

SILVIO MIRÓ FRANCHI



**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DA
FOLHA DE *Mikania glomerata* SPRENGEL, ASTERACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-
Graduação em Botânica, do Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.
Área de concentração: Plantas Medicinais e Tóxicas.

Orientador:
Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Co-orientadoras:
Prof.^ª Dr.^ª Márcia do Rocio Duarte
Prof.^ª Dr.^ª Ana Maria Soares de Arruda

CURITIBA

2000

SILVIO MIRÓ FRANCHI

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DA
FOLHA DE *Mikania glomerata* SPRENGEL, ASTERACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-
Graduação em Botânica, do Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.
Área de concentração: Plantas Medicinais e Tóxicas.

Orientador:

Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Co-orientadoras:

Prof.^ª Dr.^ª Márcia do Rocio Duarte

Prof.^ª Dr.^ª Ana Maria Soares de Arruda

CURITIBA

2000



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

“CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DA FOLHA DE *Mikania glomerata* Sprengel, ASTERACEAE”

por

SILVIO MIRÓ FRANCHI

**Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de mestre no Curso de
Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores:**

Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos (Orientador)

Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro (Titular)

Prof.ª Dr.ª Mayumi Elisa O. Sato (Titular)

Curitiba, 07 de abril de 2000

*Este trabalho é dedicado à Mércia Franchi,
quem eu amo e admiro.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
AGRADECIMENTOS.....	viii
NOTA BIOGRÁFICA.....	ix
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE.....	6
3.2 GÊNERO <i>Mikania</i>	7
3.3 <i>Mikania glomerata</i> SPRENGEL.....	7
3.4 ESTUDOS BOTÂNICOS.....	8
3.5 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS.....	9
3.6 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS.....	11
3.7 ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS.....	12
3.8 BIOSÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	15
4.2 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO.....	15
4.3 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS.....	17
4.4 ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	21
5 RESULTADOS.....	26

5.1 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO.....	26
5.2 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS.....	41
5.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	44
6 DISCUSSÃO.....	52
6.1 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO.....	52
6.2 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS.....	55
6.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	73
7 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

Mikania glomerata Sprengel é uma espécie vegetal da flora brasileira pertencente à família Asteraceae, conhecida vulgarmente pelo nome de guaco. Realizou-se estudo da folha da espécie em questão sob os pontos de vista morfo-anatômico, de isolamento e caracterização de compostos químicos e determinação da ação antiinflamatória e analgésica do extrato bruto obtido das folhas. O isolamento de compostos químicos foi realizado por fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico, por cromatografia em coluna e técnicas de purificação usuais em química. A pesquisa farmacológica foi orientada pelo teste geral de atividades e determinação da DL₅₀, em camundongos. Foram isolados e identificados espectrometricamente três compostos do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *M. glomerata* Sprengel: cumarina (**3**), ácido 2-acetil-*trans*-cinâmico (**8**) e 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (**9**), também chamado de siringaldeído. Os estudos farmacológicos sugerem que o extrato bruto ensaiado apresenta baixa toxicidade por via oral e intraperitoneal, bem como, atividade antinociceptiva e antiedematogênica, com fortes indícios de ação antiinflamatória.

ABSTRACT

Mikania glomerata Sprengel is a native species from Brazilian Flora, belonging to Asteraceae family, known in the folk medicine as guaco. A morpho-anatomic study of the leaves, isolation and characterisation of chemical constituents and determination of anti-inflammatory and analgesic activity were done using the crude hydro-alcoholic extract. The isolation of the constituents was realised by fractionating the crude extract using column chromatography and purification techniques. The pharmacology assays were oriented by using general activity test and DL₅₀ determination, in mice. Three compounds were isolated and identified by spectroscopic methods: cumarina (**3**), 2-acyl-*trans*-cinnamic acid (**8**) and 4-hydroxy-3,5-dimethylbenzaldehyde (**9**), also known as syringaldehyde. The pharmacology studies suggest that the crude extract shows low toxicity orally and intraperitonially as well as antinociceptive and antiedematogenic activities with potential antiinflammatory activity.

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço ao Prof. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelo incentivo e orientação indispensáveis, que tanto contribuíram para o meu crescimento.

A Profª. Márcia do Rocio Duarte, co-orientadora, pela valiosa contribuição nos estudos morfo-anatômicos e também pela inigualável boa vontade e incentivo em todos os momentos.

A Profª. Ana Maria Soares de Arruda, co-orientadora, pela simpatia e orientação nos estudos farmacológicos.

Ao Prof. Márcio Chimelli, do Departamento de Farmácia, pelas fotos de morfologia da planta estudada.

Ao Prof. Yedo Alquini, do Departamento de Botânica, pela imensa colaboração no estudo anatômico da planta em questão.

Ao Prof. e taxonomista Olavo Guimarães do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, pela identificação da espécie estudada.

Aos Departamentos de Botânica e Farmácia da Universidade Federal do Paraná, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade de Manchester, Inglaterra, pelos espectros.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pelas fotos realizadas.

A todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para execução deste trabalho, muito obrigado.

A Deus.

NOTA BIOGRÁFICA

O autor graduou-se em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), em 1991. Em 1994 foi nomeado Professor Auxiliar do Departamento de Farmácia, na área de Tecnologia Farmacêutica, da mesma Universidade. Em 1996 recebeu o título de Especialista em Ciências Farmacêuticas (Produtos Naturais), pela própria UFPR. Lecionou nesta instituição as disciplinas de Farmacotécnica e Farmacotécnica Homeopática, até 1999. Desde então, é Professor Assistente A de Farmacotécnica, da Universidade Tuiuti do Paraná (UTP) e Professor Assistente A de Métodos Físicos Aplicados à Farmácia do Centro Universitário Positivo (UNICENP), em Curitiba, Paraná.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
%AVP	porcentagem de aumento do volume da pata
%EMP	porcentagem de efeito máximo possível
EPM	erro padrão da média
δ	delta
λ	lambda
ν	ni
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
^{13}C	isótopo de carbono-13
^1H	próton
ATCC	“American Type Culture Collection”
CCD	cromatografia em camada delgada
CHCl_3	clorofórmio
CI	ionização química
cm	centímetro
cm^3	centímetro cúbico
Curva D/R	curva dose-resposta
d	duplete
DCM	diclorometano
DL_{50}	dose letal mediana
DNA	ácido desoxirribonucléico
EFS	estado fluido supercrítico
EI	impacto eletrônico
EM	espectro de massa
EtOAc	acetato de etila
h	hora
g	grama
IV	infra-vermelho
<i>ip</i>	intraperitoneal
IUPAC	“International Union of Pure and Applied Chemistry”
<i>J</i>	constante de acoplamento
kg	quilograma
M^+	ión molecular
Me	metila
MeOH	metanol
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	microscopia fotônica
min	minutos
mg	miligrama
MHz	mega hertz
n	número de animais
NaHCO_3	bicarbonato de sódio

NH ₃	amônia
NH ₄ ⁺	cátion amônio
nm	nanômetro
<i>p</i>	<i>para</i>
P.F.	ponto de fusão
P ₂ O ₅	pentóxido de fósforo
PAF	fator de ativação plaquetária
q	quarteto
Rf	relação de frente
RMN	ressonância nuclear magnética
rpm	rotações por minuto
s	singlete ou segundos
<i>sc</i>	subcutânea
SI	“Système Internationale d’Unités”
SNC	sistema nervoso central
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta
<i>vo</i>	via oral

LISTA DE TABELAS

1. Resultado dos testes histoquímicos da lâmina foliar e do pecíolo de <i>M. glomerata</i>	41
2. ¹ H-RMN (300MHz; CDCl ₃) de 3	42
3. ¹³ C-RMN (75 MHz, CDCl ₃) de 3	42
4. ¹ H-RMN (300MHz; CDCl ₃) de 7	43
5. ¹ H-RNM (300 MHz; (CDCl ₃) de 9	43
6. ¹³ C-RMN, CDCl ₃ , 75 MHz de 9	44
7. Tempo de permanência de camundongos em rota-rod (min).....	45
8. Número de contorções abdominais durante vinte minutos após o desafio <i>ip</i> com ácido acético.....	46
9. Médias das porcentagens de aumento do volume das patas (%AVP) em função do tempo.....	47
10. Resultados do tratamento com EB1, em camundongos, sobre a placa quente.....	48
11. Médias ± EPM, dos tempos de lambedura da pata injetada com formalina, em segundos.....	50

LISTA DE FIGURAS

1. Aspecto geral de <i>M. glomerata</i>	27
2. Detalhe das folhas de <i>M. glomerata</i>	27
3. Face adaxial da folha de <i>M. glomerata</i>	28
4. Face abaxial da folha de <i>M. glomerata</i>	28
5. Detalhe das inflorescências de <i>M. glomerata</i>	29
6. Detalhe das inflorescências de <i>M. glomerata</i>	29
7. Detalhe dos frutos de <i>M. glomerata</i>	30
8. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em vista frontal; epiderme da face adaxial.(MF).....	31
9. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em vista frontal; epiderme da face abaxial, com estômatos anomocíticos e anisocíticos. (MF).....	31
10. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em vista frontal; epiderme da face abaxial, com estômatos anomocíticos e anisocíticos e campos primários de pontuação. (MF).....	32
11. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; região da lâmina foliar, mesofilo dorsiventral, inserção do tricoma glandular e ducto secretor. (MF).....	33
12. Folha de <i>M. glomerata</i> , epiderme da face abaxial; detalhes dos estômatos, tricoma glandular e cutícula levemente estriada. (MEV) Barra = 0,1µm.....	33
13. Folha de <i>M. glomerata</i> , epiderme da face abaxial; detalhe do tricoma glandular. (MEV) Barra = 10µm.....	34
14. Folha de <i>M. glomerata</i> , epiderme da face abaxial; detalhe do tricoma glandular e estômato. (MEV) Barra = 10µm.....	34
15. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; detalhe do ducto secretor, próximo do feixe vascular, na região do mesofilo. (MF).....	35

16. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; região da nervura mediana, ductos secretores, região de colênquima angular e disposição dos feixes vasculares. (MF).....	36
17. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; detalhe do colênquima angular e cutícula, na região da nervura mediana. (MF).....	37
18. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; detalhe do tricoma glandular, em depressão epidérmica, na região da nervura mediana. (MF)....	37
19. Microscopia fotônica da folha de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; detalhe dos feixes vasculares, na região da nervura mediana. (MF).....	38
20. Microscopia fotônica do pecíolo de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal. (MF).....	39
21. Microscopia fotônica do pecíolo de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; detalhe da região de colênquima angular, feixes vasculares e ductos secretores (setas). (MF).....	39
22. Microscopia fotônica do pecíolo de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal; detalhe dos feixes vasculares. (MF).....	40
23. Diagrama do pecíolo de <i>M. glomerata</i> , em secção transversal.....	40
24. Teste do rota-rod em camundongos para o extrato bruto de <i>M. glomerata</i>	45
25. Gráfico representativo da curva dose-resposta do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético para o extrato bruto de <i>M. glomerata</i>	46
26. Gráfico representativo da curva dose-resposta do ensaio de edema de pata de rato, para o extrato bruto de <i>M. glomerata</i>	48
27. Relação entre o percentual de efeito máximo possível e o tempo transcorrido do tratamento <i>vo</i> com EB1 1000mg/kg e salina 0,1cm ³ /g, no ensaio de placa quente, para o extrato bruto de <i>M. glomerata</i>	49
28. Resultados do teste da formalina, durante a primeira fase para o extrato bruto de <i>M. glomerata</i>	50
29. Resultados do teste da formalina, durante a segunda fase para o extrato bruto de <i>M. glomerata</i>	51
30. Espectro de ¹ H-RMN 300MHz da cumarina (3).....	58
31. Espectro de COSY ¹ H-RMN 200MHz da cumarina (3).....	59
32. Espectro de ¹³ C-RMN 75MHz da cumarina (3).....	60

33. Espectro de massa da cumarina (3).....	61
34. Espectro de ¹ H-RMN 300MHz do ácido 2-acetil- <i>trans</i> -cinâmico (8).....	65
35. Espectro de COSY ¹ H-RMN 200MHz do ácido 2-acetil- <i>trans</i> -cinâmico (8).....	66
36. Espectro de massa do ácido 2-acetil- <i>trans</i> -cinâmico (8).....	67
37. Espectro de ¹ H-RMN 300MHz do 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (9).....	70
38. Espectro de ¹³ C-RMN 75MHz do 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (9).....	71
39. Espectro de massa do 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (9).....	72

1. INTRODUÇÃO

“O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato não os despreza” (BÍBLIA, 1995). Muito antes dessa alusão às plantas medicinais encontrada no texto sagrado, o homem já fazia uso das virtudes curativas da natureza. É possível afirmar que se trata de uma das primeiras manifestações do antiqüíssimo esforço do homem para compreender e utilizar a natureza, como réplica a uma das suas antigas preocupações: a doença e o sofrimento.

O mais famoso relato sobre drogas e seus usos, escrito pelo botânico grego Pedanios Dioscorides no século I d.C., intitulado *De materia medica libri cinque*, corresponde a uma obra médica em cinco volumes. Nesse tratado, são descritas cerca de seiscentas plantas medicinais, além de numerosos produtos de origem animal e mineral, para uso medicinal, tendo permanecido a autoridade no assunto por aproximadamente quinze séculos (ROBBERS *et al.*, 1996).

Fazendo-se uma retrospectiva do caminho percorrido desde as primeiras receitas da época da sexta dinastia egípcia, verifica-se que foi uma longa caminhada; contudo, observa-se que ela ocorreu sempre na mesma direção, ou seja, na busca de mais conhecimento e tecnologia para transformar as plantas medicinais em medicamentos (EVANS, 1996).

Assim, diz o livro sagrado: “... o farmacêutico faz misturas agradáveis, *compõe unguentos úteis à saúde*, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra” (BÍBLIA, 1995).

A partir da necessidade de conhecer mais profundamente os produtos de origem natural e utilizá-los na terapêutica de forma correta e segura, surgiram, na história da farmácia, várias ciências que têm como objetivo estudar as virtudes da natureza, sobretudo as plantas, em prol do bem estar da humanidade.

Gradualmente, à medida que o conhecimento sobre as drogas aumentava, disciplinas especializadas tornaram-se uma necessidade para sistematizar e organizar as novas

informações. No início do século XIX, a matéria médica começou a ser dividida em farmacologia (ação das drogas) e farmacognosia (todos os aspectos relacionados às drogas, com menor ênfase à ação), o que vem ao encontro com a divisão da arte de curar em medicina e farmácia.

Acreditou-se por muito tempo que o termo farmacognosia teria sido introduzido por C.A. Seydler, um estudante de medicina em Halle/Saale, Alemanha, que usou o título *Analectica pharmacognostica* para sua dissertação, em 1815. Estudos mais recentes mostram que o termo *pharmacognosis* foi usado pela primeira vez, na realidade, por J. A. Schmidt em 1811, que utilizou o termo em seu *Lehrbuch der Materia Medica*, publicado em Viena, para descrever o estudo das plantas medicinais e suas propriedades (ROBBERS *et al.*, 1996).

O termo FARMACOGNOSIA foi criado para designar a ciência que estuda as matérias de origem natural, usadas no tratamento de enfermidades. Esse termo, que atualmente se refere com maior ênfase às matérias de origem vegetal e animal, é formado por duas palavras gregas, a saber: *pharmakon*, que significa droga, medicamento, veneno e *gnosis*, conhecimento (OLIVEIRA *et al.*, 1996; ROBBERS *et al.*, 1996; EVANS, 1996).

A farmacognosia está intimamente ligada a outras disciplinas, sobretudo à botânica, química orgânica e farmacologia, de forma que a botânica considera em particular a descrição e identificação das plantas. Além disso, a farmacognosia se preocupa também com o histórico, fontes de obtenção, produção, comercialização, armazenamento e preparação adequada de cada espécie de droga.

Sendo o objetivo da farmacognosia o estudo ou conhecimento das drogas, torna-se imperativo estabelecer um conceito preciso a seu respeito. A origem da palavra droga não está ainda bem esclarecida. Alguns consideram provável que esteja relacionada com o vocábulo alemão *trocken*, que significa secar, visto que as drogas de origem vegetal ou animal se apresentam quase que exclusivamente no estado seco. Outros acreditam que a palavra droga derive do holandês, *droog*, que significa seco ou através do francês, *drogue* (EVANS, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996; ROBBERS *et al.*, 1996).

Chama-se droga, em farmacognosia, a todo vegetal ou animal ou, ainda, a uma parte ou órgão desses seres ou produtos derivados diretamente deles, que após passarem por processo de coleta, preparo e conservação, possuam composição e propriedades tais, que

possibilitem o seu uso como forma bruta de medicamento ou como necessidade farmacêutica. Droga é, pois, matéria sem vida, que sofreu alguma transformação para servir de base para medicamento (OLIVEIRA *et al.*, 1996; ROBBERS *et al.*, 1996; EVANS, 1996).

O estudo de novas drogas exige do farmacêutico profundo conhecimento das características macroscópicas e histológicas da mesma, além de capacidade para executar ensaios cromatográficos e outros procedimentos necessários à identificação e determinação da pureza requerida para a substância isolada ou droga em análise.

Indubitavelmente, o reino vegetal possui, ainda, muitas espécies de plantas contendo substâncias com valor medicinal, que precisam ser exploradas sob o ponto de vista farmacognóstico. Há, porém, um número grande de plantas que estão constantemente sendo pesquisadas, em função do possível valor farmacológico, particularmente por suas ações antiinflamatória, hipotensora, hipoglicemiante, amebicida, citotóxica, antibiótica e anti-Parkinson (EVANS, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996; ROBBERS *et al.*, 1996).

Nas últimas décadas, três acontecimentos relevantes ocorreram, tendo produzido modificações fundamentais na atitude, tanto da população, como de cientistas em relação à farmacognosia. Primeiramente, as pessoas leigas descobriram a utilidade de muitas drogas ou ervas, como são comumente chamadas. A insatisfação com efeitos colaterais e o custo elevado da medicina moderna induziram ao aumento na apreciação por produtos naturais e orgânicos. Tal fato levou milhares de pessoas em todo o mundo a aderir fortemente ao uso de drogas vegetais clássicas para o tratamento de determinadas patologias.

Em segundo lugar, reconheceu-se cientificamente que as plantas com folclórica reputação medicinal, muitas vezes representam a melhor fonte de compostos que podem servir como novas drogas, ou protótipos para as mesmas.

Finalmente, a maior revolução, que se encontra ainda em sua infância, teve início com a tecnologia do DNA recombinante, engenharia genética, ou mais especificamente, farmacobiotechnology. Esse método envolve a transferência do material genético de um organismo para outro, permitindo que o segundo produza em maior quantidade um componente específico, na forma usual de droga (ROBBERS *et al.*, 1996).

Dentro de todo esse contexto, o estudo da droga conhecida popularmente como guaco (*Mikania glomerata* Sprengel, Asteraceae) é importante, visto que representa um

insumo farmacêutico dotado de propriedades terapêuticas consagradas na medicina popular brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com o estudo farmacognóstico das folhas da espécie *Mikania glomerata* Sprengel, Asteraceae, sob o ponto de vista de isolamento de compostos químicos, estudo morfo-anatômico e farmacológico. A referida espécie será designada por *M. glomerata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento bibliográfico sobre a espécie *M. glomerata*;
- Caracterizar morfo-anatomicamente a folha da espécie em análise, somente a título de comparação e confirmação com os estudos já existentes;
- Isolar, caracterizar e identificar compostos biossintetizados nas folhas de *M. glomerata*;
- Estudar a ação analgésica e antiinflamatória do extrato bruto das folhas de *M. glomerata*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae compreende cerca de 920 gêneros, com aproximadamente dezenove mil espécies, sendo portanto, a maior família das Angiospermas. São plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente árvores. A grande maioria dos gêneros, cerca de 98%, é constituído por plantas de pequeno porte. As folhas são também muito variadas, inteiras ou fendidas, de disposição alterna ou oposta, latescentes ou não. Flores sempre reunidas em inflorescências típicas, formando capítulos com simetria radial ou zigomorfa, até bilateral. São hermafroditas ou de sexo separado, podendo estar na mesma inflorescência ou em plantas dióicas. O fruto é seco indeiscente, tipo aquênio, disperso pelo vento ou excepcionalmente encerrado no capítulo, que então tem brácteas duras e espinhosas (JOLY, 1998).

A família Asteraceae é caracterizada quimicamente pela riqueza em produtos do metabolismo secundário. Óleo essencial, terpenóides, compostos acetilênicos, fitomelaninas, ácido caféico e seus ésteres, flavonóides e, menos frequentemente, alcalóides são encontrados nesse grande grupo de vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 1984).

Acredita-se que a composição química das espécies representa um fator mais importante do que a morfologia na evolução da família Asteraceae. O primeiro composto isolado de Asteraceae foi uma combinação de poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas, o que representa um mecanismo de defesa do vegetal. A composição química distinta das espécies pode ser facilmente interpretada como uma arma desenvolvida contra o ataque de predadores, que começaram a se tornar mais resistentes aos compostos iridóides, os mais antigos componentes isolados quimicamente da família em epígrafe (CRONQUIST, 1988).

3.2 GÊNERO *Mikania*

O termo *Mikania*, que designa o gênero em questão, tem sua origem a partir da homenagem ao professor Mikan (BARROSO, 1978).

As espécies do gênero *Mikania* são representadas por plantas escandentes, cujas flores são de um só tipo, formando capítulos do tipo discóide, com cinco flores em cada capítulo. As flores apresentam corola tubulosa e quatro ou cinco brácteas involucrais, dispostas em série (CRONQUIST, 1988).

3.3 *Mikania glomerata* SPRENGEL

POSIÇÃO SISTEMÁTICA

NO SISTEMA DE ENGLER (JOLY, 1998)

XVII DIVISÃO: Angiospermae (=Anthophyta)

CLASSE: Dicotyledoneae

SUBCLASSE: Sympetalae (=Gamopetalae)

ORDEM: Campanulales (=Synandreae)

FAMÍLIA: Compositae

GÊNERO: *Mikania*

ESPÉCIE: *Mikania glomerata* Sprengel

NO SISTEMA DE CRONQUIST (CRONQUIST, 1988)

II DIVISÃO: Magnoliophyta

1ª CLASSE: Magnoliopsida

SUBCLASSE VI: Asteridae

ORDEM 11: Asterales

FAMÍLIA 1: Asteraceae

GÊNERO: *Mikania*

ESPÉCIE: *Mikania glomerata* Sprengel

M. glomerata é uma espécie vegetal pertencente à família Asteraceae, conhecida vulgarmente pelo nome de guaco, que goza de prestígio elevado como planta medicinal (OLIVEIRA *et al.*, 1984). É conhecida popularmente como guaco, coração-de-jesus, guaco-liso, guaco-cheiroso, cipó-caatinga e erva-de-cobra. Entretanto, outras espécies do gênero *Mikania* recebem a denominação popular de guaco, como *M. cordifolia* Willd., *M. scandens* Willd., *M. officinalis* Mart., *M. opifera* DC., *M. guaco* Willd. e *M. laevigata* Shultz (CRUZ, 1965).

O extrato fluido obtido dessa espécie da flora brasileira é empregado como antiespasmódico, antiinflamatório, béquico, balsâmico das vias respiratórias e sobretudo como expectorante (OLIVEIRA *et al.*, 1984; NEVES & SÁ, 1991; LEITE *et al.*, 1993).

M. glomerata é oficializada pela 1ª edição da Farmacopéia Brasileira. As folhas possuem odor aromático agradável lembrando baunilha, que é transmitido às formas farmacêuticas com ela elaboradas, decorrendo, desse fato, o seu emprego como corretivo de sabor e odor. Graças, ainda, a essa propriedade, o guaco em estudo é utilizado no preparo de licores, balas e pirulitos (LUCAS, 1942).

3.4 ESTUDOS BOTÂNICOS

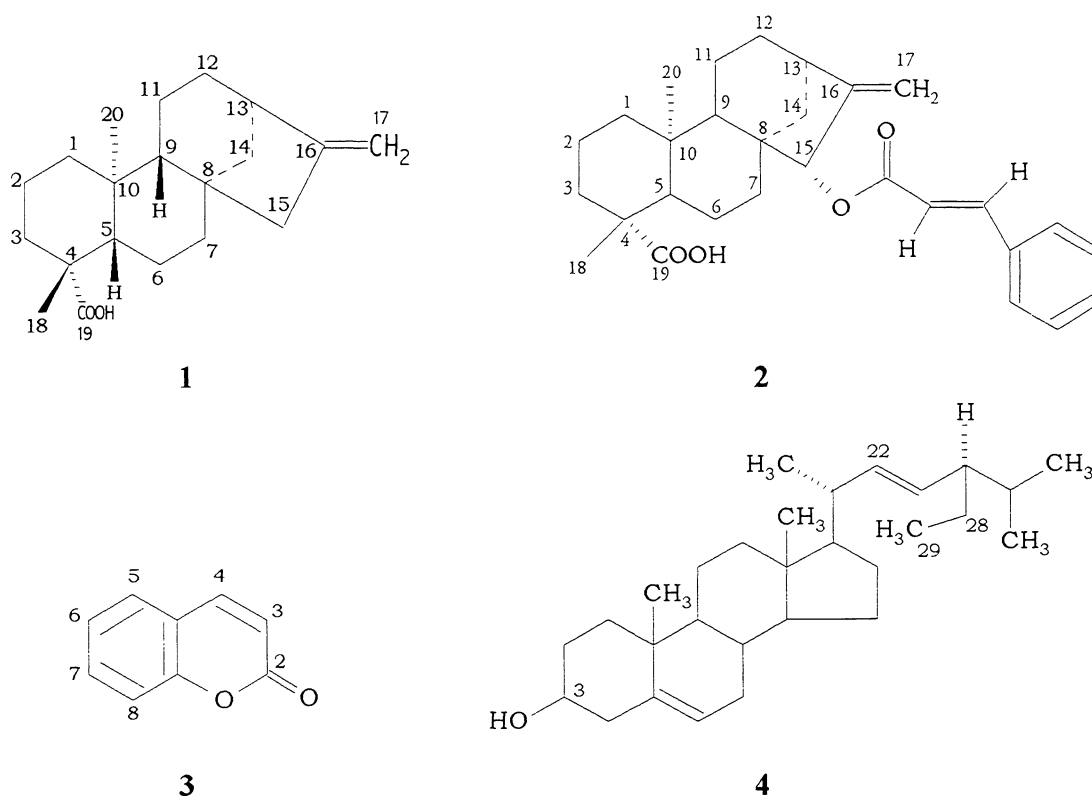
OLIVEIRA *et al.* (1985) estudaram a folha, flor, fruto e semente de *M. glomerata* sob o ponto vista morfo-anatômico, com o objetivo de fornecer subsídios para a identificação da droga vegetal.

NEVES & SÁ (1991) realizaram estudo estrutural da folha de *M. glomerata*, bem como ensaios microquímicos e marcha fitoquímica para a espécie em análise.

OLIVEIRA *et al.* (1994) estudaram várias espécies do gênero *Mikania*, dentre elas *M. glomerata*, sob o aspecto morfo-anatômico e farmacobotânico. O estudo foi concentrado na morfologia externa e anatomia da folha. Os autores sugerem também uma chave artificial de classificação das espécies brasileiras do gênero *Mikania*, com base em características microscópicas.

