina de Delafield (62), sendo então montados em água glicerizada entre lâmina e lamínula. A fixação da lamínula foi executada com auxílio de esmalte de unhas. Os cortes foram, a seguir, examinados ao microscópio(71).

Os órgãos de *Mikania smilacina* DC destinados ao estudo anatômico foram coletados e divididos em peças de tamanho conveniente aos processos de microtécnica e fixados em FAA (90 ml de álcool diluído ,5 ml

formol, 5 ml de ácido acético glacial) e guardados para uso no momento oportuno (65). Paralelamente à análise dos cortes corados pela hematoxilina de Delafield, inúmeros outros reativos foram empregados visando à elucidação de diversas estruturas. Assim, a identificação da lignina foi efetuada mediante o emprego de floroglucina clorídrica, a suberina e a cutina foram evidenciadas pelo Sudan III e a celulose, pelo cloreto de zinco iodado e pela hematoxilina(62). A solução de lugol foi utilizada na detecção de amido.

3.2.2 Métodos utilizados no estudo químico

Os métodos utilizados no estudo químico da droga e de seu extrato fluido foram subordinados aos sete tipos de atividades seguintes:

3.2.2.1- Reações genéricas de identificação

Os seguintes ensaios preliminares foram efetuados de partes aéreas de *Mikania smilacina* DC, visando detectar a presença de grupos de princípios ativos (21,23).

ALCALÓIDES- Os extratos purificados segundo o processo de STAS-OTTO foram testados com os reativos de Bouchardat, Dragendorff e Mayer .

SAPONINAS- Verificou-se nos extratos aquosos das drogas , após agitação, o aparecimento ou não de espuma persistente. Ensaiou-se, também, o poder hemolítico do extrato aquoso da droga a 1%, previamente isotonicado.

ÓLEO ESSENCIAL - Foi verificado através do odor aromático do hidrodestilado das drogas e do comportamento deste frente ao Sudan III .

TANINOS E COMPOSTOS FENÓLICOS- Extratos aquosos das drogas foram tratados com a solução de cloreto-férrico a 2% e pela solução de acetato de cobre a 4% e solução de sub-acetato de chumbo a 10%. Procedeu-se, ainda, à verificação do sabor adstringente da droga.

ESTERÓIDES- Os extratos hidroalcoólicos das drogas foram

submetidos à purificação pelo tratamento com sub-acetato de chumbo, extraído com clorofórmio e submetido a reação de Liebermann-Bouchard .

ANTRADERIVADOS - Os extratos hidroalcoólicos das drogas foram submetidos à reação de Borntraeger .

FLAVONÓIDES- Os extratos hidroalcoólicos das drogas foram submetidos à reação de Shinoda e à reação com solução de cloreto de alumínio.

CUMARINAS- Extratos hidroalcoólicos das drogas foram tratados com solução de hidróxido de sódio com vistas ao desenvolvimento de fluorescência.

3.2.2.2 Isolamento dos componentes químicos Extrato hexânico

Preparo: o extrato hexânico de *Mikania smilacina* DC foi preparado, utilizando-se cerca de 3 kg de material vegetal principalmente de partes aéreas. Assim, após processo de coleta e seleção, o material foi submetido à secagem por 24 horas em estufa aquecida a 50°C . A seguir, foi triturado em moinho de facas marca THOMAS, até se transformar em pó semi-fino (24), adequado para a extração. Aproximadamente 3 kg da droga em pó, previamente umedecidos com hexano, foram transferidos para percolador de aço inox e macerados com hexano por cerca de 24 horas. Seguiu-se a extração com o solvente referido até o completo esgotamento da droga. O extrato obtido foi filtrado, concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório até consistência semi-sólida.

Separação em coluna cromatográfica dos componentes do extrato hexânico: o extrato hexânico concentrado foi submetido à cromatografia em coluna, empregando-se os seguintes sistemas cromatográficos :

Tamanho e tipo da coluna- material de vidro de 100 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro.

Adsorvente- Silicagel Merck 0,05 a 0,2 mm (70-325 mesh ASTM)

Amostra do extrato- 20 g de extrato incorporado em 10 g de adsorvente.

Adsorvente na coluna - 400 g.

Fase móvel- Misturas de hexano e acetato de etila nos seguintes gradientes de concentração:

HEXANO 100%	1000 ml
HEXANO 90% e acetato de etila 10%.....	1000 ml
HEXANO 80% e acetato de etila 20%.....	1000 ml
HEXANO 70% e acetato de etila 30%.....	1000 ml
HEXANO 60% e acetato de etila 40%.....	1000 ml
HEXANO 50% e acetato de etila 50%.....	1000 ml
HEXANO 40% e acetato de etila 60%.....	1000 ml
HEXANO 30% e acetato de etila 70%.....	2000 ml
HEXANO 20% e acetato de etila 80%.....	2000 ml
HEXANO 10% e acetato de etila 90%.....	2000 ml
ACETATO DE ETILA 100%.....	5000 ml

Coletaram-se 180 frações de 100 ml cada. As frações de números 30 a 35, 37 a 40 e 45 a 48, mostraram na fase móvel, hexano-acetato de etila 60:40 e fase fixa silicagel GF, composição química semelhante, motivo pelo qual puderam ser reunidas. Após purificação e recristalização, obtivemos:

Fração 30 a 35 resíduo branco cristalino

Fração 37 a 40 resíduo branco cristalino

Fração 45 a 48 resíduo branco amorfo.

3.2.2.3 Análise das frações em cromatografia de camada delgada.

FRAÇÃO 30 - 35

As frações 30 a 35 reunidas, foram cromatografadas em camada delgada, utilizando-se o seguinte sistema cromatográfico:

Sistema cromatográfico nº 1

- Placas de vidro de 15 X 20 cm
- Adsorvente tipo silicagel G 254
- Fase móvel - hexano
- Desenvolvimento simples ascendente
- Percurso de 10 cm
- Visualização em luz natural após aspergir reativo sulfovanílico.

Tentou-se a purificação dessas frações por recristalização. Dissolvia-se o resíduo obtido no mínimo volume de acetato de etila a quente, promovendo-se a seguir o resfriamento, de modo a separar as impurezas. O líquido restante sobrenadante que permanecia após cristalização por 48 horas, era desprezado e os cristais eram lavados, filtrados e submetidos às análises convencionais para determinação dos critérios de pureza.

- Purificação por cromatografia preparativa:

Sistema cromatográfico nº 2.

- Placas de vidro de 15 X 20 cm
- Adsorvente tipo silicagel P
- Fase móvel - Hexano:acetato de etila (50 :50)
- Desenvolvimento simples ascendente
- Percurso de 10 cm
- Revelador solução de iodo a 5%.

Nesta fase de purificação , os cristais eram dissolvidos em hexano e aplicados em camada preparativa, com aplicador especial de material plástico com formato de pente. A placa utilizada era dividida em 2 áreas, sendo uma destinada à substância a ser isolada e outra destinada à revelação com vistas a localizar a área a ser raspada. Durante a aplicação do revelador, a área a ser removida era protegida com uma placa de vidro. Verificada a posição das manchas, esta região era retirada por raspagem e a substância contida na sílica, eluída com hexano em uma pequena coluna de vidro. Após a eluição completa, o solvente era evaporado, restando o resíduo sólido formado de cristais transparentes que foram denominados de CR-1. Esses cristais foram submetidos posteriormente à análise espectral e à determinação do ponto de fusão.

FRAÇÃO 37 - 40

As frações 37 a 40 reunidas, foram cromatografadas em camada delgada utilizando-se o seguinte sistema cromatográfico:

Sistema cromatográfico nº 3.

- Placas de vidro de 15 X 20 cm.
- Adsorvente tipo Silicagel G 254.
- Fase móvel: Hexano:acetato de etila 95:5
- Desenvolvimento simples ascendente
- Percurso de 10 cm
- Visualização em luz natural após aspergir reativo sulfovanílico.

As frações 37 a 40, apresentaram-se quase que exclusivamente como uma substância, motivo pelo qual foram purificadas apenas por recristalização, resultando em cristais transparentes denominados CR-2, os quais foram posteriormente encaminhados para a análise espectral.

FRAÇÃO 45 - 48

As frações 45 a 48 foram reunidas e cromatografadas em camada delgada, utilizando-se o seguinte sistema cromatográfico:

Sistema cromatográfico nº 4.

- Placas de vidro de 15 X 20 cm.
- Adsorvente tipo silicagel G
- Fase móvel: Benzeno: acetato de etila 7:3
- Desenvolvimento simples ascendente
- Percurso de 10 cm
- Revelador: Solução NaOH 20% observação sob luz UV366 nm

- Padrão: Solução de cumarina a 0,1%

Os cristais amorfos aqui cromatografados eram constituídos quase que exclusivamente por uma única substância. Esses cristais foram purificados por recristalização e encaminhados à análise espectral com a denominação de CR-3.

3.2.2.4 Caracterização cromatográfica dos extratos fluidos

O perfil cromatográfico do extrato fluido foi elaborado, empregando-se os seguintes sistemas cromatográficos:

Sistema cromatográfico nº 6.

-Placas de vidro de 20 X 20 cm e espessura de 0,25 mm.

-Adsorvente tipo- Silica gel 60 Merck

-Fase móvel - Benzeno: acetato de etila 7:3

-Desenvolvimento simples ascendente

-Percurso de 14 cm.

-Reveladores a) Solução de hidróxido de sódio a 20%

 b) Anisaldeído

 c) Sulfovanílico

Visualização- Observação em luz UV a 366 nm

Amostra- Extrato fluido da droga

3.2.2.5 Quantificação de cumarina no extrato fluido de *Mikania smilacina* DC

Sistema cromatográfico nº 5.

Fase estacionária : Placa de silicagel 60 Merck 20 X 20 cm e espessura de 0,25 mm.

Fase móvel: Benzeno:acetato de etila 7:3

Percurso de 14 cm

Desenvolvimento simples ascendente

Revelador: Solução de hidróxido de sódio a 20%.

Visualização: Observação à luz ultravioleta em 366 nm.

Soluções padrão: Solução de cumarina a 0,1%; 0,08%; 0,06%; 0,04%, 0,02% e 0,01% em clorofórmio.

Amostras: Extrato fluido de *Mikania smilacina* DC

Aparelho empregado: Densitômetro Photovolt modelo 520 acoplado a registrador Sargent Welch. Observação em luz ultravioleta a 366 nm. Filtro de 485 nm.

Curva de calibração: Foi efetuada com o emprego das soluções padrão de cumarina, relacionando a área dos picos obtidos no registrador com as respectivas concentrações.

3.2.2.6-Determinação do teor de óleo essencial na planta fresca.

O teor de óleo essencial na planta fresca foi determinado com o auxílio do aparelho de Clevenger modificado . Assim, 500 g de partes aéreas do vegetal florido, previamente picado em pedaços de cerca de 3 cm de comprimento , foram colocadas em balão de destilação de 5 l. Adicionou-se água ao balão até cobrir o material vegetal. A seguir, colocou-se o balão em manta aquecedora . O material vegetal foi submetido à destilação por arraste a vapor por cerca de 8 horas consecutivas.

Análise do óleo essencial

O óleo essencial obtido foi submetido à análise cromatográfica em fase gasosa, seguida de espectroscopia de massa, visando à identificação de seus componentes. Utilizou-se aparelho Finigan. As condições da análise foram as seguintes:

Coluna - SE 30

Parâmetros GC : temperatura inicial 30 °C

temperatura final 250°C

Tempo inicial 1 min.

Tempo final 60 min.

Varredura de 35 AMU à 800 AMU em 1 s.

3.2.2.7 - Análise das substâncias isoladas

Foram efetuadas as seguintes análises das substâncias isoladas, a saber , CR-1, CR-2 e CR-3.

- Ponto de fusão em aparelho Köfler

- Espectro infravermelho, em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 710 A com amostras em pastilhas de KBr empregando a absorção de 1601 cm^{-1} do poliestireno como referência.

- Espectro de ressonância magnética protônica em espectrômetro Varian EM-360, 60 mhz em solvente deuterado adequado e TMS como referência ; medidas em δ

Espectro de ressonância magnética de ^{13}C em espectrômetro usando DMSO- d_6

Espectrometria de massa em espectrômetro Finigan

3.2.3. Métodos utilizados nos estudos farmacológicos

3.2.3.1. Atividade anticoagulante

A determinação da atividade anticoagulante do extrato vegetal foi realizada através da medida do tempo de protrombina, baseada no método de Quick (67) usando reagente PT da Roche diagnóstica. A uma amostra de 0,9 ml de sangue, adicionou-se 0,1 ml da solução de citrato de sódio a 3,8%. Centrifugou-se a mistura a 3000 rpm durante 10 minutos, à temperatura de 4°C . O plasma foi retirado em tubo de ensaio a 37°C adicionando-se 0,2 ml do reativo de tromboplastina. O tempo a seguir foi cronometrado. Para o ensaio com derivado cumarínico puro, utilizou-se solução aquosa na concentração de 200 mg de substância por ml de água.

