

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS PARTES AÉREAS DA
Mikania lanuginosa DC. (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

**Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
Co – orientador: Dr. Obdúlio Gomes Miguel**

**FLORIANÓPOLIS/SC
2000**

ROSI ZANONI DA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS PARTES AÉREAS DA
Mikania lanuginosa DC. (ASTERACEAE)

Orientador Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Co-orientador: Prof. Dr. Obúlio Gomes Miguel

FLORIANÓPOLIS
2000

TERMO DE APROVAÇÃO

ROSI ZANONI DA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS PARTES AÉREAS DA *Mikania lanuginosa* DC. (ASTERACEAE)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
Departamento de Química, UFSC

Co-orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Universidade Federal do Paraná

Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Nascimento
Departamento de Química, UFSC

Prof. Dr. Marcus César Mandalesi de Sá
Departamento de Química, UFSC

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Departamento de Química, UFSC

**“ A Certeza que a recompensa vem depois de muito trabalho
é como regar a semente da vida. Com dedicação e paciência
podemos mudar o curso de várias coisas. As rosas têm espinhos
e no entanto colhem-se.”**

**Á Deus, meu mestre, meus anjos, pela força
e pela luz nos momentos difíceis encontrados no
decorrer deste trabalho e que estão presentes em
todos os momentos da minha vida.**

Dedico a minha conquista com a mais profunda admiração e respeito:

Aos meus pais, Édgar e Nair, pelo exemplo de vida que foram, são e serão. Por terem sempre incentivado meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Toni, meu esposo, que com amor, compreensão e companheirismo sempre me incentivou na realização desta dissertação.

Aos meus filhos Milene, André e Marcos, pelo carinho e paciência.

**Aos professores Drs. Rosendo Augusto yunes,
Obdúlio Gomes Miguel e Valdir Cechinel Filho, meus
agradecimentos pelas orientações, carinho e apoio
oferecidos durante todas as etapas deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Ao Carlos Stadler, Coordenador deste mestrado, pelo desempenho, esforço e dedicação dispensado, visando a sua concretização.

Ao Prof. Franco Della Monache, pela colaboração na obtenção dos espectros e na elucidação estrutural dos compostos.

Ao Prof. João Batista Calixto pela realização dos testes farmacológicos.

Aos colegas de laboratório Guedes, Louisiane, Ângela, Tânia, Niero, Cristiane, Fabiane, sempre presentes com sugestões certas para as dificuldades que surgiram no trabalho.

Aos companheiros do mestrado interinstitucional UEPG/UFSC, Adriane, Ana Márcia, Amauri, Dione, Júlio, Lourdes, Maecela, Salete e Vanessa.

À Neide e a Ângela pelo incentivo, amizade e colaboração que tanto contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

À Graça e ao Jadir, pela eficiência e apoio.

Aos ensinamentos obtidos junto a cada professor, quer diretamente em disciplinas cursadas ou indiretamente com suas pessoas e/ou trabalhos realizados.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e discussão do tema desenvolvido nesta dissertação.

À todos que estiveram presentes neste período de convívio.

À CAPES e ao Projeto inter-institucional UFSC/UEPG pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
LISTA DE SIGLAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 Introdução	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Sinopse da Família ASTERACEAE.....	7
2.2 Considerações Gerais Sobre o Gênero <i>Mikania</i>	8
2.3 Descrição Botânica do Gênero <i>Mikania</i>	10
2.4 Distribuição Geográfica da <i>Mikania lanuginosa</i> DC	10
2.5 Descrição Botânica da Espécie em Estudo.....	12
2.6 Posição Sistemática da <i>Mikania lanuginosa</i> DC.....	13
2.7 A Importância das <i>Mikantias</i> na Fitoterapia.....	15
2.8 Estudos Fitoquímicos Anteriores do Gênero <i>Mikania</i>	23
2.9 Atividades Biológicas de Algumas Espécies do Gênero <i>Mikania</i>	36
2.10 Diterpenos: Ácido Caurenóico e Giberelinas	41
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.1 Material e Métodos.....	44
3.1.1 Equipamentos	44
3.1.2 Reagentes	44
3.1.3 Métodos Cromatográficos	45
3.1.3.1 Cromatografia em coluna (CC).....	45
3.1.3.2 Cromatografia em Camada delgada (CCD)	45
3.1.3.3 Cromatografia Gasosa (CG).....	46
3.1.4 Identificação e Caracterização dos Compostos	46
3.1.4.1 Infravermelho (IV)	46
3.1.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	46
3.1.4.3 Dados Espectroscópicos dos Compostos Isolados	47
3.1.4.3.1 Composto P3AC Isolado do Precipitado	47
3.1.4.3.2 Mistura de Compostos P4ETP (ETP1 e ETP2) Isolados do Precipitado	47
3.1.4.3.3 Mistura de Compostos P4 AGP Isolados do Precipitado	48
3.1.4.3.4 Composto SGHD Isolado das Frações Hexânica e Diclorometano.....	49
3.2 Coleta e Identificação do Material Botânico	49
3.2.2 Obtenção do Extrato Etanólico a 80%	50
3.2.3 Extração e Isolamento de Compostos.....	50
3.2.4 Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto.....	51
3.2.5 Esquema de Fracionamento do Extrato Etanólico a 80%	52

3.2.6	Fracionamento das Substâncias do Precipitado.....	53
3.2.6.1	Purificação da Subfração P3 do Precipitado.....	56
3.2.6.2	Purificação da Subfração P4 do Precipitado.....	57
3.2.7	Fracionamento da Fração Hexânica	60
3.2.8	Separação dos Compostos da Fração Diclorometano	62
3.3	Estudos Comparativos dos Diferentes Órgãos Vegetais da Espécie <i>M. lanuginosa</i> por CG/FID.....	64
3.3.1	Metodologia.....	65
3.3.1.1	Material Vegetal	65
3.3.1.2	Extração com Solventes Orgânicos	65
3.3.1.3	Curva de Calibração	66
3.3.1.4	Análises Cromatográficas	67
3.3.1.5	Estudos Comparativos dos Diferentes Órgãos da Espécie <i>Mikania lanuginosa</i> DC por CCD.....	68
3.4.1.2	Dor Induzida pela Formalina.....	70
3.4.1.3	Análise Estatística.....	71
3.4.1	Atividade Anyimicrobiana	71
3.4.2.1	Amostras Bacterianas e Fúngicas	71
3.4.2.2	Difusão em Meio Sólido - Disco	72
3.4.2.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	72
3.4.3	Toxicidade Aguda (Dose Simples).....	73
3.4.3.1	Animais.....	73
3.4.3.2	Condições Experimentais	73
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1	Identificação dos Compostos Isolados no Precipitado	75
4.1.1	Identificação do P3AC no Precipitado	75
4.1.1.1	A Determinação do Ponto de Fusão do P3AC	75
4.1.1.1.B	Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	76
4.1.1.1.C	Espectroscopia de Massas (CG/EM)	78
4.1.1.1.D	Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹ H)	80
4.1.1.1.E	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³ C)	81
4.1.1.2	Identificação da Mistura de P4ETP	84
4.1.1.2.A	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	85
4.1.1.2.B	Espectroscopia de Massas (CG/EM)	86
4.1.1.2.C	Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹ H).	88
4.1.1.2.D	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³ C).....	89
4.1.1.3	Análise da Mistura P4AGP	92
4.1.1.3.A	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	92
4.1.1.3.B	Espectroscopia de Massas (CG/EM)	93
4.1.2	Identificação do Composto SGHD da Fração Hexânica e DCM	96
4.1.2.A	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	97
4.1.2.B	Espectroscopia de Massas (CG/EM).	98
4.2	Controle de Qualidade.....	99
4.2.1	Cromatografia em Camada Delgada nas 4 Estações do Ano.....	100

4.2.2	Análises Quantitativas	101
4.2.2 A	Concentração do Ác. Caurenóico nas Quatro Estações do Ano.....	106
4.3	Atividades Biológicas.....	111
4.3.1	Atividade Analgésica.....	111
4.3.2	Atividade Antimicrobiana	112
4.3.2.1	Método da Difusão Radial em Agar - Disco	112
4.3.2.2	Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	114
4.3.3	Toxicidade Aguda (Dose Simples).....	114
5.	CONCLUSÕES.....	116
6.	PERSPECTIVAS.....	118
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Número de Unidades de Saúde no Verde Saúde-Curitiba, número de apresentações farmacêuticas de fitoterápicos distribuídos pela SMS e a quantidade distribuída por ano	18
TABELA 2 -	Consumo anual de plantas medicinais e fitoterápicos no SMS	19
TABELA 3 -	Plantas medicinais mais citadas para o tratamento das doença do aparelho respiratório, dados de 1999.....	20
TABELA 4 -	Estudo da prevalência do uso de medicamentos fitoterápicos	21
TABELA 5 -	Estudo da prevalência do uso de medicamentos utilizados na unidade do PSF21	
TABELA 6 -	Comparação da eficácia entre medicamentos fitoterápicos e medicamentos alopáticos	21
TABELA 7 -	Preço de alguns xaropes de Guaco.	22
TABELA 8 -	Nomes comerciais, nomes químicos e preços de alguns xaropes sintéticos similares ao xarope de Guaco	23
TABELA 9-	Fracionamento do precipitado, mostrando os sistemas de eluição e as frações resultantes	54
TABELA 10-	Sistema de eluição utilizados no processo de purificação da subfração P3 e frações reunidas	56
TABELA 11-	Sistema de eluição utilizado no processo de purificação da subfração P4 e as frações reunidas.....	58
TABELA 12-	Sistema de eluição da fração hexânica e frações reunidas	61
TABELA 13-	Sistema de eluição utilizado no fracionamento da fração DCM e frações reunidas.....	63
TABELA 14-	Concentrações das soluções de ácido caurenóico e suas áreas relativas	66
TABELA 15-	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C para P3AC e o ac. caurenóico	82
TABELA 16-	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C/DEPT para ETP1 e ETP2 comparados com os valores da literatura	91
TABELA 17-	Comparação da concentração de ácido caurenóico nos órgãos vegetais de <i>Mikania lanuginosa</i> DC no verão.....	107
TABELA 18-	Comparação da concentração de ácido caurenóico nos órgãos vegetais de <i>Mikania lanuginosa</i> DC no outono	107
TABELA 19-	Comparação da concentração de ácido caurenóico nos órgãos vegetais de <i>Mikania lanuginosa</i> DC no inverno	108
TABELA 20-	Comparação das concentrações do ac. caurenóico nos diferentes órgãos da <i>Mikania lanuginosa</i> DC na primavera.....	108
TABELA 21-	Atividade inibitória das frações de <i>M. lanuginosa</i> contra bactérias Gram positivas e Gram- negativas pelo método da difusão em ágar-disco.....	113
TABELA 22-	Determinação da concentração inibitória mínima das frações de <i>Mikania lanuginosa</i>	114

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-	Previsão da expansão do mercado brasileiro de fitoterápicos para o ano	11
FIGURA 2-	Aspectos da folha da <i>Mikania lanuginosa</i> DC., cultivada em Ponta Grossa	14
FIGURA 3-	Aspecto geral da <i>Mikania lanuginosa</i> DC cultivada em Ponta Grossa.....	14
FIGURA 4-	Caurenos como intermediários na biossíntese do ácido giberélico.....	42
FIGURA 5-	Fluxograma demonstrativo do processo de fracionamento do extrato etanólico a 80%.....	52
FIGURA 6-	Coluna cromatográfica do precipitado.....	55
FIGURA 7-	Curva de calibração do ácido caurenóico em diclorometano a 25°C.....	67
FIGURA 8-	Cromatograma obtido por CG do ác. caurenóico isolado da <i>Mikania lanuginosa</i> DC	68
FIGURA 9-	Gráfico do ponto de fusão do composto P3AC.....	76
FIGURA 10-	Espectro no IV de P3AC em pastilha KBr.....	77
FIGURA 11-	Cromatograma do CG/EM do composto P3AC.....	78
FIGURA 12-	Esquema de fragmentação do composto P3AC (8) por CG/EM.....	79
FIGURA 13-	Espectro de massas (70 eV) do composto P3AC.	79
FIGURA 14-	Espectro de RMN ¹ H do composto P3AC em CDCl ₃	81
FIGURA 15-	Espectro de RMN ¹³ C do composto P3AC.	83
FIGURA 16-	Dados de deslocamentos químicos de RMN ¹³ C para o composto P3AC	84
FIGURA 17-	Espectro no IV da mistura P4ETP.....	85
FIGURA 18-	Cromatograma dos compostos ETP1 e ETP2	87
FIGURA 19-	Espectro de massas (70 eV) do composto ETP1	87
FIGURA 20-	Espectro de massas (70 eV) do composto ETP2.....	88
FIGURA 21-	Espectro de RMN ¹ H da mistura ETP1 e ETP2	89
FIGURA 22-	Espectro de RMN ¹³ C/DEPT da mistura ETP1 e ETP2.....	90
FIGURA 23-	Espectro no IV do P4 AGP.....	93
FIGURA 24-	Cromatograma do CG/EM da mistura P4 AGP	94
FIGURA 25-	Rota para a fragmentação do ácido palmítico	95
FIGURA 26-	Espectro de massas do composto P4 AGP-E	96
FIGURA 27-	Espectro no IV do composto SGHD em filme KBr	97
FIGURA 28-	Espectro de massas (70 eV) do composto SGHD	98
FIGURA 29-	Cromatografia em CCD dos órgãos vegetais da <i>M. lanuginosa</i> do verão	101
FIGURA 30-	Cromatografia em CCD dos órgãos vegetais da <i>M. lanuginosa</i> do outono ...	101
FIGURA 31-	Cromatografia em CCD dos órgãos vegetais da <i>M. lanuginosa</i> do inverno ..	101
FIGURA 32-	Cromatografia em CCD dos órgãos vegetais da <i>M. lanuginosa</i> do primavera	101
FIGURA 33-	Cromatograma obtido por CG do ácido caurenóico isolado da <i>Mikania lanuginosa</i>	102
FIGURA 34-	Cromatograma do extrato DCM das folhas da <i>Mikania lanuginosa</i> coletadas no verão	102
FIGURA 35-	Cromatograma do extrato DCM dos caules da <i>Mikania lanuginosa</i> coletados no verão.....	117
FIGURA 36-	Cromatograma do extrato DCM das raízes da <i>Mikania lanuginosa</i> coletadas	

	tadas no verão	103
FIGURA 37-	Cromatograma do extrato DCM das folhas da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas no outono.....	103
FIGURA 38-	Cromatograma do extrato DCM das caule da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas no outono.....	103
FIGURA 39-	Cromatograma do extrato DCM das raízes da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas no outono.....	104
FIGURA 40-	Cromatograma do extrato DCM das folhas da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas no inverno.....	104
FIGURA 41-	Cromatograma do extrato DCM dos caules da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas no inverno.....	104
FIGURA 42-	Cromatograma do extrato DCM das raízes da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas no inverno.....	105
FIGURA 43-	Cromatograma do extrato DCM das flores da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas no inverno.....	105
FIGURA 44-	Cromatograma do extrato DCM das folhas da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas na primavera.....	105
FIGURA 45 -	Cromatograma do extrato DCM dos caules da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas na primavera.....	106
FIGURA 46-	Cromatograma do extrato DCM das raízes da <i>Mikania lanuginosa</i> cole tadas na primavera.....	106
FIGURA 47-	Gráfico comparativo dos diferentes órgãos da <i>Mikania lanuginosa</i> nas quatro estações do ano	109
FIGURA 48-	Efeito das frações de <i>Mikania lanuginosa</i> DC. na nocicepção induzida pela formalina	112

LISTA DE SIGLAS

AC	Ácido caurenóico
AE	– Acetato de etila
AGP	Ácido graxo no precipitado
AP	Área de pico
BHI	Brain Heart Infusion
CA	Caule
C	Carbono
CC	– Cromatografia em coluna
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CEME	Central de Medicamentos
CG	– Cromatografia gasosa
CGAR	– Cromatografia gasosa de alta resolução
CGAR/EM	– Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas CG/ES - Espectroscopia de massas
CG/FID	– Comatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização de chama
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CNPF	Centro Nacional de Pesquisa de Florestas
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CPQBA	Centro Pluridisciplinac de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CV	– Coeficiente de variância
DCM	– Diclorometano
DI	– Dose de inibição
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária
ETP1	Estigmasterol no precipitado
ETP2	β - sitosterol glicosilado
DEPT	– reforço sem distorção por transferência de polarização
EM	– espetrometria de massas
FAS	Fundação de ação social
FLA	Folha
FLO	Flor
RURECO	Fundação para o desenvolvimento econômico rural da região centro-oeste do Paraná
GA	Giberelinas
g	grama
IM	– Inibição Média
IV	– Espectroscopia de Infravermelho
H	Hidrogênio
HBP	Hiperplasia Benigna de Próstata
HPLC	– High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
IAF	– Instituto agroflorestal Bernard Hakvoort

ip	–	Intraperitoneal
IPA		International Pharmaceutical Abstract
ITAL		Instituto de tecnologia de alimentos
Kg		Kilograma
m		Multiplete
M ⁺		Íon molecular
MHz		Megahertz
Me		Metila
MeOH		Metanol
mL		Mililitro
mg		Miligrama
µg		Micrograma
nm		Nanômetro
NQFAR	–	Núcleo de Investigação de Química Farmacêutica
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
P.A.	–	para análise
P.F.	–	ponto de fusão
pH	–	potencial de hidrogênio
ppm	–	Partes por milhão
PSF		Programa Saúde da Família
P3AC		Ácido caurenóico na subfração 3 do precipitado
P4ETP		Esteróide no precipitado
P4AGP		Ácido graxo na subfração 4 do precipitado
<i>a posteriori</i>	–	posterior
QPN	–	Química de Produtos Naturais
RA		Raiz
RDC	–	Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RMN ¹ H		Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C		Ressonância magnética nuclear de carbono treze
Rf	–	Relação de frente
SBQ	–	Sociedade Brasileira de Química
SGHD		β - Sitosterol glicosilado na fração hexânica e diclorometano
SMS		Secretaria Municipal de Saúde
SMMS		Secretaria municipal de meio ambiente
SUS		Serviço Único de Saúde
Tab		Tabela
TMS	–	Tetrametilsilano
Tr	–	Tempo de retenção
UNICAMP		Universidade Estadual de Campinas
US		Unidade de Saúde
UV	–	Ultravioleta
UV-VIS	–	energia eletromagnética compreendida entre a ultravioleta e visível
v/v	–	volume por volume

RESUMO

As plantas são fontes inesgotáveis de substâncias que o homem pode fazer uso em sua vida diária. A *Mikania lanuginosa* DC é uma planta medicinal Brasileira, que vem sendo usada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças por suas propriedades antireumáticas, antiinflamatórias e em patologias dolorosas.

O presente trabalho envolveu extração, isolamento, purificação e identificação dos constituintes químicos das partes aéreas da *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE). No precipitado foi isolado e identificado um composto majoritário, o diterpeno ácido caurenóico, juntamente com outros compostos, como: estigmasterol, β - sitosterol e uma mistura de ácidos graxos, no qual foi possível identificar o ácido palmítico. Todos estes compostos foram identificados e elucidados estruturalmente por análises espectroscópicas (IV, CG/EM, RMN ^1H e RMN ^{13}C) e por comparação com os dados existentes na literatura.

Este trabalho teve por objetivo um estudo comparativo dos diferentes órgãos (raiz, caule, folha e flor) da *Mikania lanuginosa* DC por CG/FID. Os resultados mostraram que o ácido caurenóico é o principal composto ativo e está presente em todos os órgãos da planta em diferentes concentrações nas diferentes épocas do ano.

Foram também realizados ensaios biológicos para avaliar a ação antimicrobiana, atividade antinociceptiva no midelo da dor induzida pela formalina e toxicidade aguda. As frações hexânica e diclorometano apresentaram efeito antinociceptivo em ambas as fases no modelo da dor persistente induzida pela formalina e baixa toxicidade.

ABSTRACT

Plants are a large source of substrates which are used in our lives. *Mikania lanuginosa* DC IS A Brazilian medicinal plant used in folk medicine to treat several diseases due to its properties as: antirheumatic, antiinflammatory and in dolorous pathologies

The present study investigated the extraction isolation, and purification of some compounds from the parts of *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE). In precipitate, it was isolated and identified the diterpene Kaurenoic acid, among other compounds, like: the stigmasterol, β -sitosterol, and the palmitic acid. However, in the hexanic and dichloromethane fractions, β -glucosyl-sitosterol was isolated and identified the known steroid. All these compounds were identified by comparison of their spectral data (IR, GC/MS, ^1H and ^{13}C NMR) as reported in the literature.

This work also described a comparative studies of different parts (stems leaves, flowers and roots) of *Mikania lanuginosa* DC by GC/FID. The results showed that Kaurenoic acid, the main active compound present in this plant, is located in all organs but it is concentrated in different organs of the plant and found in different concentrations depending on the years season.

Biological assays were also carried out in order to verify the possible antibacterial, pharmacology and toxicology activity. The hexane and dichloromethane fractions caused a pronounced antinociceptive effect in both phases of formalin-induced persistent pain in mice and extract didn't cause any toxicity in rats.

1.INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A busca do tratamento das enfermidades pela utilização das plantas medicinais, faz parte da história da humanidade. Essa prática milenar ultrapassou todas as barreiras e obstáculos do processo evolutivo da civilização chegando até os dias atuais.

Com o advento da química moderna e a era da industrialização, os princípios ativos das plantas foram isolados, purificados e sintetizados, com o objetivo de fornecer maior rendimento e eficácia ao medicamento, frente ao aumento do consumo por parte da população. Entretanto, algumas das plantas que proporcionaram o processo de síntese das substâncias ativas, acabaram no esquecimento (SILVA JÚNIOR & VIZZOTTO, 1996).

Neste final de século, as plantas medicinais ressurgem, ocupando posição de destaque como uma Terapia Alternativa, de consumo crescente por parte da população visando uma terapêutica menos agressiva ao organismo, tentando recuperar hábitos de vida mais saudáveis e até mesmo por falta de recursos financeiros.

Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde, 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam-se de plantas medicinais para o tratamento de suas enfermidades (HECK, 1996).

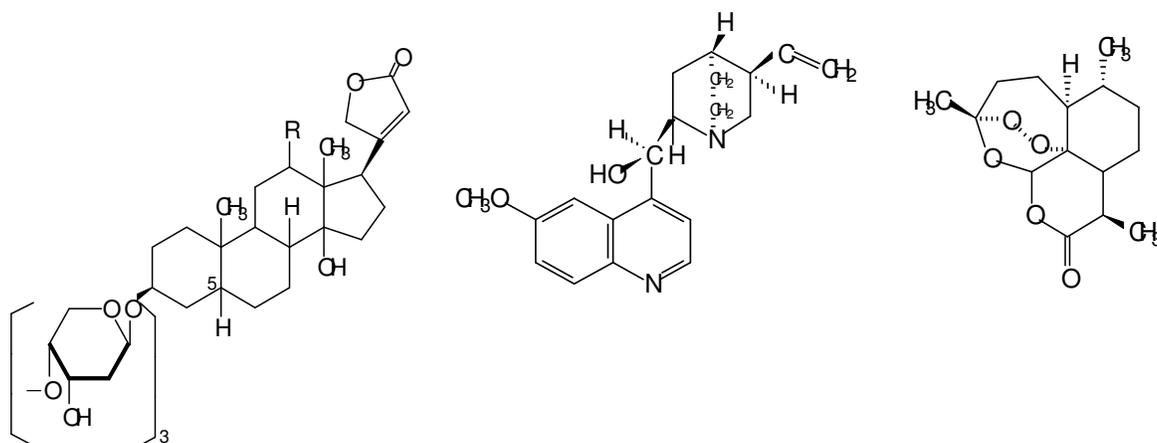
A Flora Brasileira apresenta a maior reserva de Biodiversidade do mundo (HECK,1996). Das 250 mil espécies vegetais, já mundialmente catalogadas, cerca de 120 mil delas ocorrem no Brasil, das quais somente 10% foram estudadas do ponto de vista químico e farmacológico

(HECK, 1996; MIGUEL, 1996). Essa carência de estudos evidencia uma necessidade, cada vez maior, de se intensificar as pesquisas nessa área. Portanto, a riqueza em potencial de nossa flora, constitui-se numa valiosa fonte de matéria-prima utilizada no preparo de extratos vegetais, produção de fitoterápicos e para a otimização de novos fármacos, derivados dos modelos estruturais das moléculas bioativas naturais (CECHINEL- FILHO & YUNES, 1998).

A descoberta e, por conseqüência, o emprego de novos produtos de plantas abrangem estudos que englobam conhecimentos etnobotânicos e pesquisas científicas, especialmente nas áreas de química e biologia. Com isso, é possível o isolamento, purificação e a identificação dos constituintes químicos ativos das espécies vegetais, bem como a avaliação do seu potencial farmacológico, para que se tornem efetivas no tratamento de muitas enfermidades, incluindo as de caráter crônico, como as cardiopatias, hipertensão arterial, alguns tipos de tumores, etc. É importante ressaltar que, em muitas situações, a descoberta da atividade dessas substâncias não representou apenas o surgimento de um grupo novo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica. Sendo assim, a terapêutica atual seria muito pobre, caso não tivesse ocorrido à descoberta dessas substâncias ativas (SIMÕES, et al. 1999).

Como exemplo histórico, cita-se o emprego da *Digitalis* como cardiotônica, descrita por W. Whitering em 1785 (BARREIRO, 1990). Entre os seus princípios ativos mais importantes estão a digitoxina (1) e a digoxina (2) encontradas nas folhas de *Digitalis purpurea* L. e a *Digitalis lanata* Ehrh respectivamente (TRESE & EVANS, 1989; BRUNETON, 1991) e em *Digitalis orientalis* Lam. (BARREIRO,1990).

Em 1820, Pelletier e Caventou isolaram um alcalóide quinoleínico. A quinina (3), extraída das cascas da árvore do gênero *Cinchona* (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997) foi usada como antifebrífugo no impaludismo, pela sua ação esquizotóxica (BARREIRO, 1990; SILVA, 1995). A artemisinina (4) é uma lactona sesquiterpênica, que foi isolada em 1972 pelos cientistas chineses, das folhas e flores de *Artemisia annua* L. e a sua estrutura química foi elucidada em 1979. Constitui-se em uma nova classe de composto, com atividade potente contra o *Plasmodium falciparum*, parasita sangüíneo causador da malária e responsável pela morte de dois milhões de pessoas todos os anos (MAGALHÃES & FOGGIO, 1997; FIGUEIRA & SARTORATTO, 1997; BOAVENTURA JÚNIOR & OLIVEIRA, 1997; BOAVENTURA JÚNIOR, et al., 1997; MILES, NGUYEN, MILES, 1998 ; AGTMAEL, EGGELTE, BOXTEL, 1999).



R=H Digitoxina (1) e R=OH Digoxina (2)

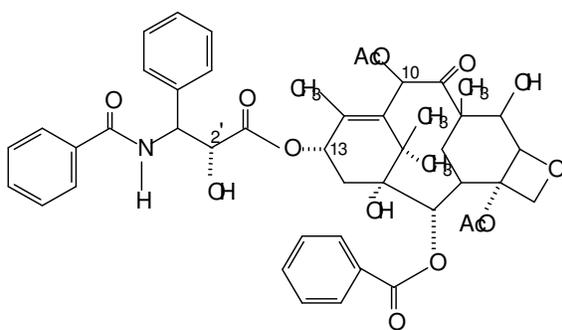
Quinina (3)

Artemisinina (4)

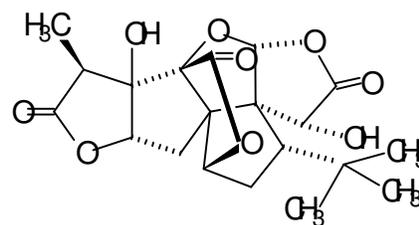
O composto Taxol (5), diterpeno do grupo taxano (BARREIRO, 1990), isolado das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt., apresenta uma potente atividade antitumoral para o tratamento dos cânceres de mama, ovário e pulmão (TRESE & EVANS, 1989; HAMBURGER &

HOSTETTMANN, 1991; PANDLEY,1998) e contra a leucemia (TRESE & EVANS, 1989; BRUNETON, 1991).

Outro composto natural importante, o diterpeno ginkgolido-A (6), isolado das folhas da árvore oriental *Ginkgo biloba* L. por Furukawa em 1932, antagonista específico do fator de agregação plaquetária (BARREIRO, 1990), atua em todos os níveis da circulação, aumentando a irrigação sanguínea dos tecidos, ativando o metabolismo celular, diminuindo o risco de trombozes (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; SHU, 1998) é captador de radicais livres inibindo a peroxidação lipídica das membranas (TECH,1996). Acredita-se ainda, que desempenha papel importante, como agente mediador de reações inflamatórias, principalmente nas alérgicas e na hiperatividade bronquial (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; SHU, 1998; SIMÕES et al., 1999).



Taxol (5)



Ginkgolido A (6)

No gênero *Mikania* Willdenow a espécie mais estudada é a *Mikania glomerata* Sprengel, o Guaco oficial brasileiro, muito utilizado pela população pelas suas propriedades anti-reumática, diaforética, antiespasmódica, antiinflamatória, e principalmente como balsâmico das

vias respiratórias, expectorante e broncodilatador nos casos de bronquite e traqueobronquites (OLIVEIRA, OGA, AKISUE, AKISUE, 1985; OLIVEIRA, SAITO, GARCIA, 1993). A *Mikania glomerata* vem sendo largamente empregada nos programas municipais de fitoterapia, na forma de xarope de Guaco, sendo eficaz no tratamento das doenças respiratórias, como: a gripe, resfriado, bronquite e asma (SACRAMENTO, 1996; BANUTH, 1996; PIRES, 1996; MORESCO, 1996).

As Mikánias apresentam várias espécies vegetais com a mesma denominação popular de Cipó-cabeludo, como *Mikania hirsutissima* DC, *Mikania lanuginosa* DC, *Mikania pilosa* Bak, *Mikania setigera* Schult-Bip, em virtude de suas semelhanças botânicas (BARROSO, 1986), tornando-se difícil o processo de identificação sistemática entre elas e em contrapartida, facilitando as possíveis adulterações, quer sejam intencionais ou não. A *Mikania lanuginosa* DC é freqüentemente confundida pelo povo com o Cipó-cabeludo oficial da Farmacopéia Brasileira, a *Mikania hirsutissima* DC (SILVA, 1929), a qual é comumente empregada para adulterá-la.

Após revisão nas bases Chemical Abstract, Biological Abstract e International Pharmaceutical Abstract (IPA), verificou-se que estas espécies foram pouco estudadas. Com relação a *Mikania lanuginosa* DC, não foi encontrado nenhum trabalho sobre a sua composição química ou atividade farmacológica. Assim, verifica-se a existência de uma lacuna em relação a esta espécie vegetal, nativa na região sul do país e muito empregada pela população na forma de chás em casos de reumatismo.

Portanto, o presente trabalho visa o estudo químico e farmacológico das partes aéreas da espécie vegetal citada, objetivando a difusão mais ampla e segura do saber popular, o controle de qualidade na fitoterapia e também contribuir com o processo de exploração e validação científica da biodiversidade brasileira.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- A) Analisar as atividades biológicas do extrato bruto e das frações de *Mikania lanuginosa* DC.
- B) Isolar e purificar os constituintes químicos ativos das frações de *Mikania lanuginosa* DC.
por meio de técnicas cromatográficas convencionais.
- C) Identificar os compostos químicos isolados por métodos físicos e físico-químicos como:
ponto de fusão (Pf), análises espectroscópicas de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e CG/MS por
comparação com os dados existentes na literatura.
- D) Comparar a composição química dos diferentes órgãos vegetais (folhas, flores, caules e
raízes) da *Mikania lanuginosa* DC nas 4 estações do ano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SINOPSE DA FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Compositae é atualmente denominada de Asteraceae. Todavia, conserva-se ainda a antiga denominação Compositae, por ser muito difundida e consagrada pelo uso (BARROSO, 1986).

Compreendem as Asteraceas (Compositae) cerca de 1.100 gêneros, com aproximadamente 25.000 espécies e aproximadamente 13 tribos, distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BURKART, 1974; BARROSO, 1986; JOLY, 1998). Constitui-se em uma das famílias mais evoluídas do reino vegetal, bem como uma das maiores (OLIVEIRA, et al., 1994). São na verdade plantas que se desenvolvem bem nos diferentes habitats, com exceção do aquático (BURKART, 1974; BARROSO, 1986; JOLY, 1998). Há, no Brasil, aproximadamente 180 gêneros dessa planta (BARROSO, 1986), as quais estão representadas por espécies herbáceas anuais ou perenes, subarborescentes ou arbustivas e raramente por espécies arbóreas (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1986; JOLY, 1998).

Deriva o nome da família Asteraceae (Compositae) da estrutura característica da inflorescência, em Capítulos Florais (BURKART, 1974; CRONQUIST, 1981; JOLY, 1998). Os capítulos florais exercem a função de um chamariz para atrair os polinizadores (BARROSO, 1986). Três tipos de polinizações têm sido observados nas Asteraceae(Compositae): a entomófila, a ornitófila e a anemófila, ocorrendo na maioria das vezes a entomófila (BURKART, 1974; BARROSO, 1986).

2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *Mikania*

O gênero *Mikania* foi denominado em 1803 por Willdenow, em homenagem ao Professor de Botânica de Praga, Johan Christian Mikan, falecido em 1814 (SILVA, 1929; BARROSO, 1986). Possui cerca de 300 espécies pertencentes à tribo Eupatorieae, distribuídas em áreas tropicais e subtropicais do continente Americano e Asiático. No Brasil foram encontradas 152 espécies de *Mikania*, ocorrendo especialmente nos Estados do Ceará, Bahia (CRUZ & LIBERALLI, 1938), Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro (CÔRREA, 1984; OLIVEIRA, et al., 1994), Paraná e Santa Catarina (REITZ, 1989).

Entre a diversidade de plantas medicinais presentes na natureza e empregadas pela população, em virtude das suas propriedades terapêuticas, merecem destaque as do gênero *Mikania* em especial aquelas que são denominadas popularmente de Guaco e Cipó-cabeludo, pela eficácia que tem demonstrado no tratamento de diversas enfermidades (RODRIGUES, ALVARENGA, KATO, 1996).

A primeira edição da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil consignou, em seu texto, a *Mikania glomerata* Sprengel, como sendo o Guaco oficial (NEVES & SÁ, 1991) e a *Mikania hirsutissima* DC, como sendo o Cipó-cabeludo oficial (SILVA, 1929; CRUZ & LIBERALLI, 1938), para serem usados no preparo de tinturas.

Com o nome de “Cipó” designavam os nossos indígenas, todas ou quase todas as plantas sarmentosas e trepadeiras. A palavra Cipó deriva do tupi: Ib – ci – pó; Ib = árvore, ci = pegar, pó = fibra, significando pegar a fibra da árvore (CRUZ & LIBERALLI, 1938).