3.5 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

OLIVEIRA *et al.* (1984) fizeram isolamento e caracterização de alguns compostos encontrados nas folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata* Schultz. Foi demonstrado que o extrato *n*-hexânico de ambas as espécies tem como componentes o ácido caurenóico (1), ácido cinamoilgrandiflórico (2), cumarina (3), e estigmast-22-*en*-3-ol (4). Foi constatada também a presença de um éster alifático insaturado, cuja estrutura química não foi elucidada.



Caracterização por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato fluido de *M. glomerata* foi realizada por OLIVEIRA *et al.* (1993). As frações *n*-hexânica, CHCl₃, EtOH e de EtOAc do extrato fluido de folhas de guaco foram analisadas por CCD, frente a padrões de ácido caurenóico (1), ácido cinamoilgrandiflórico (2), cumarina (3) e estigmasterol (4), visando estabelecer um perfil cromatográfico que caracterizasse a forma farmacêutica estudada.

Estudo analítico de compostos inorgânicos em plantas medicinais usadas pela população do Nordeste brasileiro foi efetuado por MORAIO *et al.* (1995). Cinco espécies

diferentes de plantas medicinais foram analisadas, dentre elas, *M. glomerata*. As amostras foram pesquisadas em termos de teor de umidade, cinzas totais, sílica, taninos, cloretos, fosfatos, nitratos, cálcio, magnésio, sódio, potássio, alumínio, ferro e determinação do pH.

Recentemente, VILEGAS *et al.* (1997) estabeleceram um método de doseamento para cumarina (**3**) e ácido caurenóico (**1**) em folhas de *M. glomerata*, por cromatografia de fase gasosa. O método foi considerado sensível e reprodutível. O teor de cumarina e ácido caurenóico na espécie coletada em Ribeirão Preto (Brasil) foi determinado em 4,4 (\pm 0,21) e 2,0 (\pm 0,06) mg/g respectivamente, calculados em função do peso de droga seca.

VILEGAS *et al.* (1997) estabeleceram também cinco métodos de extração de compostos com baixa polaridade das folhas de *M. glomerata*. Maceração convencional, maceração com sonicação, extração em Soxhlet e extração no estado fluido supercrítico usando *n*-hexano (EFS-hexano), ou dióxido de carbono (EFS-CO₂) foram comparados em termos de tempo e concentração de princípios extraídos, dando ênfase aos compostos cumarina e ácido caurenóico. Os resultados mostraram que a EFS-hexano foi o método mais eficiente, quando se considerou a velocidade de extração. EFS-hexano e maceração convencional apontam o maior rendimento para extração de cumarina, enquanto, maceração com sonicação representa o maior rendimento para extração de ácido caurenóico.

VENEZIANI & OLIVEIRA (1999) realizaram isolamento de compostos dos ramos caulinares (329g) e folhas (2,7kg) de *M. glomerata*, que foram extraídos separadamente, à temperatura ambiente, com *n*-hexano. Tal extrato foi suspenso em MeOH - H₂O (19:1) e realizada partição com *n*-hexano e DCM. O fracionamento e isolamento dos compostos dos extratos *n*-hexânico e em DCM foram realizados por cromatografia em coluna de sílica gel G-60. A fração *n*-hexânica (15g) dos ramos caulinares deu origem a 0,35g de friedelina; 0,65g de ácido *ent*-caur-16(17)-*en*-19-óico e 0,2g de ácido *ent*-15- β -benzoiloxicaur-16(17)-*en*-19-óico. Já a fração solúvel em DCM (6g), originou uma mistura de 0,1g de ácido grandiflórico e 0,1g de ácido 17-hidroxi-*ent*-caur-15(16)-*en*-19-óico. A fração *n*-hexânica das folhas (10g) forneceu uma mistura de 0,05g de estigmasterol e β -sitosterol, além de 0,03g de ácido *ent*-15 β -isobutiril-oxicaur-16(17)-*en*-19-óico. A fração em DCM (20g), por sua vez, originou somente 0,74g de ácido *o*-hidroxicinâmico.

3.6 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

OLIVEIRA *et al.* (1985) estabeleceram parâmetros físicos e químicos e determinaram a toxicidade aguda e ação antiedematogênica dos extratos fluidos de *M. glomerata* e *M. laevigata* Schultz. O extrato fluido das folhas de *M. glomerata* apresentou resíduo seco entre 16,21 a 17,95% e cinzas entre 3,48 e 3,84%. O teor alcoólico, o pH, a densidade, a viscosidade e o índice de refração também foram definidos. Tais extratos revelaram possuir atividade inibidora do edema induzido pela carragenina na pata de ratos, além de baixa toxicidade.

Estudo farmacológico comparativo entre *M. glomerata*, *Justicia pectoralis* Jacq., conhecida popularmente como anador, e *Torresea cearensis* Fr. (cumarú) foi realizado por LEITE *et al.* (1993). Para tanto, os extratos hidroalcoólicos das folhas, partes aéreas e cascas do caule de cada uma das espécies foram submetidos a ensaios farmacológicos *in vivo* (edema de pata induzido pela carragenina) e *in vitro* (jejuno de rato, íleo de cobaia e traquéia de rato). Os resultados foram semelhantes, dose-dependentes e mostraram ação espasmolítica, antiinflamatória e broncodilatadora, não somente nos extratos, mas também em solução de cumarina. As diferenças observadas em relação às intensidades dos efeitos farmacológicos indicam que outros compostos biologicamente ativos, além da cumarina estão presentes nos extratos ensaiados.

FIERRO *et al.* (1999) estudaram uma fração do extrato etanólico (MG1) de *M. glomerata*, avaliando suas propriedades como antialérgico e antiinflamatório. A ação antialérgica foi determinada pela indução da pleurisia alérgica, através da ovalbumina. Os modelos de inflamação local foram induzidos por aminas biogênicas, carragenina e PAF. Infiltração de neutrófilos e eosinófilos provocada pela injeção intrapleural do antígeno foi significativamente reduzida pela fração do extrato analisada. A indução de inflamação por PAF também é inibida por MG1. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com MG1 não se mostrou eficiente na inibição da inflamação da pleura pela histamina, serotonina e carragenina. Tais resultados sugerem que MG1 é efetivo na inibição da inflamação imunológica, mas não afeta a resposta inflamatória aguda causada por outros agentes.

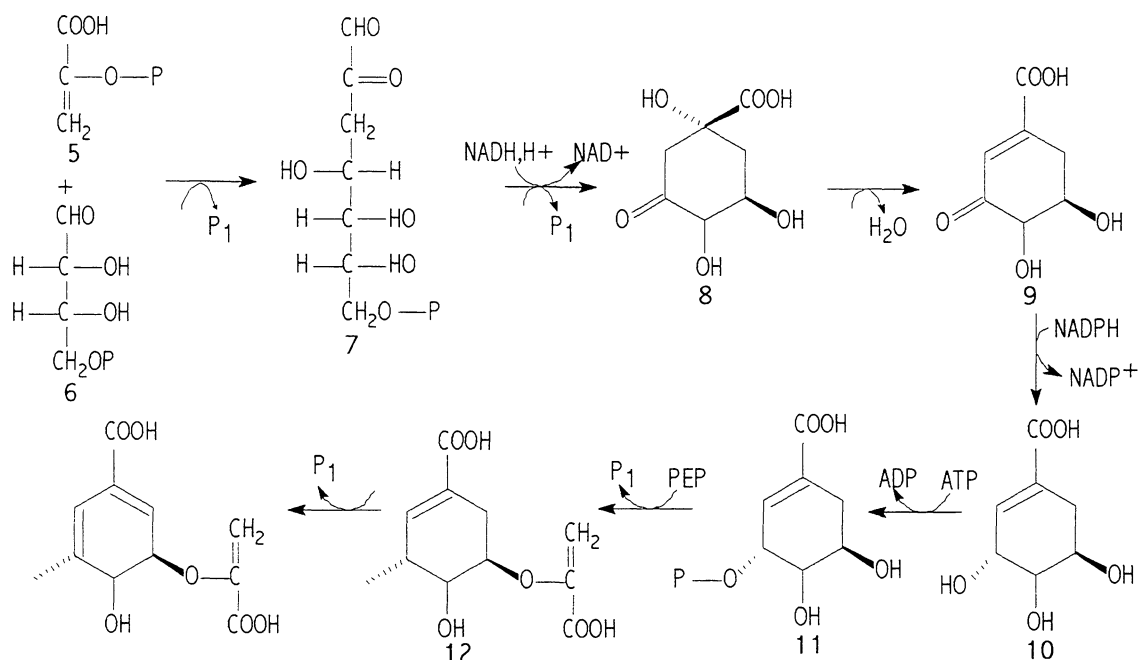
3.7 ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS

BARBOSA *et al.* (1994) determinaram a atividade antimicrobiana de alguns extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras. O extrato fluido das folhas de *M. glomerata* foi avaliado frente a cocos gram-positivos e bacilos gram-negativos, sendo as cepas padronizadas e sorotipadas pela ATCC. A metodologia adotada foi a técnica de *pour plate*, sendo o extrato fluido diluído 1:1000 no meio de cultura e o inóculo padronizado, semeado por esgotamento. As placas foram lidas 24 horas após incubação em estufa a 37°C. Os resultados revelaram ausência de atividade antimicrobiana para o extrato fluido de guaco, enquanto que *M. hirsutissima* DC manifestou atividade antimicrobiana de leve a moderada, frente a microrganismos gram positivos, principalmente no extrato aquoso.

3.8 BIOSÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES

Os compostos chamados de fenilpropanóides representam um grande grupo de produtos naturais, derivados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina (16) e tirosina (18). Como seu nome sugere, muitos desses compostos contêm em suas estruturas, um radical fenil, ao qual está associada uma cadeia lateral de três átomos de carbono.

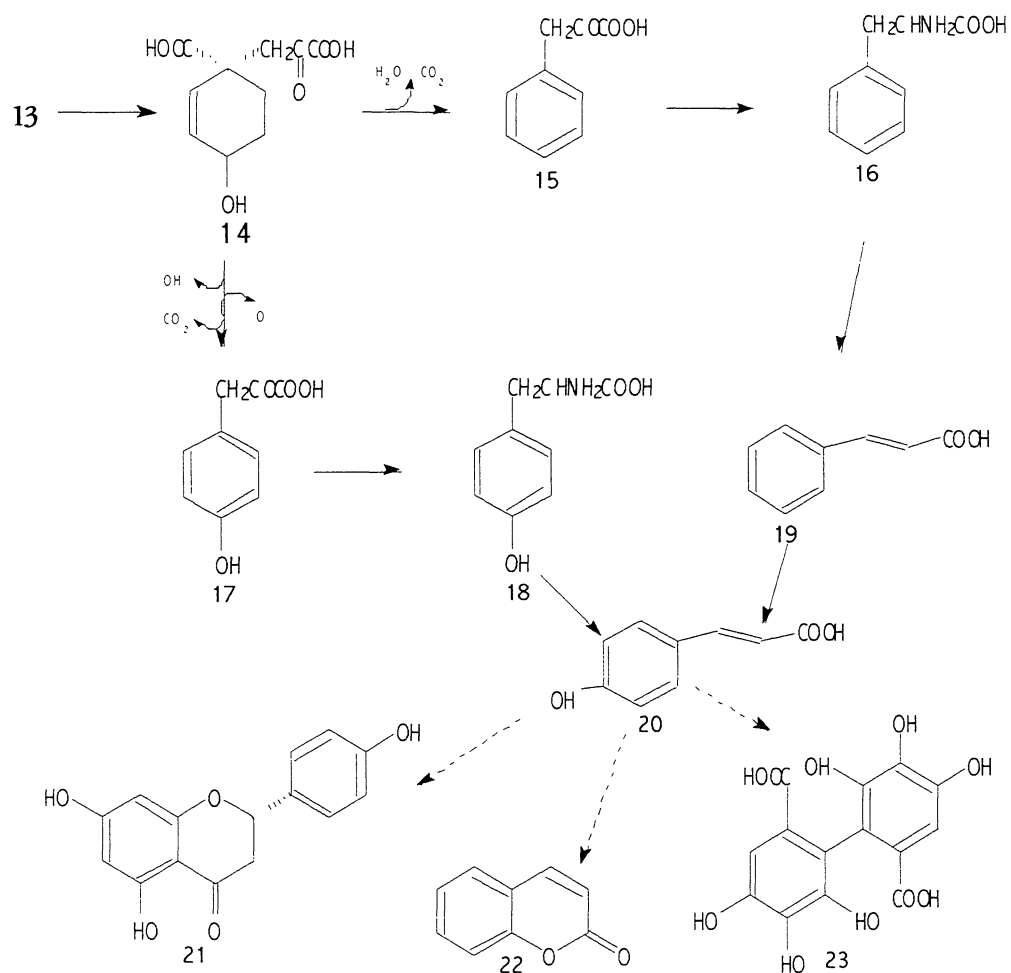
Os principais precursores de compostos fenilpropanóides são o ácido cinâmico (19) e o ácido *p*-hidroxicinâmico (20), também chamado de ácido *p*-cumárico. Nas plantas, estes compostos são originados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina (16) e tirosina (18), respectivamente, que por sua vez são sintetizados pela via do ácido xiquímico (10). Essa via biossintética foi elucidada com microrganismos, pelo uso de mutantes autotróficos de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, que necessitam de aminoácidos aromáticos para crescimento. Durante a biossíntese, dois metabólitos da glicose, D-eritrose 4-fosfato (6) e fosfoenolpiruvato (5) reagem para formar um cetona-açúcar fosforilado, com sete carbonos, ácido 3-desoxi-D-arabinoheptano-7-fosfato (DAHP) (7). Esse composto sofre ciclização, dando origem ao ácido 3-deidroquínico (8), que é convertido a ácido xiquímico (10). O ácido xiquímico (10), através de uma série de reações de fosforilação, é convertido a ácido corísmico (13), um importante elemento de ramificação da rota biossintética.



Esquema 1: Biossíntese de fenilpropanóides pela via ácido xiquímico, até o ácido corísmico (13)

Por um lado, chega-se ao ácido antranílico e triptofano e por outro ao ácido prefênico (14), o último composto não aromático da seqüência. O ácido prefênico pode ser aromatzado por duas vias. Na primeira, ocorre simultaneamente uma desidratação e descarboxilação, originando o ácido fenilpirúvico (15), precursor direto da fenilalanina (16). A segunda via ocorre pela desidrogenação do anel e descarboxilação, chegando ao ácido *p*-hidroxifenilpirúvico (17), precursor da tirosina (18).

O ácido cinâmico (19), precursor dos fenilpropanóides, é formado diretamente pela desaminação enzimática da fenilalanina. Já o ácido *p*-cumárico (20) pode ter sua origem de forma análoga, a partir da tirosina (18), ou ainda, pela hidratação do ácido cinâmico (19), na posição *para*. O ácido *p*-cumárico (20) é um intermediário central, na biossíntese de muitos fenilpropanóides, incluindo desde álcoois e fenilpropanos, como o anetol e eugenol, até compostos mais complexos, como flavonóides (21), ligninas, neoligninas, cumarinas (22) e taninos (23) (ROBBERS *et al.*, 1996).



Esquema 2: Biossíntese de fenilpropanóides pela via do ácido xiquímico, a partir do ácido corísmico (**13**)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico foi coletado em julho de 1997 em Curitiba, Paraná. Coletou-se material para confecção de exsicatas, estudo morfo-anatômico, isolamento de compostos químicos e estudo farmacológico.

A espécie coletada foi identificada como *Mikania glomerata* Sprengel, Asteraceae, sendo a exsicata registrada sob o nº 14526, no herbário UPCB, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

4.2 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO

Processamento do material coletado

Com o material fresco foram realizados testes histoquímicos e fixou-se todo o material remanescente em FAA 70 (formol/ácido acético/etanol a 70%, na proporção 5:5:90) (JOHANSEN, 1940), estocando depois em solução etanólica a 70% (BERLYN & MIKSCHE, 1976).

Caracterização macroscópica e microscópica

A caracterização macroscópica (morfologia externa) foi realizada por meio de observação visual da morfologia das folhas, comparando-se com o descrito na literatura.

Os estudos anatômicos foram efetuados em folhas adultas, coletadas a partir do 6º nó caulinar, sendo analisada a estrutura do pecíolo e da lâmina foliar. Nesta, foram analisados a epiderme em secção paradérmica; a nervura mediana no terço inferior e o mesofilo, na região entre a borda e a nervura mediana, em secções transversais.

Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos, foram elaboradas lâminas, utilizando-se os seguintes corantes e reagentes: Sudan III (SASS, 1951) para compostos lipossolúveis; azul de metileno (SAKAI, 1973) para mucilagem; glicerina iodada (BERLYN & MIKSCHE, 1976) para amido de assimilação, floroglucina clorídrica (FOSTER, 1949) para lignina e cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para compostos fenólicos.

Análise em microscopia fotônica (MF) e eletrônica de varredura (MEV)

Para o preparo de lâminas semipermanentes foram realizados cortes à mão livre nos sentidos transversal e longitudinal (paradérmico), utilizando-se isopor como suporte (QUINTAS, 1963) e solução de hipoclorito de sódio a 20% para clarificação do material. Os corantes utilizados foram azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1965) e a dupla coloração fucsina básica/azul de astra (ROESER, 1962). A montagem das lâminas foi feita com glicerina a 40% (PURVIS *et al.*, 1964) e para lutagem foi utilizado esmalte incolor (BEÇAK & PAULETE, 1976).

Para a montagem de lâminas permanentes, procedeu-se à desidratação do material botânico em série etanólica crescente, 70%, 96% e 100%. O material foi então, emblocado em glicol-metacrilato (GMA) (FEDER & O'BRIEN, 1968; BENNET, 1976) e segundo informações contidas no kit JB4 - Polysciences/USA. O material emblocado foi seccionado em micrótomo rotatório, obtendo-se cortes com espessura de 7 μ m. Utilizaram-se as mesmas colorações acima citadas, empregando-se entellan[®] como meio de montagem.

As lâminas obtidas foram fotografadas em microscópio fotônico Olympus BX-40, acoplado à câmara clara. As escalas foram fotografadas e reprografadas nas mesmas condições das fotos.

O material para microscopia eletrônica de varredura fixado em FAA 70 foi seccionado em fragmentos de cerca de 0,5cm² e desidratado em série etanólica ascendente, realizando-se duas trocas de etanol absoluto a cada duas horas. O material foi fixado em suporte metálico apropriado com cola a base de prata, sendo submetido ao ponto crítico em equipamento Balzers Sputtening CPC010 e ao processo de metalização (revestimento com ouro) em equipamento Balzers Sputtening SCD030. As amostras foram fotografadas em

microscópio eletrônico de varredura Philips SEM505, juntamente com as escalas nas mesmas condições.

4.3 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

Equipamentos e reagentes

As cromatografias em camada delgada analíticas foram feitas em placas de sílica Merck pré-ativadas com Kieselgel 60 (F₂₅₄) e a visualização em lâmpada de UV e aspersão de solução de ácido fosfomolibdico 10%, seguido de aquecimento a 100°C. Os sistemas de solventes usados estão indicados entre parênteses e as mobilidades relativas expressas pela convenção R_f. As cromatografias em colunas foram realizadas sobre Kieselgel 60 (230-400 mesh) Merck.

As determinações de ponto de fusão foram feitas em aparelho marca Köfler, sem correção.

Os espectros de ultravioleta foram obtidos em aparelho Shimadzu UV 1601 e os espectros de infra-vermelho determinados em aparelho Perkin-Elmer P-E 1710 FT-IR. Os espectros de ressonância nuclear magnética de prótons e carbono-13 foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA-300 de 300MHz e 75MHz, respectivamente, no Departamento de Química, da Universidade de Manchester, Inglaterra. As posições ou os centros dos multipletes são dados na escala δ com referência ao tetrametilsilano (TMS), como padrão interno. As multiplicidades, tipos de prótons e as constantes de acoplamento estão indicadas. Os espectros de massa foram realizados em espectrômetro Kratos Concept usando ionização elétrica (EI) e química (CI). As fórmulas moleculares foram determinadas a partir de medida de massa de precisão.

Solventes e reagentes foram purificados, antes do uso, por meio de métodos padrões. Soluções orgânicas foram secas através de lavagem com solução saturada de cloreto de sódio e repouso sobre sulfato de sódio anidro (AMAREGO & PERRIN, 1996). A vidraria usada foi seca em estufa e esfriada em dessecador antes do uso.

Unidades e símbolos estão baseados no Système Internationale d'Unités (SI) de acordo com a recomendação da IUPAC.

Processamento do material botânico

As folhas de *M. glomerata* (3kg) foram secas em estufa a 30°C e moídas a pó fino.

Extração

As folhas de guaco moídas (500g) foram colocadas em contato com solução de álcool etílico a 70% (v/v), em percolador e deixadas em maceração por cinco dias para facilitar a extração dos constituintes.

Após esse período, procedeu-se à percolação lenta, acrescentando-se mais líquido extrator ao percolador até esgotamento da droga.

Concentrou-se o extrato obtido em evaporador rotatório a 50°C, com formação de uma pasta, obtendo-se 131,68g do extrato pastoso bruto, designado por **EB1**.

Eliminação de clorofila e outras substâncias lipossolúveis do extrato bruto EB1

Suspendeu-se EB1 em água gelada, na proporção de sete partes de água para uma parte do extrato bruto. Todo o conteúdo obtido foi transferido para copo de béquer e mantido sob agitação com agitador mecânico em banho de gelo por oito horas. Após a agitação, o extrato foi mantido na geladeira por doze horas e filtrado gelado por papel de filtro.

Obteve-se cerca de um litro do extrato bruto desclorofilado, de coloração castanha, agora designado **EB1D**.

Partição do extrato bruto desclorofilado (EB1D) com solventes orgânicos

Em funil de separação colocou-se o EB1D e realizaram-se extrações com *n*-hexano (4 x 250ml), CHCl₃ (2 x 250ml) e EtOAc (2 x 250ml), nessa ordem. Trabalhou-se com o extrato, os solventes e o funil de separação gelados para minimizar a formação de emulsão.

As quatro frações de cada extrato orgânico foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório a 50°C, obtendo-se 3,38g de extrato hexânico (**EB1DH**), 6,85g de extrato CHCl₃ (**EB1DC**) e 3,42g de extrato em EtOAc (**EB1DA**). A fração aquosa foi concentrada em banho-maria a 50°C, obtendo-se 100,03g de extrato aquoso (**EB1DW**).

Fracionamento do extrato em *n*-hexano (EB1DH)

O extrato EB1DH mantido em geladeira com vestígios de *n*-hexano, favoreceu a cristalização de um composto dentro do balão. Procedeu-se então a separação e purificação do referido composto, que foi designado por **MG1'**.

Cristalização e purificação de MG1'

Todo o EB1DH foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 10ml com *n*-hexano gelado e levado à câmara fria para cristalização. O produto cristalizado apresentou impureza detectada por CCD (CHCl₃/MeOH 9:1).

A solução hexanólica de **MG1'** isenta de impurezas, por lavagem com MeOH gelado, foi levada novamente à câmara fria para cristalização. Os cristais obtidos foram novamente lavados com *n*-hexano gelado e filtrados em funil de Büchner.

O composto **MG1'** cristalizou na forma de pequenas agulhas levemente esverdeadas e com odor adocicado, semelhante à baunilha, sendo seco em secador Abderhaudden, em presença de P₂O₅ por 24 horas. Obteve-se 611mg de **MG1'**, que correspondem a 0,12% (p/p), em relação à droga seca.

Fracionamento do extrato clorofórmico (EB1DC)

O extrato clorofórmico (6,85g) foi percolado em coluna de sílica, eluindo-se com *n*-hexano, *n*-hexano/CHCl₃ (1:1), CHCl₃, CHCl₃/MeOH (1:1), (1:2), (1:3), (1:4) e (1:5), CHCl₃/MeOH (1:10) e por fim MeOH puro.

Desse fracionamento foram obtidas 148 frações, que foram submetidas a CCD (CHCl₃/MeOH 9:1) e reunidas as frações de 50 a 57 (FA) e 69 a 75 (FB) que apresentavam cristalização. As demais frações foram desprezadas por não conterem material em quantidades representativas.

Fracionamento das frações 50 a 57 (FA)

A partir do fracionamento obtido conforme dados acima, a fração FA foi eluída através de *n*-hexano, *n*-hexano/CHCl₃ (9,5:0,5), (9:1), (8:2), (7:3), (6:4) (1:1), CHCl₃, CHCl₃/EtOAc (9:1), (8:2), (1:1) e EtOAc, em aproximadamente vinte vezes o seu peso em sílica, obtendo-se 84 frações.

As frações anteriores a 34 foram desprezadas por não apresentarem manchas à luz UV em CCD.

As frações 34 a 44 (FA1) foram reunidas por apresentarem somente duas manchas à luz UV em CCD. As demais frações foram desprezadas por não apresentarem quantidades de compostos apreciáveis.

Fracionamento das frações 34 a 44 (FA1)

A partir do fracionamento obtido conforme dados acima, a fração FA1 foi eluída através de *n*-hexano, *n*-hexano/ CHCl₃ (1:1), CHCl₃, CHCl₃/EtOAc (9:1), (8:2), (1:1) e EtOAc, em aproximadamente 20 vezes o seu peso em sílica, obtendo-se 21 frações. Essas foram submetidas a CCD (*n*-hexano/EtOAc 1:1). As frações anteriores a doze foram desprezadas por não apresentarem manchas em CCD à luz UV. As frações 17 a 21 também não foram analisadas.

Reuniram-se as frações doze a dezesseis, que apresentaram cristalização e uma só mancha em CCD à luz UV. O composto assim obtido foi designado por **MG2**. O material cristalizado foi submetido a cuidadosa cromatografia em coluna, eluindo com CHCl₃/EtOAc(3:1), mostrando ser dois compostos, os quais foram denominados **MG2A** e **MG2B**, sendo o primeiro bastante solúvel em CHCl₃ e o segundo insolúvel. O composto **MG2A** foi cristalizado em DCM e submetido a análise espectrofotométrica. Em função dos espectros terem apresentado sinais de impureza, possivelmente material gorduroso, o composto foi submetido a tratamento com carvão ativado em DCM a quente, filtrado em coluna de sílica gel, cristalizado e novamente enviado para obtenção de espectros. Obteve-se 36mg de **MG2B**, que correspondem a 0,0099% (p/p), em relação à droga seca. O composto **MG2B**, devido à sua insolubilidade em solvente apropriado, não foi feita análise da sua estrutura.

Purificação das frações 69 a 75 (FB)

O material cristalizado foi submetido a cuidadosa cromatografia em coluna, usando pipeta Pasteur, eluindo com DCM, CHCl₃ e EtOAc e as frações obtidas deixadas para cristalizar. As frações que apresentaram cristais foram reunidas e o composto submetido a várias recristalizações em DCM/MeOH, e enviado para obtenção de espectros. O composto

assim purificado foi designado por **MG3**, tendo-se obtido 27mg do mesmo, que correspondem a 0,0074% (p/p), em relação à droga seca .