3.2.3.2. Toxicidade subaguda

O ensaio realizado para a determinação da toxicidade subaguda do extrato vegetal foi feito com ratos da raça Wistar divididos em 2 grupos com

5 animais cada. O grupo A foi considerado o grupo controle e tratado com salina. O grupo B foi tratado com a droga na forma de extrato fluido, previamente concentrado a 10% v/v. As doses utilizadas foram de 100 mg/kg de peso ao dia em administração diária durante 42 dias. O extrato foi administrado por via oral através de sonda gástrica de polietileno. Aplicou-se a análise de variância "two-ways", para avaliação estatística dos dados relativos à variação do peso corporal. Foi ainda realizado exame anátomo-patológico do tecido hepático dos animais após período de 15 e 40 dias de tratamento. Utilizou-se formol a 10% e hematoxilina como corante tecidual.

3.2.3.3 Atividade antimicrobiana

O extrato fluido foi concentrado a um décimo do volume inicial, obtendo-se um extrato mole. Este extrato juntamente com o ácido caurenóico, isolado e purificado por cromatografia, foram utilizados na verificação da atividade antimicrobiana. Os procedimentos realizados neste ensaio consistiram na determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em meio de cultura líquido(59) e pelo método de difusão em gel(59). A determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em meio de cultura líquido foi realizada com técnica asséptica, empregando-se solução fisiológica estéril contendo 0,1% p/v de polissorbato 80. Prepararam-se soluções do extrato mole de concentrações, variando de 10 a 60 mg/mL, com intervalo de 10mg/mL. De cada uma das concentrações transferiu-se a alíquota de 1 mL para uma série de 3 tubos, para cada microrganismo teste. A inoculação do germe foi realizada com o meio de cultura , sendo caldo caseína de soja para as bactérias e caldo Sabouraud dextrose para os fungos. Para isto, a partir da suspensão de cultura jovem com carga conhecida, foi transferida uma alíquota suficiente para obter de 10³ a 10⁴ microrganismos em cada 4 mL do meio de cultura, sendo este volume adicionado a todos os tubos contendo 1 mL de solução teste, de diferentes concentrações. Assim, as concentrações do extrato mole foram de 2 a 12 mg/mL, com intervalo de 2 mg/mL. Foram utilizados como microrganismos teste *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* , *Candida albicans* e *Aspergillus niger* . A incubação dos tubos contendo bactérias foi a 35-37 °C durante cerca de 24 horas e a 20-25 °C, para fungos, durante cerca de 72 horas, ocasião em que se efetuou a observação macroscópica de crescimento. De todos os tubos sem crescimento foi efetuada a subcultura para o meio de cultura de mesma

natureza, transferindo-se alíquota com auxílio de alça de platina de 4 mm de diâmetro. A confirmação da ação biocida ou biostática foi feita após igual condição de incubação do teste anterior. A avaliação da atividade antibacteriana por método de difusão em gel, foi realizada utilizando todas as soluções-teste, de 10 a 60 mg/mL, utilizadas no teste anterior, utilizando *Staphylococcus aureus*. A aplicação da solução ao meio de cultura foi feita pelo sistema de furo no gel, bem como pelo uso de disco de papel de filtro de 13 mm de diâmetro. O ácido caurenóico isolado do vegetal na forma purificada também foi ensaiado usando-se a segunda técnica e aplicando-se a concentração de 100 e 500 micro g/disco, através da solução em *n*-hexano. Uma réplica de 3 placas de cada série de análise foi submetida à pré-difusão de 12 horas em refrigerador. Foi incubada em estufa a 35-37 °C durante 20 a 24 horas.

3.2.3.4 Atividade antiinflamatória

A atividade antiinflamatória foi ensaiada utilizando-se ratos Wistar machos de peso compreendido entre 180 a 200 g. O edema foi induzido mediante injeção subcutânea de 0,1 ml de carragenina a 1,5% p/v na região plantar da pata traseira do animal e seu volume medido aos 60, 120, 180 e 240 minutos, utilizando-se pletismógrafo de mercúrio conectado a transductor Statham P23 e polígrafo GRASS, modelo 79, segundo Van Arman et al. (78). O extrato fluido foi administrado *p.o.*, 60 minutos antes da carragenina.

CAPÍTULO IV

4- RESULTADOS

4.1- Botânica

4.1.1- Caracterização macroscópica de *Mikania smilacina* DC

Mikania smilacina DC é uma planta de porte subarborescente e hábito trepador volúvel. Seu caule é cilíndrico, sublenhoso, glabro, estriado longitudinalmente, quando submetido à secagem. As porções terminais do caule mostram tonalidade verde glauquescente e as partes mais desenvolvidas, possuidoras de estrutura secundária, apresentam cor castanho acinzentada. O vegetal pode alcançar 5 a 6 metros de comprimento e o diâmetro caulinar de sua base até 2 cm. Suas folhas (Fig.1A) são opostas, glabras, curvinérveas, providas de 5 nervuras salientes em ambas as faces foliares. As nervuras secundárias, que emergem das nervuras principais num ângulo de aproximadamente 85°, assim como as nervuras terciárias são bem visíveis em ambas as faces formando retículo bem aparente. As folhas apresentam contorno oval, ápice acuminado e base arredondada e algumas vezes, ligeiramente assimétrica. A margem foliar é lisa. Possuem coloração verde variando sua face ventral do verde escuro até o verde glauquescente, sendo a face dorsal sempre um pouco mais clara. Apresentam consistência subcoriácea e quando recentemente coletadas exalam aroma intenso que lembra baunilha.

As folhas medem, quando adultas, de 10 a 15 cm de comprimento por 5 a 8 cm de largura. Seus pecíolos são canaletados com sua porção terminal mais dilatada, medindo cerca de 2 cm de comprimento.

Os capítulos são sésseis e dispostos em panículas de glomérulos. A bracteola (Fig 1D) é glabra, de ápice agudo e base saliente e endurecida. Possui forma navicular e apresenta margem lisa. Mede de 4 a 7 mm de comprimento por 1 a 1,5 mm de largura e apresenta-se estriada longitudinalmente. As brácteas (Fig 1B e C) involucrais, em número de quatro por capítulo, são um pouco maiores e apresentam-se ciliadas no ápice, que

Fig 1: *Mikania smilacina* DC: A - pedaço de caule com folhas ; B-invólucro do capítulo; C-bráctea involucral; D- bracteola; E- floreta.

varia de forma aguda a sub-obtusa. Apresentam-se estriadas longitudinalmente e apresentam base saliente e endurecida. Medem de 4,5 a 8 mm de comprimento por 1,5 a 2 mm de largura. As floretas (Fig.1E) apresentam corola infundibuliforme e a parte referente ao tubo mede cerca de 2 mm, e o limbo aproximadamente 5 mm, apresentando lacínias curtas triangulares. As floretas são hermafroditas e possuem cada uma delas 5 estames sinantereos e epipétalos. O apêndice apical do estame é bem manifesto. O gineceu é formado por ovário ínfero encimado por estilete cilíndrico, que se abre no ápice em estigma representado por dois ramos relativamente longos providos de papilas estigmáticas. A base do estilete se insere no centro do anel nectarífero localizado no ápice do ovário. O ápice do ovário é coroado pelo pappus formado por células tão longas quanto o comprimento da corola providas em toda sua extensão de pequeníssimos apículos. O aquênio é glabro, subcilíndrico pentangular, com aproximadamente 2,5 mm de comprimento. O pappus é caduco e mede, quando presente, aproximadamente 7 mm de comprimento.

A droga vendida no comércio é constituída pelas partes aéreas do vegetal providas ou não de órgãos reprodutivos. Os fragmentos de caule apresentam tamanhos variados, geralmente ao redor de 20 cm, e mostram região de nós e entre nós bem evidentes. Apresentam-se estriados longitudinalmente, deixando ver com frequência extremidades bastante fibrosas. Possuem coloração castanho- amarelada. As folhas de disposição opostas aparecem com frequência presas ao caule exibindo o seu sistema de nervação caracteristicamente reticulado. Seus pecíolos mostram-se nitidamente arqueados. As partes reprodutivas, quando presentes, são representadas por capítulos dispostos em glomérulos. Neste caso o pappus é bem evidente na mistura das partes integrantes da droga. O cheiro é aromático agradável, lembrando baunilha e o sabor é ligeiramente salgado e muito fracamente adstringente.

4.1.2. Morfologia interna da folha

Secções transversais da folha efetuadas ao nível do terço médio inferior mostram a seguinte estrutura:

Estudo da região da nervura mediana.

Fig 2: Secção transversal da folha de Mikania smilacina DC : A-Desenho esquemático mostrando: col-colênquima;p.fund parênquima fundamental; c.secr.-canal secretor; f.vasc-feixe vascular; B- Detalhe da região da nervura mostrando: x-xilema; fl-floema; b.fibr-bainha fibrosa; p.fund-parênquima fundamental; c.secr- canal secretor; col-colênquima; ep. inf-epiderme inferior.

Secções transversais permitem classificar a região da nervura mediana como sendo biconvexa (Fig 2A). As epidermes (Fig 2B ep.inf. e 3 AeB ep. sup.) são constituídas de células de contorno aproximadamente retangular, alongadas no sentido periclinal. Sobre as epidermes, algumas vezes, pode ser notada a presença de pêlos glandulares providos de glândulas unicelulares sésseis ou com pedicelo formado por uma única célula. As células epidérmicas que formam a epiderme inferior apresentam tamanho um pouco menor do que aquelas que integram a epiderme superior. Abaixo das epidermes observa-se a presença de 4 a 5 camadas celulares providas de espessamento celulósico nos cantos (Fig 2B col. e 3 AeB col.). Tanto a região colenquimática localizada abaixo da epiderme superior como a região colenquimática localizada abaixo da epiderme inferior sofrem processo de lignificação com o envelhecimento. Este processo de lignificação se inicia a partir de células localizadas próximas às epidermes e progride em direção ao centro da estrutura. A figura (3C) mostra fragmento de folhas com células colenquimáticas com parede lignificada observado no pó elaborado com este órgão vegetal. Nas fotografias podem ser observadas células da região colenquimática com paredes lignificadas.

A região do parênquima fundamental é bem desenvolvida, sendo, constituída por células isodiamétricas que deixam entre si espaços celulares do tipo meato. Esta região envolve em sua parte central feixe vascular colateral em forma de arco (Fig 2A), o qual é envolvido por bainha esclerenquimática bem desenvolvida. O parênquima fundamental envolve ainda inúmeros canais secretores do tipo esquizógeno geralmente com sete a vinte células de abertura (Fig 2B c. secr.). Estes canais secretores localizam-se ao redor do feixe vascular tanto do lado do xilema como do lado do floema. Células da região do parênquima fundamental em folhas mais velhas podem sofrer espessamento de lignina, tornando-se esclerificadas.

4.1.3. - Estudo da região do limbo propriamente dito

A epiderme superior, quando vista de face (Fig 4A), apresenta células de paredes espessadas e de contorno sinuoso que pode variar até quase reto. A epiderme inferior (Fig 4B) em condições idênticas é muito parecida com a epiderme superior. Nela podem ser observadas estômatos do tipo

FIG 3

Fig 3: Detalhes de secções transversais da região da nervura mediana de *Mikania smilacina* DC :A e B- ep.sup-epiderme superior; col-colênquima (paredes lignificadas); p.fund-parênquima fundamental; c.secr-canal secretor;c.escl- célula esclerenquimática. C-células colenquimáticas (visão paradérmica).

anomocítico ladeados por três a seis células paraestomatais na maioria dos casos. Tanto a epiderme superior como a epiderme inferior podem conter pêlos glandulares (Fig 4C), semelhantes àqueles descritos para a região da nervura mediana.

As seções transversais do limbo mostram epiderme superior (Fig 5AeB ep.) constituída por células irregulares na forma e no tamanho recoberta por cutícula lisa e medianamente espessa; parênquima paliçádico (Fig 5 AeB p. pal.), constituído por duas ou três fileiras de células, relativamente curtas, cuja largura, na maioria dos casos, corresponde aproximadamente à metade do comprimento. A largura do parênquima paliçádico corresponde aproximadamente a um terço do mesófilo ; parênquima lacunoso (Fig.5 AeB p. lac.) bem desenvolvido constituído de seis a dez camadas de células. A epiderme inferior (Fig 5AeB ep. inf.) apresenta características semelhantes às da epiderme superior. Na região do mesófilo, pode ser observada a presença de pequenos feixes vasculares relacionados com canal secretor. Tanto o feixe vascular (Fig 5B) como o canal secretor são envolvidos por bainha parenquimática.