Sob a denominação vulgar de Guaco, Guaco-liso, Guaco-verdadeiro, Guaco-cheiroso, Cipó-caatinga e Uaco, são conhecidas cerca de cinquenta espécies vegetais, todas empregadas na

medicina popular em nosso país, bem como em outros países da América do Sul e da América Central, inclusive como antídoto do veneno de certos ofídios e escorpiões. Incisões são feitas em algumas regiões do corpo da pessoa mordida pela cobra e, posteriormente, coloca-se o suco das folhas sobre as incisões. Os princípios ativos penetram na circulação sanguínea, e impedem a morte que seria provocada pela mordida da cobra ou pela picada de escorpiões (OLIVEIRA, 1986/1987; COSTA, 1994; PEREIRA, GONÇALVES, PEREIRA, 1992). Conta à história da fitomedicina, que as águias andinas, em seus vôos rasantes, em busca de pequenas presas, podiam ser picadas por serpentes. Nestas circunstâncias, envolviam o seu corpo sobre os Guacos, por apresentarem propriedades antiofídicas (ALONSO, 1998).

Segundo a coordenadora nacional da fitoterapia no serviço público, SACRAMENTO (1999), o Ministério da Saúde criou em 1982 o Programa de Plantas da CEME (Central de Medicamentos) com o objetivo de validar as plantas medicinais brasileiras, isto é, que seja demonstrado a sua eficácia e que os seus efeitos tóxicos sejam conhecidos e previstos. Enfim, tudo o que é necessário para que seja considerada um medicamento e autorizada o seu uso. Desta forma, propiciando o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico.

A *Mikania glomerata* Sprengel, por ser de grande relevância na etnofarmacologia brasileira, foi uma das plantas selecionadas pela CEME para ser estudada. Os resultados da pesquisa revelaram, pelos ensaios clínicos e pré-clínicos a sua eficácia no tratamento de bronquites e como calmante para a tosse (OLIVEIRA et al., 1986/1987; SANTOS, 1997). Portanto, esta espécie vegetal integra-se no rol de plantas medicinais, para serem utilizadas no projeto de fitoterapia, o qual foi implantado em 1988 no Serviço Único de Saúde (SUS) de todo o

Brasil (SACRAMENTO, 1999). Dessa forma, “Ciência” e “Tecnologia” consagram a cultura popular.

2.3 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DO GÊNERO *Mikania*

As espécies vegetais pertencentes a este gênero, apresentam as seguintes características botânicas:

É um SUBARBUSTO muito volúvel, de caule trepador e perene (REITZ, 1989).

As FOLHAS são dos mais diferentes tipos, geralmente largas, opostas e pecioladas.

Os CAPÍTULOS FLORAIS são constituídos por 4 flores isomorfas, apresentando corola tubulosa de coloração branca ou rosada, quinque dentada e hermafroditas, dispostas em rácimo; involúcro pequeno, cilíndrico, formado por 4 brácteas oblongas receptáculo glabro.

O PAPILHO é formado por pequenas cerdas.

2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA *Mikania lanuginosa* DC

A espécie vegetal em estudo, caracteriza-se por ser uma Liana, dispersa nos mais variados habitats nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo (CÔRREA, 1981), Santa Catarina e Paraná (REITZ, 1989) entre 500 até 1.350 m de altitude, como a Floresta Ombrófila Densa da Costa Atlântica e nos campos de altitude da borda oriental do planalto. Desenvolve-se desde o interior da floresta sombria, situada em solos úmidos, até os solos rochosos e de rápida drenagem, nas

2.5 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE EM ESTUDO

O nome da espécie provém do latim “lanuginosa” e significa que “a planta é coberta por pêlos”. Em função desta característica botânica, a *Mikania lanuginosa* recebe a denominação popular de Cipó-cabeludo ou Micânia (REITZ, 1989).

É um SUBARBUSTO volúvel, perene e trepador, semelhante a um cipó, geralmente atingindo muitos metros de comprimento, ramos lenhosos e cilíndricos, revestidos de tomento branco-piloso, sensível à geada (CORRÊA, 1981);

As FOLHAS são opostas, largas, sub-coriáceas, verdes, com pecíolo longo e densamente lanuginoso medindo de 2- 4 cm de comprimento, cordiforme-ovada, acuminadas e recurvadas no ápice, com formato cordiforme na base, margem do limbo denticulada, 5-7 nervuras, irradiando do ápice do pecíolo; fusco-hirsutas na face ventral e densamente griseo-seríceas, ou subtomentosas na dorsal, medindo de 5-12 cm de comprimento por 3-9 cm de largura (CORRÊA, 1981; REITZ, 1989);

Os CAPÍTULOS FLORAIS são numerosos, pediculados pequenos, corimbosos, formado por quatro flores tubulosas, hermafroditas, subsésseis, dispostas em panículas terminais e axilares alongadas e muito ramificados, opostas aos ramos; pedicelos lanosos, medindo de 1-2 mm de comprimento. INVÓLUCRO medindo de 4-5mm de comprimento, com 4 bractéolas lanceoladas, agudas e pilosas, medindo de 2-3mm de comprimento e filárias oblongas, semi-agudas, laxamente pilosas. O Tubo da corola é um pouco mais curto do que o limbo (REITZ, 1989).

O FRUTO é um aquênio cilíndrico e glabro e possui Papus branco (CORRÊA, 1981; REITZ, 1989).

2.6 POSIÇÃO SISTEMÁTICA DA *Mikania lanuginosa* DC

Segundo o sistema de classificação de CRONQUIST (1981), a espécie *Mikania lanuginosa* DC tem a seguinte classificação:

REINO: PLANTAE;

DIVISÃO: MAGNOLIOPHYTA (ANGIOSPERMAE);

CLASSE: MAGNOLIOPSDA;

SUBCLASSE: ASTERIDAE;

ORDEM: ASTERALES;

FAMÍLIA: ASTERACEAE (COMPOSITAE);

TRIBO: EUPATORIAE;

GÊNERO: *Mikania*;

ESPÉCIE: *lanuginosa* DC;

SINONÍMIA POPULAR: Cipó – cabeludo.



Figura 2 – Aspecto da folha da *Mikania lanuginosa* DC, cultivada em Ponta Grossa.

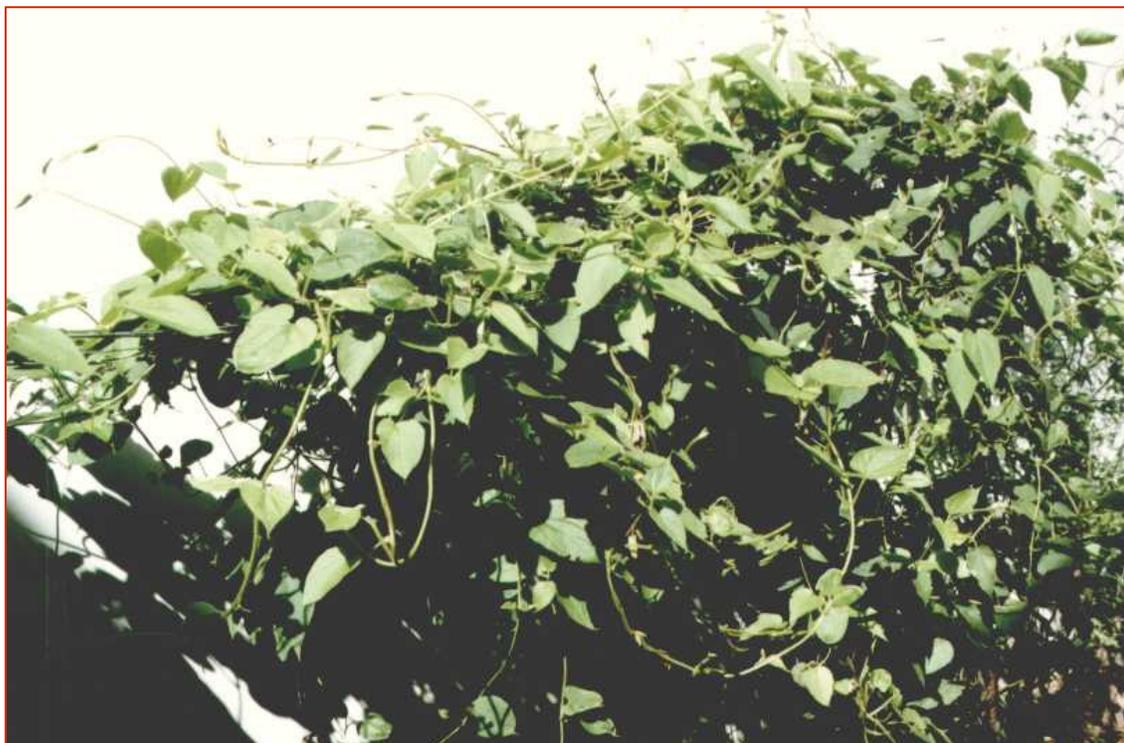


Figura 3 – Aspecto geral da *Mikania lanuginosa* DC, cultivada em Ponta Grossa.

2.7 A IMPORTÂNCIA DAS MIKANIAS NA FITOTERAPIA

As plantas medicinais constituem-se num valioso instrumento terapêutico para a produção de fitoterápicos, as quais a cada dia gozam de maior credibilidade diante das comunidades científicas em todo o mundo. Tanto assim que desde 1976, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem recomendado em suas reuniões a adoção das plantas medicinais e propalando os lemas criados, como: “Saúde para todos no ano 2000” e “Salvem as plantas, elas salvam vidas”, fazendo com que hoje a fitoterapia seja recomendada na prevenção e tratamento de doenças, pois alia eficácia com menores riscos de efeitos colaterais, e um custo acessível a todos (MIGUEL, 1996). Portanto, a implantação da fitoterapia na Saúde Pública vem promover a saúde e melhorar a qualidade de vida do ser humano neste terceiro milênio.

Atualmente, a fitoterapia encontra-se implantada no Serviço Único de Saúde, (SUS) em aproximadamente 2000 municípios brasileiros, e observa-se a crescente aceitação dos fitoterápicos por parte dos profissionais de saúde (SACRAMENTO, 1999).

Para comprovar esta realidade, a Secretaria Municipal de Saúde de Vitória – Espírito Santo, realizou uma pesquisa para verificar o índice de adesão à prescrição de Fitoterápicos por partes dos médicos capacitados pelo programa de fitoterapia. A presente pesquisa nos revelou, que dos 107 médicos de várias especialidades entrevistados, 67 deles prescrevem fitoterápicos, representando 63 % de adesão. Enquanto que 40 deles não os prescrevem, perfazendo 37 % de não adesão (SACRAMENTO,1999). Esta maior credibilidade da fitoterapia perante a classe médica deve-se ao fato das plantas medicinais hoje serem alvo de maior interesse científico, derrubando aos poucos o empirismo do emprego destes vegetais para penetrar na era científica,

em que o médico atento a estas opções extremamente válidas e convenientes, começa a incluir no seu receituário os medicamentos elaborados por indústrias de fitoterápicos confiáveis.

Assim, muitas indústrias estrangeiras têm lançado produtos vegetais em embalagens alopáticas, com resultados extraordinários para várias enfermidades, tais como Permixon ®, elaborado com extrato dos frutos de *Serenoa repens*, indicado para o tratamento e alívio dos sintomas da Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP); o Tanakan ®, preparado com o extrato seco das folhas de *Ginkgo biloba* (Egb 761) que é indicado para retardar o envelhecimento, captar radicais livres, vaso - regulador, desagregador plaquetário e flexibilizador de hemácias (TECH, 1996).

Algumas empresas farmacêuticas nacionais, que produzem fitoterápicos, como a Herbarium, Fitomed, Laboratório Catarinense S.A., constam em suas linhas de medicamentos o Xarope de Guaco e para a sua manipulação utilizam a tintura das folhas de *Mikania glomerata*.

O Laboratório Flora Medicinal, fundado pelo Dr. J. Monteiro da Silva em 1912, produz o Chá composto Mikania ®, formulação composta pela associação de três espécies vegetais que são o Cipó-cabeludo (*Mikania hirsutissima*), Quebra - pedra (*Phyllanthus niruri*) e Abacateiro (*Persea gratissima*) em caixas contendo 100 gramas dos componentes triturados e misturados. Segundo a sua bula, é indicado para o tratamento de edemas, infecções urinárias, cólicas nefríticas, cistite, litíase renal, hipertensão arterial, asma brônquica e hepatite B (CRUZ & LIBERALLI, 1938).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Farmacêutica (1998), enquanto o consumo de medicamentes sintéticos, no Brasil, vem aumentando em média 16 % por ano, o uso de produtos fitoterápicos tem crescido 20% ao ano. Considerando a expressiva busca da fitoterapia,

os sistemas municipais de saúde de algumas cidades Paranaenses, como Curitiba, Turvo e Guarapuava, vêm utilizando as plantas medicinais e os fitoterápicos como forma de tratamento complementar às doenças primárias.

Segundo o coordenador da fitoterapia no Paraná, GRAÇA (1999), a Prefeitura Municipal de Curitiba em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde (SMS), Fundação de Ação Social, Secretaria Municipal de Abastecimento e a Secretaria Municipal do Meio Ambiente, vêm utilizando as plantas medicinais e a Fitoterapia no Serviço Único de Saúde (SUS) de Curitiba, como opção terapêutica médica desde 1990, através do projeto VERDESAÚDE. O presente projeto preconiza a utilização de 13 espécies vegetais identificadas botanicamente e com usos farmacológicos consagrados, entre as quais destacam-se os Guaco como *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, ambas muito semelhantes morfológicamente. Primeiramente as plantas são cultivadas com rigoroso controle agrônômico e quando atingem o seu completo desenvolvimento, são coletadas e devidamente dessecadas. Posteriormente, segue-se um rigoroso controle de qualidade, que é realizado por um pessoal capacitado. Os lotes aprovados pelos testes de qualidade dividem-se, uma parte é embalada em sacos plásticos de 30 gramas e o restante são transformados em fitoterápicos para serem distribuídos gratuitamente nas Unidades de Saúde do Serviço Municipal de Saúde (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Número de Unidades de Saúde no Verde Saúde - Curitiba, número de apresentações farmacêuticas de fitoterápicos distribuídos pela SMS e a quantidade distribuída por ano (GRAÇA, 1999).

ANO	Nº DE US	Nº DE APRESENTAÇÕES FARMACÊUTICAS	QUANTIDADE DISTRIBUÍDA
1994	25	20	#
1995	30	25	141.435
1996	36	25	147.875
1997	38	16	177.603
1998	38	16	37.755
1999	56	16	109.434*

dado não disponível

* consumo de janeiro a julho

* Unidade de Saúde (US)

Estima-se que para o ano 2000, serão distribuídas em 90 Unidades de Saúde aproximadamente 440.604 unidades de apresentações farmacêuticas. Considerando que cada pessoa utiliza quatro apresentações farmacêuticas/ano, esta estimativa poderá beneficiar cerca de 110 mil pessoas de baixo poder aquisitivo/ano. Seguramente, a qualidade de vida destas pessoas melhorarão significativamente, tornando-as mais produtivas no trabalho e ajustadas à sociedade.

A Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (1999) possui dados expressivos quanto a utilização anual de plantas medicinais e de fitoterápicos no Serviço Municipal de Saúde (SMS)

Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Consumo anual de plantas medicinais e fitoterápicos no SMS.**Plantas Medicinais em Kg**

Nome científico	Apresentação	Nome popular	1995	1996	1997	1998	1999*	1999**	2000
1. Achillea millefolium	Planta seca	Pronto alívio	55.700	179.860	172.950	170.790	318.540	299.520	449.280
2. Ageratum conizoides	Planta seca	Mentrasto	70.890	50.810	94.800	46.560	#	#	#
3. Arctium minus/lapa	Planta seca	Bardana	53.610	21.410	63.930	36.780	148.740	181.740	272.160
4. Baccharis sp	Planta seca	Carqueja	74.560	64.820	74.920	#	#	#	#
5. Bauhinia fortificata	Planta seca	Pata de vaca	50.735	25.220	4.200	#	#	#	#
6. Calendula officinalis	Planta seca	Calêndula	60.900	23.420	310.250	16.050	#	#	#
7. Coleus b. / P. boldus	Planta seca	Boldo	76.460	64.820	102.840	69.510	126.090	237.600	356.400
8. Cymbopogon citratus	Planta seca	Capim limão	248.285	112.100	531.070	#	#	#	#
9. Foeniculum vulgare	Planta seca	Funcho	257.798	388.480	324.950	235.410	314.610	820.800	1.231.200
10. Malva sylvestris	Planta seca	Malva	84.820	170.090	153.160	87.840	0,000	282.960	424.440
11. Matricaria chamomila	Planta seca	Camomila	342.900	257.480	627.030	0,000	714.180	858.240	1.287.360
12. Maytenus ilicifolia	Planta seca	Espinhera santa	141.790	186.120	272.750	134.130	243.570	448.560	672.840
13. Melissa officinalis	Planta seca	Erva cidreira	135.590	59.410	342.940	17.940	290.580	406.080	609.120
14. Mentha sp	Planta seca	Hortelã	19.300	56.930	99.350	0.510	#	#	#
15. Mikania glomerata	Planta seca	Guaco	72.600	241.560	0	76.980	178.860	492.480	738.720
16. Pylanthus niruri	Planta seca	Quebra pedra	69.250	67.500	82.170	#	#	#	#
17. Plantago major/lanceolata	Planta seca	Tanchagem	29.250	80.458	153.160	122.070	175.230	328.320	492.480
18. Polygonum sp	Planta seca	Erva de bicho	39.500	68.990	86.120	4.580	#	#	#
19. Psidium guajava	Planta seca	Goiaba	47.167	50.460	56.710	#	#	#	#
20. Salvia officinalis	Planta seca	Sálvia	72.890	84.850	121.740	93.750	207.000	282.240	423.360
TOTAL DISTRIBUÍDO EM Kg			2003,995	2254,788	3675,060	1112,900	2717,400	4838,240	6957,360
TOTAL DISTRIBUÍDO DE PACOTES COM 30g			66,800	75,160	122,502	37,097	90,580	154,608	231,912

Fitoterápicos em Unidade

Nome científico	Apresentação	Nome popular	1995	1996	1997	1998	1999*	1999**	2000
21. Aloe Vera/arborescens	Planta seca	Babosa	3.426	3.975	454	-	-	15.000	22.500
22. Calendula officinalis	Planta seca	Calêndula	15.874	15.813	827	-	47.340	31.536	47.304
23. Calendula officinalis	Planta seca	Calêndula	8.923	6.201	3.703	#	#	#	
24. Mikania glomerata	Planta seca	Guaco	24.957	6.837	40.050	658	-	35.870	53.805
25. Passiflora alata	Planta seca	Maracujá	5.900	24.103	130	-	798	40.160	60.253
26. Plantago major/lanceolata	Planta seca	Tanchagem	-	60	-	#	#	#	
27. Symphytum officinale	Planta seca	Confrei	5.889	9.922	7.767	-	-	16.537	24.804
28. Symphytum officinale	Planta seca	Confrei	9.666	5.804	2.170	#	#	#	
TOTAL DE FITOTERÁPICOS MANIPULADOS			74.635	72,715	55,101	658	48,138	139,112	208,666

TOTAL DE PACOTES E MANIPULADOS DISPENSADOS 1995 1996 1997 1998 1999* 1999** 2000
141,435 147,875 177,603 37,755 138,718 293,720 440,578

* Consumo até setembro

** Previsão

Despadronizado em 1997

Fonte: Demonstrativo histórico de Consumo/Movimentação de Materiais (EST616) = Almoarifado/ SMS

Desde o início de 1999, vem se desenvolvendo nos municípios de Turvo e Guarapuava, região central do Paraná, através da Fundação RURECO, EMBRAPA/CNPq, IAF, UNICENTRO e Prefeitura Municipal de Guarapuava, o projeto denominado “Florestas Medicinais- Desenvolvimento de Tecnologias e Ações para a Conservação e o Uso Sustentado de Plantas Medicinais”, tendo como um dos seus objetivos, a implantação da fitoterapia como alternativa complementar no Sistema Municipal de Saúde dos municípios acima citados, para o tratamento

de patologias primárias. A partir das informações levantadas nas entrevistas, foi possível identificar um total de 48 espécies de plantas medicinais usadas para o tratamento das doenças do trato respiratório, sendo que as mais citadas encontram-se na **Tabela 3** abaixo demonstrada (RURECO, 1999).

Tabela 3 - Plantas medicinais mais citadas para o tratamento das doenças do aparelho respiratório, dados de 1999.

CLASSE	NÚMERO	% em relação ao número de entrevistados que utilizam plantas medicinais.
Manjerona	43	24,16 %
Sálvia	43	24,16 %
Guaco	40	22,47 %
Laranja	35	19,66 %
Alho	32	17,98 %
Limão	25	8,43 %
Tansagem	25	8.43 %

No período de abril a maio de 1999, foi realizado pela equipe do Programa Saúde da Família (PSF), um estudo visando avaliar os efeitos dos fitoterápicos Xarope de Guaco, Pomada de Calêndula e Tintura de Espinheira - Santa respectivamente, nas afecções das vias respiratórias, feridas epidérmicas e epigastralgias. Estes foram comparados com os efeitos dos medicamentos alopáticos, comumente utilizados para o tratamento destas respectivas patologias, no sistema municipal de saúde do Jardim das Américas, em Guarapuava. O estudo foi feito através de consultas ambulatoriais médicas e de enfermagem. No retorno, os pacientes foram reavaliados

cl clinicamente, constatando-se a eficácia ou não da utilização do medicamento **Tabelas 4, 5 e 6** abaixo (RURECO, 1999).

Tabela 4 - Estudo da prevalência do uso de medicamentos fitoterápicos.

Patologia	Medicamentos	Nº de pessoas atendidas	Retorno	Eficácia	
Epigastralgia	Tintura Espinheira Santa	08	06	05	83,3 %
Feridas na pele	Pomada de Calêndula	12	10	09	90,0 %
Tosse/ bronquite	Xarope de Guaco	14	09	08	88,8 %

Tabela 5 - Estudo da prevalência do uso de medicamentos utilizados na unidade do PSF,

Patologia	Medicamentos	Nº de pessoas atendidas	Retorno	Eficácia	
Epigastralgia	Cadrox	08	06	05	83,3 %
Epigastralgia	Cimetidina	05	04	03	75,0 %
Feridas da pele	Dexametazona	06	04	02	50,0 %
Tosse/bronquite	Iodeto de Potássio	09	07	03	42,8 %
Tosse/bronquite	Salbutamol	05	03	02	66,6 %

Tabela 6 - Comparação da eficácia entre medicamentos fitoterápicos e medicamentos alopáticos.

Patologia	Medicamentos Fitoterápicos	Medicamentos Alopáticos
Epigastralgia	83,3 %	75,0 % a 83,3 %
Feridas da pele	90,0 %	50 %
Tosse/bronquite	88,8 %	42,8 % a 66,6 %

Pelo exposto acima, verifica-se que o Xarope de Guaco constitui-se em um dos fitoterápicos de melhor aceitação e prescrição, tendo substituído em 90 % a prescrição de outros xaropes. Em geral é utilizado por crianças e adultos, com excelente tolerabilidade e eficácia.

REHDER et al. (1999), pesquisadores do CPQBA da UNICAMP, visando um controle de qualidade desses Guacos na fitoterapia, procederam análises quantitativas utilizando padrão de cumarina Aldrich, para comparar o teor de cumarina desses vegetais. Os resultados obtidos foram de 1,2 % de cumarina para a *Mikania laevigata* e 0,05 % para a *Mikania glomerata*.

Segundo a coordenadora do Programa Municipal de Fitoterapia de Realva, BANUTH (1996), o custo para a produção do Xarope de Guaco, incluindo os aditivos, embalagem, insumos para o plantio, gastos de manutenção e outros é de aproximadamente R\$ 1,63 para um vidro de 100mL.

SILVA, em trinta de outubro de 1999, coletou dados junto às farmácias comerciais de Ponta Grossa e comparou os preços dos Xaropes de Guaco com os xaropes sintéticos similares, os quais são mostrados nas **Tabelas 7 e 8**.

Tabela 7 – Preços de alguns Xaropes de Guaco.

Nome do xarope	Laboratório Farmacêutico	Preço R\$
Xarope de Guaco	Laboratório Sibrás	6,08
Xarope Expectorante e Sedativo da Tosse de Guaco	Herbarium	7,86
Xarope de Melagrião	Laboratório Catarinense	7,14
Calmatoss	H. L. B.	7,57
Xarope de Guaco	Biofar	6,99
Xarope Expectorante e Sedativo da Tosse de Guaco	Fitomed	8,00

Tabela 8 - Nomes comerciais, nomes químicos e preços de alguns xaropes sintéticos similares ao Xarope de Guaco.

Nome comercial	Nome químico	Preço
Vibral	Dropoprizina	7,05
Zyplo	Levodropropizina	16,80
Mucossolvan	Ambroxol	12,50
-	Iodeto de Potássio	5,45

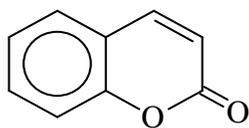
2.8 ESTUDOS FITOQUÍMICOS ANTERIORES DO GÊNERO *Mikania*

Segundo RODRIGUES, ALVARENGA e KATO (1996), mais de 10 % das espécies do gênero *Mikania* Willd foram estudadas sob o ponto de vista químico, destacando-se entre elas a *Mikania glomerata* Sprengel, a mais estudada neste aspecto. Os componentes químicos encontrados, com certa frequência, nas espécies deste gênero são: os terpenóides, as cumarinas, os flavonóides e diversos açúcares. As resinas produzidas com frequência por espécies deste gênero apresentam elevadas concentrações de diterpenos, principalmente os derivados dos esqueletos do caureno, primarano e labdano. Entre os sesquiterpenóides destacam-se os sesquiterpenos lactonas (RODRIGUES et al,1996).

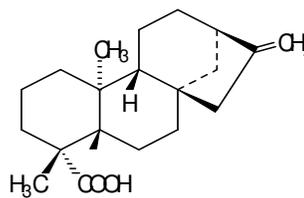
A análise fitoquímica do Cipó-cabeludo oficial da farmacopéia brasileira, *Mikania hirsutissima* DC, foi realizado por LIBERALLI (1932), o qual verificou ser constituída em grande parte por resinas, um princípio amargo, a Guacina, e taninos. FARIAS, et al. (1998),

analisaram por CG e CG/EM, a composição química do óleo essencial desta espécie vegetal, extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e concluíram ser constituído por 23,7 % de espatulenol e 24,8 % de óxido de cariofileno.

LUCAS (1942) em seu trabalho, procedeu uma análise qualitativa das folhas dessecadas de *Mikania glomerata* Sprengel e encontrou cumarina (7), juntamente com outros constituintes químicos, como: resinas, princípios amargos, taninos, matérias gordurosas, açúcares e ácidos orgânicos. Posteriormente, esta espécie foi alvo de estudos fitoquímicos complementares visando a identificação e elucidação estrutural destes compostos, em virtude da sua importância na terapêutica das afecções das vias respiratórias. Sendo assim, OLIVEIRA et al. (1984) e OLIVEIRA et al. (1985) estudaram quimicamente as partes aéreas da *Mikania glomerata* Sprengel e a *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker, isolaram e identificaram os seguintes compostos: cumarina (7) ácido caurenóico (8), ácido cinamoil-grandiflórico (9), estigmasterol (10), além de ésteres alifático. Extraíram 0,09 % de óleo essencial, por hidrodestilação, em aparelho de Clevenger e verificou-se que é constituído por dois componentes majoritários que são o espatulenol e o óxido de cariofileno (FARIAS et al., 1998). Verificaram ainda, que o extrato fluído destes vegetais possuem odor agradável, semelhante ao aroma de baunilha, podendo ser empregado como corretivo de sabor e de odor (OLIVEIRA et al., 1985).

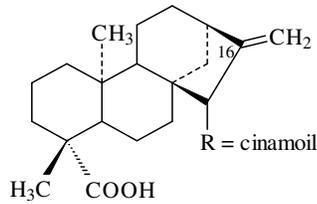


Cumarina (7)

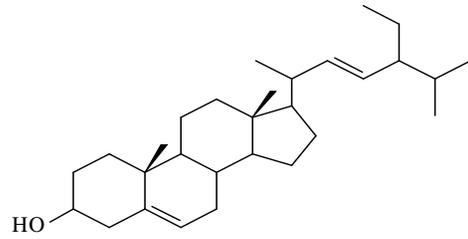


Ácido Ent-caur-16-en-19-óico (8)

Ácido caurenóico

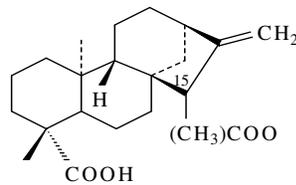


Ácido cinamoil-grandiflórico (**9**)

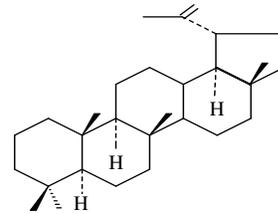


Estigmasterol (**10**)

Posteriormente, SANTOS, TONASSINI, CABRAL (1998) prosseguiram às investigações fitoquímicas com a espécie acima mencionada e conseguiram isolar os compostos anteriormente citados e outros, como: ácido 15 α -isobutiriloxi-caur-16-en-19-oico (**11**) e lupeol (**12**).



15 α -isobutiriloxi-caur-16-en-19-óico (**11**)

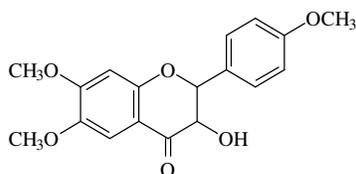


Lupeol (**12**)

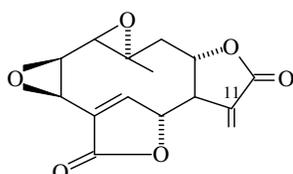
Mikania laevigata Schultz Bip. Ex Baker, conhecida popularmente por Guaco-do-mato (OLIVEIRA, SAITO, GARCIA, 1994), possui composição química similar a *Mikania glomerata* Sprengel, sendo frequentemente comercializada em seu lugar.

WAGNER (1967), isolou da *Mikania cordata* (Burm.f.) B.L. Robinson o flavonóide mikanina (**13**), quimicamente denominado de 3,5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxi flavona. Posteriormente, AGUINALDO, et al. (1995) realizaram novas investigações químicas com essa espécie vegetal, e identificaram oito sesquiterpenos lactônicos do tipo germacranolídeos, os quais foram caracterizados estruturalmente por análises espectroscópicas, como sendo: o mikanolídeo

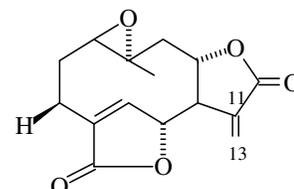
(14) e seus derivados, 11 β H,13-dihidromikanolideo (14a), deoximikanolideo (14b), escandenolideo (14c), 11 β H,13-dihidroescandenolideo (14d), miscandenina (14e).



Mikanina (13)

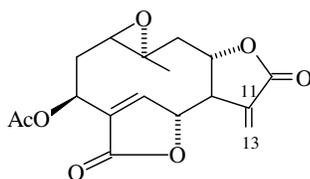


Mikanolideo (14)

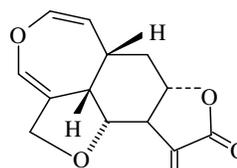


Deoximikanolideo (14b)

11 β H, 13-dihidromikanolideo (14a)



Escandenolideo (14c)



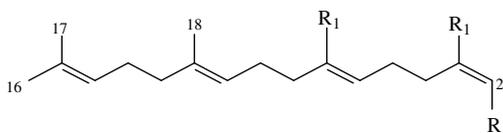
Miscandenina (14e)

11 β H,13 - dihidroescandenolideo (14d)

A *Mikania oblongifolia* foi investigada quimicamente pela equipe de VICHNEWSKI, et al. (1977) e isolaram um diterpeno, que foi identificado por meio de técnicas espectroscópicas de UV, IR, RMN 13 C, RMN 1 H, como sendo o ácido cinamoilgrandiflorico (9, ver estrutura p. 25).

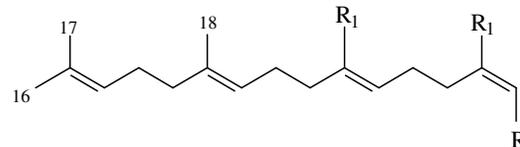
Estudos fitoquímicos realizados por BOHLMANN, et al. (1981) com as partes aéreas e as raízes de *Mikania officinalis* Mart, *Mikania sessilifolia* DC, *Mikania luetzelburgii* Mattf. e *Mikania belemii* K. et R. encontraram os seguintes constituintes químicos, comuns as espécies mencionadas: germacreno D, humuleno, geranilnerol (15) e seus derivados: 19,20-dihidroxi-16-oxo-geranilnerol (15a), geranilneral (15b), 4-hidroxigeranilgeranial (15c) e diterpenos de núcleo

ent-caureno, como o ác. caurenóico (**8**, ver estrutura p. 24), ent-caur-16-en-19-al (**16a**), ent-caur-16-en-19-ol (**16b**).



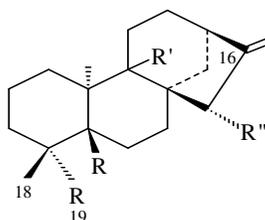
R = CH₂OH

Geranylnerol (**15a**)



R = CHO R₁ = CH₂OH

19,20-Dihidroxi-16-oxo-geranylnerol (**15b**)



Diterpeno ent-caur-16-en-19-R (**16**)

R = CHO R' = H R'' = H

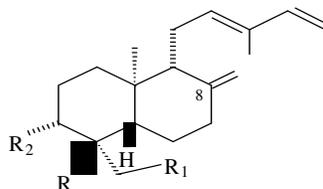
Ent-caur-16-en-19-al (**16a**)

R = CH₂OH R' = H R'' = H

Ent-caur-16-en-19-ol (**16b**)

BOHLMANN, et al. (1982), ao investigarem as partes aéreas de *Mikania alvimii*, isolaram e elucidaram estruturalmente por espectroscopia os derivados diterpênicos de núcleo ent-labdano do ácido ozico (**17a**), entre os quais encontram-se o ent-3 β ,19-dihidroxiabda-12,14-dieno (**17b**), ácido pimaradiênico (**18**) e o 15-nor diterpeno. Em outras espécies, incluindo *Mikania goyazensis*, *Mikania pohlii* Baker, *Mikania grazielae* K. et R., BOHLMANN, et al. (1982) e BOHLMANN, et al. (1982) isolaram os mikanolideo (**14**, ver estrutura p. 26), estigmasterol (**10**, ver estrutura p. 25), germacreno D, α -humuleno, geranylgeraniol e derivados (**15**, ver estrutura p. 27) citados anteriormente, com outros constituintes, como:

eudesmanolídeos, germacranolídeos diméricos, sitosterol (**19**), ácido oleanóico (**20**) lup - 12 - en - 3 β - ol e ácido linoleico (**21**). Em *Mikania cynanchifolia* (BOHLMANN, et al., 1984) e *Mikania periplocifolia* (GUTIERREZ et al., 1985) estudos fitoquímicos demonstraram que foi encontrado os sesquiterpenos lactônicos: mikanolídeo e seus derivados (**14**, ver estrutura p. 26).