Fracionamento do extrato em EtOAc (EB1DA)

O extrato em EtOAc (EB1DA) (3g) foi fracionado por cromatografia em coluna, nas mesmas condições de EB1DC. Desse fracionamento foram obtidas 137 frações, que foram submetidas a CCD (EtOAc/*n*-hexano 1:1) e reunidas as frações semelhantes. Nenhuma das frações apresentaram quantidades apreciáveis de material, que compensasse um maior fracionamento.

Fracionamento do extrato aquoso (EB1DW)

O extrato EB1DW mantido em geladeira, após partição com *n*-hexano, CHCl₃ e EtOAc, favoreceu cristalização de um composto dentro do balão. Procedeu-se à lavagem e filtração do mesmo com MeOH gelado, recristalizando-o em água. Sucessivas lavagens e cristalizações foram feitas, até obtenção de cristais transparentes e com formato bem definido. O composto, assim obtido, foi designado por **MG4** e pesou 3,57g, o que corresponde a 0,71% (p/p) em relação à droga seca. Devida a baixa solubilidade de **MG4** em solventes orgânicos, não se procedeu à análise de sua estrutura.

4.4 ESTUDO FARMACOLÓGICO

Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar albino), com peso entre 180 e 200g e camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*, variedade Swiss), com peso entre 20 e 30g. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Esses animais foram mantidos em caixas de contenção, alimentados com ração e água potável *ad libitum*, submetidos a ciclos de doze horas claro-escuro, com temperatura mantida entre 22 e 24°C, até duas horas antes do ensaio, quando foram levados ao laboratório para que se adaptassem ao local do experimento.

Equipamentos e reagentes

Nas diversas metodologias foram utilizados os seguintes equipamentos: pletismômetro Ugo Basile 7140; rota-rod Ugo Basile 7600 *treadmill for mice*; placa aquecida a temperatura constante de 55°C; funis de vidro para contenção de animais em experimento; cronômetros; pHmetro; seringas, agulhas e cânulas de gavagem para administração oral nos animais.

Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido acético glacial P.A. (Reagen), indometacina P.A. (Sigma), carragenina lambda (Sigma), cremophor RH 40 (BASF), diazepam (Sigma), bicarbonato de sódio P.A. (Merck), solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (Halex Istar), cloreto de sódio P.A. (Biotec).

Teste geral de atividades e DL₅₀ (LITCHFIELD & WILCOXON, 1948)

Camundongos fêmeas e machos, pesando 25-30g foram tratados por via intraperitoneal (*ip*) e oral (*vo*) com o extrato bruto de folhas de *M. glomerata* Sprengel (EB1) e observados, sendo anotados os sinais dos efeitos do extrato, relacionando-os à dose, durante duas horas e a cada 24 horas, por sete dias consecutivos.

No tratamento com EB1, por via oral, foram administradas doses de 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400mg/kg, em grupos de dez animais. Via intraperitoneal, o tratamento com EB1 foi realizado com doses de 200, 300, 350, 400, 800 e 1600 e 3200mg/kg, também em grupos de dez animais.

Rota-Rod (DUNHAM & MIYA, 1957)

O aparelho de rota-rod é constituído por uma barra giratória de 2,5cm de diâmetro, subdividida em 5 compartimentos, colocada a 25cm de altura e girando a 24rpm.

Neste teste, é analisado o efeito do extrato sobre a performance motora do animal. Grupos de dez camundongos machos foram selecionados 24 horas antes do experimento, sendo eliminados aqueles que não permaneceram sobre o aparelho de rota-rod, por pelo menos, dois períodos consecutivos de sessenta segundos cada. Em um grupo de dez animais selecionados foi feito tratamento por via oral com EB1, na dose de 750mg/kg, sessenta minutos antes do experimento. Em outro grupo (n=10), foi administrado salina *vo* (0,01cm³/g), sessenta minutos antes do experimento, sendo esse o controle negativo. Um

terceiro grupo de animais (n=10) recebeu, por via intraperitoneal, diazepam na dose de 2,4mg/kg, trinta minutos antes do experimento, para evidenciar o controle positivo. A seguir, cada animal foi colocado no aparelho e sua permanência foi observada por um período máximo de três minutos (tempo de corte), sendo que duas quedas consecutivas em dois períodos de um minuto já considerou-se corte. O resultado foi dado pela média do tempo de permanência de cada grupo no aparelho em minutos

Contorções abdominais (KOSTER *et al.*, 1952)

Camundongos machos pesando 20-25g (n=6) foram tratados por via oral com EB1, nas doses de 250, 500, 750 e 1000mg/kg, ou água 0,01cm³/g *vo* e indometacina 5mg/kg. Sessenta minutos após o tratamento, esses animais receberam, via *ip*, injeção de ácido acético 0,8%, na dose de 80mg/kg, com exceção do grupo controle positivo da indometacina, cujo tratamento foi feito trinta minutos antes do desafio com o ácido acético.

Imediatamente após a injeção de ácido acético, os animais foram colocados sob funis de vidro para observação, contando-se o número de contorções por vinte minutos. Foi considerada uma contorção, a contração da parede abdominal, seguida da extensão dos membros posteriores.

O resultado é expresso pelo número total de contorções abdominais durante os vinte primeiros minutos após a administração intraperitoneal de ácido acético.

Placa quente (EDDY *et al.*, 1950)

Camundongos machos, pesando 22-28g, foram colocados sobre placa aquecida a 55°C, registrando-se o tempo de latência para manifestação de comportamento de dor. Tal comportamento foi evidenciado por levantar e/ou lambe a pata traseira, sapatear, ou mesmo pular. Em seguida, os animais foram tratados com água (0,01cm³/g, *vo*) EB1 (1000mg/kg, *vo*), ou fentanil (100µg/kg, *sc*), sendo colocados novamente sobre a placa aquecida, sessenta minutos após o tratamento, com exceção do grupo fentanil, cujo tratamento foi quinze minutos antes do desafio. Os resultados foram expressos em porcentagem de Efeito Máximo Possível (%EMP), onde:

$\%EMP = (T \text{ placa} - T_0) \times 100 / (T \text{ corte} - T_0)$, sendo,

- T placa = tempo de latência para o animal tratado
- T₀ = tempo de latência antes do tratamento
- T corte = trinta segundos

Edema de pata de rato (WINTER *et al.*, 1962)

Foram utilizados ratos machos pesando entre 180-200g, que receberam injeção intraplantar de solução de carragenina (500µg / 0,1cm³ de solução salina estéril) na pata direita, e igual volume (0,1cm³) de solução salina 0,9% estéril na pata esquerda.

A avaliação do desenvolvimento do edema foi feita por pletismometria, em pletismômetro Ugo Basile 7140, onde as patas dos animais foram imersas até o maléolo.

O registro do deslocamento do líquido, produzido pela imersão da pata, foi realizado no tempo zero, antes da injeção do agente causador do edema, e por mais quatro horas, com medidas a cada hora.

Para este experimento, foram utilizados grupos de seis ratos. Os animais de cinco grupos foram tratados por via oral com o EB1, nas doses de 250, 500, 750, 1000 e 1500mg/kg, sessenta minutos antes do desafio. Os grupos controles foram tratados com água *vo* (0,01cm³/g), sessenta minutos antes da carragenina, ou indometacina 5mg/kg *vo* (solução a 0,5mg/cm³ em NaHCO₃ 5%), trinta minutos antes do desafio. Os resultados foram expressos como médias das percentagens de aumento do volume das patas (%AVP) em função do tempo.

Calculou-se a percentagem de AVP pela equação:

$$\%AVP = \frac{\text{Vol } t - \text{Vol } t_0}{\text{Vol } t_0} \times 100$$

Vol t = volume da pata em cada tempo de leitura

Vol t₀ = volume da pata antes da injeção intraplantar da carragenina

%AVP = percentagem do aumento do volume da pata

Formalina (DEBUISSON & DENNIS, 1977)

Foram utilizados camundongos machos, pesando 22-25g, os quais receberam injeção, na superfície dorsal da pata traseira esquerda, de solução de formol 1% (0,02cm³) e foram observados durante cinquenta minutos, sob funil de vidro. O tempo acumulado em que o animal apresentou sinais de dor (lambe, morde ou levanta a pata injetada), na primeira

e segunda fase, foi usado como parâmetro de comparação entre os grupos. Quatro grupos de seis animais receberam EB1 nas doses de 250, 500, 750 e 1000mg/kg *vo*, sessenta minutos antes do desafio. Os grupos controles receberam água *vo* (0,01cm³/g), sessenta minutos antes da injeção de formol, ou indometacina 5mg/kg *vo* (solução a 0,5mg/cm³ em NaHCO₃ 5%), trinta minutos antes do desafio. O principal objetivo da execução deste teste, é obter informações a respeito do efeito analgésico sobre a dor inflamatória e sobre a dor não inflamatória. Nos primeiros minutos após o desafio, o animal apresenta manifestação de dor pela aplicação da solução formol, correspondendo à primeira fase do teste, ou seja, dor não inflamatória. Algum tempo depois, as manifestações de dor tornam a ser evidenciadas, indicando que o formol induziu um processo inflamatório na pata injetada, correspondendo à segunda fase do teste, quer dizer, dor inflamatória.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Dunnett (VIEIRA, 1999) para estabelecer a diferença de grupos experimentais em relação ao grupo controle.

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO

Morfologia externa

M. glomerata é um subarbusto trepador, com ramos castanho-esverdeados e cilíndricos (Figuras 1 e 2).

As flores acham-se reunidas em capítulos sésseis, formando grandes glomérulos (Figuras 5 e 6).

Os frutos são secos, indeiscentes, do tipo aquênio, sendo dispersos pelo vento (Figura 7).

As folhas de *M. glomerata* são opostas, pecioladas (Figuras 1 e 2) e glabras, sendo providas de cinco nervuras na região basal. As nervuras secundárias e terciárias são bem visíveis em ambas as faces, formando retículo bem aparente. Possuem ápice acuminado e base arredondada ligeiramente assimétrica, apresentando projeções laterais que caracterizam a espécie (Figuras 3 e 4). As folhas adultas (a partir do 6º nó) medem de 10 a 15cm de comprimento por 5 a 8cm de largura. Estas, após secagem, exalam um aroma adocicado que lembra baunilha. O pecíolo é curto e quase cilíndrico, apresentando base torcida.



Figura 1: Aspecto geral de *M. glomerata*.



Figura 2: Detalhe das folhas de *M. glomerata*.

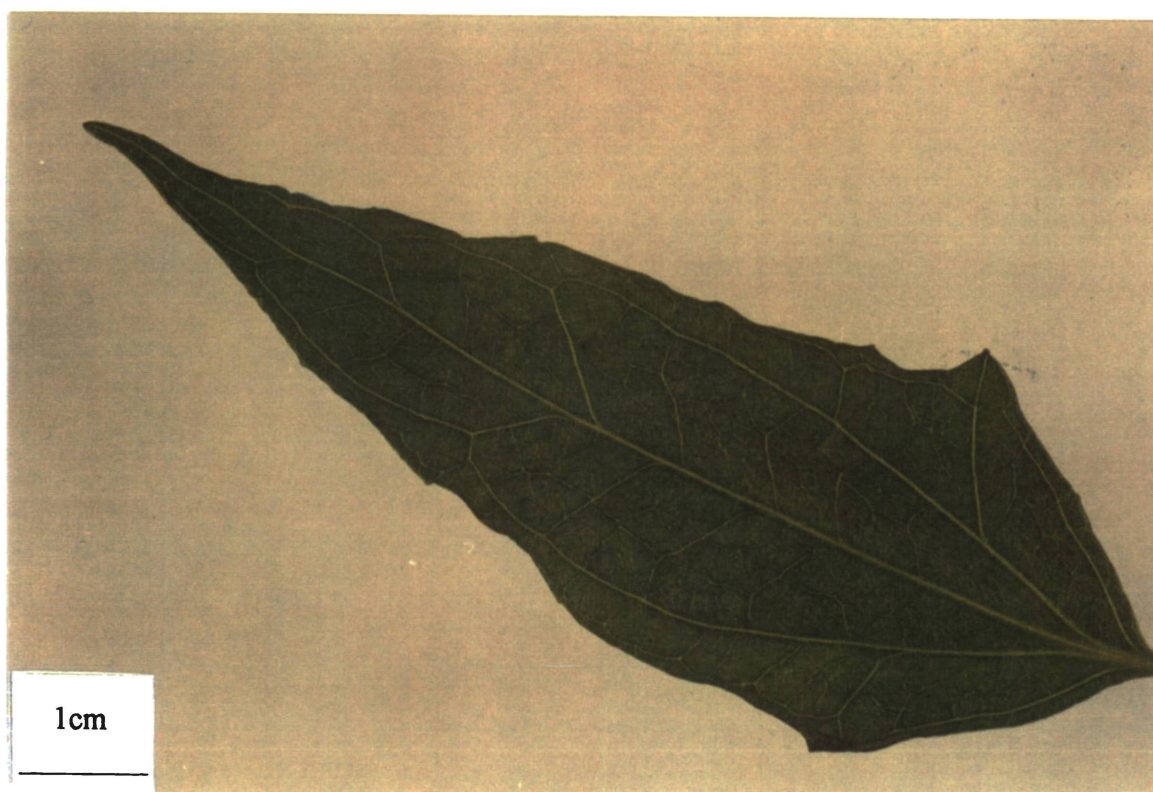


Figura 3: Face adaxial da folha de *M. glomerata*.

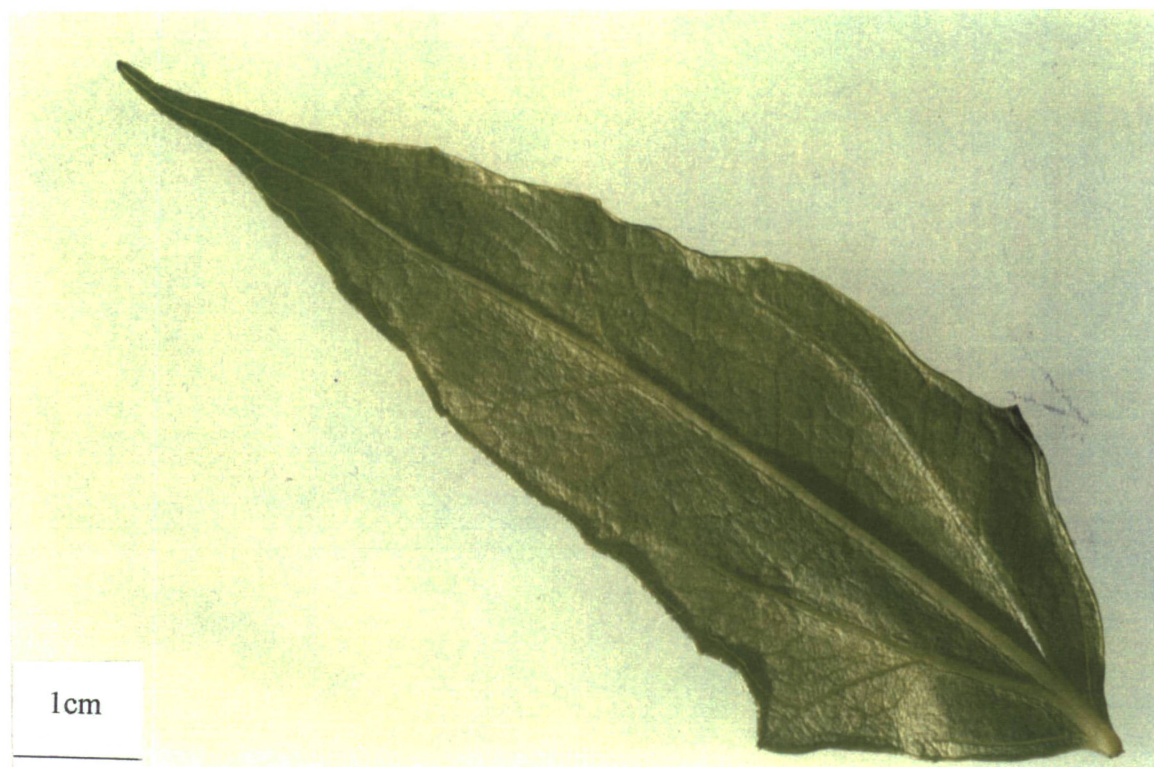


Figura 4: Face abaxial da folha de *M. glomerata*.



Figura 5: Detalhe das inflorescências de *M. glomerata*.



Figura 6: Detalhe das inflorescências de *M. glomerata*.



Figura 7: Detalhe dos frutos de *M. glomerata*.

Lâmina foliar

Em vista frontal, a epiderme da face adaxial apresenta células com formato sinuoso, sem a presença de estômatos e com paredes anticlinais pouco espessas (Figura 8). Já a epiderme da face abaxial exibe células relativamente mais sinuosas, com paredes anticlinais mais espessas, observando-se estômatos anomocíticos e predominância de anisocíticos (Figuras 9 e 10). Os complexos estomáticos não se fazem presentes na epiderme que recobre as nervuras. Não são observados tricomas tectores. Podem-se observar também, sobretudo na face abaxial, os campos primários de pontoação (Figura 10 setas).

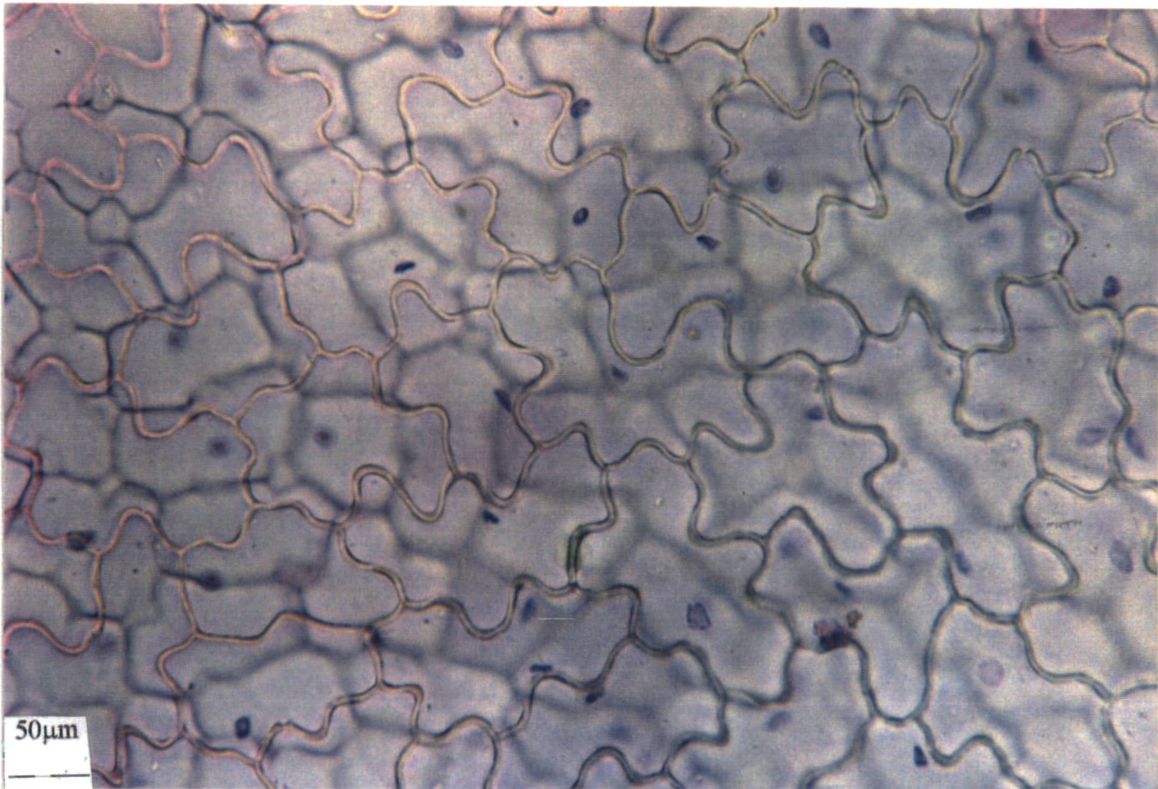


Figura 8: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em vista frontal; epiderme da face adaxial. (MF).

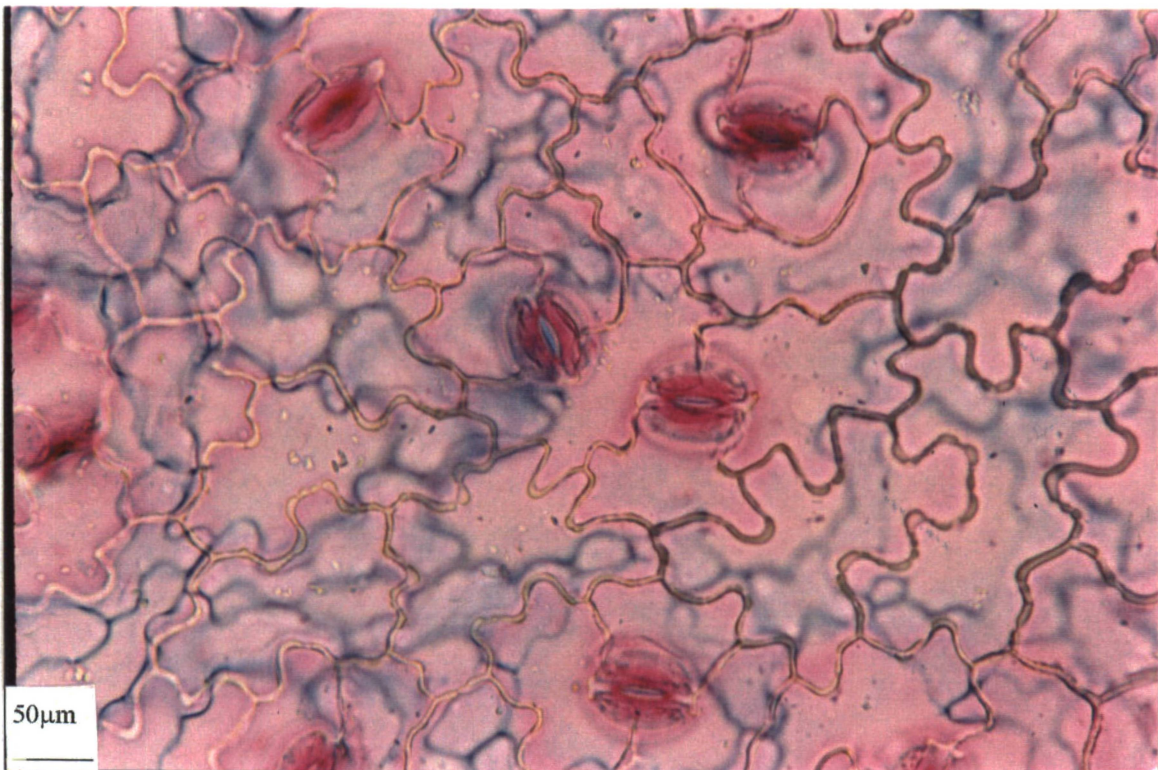


Figura 9: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em vista frontal; epiderme da face abaxial, com estômatos anomocíticos e anisocíticos. (MF).

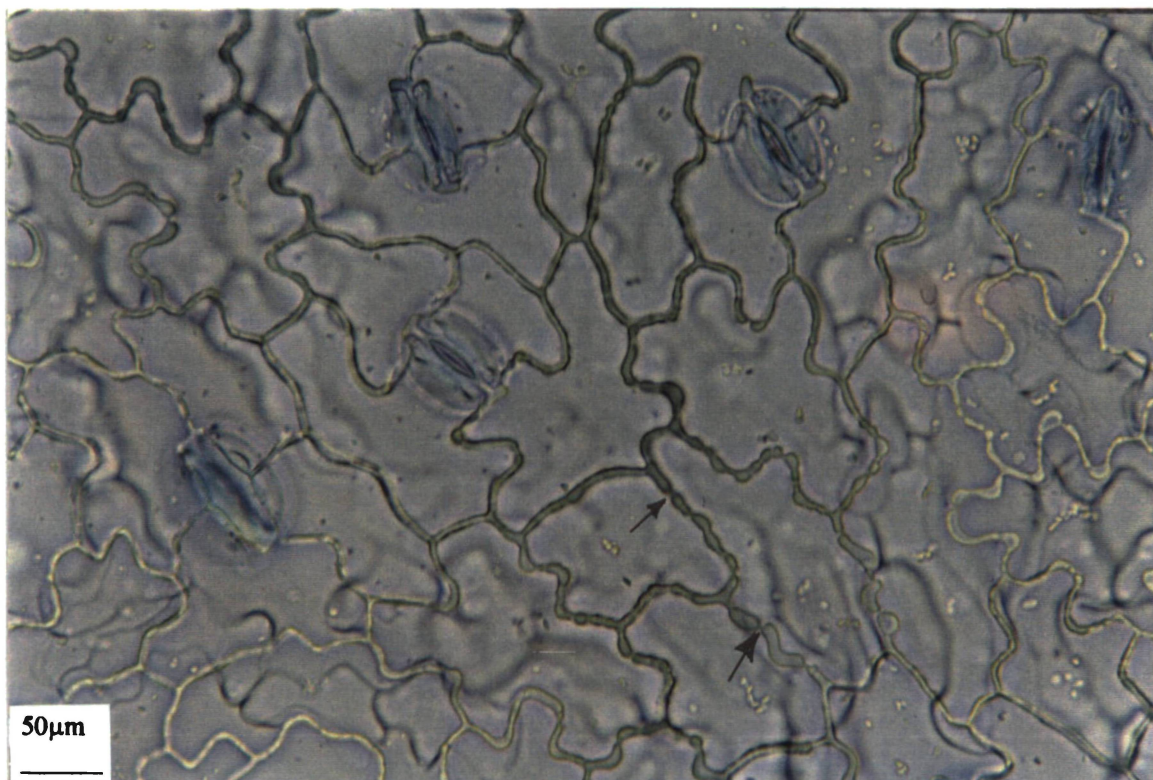


Figura 10: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em vista frontal; epiderme da face abaxial, com estômatos anomocíticos e anisocíticos e campos primários de pontuação (setas). (MF).

Em secção transversal, a epiderme da face adaxial apresenta-se uniestratificada ao longo da lâmina foliar, com células de contorno aproximadamente retangular, alongadas no sentido periclinal, observando-se camada subepidérmica. Toda a extensão da epiderme da face adaxial é revestida por cutícula delgada, que acompanha a curvatura das células epidérmicas (Figura 11). A epiderme da face abaxial, quando vista em secção transversal possui camada subepidérmica praticamente em toda sua extensão, tendo cutícula e características celulares muito semelhantes às da face adaxial.

Tricomas glandulares pluricelulares, unisseriados e curvos quase sempre em depressões epidérmicas são observados tanto na face adaxial como abaxial (Figuras 12 a 14).