4.1.4.- Estudo do pecíolo

Secções transversais do pecíolo permitem classificá-lo como sendo portador de secção côncavo-convexa ou do tipo canaletado.

A figura(6A) mostra secção transversal desta parte foliar em sua região proximal ao limbo. Nesta região, a epiderme do pecíolo apresenta características semelhantes às da epiderme da região da nervura mediana do limbo foliar já descrito. Logo abaixo da epiderme ocorre a presença de região colenquimática representada por células com espessamento celulósico localizado nos ângulos. O parênquima fundamental é bem desenvolvido, formado por células aproximadamente isodiamétricas e que deixam entre si espaços intercelulares do tipo meato. Este parênquima fundamental envolve onze feixes vasculares colaterais dispostos em V e cujo tamanho aumenta das margens para o vértice. Cada um destes feixes vasculares se relacionam com dois canais secretores, exceto o feixe maior localizado no vértice, que geralmente, se relaciona com quatro canais secretores.

Fig 4: Epidermes da folha de Mikania smilacina DC : A- epiderme superior; B- epiderme inferior; C- pêlos glandulares; D- fragmento de epiderme mostrando base de pêlo

A

100 μ

FIG 5

B

100 μ

Fig 5. Secções transversais da região do limbo da folha: ep. sup-epiderme superior; p. pal.- parênquima paliçadico; p. lac-parênquima lacunoso; ep.inf-epiderme inferior; f. vasc-feixe vascular; c. secr.-canal secretor; b.par-bainha parenquimática; p. gl- pêlo glandular.

As figuras 6B,C mostram secções transversais de pecíolo passando pelas regiões mediana e distal. As estruturas observadas são bastante parecidas com as da região anteriormente descrita, diferindo desta principalmente pelo número de células esclerosadas presentes na região do parênquima fundamental e do colênquima. O número de células esclerosadas aumentam da região proximal para a região distal do limbo foliar. Este tipo celular aumenta em número também com a idade foliar.

4.1.5.- Anatomia do caule

O caule segundo a teoria estelar de Jeffrei pertence ao tipo sifonostélico ectoflóico dissecado. Quando jovem em secção transversal apresenta a seguinte estrutura: a epiderme (Fig 7 ep.) é constituída por células de contorno aproximadamente retangular, alongadas no sentido tangencial. A cuticula é medianamente espessa e pêlos glandulares são muito pouco freqüentes, apresentando características dos descritos para as folhas. Em preparações paradérmicas pode ser observada com freqüência a presença de estômatos do tipo anomocítico.

O colênquima (Fig 7 col.), localizado logo abaixo da epiderme, é constituído por três a cinco camadas celulares com espessamento celulósico nos cantos. Esta região do caule mostra, com o envelhecimento, células que apresentam espessamento de lignina. O parênquima cortical (Fig 7p.cort.) é pouco desenvolvido, sendo constituído geralmente por quatro a oito fileiras celulares. As células apresentam contorno aproximadamente isodiamétrico e deixam entre si espaços intercelulares pequenos triangulares do tipo meato. A endoderme (Fig 7 end.) é atípica, sendo formada por células aproximadamente isodiamétricas e que diferem das demais camadas celulares da região cortical pela presença em seu interior de grãos de amido. Nas proximidades da endoderme, geralmente nos locais adjacentes aos raios medulares, pode, ser observada a presença de canais secretores (Fig 7 c. secr.). Estes canais, em número de dois ou três por feixe vascular, relacionam-se com a região floemática. O periciclo (Fig 7p.) é multisseriado, descontínuo e fibroso. Suas células se dispõem em forma de calotas localizadas sobre a região floemática. Os feixes vasculares (Fig 7) são do tipo colateral aberto e acham-se separados entre si por raios medulares formados por cinco a seis fileiras de células. A região floemática (Fig 7 fl.) é bem desenvolvida, contendo muitas placas crivadas com células companheiras envolvidas por parênquima abundante. Suas

FIG 6

Fig 6. *Mikania smilacina* DC: secção transversal do peciolo: A-região proximal; B-região média; C-região distal; col-colênquima; p. fund-parênquima fundamental; f.vasc-feixe vascular; c.secr-canal secretor; escl-esclerênquima.

FIG 7

Fig 7. *Mikania smilacina* DC: secção transversal do caule: ep-epiderme; col-colênquima; p.cort- parênquima cortical; end-endoderme; p-periciclo; fl-floema; c-câmbio; x-xilema (x^1 primário e x^2 secundário); p.med-parênquima medular; c. secr- canal secretor.

células geralmente mantêm arranjo radial. O xilema (Fig 7 x_1, x_2) é constituído pela parte de natureza primária, dividida em protoxilema e metaxilema com vasos alinhados radialmente e de abertura menor do que aqueles que formam a região secundária. Esta apresenta vasos isolados ou em pequenos grupos diretamente envolvidos por parênquima do xilema. Fibras podem ser observadas nesta região, especialmente em estruturas mais velhas. O parênquima do xilema é bem desenvolvido e assume disposição típica na região do xilema primário. Nesta região as células parenquimáticas apresentam secção aproximadamente retangular, alongadas no sentido periclinal, dispondo o seu eixo maior perpendicularmente ao alinhamento dos vasos. O parênquima medular (Fig 7p. med.) é bem desenvolvido e suas células aumentam de tamanho à medida que se aproximam do centro da estrutura. Inúmeros canais secretores podem ser observados nesta região em locais situados próximos aos feixes vasculares. O início da estrutura secundária ocorre com o funcionamento do câmbio fascicular e com o aparecimento do câmbio interfascicular que torna a região cambial contínua. Tanto o câmbio fascicular como o câmbio interfascicular formam xilema secundário no qual os vasos apresentam grande abertura e são geralmente isolados, envolvidos por parênquima acompanhados de fibras. O aumento da região vascular é compensado, inicialmente, por divisões de células anticlinais de células do parênquima cortical e posteriormente pelo aparecimento do felógeno (Fig 7fel.), derivado de células epidérmicas ou de células colenquimáticas adjacentes à epiderme. A estrutura secundária do vegetal em estudo é pouco pronunciada.

4.1.6.- Anatomia do capítulo floral

Os capítulos florais de *Mikania smilacina* DC são constituídos por quatro floretas tubulosas, (Fig.1E) cada uma delas protegidas por uma bráctea delicada de forma navicular (Fig 1BeC). Cada capítulo é acompanhado por uma bractéola. Secções transversais das brácteas protetoras das floretas efetuadas ao nível do terço médio inferior mostram a seguinte estrutura: epiderme externa e interna formadas por células irregulares na forma e no tamanho. A região epidérmica situada no ápice da bráctea (Fig 8) é portadora de pêlos tectores longos unicelulares. Esta região epidérmica, quando vista de face, é integrada por células de contorno sinuoso e aproximadamente isodiamétricas, excetuando-se as células epidérmicas localizadas sobre a nervura, que apresentam forma alongada e se dispõem ao longo do eixo

FIG 8

Fig 8. *Mikania smilacina* DC: A- Regi3o ovariana (aqu4nio); v. esp- vaso espiralado; a. escl.-anel esclerenquim3tico; B- Floreta :regi3o da lac4nia. C- Br3ctea :regi3o do 3pice; D- Estigma: desenho esquem3tico.

vascular. O mesófilo mais saliente em sua região mediana é de natureza parenquimática e envolve feixes vasculares delicados relacionados com espécie de lâmina formada por células esclerosadas. Canais secretores podem ser observados. A bractéola apresenta estrutura bastante parecida com a das brácteas, diferindo desta pela ausência de cfilios na região epidérmica apical. As floretas, quando observadas em montagem direta e clareadas pela solução de cloral, mostram epiderme externa da corola formada por células de contorno sinuoso e ligeiramente mamilonadas especialmente em suas partes proximais às lacíneas. Na região das lacíneas (Fig 8B), as células epidérmicas são mamilonadas e recobertas por cutícula nitidamente estriada. No ápice da lacínia observa-se a presença de pêlos providos de duas a três células dispostas em uma série, apresentando a célula distal transformada em glândula. A região ovariana (Fig 8A) é recoberta por células de contorno ligeiramente sinuoso, apresentando-se ligeiramente no sentido do eixo maior do órgão. Em montagem paradérmica pode-se observar com frequência a presença de feixes vasculares delicados, evidenciados especialmente por seus vasos do tipo espiralado. Secções transversais do aquênio mostram que ocorrem cinco feixes vasculares, cada um deles localizados em uma das cinco regiões de arestas deste órgão. A região basal do aquênio é provida de anel esclerenquimático relacionado com a abscisão. O estilete é cilíndrico e termina em estigma bifido (Fig 8D). Em sua base sobre o ovário nota-se a presença de anel nectarífero. O papus é constituído por cerdas, as quais apresentam secção transversal formada por quatro ou cinco células arredondadas, que demonstram ser alongadas em visão longitudinal, projetando pontas para o lado de fora e dando ao conjunto aspecto característico. O androceu é formado por cinco estames soldados pela antera (Fig 9B), formando um tubo. Montagem direta de estame evidencia antera formada por duas tecas separadas entre si pelo conectivo (Fig 9B), que se projeta em forma de ponta. As células epidérmicas que revestem a região do conectivo, inclusive na região da ponta (Fig 9C), apresentam paredes pouco sinuosas e são alongadas no sentido do eixo maior do órgão. A camada mecânica da antera (Fig 9C), vista por transparência, mostra espessamentos que, quando vistos paradérmicamente, apresentam-se com forma que lembra contas em um rosário. Os grãos de pólen (Fig 9 EeF) apresentam exina espinhosa e três poros de germinação. Os filetes (Fig 9D), vistos de face, apresentam células epidérmicas ordenadas em fileiras dispostas longitudinalmente.

FIG 9

Fig 9. *Mikania smilacina* DC: A- conectivo(saliência); B-desenho esquemático de antera: conect.-conectivo; t-teca; c-camada mecânica da antera; D-fílete; E-grão de pólen- corte óptico; F- grão de pólen (visão global); G- pedaço de cerda do papus.

Foto 1. Secção transversal da folha de Mikania smilacina DC tratada por floroglucina clorídrica pondo em evidência paredes lignificadas.

Foto 2. Secção transversal da folha de Mikania smilacina DC tratada pela floroglucina clorídrica- Detalhe mostrando: região colenquimática com células espessadas de lignina; bainha esclerenquimática protegendo região floemática; região do xilema.

Foto 3. Secção transversal do pecíolo de Mikania smilacina DC : porção proximal. Observar colênquima, parênquima fundamental, feixes vasculares e canais secretores.

Foto 4. Detalhe: Secção transversal do pecíolo de Mikania smilacina DC porção distal. Observar parênquima fundamental repleto de células com parede lignificada.

Foto 5. Detalhe de secção transversal de caule de Mikania smilacina DC mostrando: epiderme e região colenquimática. Note a presença na região colenquimática de células com paredes espessadas (tonalidade mais escura).

Foto 6. Detalhe de secção transversal de caule de Mikania smilacina DC: periciclo fibroso multisseriado e floema.

Foto 7. Secção transversal de caule de Mikania smilacina DC mostrando feixe vascular colateral aberto (estrutura secundária)

Foto 8. Secção transversal de caule de Mikania smilacina DC mostrando região medular com células de parede espessada com pontuações.

Foto 9. Secção transversal de caule de Mikania smilacina DC estrutura secundária mostrando região do xilema primário.

Foto 10. Mikania smilacina DC : detalhe mostrando canal secretor .

Foto 11. Secção longitudinal do caule de Mikania smilacina DC passando pela região xilemática. Observar vasos xilemáticos.

Foto 12. Mikania smilacina DC: Detalhe mostrando parte de vaso xilemático pontuado.

4.2 Química

4.2.1. Reações Genéricas de identificação.

ALCALÓIDES

Os extratos purificados segundo o processo de STAS-OTTO, produziram resultados fracamente positivos, evidenciados pelo aparecimento de precipitado pouco intenso com os reativos de BOUCHARDAT, DRAGENDORFF e MAYER.

SAPONINAS

Resultados positivos evidenciados pela presença de baixa atividade hemolítica e pelo fato de ter ocorrido formação de espuma persistente no teste afrogênico.

ÓLEO ESSENCIAL

Ensaio positivo evidenciado pela presença de gotículas de óleo no hidrodestilado, apresentando odor aromático e reação positiva pelo Sudan III.

TANINOS

Os extratos aquosos da planta originaram coloração negra quando tratados pela solução de cloreto férrico. Estes extratos, com a solução de acetato de cobre a 1% e solução de acetato de chumbo, deram origem a precipitados esbranquiçados. Por outro lado, a droga não apresentou sabor adstringente.

ESTERÓIDES

Os extratos hidroalcoólicos da droga foram submetidos a testes com o reativo de Liebermann-Buchard para detecção de núcleo fundamental esteróide, não ocorrendo aparecimento de cor.