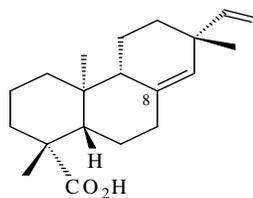


R = CO₂H R₁ = H R₂ = H

R = CH₃ R₁ = OH R₂ = OH

Ác. Ent-labdano ozico (**17a**)

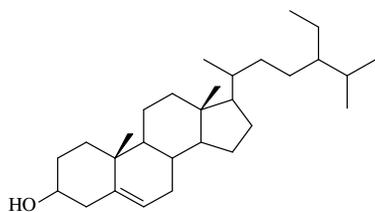
Ent-3 β ,19-dihidroxiabda-12,14-dieno (**17b**)



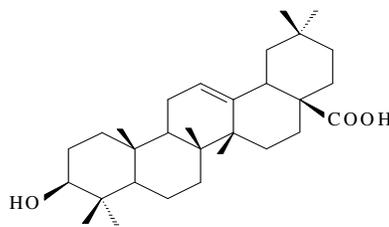
Ác. pimaradiênico (**18**)



Ác. Linoleico (**21**)



Sitosterol (**19**)

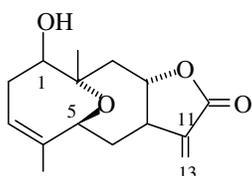
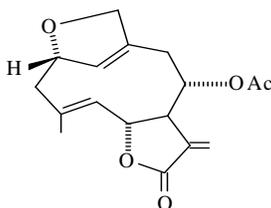
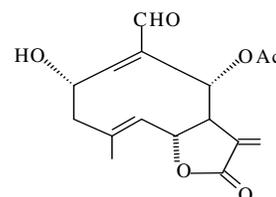
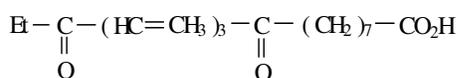
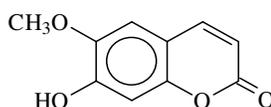
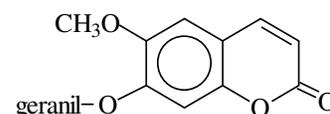
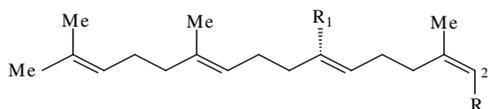
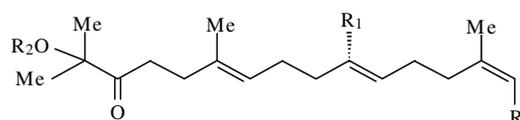


Ác. Oleanóico (**20**)

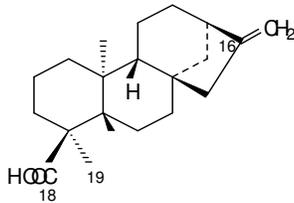
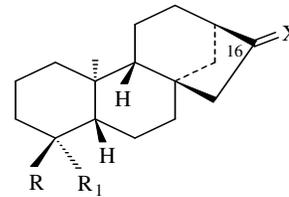
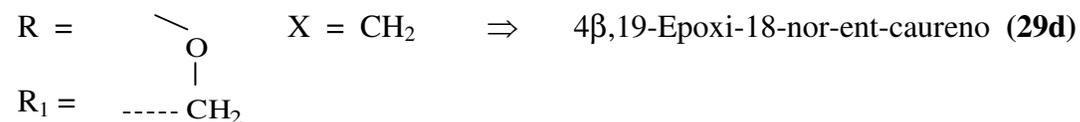
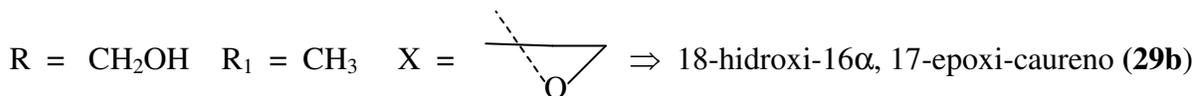
Nas investigações químicas realizadas por BOHLMANN, et al. (1982) com duas espécies de *Mikania*, encontraram nas raízes de *Mikania purpuranscens* um derivado do timol, que foi elucidado por espectroscopia de RMN ¹H e identificado como sendo, 9-Acetoxi-2-metoxi-8,10-

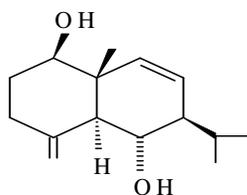
epoxitímol tiglato, e nas suas partes aéreas, identificou por IR e RMN ^1H um sesquiterpeno lactônico altamente oxigenado: 5,10-epoxigermacranolideo, que recebeu a denominação de purpurascenolideo (**22**). Em *Mikania arrojadoi*, os resultados da investigação permitiram concluir que esta espécie possui o ácido caurenóico (**8**, ver estrutura p. 24) e derivados.

Mikania congesta DC, conhecida vulgarmente por Guaco-branco, Guaco-mato ou simplesmente Guaco, foi estudada quimicamente pelos por HERTZ & KULANTHAIVEL (1985) que isolaram das partes aéreas desta espécie vegetal os seguintes sesquiterpenos lactônicos: dioxielefantopina (**23**) e melampolideo (**24**), ácido 9,16 dioxo octadece-10,12,14-trienóico (**25**), escopoletina (**26**), O-geranil-escopoletina (**27**) e geranilnerol (**15**, ver estrutura p. 27) e derivados (**15d,e,f,g**).

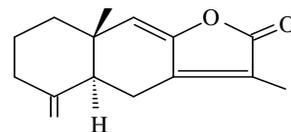
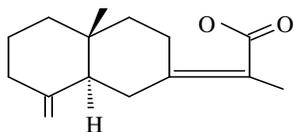
Purpurascenolideo (**22**)Dioxielefantopina (**23**)Melampolideo (**24**)Ácido graxo (**25**)Escopoletina (**26**)O-geranil-escopoletina (**27**)R = CH₂OH e R₁ = CO₂H (**15d**)R = CH₂OH e R₁ = CO₂Me (**15e**)R e R₁ = CH₂OH R₂ = H (**15f**)R e R₁ = CH₂Oac R₂ = H (**15g**)

CASTRO & JAKUPOVIC (1985), isolaram e elucidaram a estrutura química de quatro novos diterpenos de núcleo caureno e nor-caurano das partes aérea de *Mikania banisteriae* DC, que são: ácido ent-caur-16-en-18-óico (**28**), 18-acetoxi-ent-caur-16-eno (**29a**), 18-hidroxi-16 α , 17-epoxi-caureno (**29b**), ent-caur-16-en-18-al (**29c**), 4 β ,19-epoxi-18-nor-ent-caurano (**29d**). Recentemente, esta espécie botânica foi alvo de novas investigações químicas e biológicas pelos pesquisadores LOBITZ, CASTILLO, MERFORT (1997). Com esse trabalho, veio a confirmação da presença do ácido ent-caur-16-en-18-óico (**28**) e outros derivados diterpênicos ent-caurenos, tais como: ent-caur-16-en-18-ol, 18,19-diacetoxi - ent - caur - 16 - ene, ácido 17-oxo-ent-caur-1.5(16)-en-18-óico e também o sesquiterpeno eudesmano, 1 β ,6 α -dihidroxi-eudesma- 4(15),7(11) eno (**30**) e os sesquiterpenos lactônicos do tipo eudesmanolideos: eudesma-4(15),7(11)-dien-8 β ,12-olideo (**31**), eudesma - 4(15),7(11),8(9)- trien-12-olideo (**32**) .

Ácido ent-caur-16-en-18-óico (**28**)Diterpeno ent-caur-16-en-18-R (**29**)

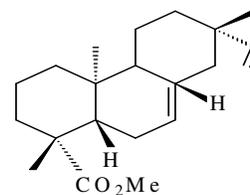
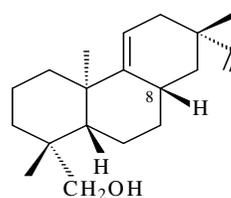
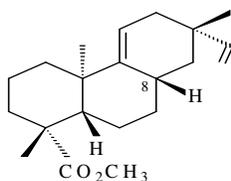
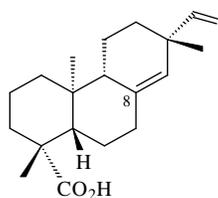


1 β ,6 α -dihidroxieudesma-4(15),7(11) eno (**30**)

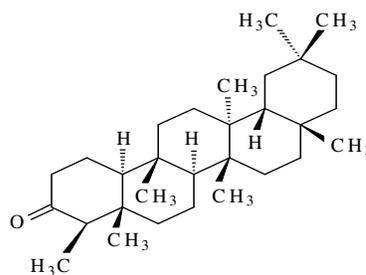


.Eudesma-4(15),7(11)-dien-8 β ,12-olideo (**31**) Eudesma - 4(15),7(11),8(9)-trien-12-olideo (**32**) .

KNUDSEN, et al. (1986) encontraram no extrato hexânico das partes aéreas de *Mikania triangularis*, compostos como o diterpenos pimaradienos (**33a,b,c,d**), friedelina (**34**) e estigmasterol (**10**, ver estrutura p. 25). Prosseguindo os estudos químicos com desta espécie vegetal, ROQUE, et al. (1988) confirmaram a presença dos constituintes isolados anteriormente.



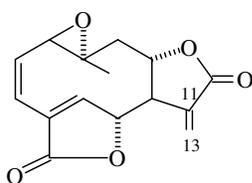
Diterpenos pimaradienos (**33 a, 33b, 33c, 33d**)



Friedelina (**34**)

Nos estudos químicos realizados por FERRO, VILEGAS e ROQUE (1986) com várias espécies de *Mikantias*, foram isolados da *Mikania microlepis*, o ácido caurenóico (**8**, ver estrutura p. 24), da *Mikania hookeriana* um diterpeno de esqueleto caureno, da *Mikania hoehnei* o lupeol (**12**, ver estrutura p. 25) e estigmasterol (**10**, ver estrutura p. 25), e da *Mikania diversifolia* o lupeol (**12**), estigmasterol (**10**) e friedelina (**34**, ver estrutura p. 31). ROQUE et al. (1988) reestudando a espécie *Mikania microlepis* Baker, conhecida como guaco piloso ou guaco-da-praia, isolaram e identificaram o ácido caurenóico, como o principal constituinte químico presente na referida espécie.

GUTIERREZ et al. (1988) ao pesquisarem quimicamente a *Mikania urticifolia* Hook, relatam em seu trabalho que os constituintes químicos isolados desta espécie vegetal foram os mikanolideos e um novo derivado, o anidroescandenolídeo (**14f**), derivados do geranilgeraniol e miscandenina (**14e**, ver estrutura p. 31), todos quimicamente semelhantes aos das espécies relatadas anteriormente.



Anidroescandenolídeo (**14f**),

As investigações fitoquímicas realizadas pelos pesquisadores CUENCA, BARDON, CATALAN (1988) com as espécies *Mikania micrantha* e *Mikania scandens* permitiram concluir que os componentes químicos presentes nestas espécies, são análogos aos de outras espécies de

*Mikania*s citadas anteriormente, tais como o mikanolídeo, dihidromikanolídeo, deoximikanolídeo escandenolídeo, dihidroscandenolídeo (**14,14a,14b,14c,14d**), miscandenina (**14e, ver estrutura p. 26**) e melanfolídeos (**24, ver estrutura p. 29**).

Estudos análogos aos anteriores foram realizados com a *Mikania diversifolia* por ROQUE et al (1988), os quais revelaram a presença de ácido caurenóico (**8, ver estrutura p. 24**), friedelina (**34, ver estrutura p. 31**), lupeol (**12**) e estigmasterol (**10, ver estruturas p. 25**), isolados em outras espécies de *Mikania*s estudadas anteriormente.

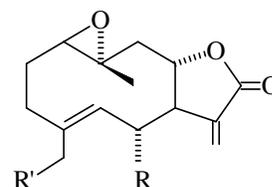
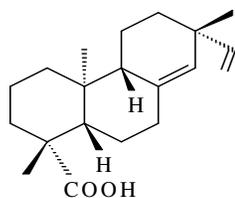
Outras duas espécies de *Mikania*s foram analisadas quimicamente por CASTRO, JAKUPOVIC, BOHLMANN (1989). Das partes aéreas de *Mikania holwayana*, foram isolados 6 sesquiterpenos lactônicos do tipo germacranolídeo e da *Mikania cordifolia* Willd os melampolídeos (**24, ver estrutura p. 29**).

FERRO & ALMEIDA (1991) isolaram do extrato hexânico de *Mikania smilacina* DC, conhecida popularmente por Guaco-de-sete-sangrias, o ác. caurenóico (**8, ver estrutura p. 24**), ác. pimara-8(14),15-dien-19-óico (**33e**) e cumarina (**7, ver estrutura p. 24**). Foi também extraído um óleo essencial, constituído por aproximadamente 67 componentes químicos voláteis, sendo o limoneno, identificado como o componente presente em maior concentração.

CUENCA et al.(1993) tendo por objetivo, analisar por raio-X os monocristais de sesquiterpenos lactônicos, presentes no extrato clorofórmico das partes aéreas de *Mikania minima* (Bak.) Robins, também isolaram um flavonóide, a eupatorina (5,3'-dihidroxi-6,7-4'-trimetoxiflavona).

Das partes aéreas de *Mikania ypacarayensis* Holmes and McDaniel em época de florescência, ZAMORANO et. al. (1994), seguindo a técnica realizada em outros pesquisas nas

quais utilizaram diferentes espécies de *Mikánias*, isolaram o mikanolídeo e seus derivados (**14**) já mencionados anteriormente, miscandenina (**14e**, ver estruturas p. 26), éster metil lactônico, monolactonas (**35**, **35a**) já isolado em *Mikania duseñii* e os sesquiterpenos dilactônicas: 3-dehidroximikaperiplocólídeo e 3.-acetoximikaperiplocólídeo .



Ác. pimara-8 (14),15-dien-19-óico (**33e**)

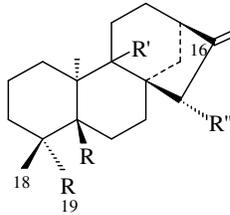
R = H e R' = Oac R = OH e R' = Oac

Monolactonas (**35**, **35a**)

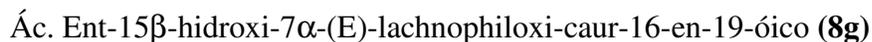
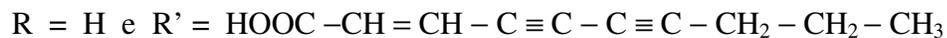
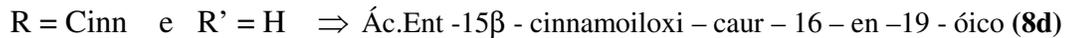
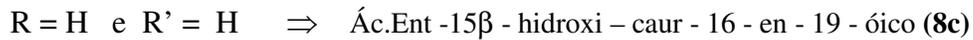
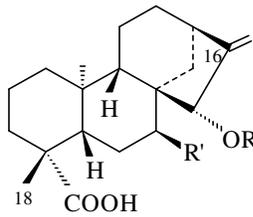
Mikania malacolepsis Robinson, conhecida popularmente por Cipó-alméga, Guaco-alméga ou Guaco-alméga-piloso, foi estudada quimicamente por, RODRIGUES, ALVARENGA e KATO (1996), os quais isolaram e identificaram os seguintes constituintes químicos: friedelina (**34**, ver estrutura p. 31) e ác. caurenóico (**8**, ver estrutura p. 24). As espécies vegetais, *Mikania malacolepsis* Robinson e *Mikania microlepis* Baker, em virtude de suas semelhanças botânicas, são muitas vezes empregadas para fraudar a *Mikania hirsutissima* DC, o Cipó-cabeludo oficial da Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1929).

Estudos químicos foram realizados recentemente por LOBITZ et al. (1998), com as partes aéreas de *Mikania vitifolia*. Os seus constituintes químicos foram isolados e suas estruturas químicas elucidadas por análises espectroscópicas, e assim foram identificados como diterpenos ent-caurenos, tais como o ác. ent-caur-16-en-19-óico (**8**, ver estrutura p. 24), ent-caur-16-en-19-

ol (**8b**), ác. ent -15 β -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**8c**), ác. ent-15 β -cinnamoiloxi-caur-16-en-19-óico (**8d**), ác. ent-7 α -cinnamoiloxi-15 β -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**8e**), ác. ent-15 β -cinnamoiloxi-7 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**8f**) e ác. ent-15 β -hidroxi-7 α -(E)-lachnophiloiloxi-caur-16-en-19-ico (**8g**).



Ent-caur-16-en-19-ol (**8b**)

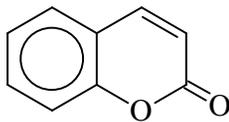


2.9. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Mikania*

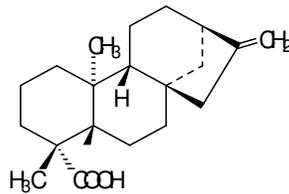
A grande importância desse gênero relaciona-se com a sua utilização como planta medicinal na medicina popular e como matéria-prima para a produção de fitoterápicos. Algumas espécies citadas anteriormente estão descritas na literatura, apresentando as seguintes atividades biológicas.

OLIVEIRA et.al. (1985) demonstraram que os extratos de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker possuem atividade antiedematogênica.

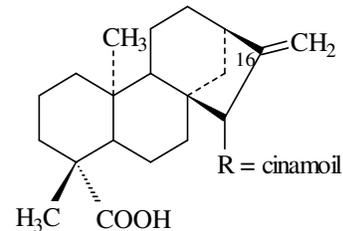
DAVINO, GIESBRECHT, ROQUE (1989), investigando a atividade antimicrobiana e antifúngica do ácido caurenóico (8), ácido cinamoilgrandiflórico (9) e dos derivados substituídos no carbono-15, presentes nas partes aéreas de *Mikania laevigata*, concluiu que esses diterpenos apresentam moderada atividade inibitória contra bactérias gram positivas. Devido a importância do Guaco oficial, na medicina popular e como fitoterápico, recentemente este tem sido alvo de novas investigações fitoquímicas e farmacológicas.



Cumarina (7)



Ácido caurenóico (8)



Ácido cinamoilgrandiflórico (9)

LEITE e cols. (1993) em seus ensaios farmacológicos “in vivo”, empregando o modelo edema de pata produzido pela carragenina em ratos e “in vitro”, e usando jejuno de rato, íleo de

cobaia e traquéia de rato, testou os extratos hidroalcoólico das folhas, partes aéreas e cascas de *Mikania glomerata*. Os resultados foram comprobatórios das atividades espasmolítica, antiinflamatória e broncodilatadora. Posteriormente, CELEGHINI, LANÇAS e VILEGAS (1996), verificaram que o extrato hidroalcoólico do guaco exerce atividade antiinflamatória e broncodilatadora, sendo a cumarina (**7, ver estrutura p. 36**), o principal responsável por tais atividades. A presença de cumarina pode explicar, ao menos em parte, seu uso como antiofídico (ALONSO, 1998). Em virtude da importância farmacológica dessa espécie vegetal, [SANTOS, TOMASSINI, CABRAL (1998)], prosseguiram as investigações microbiológicas e obtiveram excelentes resultados testando o extrato clorofórmico da *Mikania glomerata*, com o microorganismo gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* - 29336), utilizando a técnica da difusão em ágar. Porém, não pode ser observado efeito significativo na atividade antimicrobiana dos extratos hexânico, clorofórmico, etanólico e de (ATCC acetato de etila contra os microorganismos *Staphylococcus epidermidis* (ATCC-12228) e *Escherichia coli* (ATCC-29336).

Estudos neurofarmacológicos foram realizados com o extrato das raízes de *Mikania cordata* (Burm) B.L. Robinson, por BHATTACHARYA (1988) permitindo concluir que produzem alterações no comportamento, como redução da motilidade espontânea, prolonga o tempo de sono e diminuição da agressividade. Portanto, apresenta uma potente atividade depressora do Sistema Nervoso Central. Posteriormente, BISHAYEE & CHATTERJEE (1994), realizaram novas investigações farmacológicas com essa espécie vegetal e concluíram que o extrato das raízes de *Mikania cordata* possuem potente atividade antiulcerogênica.

O escandenolídeo (**14c, ver estrutura p. 39**), sesquiterpeno lactona presente em *Mikania cordata* e em outras espécies de *Mikania*, exerce atividade antiinflamatória por inibir a produção

do mediador inflamatório leucotrieno, e ativando a síntese do fator plaquetário em leucócitos (YSRAEL & CROFT, 1990).

ESQUICI e cols. (1989) demonstraram nos testes antimicrobianos, utilizando o método da difusão em ágar, que os extratos alcoólicos e aquosos de *Mikania hirsutissima* DC, apresentam moderada atividade contra o *Staphylococcus aureus*.

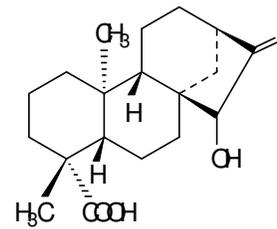
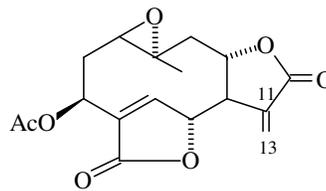
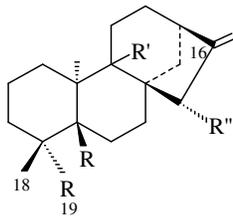
Os diterpenos isolados das raízes de *Melantheria albinervia*, por SLIMESTAD et al. (1995), foram identificados por técnicas espectroscópicas, como sendo ácido ent-caur-16-en-19-óico (**8**) e ácido 9(11),16-caurendien-19-óico, os quais demonstraram atividade larvicida, nos testes “in vitro”, contra o mosquito em estágio larval *Aedes aegypti*, agente causador da febre amarela.

PAGE et al. (1992) em seus trabalhos, relatam a atividade antimicrobiana e anti-hepatotóxica para o ácido caurenóico (**8**, ver estrutura p. 36). Os ensaios foram realizados “in vitro” usando úteros de cobaias fêmeas adulta estroginizadas e confirmando a atividade potente que os ácidos: caurenóico (**8**, ver estrutura na p. 36) e grandiflórico (**36**) apresentam em estimular a contração uterina e agindo inclusive como abortivo.

Outro diterpeno, o caurenol (**8b**), exerce efeito farmacológico sobre a função reprodutora das fêmeas, estimulando a produção de progesterona (PAGE et al., 1992).

Segundo ALVES et al. (1994) o diterpeno: ácido ent-caur-16-en-óico (**8**), presente no extrato etanólico das partes aéreas de *Mikania obtusata* DC, demonstrou atividade tripanosomicida, reduzindo em 39 % o número de formas larvárias tripomastigotas encontradas no sangue das pessoas infectadas com o protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Os demais diterpenos, ácido cinamoilgrandiflórico (**9**, ver

estrutura p. 29) e o ácido grandiflórico (**36**), também presentes neste extrato, não apresentaram esta atividade. Recentemente, BATISTA, CHIARI e OLIVEIRA (1999), confirmam a atividade tripanosomicida do ácido caurenóico (**8**, ver **estrutura p. 36**), utilizando nos ensaios o extrato etanólico das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC, possuidora de elevado teor de diterpenos de núcleo ent-caureno.

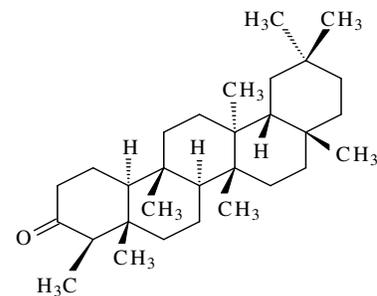
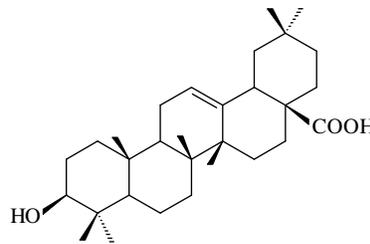
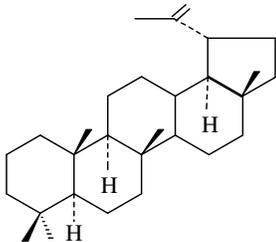


R = CH₂OH R' = H R'' = H Caurenol (**8b**)

Escandanolídeo (**14c**)

Ác. Grandiflórico (**36**)

Segundo, SAFAYHI & SAILER (1997), os triterpenos pentacíclicos: lupeol (**12**), ácido oleanóico (**20**) e friedelina (**34**), apresentam atividade antiinflamatória.



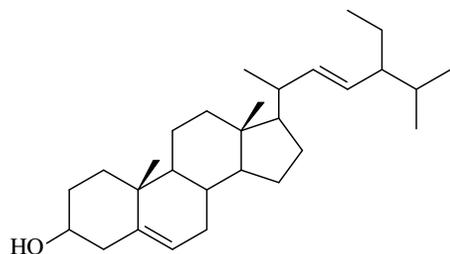
Lupeol (**12**)

Ác. Oleanóico (**20**)

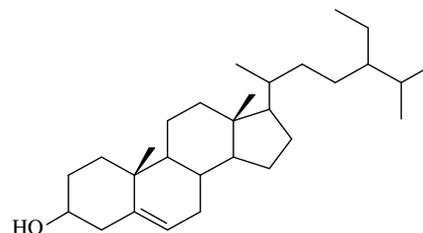
Friedelina (**34**)

Os esteróides como o estigmasterol (**10**) e sitosterol (**19**), compostos de grande importância médica são usados no tratamento de muitas enfermidades, apresentando propriedades

analgésicas (OLIVEIRA & BUENO, 1996; BLOCK et al., 1998; BATISTA, CHIARI, OLIVEIRA, 1999), antiinflamatórias e anticoncepcionais (OLIVEIRA & BUENO, 1996).



Estigmasterol (10)



Sitosterol (19)

LOBITZ et al. (1997) procederam novas investigações biológicas com a espécie *Mikania banisteriae*, e confirmaram os resultados anteriormente citados com relação a atividade antimicrobiana e anti-fúngica apresentada pelo ácido caurenóico (8, ver estrutura p. 36).

GUTIERREZ (1998), isolou do extrato das folhas de *Espeletia barclayana* o ácido caurenóico e o ácido grandiflórico e posteriormente demonstrou o potencial antimicrobiano dos mesmos, através do método da difusão em ágar. O ácido caurenóico (8), apresentou atividade contra o *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae* enquanto que o ácido grandiflórico (36) inibiu o crescimento apenas do *Bacillus subtilis*. Estes constituintes químicos apresentaram também atividade anti-fúngica, inibindo o crescimento de *Candida albicans*.

2.10 DITERPENOS: ÁCIDO CAURENÓICO E GIBERELINAS

Os diterpenos compreendem um grande número de compostos que apresentam 20 átomos de carbono (C₂₀), não são voláteis e são derivados do pirofosfato de geranylgeraniol (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os diterpenóides têm vasta gama de atividades biológicas diferentes e incluem alguns compostos de considerável interesse fisiológico, tais como o grupo dos hormônios vegetais, as giberelinas. A mais conhecida destas é a giberelina A₃, também denominada de ácido giberélico (ROBINSON, 1980).

Os cauranos é uma classe de diterpenos os quais contém um rígido esqueleto tetracíclico. A maioria dos derivados cauranos encontrados na natureza ocorrem por simples oxidação ou epoxidação e reações de hidrólise do (-) – caur – 16 – ene, o hidrocarboneto precursor biossintético. O caureno é também um intermediário na biossíntese de um bom número de metabólitos de plantas e fungos, incluindo as giberelinas (GA), o hormônio de crescimento vegetal (DEWICK, 1997; GHISALBERTI, 1997).

Os cauranos são muito difundidos no reino vegetal, pois são precursores biossintéticos das Giberelinas (GA), como é demonstrado na **figura 4** (GHISALBERTI, 1997).

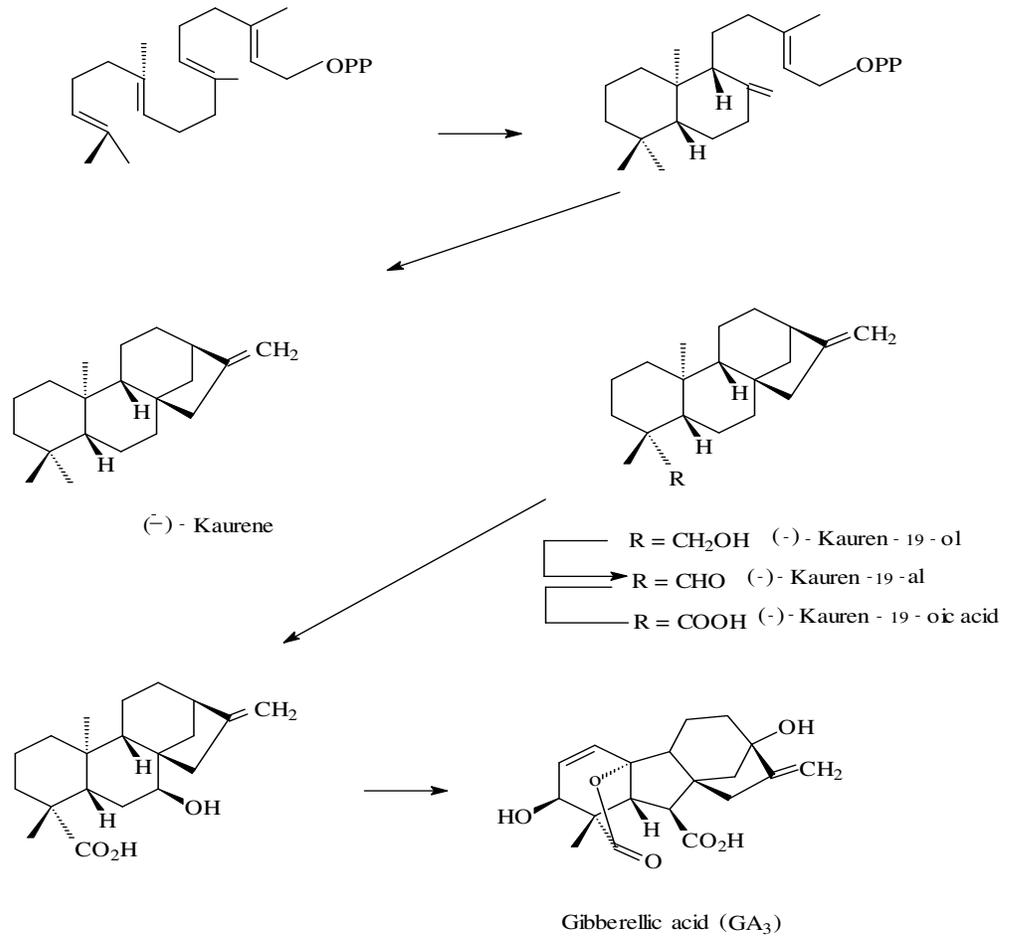


Figura 4 – Caurenos como intermediários na biosíntese do Ácido Giberélico.

O crescimento e o desenvolvimento das plantas estão regulados por certo número de substâncias químicas que em conjunto, exercem uma completa interação para suprir as necessidades da planta. Estas substâncias foram denominadas de hormônios vegetais ou fitohormônios, que são: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e o etileno (SOARES, 1997).

As auxinas e giberelinas e citocininas estimulam o crescimento das plantas.

As giberelinas estão presentes em toda a planta, podendo ser detectadas em folhas, caules, raízes, sementes, embriões e pólen. Parecem ser sintetizadas nas mesmas regiões das plantas onde são sintetizadas as auxinas, isto é, ápice do caule, folhas em crescimento, sementes e embriões em desenvolvimento, embora não necessariamente ao mesmo tempo e nas mesmas taxas (FERRI, 1979).

As mais importantes propriedades fisiológicas das giberelinas são: exercerem particularmente um papel importante nos fenômenos de floração (FERRI, 1979; SOARES, 1997), promoverem o alongamento celular (Princípios Ativos, 2001) e assim, determinando o alongamento caulinar e foliar das plantas (DEWICK, 1997; AMABIS & MARTHO, 1985). Altos níveis de giberelinas são encontrados em plantas trepadeiras (FERRI, 1979).

Embora o mecanismo de ação das giberelinas seja ainda desconhecido, sabe-se que este grupo de hormônios, estimulam a produção de auxinas nas gemas apicais caulinares (AMABIS & MARTHO, 1985), cujo mecanismo de ação já está bem elucidado.

As auxinas são produzidas pelas células meristemáticas (tecido de crescimento), junto à extremidade dos caules e raízes, estimulando a velocidade das mitoses (multiplicação celular) e o alongamento das células. Assim, sob o estímulo desses fitohormônios, as células dividem-se mais rapidamente e distendem-se (esticam-se) determinando o aumento longitudinal da planta (SOARES, 1997).

Os efeitos das giberelinas e auxinas são complementares, requerendo-se ambos os hormônios para a estimulação total do alongamento celular, de forma que cada um requer a presença do outro (Princípios Ativos, 2001).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 EQUIPAMENTOS

Os extratos foram concentrados em rotavapor BÜCH RE-120 e acoplado a um banho-maria IKA - HEIZBAD HB - 250 com controle de temperatura.

Os extratos, frações e os compostos foram pesados em balança analítica SHIMADZU LIBROR AEG – 220 e SHIMADZU LIBROR EB –330 D.

O ponto de fusão do composto isolado foi determinado em aparelho da SHIMADZU DSC-50.

Os espectros de massas foram realizados em um aparelho da SHIMADZU CG/MS – QP 2000A sobre impacto de feixe eletrônico a 70 eV, utilizando-se a técnica de inserção direta (PROB) para compostos puros ou acoplados a cromatografia gasosa (CG) nos casos de misturas de compostos.

3.1.2 REAGENTES

Os solventes utilizados no processo de extração, partição líquido - líquido, fracionamento e purificação dos compostos, são de pureza analítica da Merck e Reagen.

3.1.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.1.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

As colunas cromatográficas (CC) foram escolhidas de acordo com a quantidade de material a ser cromatografado e preenchidas com sílica-gel 60 de granulometria 70 – 230 mesh ($\varnothing = 0,063 - 0,20$ mm), da Merck, como fase estacionária.

3.1.3.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica-gel 60 GF₂₅₄, de 0,2 mm de espessura e preparadas sobre folhas de alumínio, de procedência Merck.

Para a visualização da fluorescência dos compostos nas CCDs, as placas foram reveladas sob luz ultravioleta Minerallight 254 e 365 nm. Posteriormente, as cromatoplasmas foram nebulizadas com reveladores químicos específicos para cada grupo químico de princípio ativo, por meio de um pulverizador manual, quando necessário, foram aquecidas à temperatura de 110°C, em estufa FANEM para secagem e esterilização, modelo 315 SE.

Os reveladores químicos empregados nos procedimentos cromatográficos em camada delgada foram: solução de anisaldeído sulfúrico para detectar terpenos e esteróides, solução de cloreto férrico a 3 % em etanol para detectar flavonóides e solução etanólica de KOH a 10 % para detectar cumarinas.