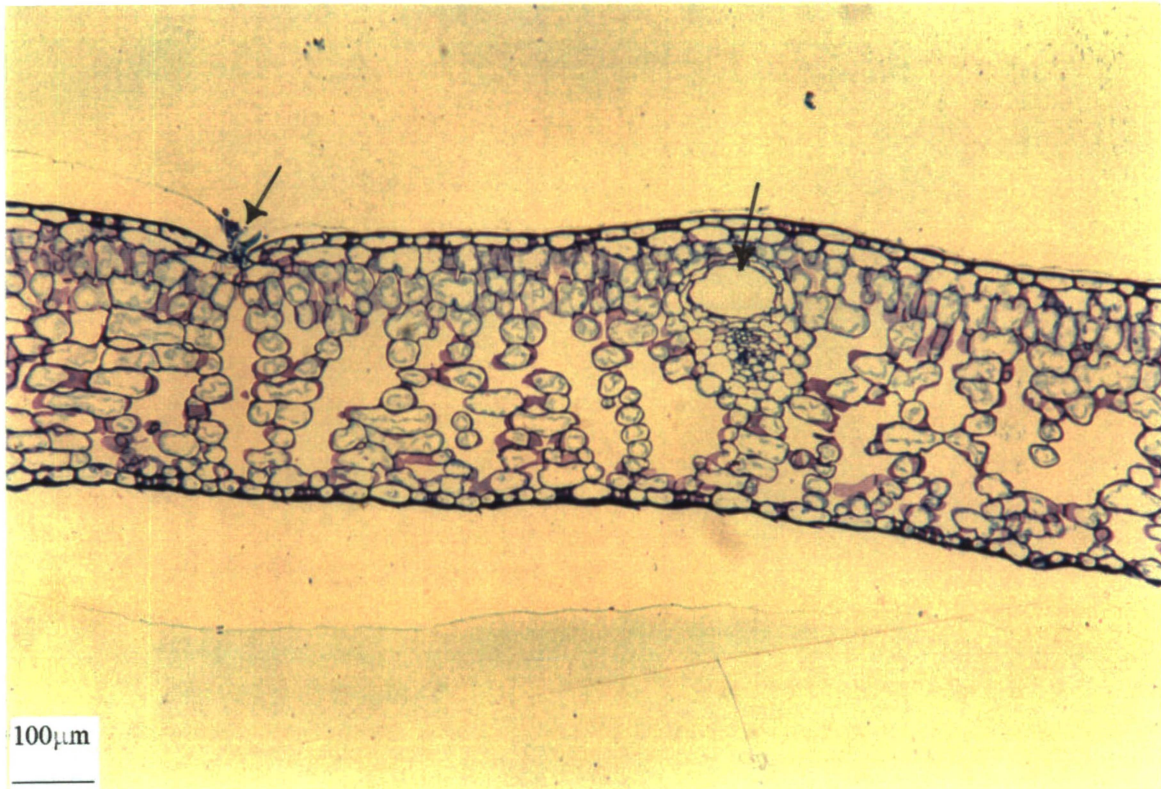


Figura 11: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em secção transversal; região da lâmina foliar, mesofilo dorsiventral, inserção do tricoma glandular (seta) e ducto secretor (seta). (MF).

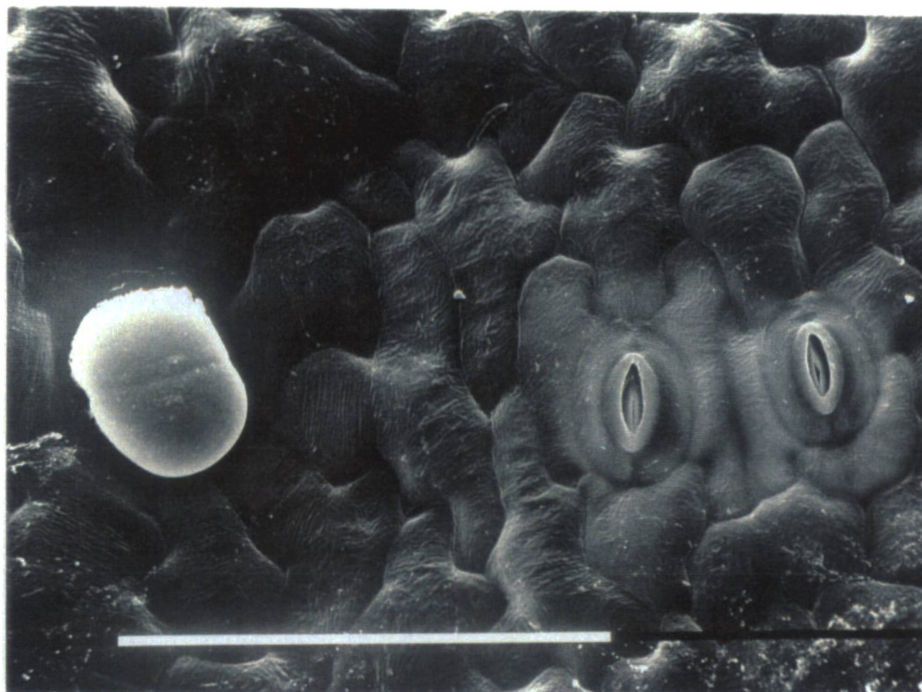


Figura 12: . Epiderme da face abaxial da folha de *M. glomerata*; detalhes dos estômatos, tricoma glandular e cutícula levemente estriada. (MEV) Barra = 0,1 μm

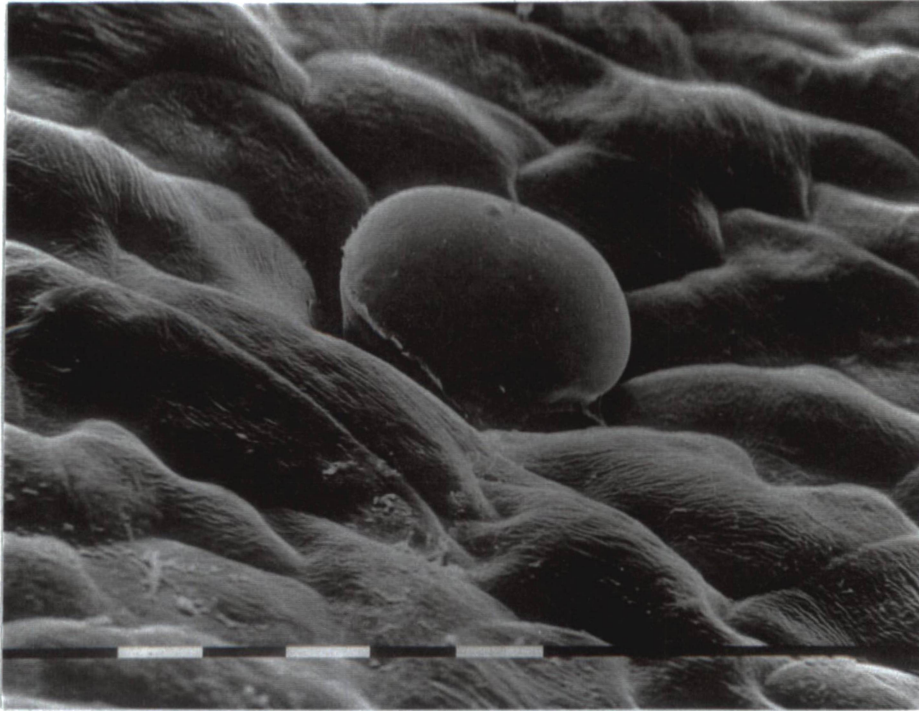


Figura 13: Epiderme da face abaxial da folha de *M. glomerata*; detalhe do tricoma glandular. (MEV) Barra = 10 μ m.



Figura 14: Epiderme da face abaxial da folha de *M. glomerata*; detalhe do tricoma glandular e estômato. (MEV) Barra = 10 μ m.

O mesofilo, em secção transversal, é dorsiventral, sendo o parênquima paliçádico constituído por uma ou duas fileiras de células e o lacunoso por oito a dez camadas (Figura 11).

Observam-se também na região do mesofilo estruturas secretoras que correspondem a ductos, freqüentemente associados à feixes vasculares (Figura 15).

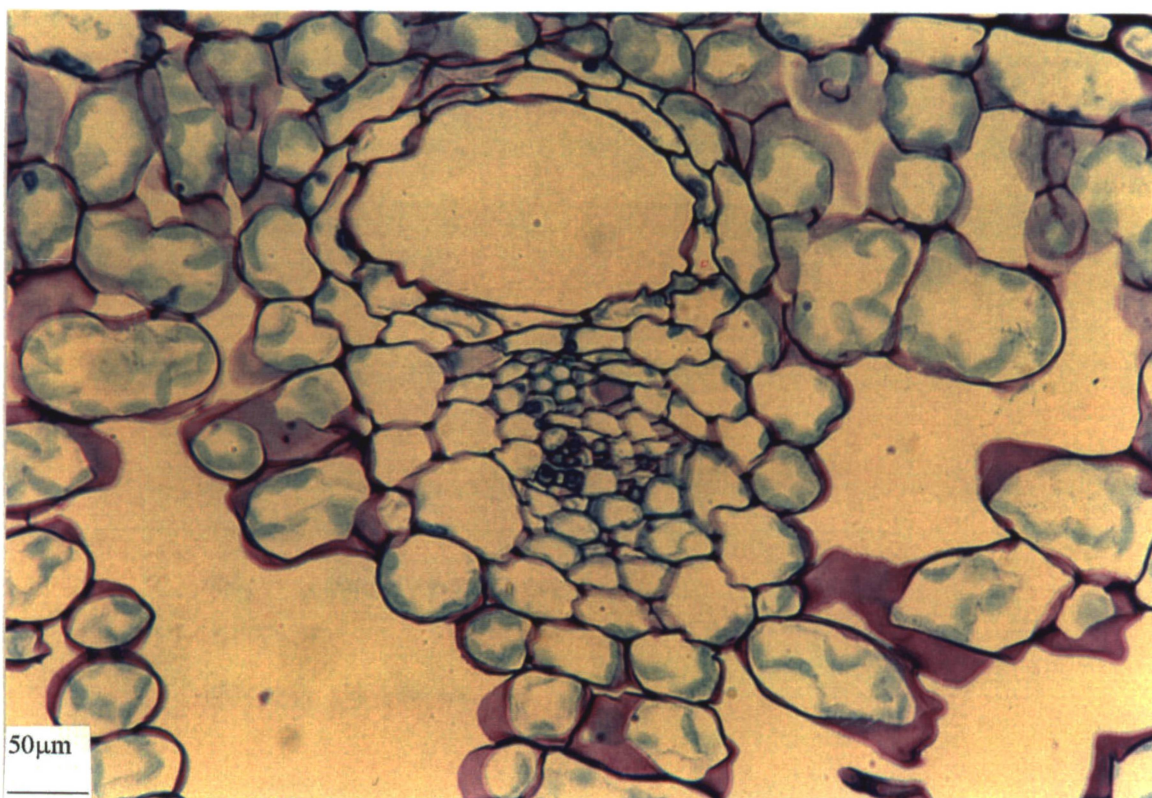


Figura 15: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em secção transversal; detalhe do ducto secretor, próximo do feixe vascular, na região do mesofilo. (MF).

Região da nervura mediana

A região da nervura mediana, em secção transversal, apresenta contorno biconvexo, mais proeminente na face abaxial (Figura 16). A epiderme da face adaxial é formada por uma só camada de células de contorno aproximadamente retangular, alongadas no sentido periclinal. Essas células são recobertas por cutícula relativamente espessa (Figura 17) e levemente estriada, podendo-se observar também com pouca freqüência, tricomas glandulares pluricelulares curvos em depressões epidérmicas (Figura 18). A epiderme da face abaxial é semelhante à da face adaxial.

Observa-se contiguamente às faces epidérmicas, colênquima com espessamento tipicamente angular (Figura 17), sendo os parênquimas paliádico e lacunoso interrompidos nessa região (Figuras 16 e 17). O parênquima fundamental apresenta células com contornos arredondados, em secção transversal, deixando meatos (Figura 17 setas).

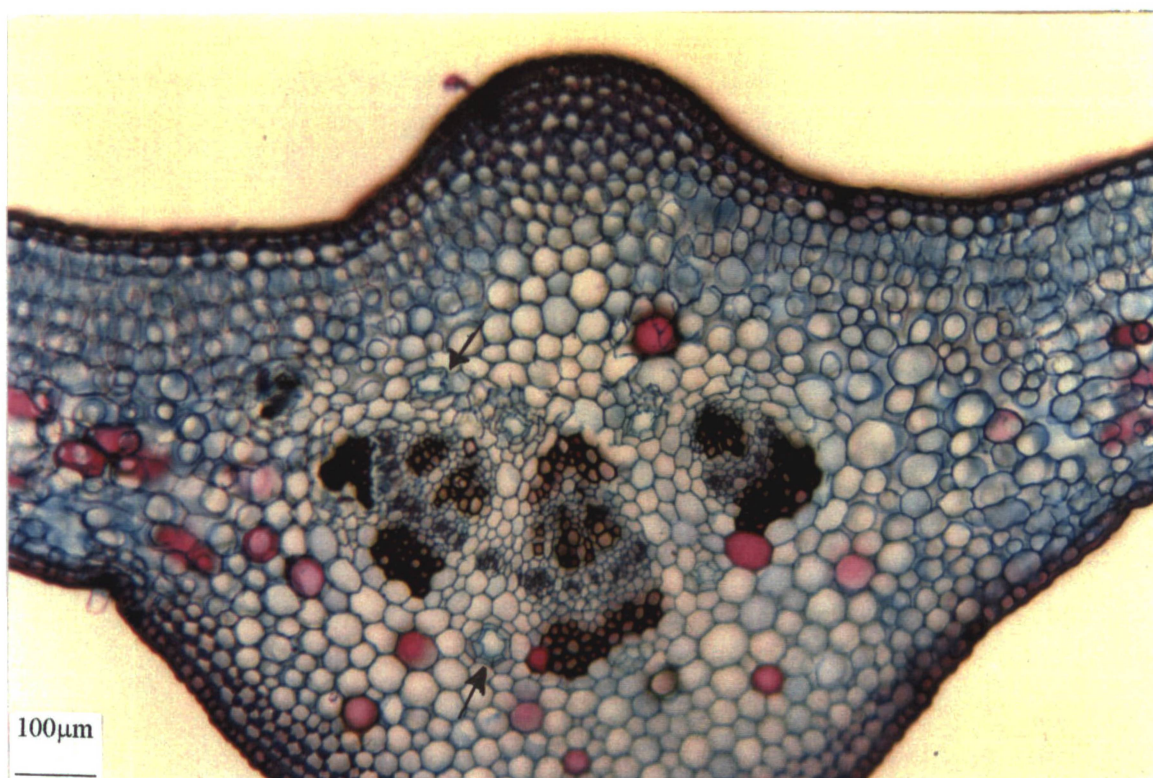


Figura 16: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em secção transversal; região da nervura mediana, com ductos secretores (setas), região de colênquima angular e disposição dos feixes vasculares. (MF).

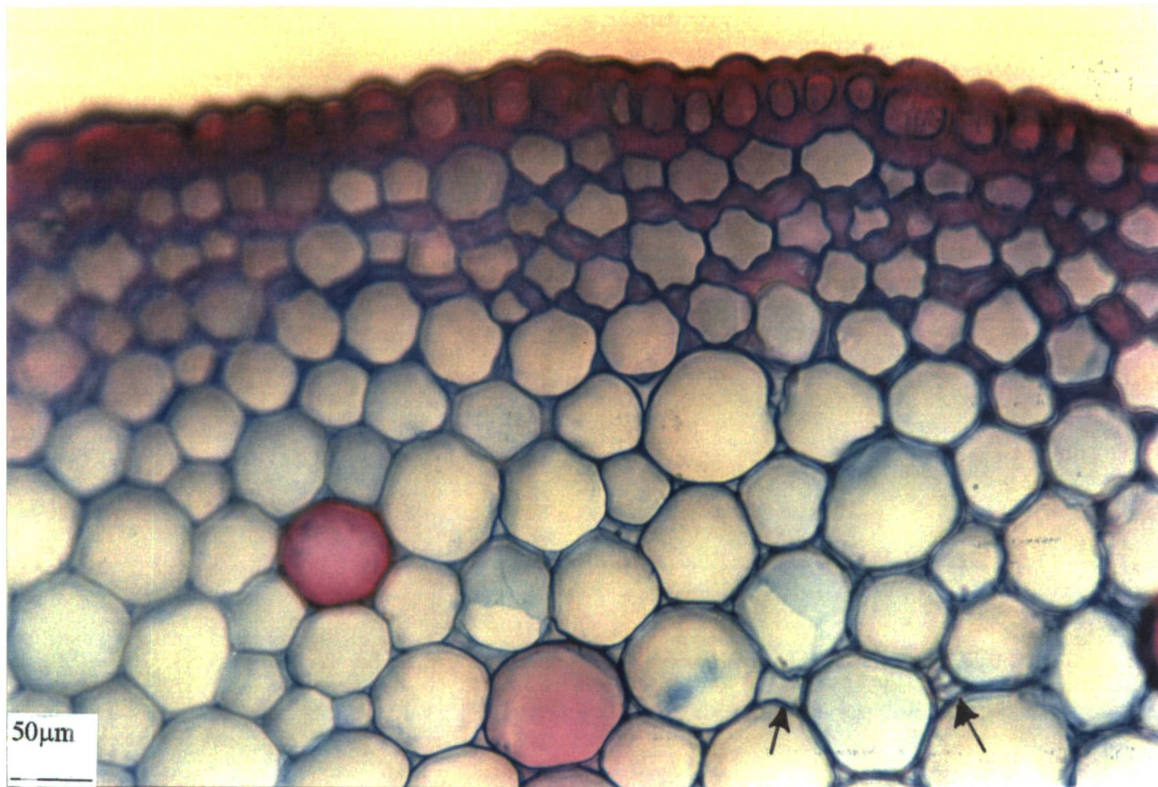


Figura 17: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em secção transversal; detalhe do colênquima angular, cutícula e meatos (setas), na região da nervura mediana. (MF).

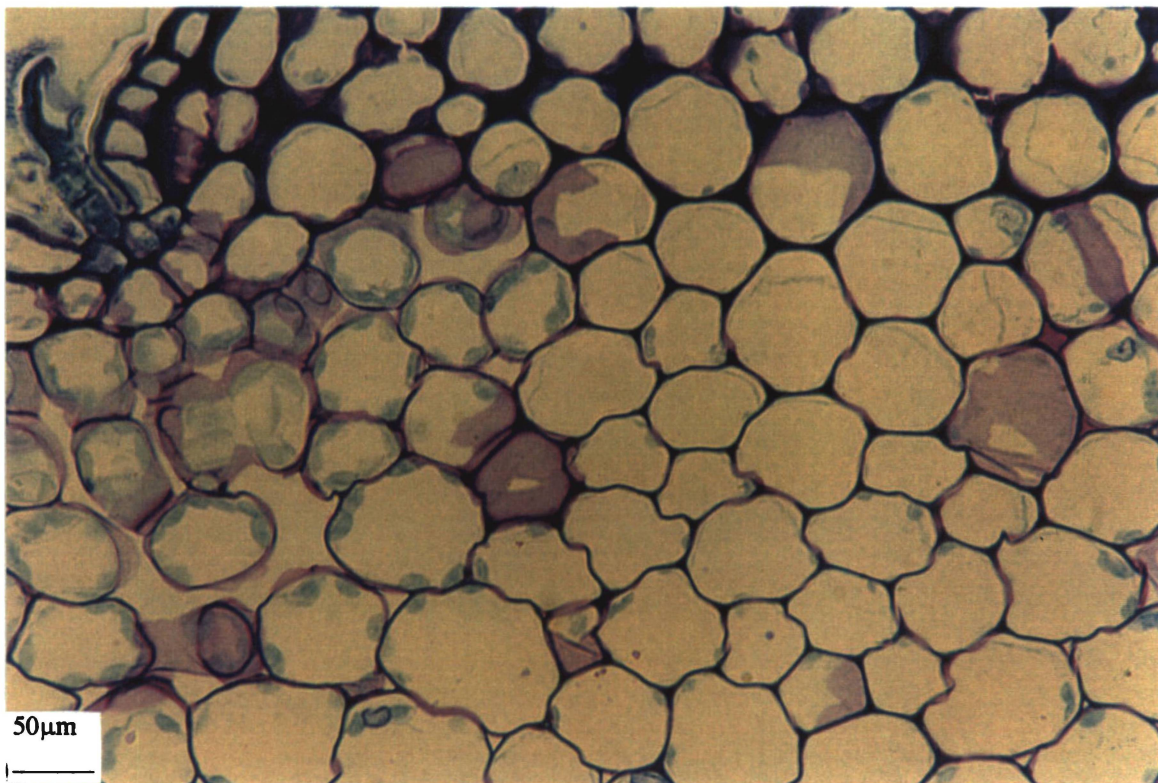


Figura 18: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em secção transversal; detalhe do tricoma glandular, em depressão epidérmica, na região da nervura mediana. (MF).

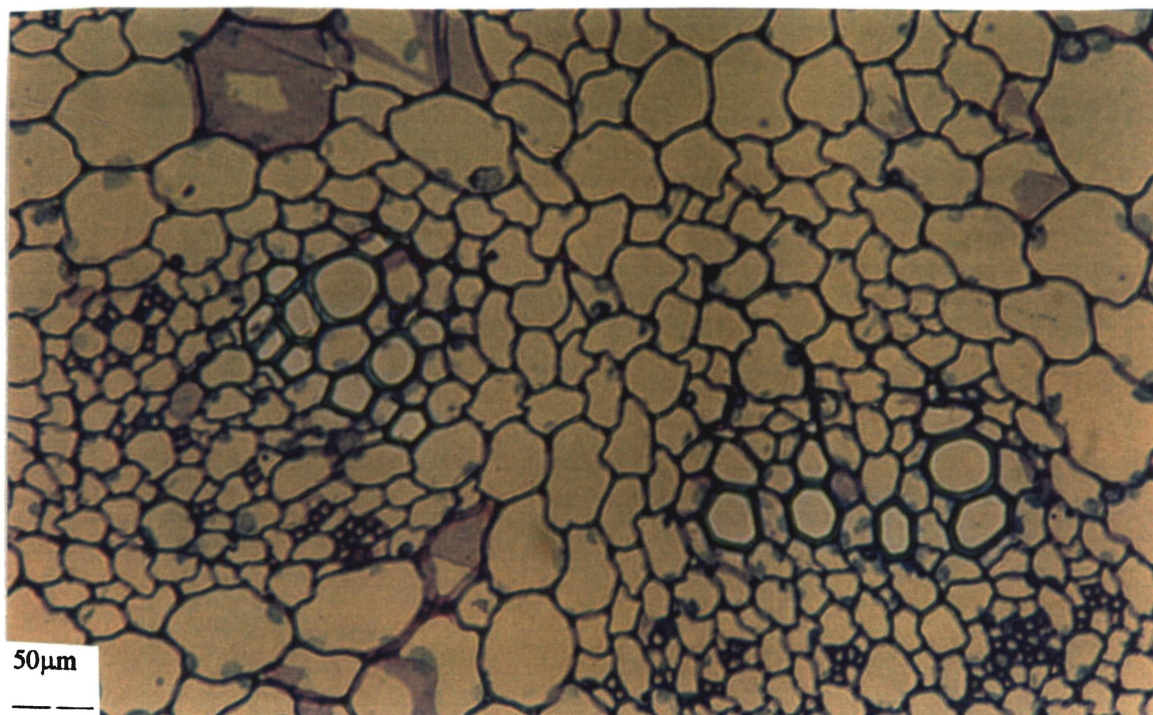


Figura 19: Microscopia fotônica da folha de *M. glomerata*, em secção transversal; detalhe dos feixes vasculares, na região da nervura mediana. (MF).

Os feixes vasculares, geralmente em número de quatro, são do tipo colateral, dispostos em forma de arco, sendo envolvidos por bainha esclerenquimática descontínua, ou em fase de esclerificação (Figura 16). Estes são separados por raios compostos por três a cinco células do parênquima (Figura 16 e 19).

Observam-se também nas proximidades do xilema e floema, pequenos ductos secretores, revestidos por epitélio composto por 5 a 11 células (Figura 16 setas).

Pecíolo

O pecíolo apresenta contorno praticamente plano-convexo a arredondado, em secção transversal (Figura 20). As células epidérmicas, com formato retangular, em secção transversal, dispõem-se em um único estrato e são revestidas por cutícula lisa e delgada. Uma faixa contínua de colênquima angular encontra-se contígua à epiderme, compreendendo cerca de 5 a 6 estratos celulares (Figura 21).

O parênquima fundamental exhibe células de contorno arredondado, em secção transversal, com os feixes vasculares dispostos em forma de arco, acompanhando o contorno da estrutura. Observam-se de 7 a 9 feixes vasculares do tipo colateral (Figuras 20 a 23). Ductos secretores são observados no tecido parenquimático próximo aos feixes vasculares.

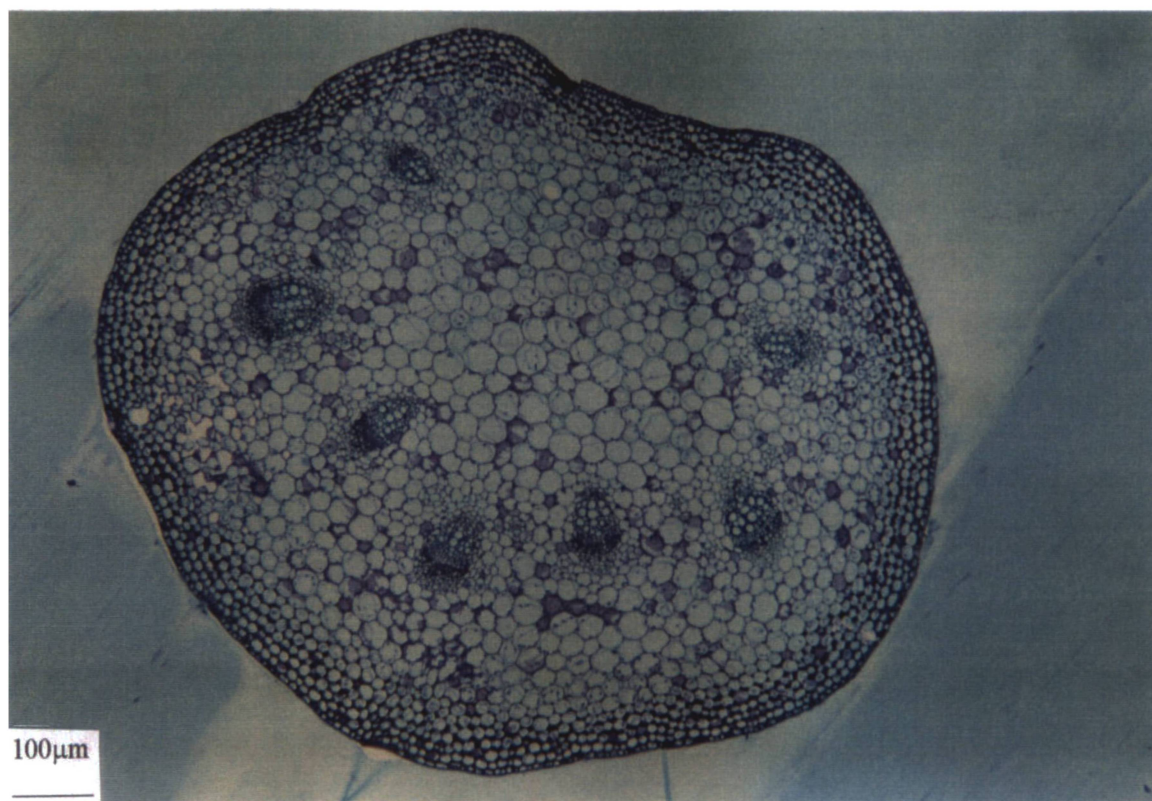


Figura 20: Microscopia fotônica do pecíolo de *M. glomerata*, em secção transversal. (MF).