ANTRADERIVADOS

Submeteram-se os extratos hidroalcoólicos da droga a testes com reativo de Borntraeger para evidenciar presença de compostos antraquinônicos, dando resultado negativo.

FLAVONÓIDES

Os extratos hidroalcoólicos da droga foram submetidos às reações com cloreto de alumínio e à reação de Shinoda, dando resultados positivos.

CUMARINAS

O extrato hidroalcoólico da droga, tratado por solução de hidróxido de sódio, originou coloração amarela fluorescente revertida pela adição de ácido. A droga e os extratos obtidos a partir dela apresentam odor cumarínico característico.

4.2.2. Extrato hexânico

A eluição do extrato hexânico deu origem a 180 frações, entre as quais as de números 30 a 35, 37 a 40 e 45 a 48. Estas apresentaram, após a evaporação do solvente, resíduo os quais em cada conjunto mostraram composição química semelhante através de cromatografia em camada delgada.

4.2.2.1 *Análise da fração 30-35*

As frações de 30 a 35 reunidas, quando submetidas à cromatografia em camada delgada empregando-se o sistema 1, apresentaram predominantemente uma única substância. Esta substância foi purificada através de cromatografia preparativa utilizando-se o sistema cromatográfico 2. Cristais brancos, transparentes foram obtidos, sendo denominados de substância CR-1.

A substância CR-1, ao ser cromatografada (sistema cromatográfico 1), apresentou comportamento semelhante ao dos ácidos orgânicos, isto é, a mancha apresentou zona de concentração maior na parte dianteira e cauda relativamente longa. Revelada com o reativo sulfovanílico, apresentou cor violeta que, com o tempo, torna-se branco leitosa.

IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CR-1

PONTO DE FUSÃO : 170-174 °C

ESPECTRO NO INFRAVERMELHO :

Fig 10

O espectro em infravermelho, realizado em pastilhas de KBr mostrou as seguintes absorções:

ν (cm⁻¹)

3100	-	estiramento O-H de -COOH
2970	-	estiramento C-H
2870	-	estiramento C-H
1690	-	estiramento de C=O de ácido carboxílico
1450	-	deformação -CH ₂ -

- 1250 - deformação de O-H e estiramento de C-O
 870 - deformação de grupo metilênico terminal.

ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PROTÔNICA.

O espectro de prótons, utilizando-se clorofórmio deuterado, apresentou os seguintes sinais:

Fig 1 1

ESPECTRO DE MASSA

O espectro de massa do composto indicou os fragmentos: (m/e)

Fig 1 2

M^+ 302, 287, 259 257, 256, 243 241, 213, 187, 131, 91, 77.

ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C

Fig 13

O espectro de ^{13}C da substância CR-1 da Fig13 ,apresenta as seguintes características.

δ (80 Mhz, CDCl_3) :

Valôres entre parênteses correspondem àqueles da literatura (37).

C_1 : 40,86,(41,3), C_2 : 18,86,(18,7), C_3 : 42,81(42,0), C_4 : 28,62 (33,3), C_5 : 56,18 (56,1), C_6 : 21,61(20,3), C_7 : 40,35(40,4), C_8 : 43,78(44,2), C_9 : 54,45(56,1), C_{10} : 39,20(39,3), C_{11} : 18,01(18,1), C_{12} : 32,69(33,3), C_{13} : 43,23(44,2), C_{14} : 39,97(39,9), C_{15} : 48,57(49,2), C_{16} : 154,85(156,0), C_{17} : 103,15(102,8), C_{18} : 37,69(33,7), C_{19} : 178,53(21,7), C_{20} : 15,37(17,6)

IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A substância CR-1 foi comparada através do sistema cromatográfico 1, com padrão de ácido caurenóico. O R_f tanto da amostra como do padrão foi 0,7. O ácido caurenóico foi detectado em câmara de vapores de iodo e com o reativo sulfovanílico, produzindo manchas ou spots na forma de rastro de coloração inicialmente violeta. A análise espectral do infravermelho, de ressonância magnética de prótons, de massa e de ^{13}C , bem como o ponto de fusão e o R_f da substância CR-1, coincidem com os do ácido caurenóico.

A substância CR-1 corresponde ao ácido caur-16-en-19 óico.

4.2.2.2 Análise da fração 37-40

A análise cromatográfica da fração 37-40, através do sistema cromatográfico 3, revelou que este é constituído predominantemente de uma substância CR-2, que possui também comportamento cromatográfico característico de substância ácida, apresentando-se na forma de um rastro de $R_f=0,5$, que após revelação com reativo sulfovanílico, apresentou-se de cor violeta, que esmaece com o tempo, tornando-se um rastro esbranquiçado após algumas horas. Foi feita também a observação da placa após permanência em cuba com iodo metálico, o que evidencia as zonas de cor amarela dos componentes dessa fração.

IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CR-2

PONTO DE FUSÃO: 148-152 °C

ESPECTRO NO INFRAVERMELHO:

Fig 14

O espectro no infravermelho da substância CR-2 foi realizado utilizando pastilhas de KBr, observando-se as seguintes absorções:

$\nu(\text{cm}^{-1})$

3600 - 2500 estiramento O-H

1695 estiramento de C=O carbonila de ácido.

1660 estiramento de C=C cíclico

998 deformação de dupla monossubstituída

917 deformação de dupla monossubstituída

865 deformação de dupla trissubstituída.

850 deformação de dupla trissubstituída.

ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PROTÔNICA

O espectro de prótons apresentou as seguintes absorções :

Fig 15

11,0 - (1H,s)

5,82 a 5,55 (1H,m)

5,1 - 5,0 (1H,d)

4,85 - (1H,d)

4,75 - (1H,d)

1,25 - (3H,s)

1,00 - (3H,s)

0,6 - (3H,s)

ESPECTROMETRIA DE MASSA

O espectro de massa do composto indicou os seguintes fragmentos : m/e

Fig 16

M^+ 302, 257, 234, 167, 121, 91, 79.

ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C

Dados de RNM ^{13}C de ent-pimara 8(14) 15 dien-19 óico

Fig 17

Amostra de CR-2 *

Valôres entre parênteses da literatura **

C_1 : 38.978(39,3), C_2 : 19,16(19,3), C_3 : 38,18(38,0),

C_4 : 44,10(44,1), C_5 : 56,04(56,2), C_6 : 24,24(24,2), C_7 : 35,73(35,8), C_8 : 138,0(137,9), C_9 : 50,44(50,6), C_{10} : 39,22(39,3), C_{11} : 19,60(19,6), C_{12} : 36,41(36,5), C_{13} : 38,46(38,5), C_{14} : 127,85(128,0), C_{15} : 147,19(147,0), C_{16} : 112,78(112,9), C_{17} : 29,66(29,40), C_{18} : 29,30(29,2), C_{19} : 177,94(184,5), C_{20} : 13,53(13,9), C_{21} : 51,13.

* CR-2 na forma esterificada

** Referência dados da literatura (52)(5).

IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A substância CR-2 foi cromatografada utilizando-se o sistema cromatográfico 3, apresentando o valor de $R_f=0,5$. Tal componente, pertencente à categoria dos diterpenos, apresentou mancha de formato característico no cromatograma, em forma de rastro e de coloração violeta após revelação.

A análise espectral no infravermelho, ressonância magnética de prótons e a espectrometria de massa, bem como o ponto de fusão e o R_f da substância CR-2 identificam-na como sendo o ácido pimaradiênico(54).

4.2.2.3 Análise da fração 45-48

A substância CR-3 foi comparada através do sistema cromatográfico 4, com o padrão de cumarina. O R_f do padrão e da amostra foi de 0,8. Os pontos do cromatograma tornaram-se fluorescentes após aspersão com solução de NaOH a 20% e observação no ultravioleta a 366 nm.

IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CR-3

PONTO DE FUSÃO : 68 - 70 °C

ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO:

O espectro no infravermelho da substância CR-3 mostra as seguintes absorções :

Fig 18

$\nu(\text{cm}^{-1})$

- 1720 estiramento C=O
- 1620 estiramento de dupla conjugada de aromático.
- 1560 estiramento C=C de aromático
- 1120 estiramento C-O de éster.
- 775 deformação C-H de aromático, 4H adjacentes.

ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PROTÔNICA

O espectro de prótons apresentou as seguintes absorções

6,33 7,02 7,52 7,65.

Fig 19

IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A substância CR-3 foi cromatografada utilizando-se o sistema cromatográfico 4, que apresentou valor de 0,8 para o Rf. Tal componente pertence à categoria das cumarinas simples, mostrando fluorescência amarela intensa após revelação com NaOH a 20% e observação sob luz UV 366 nm.

A análise espectral no infravermelho, por ressonância magnética protônica, ponto de fusão e Rf da substância CR-3 identificam-na como sendo cumarina.

4.2.3 Análise cromatográfica do extrato fluido de *Mikania smilacina* DC.

Sistema cromatográfico 4

TABELA

hRf	Forma	Cor(UV)	Intensidade	F-48	Cumarina
0,00	circular	escura	+ + +	---	---
12,0	meia lua	amarelo	+ +	---	---
21,0	circular	escura	+	---	---
63,0	circular	azul	+	---	---
78,0	circular	amarelo	+ + +	+ + +	+ + +

hRf	Forma	Cor	Cor	Intensidade
		Sulfovanílico	Anisaldeído	
0,00	arredondada	marrom	marrom	+ + +
12,0	arredondada	cinza	rosa	+ +
16,0	arredondada	---	rosa	+
21,0	arredondada	roxo	rosa	+ +
45,0	arredondada	roxo	rosa	+ +
70,0	arredondada	roxo	---	+

4.2.4 Determinação quantitativa de cumarina no extrato de *Mikania smilacina* DC

Sistema cromatográfico 4

Padrão de cumarina utilizado na diluição 0,1 a 0,01%

Filtro de 485 nm

Leitura de manchas em densitômetro

Área dos picos estabelecida por triangulação e expressa em cm²

Teor de cumarina no extrato

DOSEAMENTO DENSITOMÉTRICO *Mikania smilacina* DC

Gráfico densitométrico com picos de diferentes áreas
 proporcionais à concentração das substâncias.
 Concentração padrão variando de 0,1 à 0,01 g/mL
 Concentração da amostra 0,032 à 0,035% m/v

4.2.5. Análise de óleo essencial

O rendimento de óleo essencial foi de 1,7 ml, o que corresponde a teor de óleo essencial igual a 0,34%. A composição química do óleo essencial e a porcentagem de alguns de seus componentes encontra-se na tabela que segue:

Constituintes do óleo essencial de *Mikania smilacina* DC e respectivas porcentagens

TABELA

PICO nº	SUBSTÂNCIA	%
1	alfa-pineno	3,91 (1)
2	sabineno	0,98 (2)
3	limoneno	14,83(3)
4	Alcool alfa,4-dimetil benzílico	12,61(4)
5	Derivado dimetilado do estireno	5,86
6	Terpinoleno	4,25 (5)
7	biciclo(6.1.0) nonano,9-(1-metiletilideno)	0,93 (6)
8	ciclo-hexeno, 1,5,5-trimetil-6-(2-propenilideno)	0,52
9	ciclo-hexeno, 1-(propinil)	1,34
10	2H-1,6 benzoxazocin-5-(6H)one,3,4-dihidro	0,61
11	2(1H) azulenona, 4,5,6,7,8,8a-hexahidro-8a-metil	6,78(7)
12	etanona,1(octahidro-3-hidroxi-7A-metil-5-(1 metil-etenil)	0,31
13	2,6,10 dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimetil	3,78
14	1-heptanol, 2-propil	0,49
15	1- noneno, 4,6,8- trimetil	0,49
16	espiro(4,5)dec-7-eno,1,8-dimetil-4-(1-metileteni)	0,27
17	3-metil- 1,4-heptadieno	0,09
18	Metilester do ácido 2-metil octanóico	0,03
19	2,4,4- trimetil hexano	0,08
20	ciclopentano, 2-metil-1-metileno-3-(1-metileteni)	0,03
21	2- metil, undecano	0,05
22	4-metil-2-propil 1-pentanol	0,12
23	3-etil, 3-pentanol	0,11
24	octadecano	1,9
25	N- etil acetamida	0,11
26	Hexatriacontano	0,71
27	2-metil dodecano	0,35
28	3-3- dimetil heptano	0,20

Cromatograma através do ICEX-UFMG (gás-massa)
Dra. Maria Auxiliadora Fontes Prado.