3.1.3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

As análises cromatográficas gasosas foram realizadas em aparelho SHIMADZU, modelo 14A, com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida, LM -1, com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e H₂ como gás de arraste, nas condições específicas para cada experimento.

3.1.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

3.1.4.1 INFRAVERMELHO (IV)

Para a obtenção dos espectros na região de absorção do Infravermelho (IV) utilizou-se um espectrômetro FT PERKIN ELMER 16PC, com pastilhas de KBr. Os valores foram registrados em centímetros recíprocos (cm⁻¹).

3.1.4.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C) foram obtidos em aparelho BRUCKER AC 200 ou espectrômetro VARIAN XL 300, utilizando-se solventes deuterados. Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm), tendo como referência interna o TMS –

tetrametilsilano. As multiplicidades dos sinais são indicadas como segue: s = singleto, d = duplete, t = tripleto e m = multiplete.

3.1.4.3 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

3.1.4.3.1 Composto P3AC isolado do precipitado

IV ν_{\max} . cm^{-1} - 3440, 3068, 2926, 2846, 1692, 1468, 870.

CG/MS [70 eV, m/e (%)]: 302 (13) [M^+] e os demais fragmentos: 287 (12), 259 (18), 257 (8), 243 (20), 241 (18), 213 (15), 201(5), 187 (9), 185 (6), 159 (10), 147 (15), 131 (51), 123 (20), 121 (29), 119 (30), 109 (28), 107 (35), 105 (50), 95 (28) 93 (50), 81 (44), 91 (75), 79 (58), 69 (20), 67 (46), 55 (70), 45 (9), 43 (51), 41 (100).

RMN ^1H (200 MHz CDCl_3) δ (mult., J, H): 1,0 - 2,5 ppm (m.,) 4,76 ppm (d, J = 11,44, H - 17 e 18)

RMN ^{13}C (200 MHz CDCl_3) - δ 15,58 ppm (CH_3), δ 18,43 ppm (CH_2), δ 19,09 ppm (CH_2), δ 21,82 ppm (CH_2), δ 28, 96 ppm (CH_3), δ 33,01 ppm (CH_2), δ 37,77 ppm (CH_2), δ 39,68 ppm (CH_2), δ 40,69 ppm (CH_2), δ 41,27 ppm (CH), δ 43,82 ppm (C), δ 44,22 ppm (CH_2), δ 48,9 ppm (CH_2), δ 103,00 ppm (CH_2), δ 155,9 ppm (C) e δ 184,58 ppm (C).

3.1.4.3.2 Mistura de compostos P4ETP (ETP1 e ETP2) isolados do precipitado

IV ν_{\max} . cm^{-1} – 3442, 2866, 1638, 1464, 1378, 1055.

CG - ETP1 com 28,7 min e **ETP2** com 29,23 min.

CG / MS - ETP1 [70 eV, m/e (%)], m/e 412 (47) [M^+], 55 (100), 394 (12), 379 (7,7), 351 (22), 97 (21), 83 (56), 69 (49), 57 (22).

CG/MS -ETP2 - [70 eV, m/e (%)], m/e 41 (25) [M⁺], 55 (100), 396 (18,6), 381 (12), 329 (23), 303 (16), 213 (26), 163 (28), 159 (25), 145(38), 133 (28), 107 (49), 95 (52), 81 (66), 69 (59), 57 (91,2).

RMN ¹H mistura ETP1 e ETP2 (300 MHz, CDCl₃) δ (mult., J, H): 0,68 (s, H – 18 ETP1), 0,69 (s, H – 18 ETP2), 0,92 (d, H = 6,5, H – 21 ETP1 e ETP2), 1,01 (s, H – 19 ETP1 + ETP2), 3,47 – 3,58 (m, H – 3 ETP1 e ETP2), 4,9 – 5,02 (m), 5,11 – 5,19 (m, H – 22 e 23 do ETP1), 5,35 (d, H = 5,22, H – 6 do ETP1 e ETP2).

RMN ¹³C/DEPT (300 MHz -CDCl₃) – ETP1: δ11, 99 (CH₃), δ 12,24 (CH₃), δ 18,79 (CH₃), δ 18, 99 (CH₃), δ 19,40 (CH₃), δ 21,10 (CH₂), δ 21,22 (CH₃), δ 24,37 (CH₂), δ 25,40 (CH₂), δ 28,91 (CH₂), δ 31,69 (CH₂), δ 31,88 (CH₂), δ 31,88 (CH), δ 31,93 (CH), δ 36,53 (C), δ 37,28 (CH₂), δ 39,71 (CH₂), δ 40,47 (CH), δ 42,23 (C), δ 42,33 (CH₂), δ 50,18, δ 51,25 (CH), δ (CH), δ 55,99 (CH), δ 56,88 (CH), δ 71,81 (CH), δ 121,69 (CH), δ 129,31 (CH₂), δ 138,30 (CH₂), δ 140,75 (C).

RMN ¹³C/DEPT (300 MHz -CDCl₃) – ETP2: δ 11,99 (CH₃), δ 12,03 (CH₃), δ 18,79 (CH₃), δ 19,40 (CH₃), δ 19,81 (CH₃), δ 21,10 (CH₂), δ 21,22 (CH₃), δ 23,11 (CH₂), δ 24,31 (CH₂), δ 26,15 (CH), δ 28,25 (CH₂), δ 31,69 (CH₂), δ 31,88 (CH₂), δ 31,88 (CH), δ 31,93 (CH), δ 33,97 (CH), δ 36,16 (CH), δ 36,53 (C), δ 37,28 (CH₂), δ 39,80 (CH₂), δ 42,23 (C), δ 42,33 (CH₂), δ 45,88 (CH), δ 50,18 (CH), δ 56,09 (CH), δ 56,790 (CH), δ 71,81 (CH), δ 121,69 (CH), δ 140,75 (C).

3.1.4.3.3 Mistura de compostos P4 AGP isolados do precipitado.

IV v_{max}. cm⁻¹ – 3328, 2920, 2850, 1704, 728.

CG / MS da mistura [70 eV – R.T. min]: P₄ GP – A (11,73), P₄ GP – B (15,13), P₄ GP – C (16,53), P₄ GP – D (19,03), P₄ GP – E (20,70), P₄ GP – F (22,30), P₄ GP – G (22,76), P₄ GP – H (25,86), P₄ GP – I (28,60), P₄ GP – J (34,93).

CG/MS - P₄ GP – E [70 eV, m/e (%)]: m/e 256 (5,3)[M⁺], 199 (3,2), 185 (5,3), 171 (5,3), 157 (6,4), 143 (4,3), 129 (23,6), 115 (10,7), 101 (16), 83 (17), 73 (100), 60 (97), 57 (89), 55 (74).

3.1.4.3.4 Composto SGHD isolado das Frações Hexânica e Diclorometano

IV v_{max}. cm⁻¹ – 3422, 2960, 2868, 1636, 1072, 1024.

CG / MS [70 eV, m/e (%)]: 397 (17,4) [M⁺] e os demais fragmentos 396 (29,3), 395 (14), 255 (13), 161 (14), 159 (15), 147 (21), 145 (24), 121 (20), 107 (23), 105 (26), 97 (31), 95 (41), 93 (28), 91 (28), 83 (72), 81 (61), 69 (77), 55 (100), 57 (98).

3. 2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A *Mikania lanuginosa* DC foi coletada no mês de setembro de 1998, na Vila Estrela, bairro de Ponta Grossa, estado do Paraná. A cidade de Ponta Grossa situa-se a 975 m de altitude e apresenta as seguintes coordenadas geodésicas: Latitude - 25° 05'38" S e Longitude - 50° 09'30" Oc. Estes dados foram obtidos com o Professor Perci Córdova Schleder, junto ao Departamento de Geociências das UEPG.

A espécie vegetal em estudo foi identificada pelo botânico Dr.Gert HatschBach, do Museu Botânico da Prefeitura Municipal de Curitiba, por comparação com excicata depositada no herbário, onde recebeu o número de referência 190376.

3.2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO A 80 %

As partes aéreas (caules e folhas) de *Mikania lanuginosa* DC (2,310 kg) frescas foram trituradas, utilizando-se um liquidificador e colocadas em um percolador. Posteriormente, foram submetidas a extração por maceração, durante 15 dias, na presença de 11 litros de etanol a 80 %, como solvente extrator. O processo de extração ocorreu à temperatura ambiente e em recipiente protegido da luz.

Durante o período de maceração, ocorreu a formação de um precipitado (7,0 g) de aspecto resinoso e de coloração verde-escuro, que após filtragem pelo funil de Büchner, foi separado do extrato bruto e acondicionado em um dessecador.

O extrato etanólico foi concentrado até a eliminação do solvente, a uma temperatura constante de 60°C, em evaporador rotatório, obtendo-se 63,90g do extrato etanólico bruto.

3.2.3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

Os procedimentos experimentais adotados nesse trabalho, foram baseados em técnicas de separação de produtos naturais, como: extração, separação, recristalização, purificação e identificação de compostos, conforme descrito anteriormente (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Inicialmente, preparou-se um extrato etanólico a 80%, das partes aéreas da espécie vegetal em estudo e obteve-se o extrato etanólico bruto, com um rendimento de 2,77% de extrato seco e um precipitado escuro, de aspecto resinoso, com um rendimento de 0,3%.

O fracionamento, seguido do processo de purificação das frações **P3** e **P4** do precipitado, permitiu o isolamento de 3 compostos, com os seguintes rendimentos: **P3 AC** – 0,033 %, **P4 ETP** (mistura de **ETP1** e **ETP2**) - 0,0086 % e **AGP**, com um rendimento muito baixo.

Da fração hexânica com um rendimento de 0,0433 %, foi isolado um composto, que foi denominado de **SGHD**, com um rendimento de $\cong 0,00025$ %.

Da fração diclorometano com um rendimento de 0,097 % foi possível isolar o composto **SGHD**, identificado na fração anterior, com um rendimento de $\cong 0,00035$ %, perfazendo um total de 0,0006 %.

3.2.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

O fracionamento das 63,9 g do extrato bruto etanólico foi realizado pelo processo de extração por solventes imiscíveis (líquido/líquido) de polaridades crescentes.

Os 650mL do extrato bruto etanólico foram transferidos para um funil de separação com capacidade para 2 litros e extraído 5 x 200mL sucessivamente, com os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Em cada uma dessas extrações, esperou-se a nítida visualização das linhas de separação dos solventes. As frações foram evaporadas em rotavapor, seguida da análise quantitativa: 1,00 g para fração hexânica, 2,23 g para a fração diclorometano, 2,89g para a fração acetato de etila, 8,20g para a fração butanol e 49,58g para o extrato hidroalcoólico. Separou-se as amostras de todas as frações obtidas, as quais foram encaminhadas para serem testadas na farmacologia e microbiologia .

3.2.5 ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO A 80%

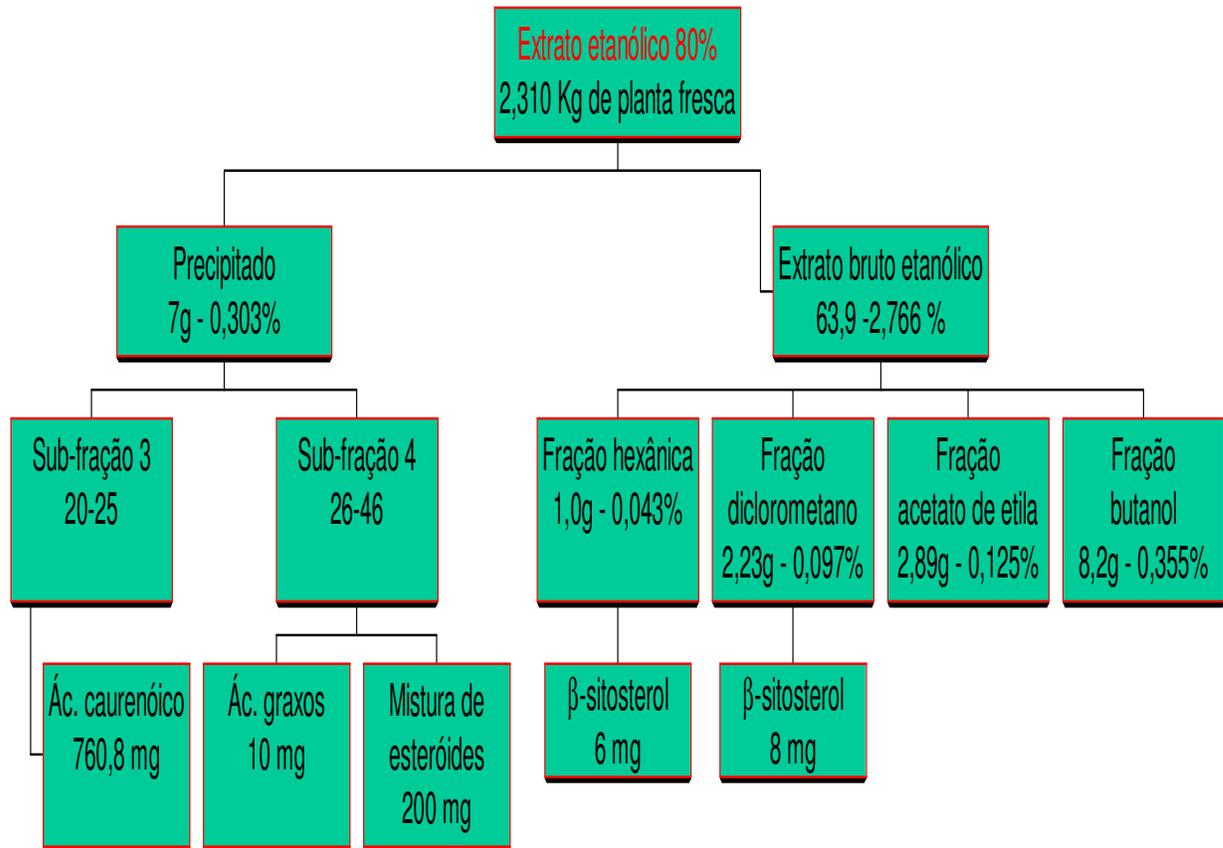


Figura 5 - Fluxograma demonstrativo do processo de fracionamento do extrato etanólico a 80 %.

3.2.6 FRACIONAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS DO PRECIPITADO

O precipitado (6,5 g) foi acrescido de 13 g de sílica-gel 60 de granulometria 70 – 230 mesh e redissolvido com clorofórmio. Com a evaporação do solvente, a fração ficou adsorvida na sílica, obtendo-se a pastilha.

A pastilha foi submetida a uma coluna cromatográfica de 5 cm de diâmetro por 60 cm de altura, contendo 73 g de sílica-gel 60 de granulometria 70 – 230 mesh e empacotada com 100mL de hexano. A fração foi eluída segundo gradiente, de polaridade crescente, com o seguinte sistema de solventes: hexano 100 %, hexano: acetato de etila, acetato de etila 100 %, acetato de etila: metanol e finalmente metanol 100 % em uma única fração, com vazão de 1mL/min.

Foram coletados 121 frascos de aproximadamente 20mL cada, que após a evaporação espontânea do solvente, foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas de sílica gel 60 GF₂₅₄. As frações foram reunidas, conforme semelhança do perfil cromatográfico apresentado. As cromatoplasmas foram eluídas com as seguintes fases móveis: hexano 100 %, hexano: acetona (80/20), hexano: acetato de etila (90/10), hexano: acetona (70/30), benzeno (20): acetato de etila (10). Os reveladores foram: luz ultravioleta Minerallight de 254 e 365 nm, solução de NaOH a 10 % em H₂O (específico para Cumarina), anisaldeído sulfúrico com aquecimento por alguns minutos, em estufa a 100°C. A **Tabela 9** abaixo, nos mostra o sistema de eluição utilizado, com as respectivas reuniões das subfrações.

Tabela 9 - Fracionamento do precipitado, mostrando os sistemas de eluição e as frações resultantes.

SubFrações	% hexano : Acet. de etila % Acet.de etila: Metanol	Frações reunidas
Subfração P1	Hexano 100%	1 – 4
Subfração P2	Hexano (95):Acet.de etila (5)	5 – 19
Subfração P3*	Hexano (95):Acet.de etila (5)	20 - 25
Subfração P4*	Hexano (95):Acet.de etila (5) Hexano(70):Acet.de etila(30)	26 - 46
Subfração P5	Hexano(70):Acet.de etila(30)	47 - 54
Subfração P6	Hexano(70):Acet.de etila(30) Hexano(30):Acet.de etila(70)	55 - 85
Subfração P7	Hexano(30):Acet.de etila(70)	86 – 107
Subfração P8	Acetato de etila 100 %	108 – 117
Subfração P9	Metanol 100 %	118 – 121

* Frações estudadas

Nas frações de 20 a 25, após a evaporação espontânea do solvente, ocorreu a formação de cristais alongados incorporado a um óleo de coloração amarela, que conforme o perfil cromatográfico apresentado por CCD, foram reunidas na subfração **P3**, pesando 1,452 g.

Nas frações de 26 a 46, após a evaporação espontânea do solvente, ocorreu a formação de cristais alongados incorporados a um resíduo verde escuro, que por apresentarem Rfs semelhantes nas CCD, foram reunidas na subfração **P4**, pesando 1,346 g.

As demais subfrações desta coluna cromatográfica não foram estudadas, por serem constituídas por uma mistura muito complexa de componentes químicos e com pouco rendimento

em peso, o que torna difícil o processo de isolamento, purificação e identificação dos mesmos. As sub-frações P5, P6, P7, P8, P9, foram reunidas em uma única sub-fração, pois são formadas de um resíduo verde escuro e viscoso, que nas análises por CCD, revelaram várias manchas de coloração verde, as quais emitem fluorescência avermelhada sob luz ultravioleta, demonstrando ter uma grande quantidade de clorofila e outros pigmentos.

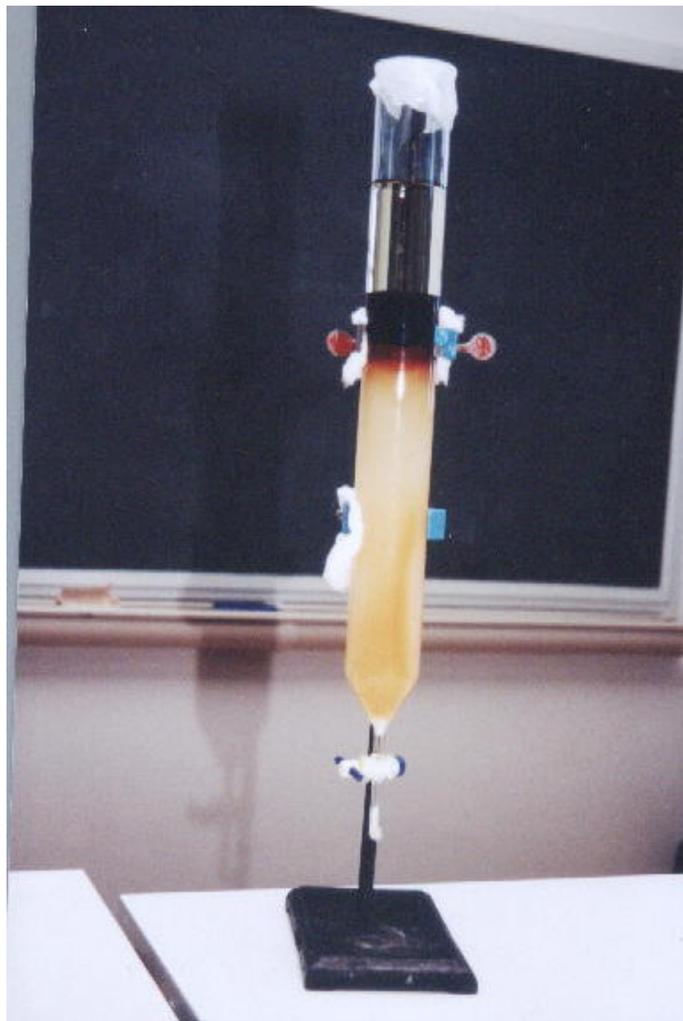


Figura 6 - Coluna cromatográfica do precipitado

3.2.6.1 PURIFICAÇÃO DA SUBFRAÇÃO P 3 DO PRECIPITADO

A subfração **P3** (1,452 g), foi purificada por refração em coluna cromatográfica (CC) de 2 cm de diâmetro por 60 cm de comprimento, previamente empacotada com 40 g de sílica-gel 60 de granulometria 70-230 mesh e 100mL de hexano 100 %. A CC foi eluída com gradiente de polaridade crescente: 300mL de hexano 100 %, 1.100mL de hexano 98 %, 400mL de hexano 95 %, 100mL de hexano 95 % e 100mL de acetato de etila 100 %. Coletaram-se 94 frações, contendo 20mL, cada as quais foram monitoradas por CCD comparativa utilizando-se padrão de ácido caurenóico, e conforme perfil cromatográfico, foram agrupadas em 5 subfrações (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Sistemas de eluição utilizados no processo de purificação da subfração **P3** e frações reunidas.

Subfrações	%Hexano:Acet.de etila	Frações reunidas
Subfração 1	Hexano 100 %	1 – 25
Subfração 2	Hexano (98):Acet.de etila (2) Hexano (98):Acet.de etila (2)	26 – 38
Subfração 3 *	Hexano (98):Acet.de etila (2) Hexano (95):Acet.de etila (5)	39 - 74
Subfração 4	Hexano (95):Acet.de etila (5) Hexano(90):Acet.de etila(10)	75 – 90
Subfração 5	Acetato de etila 100 %	91 – 94

* Subfração estudada

Nas subfrações 2 e 3, após a evaporação espontânea do solvente, obteve-se um resíduo branco cristalino, o qual foi denominado de **AC**, pesando 760,8 mg. Esses cristais foram analisados por CCD comparativa, empregando-se amostra autêntica de ácido caurenóico e hexano: acetona (8/2), como fase móvel. As cromatoplasas, após serem reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico e aquecimento em estufa a 110°C, demonstraram ser constituídas por uma única mancha, apresentando inicialmente cor amarela que passa para rosa e, em seguida para roxo. Esses cristais **AC** foram submetidos a uma cromatografia gasosa, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida nas seguintes condições: programação linear com temperatura de 40°C a 310°C, velocidade de programação de 8°C/ min, temperatura do injetor de 280°C, temperatura do detector de 310°C e isoterma de 10°C. 6,3 mg da amostra foram diluídos em 0,5mL de diclorometano, sendo injetado no cromatógrafo gasoso um volume de 1,5µL.

O ponto de fusão do composto **AC** foi determinado em aparelho SHIMADZU DSC-50, como sendo 173,3°C, conforme é demonstrado na **Figura 9 (resultados e discussões, p. 75)**. Através desta análise, pode-se observar que a substância **AC** apresenta-se com elevado grau de pureza, sendo as amostras encaminhadas para análises espectroscópicas de IV, CG/MS, RMN ¹³C e RMN ¹H

3.2.6.2 PURIFICAÇÃO DA SUBFRAÇÃO P4 DO PRECIPITADO

Os compostos da subfração **P4** (1,346 g) foram isolados por refractionamento, utilizando-se uma coluna cromatográfica de 2 cm de diâmetro x 60 cm de comprimento e previamente empacotada com 40 g de sílica-gel de granulometria 70 - 230 mesh com 100mL de hexano a 100

%. Empregou-se na eluição da coluna cromatográfica (CC), o seguinte sistema de solventes de polaridade crescente: 200mL de hexano 100 %, 300mL de hexano: acetato de etila 98 %, 300mL de hexano: acetato de etila 95 %, 100mL de hexano: acetato de etila 92 %, 600mL de hexano: acetato de etila 90 %, 100mL de hexano: acetato de etila 87 % e 100mL de hexano: acetato de etila 85 %. Coletaram-se 67 frações, contendo 20mL cada, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa, utilizando-se padrões autênticos de esteróides, as frações que apresentaram Rfs semelhantes foram reunidas (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Sistemas de eluição utilizados no processo de purificação da subfração **P4** e as frações reunidas.

Subfrações	% Hexano: Acetato.de etila	Frações reunidas
Subfração 1	Hexano 100 % Hexano(98):Acet.de etila (2)	1 – 19
Subfração 2	Hexano(95):Acet.de etila (5)	20 – 27
Subfração 3 *	Hexano(95):Acet.de etila (5)	28– 34
Subfração 4 *	Hexano(92):Acet.de etila (8)	35 – 59
Subfração 5	Hexano(87):Acet.de etila(13)	60 – 67

* Subfrações estudadas

Na subfração 3, após a evaporação espontânea do solvente, ocorreu a formação de um resíduo gelatinoso e de aspecto gorduroso, o qual foi denominado de **P4 AGP**. Através de análise por cromatografia em camada delgada (CCD), usando hexano: acetato de etila (8/2) como fase móvel e nebulização com solução de anisaldeído sulfúrico, verificou-se a presença de várias

manchas, com Rfs muito próximos. Por meio de análises espectroscópicas de CG/EM, verificou-se que o resíduo **P4 AGP (Figura 24 ver na p. 90)** é constituído por uma mistura de 10 constituintes, com características de ácido graxo.

A subfração 4 foi concentrada mediante evaporação espontânea do solvente, resultando na formação de cristais incolores em forma de agulhas, solúveis no clorofórmio e insolúveis em metanol, os quais foram denominados de **P4ETP**, pesando 200mg. Esses cristais foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa com padrões de alguns esteróides. O eluente utilizado foi hexano: acetona (7/3) e sob luz ultravioleta, emite fluorescência azul em 254 nm e verde em 365 nm, após nebulização com solução de anisalaldeído sulfúrico. A subfração **P4 ETP** também foi analisado por cromatografia gasosa, nas seguintes condições, isoterma final de 10°C, programação linear com temperatura de 40°C a 310°C, velocidade programada de 8°C, temperatura do injetor e detector de 280°C e 320°C respectivamente. 6,3mg da amostra foram diluídas em 0,5mL de diclorometano e o volume de amostra injetado no cromatógrafo gasoso foi de 1,5µL. Amostra da sub-fração **P4 ETP** foi enviada para análise em CG/EM (**Figura 18, ver na p. 84**) e verificou-se que é constituída por uma mistura de dois componentes, os quais foram denominados de **ETP 1** e **ETP 2**. Para a elucidação estrutural dos compostos desta mistura, procedeu-se análises espectroscópicas de IV (**Figura 17, ver na p. 82**), RMN ¹H (**Figura 21, ver na p. 86**) e RMN ¹³C (**22, ver na p. 87**).

3.2.7 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXÂNICA

Os 900 mg da fração hexânica foram acrescidas de 2 partes de sílica-gel 60 de granulometria 70 – 230 mesh e impregnadas com cetona. Com a evaporação do solvente, o extrato fica adsorvido na sílica, obtendo-se a pastilha.

A pastilha foi cromatografada através de uma coluna cromatográfica (CC) de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura, contendo 30 g de sílica - gel 60 de granulometria 70 - 230 mesh e empacotada com hexano. A eluição foi feita com o gradiente: hexano 100 % e aumentando-se gradativamente a polaridade usando hexano: acetato de etila, acetato de etila 100 %, acetato de etila: metanol e finalmente metanol 100 %, com vazão de 1mL/min.

Foram coletada 95 frações de 20mL cada, os quais foram monitorados por cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas de sílica-gel GF₂₅₄ 0,2 mm de espessura, preparada sobre folha de alumínio de procedência Merck e as seguintes fases móveis, hexano e acetato de etila (80/20), hexano e acetato de etila (70/30), diclorometano e metanol (90/10), benzeno e acetato de etila (20/10). As cromatoplasmas foram reveladas sobre luz ultravioleta Minerallight 254 e 365 nm, nebulizadas com solução de anisaldeído sulfúrico e hidróxido de sódio (NaOH) a 10 % em água (revelador específico para cumarinas). As subfrações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas (**Tabela 12**).

Tabela 12 – Sistemas de eluição da fração hexânica e frações reunidas.

Subfrações	% Hexano: Acetato de etila % Acetato de etila: Metanol	Frações reunidas
Subfração 1	Hexano 100%	1 – 5
Subfração 2	Hexano (98):Acet.de etila (2)	6 – 10
Subfração 3	Hexano (95):Acet.de etila (5)	11 – 20
Subfração 4	Hexano(85):Acet.de etila(15)	21 – 25
Subfração 5	Hexano(80):Acet.de etila(20)	26 – 29
Subfração 6	Hexano(75):Acet.de etila(25)	30 – 42
Subfração 7	Hexano(50):Acet.de etila(50)	43 – 48
Subfração 8	Hexano(25):Acet.de etila(75)	49 - 59
Subfração 9*	Acetato de etila 100%	
Subfração 9*	Acet.de etila (90): Met. (10)	60 – 67
Subfração 10	Acet. de etila (80): Met. (20)	68 – 71
Subfração 11	Acet. de etila (70): Met. (30)	72 – 78
Subfração 12	Acet. De etila (50): Met. (50)	79 – 90
Subfração 13	Acet.de etila (10): Met. (90)	
Subfração 13	Metanol 100%	91– 95

* Subfração estudada

Na subfração 9, foi possível isolar o composto **SGHD**, por apresentar-se na forma de flóculos brancos, amorfos, em meio a uma massa escura e viscosa, constituída possivelmente por uma grande quantidade de clorofila e outros pigmentos, insolúveis em acetona e metanol. No processo de purificação do **SGHD**, os flóculos foram lavados sucessivamente com metanol: acetona (1/1) e filtrados com ajuda de uma pipeta de Pasteur, para a remoção das impurezas,

obtendo-se 6,0mg em peso. O composto **SGHD** foi analisado por técnicas cromatográficas como: cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa, usando-se padrões autênticos de esteróides (β -sitoserol glicosilado) e cromatografia gasosa (CG) (**Figura 26 ver na p. 92**) e espectroscopia de IV (**Figura 27 ver na p. 97**), apresentando características semelhantes aos compostos de natureza esteroidal.

As demais subfrações não foram estudadas por apresentarem-se com um rendimento muito baixo e serem constituídas por uma mistura complexa de componentes de Rfs muito próximos, após análise por cromatografia em camada delgada, inviabilizando a separação e elucidação das mesmas pelos métodos convencionais disponíveis.

3.2.8. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DA FRAÇÃO DICLOROMETANO

Uma parte da fração diclorometano (1,7g) foi acrescida de 3,4 g de sílica-gel 60 de granulometria 70 - 230 mesh e dissolvida com diclorometano para a impregnação do extrato na sílica (pastilha).

A pastilha foi submetida a uma coluna cromatográfica (CC) de 3 cm de diâmetro por 60 cm de comprimento, contendo previamente 60 g de sílica-gel 60 de granulometria 70 - 230 mesh e empacotada com 100mL de hexano a 100 %. Utilizou-se um sistema de solventes de polaridade crescente: hexano 100 %, hexano: acetato de etila, acetato de etila 100 %, acetato de etila: metanol e metanol 100%. Coletaram-se 101 frações, contendo 20mL cada, as quais foram

analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e conforme perfil cromatográfico apresentado, foram agrupadas de acordo com a **Tabela 13**.

Tabela 13 – Sistemas de eluentes empregados no fracionamento da fração DCM e frações reunidas.

Subfrações	100% Hexano: Acet. de etila	Frações reunidas
Subfração 1	Hexano 100 %	1 - 11
Subfração 2	Hexano(98): Acet.de etila (2)	12 - 20
Subfração 3	Hexano(95): Acet.de etila (5)	21 - 29
Subfração 4	Hexano(80):Acet.de etila(20)	30 - 36
Subfração 5	Hexano(75):Acet.de etila(35)	37 - 47
Subfração 6	Hexano(60):Acet.de etila(40)	48 - 56
Subfração 7	Hexano(40):Acet.de etila(60)	57 - 71
Subfração 8 *	Acet.de etila(90):MeOH (10)	72 - 75
Subfração 9	Acet.de etila(80); MeOH(20)	76 - 85
Subfração 10	Acet.de etila(60); MeOH(40)	86 - 98
Subfração 11	Acet.de etila(50): MeOH(50)	99 - 101
	Acet.de etila(20):MeOH (80)	
	Metanol 100 %	

- Subfração estudada

Na subfração 8 , após a evaporação espontânea do solvente, ocorreu a formação de um resíduo floculoso e insolúvel em acetona e metanol. No processo de purificação deste composto, os flóculos foram lavados, com uma mistura em partes iguais de metanol e acetona, para remover

as impurezas e promover a precipitação de compostos apolares, como os esteróides, pesando 8 mg. Após esse procedimento, o composto purificado e denominado de **SGHD** foi analisado por IV, CG/EM e CCD comparativa utilizando-se padrão do β -sitosterol glicosilado. As cromatoplasmas foram eluídas em diclorometano/metanol (90/10), clorofórmio/metanol (85/15) e nebulizadas com solução de anisaldeído sulfúrico. A revelação possibilitou concluir que o composto isolado é muito semelhante ao padrão do β -sitosterol glicosilado, isolado na fração anterior (fração hexânica).

3.3 ESTUDOS COMPARATIVOS DOS DIFERENTES ÓRGÃOS DA ESPÉCIE *Mikania lanuginosa* DC POR CG/FID.

Este estudo visa estabelecer parâmetros comparativos da concentração do ácido caurenóico (AC), presente nos diferentes órgãos vegetais (raíz, caule, folhas e flores) de *Mikania lanuginosa* DC, nas quatro estações do ano por cromatografia gasosa de alta resolução/detector de ionização de chama (CG/FID) comparativa, utilizando-se padrão autêntico de ácido caurenóico. A quantificação deste diterpeno em cada órgão vegetal, foi estabelecida pela relação existente entre a área do pico, determinada por CG, conforme **Figuras 33 a 46 (ps. 100 a 107)**, com a concentração obtida mediante curva de calibração (BRESCIANI; YUNES; CECHINEL-FILHO, 1999).

3.3.1 METODOLOGIA

3.3.1.1 MATERIAL VEGETAL

Amostras dos diferentes órgãos vegetais de *Mikania lanuginosa* DC, foram coletadas nas quatro estações do ano (primavera, verão, outono, inverno). Posteriormente, foram fragmentados em pequenos pedaços e colocados para dessecar a temperatura ambiente, durante cinco dias.

3.3.1.2 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS

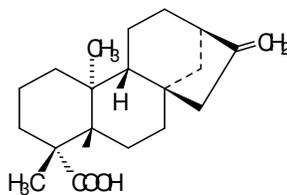
Pesou-se exatamente 1g de cada órgão (raíz, caule, folha e flor) da espécie vegetal em estudo, os quais foram colocados para macerar separadamente. O processo de maceração ocorreu pela ação de três tipos de solventes de polaridades crescentes, sendo que o tempo de extração de cada solvente foi de três dias e com agitação constante. A primeira maceração ocorreu na presença de 100mL de diclorometano. Após o tempo de maceração estabelecido, o solvente foi substituído por 100mL de acetato de etila e finalmente 100mL de metanol. Os extratos de diclorometano, acetato de etila e metanólico de cada órgão vegetal, foram evaporados espontaneamente. Finalmente, procederam-se as análises diretas do extrato de diclorometano dos diversos órgãos vegetais por meio de cromatografia gasosa de alta resolução/detector de ionização de chama (CG/FID) comparativa utilizando-se padrão autêntico do ácido caurenóico (VILEGAS & LANÇAS, 1994).