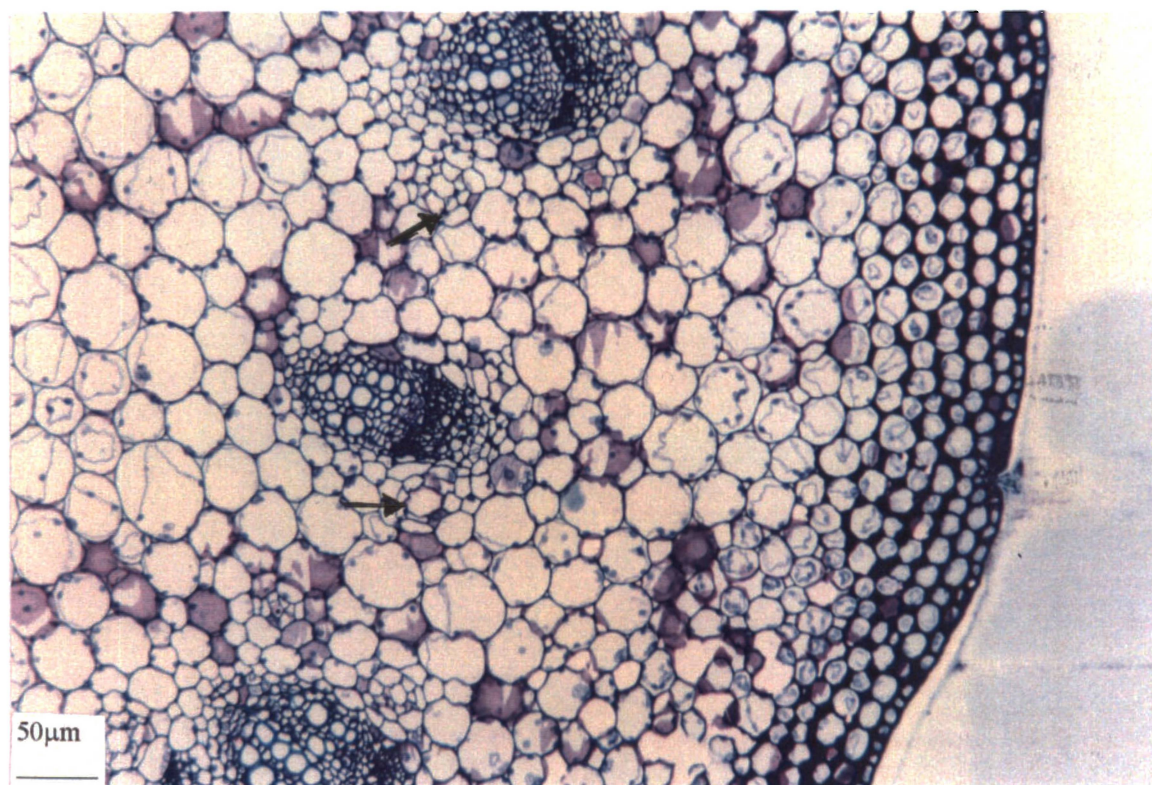


Figura 21: Microscopia fotônica do pecíolo de *M. glomerata*, em secção transversal; detalhe da região de colênquima angular, feixes vasculares e ductos secretores (setas). (MF).

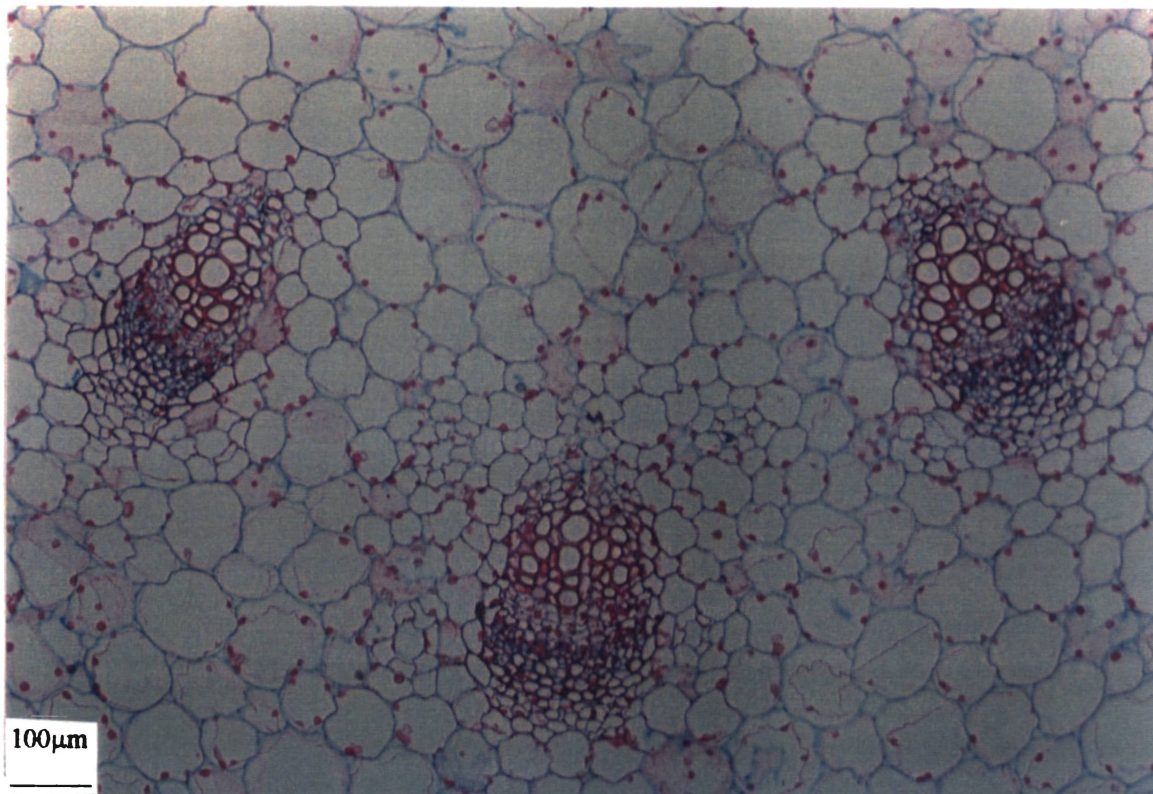


Figura 22: Microscopia fotônica do pecíolo de *M. glomerata*, em secção transversal; detalhe dos feixes vasculares. (MF).

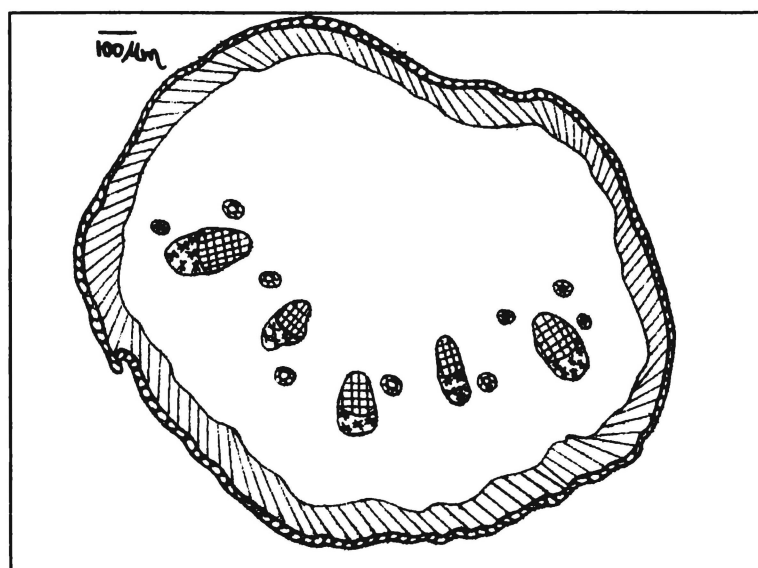


Figura 23: Diagrama do pecíolo de *M. glomerata*, em secção transversal.

- | | |
|--|---|
|  Epiderme |  Floema |
|  Região de colênquima ângular |  Xilema |
|  Parênquima fundamental |  Ductos secretores |

Testes histoquímicos

Os resultados dos testes histoquímicos realizados estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultado dos testes histoquímicos da lâmina foliar e do pecíolo de *M. glomerata*.

TESTE	LÂMINA FOLIAR	PECÍOLO
Amido	Presença de grande quantidade de amido de assimilação nos parênquimas paliçádico e lacunoso	Presença de amido de assimilação no parênquima fundamental.
Compostos lipofílicos	As estruturas secretoras internas (ductos) apresentam produto que reage positivamente ao Sudan III.	As estruturas secretoras internas (ductos) apresentam produto que reage positivamente ao Sudan III.
Compostos fenólicos	Presença de compostos fenólicos no parênquima paliçádico.	Não observado.
Mucilagem	Não observada	Não observada

5.2 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

Foram isolados cinco compostos da folha de *M. glomerata*. Os compostos designados por MG1, MG2A e MG3 foram identificados através de análises espectroscópicas de ultravioleta, infra-vermelho, ressonância nuclear magnética de prótons e isótopo de carbono-13, com experimentos de COSY e DEPT, e espectrometria de massa. Os compostos MG2B e MG4, pouco solúveis em solventes orgânicos, não foram identificados.

Composto MG1'

ν máx. (filme)/ cm^{-1} : 1785 e 1581.

λ máx.(MeOH): 208, 272, 307nm.

Tabela 2: ^1H -RMN (300MHz; CDCl_3) de **3**

1H	δ	Nº DE PRÓTONS	SINAL	MULTIPLICIDADE (<i>J</i>)
C3	6,70	1	d	9,61
C4	7,70	1	d	9,61
C5	7,58	1	t	1,79
C6	7,41	1	t	7,38
C7	7,52	1	t	1,10
C8	7,32	1	t	8,47

Tabela 3: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) de **3**

^{13}C	δ	SINAL
CO	160,675	s
C3	116,729	d
C4	143,417	d
C5	118,737	s
C6	127,819	d
C7	124,354	d
C8	131,745	d
C9	116,535	d
C10	153,916	s

EM (CI NH_3): m/z 164 ($\text{M}^+ \text{NH}_4^+$), 147 ($\text{M}^+ + 1$), 146 (M^+), 118, 148, 165 e 166.

EM (EI): m/z 147 ($\text{M}^+ + 1$), 146 (M^+), 118, 89, 90, 44.

Composto MG2A

ν máx. (filme)/ cm^{-1} : 756, 1628, 1686, 1752 e 3260.

λ máx. (MeOH): 266nm.

Tabela 4: ^1H -RMN (300MHz; CDCl_3) de 7

^1H	δ	Nº DE PRÓTONS	SINAL	MULTIPLICIDADE (J)
C3	7,02	1	t	1Hz
C4	7,34	1	t	8Hz
C5	7,12	1	d	8Hz
C6	7,59	1	d	8Hz
C7	7,66	1	d	16Hz
C8	6,42	1	d	16Hz
CH_3	2,34	3	s	_____
COOH	10,98	1	s	_____

EM (CI NH_3): m/z 224 ($\text{M}^+ \text{NH}_4^+$), 207 ($\text{M}^+ + 1$), 206 (M^+), 102 118, 146, 164.

EM (EI): m/z 206 (M^+), 118, 146, 164.

Composto MG3

ν_{max} (filme)/ cm^{-1} : 3275, 2938, 1671, 1607, 1586, 1512, 1331, 1107;

λ_{max} (MeOH): 238, 308, 320 nm

Tabela 5: ^1H -RMN (300 MHz; CDCl_3) de 9

^1H	δ	Nº de prótons	Sinal	Multiplicidade (J)
-CHO	9,83	1	S	_____
2 / 6	7,16	2	S	_____
-OH	6,09	1	S	_____
-OCH ₃	3,98	6	S	_____

Tabela 6: ^{13}C -RMN, CDCl_3 , 75 MHz de **9**

^{13}C	δ	Sinal
-CHO	190,650	d
C-4	147,262	s
C-1	140,722	s
C-3 / 5	128,321	s
C-2 / 6	106,603	d
-O-Me	56,399	q

EM (CI NH_3): m/z 200 ($\text{M}^+ + \text{NH}_4^+$), 183 ($\text{M}^+ + 1$), 182 (M^+), 169, 108, 105, 91 e 88

EM (EI): m/z 183 ($\text{M}^+ + 1$), 182 (M^+), 168, , 167, 151, 139, 135, 111, 108, 96, 91, 84, 79, 77, 65, 49

5.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO

Teste geral de atividade

Via oral

As doses de 200, 400 e 800mg/kg não causaram nenhuma manifestação nos animais. Doses mais elevadas provocaram piloereção e perda de apreensão das patas.

Via intraperitoneal

A administração *ip* de EB1 gerou contorções nos animais testados, cuja intensidade aumentou, conforme o aumento da dose.

DL₅₀ em camundongos

Via oral

O extrato EB1 nas doses de 200 a 6400mg/kg não provocaram óbito de nenhum dos animais testados.

Via intraperitoneal

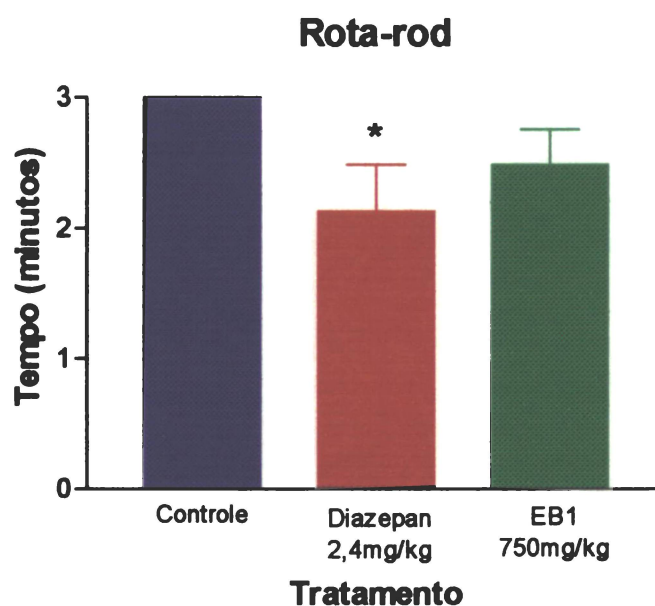
A DL_{50} de EB1, determinada via *ip*, por regressão apresentou valor de 2349,86mg/kg.

Rota-rod

O tratamento *vo* 750mg/kg de EB1 não alterou o comportamento de camundongos no rota-rod, ao nível de significância de 5%.

Tabela 7: Tempo de permanência de camundongos em rota-rod (min).

	salina 0,9% <i>vo</i>	diazepam 2,4 mg/kg <i>ip</i>	EB1 750 mg/kg <i>vo</i>
Média	3,00	2,13	2,49
EPM	0,00	0,36	0,27



* ($p < 0,05$)

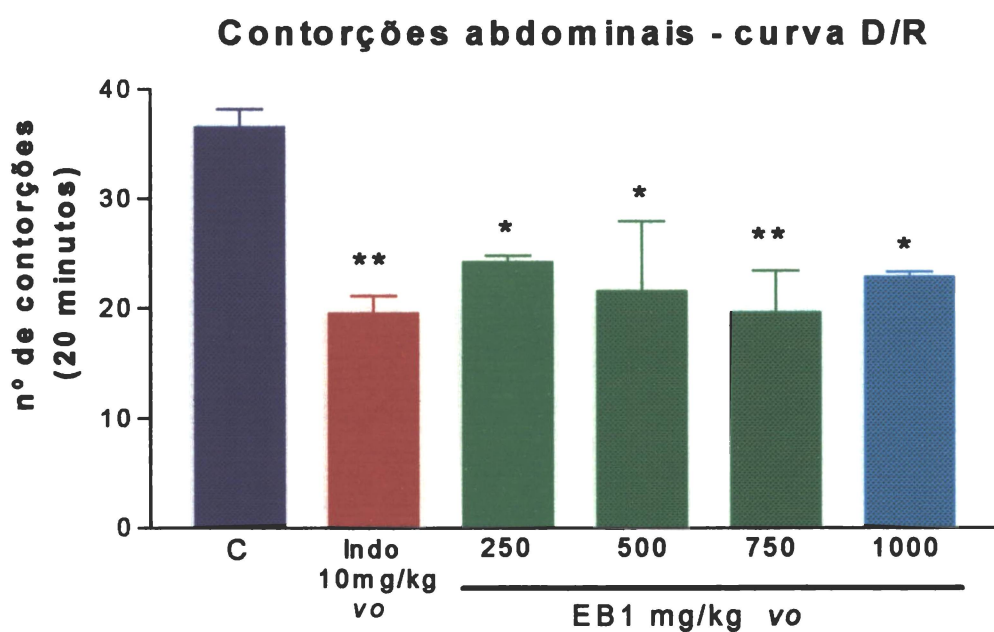
Figura 24: Teste do rota-rod em camundongos, para o extrato bruto de *M. glomerata*. Cada barra representa a média \pm EPM, do tempo de permanência de cada grupo ($n=10$) no rota-rod, em minutos, por no máximo três minutos.

Contorções abdominais

Desenvolveu-se uma curva dose-resposta de EB1 *vo*. Os resultados mostraram que o tratamento oral com EB1 diminuiu o número de contorções abdominais em todas as doses testadas.

Tabela 8: Número de contorções abdominais durante vinte minutos após o desafio *ip* com ácido acético.

	SALINA	INDO 10 mg/kg <i>sc</i>	EB1 500 mg/kg <i>vo</i>	EB1 750 mg/kg <i>vo</i>	EB1 1000 mg/kg <i>vo</i>	EB1 1250 mg/kg <i>vo</i>
MÉDIA	36,5	19,5	24,2	21,5	19,6	22,8
EPM	1,67	1,56	0,54	6,40	3,79	0,48



* ($p < 0,05$)

** ($p < 0,01$)

Figura 25: Gráfico representativo da curva dose-resposta do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, para o extrato bruto de *M. glomerata*, em camundongos. Cada barra mostra o número de contorções abdominais que cada grupo de animais apresentou, em média, contadas por vinte minutos.

Edema de pata de rato

Realizou-se uma curva dose resposta com EB1. No tempo de sessenta minutos houve diminuição significativa no aumento do volume de pata de rato em relação ao controle nas doses de 250mg e 1000mg/kg ($p<0,05$). No tempo de 180 minutos também ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa no aumento do volume da pata, na dose de 500mg/kg ($p<0,05$) em relação ao controle. Para o tempo de 240 minutos a diminuição significativa do volume da pata em relação ao controle ocorreu na dose de 500mg/kg ($p<0,05$).

O tratamento oral com EB1, sessenta minutos antes do desafio, diminuiu o edema induzido pela injeção intraplantar de 500 μ g de carragenina.

O tratamento oral com EB1, na dose de 500mg/kg, inibiu significativamente o edema de pata após 180 e 240 minutos do desafio ($p<0,05$), em relação ao controle. As doses de 250 e 1000mg/kg só inibiram a evolução inicial do edema, ou seja, 60 minutos após o desafio ($p<0,05$).

Tabela 9: Médias das porcentagens de aumento do volume das patas (%AVP) em função do tempo.

Tempo (minutos)	Água vo		Indo vo		EB1		EB1		EB1		EB1	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
60	31,76	3,42	8,91	2,28	7,91	2,58	35,13	7,33	19,74	2,91	13,98	3,61
120	55,91	6,54	6,69	2,20	27,38	6,39	37,13	12,96	38,05	4,61	33,50	6,66
180	76,88	5,91	18,11	3,46	39,97	8,60	35,59	8,22	64,84	5,49	67,74	12,00
240	82,30	4,98	28,55	19,51	39,26	8,63	30,90	5,40	58,29	5,07	61,45	7,75

Edema de pata de rato

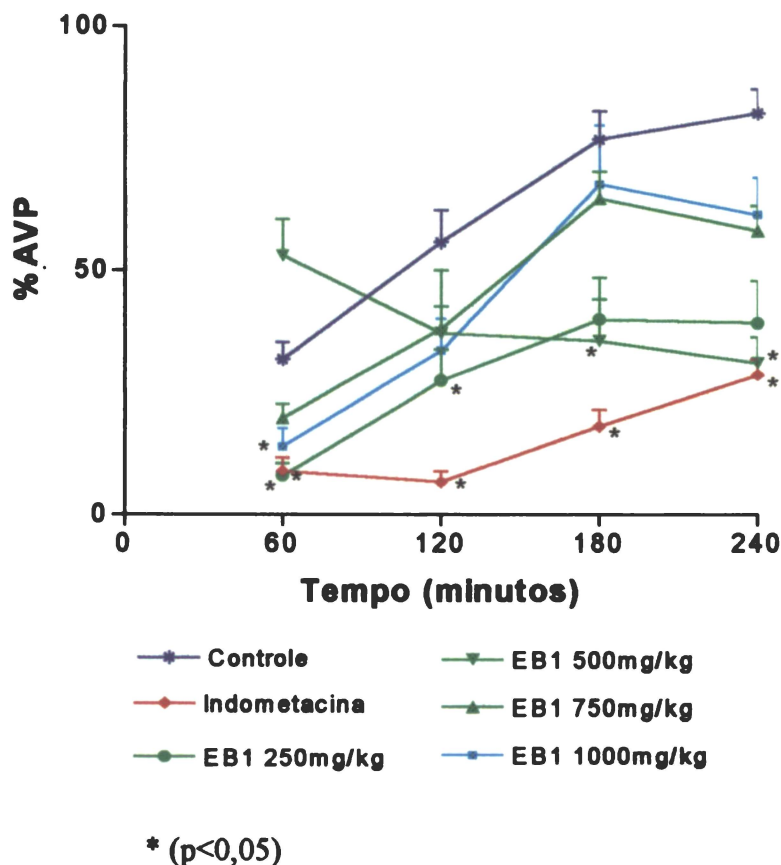


Figura 26: Gráfico representativo da curva dose-resposta do ensaio de edema de pata de rato, para o extrato bruto de *M. glomerata*.

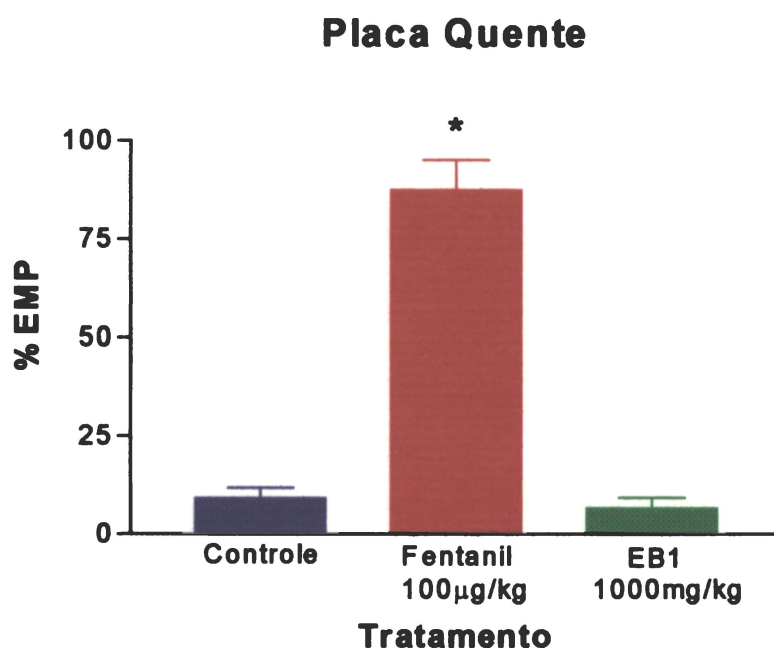
Placa quente

Os dados do ensaio de placa quente foram apresentados como a média \pm EPM, do percentual de efeito máximo possível (%EMP).

A administração de EB1, na dose de 1000mg/kg não alterou significativamente ($p < 0,05$) o tempo de permanência dos animais na placa aquecida a 55°C.

Tabela 10: Resultados do tratamento com EB1, em camundongos, sobre a placa quente.

Tempo	SALINA <i>vo</i>		EB1 1000mg/kg <i>vo</i>		FENTANIL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
60 minutos	9,1	2,73	6,6	2,74	87,50	7,74



* (P<0,05)

Figura 27: Relação entre o percentual de efeito máximo possível e o tempo transcorrido do tratamento *vo* com EB1 1000mg/kg e salina 0,1cm³/g, no ensaio de placa quente, para o extrato bruto de *M. glomerata*. Cada barra representa a média de seis camundongos.

Formalina

Observou-se que na primeira fase do teste (estímulo direto), ocorreu uma diminuição significativa no tempo de lambadura da pata do camundongo, em relação ao grupo controle, nas doses de 250 (p<0,01) e 1000mg/kg (p<0,001).

Na segunda fase, a diminuição do tempo de lambadura da pata se deu de forma significativa, nas doses de 250 e 500mg/kg (p<0,01) e 750 e 1000mg/kg, (p<0,05).

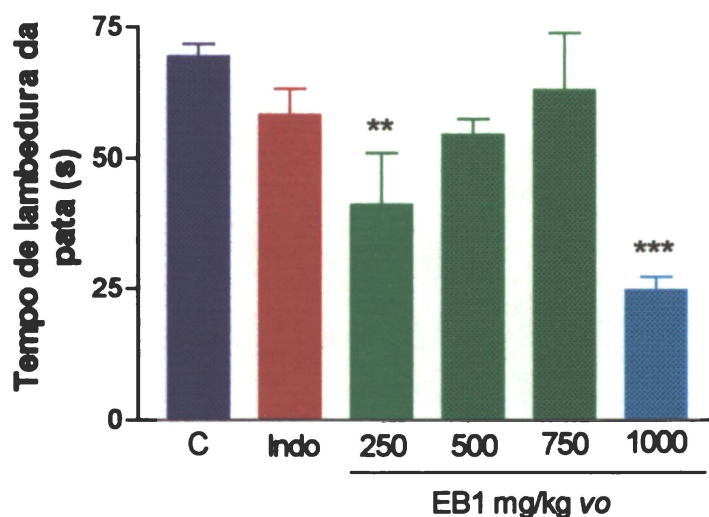
O tratamento com indometacina 10mg/kg *vo*, usada como controle positivo, apresentou redução significativa no tempo de lambadura da pata, na segunda fase, validando o modelo da formalina.

Os resultados são expressos em termos das médias \pm EPM, dos tempos de lambadura da pata injetada com formalina (n=6), em segundos.

Tabela 11: Médias \pm EPM, dos tempos de lambedura da pata injetada com formalina, em segundos.