Fig10 Espectro de infravermelho do ácido caurenóico

varian instruments

palo alto, california

Fig 11 Espectro de ressonância magnética protônica do ácido caurenóico

Fig 12 Espectro de massa do Ácido caurenóico

Fig14 Espectro de infravermelho do ácido pimaradiênico

Scan 469 (10.220 min) of DATA:1721B.D

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
41.15	4	106.05	6	145.20	7	188.15	2
43.15	3	107.20	22	146.20	3	189.15	2
45.15	1	108.20	4	147.20	10	191.15	1
51.15	1	109.20	8	148.20	10	193.15	1
53.15	2	110.20	1	149.20	6	199.15	1
55.05	7	111.20	2	150.20	1	201.25	2
56.05	1	113.05	1	151.20	1	202.25	1
57.05	2	114.20	1	152.20	1	203.15	1
59.05	1	115.05	6	153.20	1	205.15	1
65.05	3	116.05	2	154.20	1	206.15	1
66.05	1	117.20	9	155.20	1	207.15	1
67.05	6	118.20	3	156.20	1	208.15	1
68.05	1	119.20	22	157.20	2	213.25	1
69.05	4	120.20	7	158.20	1	215.25	1
70.20	1	121.20	100	159.20	7	216.25	1
71.05	1	122.20	13	160.20	2	219.15	1
77.05	10	123.20	29	161.20	4	220.25	1
78.05	3	124.20	3	162.15	1	227.25	1
79.05	19	125.20	3	163.15	1	232.25	1
80.05	3	126.20	1	164.15	1	234.25	2
81.05	14	127.20	1	165.15	1	241.25	6
82.05	2	128.05	4	166.15	20	242.25	1
83.05	2	129.20	4	167.15	26	243.15	1
85.05	1	130.20	2	168.15	3	245.25	1
87.05	2	131.20	7	169.15	1	256.25	1
91.05	29	132.20	2	171.15	2	257.25	7
92.05	8	133.20	24	172.15	1	258.25	2
93.05	23	134.20	22	173.15	3	259.25	1
94.05	5	135.20	19	174.15	1	260.25	1
95.05	11	136.20	9	175.15	3	261.25	1
96.05	1	137.20	2	176.15	1	269.25	1
97.05	3	138.20	1	178.15	1	273.20	1
99.05	4	139.20	27	180.15	4	274.20	1
100.05	1	140.20	3	181.15	1	284.20	1
102.05	1	141.20	2	183.15	1	287.20	9
103.05	3	142.20	1	185.15	3	288.20	2
104.05	2	143.20	3	186.15	1	302.20	17
105.05	24	144.20	1	187.15	5	303.20	4

Fig 16 Espectro de massa do ácido pimaradiênico

Fig 17 Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do ester metílico do ácido pimaradiênico

Fig 19 Espectro de ressonância magnética protônica da
cumarina

Fig 18. Espectro de infravermelho de cumarina

4.3- Farmacologia

4.3.1. Atividade anticoagulante

Os resultados obtidos no ensaio de atividade anticoagulante não mostraram alteração dos tempos normais de coagulação do sangue. Tanto as medidas de tempo de protrombina realizadas em 3 horas após a retirada do sangue dos animais tratados e do grupo controle após 40 dias, e testadas com o reativo, quanto as medidas realizadas com as amostras de sangue após a administração da substância pura (derivado cumarinico 200mg/ml água após 24 horas), não apresentaram variações significativas dos tempos normais de coagulação.

TABELA

Determinação do tempo de coagulação

Animais N°	Salina	Extrato	Substância isolada
	t(s)	t(s)	t(s)
1	23,0	22,0	20,0
2	19,0	17,0	18,0
3	21,0	19,0	18,0

4.3.2. Toxicidade subaguda

Os resultados deste ensaio não indicaram qualquer manifestação tóxica dos extratos administrados aos animais. Houve aumento progressivo de peso corporal no decorrer dos dias, em ambos os grupos, controle e tratados com o extrato. O crescimento ligeiramente maior foi observado no grupo controle, sem contudo apresentar diferença significativa em relação ao tratado com o extrato. Os exames anátomo-patológicos não mostraram lesões dignas de nota, tanto nos animais de 15 dias de tratamento quanto nos de 40. (Foto 13 e 14) Fig-20

Efeito do extrato fluido de Mikania smilacina DC no crescimento dos ratos

Foto 13 Corte histológico do fígado de rato normal. HE

Foto 14 Corte histológico do fígado de rato tratado com o extrato bruto de *Mikania smilacina* DC HE

4.3.3. Atividade antimicrobiana

O extrato mole foi ativo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, sendo a concentração biostática mínima igual a 10 mg/mL. Entretanto, pela técnica de difusão em gel, a concentração de 60 mg/mL não apresentou halo de inibição de crescimento, mesmo após prolongado período de pré-difusão. Da mesma forma, o ácido caurenóico não apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

Diluição em meio líquido:

Extrato mole em solução mg/ml

Microrganismo	12	10	8	6	4	2
<i>S aureus</i>	-	-	+	+	+	+
<i>E coli</i> +	+	+	+	+	+	
<i>C albicans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>A niger</i> +	+	+	+	+	+	

Ação biostática contra *S. aureus*

Difusão em gel

Extrato mole não apresenta atividade inibitória

Ácido caurenóico não apresenta atividade inibitória

4.3.4. Atividade antiinflamatória

Conforme mostra o gráfico, o extrato, testado em duas doses, não exibiu efeito inibitório, no edema de pata induzido pela carragenina. A fenilbutazona (100 mg/kg) inibiu acentuadamente o edema.

Efeito do extr fluido conc. M. smilacina DC no edema induzido pela carragenina

CAPÍTULO V

5- DISCUSSÃO

5.1 Botânica

5.1.1 Considerações gerais

Segundo Oliveira e Akisue (62), os nomes regionais das plantas com frequência constituem causa de erro na identificação de drogas. Estes nomes, ou seja, os nomes populares das plantas, variam muito de um lugar para outro e é comum designar-se plantas diferentes por um mesmo nome. Assim, por exemplo, o nome jaborandi é dado pela Farmacopéia Brasileira (1º edição) para as espécies *Pilocarpus jaborandi* Holmes, *Pilocarpus microphyllus* Stapf. e *Pilocarpus pennatifolius* Lem. Pelo nome jabórandi o povo brasileiro conhece além das três espécies oficiais citadas outras pertencentes a gêneros e famílias diversas. Assim, no interior do Estado de São Paulo, diversas espécies de *Piper* e de *Ottonia*, gêneros pertencentes à família *Piperaceae*, são conhecidas por jaborandi. O nome vulgar sete-sangrias não fugiu a esta regra quase que geral. Pio Corrêa (20) registra 14 espécies diferentes com este nome. Estas espécies pertencem às famílias *Lythraceae*, *Boraginaceae* e *Symplocaceae*. Para Pio Corrêa são denominados de sete sangrias as espécies: *Cuphea aperta* Koehne, *Cuphea balsamona* Cham, *Cuphea glutinosa* Cham et Schl, *Cuphea ingrata* Cham. et Schl, *Cuphea ligustrina* Cham et Schl, *Cuphea lysimachioides* Cham, *Cuphea organifolia* Cham. Schl, *Cuphea spicata* Cav.; pertencentes à família *Lythraceae*. *Heliotropium clausenii* DC, *Heliotropium lanceolatum* Sofgr., *Lithospermum officinale* L., *Lithrum hyssopifolia* L., pertencentes à família *Boraginaceae* e *Symplocos platyphylla* Benth, *Symplocos pubescens* Klotsch pertencentes à família *Symplocaceae*. Toursarkissian (77), tratando das plantas

medicinais da Argentina, menciona 6 *Lythraceae* pertencentes ao gênero *Cuphea* como denominadas pelo nome de sete sangrias (siete sangria).

Conceição (19) e Carvalho(13) reconhecem como sete- sangrias a espécie *Cuphea ingrata* Cham et Schl. Ratera et Ratera (69) Balbach (2) atribuem o nome sete-sangrias a espécies do gênero *Cuphea*. Freise (27), atribui o nome de sete sangrias a espécies do gênero *Heliotropium*. Lourteig, ao tratar da família *Lythraceae* para a Flora de Santa Catarina menciona 21 espécies de *Cuphea*, todas conhecidas com o nome de sete- sangrias.

Embora o nome de sete sangrias ou guaco de sete sangrias possa ocasionar enganos, no que se refere à identificação da droga elaborada com *Mikania smilacina* DC é relativamente fácil a diferenciação da espécie em estudo das outras sete sangrias. Assim, as espécies conhecidas com o nome de sete sangrias pertencentes ao gênero *Cuphea*, apresentam folhas de dimensões pequenas geralmente de tamanho menor que 10 cm e nunca de nervação reticulada.

Cumpre mencionar ainda, que o nome de sete sangrias é empregado com maior frequência para espécies do gênero *Cuphea*. A Central de Medicamentos, em seu projeto de estudo de plantas medicinais brasileiras, selecionou a espécie *Cuphea antisiphylitica* HBK para estudo, atribuindo-lhe o nome vulgar de sete sangrias.

Existe pois conveniência de preceder sempre a palavra guaco ao nome de sete-sangrias, quando for objetivo se referir a, *Mikania smilacina* DC.

5.1.2 Morfologia externa e anatomia de *Mikania smilacina* DC

Mikania smilacina DC, pertence à seção *Globosae* Robinson que, no Brasil, se acha representada por oito espécies, todas portadoras de folhas opostas inteiras, de capítulos sésseis dispostos em glomérulos densos e conhecidas vulgarmente pelo nome de guaco(3).

Segundo o critério de Baker (1), estas oito espécies, em conjunto com outras não pertencentes à seção criada por Robinson, encontram-se reunidas na seção *Mikania corymbosae* volubilis Baker, em função de possuir ramos flexuosos ou volúveis e inflorescência em forma de corimbo. Este último autor dividiu a seção em séries, valendo-se do caráter forma das folhas. Para

Baker, *Mikania smilacina* DC pertence à série *Ecordatae* DC da seção *Mikaniae corymbosae volubilis* Baker, visto possuir folhas de contorno foliar oval. As folhas quinquenervadas e reticuladas de *Mikania smilacina* DC constituem característica diferencial de grande importância e permitem separar, com facilidade, esta espécie das outras sete que constituem com ela, a seção *Globosae* Robinson brasileira e portanto diferenciá-la dos outros guacos

O gênero *Mikania* Willd. é mal estudado do ponto de vista da anatomia. Metcalfe e Chalk (53) não incluíram este gênero entre os estudados, quando trataram da anatomia de *Compositae* Gaertner. Oliveira (61), após estudar anatomicamente *Mikania hirsutissima* DC (guaco cabeludo ou cipó cabeludo) e as espécies de *Mikania* Willd da seção *Globosae* Robinson (todas conhecidas pelo nome de guaco), afirma que as espécies estudadas apresentam mesófilo heterogêneo e assimétrico. Esta afirmação está de acordo com o encontrado por Metcalfe e Chalk, isto é, o mesófilo da grande maioria das *Compositae* Gaertner é bifacial (53).

Oliveira (65) cita como caráter importante na separação das espécies da seção *Globosae* Robinson a presença de camada subepidérmica aclorofilada nas folhas, caráter este ausente em *Mikania smilacina* DC.

Os estômatos de *Mikania smilacina* DC seguem o padrão observado para o gênero, isto é, são do tipo anomocítico. Já os pêlos glandulares encontrados na espécie em estudo diferem do tipo mais freqüentemente encontrado em *Mikania* Willd. O pêlo glandular mais freqüente em *Mikania* Willd apresenta pedicelo pluricelular unisseriado encimado por glândula unicelular. Este tipo de pêlo apresenta-se tipicamente encurvado e geralmente preso a regiões epidérmicas representadas por pequenas áreas deprimidas. Os pêlos glandulares de *Mikania smilacina* DC não são encurvados, são constituídos por uma ou duas células fixadas a regiões epidérmicas localizadas em nível normal.

O caule da planta em estudo é do tipo eustélico, como na maioria das *Compositae* Gaertner. A presença de canais secretores localizados na região cortical, junto à endoderme, e na região medular, junto aos feixes vasculares, como acontece a *Mikania smilacina* DC, também é característica freqüente em *Compositae* Gaertner. Detalhe morfológico mais significativo para a diagnose do guaco de sete sangrias é dado pela região colenquimática tanto de folha como do caule que sofre caracteristicamente espessamento de lignina quando os órgãos ficam mais velhos.

Já as partes reprodutivas do vegetal apresentam características que podem ajudar na identificação do vegetal e da droga. Entretanto, estas características são muito freqüentes em toda a família *Compositae* Gaertner, o que diminui um pouco a importância. Apresentam significado maior entre as referidas características a inflorescência em forma de glomérulos de capítulos nos quais as lacínias das floretas e as brácteas involucrais apresentam-se ciliadas.

Do ponto de vista biológico é de se notar o aspecto escleromórfico de todas as partes do vegetal. *Mikania smilacina* DC é planta de cerrado e o seu escleromorfismo acentuado está de acordo com o seu habitat natural.

5.2 Química

5.2.1 Reações genéricas de identificação

As reações genéricas de identificação de classes de princípios ativos levaram a constatação à indicação da presença de alcalóides, cumarinas, óleo essencial, flavonóides, saponinas e taninos.