3.3.1.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO

Segundo BRESCIANI, YUNES, CECHINEL - FILHO (1999), o ác. caurenóico para ser usado na curva de calibração, deve ser silanizado e apresentar elevado grau de pureza. Uma solução estoque de ácido caurenóico foi preparada, usando-se diclorometano grau analítico, como solvente. Quatro soluções para a curva de calibração foram preparadas como solução estoque. As concentrações do ac. caurenóico empregadas nas soluções de calibração foram: 110,0; 220,0; 440,0 e 880,0 $\mu\text{g/mL}$. Aliquotas (1,0 μL) das quatro diluições foram analisadas por CG, e as áreas dos picos resultantes das soluções acima, foram calculadas. Foram feitas três determinações de cada concentração e calculou-se a concentração média. A curva de calibração foi graficada por meio das áreas dos picos versus a concentração da amostra injetada (**Tabela 14 e Figura 7**).

Tabela 14 – Concentrações das soluções de ácido caurenóico e suas áreas relativas.

Concentração do Ácido caurenóico ($\mu\text{g/MI}$)	Áreas Relativas Integradas
880,0	7,95
440,0	3,99
220,0	1,69
110,0	1,23



Ácido caurenóico (**8**)

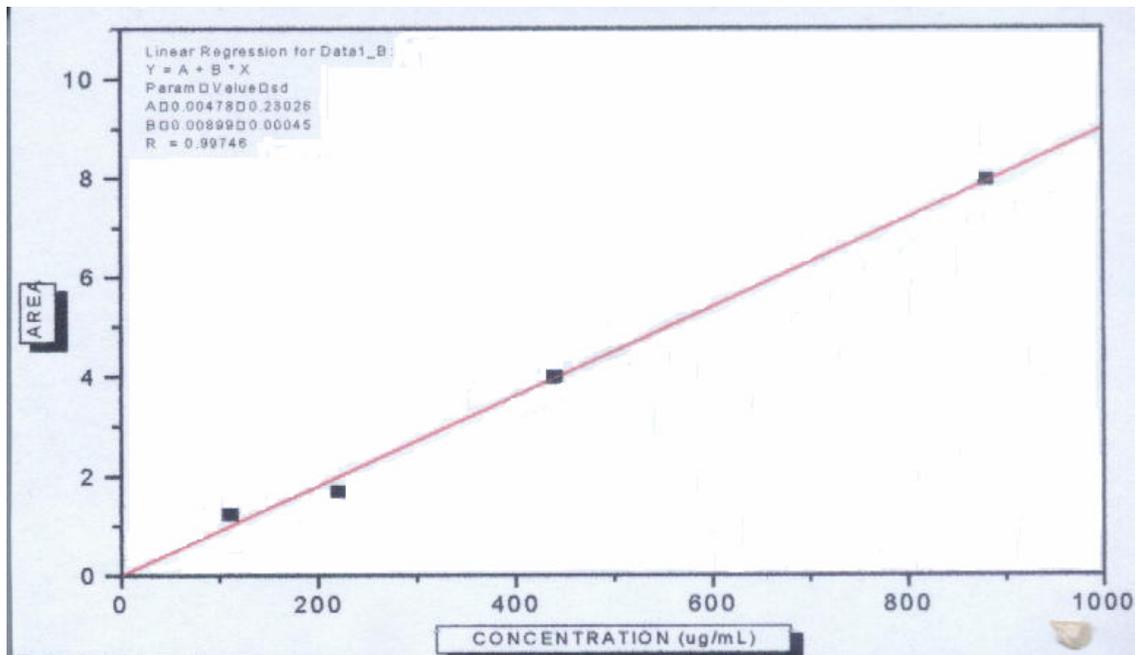


Figura 7- Curva de calibração do ácido caurenóico, em diclorometano a 25°C.

3.3.1.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram feitas em um cromatógrafo gasoso de alta resolução (CG/FID), modelo SHIMADZU GC – 14A com detector de ionização de chama. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida, LM-1, com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno, com fase ligada com polimetilsiloxano como fase estacionária. As amostras foram introduzidas usando splitless (1min, injeção sem divisão de fluxo, 1,5µL de volume injetado) e H₂ como gás de arraste, nas seguintes condições: programação linear com temperatura de 40°C a 310°C, velocidade de programação de 8°C/min, temperatura do injetor de 280°C, temperatura do

detector de 320°C e isoterma de 10°C. Foram diluídos 6,3mg da amostra, em 0,5mL de diclorometano, e injetado um volume de 1,5µL (VILEGAS, LANÇAS, CERVI, 1993; VILEGAS, LANÇAS, ANTONIOSI FILHO, 1995; BRESCIANI; YUNES; CECHINEL-FILHO, 1999).

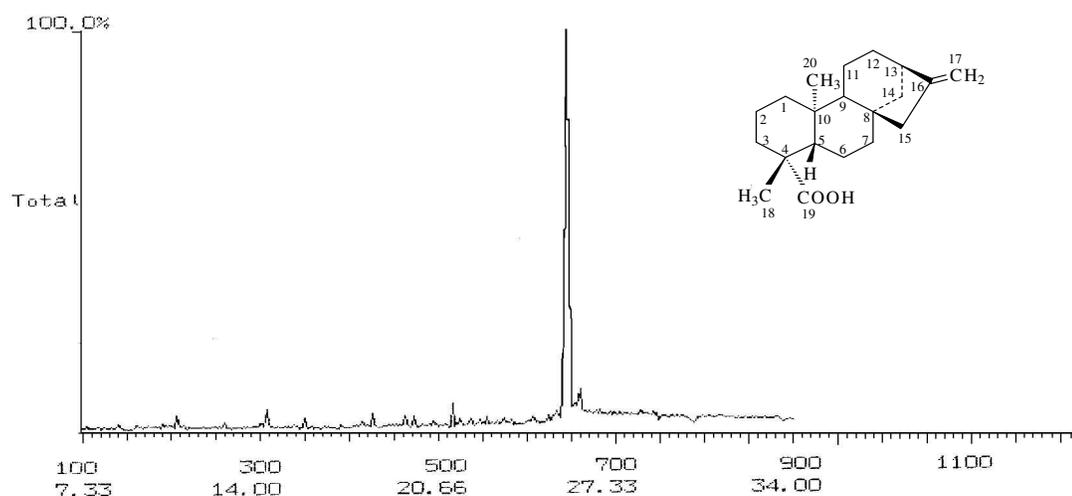


Figura 8 – Cromatograma obtido por CG do Ác. Caurenóico isolado da *M. lanuginosa* .

3.3.1.6 ESTUDOS COMPARATIVOS DOS DIFERENTES ÓRGÃOS DA ESPÉCIE *Mikania lanuginosa* DC POR CCD.

Os extratos diclorometano dos diversos órgãos da *Mikania lanuginosa* DC, coletados nas quatro estações do ano foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa, utilizando-se padrão autêntico de ácido caurenóico. As cromatoplas foram eluídas na mistura

de solventes hexano (8): acetato de etila (2), como fase móvel e nebulizadas com o revelador anisaldeído sulfúrico (**Figuras 29 a 32, ver na p. 99**).

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os testes farmacológicos das frações obtidas das partes aéreas de *Mikania lanuginosa* DC foram realizados pela equipe do Prof. Dr. João B. Calixto, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os testes antimicrobianos das frações obtidas das partes aéreas de *Mikania lanuginosa* DC foram realizados no NIQFAR/ UNIVALI, pelos professores Alexandre Bella Cruz e Rosana Cé Bella Cruz, e os testes toxicológicos do extrato bruto das partes aéreas de *Mikania lanuginosa* DC foram realizados no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG.

3.4.1 ATIVIDADE ANALGÉSICA

Foram efetuadas as avaliações do efeito das diversas frações obtidas da *Mikania lanuginosa* DC na nocicepção induzida pela formalina (CORRÊA & CALIXTO, 1993).

3.4.1.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos “Suíços” machos e fêmeas pesando entre 25 a 30g, aclimatizados a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ com ciclo claro/escuro de 12 horas mantidos no biotério

central do Departamento de Farmacologia da UFSC, tratados com ração e água *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos.

3.4.1.2 DOR INDUZIDA PELA FORMALINA

Nos animais foram injetados 20 µL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) ou salina na região intraplantar das patas posteriores direita e esquerda, respectivamente.

Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados, individualmente, dentro de um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após foi quantificado, durante 30 minutos, o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse tempo cronometrado e considerado como indicativo de dor. Esse modelo permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção de formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda, que ocorre entre 15 a 30 minutos após a formalina, representando a resposta tônica à dor acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios (CORRÊA & CALIXTO, 1993).

Os animais foram pré-tratados com 100mg/kg via oral, com as frações obtidas da *Mikania lanuginosa* DC, 30 minutos antes da injeção da formalina. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores direita (injetada com formalina) e a esquerda (injetada com salina) cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança analítica para quantificação do edema induzido pela formalina.

3.4.1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos resultados foram efetuados por meio de testes de variância seguido pelo de múltipla comparação utilizando-se método de Dunnet, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ ou menor foram considerados como indicativos de significância.

3.4.2 ATIVIDADE ANTI MICROBIANA

Avaliou-se o potencial antimicrobiano das frações: hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica da *Mikania lanuginosa* DC, segundo os métodos da difusão em ágar, e concentração inibitória mínima (MITSCHER, et al. 1972).

3.4.2.1 AMOSTRAS BACTERIANAS E FÚNGICAS

As espécies microbianas, *Staphylococcus aureus* (ITAL SFCO 001), *Escherichia coli* (ITAL ESCH 001), obtidas no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, S. Paulo e *Candida albicans* (ATCC 102), adquirida no American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) foram testadas pelo método da concentração inibitória mínima com as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica da *Mikania lanuginosa* DC.

3.4.2.2 DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO – DISCO

Em placas estéreis, depositou-se 1mL da suspensão do microorganismo, preparada em solução fisiológica a 0,85 %. Padronizou-se pelo tubo 0,5 da Escala de McFarland e ajustou-se para 90 % T (530 nm), correspondendo aproximadamente a 10^6 UFC/mL. Em seguida, adicionou-se 21mL de meio sólido fundido a 50°C (ASD para fungos e leveduras, Müller Hinton para bactérias). Após solidificação, depositou-se os discos de papel de filtro (CECON/SP) embebidos com 0,02mL as frações: hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica da *Mikania lanuginosa* DC diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 1,5mg. Foram realizados controles com antimicrobianos padrões, tetraciclina ou ampicilina a 30 µg para bactérias e cetoconazol a 1000 µg para fungos e leveduras. Os ensaios foram incubados por 24 - 48 horas a 37°C para bactérias e leveduras e por 28 – 30°C durante 10 a 14 dias para os fungos filamentosos (FROMTLING et al., 1983; PLEMPEL et al., 1983; DRUTZ, 1987; BENOUDIA et al., 1988; RANA et al., 1997).

3.4.2.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

As amostras bacterianas foram ativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion – Merck-10493) por 24 horas. A densidade ótima do inóculo foi de 3×10^8 unidades formadoras de colônia/mL de meio, determinada através da escala de McFarland. O caldo BHI foi distribuído em uma série de tubos, onde foram colocados também o inóculo padronizado e as frações foram diluídas em dimetilsulfóxido nas concentrações desejadas. Dois tubos foram utilizados como

controles, contendo DMSO e o inóculo bacteriano. A seguir, os tubos foram incubados a 37°C por 18 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura por turbidimetria (MITSCHER, et al., 1972).

3.4.3 TOXICIDADE AGUDA (DOSE SIMPLES)

Avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas do extrato bruto das partes aéreas de *Mikania lanuginosa* DC.

3.4.3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 20 ratos albinos adultos (*Rattus albinus novergicus*, Wistar) pesando em média 260 g. Estes animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG durante um período de 10 dias de aclimatação e 14 de experimentação, obedecendo ciclo de claro/escuro de 12 horas e recebendo água *ad libitum* e ração do tipo Purina® para animais de laboratório.

3.4.3.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os animais foram agrupados em grupo teste e controle, contendo o mesmo número de animais. Antes do experimento, os animais foram pesados e marcados.

A solução aquosa do extrato bruto de *Mikania lanuginosa* DC foi administrada em dose única por via intraperitoneal, na concentração de 1500mg/kg, tendo-se o cuidado do cálculo da diluição do extrato estar contida no volume máximo de 1mL. Os animais controle receberam 1mL do veículo (solução salina estéril – NaCl 0,9 %).

Após a administração da injeção da solução aquosa do extrato bruto de *Mikania lanuginosa* DC, os animais foram privados de alimentos e água por um período de 3 a 4 horas e observou-se clínica e sistematicamente cada animal aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e, depois, a cada 24 horas até completar 14 dias de experimento. As respostas foram anotadas em protocolo individual, observando-se a alteração de pêlos, pele e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistema nervoso central e periférico; atividade somatomotriz; comportamento com especial atenção a sintomas tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, coma e morte (GIBSON, HUFFMANN, NEWBERNE, 1982; BRITO, 1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS NO PRECIPITADO

4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DO P3AC NO PRECIPITADO

A substância isolada e purificada da subfração **P3** do precipitado e denominada de **AC** foi analisada por CG e CCD comparativa, utilizando-se padrão autêntico de ácido caurenóico. O perfil cromatográfico permitiu identificá-lo como sendo ácido caurenóico. Posteriormente, a estrutura química foi elucidada por técnicas espectroscópicas, as quais são descritas nos ítems abaixo:

4.1.1.1. A DETERMINAÇÃO DO PONTO DE FUSÃO DO P3AC

Conforme descrito na parte experimental, foram obtidos cerca de 760,8mg deste composto, o qual apresenta-se como um sólido branco, cristalino. O ponto de fusão foi determinado em aparelho SHIMADZU DSC - 50 e o valor encontrado foi de 173,3°C (**Figura 9, ver p. 75**). Este é coincidente com dados citados pela literatura para o ácido caurenóico (**8, ver estrutura na p. 36**), que oscilam entre 172 – 175 °C (SANTOS, TOMASSINI, CABRAL, 1998).

No processo de identificação de composto, a determinação do ponto de fusão é de grande importância, pois esta constante física juntamente com outras análises, como o IV, CG/ MS,

RMN ^{13}C , RMN ^1H e a análise elemental nos permite determinar o grau de pureza de um composto.

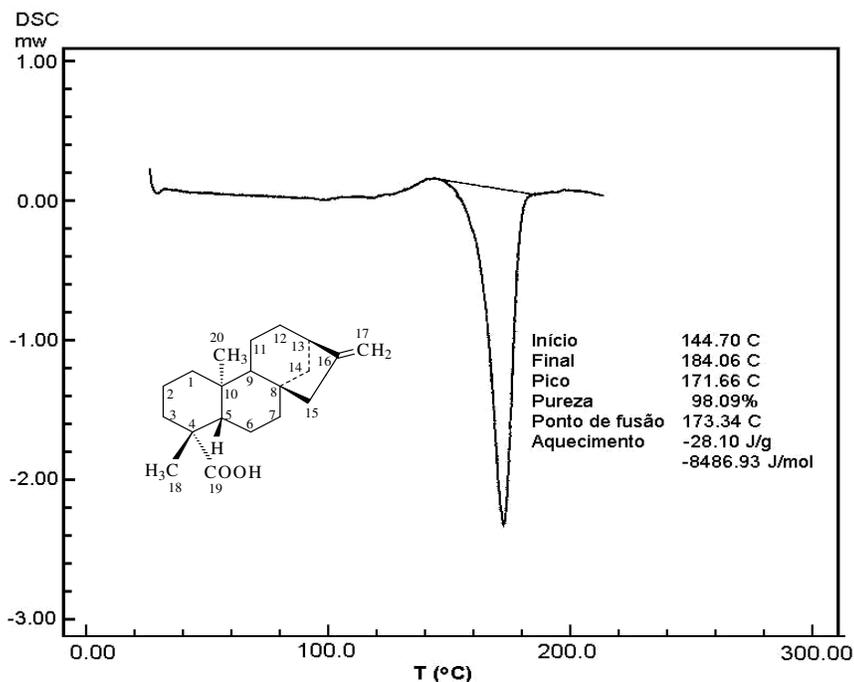


Figura 9 – Gráfico do ponto de fusão do composto **P3AC**.

4.1.1.1.B ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV)

O espectro de infravermelho mostra uma banda larga em 3.440 cm^{-1} interpretada como de estiramento de deformação axial O - H do - COOH; duas bandas de absorções intensas em 2.926 cm^{-1} e 2.846 cm^{-1} referentes ao estiramento de deformação axial C-H; banda intensa de absorção em 1.692 cm^{-1} correspondente ao estiramento de deformação axial da carbonila. Em 1.468 cm^{-1} é observada a banda deformação do - CH₂. Pode-se observar ainda absorções em

3.068 cm^{-1} e 870 cm^{-1} referentes ao estiramento e deformação angular do grupo metileno terminal. Os dados obtidos no espectro de infravermelho coincidem com os dados citados na literatura (OLIVEIRA et al. 1984; RODRIGUES, ALVARENGA, KATO, 1996) e sugere que o composto isolado **P3AC** apresenta a função química ácido. A **Figura 10** mostra o espectro de infravermelho, em pastilha compactada de KBr, obtido para a amostra **P3AC**.

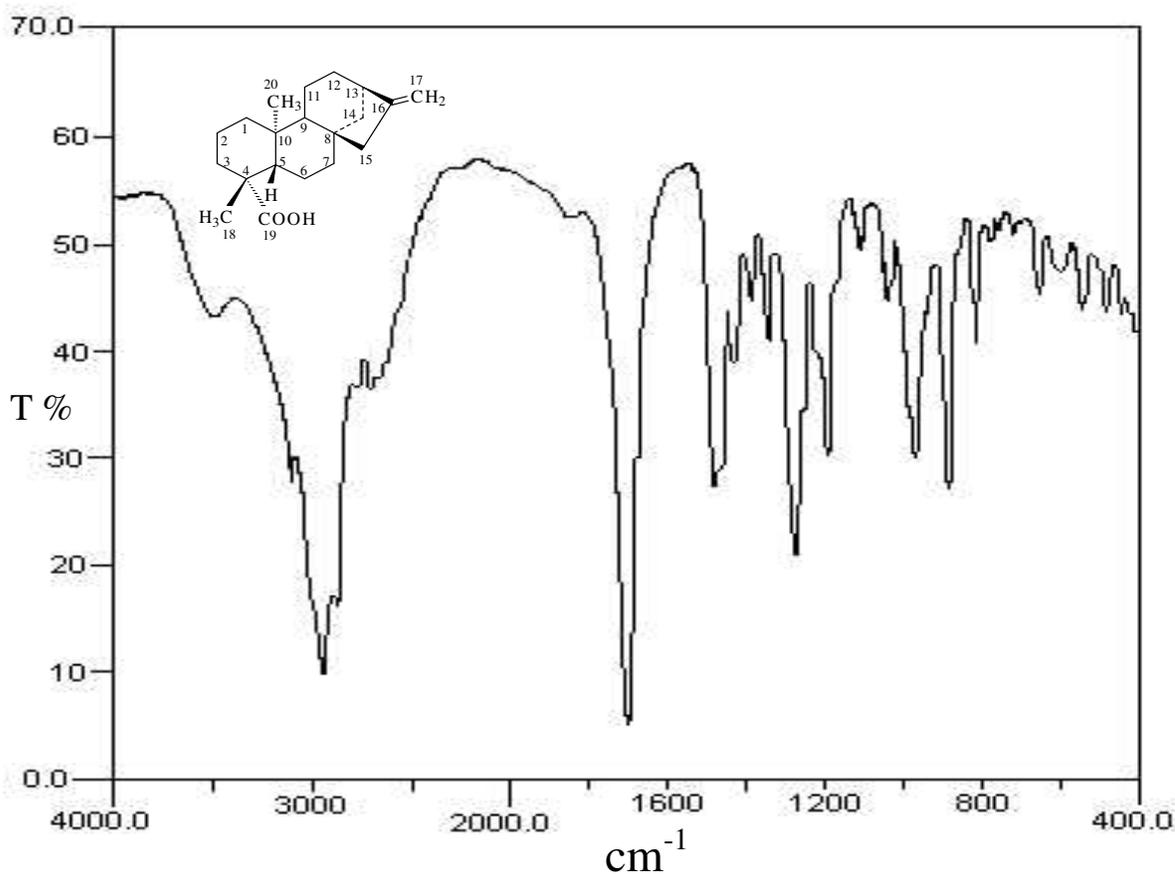
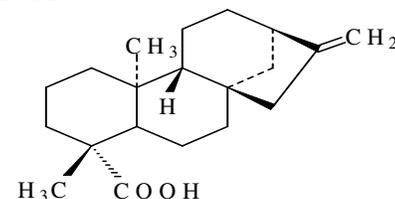


Figura 10 - Espectro de IV de **P3 AC** em pastilha de KBr.

4.1.1.1.C ESPECTROSCOPIA DE MASSAS(CG/EM)

O composto **P3AC** foi cromatografado em CG/EM, e o cromatograma nos mostra apenas um pico, no tempo de retenção de 25,56 minutos, indicando que o composto encontra-se puro, (Figura 11).

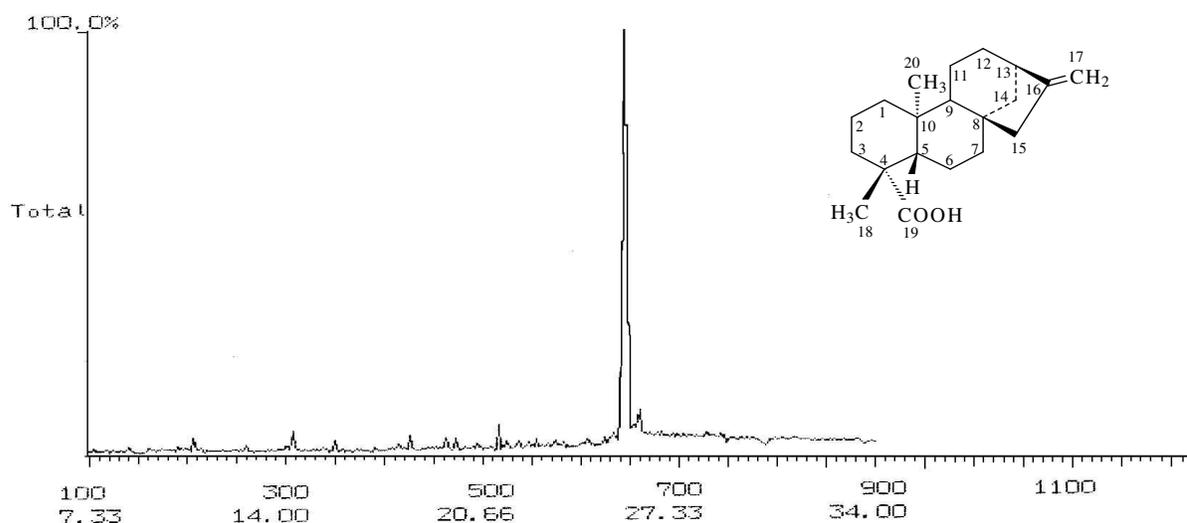


Figura 11 – Cromatograma do CG/EM do composto **P3AC**.

O Espectro de Massas mostrou o pico íon molecular $[M^+]$ a m/e (% rel.) 302 (13) e os demais fragmentos: 287 $[M - Me]^+$ (12), 259 $[M - CH_3 - OH]^+$ (18), 257 $[M - COOH]^+$ (8), 243 (20), 241 $[M - Me - COOH - H]^+$ (18), 213 (15), 201(5), 187 (9), 185 (6), 159 (10), 147 (15), 131 (51), 123 (20), 121 (29), 119 (30), 109 (28), 107 (35), 105 (50), 95 (28), 93 (50), 81 (44), 91 (75), 79 (58), 69 (20), 67 (46), 55 (70), 45 (9), 43 (51), 41 (100). Estes dados, estão de acordo

com a literatura (OLIVEIRA, ALVARENGA, AKISUE, 1984; SANTOS, TOMASSINI, CABRAL, 1998). A **Figura 12** mostra os principais fragmentos obtidos a partir do ácido caurenóico.

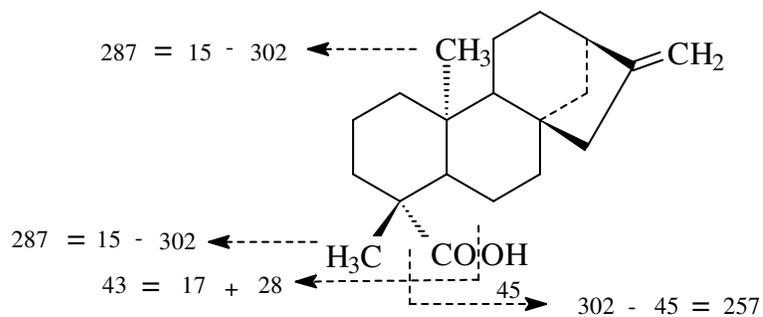


Figura 12 – Esquema de fragmentação do composto **P3AC (8)** por CG/EM

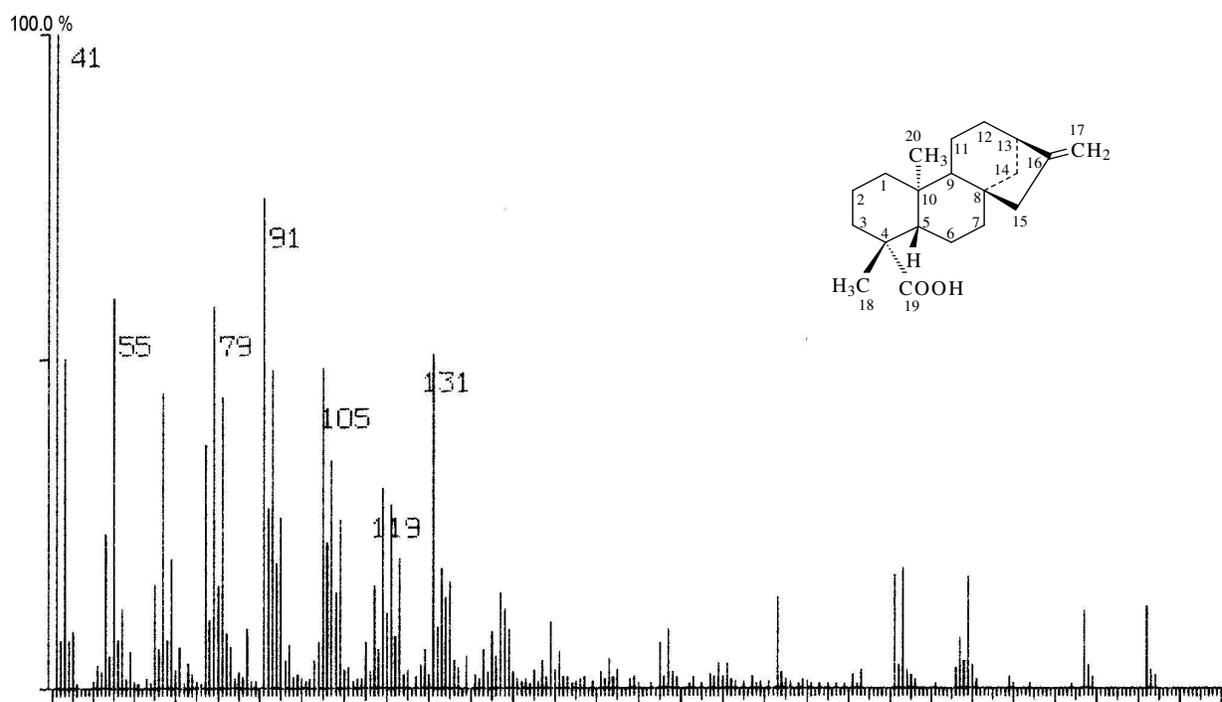


Figura 13 - Espectro de massas (70 eV) do composto **P3AC**

4.1.1.1.D. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN ^1H)

O espectro de ressonância magnética nuclear de próton mostrou deslocamentos químicos (δ) na região espectral compreendida entre 1,0 e 2,5 ppm, relativo aos prótons de CH_2 e CH_3 de ciclo alcanos, de difícil resolução em virtude da sobreposição dos sinais. Na região do espectro, em 4,87 ppm, pode-se observar um dublete ($J = 11,44$ Hz), com intensidade relativa de dois prótons (CH_2), deslocamento químico característico dos prótons olefínicos e em 7,3 ppm observa-se o deslocamento químico relativo ao solvente utilizado nesta análise, o clorofórmio deuterado. Não foi observado neste espectro, o deslocamento químico do próton relativo à carboxila, pelo fato deste espectro ir apenas até 7,5 ppm. O próton da carboxila absorve na região do espectro compreendida entre 10,0 e 13,0 ppm, isto é, em campo baixo por estar menos blindado (WILLARD, MERRITT, DEAN, 1974; SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991). Estes dados são concordantes com os da literatura, confirmando a estrutura proposta para o ácido caurenóico (OLIVEIRA, et al., 1984; SANTOS, TOMASSINI, CABRAL, 1998), como é demonstrado na **Figura 14** abaixo:

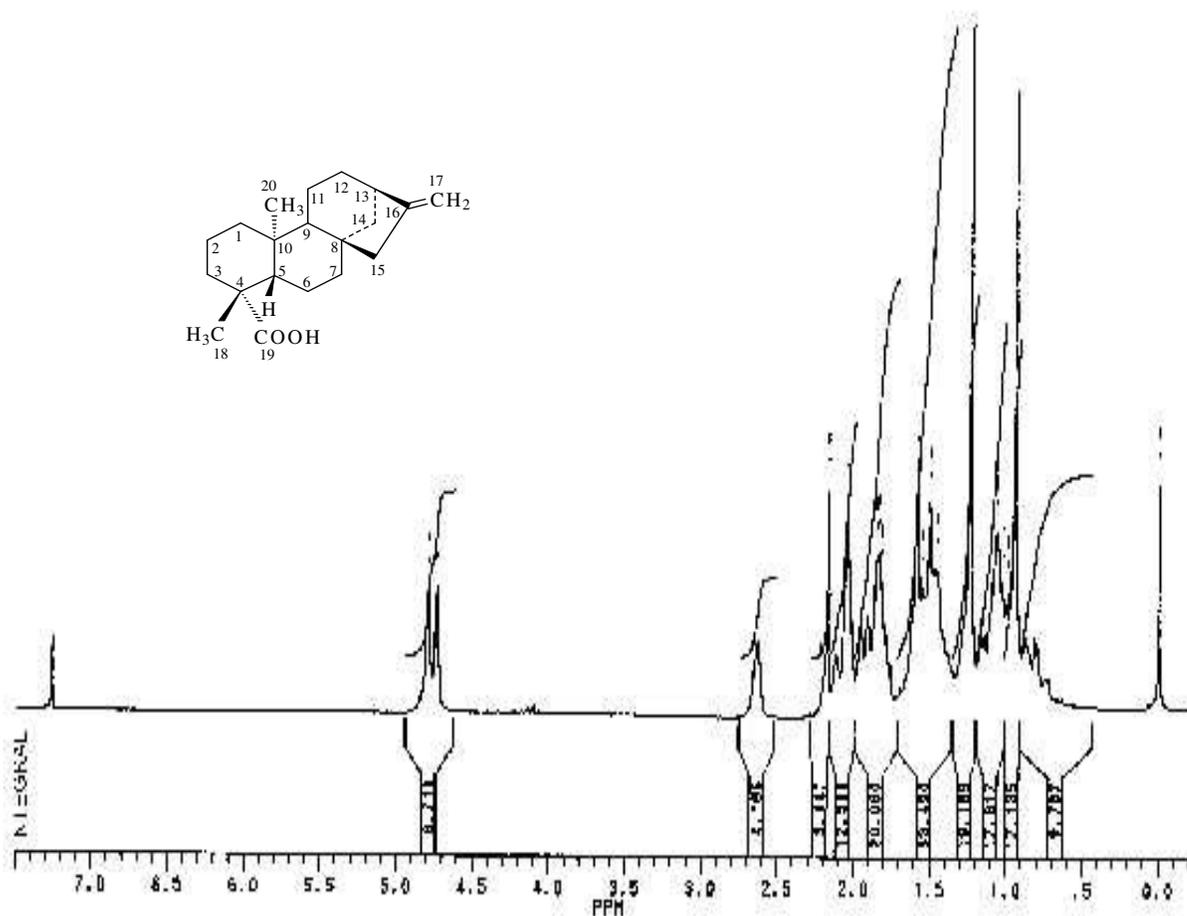
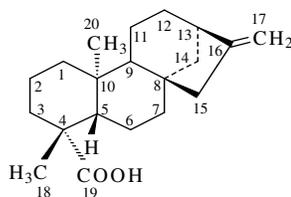


Figura14 - Espectro de RMN ^1H do composto **P3 AC** em CDCl_3

4.1.1.1.E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO (RMN ^{13}C)

Os valores dos deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^{13}C estão de acordo com os relatados na literatura para o ácido caurenóico (RODRIGUES, ALVARENGA, KATO, 1996), conforme **Tabela 15** e **Figura 15** abaixo:

Tabela 15 -Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para P3AC e o Ác. caurenóico (literatura).