FASE	Controle vo		EB1 vo 250mg/kg		EB1 vo 500mg/kg		EB1 vo 750mg/kg		EB1 vo 1000mg/kg		Indometacina vo	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Primeira	69,49	2,30	41,20	9,86	54,60	2,93	63,00	10,94	24,75	2,68	58,25	5,00
Segunda	143,3	6,74	73,25	12,14	105,0	22,54	81,33	14,71	116,6	18,41	75,83	9,88

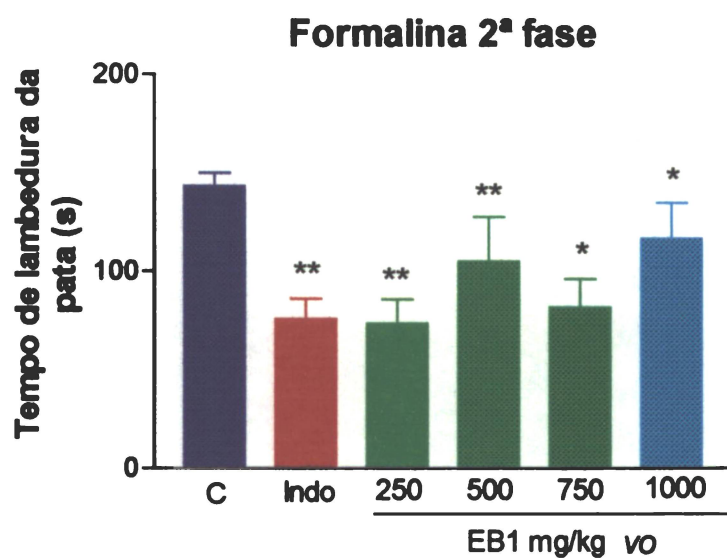
Formalina 1ª fase



** (p<0,01)

*** (p<0,001)

Figura 28: Resultados do teste da formalina, durante a primeira fase, para o extrato bruto de *M. glomerata*, em camundongos. Cada barra representa o tempo médio \pm EPM do tempo de lambedura da pata injetada com formalina de cada grupo (n=6).



* ($p < 0,05$)

** ($p < 0,01$)

Figura 29: Resultados do teste da formalina, durante a segunda fase, para o extrato bruto de *M. glomerata*, em camundongos. Cada barra representa o tempo médio \pm EPM do tempo de lambedura da pata injetada com formalina de cada grupo ($n=6$).

6. DISCUSSÃO

M. glomerata foi oficializada pela Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (SILVA, 1929), na monografia intitulada “Guaco”. Nela, constam descrições macroscópica e microscópica das folhas, sendo estas definidas como a parte usada da droga. Seu emprego terapêutico é dito “espécies peitoraes” e a forma oficial de uso é o extrato fluido ou a tintura de guaco.

6.1 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO

A descrição morfológica externa da espécie em questão coincide com a de CORRÊA (1984), OLIVEIRA *et al.* (1985), CRONQUIST (1988), NEVES & SÁ (1991), AGAREZ *et al.* (1994) e JOLY (1998).

Os caracteres morfológicos externos do limbo e pecíolo de *M. glomerata* apresentam-se conforme o estabelecido pela Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (SILVA, 1929), OLIVEIRA *et al.* (1985), NEVES & SÁ (1991) e para a família Asteraceae por CRONQUIST (1988), AGAREZ *et al.* (1994) e JOLY (1998).

Com relação aos caracteres microscópicos, a Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (SILVA, 1929) descreveu a presença de células isoladas na folha, que continham uma substância resinífera, finamente granulosa, não observada nas folhas da espécie em questão.

OLIVEIRA *et al.* (1985) e NEVES & SÁ (1991) descreveram a face adaxial da epiderme da folha de *M. glomerata*, em vista frontal, apresentando células com paredes sinuosas e células mais sinuosas, para face abaxial, tal como observado na folha estudada. Espessamento e impregnação de sílica sobre as paredes anticlinais foram citados por METCALFE & CHALK (1950) e NEVES & SÁ (1991), não se verificando tais características na espécie analisada. Os últimos autores fizeram referência a tricomas tectores simples, pluricelulares, do tipo claviforme, distribuídos por toda face adaxial da

epiderme, podendo ser isolados ou mais raramente geminados e implantados em depressões do extrato epidérmico. OLIVEIRA *et al.* (1985) também descreveram tricomas tectores semelhantes, porém situados em ambas as faces da folha de *M. glomerata*. Na folha de guaco em epígrafe, não se observou nenhum tipo de tricoma tector.

NEVES & SÁ (1991) verificaram haver tricomas tectores simples, na face abaxial da epiderme, semelhantes aos descritos para face adaxial e tricomas capitados, implantados em acentuadas depressões da epiderme. Observou-se na folha estudada, somente tricomas glandulares, situados em depressões epidérmicas de ambas as faces.

Estômatos anomocíticos, anisocíticos e actinocíticos, localizados no mesmo nível das células epidérmicas da face abaxial foram citados por NEVES & SÁ (1991), sendo que OLIVEIRA *et al.* (1985) observaram somente estômatos anomocíticos, com três a cinco células paraestomatais, diferindo do encontrado na folha estudada, que são predominantemente anisocíticos.

METCALFE & CHALK (1950), OLIVEIRA *et al.* (1985) e NEVES & SÁ (1991) descreveram o mesofilo da folha de *M. glomerata* como dorsiventral, em concordância com o verificado no material analisado. METCALFE & CHALK (1950) citaram, para a maioria das espécies da família Asteraceae, hipoderme esclerificada bem desenvolvida, tanto na face adaxial, como na abaxial. Observou-se camada subepidérmica contínua e contígua à face adaxial e aparentemente descontínua junto à abaxial. Em ambas as faces, a camada subepidérmica não se mostrou esclerificada.

A nervura mediana, em secção transversal, apresenta contorno biconvexo, em concordância com OLIVEIRA *et al.* (1985) e NEVES & SÁ (1991). A presença de bainha colenquimatosa, com espessamento angular, disposta em três ou quatro estratos celulares e voltada para face adaxial, na região da nervura mediana, foi citada pelos mesmos autores e verificada na espécie em questão.

OLIVEIRA *et al.* (1985) e NEVES & SÁ (1991) relataram haver na região perivascular da nervura mediana da folha de *M. glomerata*, canais secretores e pequenos cordões de fibras em processo de lignificação. FERRO (1991) descreve canais secretores esquizógenos, localizados ao redor dos feixes vasculares, tanto do lado do floema, como do xilema, para a folha de *Mikania smilacina* DC.

Pela definição de CUTTER (1986) (a), os canais secretores representam pequenos grupos de células, densamente protoplasmáticas e de paredes delgadas, que possuem ação secretora. Suas secreções são coletadas numa cavidade interna consideravelmente alongada num plano. Quando a cavidade é formada pela partição das células da lamela média, o canal secretor é dito esquizógeno. Nesse caso, um anel ou forro de células intactas, o epitélio, circunda a cavidade, o limite da qual é bem definido pelas suas paredes celulares. Tal definição corrobora com a citação de FAHN (1982) e ESAU (1959), para canais secretores esquizógenos, que ressaltaram a importância de tais estruturas na identificação da maioria das espécies de Asteraceae. Canais secretores, com provável origem esquizógena, próximos aos feixes vasculares, foram observados na espécie estudada. FAHN (1982) e ESAU (1959) mencionam, ainda, que canais laticíferos articulados são característicos de espécies da família Asteraceae, não se tendo observado estruturas desse tipo nas folhas de guaco pesquisadas.

Os feixes vasculares observados na espécie estudada são do tipo colateral, em concordância com FAHN (1982), ESAU (1959), OLIVEIRA *et al.* (1985), MAUSETH (1988) e NEVES & SÁ (1991), para espécies da família Asteraceae.

NEVES & SÁ (1991) apontaram floema guarnecido por cordão de fibras mucilaginosas, fato que não se verificou na folha de *M. glomerata* estudada. Tais autores citaram que as nervuras secundárias da folha acham-se envolvidas por bainha parenquimatosa, tal como observado no material pesquisado.

Os complexos estomáticos não são observados na epiderme que recobre as nervuras, porém, NEVES & SÁ (1991) citaram raros estômatos na região da nervura mediana.

O pecíolo da folha de *M. glomerata*, segundo OLIVEIRA *et al.* (1985) é quase cilíndrico e ligeiramente canaletado, em secção transversal, tal como citado por NEVES & SÁ (1991) e observado no material analisado.

METCALFE & CHALK (1950) notaram pecíolo provido de zona colenquimatosa periférica, que contorna a estrutura do pecíolo, em muitas espécies de Asteraceae, e fina cutícula revestindo a epiderme, exatamente como verificado na folha de *M. glomerata* estudada. FAHN (1982) e ESAU (1959) descreveram colênquima lacunar para o pecíolo da maioria das espécies da família Asteraceae, tendo-se observado no pecíolo em questão, região de colênquima tipicamente angular.

OLIVEIRA *et al.* (1985) e NEVES & SÁ (1991) descreveram o sistema vascular do pecíolo formado por nove feixes do tipo colateral, guarnecidos por casquetes de fibras, justapostas ao floema. O pecíolo estudado mostra exatamente as mesmas características.

NEVES & SÁ (1991) evidenciaram feixes vasculares no pecíolo de *M. glomerata* com vasos de calibre variável, mas sempre com estratos cambiais, independente das dimensões dos vasos. Estratos cambiais são evidenciados nos feixes vasculares do pecíolo em questão.

Canais secretores se fazem presentes próximos aos feixes vasculares do pecíolo, conforme descrito também por OLIVEIRA *et al.* (1985) e NEVES & SÁ (1991).

6.2 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

Composto MG1'

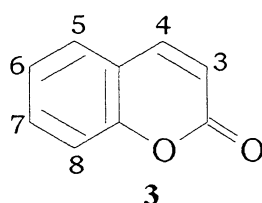
O composto MG1' foi purificado e cristalizado com *n*-hexano, p.f. 67-68°C e seu espectro de infra-vermelho (IV) mostrou picos em 1785, 1581 cm^{-1} , indicando presença de anel lactona de seis membros e anel aromático, respectivamente. O espectro de ultravioleta (UV) em metanol, apresentou bandas de absorção em 272 e 307nm, característico de conjugação de anel aromático com cadeia α,β -insaturada.

O espectro de massa (Figura 33) mostrou picos em m/z 147 ($M^+ + 1$), 146 (M^+) referente ao íon molecular e sinais importantes em m/z 118, 90 e 44, referentes à fragmentação do anel aromático e, possivelmente, formação de CO_2 da lactona.

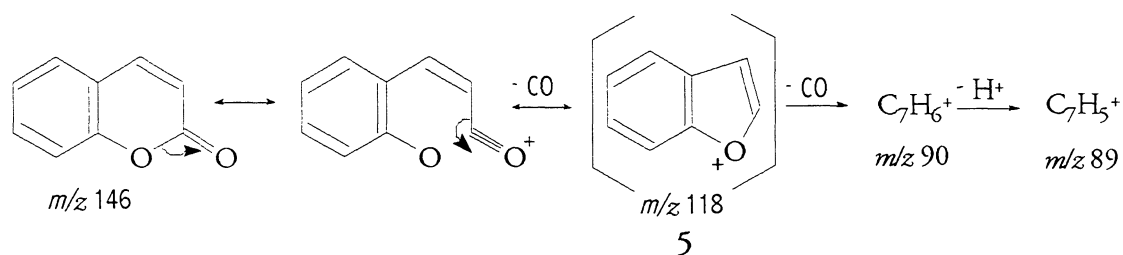
As informações mais importantes foram aquelas proveniente do espectro de ressonância nuclear magnética de próton (^1H -RMN, CDCl_3 , 300MHz) (Figura 30) e COSY (Figura 31), que apresentaram sinais clássicos do espectro de anel aromático *orto*-substituído devido à presença de um par de dupletos em δ 7,38 e 7,58 (J 7,41 e 1,79Hz) e um par de tripletes em δ 7,32 e 7,52 (J 8,24 e 1.1Hz). Apresentou também dupletos referentes à uma dupla ligação em δ 6,4 e δ 7,7 com constante de acoplamento de 9,61Hz, indicando a configuração *cis* para essa ligação (Tabela 2). O espectro de ressonância nuclear magnética do isótopo de carbono treze (^{13}C -RMN, CDCl_3 , 75MHz) (Figura 32) apresentou sinais para nove carbonos em δ 160,67, 153,91, 143,41, 131,74, 127,812,

142,35, 118,74, 116,73, 116,54, corroborando com os dados anteriores, ou seja, presença de um grupo carbonila e sinais de anel aromático e dupla ligação (Tabela 3).

Considerando a presença de um anel aromático ligado a uma dupla ligação de configuração *cis*, somam-se assim oito carbonos; o nono átomo de carbono é atribuído à carbonila, totalizando uma massa (C_9H_6O) de 130, sendo os 16 restantes devido a presença de mais um átomo de oxigênio, conforme espectro de IV, que apresenta uma absorção para anel lactônico de seis membros. Sugere-se, dessa forma, a estrutura da cumarina (**3**) para MG1'.



Nesse sentido, a rota possível de fragmentação da cumarina (**3**) apresentada no seu espectro de massa (Figura 33) está indicada no esquema 3 (MURRAY, *et al.*, 1982).



Esquema 3: Fragmentação da cumarina (**3**)

A perda de monóxido de carbono, do núcleo pirano, pelo íon molecular (M^+ 146), forma diretamente o íon m/z 118 (100%). Esta proposta de fragmentação foi comprovada pela determinação da massa (*accurate mass measurement*) desse fragmento e por observação do pico metaestável em m/z 95,4, durante a transição $146^+ \rightarrow 118^+ + 28$. Postulou-se que o íon resultante apresentasse a estrutura do íon molecular benzofurano (**5**). Muitos autores usam o íon benzofurano (**5**) para representar as espécies resultantes da perda de CO da carbonila da cumarina, fato que representa uma característica presente no

espectro de massa de inúmeras cumarinas. O íon benzofurano (5) se decompõe, então, pela perda consecutiva de CO (m/z 90) e um átomo de hidrogênio (m/z 89) (MURRAY *et al.*, 1982).

A cumarina, lactona do ácido cumarínico ou *cis*-o-hidroxicinâmico, é um componente natural, que foi isolado de numerosas espécies vegetais. Extratos vegetais como o de guaco apresentam aroma característico adocicado, lembrando baunilha, típico da cumarina. Por vezes, encontra-se na forma de combinações inodoras, de glicosídeos, e só depois da ação hidrolítica de fermentos é liberado o aroma. Explica-se, assim, o fato de algumas plantas adquirirem o aroma particular da cumarina somente depois de secas, após a morte das células (OLIVEIRA *et al.*, 1985).

Ao todo, cerca de cem tipos diferentes de cumarinas naturais já foram isoladas, sendo que a cumarina propriamente dita foi encontrada em aproximadamente 150 espécies, pertencentes a trinta famílias diferentes (MURRAY *et al.*, 1982). OLIVEIRA *et al.* (1985) relataram o isolamento desse composto a partir das folhas de *M. glomerata*. O referido composto tem sido indicado como marcador de controle de qualidade de várias espécies de guaco, tendo seu doseamento sido proposto por VILEGAS *et al.* (1997), por meio de cromatografia gasosa. A cumarina e seus derivados têm algumas propriedades farmacológicas conhecidas. Em animais de laboratório, a cumarina mostra possuir atividade espasmolítica (PATYRA *et al.*, 1966; MACRAE & TOWES, 1984), hipoglicemiante e antidiurética (SHANI *et al.*, 1974), antiespermatogênica (TYAGI *et al.*, 1980) e carcinogênica (NASHED & BRENDDEL, 1983).

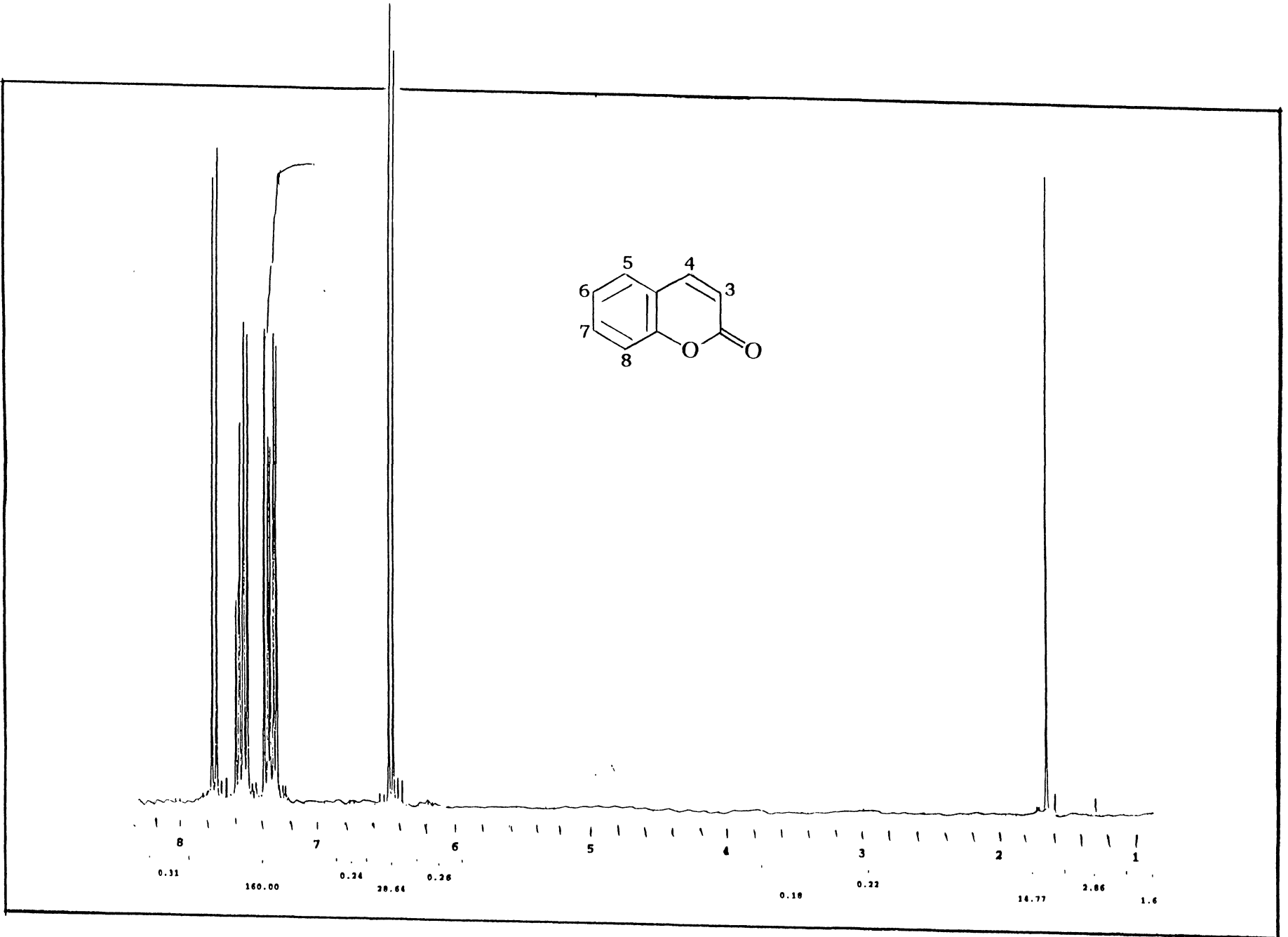
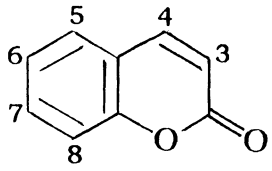


Figura 30: Espectro de ¹H-RMN 300MHz da cumarina (3).

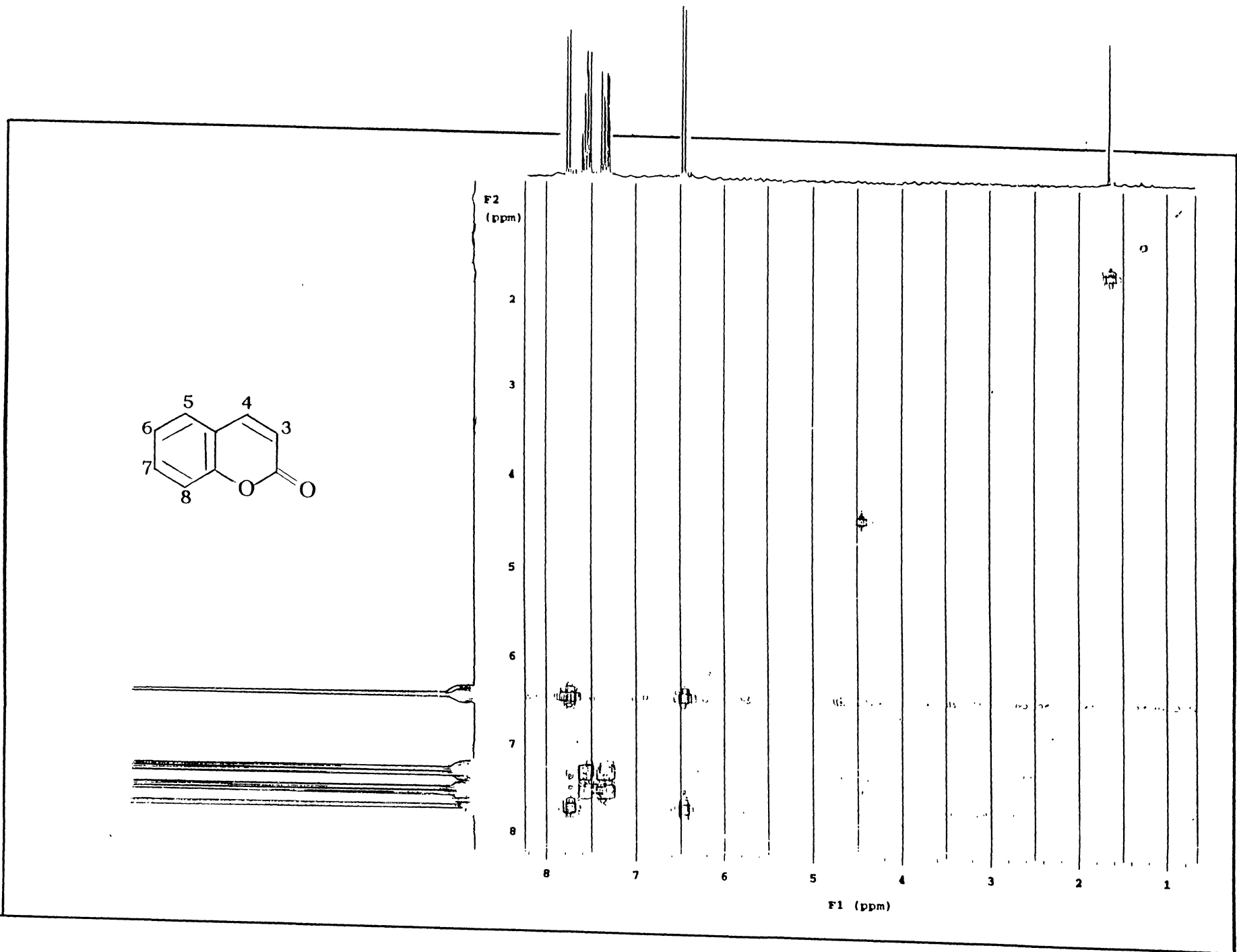
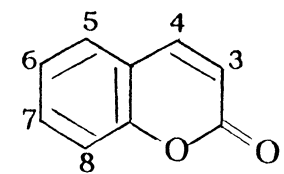


Figura 31: Espectro de COSY ¹H-RMN 200MHz da cumarina (3).

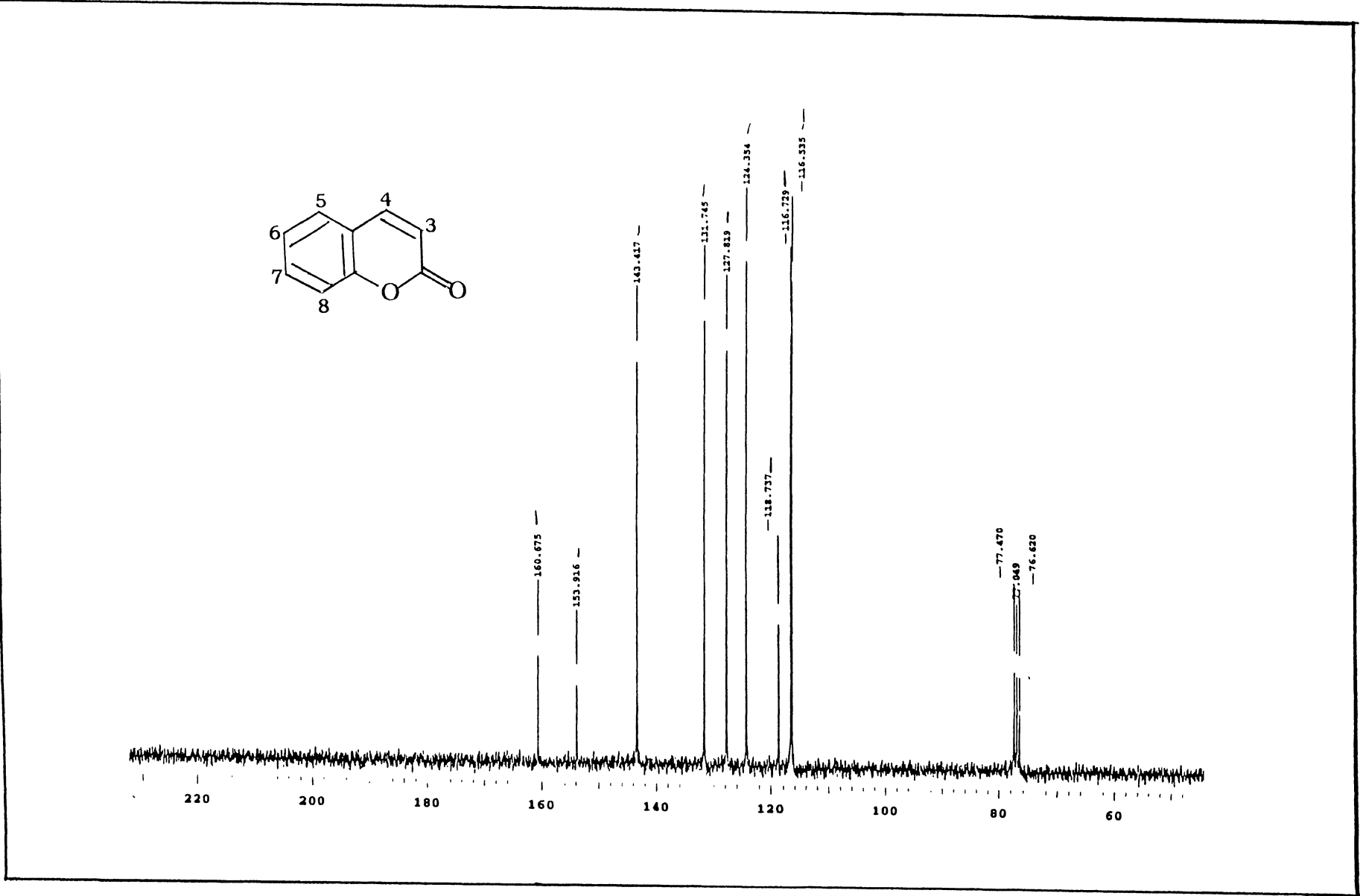
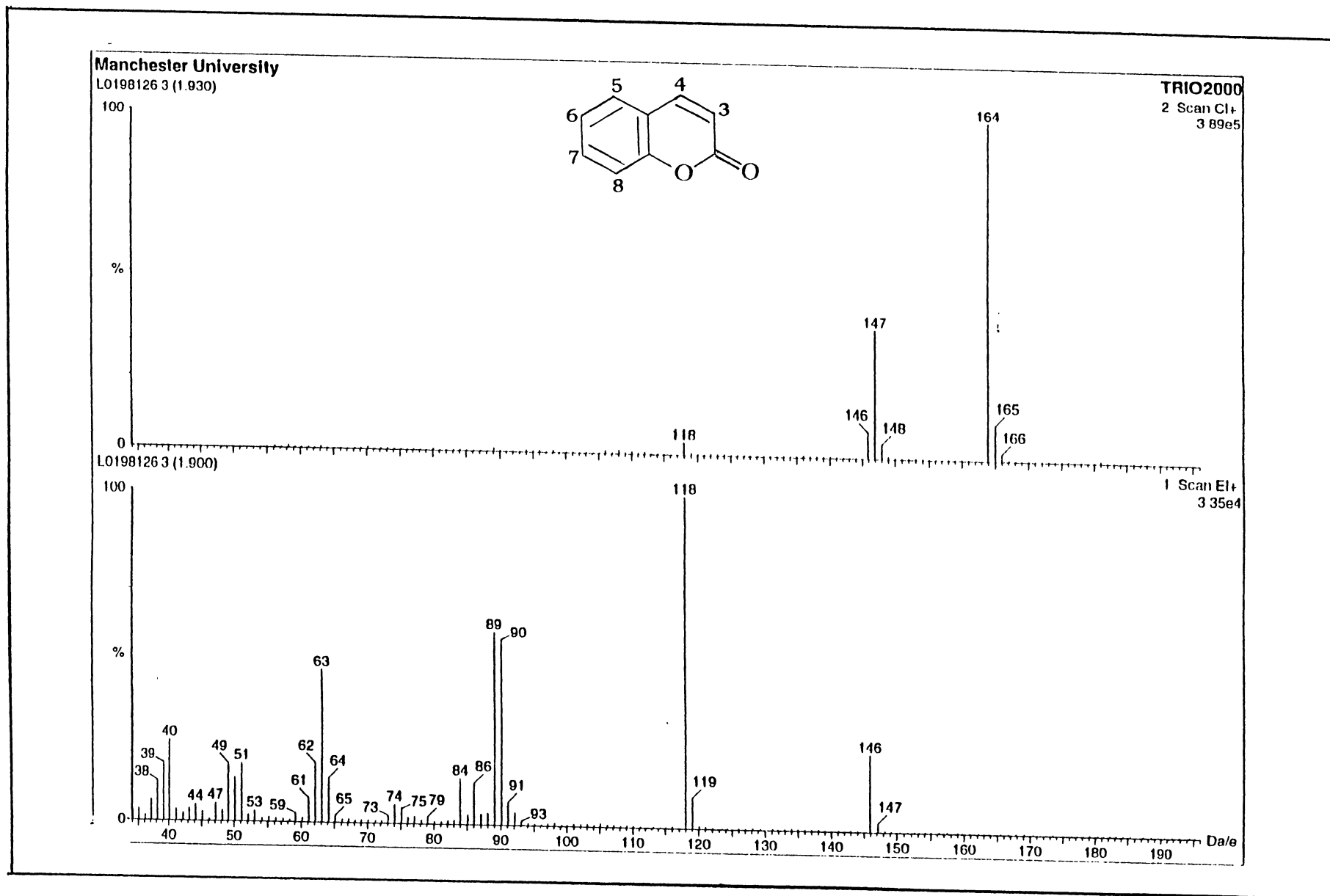


Figura 32: Espectro de ^{13}C -RMN 75 MHz da cumarina (3).