Os testes para alcalóides deram resultados fracamente positivos, resultados esses que poderiam estar relacionados com a presença de cumarinas no vegetal. Fong et al (26), tratando da abordagem fitoquímica de plantas dos Estados Unidos, aponta com muita propriedade o fato de extrato de vegetais possuidores de cumarina e seus derivados darem reações de precipitação com reativos de Mayer, Bouchardat, Bertrand e Dragendorff. A constatação da presença de cumarina em todas as partes do vegetal, confirmada por seu isolamento e identificação, bem como a verificação de outra substância não identificada, porém de características cromatográficas bastante parecidas com as da substância anterior, levaram a crer na possibilidade de resultado falsamente positivo para alcalóides.

Os extratos hidroalcoólicos da droga deram reação positiva com a solução de cloreto de alumínio e com o reativo de Shinoda. Este fato indica a presença de flavonóides na droga, confirmada por ocasião da obtenção do óleo essencial. Nesta oportunidade, submeteram-se folhas do vegetal em misturas com sumidades floridas à destilação por arraste à vapor em aparelho de Clevenger. Obteve-se, assim, óleo essencial de coloração amarelo-esverdeada. A água residual desta destilação contida no balão do aparelho de Clevenger foi extraída com acetato de etila. O extrato em acetato de etila por evaporação levou a resíduo que apresentou reação positiva para flavonóides. Deste resíduo separou-se, por sublimação, substância cristalina, em forma de pequenas agulhas, a que, em função da quantidade, não foi identificada.

A presença de saponinas também pode ser constatada. Assim o extrato aquoso da droga apresentou atividade afrogênica, bem como atividade hemolítica após sua isotonzificação. Acredita-se, entretanto, com base no ensaio

realizado, embora não tenha sido efetuado ensaio quantitativo, que o teor de saponina presente seja pequeno. Por outro lado, foram, obtidas reações positivas com a solução de cloreto férrico, acetato de chumbo e acetato de cobre, reações estas indicadoras da presença de taninos. Entretanto, a planta não apresenta sabor adstringente. A presença de taninos do vegetal deve ser muito pequena ou mesmo esta classe de substância pode até nem existir, possibilidade esta na qual as reações positivas mencionadas poderiam ser atribuídas à presença de outros compostos fenólicos, como por exemplo flavonóides.

5.2.2- Análise do Extrato hexânico

-Substância CR-1

O espectro no infravermelho revelou a presença de absorção em 3100 cm^{-1} , interpretado como estiramento O-H de carboxila, bem como absorção em 1690 cm^{-1} , correspondente a estiramento C=O. Estes achados, ao lado do fragmento m/e 257 do espectro de massa (M-COOH), levou à conclusão que a substância CR-1 tratava-se de um ácido carboxílico. Já a absorção no IV a 880 cm^{-1} foi interpretada como pertencente a grupo metileno terminal.

O espectro de ressonância magnética protônica mostrou, ainda, os seguintes sinais: $0,95\ \delta$ singlete correspondente a 3 H do carbono C20 ; $1,3\ \delta$, singlete correspondente a 3 H do carbono C18 ; $2,1\ \delta$ referentes a 2 H de grupo CH₂= em α do metileno terminal; $2,6\ \delta$, dublete largo referente a 1 H do C13 ;

4,8 δ , dublete largo referente a 2 H de grupo metileno terminal. A integração do espectro de ressonância protônica demonstrou a presença de 30 prótons.

O espectro de massa mostrou a presença dos seguintes fragmentos: M^+ 302 ; 287 ($M-CH_3$); 259($M-C_3H_7$); 257($M-CHO_2$) ; 256($M-CH_2O_2$); 243($M-C_4H_{11}$), além de outros.

O espectro de ^{13}C mostrou a presença de 20 átomos de carbono, sendo que um deles apareceu desdobrado em dois picos (39,20 e 39,11).

A diferença nos valores dos C_4 , C_{18} e C_{19} principalmente se deve ao fato de que os dados da literatura correspondem ao ent-kaurene (37) que possui duas metilas ligadas ao C_4 . Para o caso do componente isolado, o C_{19} apresentou valor de deslocamento elevado nos levando a concluir ser um carbono de carboxila. Devido a isto, o C_4 e C_{18} apresentaram valores deslocados com referência àqueles da literatura (37).

Os dados espectrais no infravermelho, de ressonância protônica, de ^{13}C e espectrometria de massa, bem como o ponto de fusão, levaram à conclusão de que o composto CR-1 trata-se do ácido caur-16-en-19-óico. Esta conclusão foi confirmada através de cromatografia em camada delgada por comparação com amostra autêntica cedida pelo Prof. Dr. José Muradian, do IQUSP.

-Substância CR-2

A substância CR-2 apresentou-se em forma de cristais brancos transparentes e que fundiam no intervalo de 148 a 152 °C. O espectro no IV de CR-2 apresenta características de substâncias alifáticas ácidas tais como: banda larga na região de 3600 a 2500 cm^{-1} centrada em frequência $\sqrt{3000 \text{ cm}^{-1}}$, interpretada como referente a estiramento O-H e absorção em 1695 cm^{-1} , referente a estiramento C=O de carboxila. Este espectro permite ainda observar absorção em 1660 cm^{-1} correspondente a estiramento de C=C endocíclico, absorção em 998 e 917 cm^{-1} , correspondente à deformação de dupla ligação monossubstituída de grupo vinila, e absorção em 865 e 850 cm^{-1} de deformação de dupla ligação trissubstituída.

O espectro de RMN ^1H confirma a hipótese de substância ácida ao apresentar absorção em 11 δ . O espectro apresenta ainda : bandas na região de prótons olefínicos localizada entre 6,0 δ e 4,75 δ . A análise mais detalhada

da região dos prótons olefinicos mostra: multipeto em 5,82 δ - 5,55 δ referente a 1 H vinílico (a); 4,85 δ , dupeto de 1 H dupla vinílica (b); 4,75 δ , dupeto de 1 H dupla vinílica (c); 5,1-5,0 δ , dupeto de banda larga correspondente a 1 H de dupla endocíclica; 1,25 δ , referente a prótons de metila no C18; 1,00 δ , referente a prótons de metila do C13; 0,6 δ , referente a metila do C10, multipeto entre 2,4 δ e 1,2 δ , referente a CH₂ e CH do esqueleto.

O espectro de massa revela a presença de ion molecular de massa 302. Observaram-se, também, os seguintes fragmentos:

257 (M-CHO₂), 167 (C₁₀H₁₅O₂), 121 (C₁₀H₁₅O₂ - HCO₂H) além de outros.

O espectro de ¹³C foi obtido a partir de uma amostra previamente esterificada, notando-se a presença de um pico em 51,13 correspondente ao C₂₁. Os deslocamentos químicos dos demais C estão condizentes com aqueles apresentados na literatura(52).

De acordo com os dados espectrais, chegou-se à conclusão de que o composto CR-2 é um diterpeno ácido de esqueleto pimarânico.

Comparando-se os dados obtidos pela análise espectrométrica com os apresentados por Matsuo (52), referentes à identificação de um novo ent-pimarano, concluiu-se que a substância CR-2 trata-se do ácido ent-pimara 8(14), 15-dien-19-óico.

-Substância CR-3

A substância CR-3, constituída por cristais brancos em forma de agulha, possuía odor intenso lembrando o da cumarina. Este fato, e o trabalho executado por Oliveira (65), referente a seção *Globosae* Robinson do gênero *Mikania Willdenow* e que engloba a espécie ora em estudo, levou à hipótese de a substância em questão tratar-se de cumarina. A espectroscopia no infravermelho e de ressonância magnética protônica confirmaram esta hipótese. Assim, a análise RMN ^1H revela somente a presença de prótons aromáticos e olefínicos. Nestes espectros fica evidenciada a presença de dois prótons olefínicos em *cis* acoplados, a 6,33 δ e de um multiplete referente a quatro prótons aromáticos entre 7,2 e 7,9 δ .

O espectro no IV mostrou absorção em 1720 cm^{-1} , interpretada como estiramento C=O de *alfa*-pironas. Apresentou, ainda, em 1620 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} banda referente a estiramento de C=C de aromático. Absorções em 1120 cm^{-1} e 750 cm^{-1} foram atribuídos, respectivamente, a estiramento C-O de lactonas e deformação C-H de aromático com 4 H adjacentes.

Confirmou-se, também, a identidade de CR-3 com cromatografia em camada delgada frente a padrão autêntico de cumarina.

5.2.3- Análise cromatográfica do extrato fluido e quantificação de cumarina.

O extrato fluido submetido a análise cromatográfica em camada delgada, permitiu evidenciar pelo menos a presença de oito substâncias cujos hRf nos sistemas empregados são: 0,0 ; 12,0 ; 16,0 ; 21,0 ; 45,0 ; 63,0 ; 70,0 e 78,0.

Quando empregamos o reativo sulfovanílico nota-se a presença de tres manchas principais a saber : hRf : 12,0 ; 21,0 e 45,0. Neste sistema de revelação a cumarina empregada como padrão não é visualizada. A coloração das manchas mencionadas são respectivamente cinza, violeta e rosa.

Quando empregamos como revelador o anisaldeído, as tres manchas mencionadas podem ser evidenciadas. Todas elas adquirem coloração rosa.

O revelador que melhor serviu para caracterizar o extrato fluido de *Mikania smilacina* DC foi a solução de hidróxido de sódio a 20% em água,

seguido de observação a luz ultravioleta de 366 nm. Nestas circunstâncias o cromatograma evidencia a presença pelo menos de cinco substâncias destacando-se pela importância as manchas de hRf 12,0 e 78,0 dotadas de fluorescência amarela. A mancha de hRf 78,0 coincidiu com as características da cumarina padrão, bem como da fração 48 do extrato hexânico.

O perfil cromatográfico do extrato fluido neste último sistema é dado pela seguinte sequência de manchas de hRf iguais a : 0,0 (circular escura), 12,0 (em forma de meia lua e cor fluorescente amarela), 21,0 (circular escura), 63,0 (circular fluorescente azul), 78,0 (circular fluorescente amarela).

A quantificação da cumarina no extrato fluido de *Mikania smilacina* DC, por densitometria em placa cromatográfica foi executada com relativa facilidade já que se conseguiu boa separação das substâncias no sistema empregado.

5.2.4- Estudo do óleo essencial

O teor de óleo essencial em plantas do gênero *Mikania* não é muito alto. Assim, *Mikania micrantha* HBK, *Mikania congesta* DC, *Mikania banisteriae* DC e *Mikania amara* Baker, apresentaram, respectivamente, 0,8%, 0,2%, 0,1% e 0,1% de óleo essencial em plantas submetidas à secagem. *Mikania smilacina* DC apresentou 0,34% de óleo essencial na planta verde.

O óleo essencial de *Mikania smilacina* DC apresentou em sua composição química a presença de pelo menos 67 compostos dos quais logrou-se a identificação de 28. O componente identificado que apresentou maior porcentagem na composição do óleo foi o limoneno. Silva et al(74), estudando comparativamente os componentes do óleo essencial de três espécies de *Mikania* da Amazônia, encontrou 43,3% de *alfa*- pineno em *Mikania banisteriae* DC, como componente em maior concentração. *Mikania congesta* DC e *Mikania amara* Baker, apresentaram, respectivamente, como componente mais importante o *beta* -culubeno (19,5%) e o tetradecanal (26,3%). Nicollier e Thompson (58), estudando *Mikania micrantha* HBK, encontrou 21,64% de sesquiterpenos e 15,1% de linalol.

O *alfa* –pineno está presente em *Mikania smilacina* DC, e também nas espécies *Mikania banisteriae* DC e *Mikania congesta* DC.

Mikania smilacina DC apresenta como componentes mais importantes em seu óleo essencial o limoneno, um derivado do álcool *alfa* -4-dimetilbenzílico.

5.3 Farmacologia

5.3.1 Atividade anticoagulante

A ausência de efeito anticoagulante, nos testes realizados em diversas condições vem confirmar a hipótese de que tal componente cumarínico presente no extrato apresente núcleo simples de cumarina e, portanto, desprovido de ação anticoagulante (48).

5.3.2 Toxicidade subaguda

A ausência de qualquer sinal de intoxicação, em ratos submetidos à dose de 100 mg/kg por 40 dias, assim como o crescimento normal dos animais no decorrer do experimento (Fig 20) indicam que o extrato é pouco tóxico.