. Carbono	P3AC δ (ppm)	Ác.caurenóico (RODRIGUES, ALVARENGA, KATO,1996)
1 – CH ₂	40,69	40,66
2 – CH ₂	18,43	18,4
3 – CH ₂	37,77	37,73
4 – C	43,82	43,72
5 – CH	57,05	57,02
6 – CH ₂	21,82	21,79
7 – CH ₂	44,22	41,25
8 – C	43,82	44,19
9 – CH	55,09	55,06
10 – C	39,68	39,67
11 – CH ₂	19,09	19,06
12 – CH ₂	33,01	33,08
13 – CH	41,27	43,81
14 – CH ₂	39,68	39,67
15 – CH ₂	48,9	48,92
16 – C	155,9	155,8
17 – CH ₂	103,00	102,98
18 – CH ₃	28,96	28,95
19 – C	184,58	184,84
20 – C H ₃	15,58	15,55

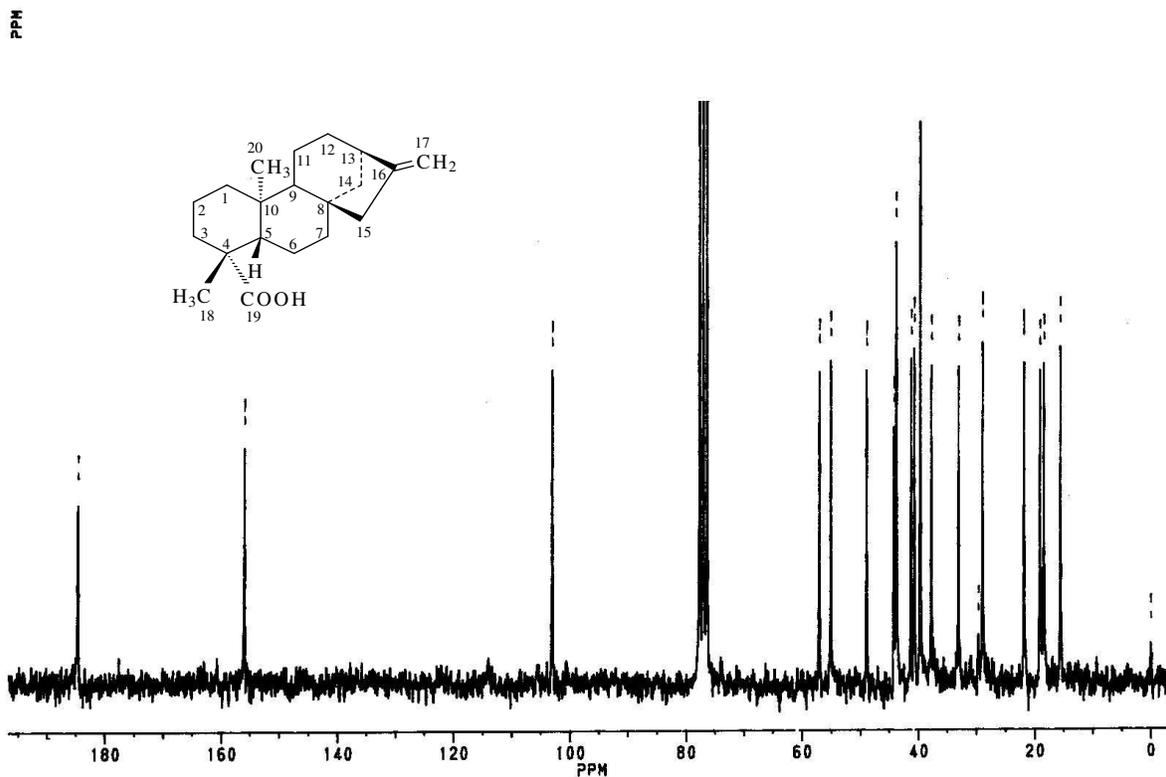


Figura 15 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **P3AC**.

As análises espectroscópicas anteriormente relatadas nos fornecem dados importantes, os quais nos permite elucidar a estrutura química do composto **P3AC**, isolado do precipitado da *Mikania lanuginosa* DC. O espectro de RMN ^{13}C nos revela que o referido composto é constituído por 20 átomos de carbono, apresentando grupos metilas (CH_3), metilênicos (CH_2), metínico (CH) e carbono quartenário (C). O espectro de CG/MS nos sugere fragmentações características de um ácido de peso molecular 302, sendo tal informação confirmada pela espectroscopia de IV.

O ácido caurenóico constitui-se num diterpeno tetracíclico, apresentando um esqueleto básico (-) caureno (ROBINSON, 1980) com cinco carbonos quaternários, três metínicos e nove metilênicos

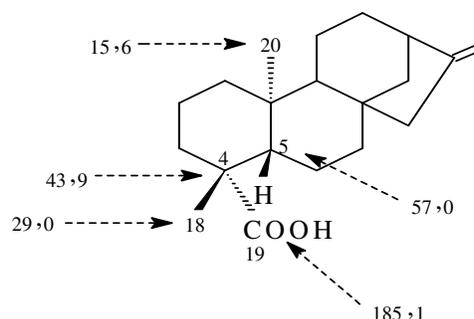


Figura 16 – Dados de deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para o composto **P3AC**.

Comparando-se os resultados obtidos das análises espectroscópicas de CG/EM, IV, RMN ^{13}C e RMN ^1H além do ponto de fusão do composto **P3AC**, com os da literatura, foi possível concluir seguramente que o composto isolado trata-se do ácido ent-caur-16-en-19-óico, ou ácido caurenóico (**8**) (VICHNEWSKI et al.,1977).

4.1.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA MISTURA DE P4ETP

De acordo com descrição feita anteriormente na parte experimental, foi obtido no precipitado, cerca de 200mg de um sólido cristalino, incolor, o qual foi analisado por CG e espectroscopia de IV e RMN. Os dados espectroscópico para **P4 ETP** estão descritos e mostrados abaixo:

4.1.1.2.A ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV)

No espectro de IV (**Figura 17**), além das absorções de grupos metilas e metilenos, observou-se uma banda de absorção em 3442 cm^{-1} , referente as vibrações de deformação axial do grupo OH e banda de absorção de fraca intensidade a 1055 cm^{-1} , correspondendo a OH secundários. Observam-se ainda bandas de absorção de intensidades médias a fracas em 2866 cm^{-1} e em 1464 cm^{-1} e 1378 cm^{-1} , que correspondem a estiramentos de grupo -CH e de -CH_2 . Outra banda de absorção de fraca intensidade em 1638 cm^{-1} , refere-se a deformação de olefinas . Estes dados observados no espectro de IV sendo comparáveis aos citados na literatura (UGAZ, 1994; MALHEIROS, 1995).

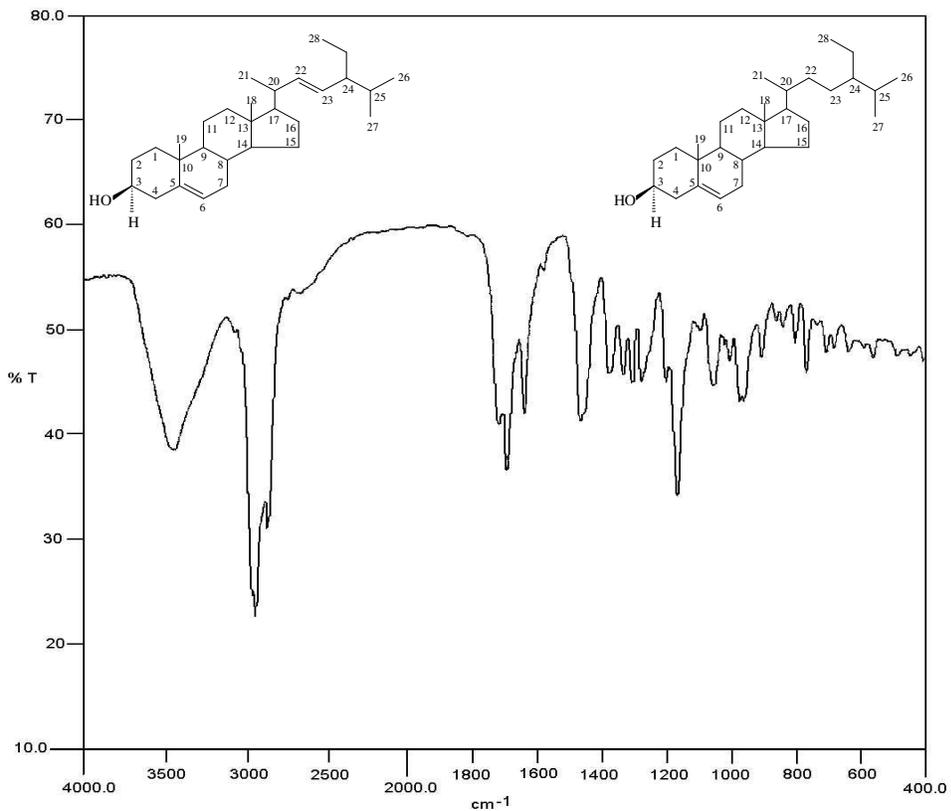


Figura 17 – Espectro de IV da mistura P4 ETP.

4.1.1.2.B ESPECTROSCOPIA DE MASSAS (CG/EM)

A mistura **P4ETP** foi cromatografada em CG/EM, e no cromatograma pode-se verificar a presença de dois compostos (**Figs. 18 a 20**), os quais possuem os seguintes tempos de retenção, **ETP1** com 28,7 min. e **ETP2** com 29,23 min. O espectro de massas para **ETP1**, apresenta o sinal do íon molecular em m/e 412 [M^+ 47 %] e o pico base 55 (100%) e demais fragmentos em 394(12), 379 (7,7), 351(22), 97 (21), 83 (56), 69 (49), 57 (22).

O outro composto, **ETP2**, mostrou o sinal do íon molecular m/e 414 [M^+ 25%] e o pico base em 55 (100%) e os demais fragmentos em: 396 (18,6), 381 (12), 329 (23), 303 (16), 213 (26), 163 (28), 159 (25), 145(38), 133 (28), 107 (49), 95 (52), 81 (66), 69 (59), 57 (91,2).

Um pico normalmente encontrado em álcoois primários é o [$M - 18$] $^+$ e corresponde a perda de água, em virtude da decomposição térmica dos álcoois superiores nas paredes quentes da câmara de injeção.

Outro pico característico dos álcoois que apresentam grupos metilas como ramificações, como os álcoois terpênicos, é o [$M - 33$] $^+$ resultante da perda de CH_3 e H_2O .

Os álcoois cíclicos sofrem fragmentações para formar o cátion $C_6H_{11}O^+$, que por sua vez perde uma molécula de água para formar $C_6H_{10}^+$ e originar o íon $C_3H_5O^+$, por um mecanismo complexo de quebra do anel. Ainda, os álcoois primários mostram, além da quebra C - C próxima ao átomo de hidrogênio, uma série homóloga de picos cuja intensidade decresce progressivamente, resultante da clivagem das ligações de C - C (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991).

Os dados obtidos nos espectros de massas para os compostos **ETP1** e **ETP2** sugerem que são os fitoesteróis estigmasterol e o β - sitosterol, respectivamente, sendo estes concordantes

com os da literatura (MACARI, EMERENCIANO, FERREIRA, 1990; NIERO, 1993; MALHEIROS, 1995; AI, 1997; CARDOSO, VILEGAS, HONDA, 1998).

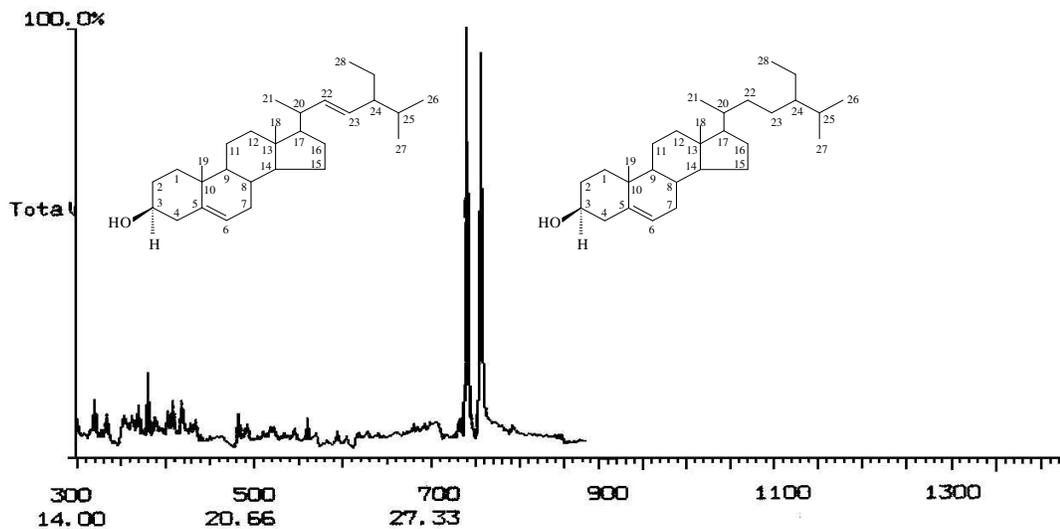


Figura 18 - Cromatograma dos compostos ETP1 e ETP2

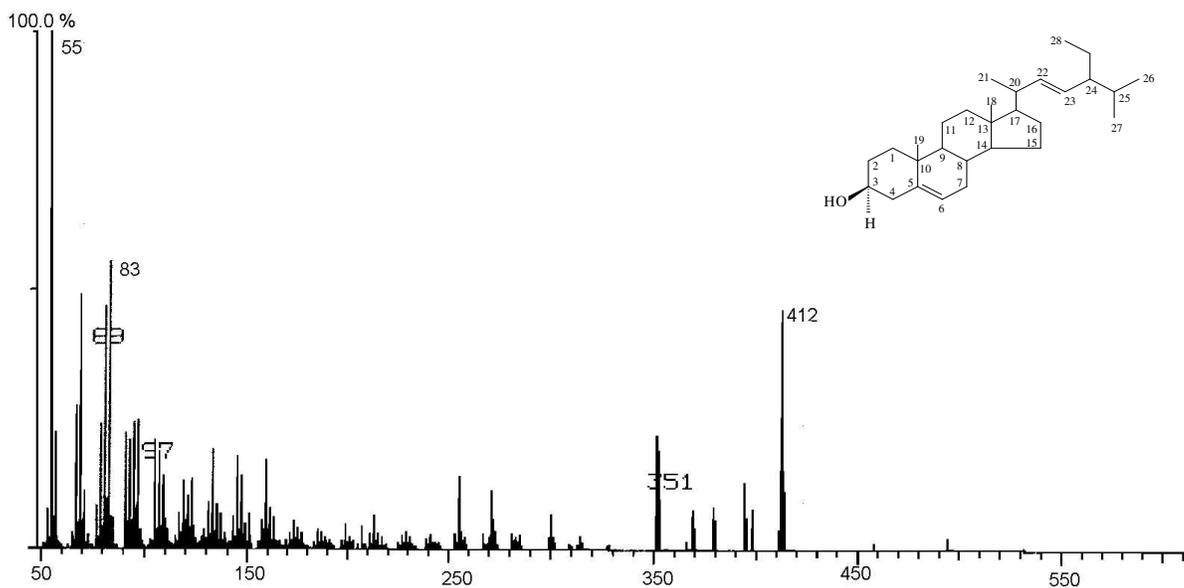


Figura 19 – Espectro de massas (70 eV) do composto ETP1.

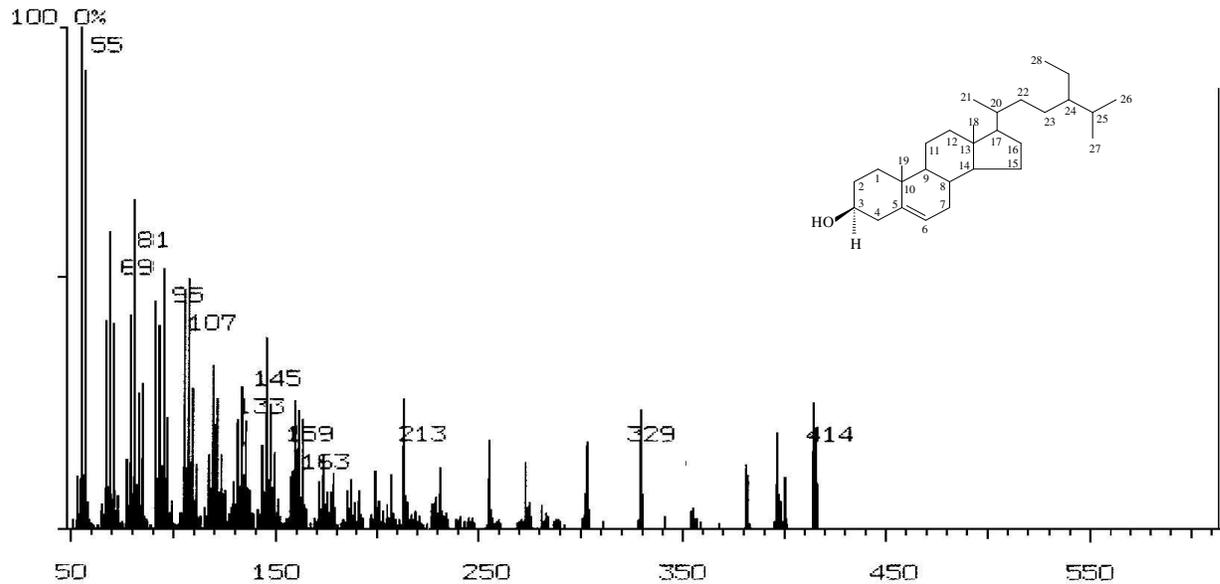


Figura 20– Espectro de massas (70 eV) do composto **ETP2**.

4.1.1.2.C RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN ^1H)

O espectro de RMN ^1H da mistura **ETP1** e **ETP2** realizado pelo Prof. Franco Delle Monache (Itália), apresenta os seguintes deslocamentos químicos em campo alto: 0,68 ppm (s), 0,78 - 0,9 ppm (m) e 1,01 ppm (s) correspondem as absorções dos prótons metílicos de C -18 e C - 19 da mistura de esteróides. Um sinal em 3,47 – 3,58 (m) é atribuído aos prótons ligados a OH de C - 3 e um múltiplo em 4,9 – 5,02 ppm e em 5,11 – 5,19 ppm atribuídos aos prótons dos C - 22 e C - 23 do composto **ETP1**. Observa - se ainda um deslocamento químico em campo baixo, na região de absorção dos prótons olefínicos, em 5,35 ppm ($J = 5,22\text{Hz}$), um dubleto atribuído ao H - 6 da mistura. Estes valores coincidem com os dados da literatura (OLIVEIRA, et al. 1984; MALHEIROS, 1995; CARVALHO, et al. 1998) (**Figura 21**).

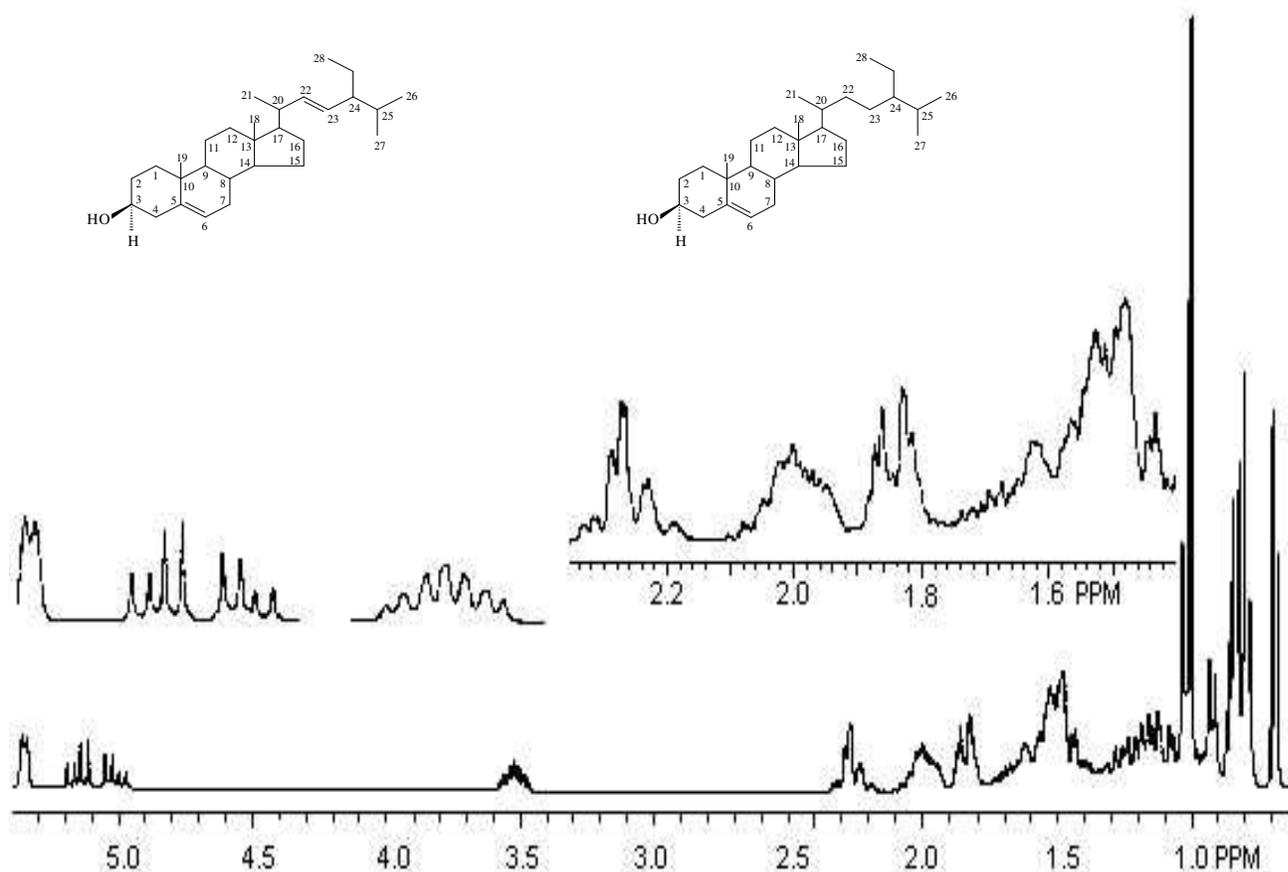


Figura 21 – Espectro de RMN ^1H da mistura **ETP1** e **ETP2**.

4.1.1.2.D RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE ^{13}C (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da mistura de esteróides **ETP 1** e **ETP 2** foi feito na Itália, pelo Prof. Franco Delle Monache, no qual pode-se observar os deslocamentos químicos para a mistura, os quais são demonstrados na **Tabela 16** e **Figura 22**, que por comparação com os dados da literatura (MALHEIROS, 1995; SCHUQUEL, MALHEIROS, VIDOTTI, 1996), foi possível

confirmar a estrutura química para os dois compostos, sendo estes concordantes com os dados obtidos por CG/MS e RMN de próton.

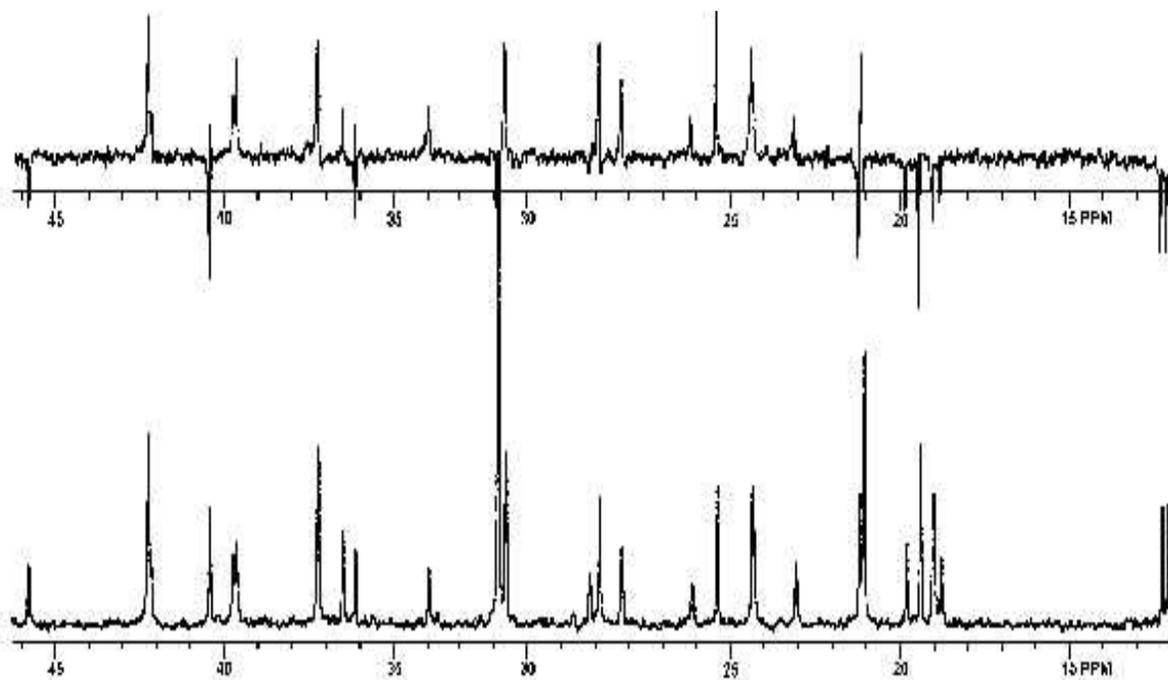
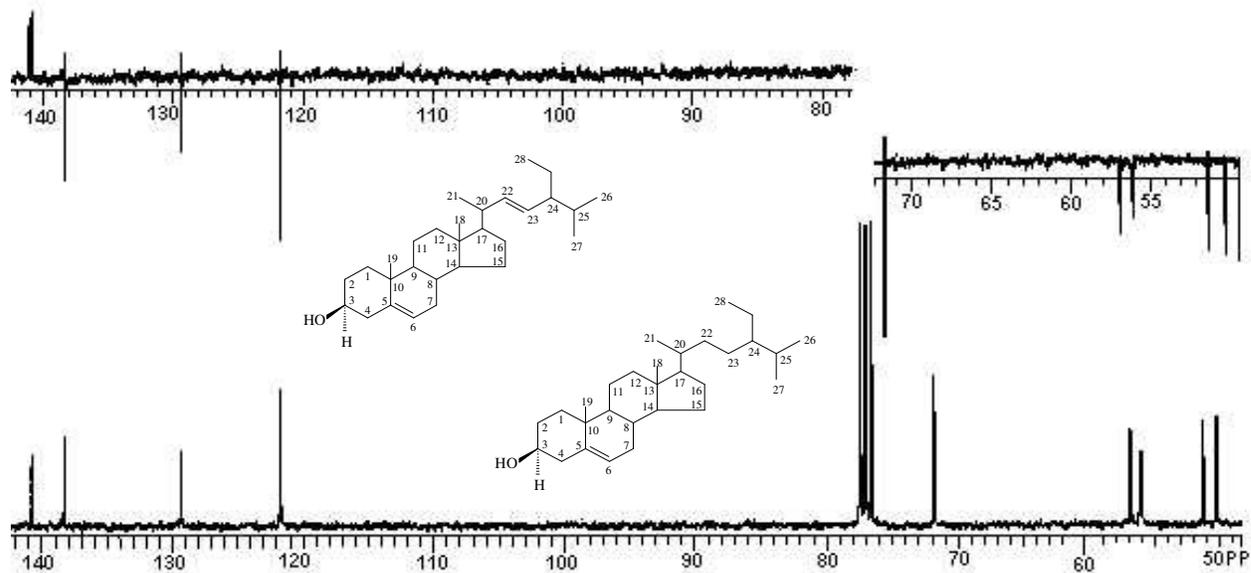


Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C / DEPT da mistura ETP 1 e ETP 2

Tabela 16 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para **ETP1** e **ETP2** comparados com os valores da literatura (MALHEIROS, 1995).

<i>Carbono</i>	$\delta(\text{DEPT})$ <i>ETP1</i>	$\delta(\text{DEPT})$ <i>ETP2</i>	<i>Estigmasterol</i> (MALHEIROS, 1995)	<i>Sitosterol</i> (MALHEIROS, 1995)
C – 1	37,28 (CH ₂)	37,28 (CH ₂)	37,24	37,24
C – 2	31,69 (CH ₂)	31,69 (CH ₂)	31,64	31,64
C – 3	71,81 (CH)	71,81 (CH)	71,80	71,80
C – 4	42,33 (CH ₂)	42,33 (CH ₂)	42,27	42,27
C – 5	140,75 (C)	140,75 (C)	140,74	140,74
C – 6	121,69 (CH)	121,69 (CH)	121,71	121,71
C – 7	31,88 (CH ₂)	31,88 (CH ₂)	31,90	31,90
C – 8	31,88 (CH)	31,88 (CH)	31,88	31,88
C – 9	50,18 (CH)	50,18 (CH)	50,12	50,12
C – 10	36,53 (C)	36,53 (C)	36,50	36,50
C – 11	21,10 (CH ₂)	21,10 (CH ₂)	21,08	21,08
C – 12	39,71 (CH ₂)	39,80 (CH ₂)	39,67	39,76
C – 13	42,23 (C)	42,23 (C)	42,31	42,20
C – 14	56,88 (CH)	56,790 (CH)	56,85	56,75
C – 15	24,37 (CH ₂)	24,31 (CH ₂)	24,35	24,29
C – 16	28,91 (CH ₂)	28,25 (CH ₂)	29,69	28,24
C – 17	55,99 (CH)	56,09 (CH)	55,93	56,04
C – 18	11,99 (CH ₃)	11,99 (CH ₃)	11,97	11,84
C – 19	19,40 (CH ₃)	19,40 (CH ₃)	19,38	19,38
C – 20	40,47 (CH)	36,16 (CH)	40,48	36,13
C – 21	21,22 (CH ₃)	21,22 (CH ₃)	21,20	19,97
C – 22	138,30 (CH ₂)	33,97 (CH)	138,30	33,94
C – 23	129,31 (CH ₂)	26,15 (CH)	129,26	26,04
C – 24	51,25 (CH)	45,88 (CH)	51,22	45,83
C – 25	31,93 (CH)	31,93 (CH)	32,42	26,03
C – 26	18,79 (CH ₃)	18,79 (CH ₃)	18,76	18,76.
C – 27	18,99 (CH ₃)	19,81 (CH ₃)	19,02	19,81
C – 28	25,40 (CH ₂)	23,11 (CH ₂)	25,39	23,05
C – 29	12,24 (CH ₃)	12,03 (CH ₃)	12,23	12,03

A mistura de esteróides **P4ETP** foi identificada por análises espectroscópicas e por comparação com os dados da literatura (MALHEIROS, 1995; SCHUQUEL, MALHEIROS, VIDOTTI, 1996). Após as análises e comparações foi possível elucidar de forma inequívoca as

estruturas químicas dos dois esteróides, como sendo: **ETP 1** – estigmasterol e **ETP 2** - β - sitosterol.

4.1.1.3 ANÁLISE DA MISTURA P4 AGP

Como mencionado anteriormente na parte experimental, no processo de purificação da sub-fração **P4** do precipitado, nas frações, 28 a 34, ocorreu a formação de um resíduo gelatinoso e de aspecto gorduroso, o qual foi denominado de **AGP**. Após análises espectroscópicas de IV e CG/EM, verificou-se que o resíduo **AGP** é constituído por uma mistura complexa de compostos.

4.1.1.3.A ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE INFRAVERMELHO (IV)

O espectro de IV (**Figura 23**) mostra uma banda larga de absorção em 3328 cm^{-1} referente a deformação axial e uma banda de absorção de intensidade média em 1704 cm^{-1} para deformação axial do grupo carbonila. O grupo $\text{C} = \text{O}$ nos ácidos alifáticos saturados está na região de $1720 - 1706\text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991). Observam-se ainda duas bandas de absorção de intensidade forte em 2.920 e 2.850 cm^{-1} , relacionadas a deformação axial de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$. Em 1464 e 1380 cm^{-1} , são observadas duas bandas de absorção referentes a deformação angular de grupos $-\text{CH}_2$ e CH_3 , respectivamente. O espectro de IV mostrou em 728 cm^{-1} uma banda da deformação angular assimétrica no plano de $-\text{CH}_2$, de cadeia linear de sete ou mais átomos de carbono (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991).

O padrão de absorção no IV apresenta um perfil característico de ácidos graxos, o qual será confirmado por espectroscopia de massas.

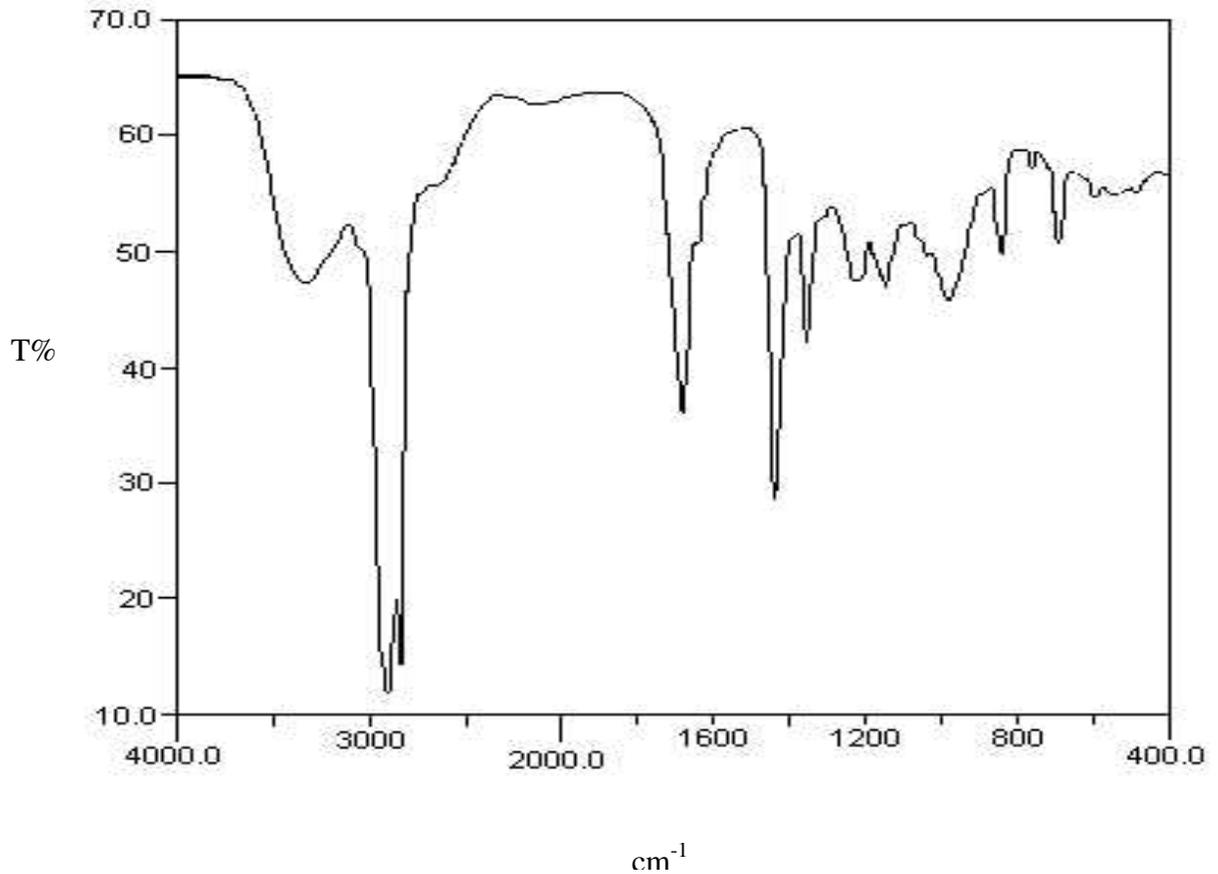


Figura 23 – Espectro de IV do **P4 AGP**

4.1.1.3.B ESPECTROSCOPIA DE MASSAS (CG/EM)

A mistura foi cromatografada em CG/EM, e pode-se observar no cromatograma abaixo (**fig 24**), a presença de dez compostos majoritários, com seguintes tempos de retenção: **P4GP – A** (11,73 min); **P4AGP – B** (15,13 min); **P4AGP - C** (16,53 min); **P4AGP – D** (19,03 min);

P4AGP - E (20,70 min); **P4AGP - F** (22,30 min); **P4AGP - G** (22,76 min); **P4AGP - H** (25,86 min); **P4AGP - I** (28,60 min); **P4AGP - J** (34,93 min).