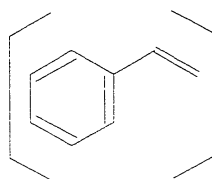
Figura 33: Espectro de massa da cumarina (3).



Composto MG2

Esse composto apresentou p.f. 154-155 °C após cristalização em CHCl₃:MeOH (3:1) e seu espectro de UV em metanol apresentou pico em 266nm. Quando adicionado ácido, o espectro de UV não apresentou nenhuma alteração, enquanto que adicionado uma gota de solução de NaOH 1N, o espectro apresentou um deslocamento para 272 e 363nm. O espectro de IV (film/cm⁻¹) apresentou um pico largo em 3260 indicando a presença de um ácido carboxílico, e picos importantes em 1752, característico de carbonila de radical acetil, 1686, que indicou a presença de uma carbonila α,β -insaturada, e 1628 para a presença de um anel aromático. Um pico em 756cm⁻¹ indicou a possibilidade do anel aromático ser *orto*-dissubstituído.

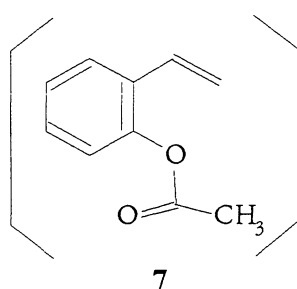
O espectro de massa (Figura 36) apresentou íon molecular em m/z 206, com fragmentos importantes em m/z 164, 146, 118, 91 e 84. O espectro de ressonância nuclear magnética de próton (¹H-RMN, CDCl₃, 300MHz) (Figura 34) apresentou picos característicos de anel aromático *orto*-dissubstituído como para MG1', com um par de dupletes em δ 7.59 (J 8Hz) e 7.12 (J 8Hz) e um par de tripletes em δ 7.34 e 7,20 (J 8 e 1Hz). Da mesma forma que em MG1', MG2A também apresentou sinais em δ 7.66, mostrando no espectro de COSY (Figura 35) acoplamento com outro sinal em δ 6.42, com a diferença de que o valor da constante de acoplamento encontrada foi de 16Hz, caracterizando configuração *trans* para a dupla ligação (Tabela 4), ao contrário da cumarina (3), com configuração *cis*, onde a constante de acoplamento esperada é de 8-10Hz (Tabela 2). Dessa forma, até o presente, é possível sugerir que parte da estrutura de MG2A é constituída de um anel aromático, com substituição de radical vinil (6).



6

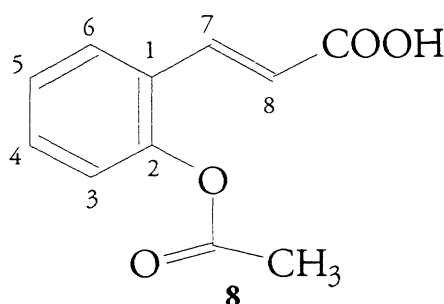
O espectro de ressonância nuclear magnética de próton (Figura 34) também mostrou dois singletes em δ 2.34 e 0,98, com integração para três prótons cada um, sugerindo ainda a presença de mais duas metilas. A primeira, corroborando com o espectro de IV, sugere um radical acetil, ligado ao anel aromático, e a segunda uma metila terminal. A purificação

do composto com carvão ativado, mostrou a presença dos mesmos sinais, com variação e desaparecimento do sinal em δ 0,98, mas mantendo o sinal em δ 2,34, o que significa que pelo menos esse sinal é genuíno. A dúvida foi desfeita com o espectro de ressonância nuclear magnética de ^{13}C (DEPT) que apresentou um sinal para CH_3 em 20.97ppm, típico de metila ligada à carbonila. Sinais de metila de radical acetil normalmente aparecem entre 1.9-2.0ppm, mas o sinal em 2,34ppm pode ser atribuído a acetil ligado diretamente ao anel aromático *orto*-substituído. Os dados até agora, permitem sugerir a estrutura parcial 7.



Como o espectro de IR apresentou pico característico de ácido carboxílico e para a estrutura 7 pode ser atribuída uma massa de 161, para completar o valor do íon molecular (M^+ 206) de MG2A, falta exatamente uma massa de 45, representando o ácido carboxílico. Conclui-se, portanto, pela estrutura 8 para MG2A, que corresponde ao ácido 2-acetil-*trans*-cinâmico (8).

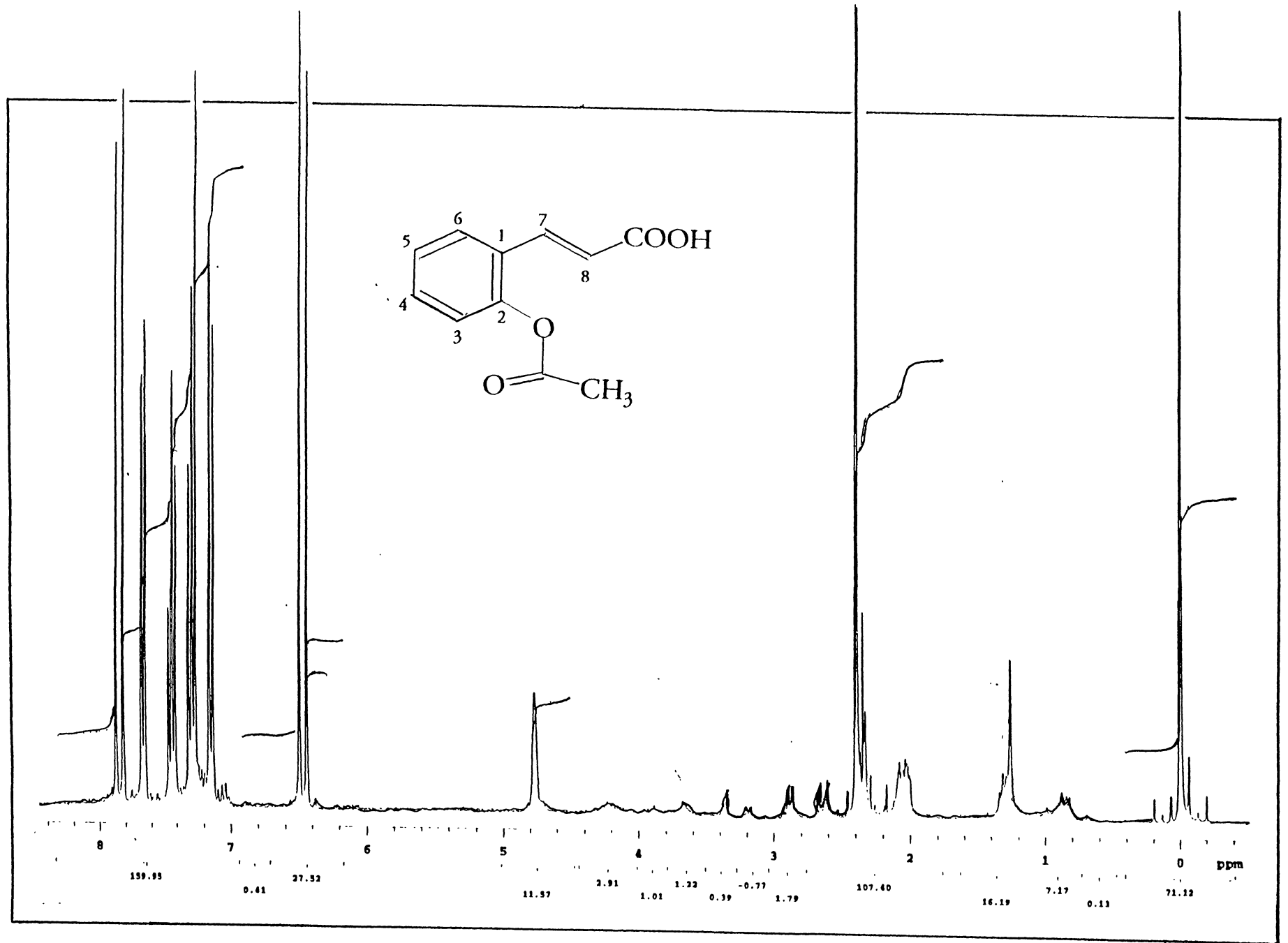
Dessa forma, os picos encontrados no espectro de massa (Figura 36) podem ser racionalizados da seguinte forma: ocorrendo a perda do radical acetil (m/z 164, M^+-43) favoreceria a formação da própria cumarina (MG1') pela lactonização do anel e, conseqüentemente, seguindo o esquema 3 proposto para MG1'



Esse é o primeiro relato de isolamento do ácido 2-acetil-*trans*-cinâmico (**8**) em espécie do gênero *Mikania*. A revisão da literatura demonstra também que, possivelmente, não há registro de isolamento desse composto em nenhuma outra espécie de planta.

Os compostos com radical acila têm sido isolados de plantas, com mais frequência, nos últimos anos e, na sua maioria, mostram atividades biológicas de interesse para a indústria farmacêutica. A presença desse grupamento num composto químico, aumenta a lipossolubilidade da molécula, tornando-a mais permeável às membranas celulares e facilitando, com isso, as quebras enzimáticas, que podem gerar substâncias biologicamente ativas (SANTOS, 1998).

Figura 34: Espectro de ^1H -RMN 300MHz do ácido 2-acetil-*trans*-cinâmico (8).



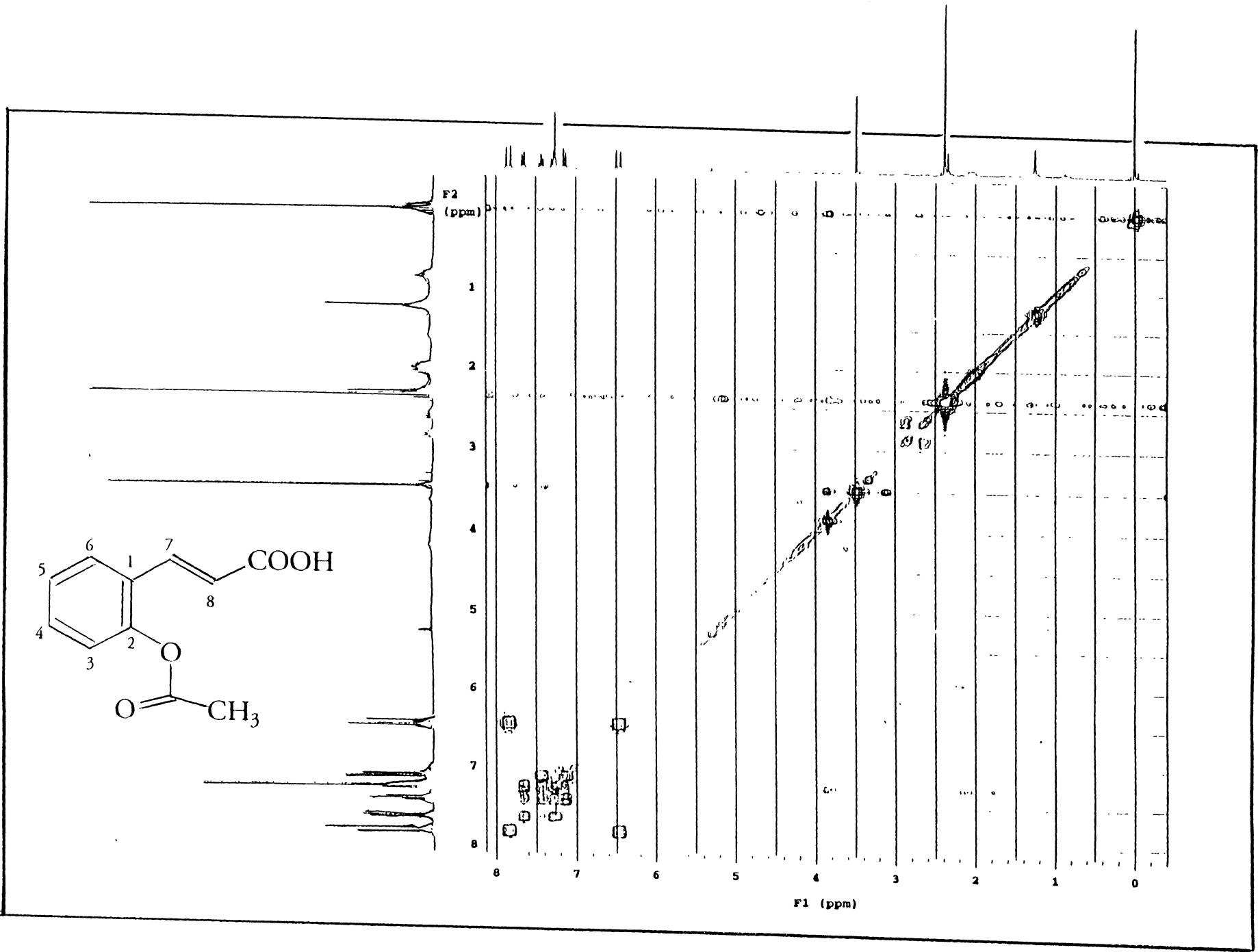
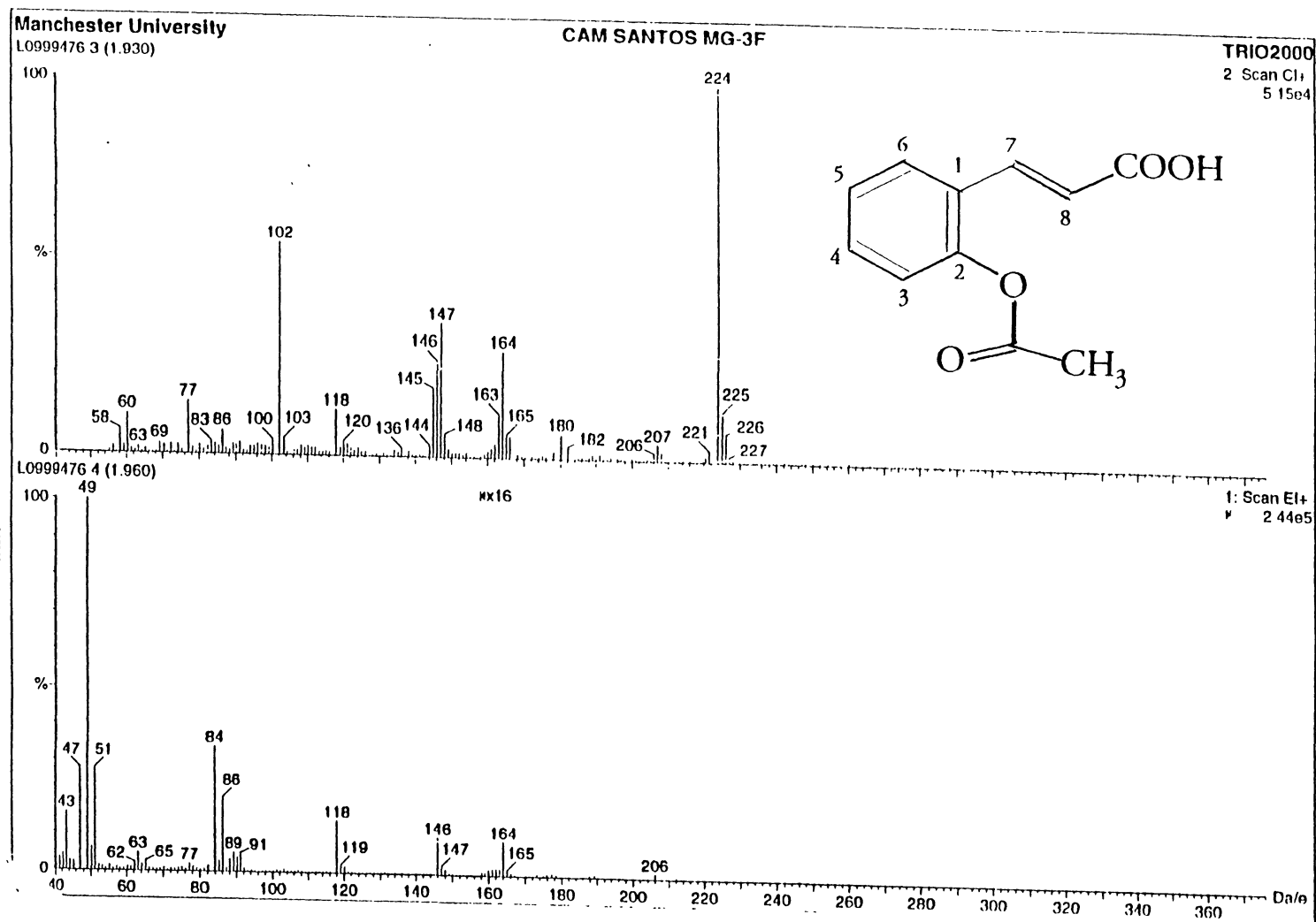


Figura 35: Espectro de COSY ¹H-RMN 200MHz do ácido 2-acetil-*trans*-cinnâmico(8).

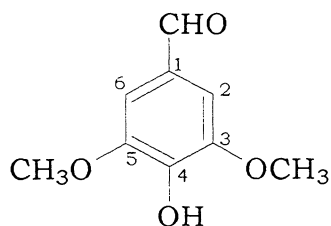
Figura 36: Espectro de massa do ácido 2-acetil-*trans*-cinâmico (8).



Composto MG3

O composto MG3 foi cristalizado com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1), p.f. 109-111°C e seu espectro de IV mostrou picos em 3275, 1671, 1607 e 1583 cm^{-1} , indicando presença de grupamentos hidroxila, aldeído e anel aromático, respectivamente. O espectro de UV em metanol apresentou uma banda de absorção em 238, 308 e 320nm com perfil de curva típica de composto aromático. O espectro de massa (Figura 39) mostrou picos em m/z 183 (M^++1), 182 (M^+ , 100%) referente ao íon molecular e sinais em m/z 77 e m/z 91, característicos de fragmentos de anel aromático.

O espectro de ressonância nuclear magnética de prótons (^1H -RMN, CDCl_3 , 300MHz) (Figura 37) apresentou um singlete com integração para um próton em δ 9,7, confirmando a presença de um grupamento aldeído. Um singlete em δ 7,1, com integração para dois prótons, indicou a possibilidade de ser um composto aromático com uma certa simetria, podendo ser para prótons situados em posição *orto*, num mesmo ambiente químico. Sendo esse o único sinal na região aromática, assume-se que as outras posições devam estar substituídas. Um outro singlete em δ 4,0, com integração para seis prótons, indicou a presença de dois grupos metoxila ligados à anel aromático e um outro singlete em δ 6,1, que desapareceu no espectro de ^1H -RMN, após adição de D_2O , foi atribuído ao um próton de grupo hidroxila. O espectro de COSY, como esperado devido a presença de apenas singletes no espectro, não apresentou nenhuma correlação entre os sinais. Os dados apresentados e considerando as presenças de um anel aromático com quatro substituições (C_6H_2 , massa 74), duas metoxilas ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$, massa 62), um aldeído (CHO , massa 29) e uma hidroxila (massa 17), permitem atribuir ao composto MG3 a estrutura de 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (**9**).



Para confirmar a estrutura proposta, realizou-se o espectro de ressonância nuclear magnética de isótopo de carbono 13 (^{13}C -RMN, CDCl_3 , 75 MHz) (Figura 38), que apresentou sinais para seis carbonos em δ 56,39 (2 x OCH_3); 106,60 (C-2 e C-6); 128,32 (C-3 e C-5); 140,72 (C-1); 147,262 (C-4) e 190,650 (CHO). O espectro de DEPT apresentou apenas sinais para CH/ CH_3 em δ 56,39, indicando o sinal do grupo metoxila e para CH apenas em δ 106,60 para CH-aromático (C-2 e C-6). Os outros sinais que não apareceram no experimento DEPT eram referentes à carbonila do aldeído e aos sinais de C-1, C-3, C-4 e C-5 aromáticos. Esses sinais confirmaram a estrutura (9) proposta para MG3.

4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (9), também conhecido por siringaldeído (9) (KOKPOL *et al.*, 1993) já foi isolado de várias espécies vegetais, sendo freqüente na família Asteraceae. GUTIERREZ & HERZ (1988) isolaram siringaldeído (9) das partes aéreas de *Mikania shushunensis* Holmes & McDaniel, coletada no Peru. CASTILHO *et al.* (1983) isolaram MG3 das cascas do caule de *Ambrosia cumarensis*, também pertencente à família Asteraceae. KOKPOL *et al.* (1993) isolaram tal composto do caule de *Rhizophora apiculata*, Rhizophoraceae e determinaram sua atividade antibacteriana e antifúngica, pelo método de difusão em ágar. Verificaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, sendo que a concentração mínima inibitória do produto foi superior a 250ppm. WU *et al.* (1995) isolaram siringaldeído (9) de *Annona montana*, sendo esse o primeiro registro de isolamento na família Annonaceae. Determinaram também, atividade citotóxica seletiva do composto e seu derivado acetilado, contra células do tipo P338 (ATCC).

Nenhum relato do isolamento de siringaldeído (9) a partir das folhas de *M. glomerata* foi encontrado na literatura, podendo-se dizer que essa é a primeira vez que tal composto é isolado da espécie em estudo.

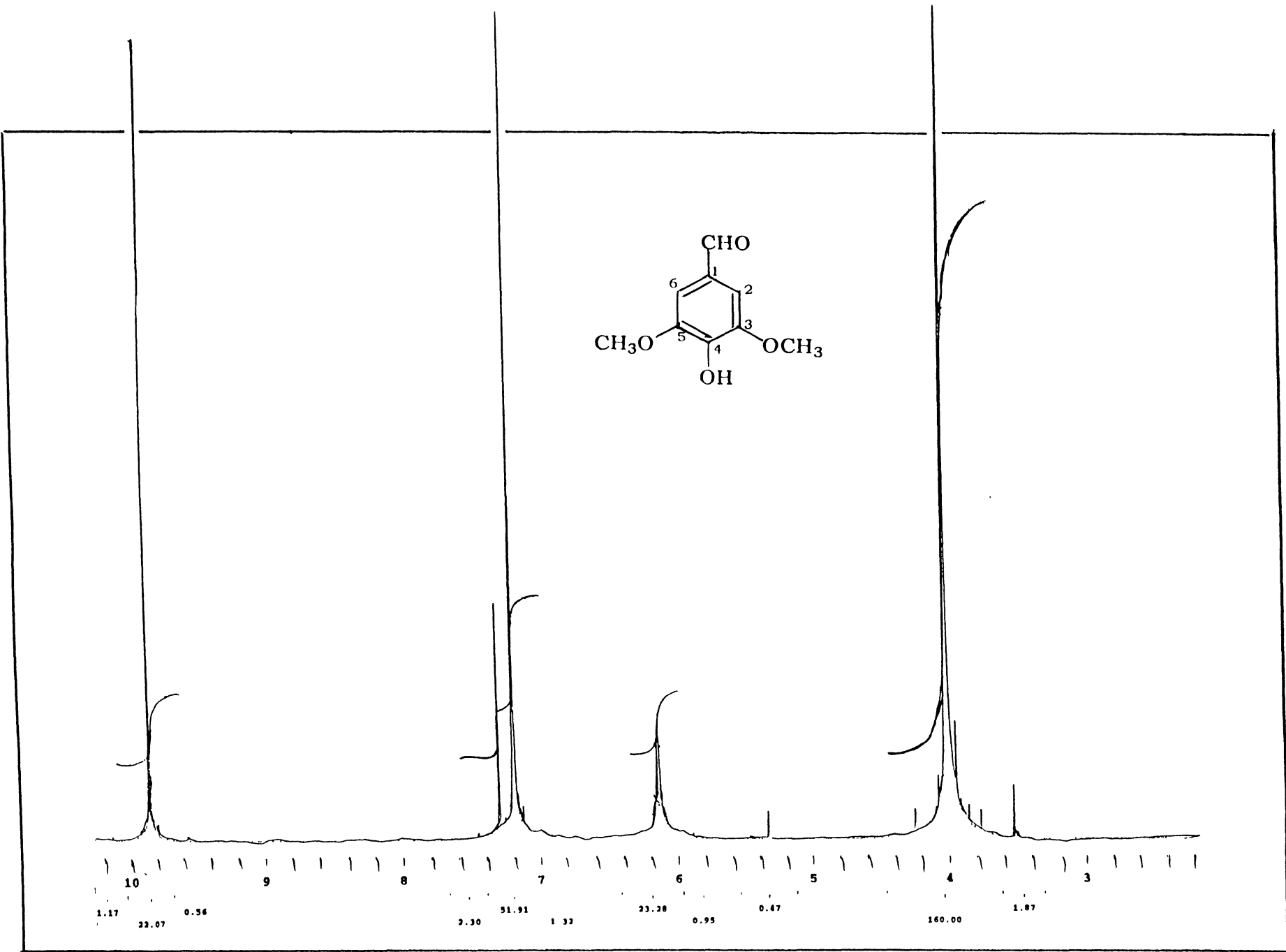
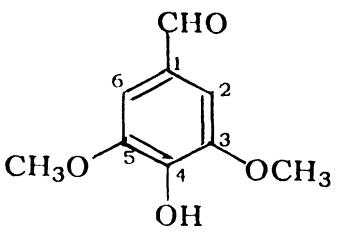


Figura 37: Espectro de ¹H-RMN 300MHz do 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (9).