5.3.3. Atividade antimicrobiana

A presença de derivados diterpênicos em diversas espécies do gênero *Mikania*, também confirmada na espécie em estudo, motivou a avaliação da atividade antimicrobiana no extrato mole. Ao lado deste fato, a publicação de dados conflitantes (49,51) entre alguns estudos, no tocante à atividade biológica do ácido caurenóico, corroborou para a necessidade de comprovação dos resultados. Pelos dados encontrados no teste de diluição seriada, o extrato apresenta composição cuja atividade inibitória de crescimento é baixa, uma vez que se mostrou bacteriostático na concentração de 10 mg/mL, apenas frente a *Staphylococcus aureus*. Pela prova de difusão em gel, nem mesmo a concentração de 60 mg/mL, ainda com tempo de pré-difusão bastante longo, foi capaz de acusar inibição de crescimento. Evidentemente que resultados idênticos não podem ser obtidos pelos ensaios em que os princípios envolvidos são completamente diferentes. A baixa sensibilidade do teste com difusão em gel, pode, muitas vezes, ser devida à características físico-químicas da substância, com coeficiente de difusão muito pequeno.

5.3.4. Atividade antiinflamatória

Quanto à atividade antiinflamatória, o extrato não evidenciou potência antiedema no teste realizado com o método da carragenina. Este resultado indica que o extrato é provavelmente desprovido de propriedade antiflogística, porquanto o método é bastante sensível aos agentes antiinflamatórios, esteróides e não esteróides.

CONCLUSÕES

O estudo elaborado permite chegar as seguintes conclusões

- 1- São características importantes na identificação da droga comercializada como guaco-de-sete-sangrias:

Características macroscópicas: fragmentos de caules estriados longitudinalmente, providos de região de nó bem evidente de onde partem folhas opostas: presença de folhas de contorno ovalado de ápice acuminado e de base arredondada. A nervação é caracteristicamente reticulada e toda a droga possui marcante odor que lembra a cumarina.

Características microscópicas: caule do tipo sifonostélico ectoflóico descontínuo (eustele); presença de canais secretores tanto na região cortical como na região medular do caule e na nervura das folhas; periciclo fibroso descontínuo em forma de calota protegendo a região floemática; presença de braquiesclerito na região do pecíolo; presença de colênquima que sofre lignificação tanto nas folhas como no caule; feixes vasculares do tipo colateral aberto acompanhado de canais secretores ; pêlos glandulares de pedicelo unisseriado e glândula unicelular nas folhas; mesofilo heterogêneo e assimétrico; brácteas providas de cílios no ápice ; ausência de cristais de oxalato de cálcio.

- 2- A abordagem fitoquímica permitiu prever a existência de óleo essencial, cumarina, flavonóides, saponinas e compostos fenólicos.
- 3- São componentes do extrato hexânico elaborado a partir da droga; ácido caurenóico, ácido pimaradiênico e a cumarina.
- 4- São componentes do óleo essencial do vegetal :

alfa-pineno, sabineno, limoneno, álcool alfa, 4-dimetil benzílico, derivado dimetilado do estireno, terpinoleno, biciclo(6.1.0) nonano, 9-(1- metiletilideno), ciclo-hexeno, 1,5,5-trimetil-6-(2-propenilideno), ciclo-hexeno, 1-(propinil), 2H-1,6 benzoxazocin-5-(6H) ona 3,4-dihidro, 2(1A) azulenona, 4,5,6,7,8,8a-hexahidro-8a-metil, etanona, 1(octahidro-3-hidroxi-7A-metil-5-(1 metil-etênil), 2,6,10 dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimetil, 1-heptanol 2-propil, 1-noneno, 4,6,8- trimetil, espiro(4,5)dec-7-eno,1,8-dimetil-4-(1-metiletenil), 3-metil-1,4-heptadieno, metilester do ácido 2-metil octanóico, 2,4,4- trimetil hexano, ciclopentano, 2-metil-1-metileno-3-(1-metiletenil), 2-metil, undecano, 4-metil-2-propil 1-pentanol, 3-etil,3-pentanol,octadecano, N-etil acetamida, hexatriacontano, 2-metil dodecano, 3-3- dimetil heptano.

- 5- O teor de cumarina no extrato fluido varia de 0,032 a 0,035% m/v.
- 6- O perfil cromatográfico do extrato fluido em-pregando silica gel G como fase estacionária e benzeno: acetato de etila 7:3 como fase móvel e solução de hidróxido de sódio a 20% como revelador mostra caracteristicamente a seguinte sequência de manchas com hRf seguintes: 0,0 (circular escura), 12,0 (em forma de meia lua e amarelo fluorescente), 21,0 (circular escura), 63,0 (circular fluorescente azul), 78,0 (circular fluorescente amarela coincidente com o padrão de cumarina).
- 7- O extrato fluido não apresentou toxicidade subaguda significativa.
- 8- O extrato fluido não apresentou atividade an-ticoagulante nas condições experimentais
- 9- O extrato fluido apresentou baixa atividade microbiana contra *Staphylococcus aureus*
- 10- O extrato fluido não apresentou atividade antiinflamatória nas condições experimentais.

RESUMO

Mikania smilacina DC vulgarmente denominada de guaco-de-sete-sangrias, utilizado como antiinflamatório buco-dentário, no tratamento da hipertensão, de urticária e como diurético, foi caracterizada farmacognosticamente.

A morfologia externa e interna da planta e da droga com ela elaborada foi estudada detalhadamente. Desenhos e fotografias das estruturas analisadas ilustram o trabalho.

O estudo químico foi executado isolando-se e identificando-se substâncias presentes no extrato hexânico preparado a partir da droga. Assim, foi constatada a presença de ácido caurenóico, ácido pimaradiênico e de cumarina no referido extrato. A análise cromatográfica em fase gasosa seguida de identificação dos componentes por espectroscopia de massa acoplada a banco de dados permitiu verificar a presença dos seguintes componentes na fração óleo essencial:

alfa-pineno; sabineno; limoneno; álcool alfa 4-dimetil benzílico; derivado dimetilado do estireno; terpinoleno; biciclo(6.1.0) nonano, 9-(1-metiletilideno); ciclo-hexeno 1,5,5-trimetil-6-(2-propenilideno); ciclo-hexeno, 1-(propinil); 2H-1,6 benzoxazocin-5-(6H)ona, 3,4-dihidro; 2(1A) azulenona, 4,5,6,7,8,8a-hexahidro-8a-metil; etanona, 1 octahidro-3-hidroxi-7a-metil-5-(1metil- etenil); 2,6,10 dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimetil; 1- heptanol, 2 propil; 1-noneno, 4,6,8- trimetil; espiro(4,5) dec-7-eno,1,8-dimetil-4-(1-metiletenil); 3-metil - 1,4-heptadieno; metilester do ácido 2-metil octanóico; 2,4,4-trimetil hexano; ciclopentano, 2-metil-1-metileno-3-(1-metiletenil); 2-metil, undecano; 4-metil-2-propil 1-pentanol; 3-etil, 3-pentanol, octadecano, N-etil acetamida, Hexatriacontano, 2-metil dodecano; 3-3-dimetil heptano. A quantificação da cumarina por cromatografia em camada delgada seguida de densitometria do extrato fluido foi também executada o que permitiu saber que a concentração desta substância no referido extrato varia entre 0,032 a 0,035 % m/v.

O perfil cromatográfico do extrato fluido foi melhor caracterizado quando empregamos hidróxido de sódio a 20% como revelador.

A atividade anticoagulante, antiinflamatória, antimicrobiana e toxicidade subaguda foi também executada.

A planta parece não possuir atividade anticoagulante e antiinflamatória possuindo baixa atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*.

O ensaio de toxicidade subaguda do extrato revelou ausência de sinais de intoxicação nas doses de até 100 mg/kg

SUMMARY

Mikania smilacina DC, which is commonly known as "guaco-de-sete-sangrias", was described pharmacognostically. It has been applied in folk medicine as an antiinflammatory teething agent, in treatment of hypertension, urticaria and for its diuretic properties.

The external and internal plant and drug morphology has been studied here in detail. Some illustration is made with pictures and photos of many structures.

Chemical study was made isolating and identifying components of the hexanic extract prepared from the plant. In this manner a kaurenoic acid, a pimaradienic acid and coumarin has been found in the extract of the plant.

Gas chromatography analysis followed by the identification of the components by mass spectroscopy connected to a databank detected the presence of the following components:

alfa-pineno; sabineno; limoneno; alcool alfa 4-dimetil benzílico; derivado dimetilado do estireno; terpinoleno; biciclo(6.1.0) nonano, 9-(1-metiletilideno); ciclo-hexeno 1,5,5-trimetil-6-(2-propenilideno); ciclo-hexeno, 1-(propinil); 2H-1,6 benzoxazocin-5-(6H)ona, 3,4-dihidro; 2(1A) azulenona, 4,5,6,7,8,8a-hexahidro-8a-metil; etanona, 1 octahidro-3-hidroxi-7a-metil-5-(1metil- etenil); 2,6,10 dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimetil; 1- heptanol, 2 propil; 1-noneno, 4,6,8- trimetil; espiro(4,5) dec-7-eno,1,8-dimetil-4-(1-metiletenil); 3-metil - 1,4-heptadieno; metilester do ácido 2-metil octanóico; 2,4,4-trimetil hexano; ciclopentano, 2-metil-1-metileno-3-(1-metiletenil); 2-metil, undecano; 4-metil-2-propil 1-pentanol; 3-etil, 3-pentanol, octadecano, N-etil acetamida, Hexatriacontano, 2-metil dodecano; 3-3-dimetil heptano.

Quantification of coumarin by thin layer chromatography followed by densitometry of the fluid extract has also been made and the concentration of the substance in the plant varies from 0,032 to 0,035 % m/v. The chromatographic profile of the fluid extract was better characterized when using a 20% sodium hydroxide solution as the revealer reagent. The anticoagulant, antiinflammatory and antimicrobial activity as well as its subagude toxicity has also been tested. The plant does not seem to present antiinflammatory or anticoagulant activity, and only low antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The subagude toxicity assay of the extract showed no intoxication signals when using doses up to 100 mg/kg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1-BAKER, J.G.- In: MARTIUS , C.F.P.- Flora brasiliensis. Lipsiae, 1876. v. 6(2), p. 217-72. t.61-72
- 2-BALBACH, A.- As plantas curam , São Paulo: Editora Missionária, "A verdade presente" p. 327.
- 3-BARROSO, G.M.- Micánias do Brasil. Arq. Jar. Botan. Rio de Janeiro , v.16, p. 239-333, 1960.
- 4-BARROSO, G.M.- Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade de Viçosa. 1986. v.3, p. 237-310.
- 5-BIER, R.- Stereochemical assignment at the ^{13}C carbon of pimaradienes by ^{13}C NMR . A reassessment. Org. Magn. Reson., London, v.11, p. 586, 1978.
- 6-BOHLMANN, F. , NATU, A.A, MAHANTA, P.K.- Neue Diterpene und Germacranolide aus Mikania Arten. Phytochemistry, New York, v.17, p. 483-5, 1978.
- 7-BOHLMANN, F., ADLER, A., KING, M.R., ROBINSON, H.- Ent-Labdanes from Mikania alvimii Phytochemistry , New York, v. 21, n.1, p.173-6, 1982.
- 8-BOHLMANN, F., SINGH, P., JAJUPOVIC, J., ROBINSON, H, KING, R.M.- An epoxygermacranolide and further constituents from Mikania species. Phytochemistry, New York, v.21, n.3, p. 705-7, 1982.
- 9-BOHLMANN, F., ADLER, A., JAKUPOVIC, J., KING, R.M., ROBINSON, H.-A dimeric germacranolide and other sesquiterpene lactones from Mikania species- Phytochemistry, New York, v.21, n.6, p. 1349-55, 1982.
- 10-BOHLMANN, F., ADLER, A., KING, R.M., ROBINSON, H.- Germacranolides from Mikania grazielae - Phytochemistry, New York, v.21, n.5, p.1169-70, 1982.
- 11-BOHLMANN, F., ADLER, A., SCHUSTER, A.GUPTA, R.K.KING, R.M. ROBINSON, H.- Diterpenes from Mikania species - Phytochemistry, New York, v. 20, n.8, p. 1899-902, 1981.

* De acordo com NBR-6023 AGO/1989 aconselhado pela ABNT.