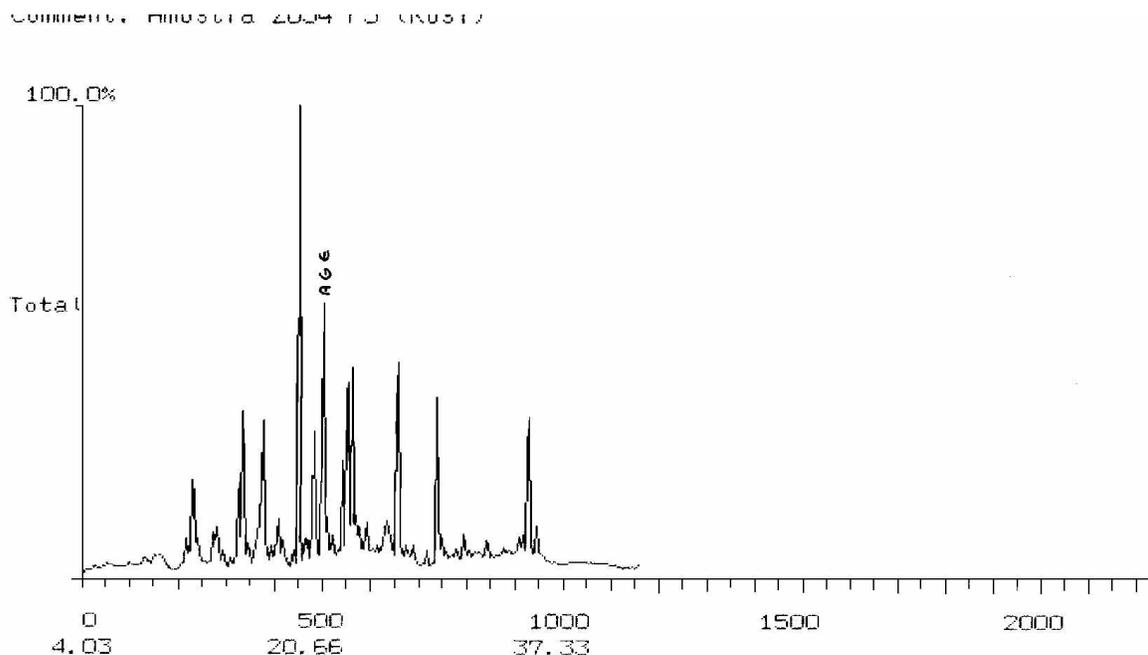


Figura 24 – Cromatograma do CG/EM da mistura **P4 AGP**.

O espectro de massas para o composto **P4AGP - E**, mostra o sinal do íon molecular em m/e 256 [M^+ 5,3%], o pico base em m/e 73 (100%) e os demais fragmentos, em: 213(7,5), 199(3,2), 185(5,3), 171(5,3), 157(6,4), 143(4,3), 129 (23,6), 115(10,7), 101(16), 83(17), 60(97), 57(89), 55(74), (**Figura 26**).

Os íons de m/e 213, 185, 171, 157, 129, foram propostos como sendo os fragmentos correspondentes a [M^+ - $(CH_2)_4 CH_3$], [M^+ - $CH_3 (CH_2)_4 CO$], [M^+ - $CH_3 (CH_2)_5 CO$], [M^+ - $CH_3 (CH_2)_6 CO$], [M^+ - $(CH_2)_9 CH_3$] (LAVERDE –JÚNIOR, 1995).

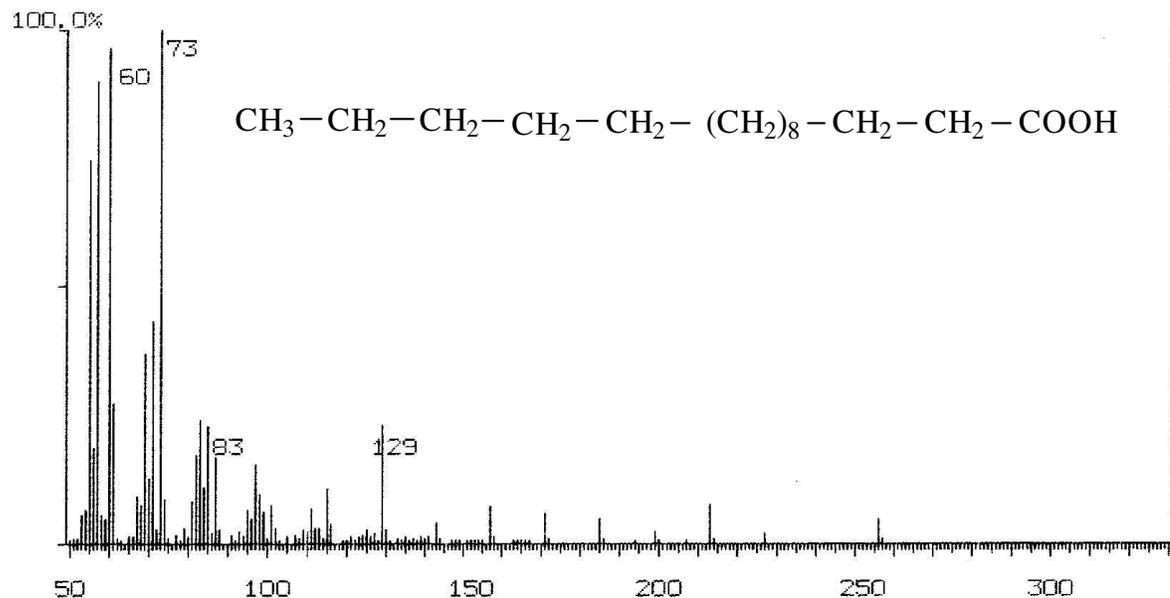


Figura 26 – Espectro de massas do composto **P4 AGP – E**.

4.1.2 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO SGHD DA FRAÇÃO HEXÂNICA E DCM

O composto **SGHD** foi isolado da fração hexânica, nos frascos 60 a 67 (subfração 9) e na fração diclorometano, nos frascos 72 a 75 (subfração 8) como um sólido, de coloração esbranquiçada, em meio a mistura de impurezas. O processo de purificação ocorreu por recristalização, utilizando-se uma mistura de acetona/metanol em partes iguais, obtendo-se 6,0mg na fração hexânica e 8mg na fração diclorometano, totalizando 14mg. Este composto foi analisado por CCD comparativa, utilizando-se padrão autêntico do esteróide β - sitosterol glicosilado e análises espectroscópicas de IV e CG/EM.

4.1.2.A ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV)

No espectro de IV (**figura 27**), além das bandas de absorções referentes a deformações axiais em 2960 e 2868 cm^{-1} das metilas e metilenos, observa-se uma banda larga e de intensa absorção em 3422 cm^{-1} , resultante das vibrações de deformação axial do grupo OH e em 1636 cm^{-1} uma banda larga e de fraca absorção, referente a deformação axial das olefinas (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991). Observou-se também em 1072 e 1024 cm^{-1} bandas referentes à deformação axial.

As bandas de absorções em 3422 cm^{-1} e 1072 – 1024 cm^{-1} são indicativas da unidade glicosídica. Portanto, o perfil das absorções apresentado no espectro de IV, sugerem que o composto isolado **SGHD**, trata-se de um esteróide glicosilado (SCHUQUEL, MALHEIROS, VIDOTTI, 1996).

Figura 27 – Espectro de IV do composto SGHD em filme KBr

4.1.2.B ESPECTROSCPIA DE MASSAS (CG/EM)

O espectro de massas do composto **SGHD** (**figura 28**) não revelou o pico do íon molecular, característico da classe de compostos esteroidais hidroxilados, em virtude da rápida decomposição do íon molecular protonado (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991). O espectro apresenta o pico base em m/e 55 e as demais fragmentações em: 397 (17,4), 396 (29,3), 395 (14), 255 (13), 161 (14), 159 (15), 147 (21), 145 (24), 121 (20), 107 (23), 105 (26), 97 (31), 95 (41), 93 (28), 91 (28), 83 (72), 81 (61), 69 (77), 57 (98). O pico m/e 397 é indicativo da fragmentação da unidade glicosídica para compostos com esqueleto esteroidal [MALHEIROS, 1995; SCHUQUEL, MALHEIROS, VIDOTTI, 1996].

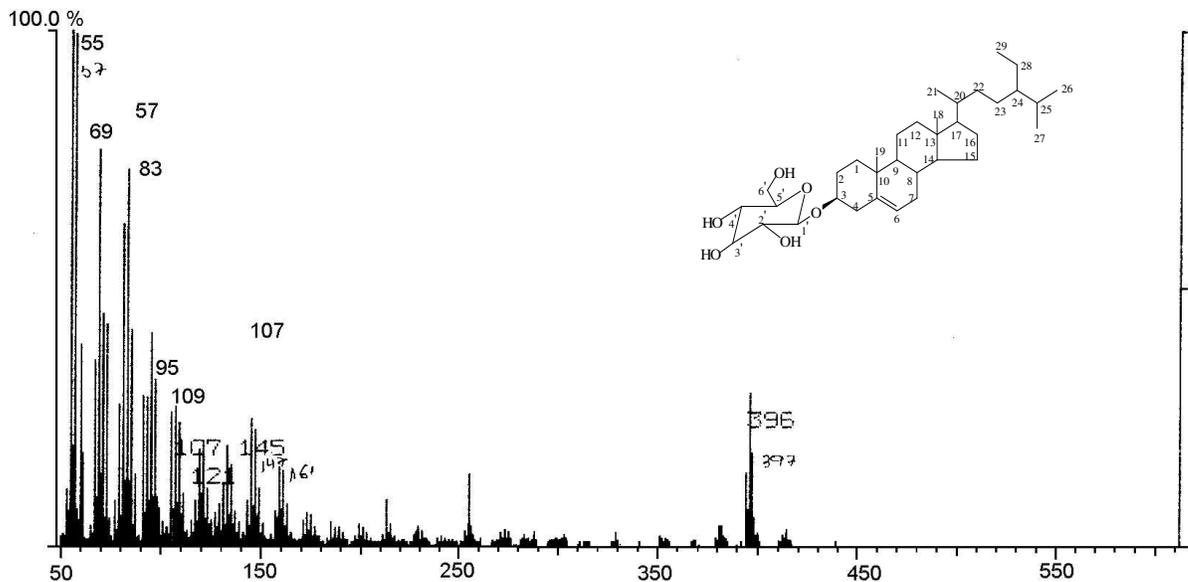
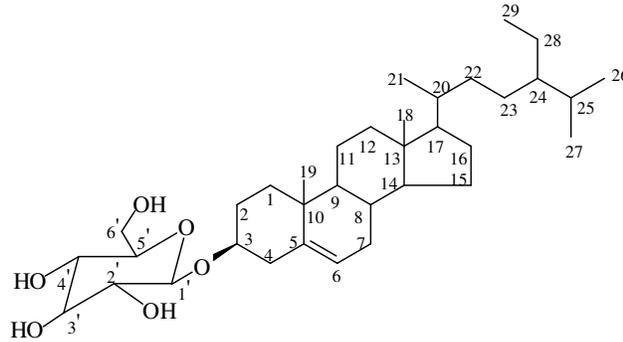


Figura 28 – Espectro de massas (70 eV) do composto **SGHD**.

Os dados de espectrometria de massas obtido coincidem com os da literatura e permitiu-nos concluir que o composto isolado **SGHD** é o 3, O- β -glicopiranosil 24-etil-colest-5-enol (**37**).



(**37**) β -sitosterol-glicosilado(MALHEIROS,1995)

4.2 CONTROLE DE QUALIDADE

A utilização de plantas com fins medicinais é uma prática difundida em todo o mundo. Atualmente, devido a diversos fatores, como alto custo dos medicamentos industrializados ou o próprio modismo, verifica-se uma grande expansão na utilização e no comércio de plantas medicinais, drogas vegetais e produtos fitoterápicos. No entanto, a falta de padronização e a má qualidade do material vegetal e extratos vegetais comercializados no Brasil constituem um problema antigo que vem sendo discutido, há anos (BRANDÃO, 1997). Esta padronização deve ser realizada por métodos simples, rápidos e eficientes, além de procedimentos mais sofisticados tais como, CCD, CG/FID, HPLC de modo a permitir a identificação dos princípios ativos

presentes nas plantas medicinais e extratos vegetais (VILEGAS, et al., 1995; POZETTI, 1995; JACOME, et al., 1998).

Segundo BRESCIANI, et al. (1999) a cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização de chama, tem prestado um grande auxílio na padronização de extratos de plantas, uma vez que é capaz de mostrar o perfil cromatográfico, tornando possível à averiguação das substâncias normalmente presentes e/ou responsáveis pela atividade farmacológica, mesmo em pequenas concentrações.

As análises cromatográficas realizadas por CG/FID comparativas com padrão autêntico de ácido caurenóico, conforme metodologia anteriormente descrita, usando os extratos diclorometano obtidos dos diversos órgãos da *Mikania lanuginosa* DC, coletados nas 4 estações do ano, permitiram-nos concluir que o ácido caurenóico (AC) é o principal constituinte químico ativo e está presente em todos os órgãos vegetais da espécie em estudo. Entretanto, as suas concentrações variam nas diferentes épocas do ano e nas diferentes partes da planta.

4.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA NAS 4 ESTAÇÕES DO ANO

Através das análises por cromatografia em camada delgada, pode-se observar nas cromatoplasmas (**figuras 29 a 32**), a presença do ácido caurenóico nos diversos órgãos vegetais da espécie medicinal em estudo, como nas raízes (**RA**), nos caules (**CA**), e nas folhas (**FLA**) em todas as épocas do ano, além das flores (**FLO**) no inverno. Entretanto, as concentrações deste diterpeno variam nestes órgãos vegetais dependendo das épocas do ano (**tabelas 17 a 20**).

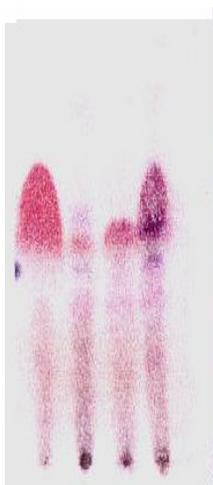


Fig. 29 – Verão

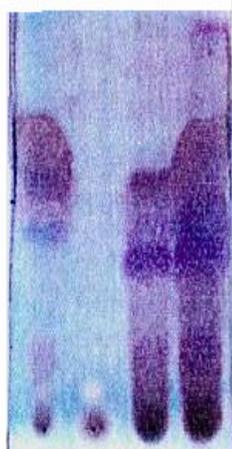


Fig. 30 – Outono

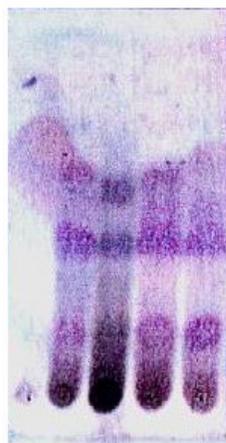


Fig. 31 – Inverno



Fig. 32 – Primavera

4.2.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS

A análise quantitativa do ácido caurenóico foi realizada apenas com o extrato diclorometano, uma vez que este composto é o majoritário nesta fração e com atividade analgésica.

Neste estudo, a curva de calibração linear foi obtida através da área dos picos do ácido caurenóico (**Y**), usadas como padrão interno, versus a quantidade injetada (**X** µg/mL) (KNÖSS & ZAPP, 1997; JÁCOME, et al., 1999).

Os valores obtidos para **A** e **B** na foram respectivamente 0,00478 e 0,0899.

$$Y = A + Bx$$

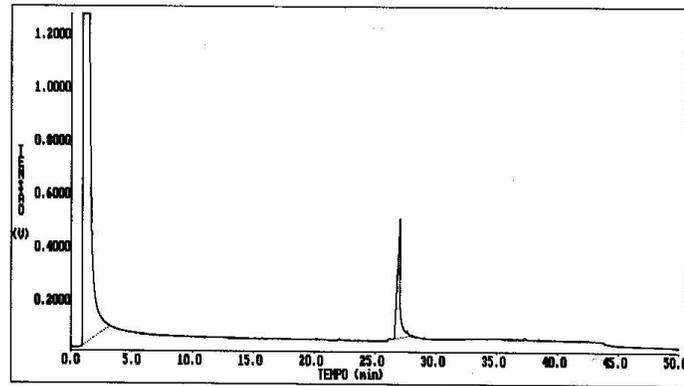


Figura 33 – Cromatograma obtido por CG do Ác. Caurenóico isolado da *M. lanuginosa*.

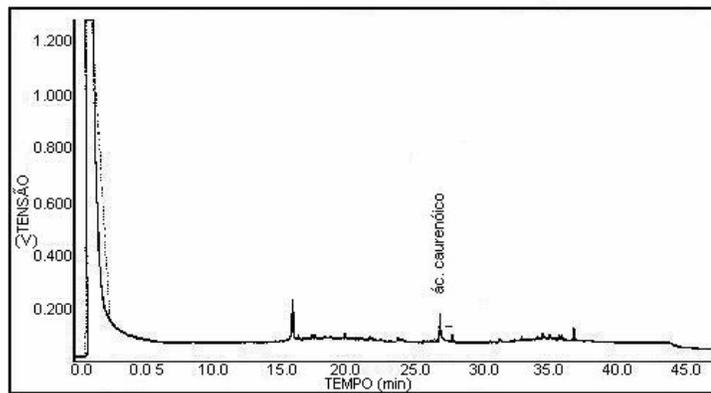


Figura 34 – Cromatograma do extrato DCM das folhas da *M. lanuginosa* coletadas no verão.

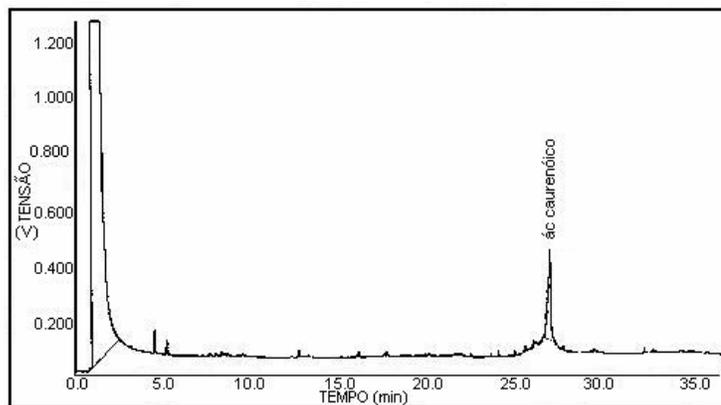


Figura 35 – Cromatograma do extrato DCM dos caules da *M. lanuginosa* coletados no verão.

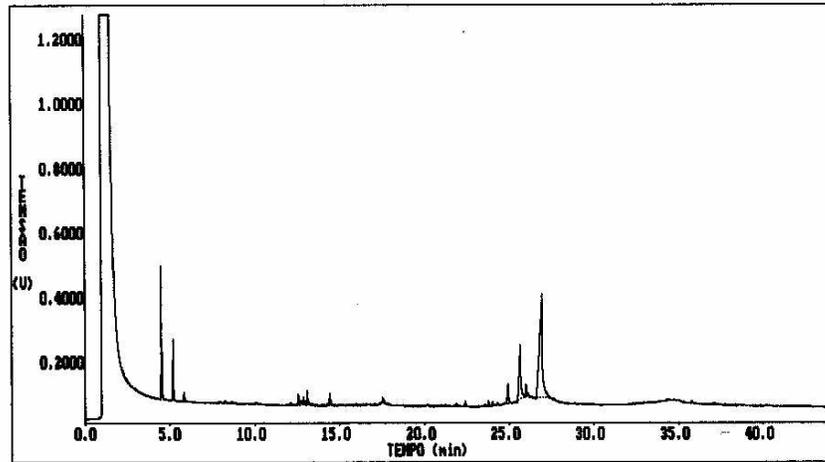


Figura 36 – Cromatograma do extrato DCM das raízes de *M. lanuginosa* coletados no verão.

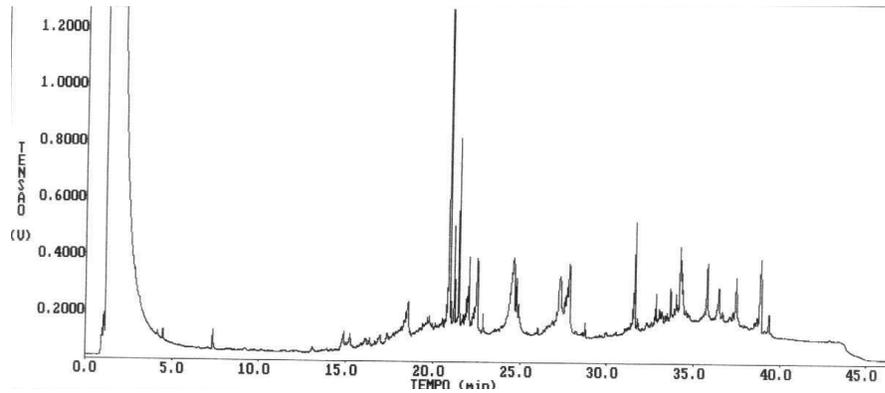


Figura 37 – Cromatograma do extrato DCM das folhas de *M. lanuginosa* coletados no outono.

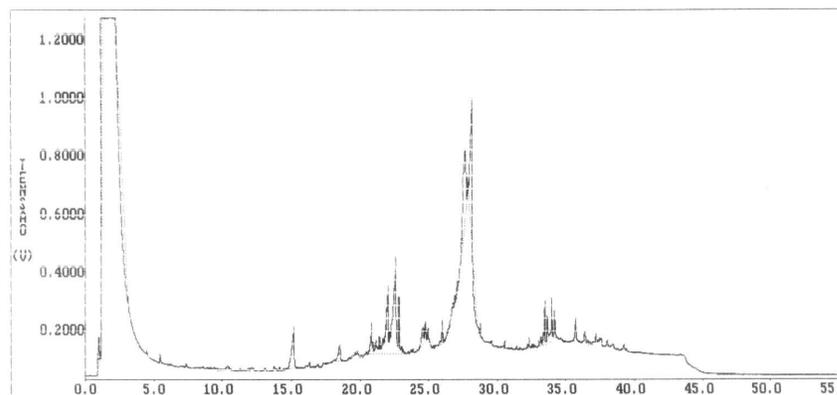


Figura 38 – Cromatograma do extrato DCM do caule de *M. lanuginosa* coletados no outono.

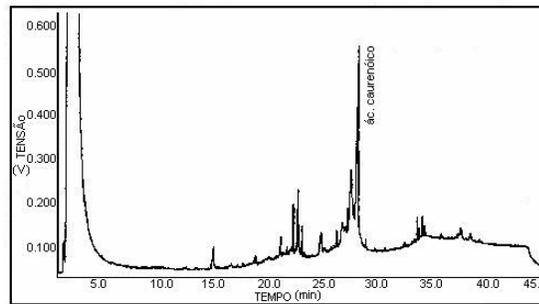


Figura 39 – Cromatograma do extrato DCM das raízes de *M. lanuginosa* coletadas no outono.

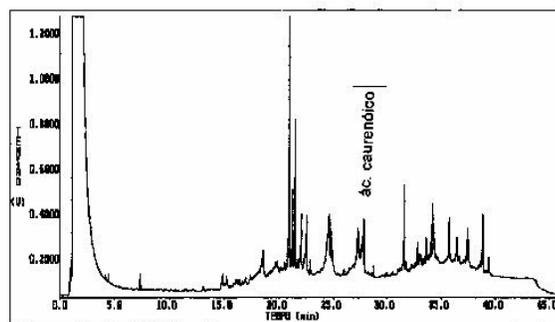


Figura 40 -Cromatograma do extrato DCM das folhas de *M. lanuginosa* coletadas no inverno.

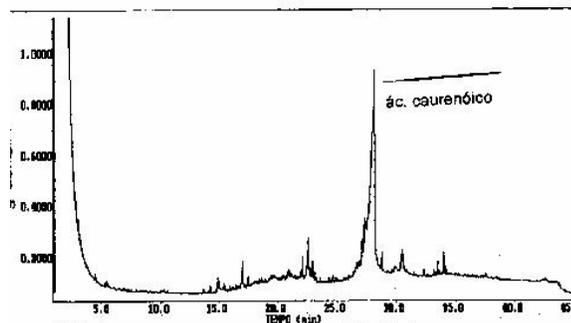


Figura 41 – Cromatograma do extrato DCM do caule de *M. lanuginosa* coletados no inverno.

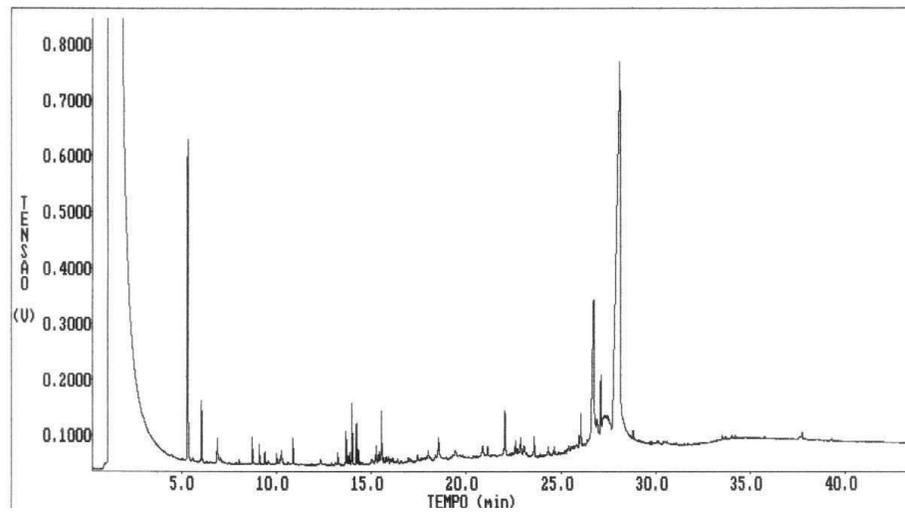


Figura 42 – Cromatograma do extrato DCM das raízes de *M. lanuginosa* coletadas no inverno.

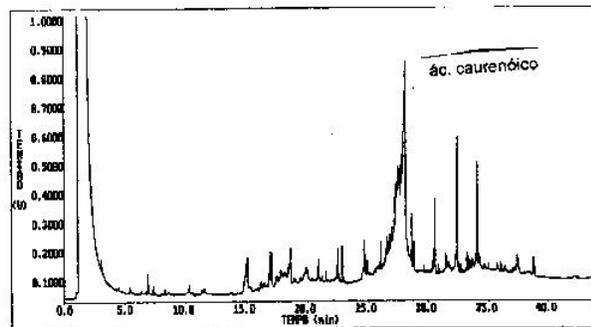


Figura 43 – Cromatograma do extrato DCM das flores de *M. lanuginosa* coletadas no inverno.

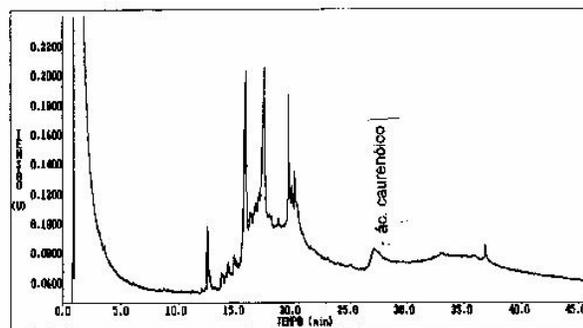


Figura 44 - Cromatograma do extrato DCM das folhas de *M. lanuginosa* coletadas na primavera.

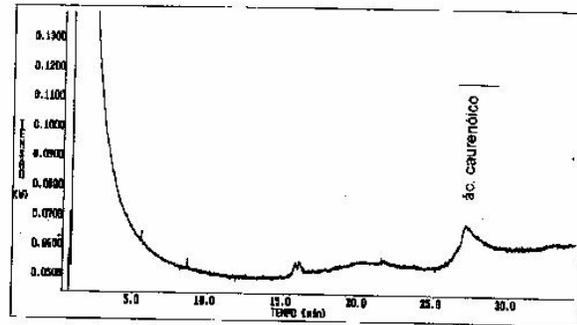


Figura 45 – Cromatograma do extrato DCM do caule de *M. lanuginosa* coletadas na primavera.

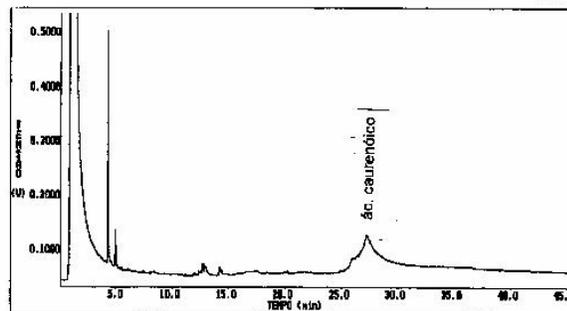


Figura 46 – Cromatograma do extrato DCM das raízes de *M. lanuginosa* coletadas na primavera.

4.2.2.A CONCENTRAÇÃO DO ÁC. CAURENÓICO NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO.

As análises quantitativas realizadas por CG/FID, permitiu-nos identificar e calcular as concentrações do ácido caurenóico no extrato DCM dos diversos órgãos da *Mikania lanuginosa*

DC, através do tempo de retenção (TR) do ácido caurenóico no extrato em comparação com o T.R. do padrão do ácido caurenóico - 27,875 min e área do pico (AP) 30,655 (**Tabelas 17 a 20**).

Tabela 17 - Comparação da concentração de ácido caurenóico nos órgãos vegetais de *Mikania lanuginosa* DC no verão.

Órgão Vegetal	Amostra AP	Conc. mg/g	%
Raiz	38,30	0,43	0,043
Caule	35,57	0,02	0,002
Folha	7,33	0,041	0,0041

Tabela 18 - Comparação da concentração de ácido caurenóico nos órgãos vegetais de *Mikania lanuginosa* DC no outono.

Órgão Vegetal	Amostra AP	Conc. mg/g	%
Raiz	27,93	0,91	0,091
Caule	28,16	0,63	0,063
Folha	27,88	0,086	0,0086

Tabela 19 - Comparação da concentração de ácido caurenóico nos órgãos vegetais de *Mikania lanuginosa* DC no inverno.

Órgão Vegetal	Amostra TR	Conc. mg/g	%
Raíz	40,98	1,595	0,160
Caule	98,74	1,65	0,165
Folha	7,23	0,080	0,008
Flor	54,60	0,61	0,061

Tabela 20 – Comparação das concentrações do ác. caurenóico nos diferentes órgãos da *Mikania lanuginosa* DC na primavera.

Órgão Vegetal	Amostra AP	Conc. mg/g	%
Raiz	25,124	0,140	0,0014
Caule	1,223	0,007	0,0007
Folha	2,573	0,014	0,0014

A **figura 47** nos mostra um gráfico comparativo das diferentes concentrações do marcador químico, o ácido caurenóico, presentes nos diversos órgãos vegetais da *Mikania lanuginosa* DC, nas quatro estações do ano.

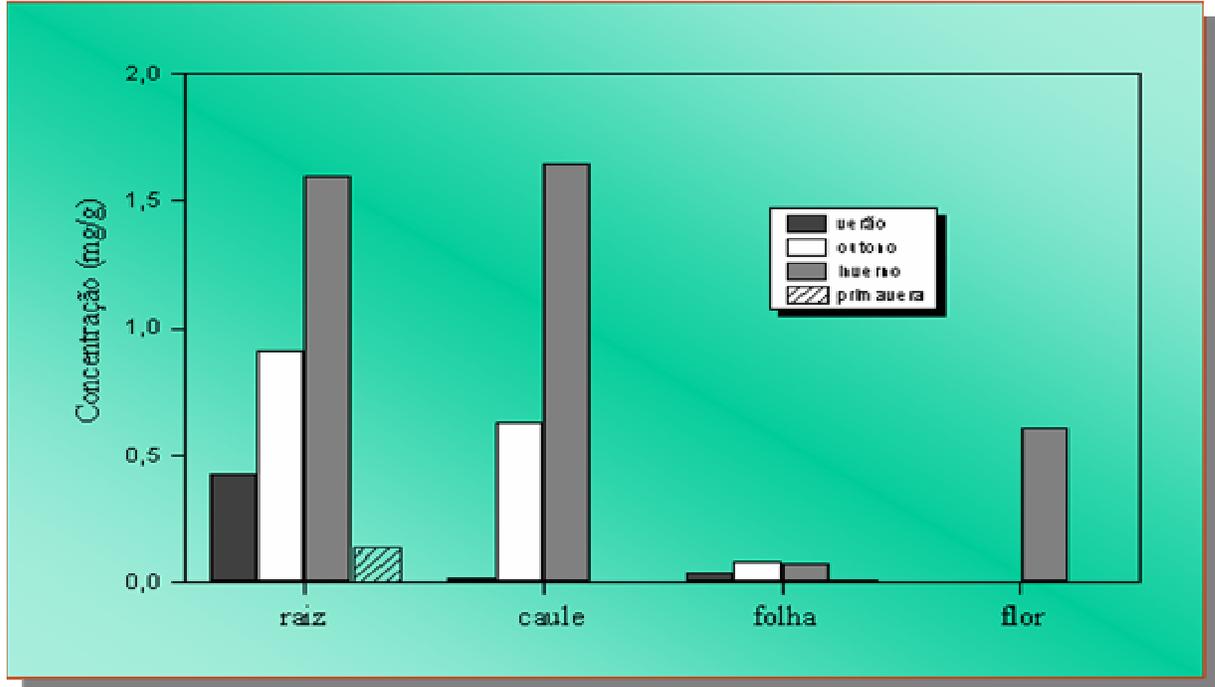


Figura 47. Gráfico comparativo dos diferentes órgãos da *Mikania lanuginosa* nas quatro estações do ano

Pelo exposto nas tabelas e gráfico acima, podemos observar que a concentração do ácido caurenóico presente na espécie vegetal em estudo, no período do verão é maior nas raízes, seguida das folhas, e por último nos caules. No outono as concentrações deste diterpeno praticamente dobram, estando em maior quantidade nas raízes, depois nos caules e finalmente nas folhas.

Entretanto, o período do inverno culmina com os maiores teores do ácido caurenóico, sendo encontrado em maior concentração nos caules, depois nas raízes e flores e por último nas folhas.

Na primavera a concentração deste diterpeno decresce sensivelmente, estando este caureno mais concentrado nas raízes, seguido das folhas e sendo encontrado apenas traços nos caules.

É muito provável que o decréscimo da concentração do ácido caurenóico nos órgãos vegetais da *Mikania lanuginosa* DC na primavera, ocorra pela transformação biossintética deste diterpeno, nas Giberelinas (GA). Conforme foi demonstrado no Capítulo 2 (**figura 4, ver p. 42**), os caurenos e seus produtos de oxidação, como o ácido caurenóico; caurenol e caurenal são os precursores biossintéticos imediatos das giberelinas, através de reações que ocorrem no metabolismo secundário do vegetal (FERRI,1979). Uma das mais importantes propriedades fisiológicas das giberelinas são no crescimento, especialmente no alongamento dos caules. Esta atividade é tanto mais intensa, em se tratando de plantas trepadeiras (FERRI, 1979).

A espécie vegetal em estudo é denominada popularmente de Cipó-cabeludo (REITZ, 1989). Tal denominação deve-se ao fato, desta espécie medicinal apresentar o caule do tipo subarbusto, perene e trepador, semelhante a um cipó, atingindo muitos metros de comprimento e ser sensível à geada (CORRÊA, 1981). Portanto, para o desenvolvimento dos caules e folhas, é necessário à presença de substâncias que estimulem a proliferação celular por mitoses sucessivas e promovam o alongamento das células nos tecidos meristemáticos, resultando no alongamento do caule, isto é, na formação do cipó.