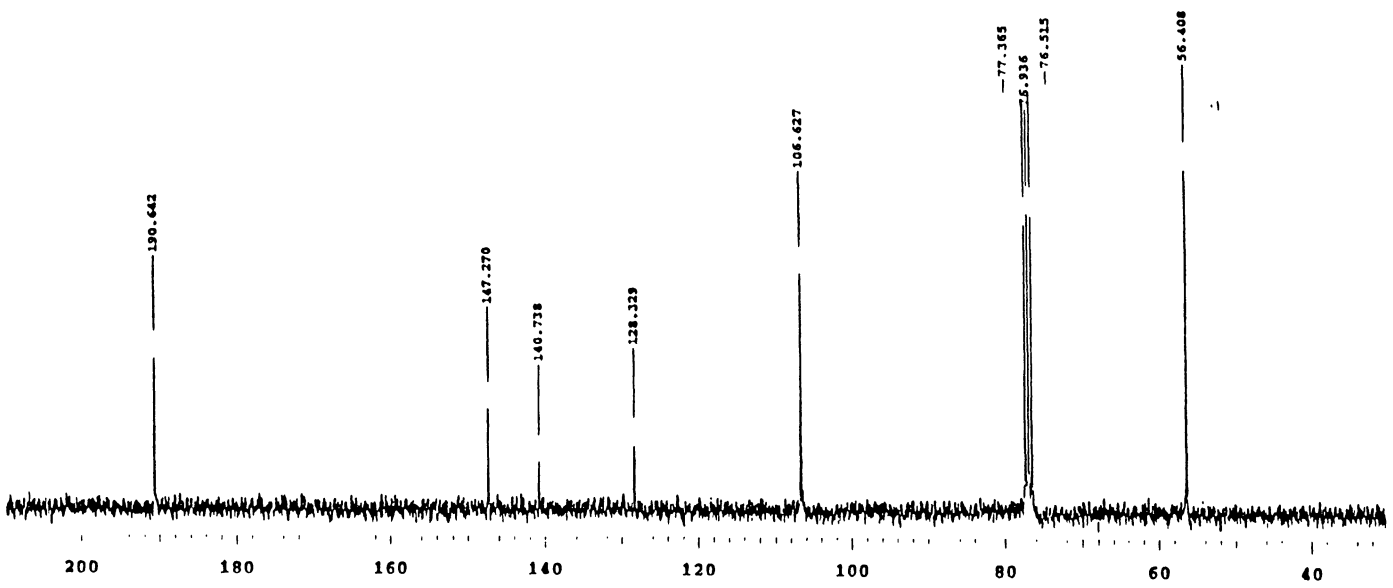
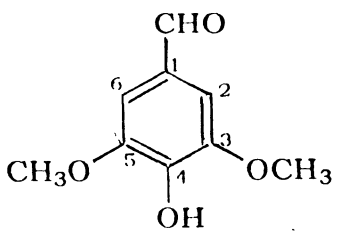
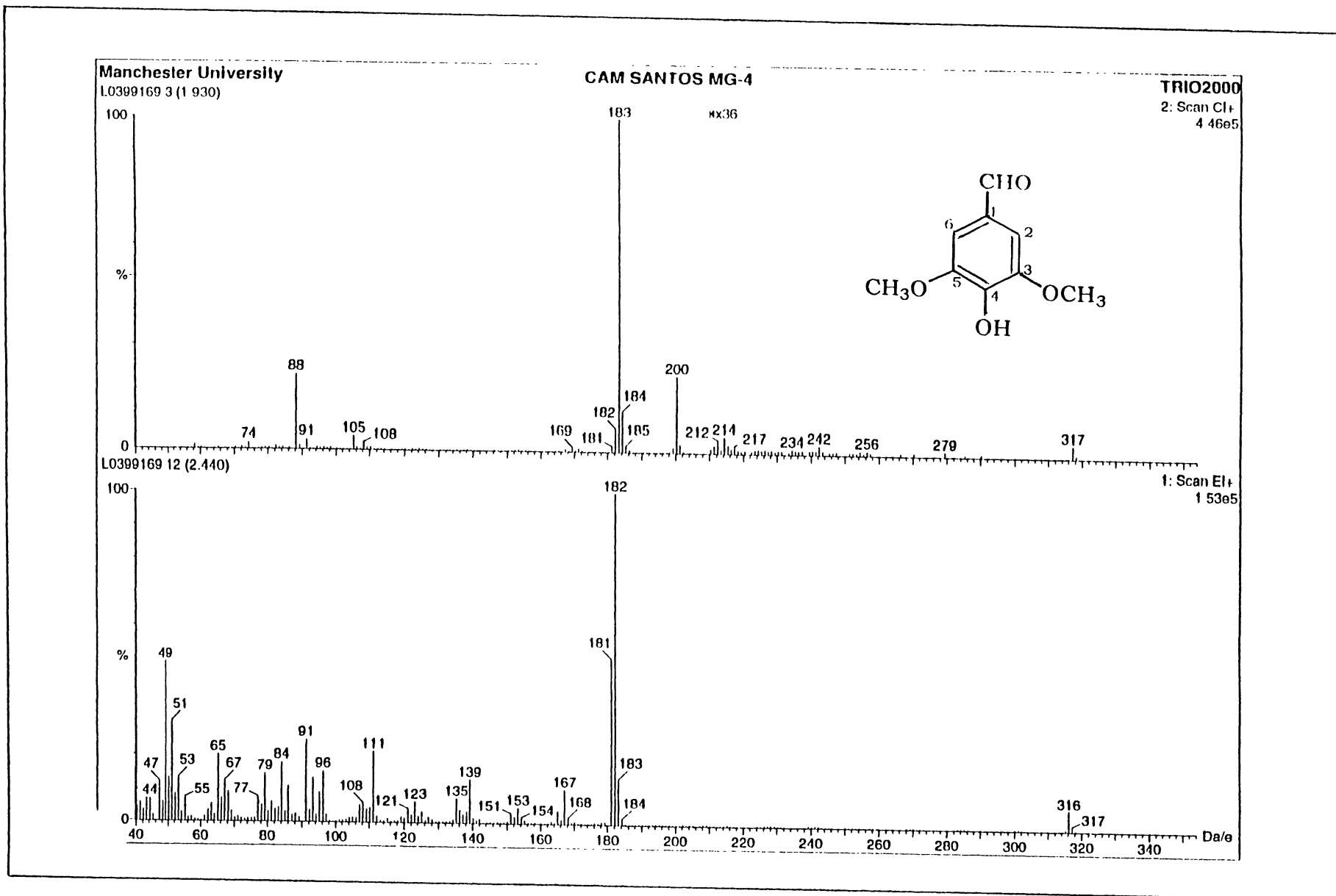


Figura 38: Espectro de ¹³C-RMN 75MHz do 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (9).

Figura 39: Espectro de massa do 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeido (9).



6.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO

O teste geral de atividade indica que o extrato bruto das folhas de *M. glomerata* apresenta baixa toxicidade, sendo necessárias altas doses para provocar efeitos nocivos aos camundongos. Os animais administrados por via oral, com EB1 não morreram até a dose de 6400mg/kg, mostrando a baixa toxicidade desse extrato por essa via.

A via intraperitoneal apresentou DL_{50} de 2349,86mg/kg, indicando também baixa toxicidade do extrato por essa via.

Os sinais demonstrados pelos animais, tais como diminuição da motilidade e perda da apreensão das patas, indicaram que há possibilidade do extrato atuar deprimindo o SNC e/ou musculatura esquelética, quando utilizado em altas doses. Por isso, os testes de placa quente e rota-rod foram necessários, já que houve significativa redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Esta diminuição poderia estar ocorrendo devido a uma provável ação sobre o SNC e/ou musculatura esquelética.

Com o modelo da placa quente, observa-se efeito analgésico de drogas que agem sobre o SNC via mecanismos supra-espinhais, tais como os opióides (VAZ *et al.*, 1996). O EB1, na dose de 1000mg/kg *vo*, não apresentou atividade sobre este modelo, mostrando que seu mecanismo deve ser periférico, não envolvendo sistemas supra-espinhais.

No teste do rota-rod, evidencia-se a ação de drogas depressoras do SNC e também relaxantes da musculatura esquelética (VAZ *et al.*, 1996). Por esse motivo, utilizou-se o diazepam 2,4mg/kg *ip* como controle positivo, que diminuiu de modo significativo o tempo de permanência dos animais no aparelho. O tratamento com EB1, na dose de 750mg/kg *vo*, não diminuiu de modo significativo esse tempo de permanência, comparado ao grupo salina. Isto indica que este extrato não apresentou efeito depressor sobre o SNC ou que alterasse a performance motora do animal em experimento, na dose utilizada.

A ausência de atividade do extrato nas metodologias da placa quente e rota-rod sugerem que a diminuição do número de contorções abdominais foi mesmo por interferência em algum sistema diretamente envolvido na dor inflamatória, e não resultado de um efeito sobre o SNC ou musculatura esquelética.

No modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, a dor é de origem inflamatória, estando presentes mediadores químicos como prostaglandinas, óxido nítrico (DEBUISSON & DENIS, 1997), cininas, além da participação do SNA simpático

(DOGROER *et al.*, 1998 & ROGER *et al.*, 1980 & THOMAZZI, 1997). A diminuição do número de contorções abdominais causada pelo tratamento oral com EB1, nas doses apresentadas, pode estar indicando que este extrato tem um ou mais componentes que interferem em algum sistema envolvido na dor inflamatória desse modelo experimental.

O tratamento com EB1 reduziu significativamente o edema produzido pela injeção intraplantar de carragenina apenas na dose de 500mg/kg *vo*. Este resultado indica que o efeito antinociceptivo apresentado pode estar correlacionado com a ação antiinflamatória, já que o edema induzido por carragenina é dependente da migração de leucócitos e presença de prostaglandinas no local da inflamação, sendo essas últimas importantes nas contorções abdominais e na segunda fase do teste da formalina (ROGER *et al.*, 1980 & VAZ *et al.*, 1996).

Os resultados do teste da formalina mostram redução significativa do tempo de lambadura da pata injetada com formol para todas as doses de EB1, durante a segunda fase. Isto significa que o referido extrato está inibindo o processo inflamatório provocado na pata do animal (HUNSKAAR & HOLE, 1989). Tal fato vem se somar aos resultados dos ensaios de edema de pata e contorções abdominais, indicando uma provável ação antinociceptiva de EB1, pela inibição do processo inflamatório induzido em cada modelo experimental. Esses também são indicativos de que o extrato bruto de *M. glomerata* provoca diminuição da quantidade de mediadores da inflamação. É inegável, portanto, que EB1 possui ação antiinflamatória, embora não seja possível afirmar, com os resultados apresentados, o mecanismo de ação antiinflamatória. A atividade apresentada por EB1, nas três metodologias utilizadas, não foi dose-dependente. Tal resultado pode estar relacionado com o fato de termos trabalhado com extrato bruto, onde estão presentes vários compostos diferentes, que podem interferir na ação geral, dificultando com isso, a caracterização da especificidade da ação. De qualquer forma, mesmo não se podendo afirmar que o extrato bruto de *M. glomerata* tenha ação específica, os resultados indicam atividade antiinflamatória, cujo perfil apresentado é de um antiinflamatório não esteroidal.

Popularmente, as folhas de *M. glomerata* são usadas pelas pessoas portadoras de asma ou bronquite, para alívio dos sintomas (OLIVEIRA *et al.*, 1984). Sendo a asma uma patologia essencialmente inflamatória, justifica-se pelos resultados obtidos, o uso popular da planta como antiinflamatório. Outro fator importante, quando se pensa em uso popular, é a

toxicidade da droga. Nesse sentido, a presente pesquisa prova também que o guaco estudado pode ser usado sem maiores riscos pela população, visto que sua toxicidade se mostrou bem baixa, sobretudo por via oral, que é a via de administração comumente utilizada em humanos.

7. CONCLUSÃO

Os estudos morfológicos de *M. glomerata* permitem concluir que as folhas são pecioladas, glabras, providas de cinco nervuras na região basal e apresentam disposição oposta. O pecíolo é curto, praticamente plano-convexo e apresenta base torcida.

São características microscópicas importantes da lâmina foliar de *M. glomerata*: presença de tricomas glandulares pluricelulares situados em depressões epidérmicas de ambas as faces, ductos secretores, com epitélio formado por cinco a onze células, relacionados com os feixes vasculares, mesofilo dorsiventral e estômatos anomocíticos e anisocíticos somente na epiderme da face abaxial, definindo a folha como hipoestomática. Os feixes vasculares são do tipo colateral.

O pecíolo exhibe feixes vasculares do tipo colateral, dispostos em arco e acompanhando o contorno da estrutura. Outra característica importante é a presença de ductos secretores relacionados com os feixes vasculares.

Os resultados dos testes histoquímicos revelam a presença de amido de assimilação nos parênquimas paliçádico e lacunoso e compostos fenólicos no parênquima paliçádico da folha de *M. glomerata*.

A análise espectroscópica dos compostos isolados da folha de *M. glomerata* permite concluir que a cumarina (**3**) faz parte da composição química da mesma, como já se esperava, conferindo o aroma semelhante à baunilha, típico da droga estudada.

O segundo composto isolado e identificado é designado por ácido 2-acetil-*trans*-cinâmico (**8**), que até o momento não apresenta registro de isolamento de fonte natural, tendo sido somente obtido sinteticamente.

O terceiro composto isolado e identificado corresponde ao 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldeído (**9**), conhecido também por siringaldeído, sendo esse o primeiro relato de isolamento a partir da espécie *M. glomerata*.

Os resultados obtidos mostraram que EB1 não é tóxico quando administrado por via oral, não apresentando toxicidade elevada se administrado por via intraperitoneal.

Nas condições experimentais apresentadas, verifica-se que o extrato bruto de *M. glomerata* apresenta ação antinociceptiva e antiedematogênica, com fortes indícios de ação antinflamatória. Tal afirmativa é reforçada pelo fato de EB1 não apresentar atividade sedativa ou sobre a musculatura esquelética. Esses resultados dão suporte científico ao uso popular da espécie *M. glomerata*, como planta medicinal.

Esse trabalho representou, portanto, uma contribuição para consolidação científica do uso das folhas de *M. glomerata*, como planta medicinal. O isolamento de dois compostos, até então não relatados na literatura científica para essa espécie, demonstra que a mesma ainda tem muito a ser estudada, sobretudo do ponto de vista da composição química de metabólitos secundários e atividade farmacológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGAREZ, F. V.; PEREIRA, C.; RIZZINI, C. M. **Botânica: taxonomia, morfologia e reprodução das angiospermas, chaves para determinação das famílias.** 2.ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994. 212 p.
2. AMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D.; **Purification of laboratory chemicals.** 4.ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1996. 529 p.
3. BARBOSA, A. D.; FERREIRA, R. C. V.; VALENTE, P. H. M. Atividade antibacteriana de extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras. **LECTA-USF.**, v. 12, n. 2, p. 153-163, 1994.
4. BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1978. v. 1. 284 p.
5. BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia.** Rio de Janeiro, Livros técnicos e científicos, 1976. v. 1. 305 p.
6. BENNET, H. S. *et al.* Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. **Stain tech.**, v. 55, n. 1, p. 71-97, 1976.
7. BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry.** The Iowa State University Press: Ames, 1976. 326 p.
8. BÍBLIA, Eclesiástico. **Bíblia sagrada.** Trad. Centro Bíblico Católico. São Paulo: Ed. Ave Maria, 1995. p. 917.

9. BUCHERL, W. **Técnica microscópica**. São Paulo: Polígono, 1962.
10. CASTILLO, J. B.; DELSO, A. B.; FERRERO, M. M. T.; BUENO, P. V.; LUIS, F. R. A sesquiterpenoid lactone from *Ambrosia cumanensis*. **Phytochem.**, v. 22, n. 3, p. 782-783, 1983.
11. COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. v. 2, 668 p.
12. CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Nacional, 1984. v. 3, 516 p.
13. CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1988.
14. CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Belo Horizonte: Oficinas Gráficas de Veloso, 1965. 864 p.
15. CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Parte I - Células e tecidos. 2.ed. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.
16. CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Parte II - Órgãos - Experimentos e interpretação. 2.ed. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.
17. DEBUISSON, D.; DENIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-71, 1977.
18. DOGRUER, D.S.; ÜNLÜ, S.; SAHIN, M.F. & YESILADA, E. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of some (2-benzoxazolone-3-yl and 2-benzothiazolone-3-yl) acetic acid derivatives. **II Farmaco** 53: 80-84, 1998.

19. DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46, p. 208-209, 1957.
20. EDDY, N. B.; TOUCHBERRY, C. F.; LIEBERMAN, J. E. Analgesic properties of methadone isomers and derivatives. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, v. 98, p. 121-137, 1950.
21. ESAU, K. **Anatomy of seeds plants**. 2.ed. New York: Willey, 1977. 438 p.
22. EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14.ed. London: The Bath Press, 1996. 318 p.
23. FAHN, A. **Plant anatomy**. 3.ed. Oxford: Pergamon, 1982. 231 p.
24. FARNOSWORTH, N. R. **Bioactive compounds from plants**. Chichester: Wiley, 1990. 265 p.
25. FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Amer. J. Bot.**, v. 55, n.1, p. 123-142, 1968.
26. FERRO, V. de O. **Aspectos farmacognósticos de *Mikania smilacina* DC, Compositae**. São Paulo, 1991. Tese para obtenção do título de Doutor, área de Insumos Farmacêuticos–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
27. FIERRO, I. M.; SILVA, A. C. B. S.; LOPES, C. S.; MOURA, R. S.; FIDALGO, C. B. Studies on the Anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 19-24, 1999.
28. FINAR, I. L. **Organic Chemistry**. 5.ed. London: Longman, 1975. v. 2, 942 p.

29. FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.
30. GIOVANNI, B.; CALIGNANO, A.; ROSA, M. Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 1372-1376, 1994.
31. GUTIERREZ, A. B.; HERZ, W. Bisabolones and other constituents of *Mikania shushunensis*. **Phytochem.**, v. 27, n. 12, p. 3871-3874, 1988.
32. GRAY, P. **Handbook of basic microtechnique**. 3.ed. Pittsburgh: McGraw-Hill Book Company, 1958.
33. HERZ, W.; KUMAR, N. Aromatic and other Constituents of four *Verbenisia species*: Structure and stereochemistry of verbesindiol. **Phytochem.**, v. 20, p. 247-250, 1981.
34. HOOKER, J. B.; JACKSON, A. **Index Kewensis Plantarum Phanerogamum**. Oxford: Clarendon, v. 1, 499 p. 1985.
35. HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, **Elsevier Science Publishers B. V.**, v. 30, p. 103-114, 1989.
36. JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.
37. JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 8.ed. São Paulo: Nacional, 1998.
38. KLEIN, R. M.; SLEUMER, H. O. Asteraceae. In: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, 1984. 86 p.
39. KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; CHITTAWONG, V.; BRUCE, M., CUNNINGHAM, G.; MILES, D. Long chain aliphatic alcohols and saturated

- carboxylic acids from heartwood of *Rhizophora apiculata*. **Phytochem.**, v. 33, n. 5, p. 1129-1131, 1993.
40. KOSTER, R. *et al.* Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412, 1952.
41. KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, Editora Universidade Rural, 1997. 198 p.
42. LEITE, R. M. G.; SOUZA, C. L.; SILVA, M. A.; KALYNE, A. L.; MATOS, J. F.; VIANNA, G. S. B. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) e *Justicia pectoralis* Jacq. (anador) e *Torresea cearensis* Fr. All (cumarú). **Rev. Bras. de Farm.**, v. 74, n.1, p. 12-15, 1993.
43. LITCHFIELD, J.; WILKOXON, F. **Simplified methods of evaluating dose-effect experiments**. For Saito and Co. Software & Shareware. 1948.
44. LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco. **Rev. Flora Med.**, v. 9, n. 3 p. 101-132, 1942.
45. MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. **Neil J. of Ethnopharmacol.**, v. 12, p. 93-11, 1984.
46. MANN, R. S.; DAVIDSON, J. B.; HOBBS, D. V. **Natural products: their chemistry and biological significance**. Longman: Harbone, 1994. 455 p.
47. McMURRY, J. **Fundamentals of organic chemistry**. 2.ed. Pacific Grove: Book/Cole Publishing Company, 1990. 493 p.
48. MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1988. 127 p.

49. METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of leaf and stem.** 2.ed. Oxford: Clarendon, 1988.
50. MORAIO, N. M. T.; NOGUEIRA, C. M. D.; FÁTIMA, M.; LOPES, G.; VASCONCELOS, N. Inorganic analytical study of medicinal plants. **J. CA Section**, 1995.
51. MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S. A. **The natural coumarins.** New York: John Wiley & Sons, 1982. 53 p.
52. NASHED, N.; BRENDEL, M. **Envirion Institute**, v. 9, n.1, p. 33-38, 1983. In. *Chem. Abst.* 99: 1574W.
53. NEVES, L.; SÁ, M. F. A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: *Mikania glomerata* Spreng. **Rev. Bras. de Farm.**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 2, p. 42-47, 1991.
54. NEWALL, C.A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal medicines: a guide for health-care professionals.** London: The Pharmaceutical Press, 1996. 296 p.
55. O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of structure principles and selected methods.** Melbourne: Termarcarphi Pty., 1981. 280 p.
56. OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; MANCINI, B.; CHUMZUM, M. Morfodiagnose do axofito do guaco: *Mikania glomerata* Sprengel. **Rev. Ciênc. Farmac.**, São Paulo, v. 8, n. 9, p. 11-24, 1987.
57. OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica.** Rio de Janeiro: Atheneu, 1996. 221 p.

58. OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, A. M.; 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. e Bioquím. da USP**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 169-183, 1984.
59. OLIVEIRA, F.; FERRO, V. de O. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido do guaco das sete sangrias: *Mikania smilacina* DC. **Rev. Farm. e Bioquím. da USP**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 1-13, 1985.
60. OLIVEIRA, F.; OGA, S.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluídos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco do mato (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker). **Rev. Farm. e Bioquím. da USP**, São Paulo, v. 25, n. 1/2, p. 50-54, 1985.
61. OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L.; GARCIA, L.O. Caracterização cromatográfica em camada delgada do extrato fluido de guaco: *Mikania glomerata* Sprengel. **Lecta USF**, v. 11, n. 1, p. 43-56, 1993.
62. OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L.; GARCIA, L. O. Morfologia externa das partes aéreas e anatomia foliar das espécies brasileiras de *Mikania willdenow* Sección *Globosae* Robinson: visão farmacognóstica. **Lecta USF**, v. 12, n. 1, p. 23-65, 1994.
63. PATYRA, S.; NAGORNA, S. B.; PYTASZ, M. **Annais da Universidade Marie Curie**, Sklodowska, v. 20, p. 21-53, 1966. In. *Chem. Abst.* 66: 4515m.
64. PURVIS, M. J.; COLLIER, D. C.; WALLS, D. **Laboratory techniques in botany**. London: Butterwoths, 1964. 371 p.
65. QUINTAS, A. T. Novo material de apoio para cortes histológicos. **Rev. da Fac. de Agron. da UFRGS**, Porto Alegre, v. 6, p. 51-5, 1963.

66. ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, K. M.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: A Lea & Febiger Book, 1996. 337 p.
67. ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer Massenprodukt and Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.
68. ROGER, D.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in na algogenic reaction and its inhibition. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 61, p. 17-24, 1980.
69. SANTOS, C. **Rota para biossíntese de flavonóides e glicosídeos com radicais acila biologicamente ativos**. Curitiba, 1998. Tese para obtenção do título de Professor Titular, área de Fitoquímica - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.
70. SAKAI, W. S. Simple method of differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **O. Stain Technol.**, v. 48, n. 5. p. 247-249, 1973.
71. SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2.ed. Iowa: The Iowa State College Press. 1951.
72. SHANI, J. *et al.*; **Arch. Int. Pharmacodyn.** v. 210, n. 1, p. 27-37, 1974. In. *Chem. Abst.* 83: 90765U.
73. SILVA, R. A. D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929. 1149 p.
74. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1979. 297 p.

75. THOMAZZI, S.M.; RIBEIRO, R.A.; CAMPOS, D.I.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages. **Mediators of Inflammation** **6**: 195-200, 1997.
76. TYAGI, A.; DISCIT, V. P.; JOSHI, B. C. **Naturwissenschaften**, v. 67, n. 2, p. 104, 1980. In. Chem. Abst. 92: 158152K.
77. VAZ, Z. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy-benzofuran, a novel xanthoxylone derivate on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharma Exp. Ther.**, v. 278, n. 1, p. 304-312, 1996.
78. VENEZIANI, R. C. S.; OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochem. System. and Ecol.**, v. 27, p. 99-102, 1999.
79. VILEGAS, J. H. Y.; EDERSON, L.; FERNANDO, M. Determination of kaurenoic acid in *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) leaves by capillary gas chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 8, n. 2, p 74-77, 1997.
80. VIEIRA, S. **Estatística Experimental**. 2.ed. São Paulo: Editora Atlas, 1999. 185 p.
81. VILEGAS, J. H. Y.; EDERSON, L.; FERNANDO, M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* (guaco) leaves. **Phytochem. Anal.**, v. 8, p 266-270, 1997.
82. WALLIS. T. E. **Microscopía Analítica**. London: Editorial Acribia Zaragoza, 1968.
83. WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 5.ed. London: McGraw-Hill, 1995. 329 p.

84. WINTER, C.A. *et al.* Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544-547, 1962.
85. WU, T.S.; YEH, J.; WU, P. L. The heartwood constituents of *Tetradium glabrifolium*. **Phytochem.**, v. 40, n. 1, p. 121-124, 1995.
86. YAMAMOTO, C.; CONSIGLIERI, V. O.; BRADA, M. V.; CHAVES, P. H. C.; GIANOTTO, E. A.; FERRO, V. de O.; SAITO, T. Atividade antimicrobiana do extrato de *Mikania smilacina* DC. **Rev. Bras. de Farmac.**, v. 2, n. 4. p. 62-66, 1989.