- 12-BOHLMANN, F., TSANKOVA, E., KING, R.M., ROBINSON, H.-Five mikanolide derivatives from Mikania cynanchifolia and their biogenetic relationships. Phytochemistry, New York, v.23, n.5, p.1099-101, 1984.
- 13-CARVALHO, A. R.- A cura pelas plantas . São Paulo: Editora Falco Masucci, 1972. p.301-2.
- 14-CASTRO, V., JAKUPOVIC, J. - 4- beta, 19-Epoxy-norkaurene and other diterpenes from Mikania banisteriae Phytochemistry, New York, v.24, n.10, p.2450-1, 1985.
- 15-CASTRO, V., JAKUPOVIC, J., BOHLMANN, F.- Germacranolides from Mikania species. Phytochemistry, New York, v.28, n.2, p. 527-30, 1989.
- 16-CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J., BOHLMANN, F.- Sesquiterpene lactones from Mikania species.- Phytochemistry , New York, v.25, n.7, p. 1750-2, 1986.
- 17-CATTORINI, P.E.- Guacos. Fitoterapia, Milano, v.33, n.1 p.20-24, 1962.
- 18-CATTORINI, P.E.- Guacos .Fitoterapia, Milano, v.32, n.4, p.7-13, 1961.
- 19-CONCEIÇÃO, M. - Plantas medicinais no ano 2000. São Paulo: Editora Tao 1982. p. 135-6.
- 20-CORREA, M.P.-Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas . Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ IBDF, 1975. p. 116-120.
- 21-COSTA, A.F. Farmacognosia , Lisboa,- Fundação Calouste Gulbenkian, 1987, 3v.
- 22-CRUZ, J.P.G., LIBERALLI, C.H.R.- Contribuição ao estudo de Mikania hirsutissima DC. Rev.Flora med., v.4, n.6 p.223-35, 1938.
- 23-DOMINGUEZ, A.X.- Métodos de investigación fitoquímica México: Limusa Editorial, 1973. 281 p.
- 24-FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.p. 446-53.
- 25-FONT QUER, P.- Plantas medicinais. Barcelona, Labor, 1985.p.776-875.
- 26-FONG, H.H.S., TIN-WA, M., FARNSWORTH, N.R., DOBBERSTEIN, R.H., -Phytochemical screening methods. Chicago: University of Illinois, 82 p.

- 27-FREISE, F.W. - Plantas medicinais brasileiras. Bol.Agric., São Paulo, v.34, p.462, 1933.
- 28-GEISSMAN, T.A., CROUT, D.H.G.- Organic chemistry of secondary plant metabolism . San Francisco: Freeman Cooper, 1969.p.3-11.
- 29-GIESBRECHT, A.M., DAVINO, S.C., BARBOSA, R.C.C. , PAULA, C.R.- In vitro study of the antibiotic activity of diterpenes. Braz J. Med.Biol.Res., Ribeirão Preto, v.20, p. 807-10, 1987 .
- 30-GIESBRECHT, A.M., LOPES, J.L.C.- Antibiotic activity of extracts and of constituents of Compositae species. Braz.J.Med.Biol.Res. v. 18: p. 727 A, 1985.
- 31-GIESBRECHT, A.M.- Atividade antibiótica de produtos naturais São Paulo, 1980. (Tese de Livre Docência-. Instituto de Ciências Biomédicas da USP)
- 32-GROTTA, A.S.- Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de Achyrocline satureoides DC Compositae An. Fac. Farm. Odontol. Univ.São Paulo v. 17, p.1-16, 1960.
- 33-GROTTA, A.S.- Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de Spilanthes acmella L. Compositae . An.Fac.Farm.Odontol.Univ. São Paulo v.4, p.130-64, 1945.
- 34-GUTIERREZ, A.B., OBERTI, J.C. KULANTHAIVEL, P., HERZ, W.- Sesquiterpene lactones and diterpenes from Mikania periplocifolia Phytochemistry , New York, v. 24 n.12, p. 2967-71, 1985.
- 35-GUTIERREZ, A.B., HERZ, W.- Bisabolones and other constituents of Mikania shushunensis .Phytochemistry, New York, v.27, n.12, p. 3871-4, 1988.
- 36-GUTIERREZ, A.B., OBERTI, J.C., HERZ, W.- Germacran-5, 14, 6, 12-diolides from Mikania urticifolia - Phytochemistry, New York, v. 27, n.3, p. 938-9, 1988.
- 37-HANSON, J.R., SIVERNS, M., PIOZZI, F., SAVONA, G. J. Chem.Soc. Perkin Trans v.1, p.114, 1976.
- 38-HARBORNE, J.B.- Introduction to ecological biochemistry. London: Academic Press, 1982.
- 39-HERZ, W., KULANTHAIVEL, P.- Diterpenes and sesquiterpene lactones from Mikania congesta - Phytochemistry , New York, v.24, n.8, p. 1761-8, 1985.

- 40-HERZ, W., SUBRAMANIAM, P.S., SANTHANAM, P.S., AOTA, K., ALLEN, L.H Structure elucidation of sesquiterpene dilactones from Mikania scandens - J. Org. Chem. v.35, n.5 p. 1453-63, 1970.
- 41-HERZ, W., SANTHANAM, P.S., WAGNER, H., HOER, L., HORHAMMER, L., FARKAS, L.- Isolation, structure and synthesis of 4', 5, 6, 7-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone (batatifolin), A new flavone from Mikania batatifolia DC. - Tetrahedron Lett. , Oxford, v. 39, p. 3419-21, 1969.
- 42-HERZ, W., SANTHANAM, P.S., SUBRAMANIAM, P.S., SCHMID, J.J.- The structure of mikanolide, a new sesquiterpene dilactone from Mikania scandens L.Willd. Tetrahedron Lett., Oxford, v.32, p.3111-5, 1967.
- 43-HERZ, W., SRINIVASAN, A., KALYANARAMAN, P.S.- Mikanokryptin, a new guianolide from Mikania. Phytochemistry, New York, v. 14, p. 233-7, 1975.
- 44-HOEHNE, W. - Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de Calea pinnatifida Banks Compositae An. Fac. Farm. Odontol. Univ. São Paulo, v.10, p.9-33, 1952.
- 45-JOHANSEN, D.A.- Plant microtechnique . London: Mac Graw Hill, 1940. p. 190-5.
- 46-JOLY,A.B., Botânica , Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo, Companhia Editora Nacional p. 628-38.
- 47-KNUDSEN,F.S.,VILEGAS,W., OLIVEIRA,F. ,ROQUE,N.F.-Pimaradiene diterpenes from Mikania triangularis . Phytochemistry , New York, v.25, n.5, p.1240-2, 1986.
- 48-KOROLKOVA,A.-Essentials of medicinal chemistry New York: Wiley-Interscience, 1988 p.540 .
- 49-LWANDE,W., MACFOY,C., OKEY,M., DELLE MONACHE, F., MARINI BETTOLO, G.B.- Kaurenoic acids from Aspilia pluriseta . Fitoterapia ,Milano, v.55,n.2,p. 126-8, 1985.
- 50-MATHUR,S.B., FERMIN, C.M.- Terpenes of Mikania mongenans . Phytochemistry ,New York, v.12, p.226-7, 1973.
- 51-MATHUR,S.B.,TELLO,P.G.,FERMIN,C.M.,MORA-ARELLANO,V.- Terpenoids of Mikania monagasensis and their biological activities.- Rev. Latinoamer. Quim. Monterey, v.6,p. 201-5, 1975.

- 52-MATSUO,A., UTO,S., NAKAYAMA, M. , HAYASHI, S.- - Thermarol, a new ent-pimarane class diterpene diol from Jungermannia thermanum (Liverwort). Tetrahedron Lett.,Oxford , v.28, p.2451, 1976.

- 53-METCALFE , C.H., CHALK, L. Anatomy of the dycotyledone. London: Clarendon Press, 1959. v.2, p. 782-804.

- 54-MIHASHI, S., YANAGISAWA, I., TANAKA,O., SHIBATA,S. - Further study on the diterpenes of Aralia spp. Tetrahedron Lett. ,Oxford ,v.21, p. 1683, 1969.

- 55-MOURA, S.R.,NASCIMENTO DA SILVA,V.,MAGALHÃES, V.C.,GAGLIARDI,A.R.F., COSTA,S.- Efeitos de algumas frações obtidas de extratos hidroalcoólicos e de eter de petróleo de folhas de Mikania glomerata na traquéia isolada de cobaia. In: V REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 5 , 1990. Livro de resumos Caxambú , 1990.

- 56-MURADIAN, J., MOTIDOME, M., FERREIRA, P.C., BRAS FILHO, R.- Flavonols and (-)kaur-16-en-19 oic acid from Mikania hirsutissima DC. var. hirsutissima . Rev . Latinoamer. Quim ., Monterey, v.8, p.88-9, 1977.

- 57-MYIHAKI, K.T.E., Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de Aruca - Calea pinnatifida(R. Brown), Banks ex Stendel. São Paulo; 1988 (Dissertação de mestrado - Fac. Cienc. Farmacêuticas da USP).

- 58-NICOLLIER, G. , THOMPSON A.C.- Essencial oil and terpenoids of Mikania micrantha HBK - Phytochemistry, New York, v.20, p.2587-8, 1981.

- 59-OFFICIAL Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington, p.59-60 , William Horwitz Editor 1975.

- 60-OLIVEIRA, F., OGA, S., AKISUE, G., AKISUE, M.K.- Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (Mikania glomerata Sprengel) e de guaco do mato (Mikania laevigata Schultz Bip ex Baker).- An. Farm. Quim., São Paulo, v. 25 n.1-2, p.50-4, 1985.

- 61-OLIVEIRA, F.- Contribuição para o estudo botânico de Mikania hirsutissima DC, variedade hirsutissima- Rev. Farm.Bioquim .Univ.São Paulo , v.9, n.1, p.79-100, 1971.

- 62-OLIVEIRA, F., AKISUE, G - Fundamentos de Farmacobotânica São Paulo, Atheneu, 1989.

- 63-OLIVEIRA, F., FERRO, V.O.- Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido do guaco-de-sete-sangrias, Mikania smilacina DC. Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo v.21, p.1-13, 1985.
- 64-OLIVEIRA, F.- Contribuição para o conhecimento de Mikania hirsutissima DC. São Paulo, 1969.(Tese de doutoramento - Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP)
- 65-OLIVEIRA, F.-Biofarmacognosia das espécies brasileiras da seção Globosae Robinson do gênero Mikania Willdenow. São Paulo, 1983.(Tese de Livre Docência-Faculdade de Ciências Farmacéuticas da USP)
- 66-OLIVEIRA, F., ALVARENGA, M.A., AKISUE, G., AKISUE, M.K., - Isolamento e identificação de componentes químicos de Mikania glomerata Sprengel e de Mikania laevigata Schultz Bip ex Baker.-Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo, v.20, n.2, p.169-83, 1984.
- 67-QUICK, A.J.- The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. J.Biol. Chem., Baltimore , v. 109, p.73-4, 1935.
- 68-ROBINSON, B.L.- The Mikantias of Norther and Western South America. Contr. Gray Herb. Cambridge , v. 64 :p. 21-216, 1922.
- 69-RATERA, L., RATERA, M.O.- Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular .Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, p. 147.
- 70-SARG, T.M., DAHMY, S.EL., - A further new ent-labdane from Mikania alvimii. Fitoterapia Milano, n.2, p. 160-1, 1990.
- 71-SASS, J.E.- Elements of botanical microtechnique . New York: Mac Graw Hill, 1940. p. 99-102.
- 72-SCAVONE, O. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de Senecio brasiliensis Less var. tripartitus Baker . An. Fac. Farm.Odontol. Univ. São Paulo, v.13, p. 15-32, 1955.
- 73-SILVA OLIVEIRA, C.- Farmacodinâmica dos diuréticos e estudo farmacéutico e farmacodinâmico de Mikania hirsutissima DC Rio de Janeiro, 1920.
- 74-SILVA, M.L., LUZ, A.I.R., ZOGHBI, M.G.B., RAMOS, L.S. MAIA, J.G.S. - Essencial oils of some Amazonian Mikania species. Phytochemistry , New York, v.23, n. 10, p. 2374-6, 1984.
- 75-SILVA, F.P., ROQUE, N.F., FERRO, V.O., ALVARENGA, M.A., OLIVEIRA, F. Estudo químico de espécies do genero Mikania. Ciênc Cult., S. Paulo, v. 35 (supl.), p. 477, 1983.

- 76-TETLEY , V. The secretory system of root of the Compositae New Phytol , London, v.24, p. 138-62, 1925.
- 77-TOURSARKISSIAN, M.- Plantas medicinales de la Argentina Buenos Aires: Limusa Editorial, 1980. p. 80-2.
- 78-VAN ARMAN C.G., BEGANY, A.J., MILLER, L.M., PLESS, H.H.-Some details of the inflammations caused by yeast and carrageenin. J. Pharmac.Exp.Ther. , v. 150, p.328-33, 1965.
- 79-VICHNEWSKI, W., H.FILHO, L.F, MURARI, R., HERZ, W.- Cinnamoylgrandifloric acid from Mikania oblongifolia - Phytochemistry , New York, v.16, p. 2028-9, 1977.
- 80-VILEGAS, W., ROQUE, N.F., FERRO, V.O., OLIVEIRA, F .- Estudo químico do gênero Mikania : M. diversifolia e M. hoehnei. Ciênc .Cult. São Paulo, v.36 (supl.):p.530, 1984.
- 81-VOGEL, A.I.- Química Orgânica ; Análise orgânica qualitativa. Trad. C.A.C.Costa, O.F. Santos, C.F.M. das Neves. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico; S. Paulo, EDUSP 1979. v.3, p. 1017.