Sendo assim, podemos concluir que o órgão vegetal da *Mikania lanuginosa* DC, o qual deverá ser coletado para fins medicinais ou como matéria-prima na indústria de fitoterápicos, são os caules, colhidos no período do inverno. Não aconselha-se a coleta das raízes, apesar da elevada concentração de ácido caurenóico nele armazenada. As raízes exercem funções vitais no vegetal, que são: fixação das plantas no solo e a absorção de água e nutrientes minerais do solo

(AMABIS & MARTHO, 1985). A sua falta, mesmo que parcial provocará um abalo na vida do vegetal, levando-o a morte.

4.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 ATIVIDADE ANALGÉSICA

O presente estudo demonstrou claramente que as frações diclorometano e hexânica obtidas a partir do extrato etanólico a 80% das partes aéreas da *Mikania lanuginosa* DC, causaram um significativo efeito antinociceptivo no modelo de dor induzida pela formalina, a qual evidencia as duas fases de dor, que são: 1ª fase = dor neurogênica e 2ª fase = dor inflamatória (CORRÊA & CALIXTO, 1993). Neste teste, a fração diclorometano inibiu significativamente a primeira fase da dor (dor neurogênica), reduzindo 49,0% o tempo de lambidas ou mordidas das patas posteriores direita e esquerda dos ratos, na dosagem de 100 mg/kg via oral, apresentando indicativo de significância de ** $P < 0,01$ quando comparado com o controle. A fração hexânica inibiu principalmente a segunda fase da dor (dor inflamatória), reduzindo 55,9 % o tempo de lambidas ou mordidas das patas posteriores direita e esquerda dos ratos, quando administrado 100 mg/kg via oral, apresentando indicativo de significância de * $P < 0,05$ comparados com o controle, conforme **figura 48** abaixo demonstrada. Atribui-se a atividade analgésica desta espécie medicinal em virtude da presença do ácido caurenóico e esteróides.

BLOCK e cols. (1998) demonstraram “in vivo” a potente atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico da *Wedelia paludosa* DC, no qual foi encontrado o ácido caurenóico,

estigmasterol e luteolina, utilizando o modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Tal extrato mostrou ser mais ativas que as drogas analgésicas: ácido acetil salicílico, acetoaminofen, dipirona e indometacina.

Os esteróides, como o estigmasterol e sitosterol são usados no tratamento de muitas enfermidades como analgésico (OLIVEIRA & BUENO, 1996; BLOCK et al., 1998; BATISTA, CHIARI, OLIVEIRA, 1999).

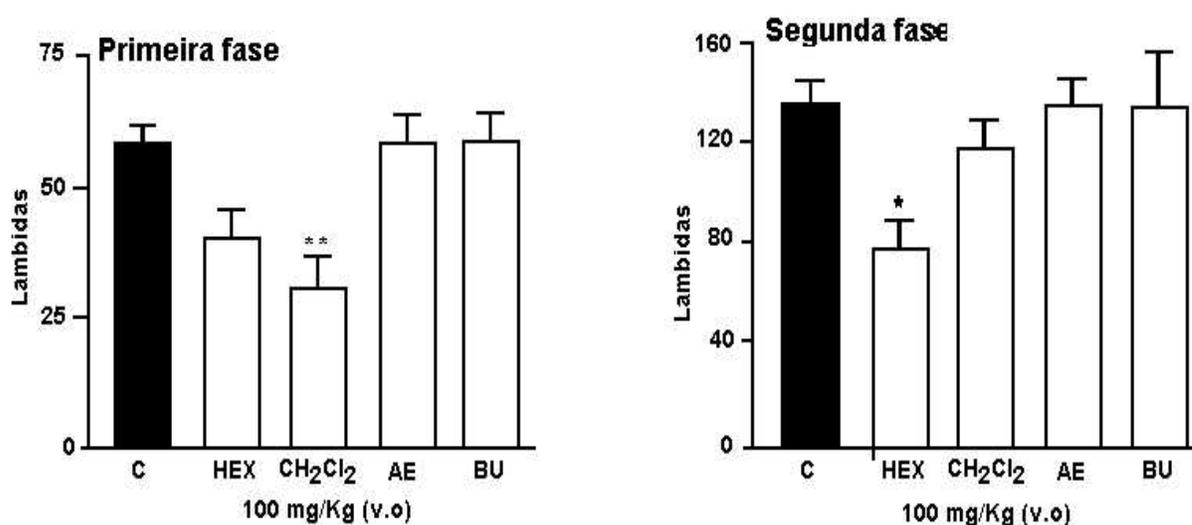


Figura 48 – Efeito das frações de *M.lanuginosa* DC na nociceção induzida pela formalina.

4.3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.3.2.1 MÉTODO DA DIFUSÃO RADIAL EM ÁGAR - DISCOS

Estudos anteriores comprovaram a atividade antimicrobiana das partes aéreas de várias espécies de *Mikania*s, frente a diversas bactérias e fungos patogênicos. Os diterpenos de núcleo

caureno são freqüentemente encontrados nas *Mikantias* e responsáveis pela atividade antimicrobiana (DAVINO, GIESBRECHT, ROQUE, 1989; SANTOS, TOMASSINI, CABRAL, 1998).

As frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica da *Mikania lanuginosa* DC foram avaliadas preliminarmente pelo método da Difusão Radial em meio sólido – disco, os quais foram impregnados com uma solução das respectivas frações, concentração de 1,5 mg/disco e testados contra as bactérias: *Staphylococcus aureus* (gram – positiva, ITAL SFCO 001) e *Escherichia coli* (Gram-negativa, ITAL ESCH 001). Os resultados obtidos podem ser visualizados na **tab 21** abaixo:

Tabela 21 – Atividade inibitória das frações de *M. lanuginosa* contra bactérias Gram – positivas e Gram – negativas pelo método da difusão em ágar – discos.

Frações na conc.1,5mg/disco	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fração hexânica	Inativa	Inativa
Fração diclorometano	15 mm	Inativa
Fração acetato de etila	15 mm	Inativa
Fração butanólica	Inativa	Inativa

Apenas as frações diclorometano e acetato de etila mostraram-se um halo de inibição de 15mm contra o *Staphylococcus aureus* e enquanto que as demais frações se mostraram inativas contra a *Escherichia coli*.

4.3.2.2. MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações diclorometano e acetato de etila da *Mikania lanuginosa*, frente os microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ITAL SFCO 001), *Escherichia coli* (ITAL ESCH 001) e *Candida albicans* (ATCC 102). Os resultados obtidos podem ser observados na **tab 22** abaixo:

Tabela 22 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima das frações de *Mikania lanuginosa*

	<i>S. aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
F. DCM	< que 500 µg/ml	> que 1000 µg/ml	> que 1000 µg/ml
F. Acet. De etila	Inativa até 1000µg/ml	Inativa até 1000µg/ml	Inativa até 1000µg/ml

A concentração inibitória mínima é definida como a menor quantidade da substância necessária para inibir o desenvolvimento de microorganismos (GUTIÉRREZ, et.al., 1998).

Este estudo permitiu verificar que as frações hexânica e butanólica foram inativas enquanto as frações diclorometano e acetato de etila tiveram atividade pouco significativa contra os microorganismos acima mencionados.

4.3.3 TOXICIDADE AGUDA (DOSE SIMPLES)

A toxicidade aguda em dose única serve de base ainda para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre a toxicidade aguda subcrônica, crônica e com doses

repetidas, além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação tóxico da substância – teste (GIBSON, HUFFMANN, NEWBERNE, 1982).

Assim foi realizada uma avaliação toxicológica do extrato bruto das partes aéreas de *Mikania lanuginosa* DC, conforme descrição em materiais e métodos. Os resultados demonstraram, que na dose de 1500 mg/kg esta espécie medicinal não apresentou aparentemente efeitos tóxicos, nos animais estudados. Pode-se observar, entretanto, um efeito farmacológico, depressão do sistema nervoso com ação calmante e indutora do sono.

5. CONCLUSÕES

Os estudo fitoquímicos e biológicos realizados com as partes aéreas da *Mikania lanuginosa* DC permitiram concluir que:

1 – O precipitado apresenta uma mistura complexa de substâncias formando um óleo-resina, do qual foi possível isolar, purificar e identificar um componente majoritário, de natureza química terpênica. Este terpeno constitui-se em um ácido diterpênico, o qual foi identificado através de análises cromatográficas e espectroscópicas de IV, EM, RMN ¹³C, RMN ¹H e por comparação com dados da literatura, como sendo o ácido caurenóico. Também faz parte deste óleo-resina, uma mistura de esteróides: estigmasterol e sitosterol e uma mistura complexa de ácidos graxos, entre os quais foi possível identificar o ácido palmítico.

2 – Nas frações hexânica e diclorometano foi isolado e identificado por análises espectroscópicas de IV, CG/EM e por comparação com os dados com a literatura, o β - sitosterol glicosilado.

3 – A presente pesquisa não constatou a presença de Cumarina, pois a literatura reporta que esta substância está presente na maioria das plantas deste gênero. Entretanto, através da revisão bibliográfica, verificou-se que as cumarinas estão presentes em apenas algumas espécies de *Mikantias*, como: *Mikania glomerata* Sprengel, *Mikania laevigata* e *Mikania smilacina*, não sendo, portanto, comumente encontrada.

4 – As frações hexânica e diclorometano causaram um significativo efeito antinociceptivo no modelo da dor induzida pela formalina. A fração diclorometano inibiu significativamente a 1ª fase da dor (dor neurogênica), enquanto que a fração hexânica, inibiu a 2ª fase da dor (dor inflamatória).

5 – As frações hexânica e butanólica foram inativas e as frações diclorometano e acetato de etila não apresentaram efeitos significativos quando avaliadas contra fungos e bactérias.

6 – O extrato bruto não apresentou efeito de toxicidade aguda, quando administrado em dose única, na concentração de 1500mg/kg de peso por via intraperitoneal.

7 – O controle de qualidade por CG/FID permitiu-nos concluir que o ácido caurenóico é o principal constituinte químico e está presente em todos os órgãos vegetais, variando as suas

concentrações nos diversos órgãos da planta e nas diferentes épocas do ano, da seguinte ordem decrescente de concentração:

Verão \Rightarrow na raíz > caule > folha.

No outono, dobra a quantidade do ácido caurenóico em todos os órgãos raíz > caule > folha.

No inverno culmina com os maiores teores deste diterpeno nos caule > raíz > flor > folha.

Na primavera, os teores do ácido caurenóico caem sensivelmente em todos os órgãos do vegetal, estando mais concentrado nas raízes > folhas > caules.

6. PERSPECTIVAS

As *Mikánias* são morfológicamente muito semelhantes, o que as torna passíveis do processo de adulteração, quer sejam intencionais ou não. Portanto, deve-se intensificar as pesquisas com essas espécies vegetais, principalmente com a *Mikania glomerata*, pois é uma espécie amplamente utilizada como matéria-prima na fitoterapia municipal em todo o Brasil e inclusive por muitos laboratórios farmacêuticos, em virtude da sua riqueza em cumarina. Mas, existem indícios que a espécie com teor triplicado de cumarina, seja a *Mikania laevigata*. Para tanto, faz-se necessário pesquisas objetivando um rigoroso controle de qualidade dessas espécies vegetais, utilizando a cumarina como marcador químico nas diferentes épocas do ano. Estas são:

- A) Estudo fitoquímico da fração acetato de etila da *Mikania lanuginosa* DC visando o isolamento de flavonóides.
- B) Obtenção de alguns derivados do ácido caurenóico por modificações estruturais com possibilidades terapêuticas.
- C) Testes de atividade antimicrobiana do ácido caurenóico frente algumas bactérias e fungos.
- D) Testes com o extrato bruto da *Mikania lanuginosa* DC em várias concentrações na toxicidade aguda por via oral e intraperitoneal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AGTAMAEL, M.A.V.; EGGELTE, T. A.; BOXTEL, C.J.V. Artemisinin Drugs in the Treatment of Malaria: From Medicinal Herb to Registered Medication. **TIPS**, v. 20, n. 5, p. 199 – 204, may 1999.
- 2- AGUINALDO, A.M.; ABE, F.; YAMAUCHI, T.; PADOLINA, W.G. Germacranolides of *Mikania cordata*. **Phytochemistry**, v. 38, n.6, p. 1441 – 1443, 1995.
- 3 - AI, J. Rapid Measurement of Free Phytosterols in Tobacco by Short - Column CG/MS/MS. **J. Agric. Food Chem.**, vol.45, n.10, p.3932 – 3935, 1997.
- 4-ALVES, T.M.A.; CHAVES, P.P.G; SANTOS, L.M.S.T.; NAGEM, T.J.; MURTA, S.M.F.; CE RAVOLO, I.P.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. A Diterpene from *Mikania obtusata* Active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Méd**, 61, p. 85 – 87, 1995.
- 5- AKISUE, G.; AKISUE, M. K; OLIVEIRA, F. **Farmacognosia**. São Paulo: Pharmakon Edições, 1993.

- 6- ALONSO, J.R. **Tratado De Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas.** Argentina, ISIS Ediciones S.R.L., 1998.
- 7- AMABIS, J.M. & MARTHO, G.R. **Curso Básico de Biologia: Os Seres Vivos.** São Paulo: Editora Moderna Ltda, 1^a e., v.2, p. 331- 339, 1985.
- 8- BANUTH, V.L. O Desenvolvimento de Programas Municipais de Fitoterapia. Fitoterápicos: Projeto Farmácia Viva de Arealva – SP. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATÚ, II , Botucatu – SP, 14 - 15 /06/1996. **Anais**, Botucatu, P.49 – 53.
- 9 -BARROSO, G. M. **Sistemática das Angiospermas do Brasil.** Minas Gerais: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v.3, p.237- 245, 1986.
- 10-BARREIRO, E. J. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de de Fármacos. **Quím. Nova**, v.13, n. 1, p. 29 – 37, 1990.
- 11- BATISTA, R.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B. Trypanosimicidal Kaurene Diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta Méd**, 65, p. 283 – 284, 1999.
- 12- BENOUDIA, A.; HASSAR, M.; BENJILALI, B. Les Propriétés Antiséptiques des Huiles Essentielles *in vitro*, Testées Contre des Germes Pathogenes Hospitaliers. **Fitoterapia**, v. 59, n.2, p.115 – 119, 1988.
- 13- BHATTACHARYA, S.; PAL, S.; CHAUDHURI, A. K. N. Neuropharmacological Studies on *Mikania cordata* Root Extract. **Planta Méd**, v.54, n.6, p.483- 487, 1988.
- 14- BISHAYEE, A. & CHATTERJEE, M. Protective Effects of *Mikania cordata* Root Extract Physical and Chemical Factors - Induced Gastric Erosions in Experimental Animals. **Planta Med**, 60, p 110-113, 1994.
- 15- BLOCK, L.C.; SANTOS, A.R.S.; SOUZA, M.M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R.A.; SANTOS, M.A.; MONACHE, F.D.; CECHINEL FILHO, V. Chemical and Pharmacological Examination of Antinociceptive Constituents of *Wedelia paludosa*. **J. Ethnopharmacol.** 61, p. 85 – 89, 1998.
- 16- BOCK, L.C.; et al. Phytochemical and Pharmacological Analysis of Different parts of *Wedelia paludosa* DC (Compositae). **Pharmazie** 53, p.716 – 717, 1998.
- 17- BOAVENTURA JR & OLIVEIRA, J.G. Método de Quantificação de Artemisinina em *Artemisia annua* por Fotodensitometria. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, III, Campinas, 11-15/ 10/1997. **Resumos**, Campinas, 1997, p. 206, (FIT 22).
- 18- BOAVENTURA JR.; REHDER, V.L.G.; SALES, B.H.N.; SARTORATTO, A. Obtenção do Arteéter, uma Droga Antimalária Derivada de Artemisinina. In: JORNADA PAULISTA

- DE PLANTAS MEDICINAIS, III, Campinas, 11-15/10/1997. **Resumos**, CPQBA, 1997, p. 255, (MULT 19).
- 19- BOHLMANN, F.; ADLER, A.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. A Dimeric Germacranolide and Other Sesquiterpene Lactones from *Mikania* Species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, 1982, p. 1349 – 1355, 1982.
- 20- BOHLMANN, F.; ADLER, A.; SCHUSTER, A.; GUPTA, R.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Diterpenes from *Mikania* Species. **Phytochemistry**, vol. 20, n. 8, p.1899-1902, 1981.
- 21- BOHLMANN, F.; ADLER, A.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Ent-labdanes from *Mikania alvimii*. **Phytochemistry**, v. 21, n.1, p. 173 – 176, 1982.
- 22- BOHLMANN, F.; ADLER, A.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Germacranolides from *Mikania grazielae*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1169 – 1170, 1982.
- 23- BOHLMANN, F.; TSANKOVA, E.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Five Mikanolide Derivatives from *Mikania cynanchifolia* and Their Biogenetic Relationships. **Phytochemistry** v.23, n. 5, p.1099 – 1101, 1984.
- 24- BOHLMANN, F.; SINGH, P.; JAKUPOVIC, J.; ROBINSON, H.; KING, R.M. An Epoxy germacranolide and Further Constituents from Constituents From *Mikania* Species. **Phytochemistry**, v.21, n.3, p. 705- 707, 1982.
- 25- BRANDÃO, M.G.L. Recomendações para a Avaliação da Qualidade de Drogas e Extratos Vegetais pelas Farmácias de Manipulação. **Informa**, v. 6, n.1/2, p. 6- 7,1997.
- 26- BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; CECHINEL - FILHO, V. Comprative Study of Different Parts of *Wedelia paludosa* DC by Gas Chromatography. **Nat. Prod. Lett.**, v.14(4), p. 247 – 254,1999.
- 27- BRIDI, R.; CROSETTI, F.; HENRIQUES, A.T. Estudo da Atividade Antioxidante do Extrato Padronizado de *Ginkgo biloba* (Egb 761) em Hipocampo de Ratos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV, Águas de Lindóia, 14 -17/10/1998. **Programas e Resumos**, Águas de Lindóia, 1998, p. 51, (01. 034).
- 28 – BRITO, A.S. **Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo**. São Paulo: Editora UNICAMP, 1994, p.122.
- 29- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. 1.ed. Espanha: Editorial Acribia, S.A.,1991. p.594.
- 30- BURKART, A. **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Buenos Aires, 1974, v.6, p.106.
- 31 - CASTRO,V. & JAKUPOVIC, J. 4β,19 – Epoxy – Norkaurene and Other Diterpenes from

- Mikania banisteriae*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2450 - 2451, 1985.
- 32- CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Germacranolides from *Mikania Species*. **Phytochemistry**, v. 28, n.2, p. 527 – 530, 1989.
- 33- CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; HONDA, N.K. Qualitative Determination of Indole Alkaloids, Triterpenoids and Steroids os *Tabernaemontana hilariana*. **J. Chromatogr. A.** 808, p. 264 – 268, 1998.
- 34- CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, L.F.; BEZERRA, F.B. Triterpenos Isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Quím. Nova**, v. 21, n. 6, p. 740 - 742, 1998.
- 35- CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais, Conceito sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Quím. Nova**, 21 (1), p. 99-103, 1998.
- 36- CELECHINI, R.M.S.; LANÇAS, F.M.; VILEGAS, J.H.Y. Avaliação de Métodos de Extração da Cumarina em Amostras de “Guaco” (*Mikania glomerata* Sprengel). In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE CROMATOLOGRAFIA, IV, 24 B7, Caracas, Venezuela, 1996.
- 37- CORRÊA, C. R. & CALIXTO, J.B. Evidence for Participation of B₁ and B₂ Kinin Receptors in Formalin – Induced Nociceptive Response in the Mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 110, p. 193 – 198, 1993.
- 38- CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, vol.II, p.265.
- 39- COSTA, A.F. **FARMACOGNOSIA**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 4.ed., v.2, p. 65 – 66.
- 40- CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York Colombia University Press, p.1262 il., 1981.
- 41- CRUZ, J. P.G. & LIBERALLI, C.H. Contribuição ao Estudo a *Mikania hirsutissima* DC., **Rev. Flora Medicinal**, 4, p. 323 – 355, 1938.
- 42- CUENCA, M. D. R.; BARDON, A.; CATALAN, C. A. N. Sesquiterpene Lactones From *Mikania micrantha*. **J. Nat. Prod.** v. 51, n. 3, p. 625 – 626, may/jun, 1988.
- 43- CUENCA, M.D.R, BORKOSKY, S.; CATALÁN, C.A.N.; GOEDKEN, V.L.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. Sesquiterpene Lactones of *Mikania minima*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1509 – 1513, 1993.

- 44- CURITIBA. Prefeitura Municipal de Curitiba. Fundação de Ação Social. Secretaria Municipal de Agronomia e Abastecimento. Secretaria Municipal do Meio Ambiente. Secretaria Municipal de Saúde. – **VERDESAÚDE Curitiba**. Curitiba, Gráfica Exclusiva, p.58, 1998.
- 45- DAVINO, S.C.; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N.F. Antimicrobial Activity of kaurenoic Acid Derivatives Substituted on Carbon – 15. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.22, p.1127 - 1129, 1989.
- 46 – DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, John Wiley & Sons, p.190, 1997.
- 47- DRUTZ, D.J. *In vitro* Antifungal Susceptibility Testing and Measurement of Levels of Antifungal Agents in Body Fluids. **Rev. Infect. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 392 – 397, 1987.
- 48- ESQUICI, R.N.; ALICE, C.B.; SCHAPORAL, E.E.S.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. Investigação Comparativa da Atividade Antimicrobiana de *Mikania hirsutissima* DC (Compositae) e *Micrograma vacciniifolia* (Langsd. et Fisch) Copel (Polipodiaceae). **Rev. Bras. Farm.** , v.70, n. 3, p. 70 – 76, 1989.
- 49- FARIAS, F.M.; LIMBERGER, R.P.; SIMÕES, C.A.P.; HENRIQUES, A.T. Análise da Composição Química do Óleo Volátil de Cinco Espécies de Gênero *Mikania*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV, Águas de Lindóia – SP, 14-17/10/1998. **Programas e Resumos**, Águas de Lindóia, 1998, p. 164, (03.195).
- 50 – FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal** . São Paulo, Editora Pedagógica da Universidade de São Paulo, v.2, p.129, 1979.
- 51- FERRO, V. O.; VILEGAS, W.; ROQUE, N. F. Estudo Químico de *Mikania*s . **Rev. Bras. de Farmacog**, n 1, p.45, out. 1986.
- 52- FERRO, V.O. & ALMEIDA, G.M.I. . Novo Diterpeno de Espécie do Gênero *Mikania*. Congresso de Farmácia do Cone Sul, 1. Porto Alegre, cad. Farm., 7 (supl.), 1991.
- 53- FIGUEIRA, G.M. & SARTORATTO, A. Avaliação dos Teores de Artemisinina em *Artemisia annua* L. Após Secagem e Durante o Armazenamento das Folhas. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, III, Campinas, 11 - 15/ 10/ 1997. **Resumos**. CPQBA, p.69, (12).
- 54 – FROMTLING, R.A.; PUI – YU, H.; SHADOMY, S. *In vitro* Inhibitory Activities of 2 new Orally Absorbable Imidazole Derivatives: BAYN 7133 and BAYI 913. **As bouraudia**, v. 21, p. 179 – 184, 1983.

- 55-GHISALBERTI, E.L. The Biological Activity of Naturally Occuring Kaurane Diterpenes. **Fitoterapia**, 68(4): p. 303 – 324, 1997.
- 56 – GIBSON, J.P.; HUFFMANN, K.W.; NEWBERNE, J.W. Preclinical Safety Studies With Terfenadine. **Arzneim. Forsch. / Drug Res.** 22(II), Nr. 9a, 1p.1179 – 1184, 1982.
- 57 – GRAÇA, C. **Fitoterapia em Saúde Pública.** I Congresso Sul Brasileiro de Plantas Mediciniais, Maringá – Pr., 1999.
- 58- GUTIERREZ, A.B.; OBERTI, J. C.; HERZ, W. Germacran – 5,14, 6,12- Diolodes From *Mikania urticifolia*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, p. 938 – 939, 1988.
- 59- GUTIÉRREZ,A.B.; OBERTI, J.C.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. Sesquiterpene Lactones and Diterpenes from *Mikania periplocifolia*. **Phytochemistry**, v. 24. n12 , p. 2967 – 2971, 1985.
- 60- GUTIÉRREZ,S.R.; FUENTES,O.; TÉLLEZ,A.N.; TORRENEGRA,R. Principios Activos Antibacterianos de *Espeletia barclayana*. **Rev. Latinoam. Quim.**, v.26, n.3; p. 71 - 74, 1998.
- 61- HAMBURGER, M. & HOSTETMANN, K. Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and Medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3864 –3874, 1991.
- 62- HECK, M.C. Conservação, Manejo e Legislação de Plantas Mediciniais. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATÚ, II , Botucatu, 14-15 /06 /1996. **Anais.** Botucatu, p. 17.
- 63- HERZ, W. & KULANTHAIVEL, P. Diterpenes and Sesquiterpene Lactones from *Mikania congesta*. **Phytochemistry**, v. 24. n 8, p. 1761 – 1768, 1985.
- 64- JÁCOME, R.L.R.P.; OLIVEIRA,A.B.; RASLAN, D.S.; MÜLLER, A.; WAGNER, H. Análise de Naftoquinonas em Extratos Brutos de Raízes de *Zeyheria montana* M. (Bolsa-de-Pastor). **Quím. Nova**, v.22, n.2, p. 175- 177, 1999.
- 65- JOLY, A. B. **Botânica. Introdução à Taxonomia Vegetal.** 12ed.: Companhia Editora Nacional,1998.
- 66- KNUDSEN, F.S.; VILEGAS, W.; OLIVEIRA, F.; ROQUE, N.F. Pimaradiene Diterpenes from *Mikania triangularis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1240 – 1242, 1986.
- 67 – LAVERDE JR., A. **Estudo Químico da *Aristolochia elegans*, Preparação e Avaliação da Atividade Antibacteriana de Derivados do Ácido Aristolóquio I Isolado.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 1995, p. Dissertação de Mestrado em Química.
- 68- LEITE, M.G.R.; SOUZA, C.L.; SILVA, M.A.M.; MOREIRA, L.K.A.; MATOS, F.J.A.; VIA

- NA, G.S.B. Estudo Farmacológico Comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* Fr.All (cumarú). **Rev. Bras. Farm.** v.74, n.1, p.12 – 15, 1993.
- 69- LIBERALLI, C.H. Estudo Químico da *Mikania hirsutissima* DC.
- 70- LOBITZ, G.O. et al. Kaurene Diterpenes from *Mikania vitifolia*. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p. 805 –809, 1988.
- 71- LOBITZ, G. O.; TAMOYO – CASTILLO; MERFORT, I. Diterpenes and Sesquiterpenes from *Mikania banisteriae*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p.161 –164, 1997.
- 72- LUCAS, V. Estudo Farmacognóstico do Guaco: *Mikania glomerata* Sprengel, Composta. **Rev. Flora Medicinal**, v.9 n.3, p.101 – 132, 1941.
- 73 – MACARI, P.A.T.;EMERENCIANO, V.P.; FERREIRA, Z. M.G.S. Identificação dos Triterpenos de *Miconia albicans* Triana Através de Análise por Microcomputador. **Quim. Nova**, v.13, n.4, p. 260 – 261, 1990.
- 74- MAGALHÃES, P.M & FOGGIO, M. A. Estudos Integrados com *Artemisia annua* L.: híbridos da Espécie Garantem seu Cultivo no Brasil e Tecnologia de Obtenção da, Artemisinina. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, III, Campinas 1997. **Resumos**, Campinas, 1997, p.15.
- 75- MALHEIROS, A. **Estudo Fitoquímico e Avaliação de Atividade Antibacteriana de *Alla manda cathartica* L. (*Apocynaceae*).** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1995, p.95. Dissertação de Mestrado em Química.
- 76- MIGUEL, M.D. **O Ensino Com Pesquisa Como Metodologia Articuladora na Formação de Profissionais da Saúde na produção de Fitoterápicos.** Curitiba: Pontífica Universidade Católica do Paraná, 1996, 276 p. , Dissertação de mestrado em educação.
- 77- MILES, H.; NGUYEN, C. L.; MILES, D.H. Utilization of Natural Products for Treatment of Blood Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v.5, p. 421 - 440, 1998.
- 78- MITCHER, L.A.; LEU,R.P.; BATHALA, M.S.; WU, W.N.;BEAL, J.L. Antimicrobial Agent from Higher Plants. Introduction, Rationale, and Methodology. **Lloydia**. V. 35. N.2, jun, p. 157 – 165, 1972.
- 79- MORESCO, P. M. O Desenvolvimento de Programas Municipais de Fitoterapia. Plante Saúde – Uma Opção Terapêutica. In: WORKSHOP DE LANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATÚ, II , Botucatu, 14-15/06/1996. **Anais**, Botucatu, P.57-59.
- 80- NEVES, L.J. & SÁ, M.F.A. Contribuição ao Estudo das Plantas Medicinais *Mikania glomerata* Sprengel. **Rev. Bras. Farm.** v.72, n. 2, p. 42 – 47, 1991.

- 81 – NIERO, R. **Isolamento e Identificação de Compostos de *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com Efeito Analgésico; Correlação Estrutura-Atividade.** Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 1993, p.84. Dissertação de Mestrado em Química.
- 82- OLIVEIRA, H.B.& BUENO, D.D. Biotransformação de Esteróis. **Quím. nova**, v. 19, n.3, p. 233, 1996.
- 83- OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L.; GARCIA, L. O. Caracterização Cromatográfica em Camada Delgada do Extrato Fluído de Guaco – *Mikania glomerata* Sprengel. **LECTA USF**, Bragança Paulista, v.11, n.1, p.43 – 56, 1993.
- 84- OLIVEIRA, F; ALVARENGA, M. A.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Isolamento e Identificação de Componentes Químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip.Ex. Baker. **Rev. Farm. Bioquím.** Univ. S. Paulo, 20, n.2, p.169-183, jul/dez, 1984.
- 85- OLIVEIRA, F.; OGA, S.; AKIISUE, 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). **An. Farm. Quim.** v. 25, n. 1,2, p. 50 – 54, 1985.
- 86- OLIVEIRA, F; AKISUE, G.; AKIISUE, M.K.; MANCINI, B.; CHUMZUM, M. Morfodiagnose do Axófito do Guaco. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, 8/9, p.11– 24, 1986/1987.
- 87- OLIVEIRA, F. O.; SAITO, M.L.; GARCIA, L.O. Morfologia Externa das Partes Aéreas e Anatomia Foliar das Espécies Brasileiras de *Mikania* Willdenow Secção *Globosae* Robinson – Visão Farmacognóstica. **LECTA – USF**, Bragança Paulista, v. 12, n. 1, p. 23- 65, 1994.
- 88- PAGE, J.E.; BALZA, F.; NISHIDA, T.; TOWERS, G.H.N. Biologically Active Diterpenes From *Aspilia Mossambicensis*, a Chimpanzee Medicinal Plant. **Phytochemistry**, v.31, n.10, 1992, p. 3437 - 3439.
- 89- PANDLEY, R.C. Prospecting for Potentially New Pharmaceuticals From Natural Source. **Pharmaceuticals From Natural Sources**, v.18, n. 5, p.333 – 346, 1998.
- 90- PEREIRA, B.M.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Abordagem Farmacológica de Plantas Recomendadas pela Medicina Folclórica como Antiofídicas. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XII, Curitiba-Pr, 15-17 /09 /1992. **Anais**, Curitiba, p.1.
- 91- PINTO, A.C. O Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. **Quím. Nova**, v.18, n.6, p. 608 – 614, 1995.

- 92- PIRES, A. M. O Desenvolvimento de Programas Municipais de Fitoterapia. Fitoterapia e Homeopatia na Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATÚ, II, Botucatu, 14-15/ 06/1996, Botucatu, p. 54 – 56.
- 93- PLEMPPEL, M.; BERG, D.; BUCHEL, B.; ABBINK, D. Test Methods for Antifungal Agents a Critical Review. **Mykosen**, v.30, n.1, p.28 – 34, 1986.
- 94- POZETTI, G.L. Controle de Qualidade Aplicado a Fitoterápicos e a Produtos Homeopáticos. **Rev. Racine**, p.5-6, mar/abr, 1995.
- 95 – PRINCÍPIOS, Activos. Disponível em: <<http://www.personal.redestb.es/martin/activos.htm>> Acesso em: 07.nov.2001.
- 96 – RANA, B.K.; SINGH, U.P.; TANEJA, V. Antifungal Activity and Kinetics of Inhibition Essential Oil Isolated from Leaves of *Aegle marmelos*. **J. Ethnopharm.**, v. 57. p.29 - 34, 1997.
- 97- REHDER, V.L.C.; FIGUEIRA, C.M.; MAGALHÃES, P.M.; SARTORATTO, A; MORAES, M.D. Caracterização Botânica e Comparação do Teor de Cumarina entre *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS DA UNAERP, IV, Ribeirão Preto-SP, 12-15/10/99. **Programação e resumos**, Ribeirão Preto 1999, p.101, (8.19).
- 98- REITZ, R. **Composta. In: Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues 1989, p. 702 - 704.
- 99- ROBINSON, T. **The Organic Constituents of Higher Plants. Their Chemistry and Interrelationships.** 4.ed. North Amherst, Cordus Press, 1980.
- 100- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiologia.** São Paulo, Editorial Premier, 1997, p.372.
- 101- RODRIGUES, R.O.; ALVARENGA, M.A.; KATO, E.T.M. Constituintes Químicos de *Mikania malacolepsis* Robinson. **LECTA – USF**, Bragança Paulista, v.14. n.1, p. 29- 47, jan/ jun. 1996.
- 102 - ROQUE, N. F.; VILEGAS, W.; GIANELLA, T.L.; KNUDSEN, F.S.; RONDELLA, G.; TORRES, L.M.B.; FERRO, V.O.; OLIVEIRA, F. Compostas Medicinais do Brasil. 2 Estudo Químico de *Solidago microglossa*, *Mikania triangularis*, *M. diversifolia*, *M. smilacina*, *M. microlepis* e *Wedelia paludosa*. **Suplemento Acta Amazonica**, v.18, n.1 - 2, p. 473-476, 1988.
- 103- RURECO- Fundação para o Desenvolvimento Econômico Rural da Região Centro –Oeste. do Paraná Buscando a Nossa Farmacopéia ... Guarapuava, 1999, p.56.

- 104-SACRAMENTO, H. T. O Desenvolvimento de Programas Municipais de Fitoterapia. Fitoterapia no SUS: Uma Opção Terapêutica no Município de Vitória. In: WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATÚ, II, Botucatu, 14 - 15/06/1996. **Anais**, Botucatu, p. 44 – 48.
- 105- SACRAMENTO, H.T. A Fitoterapia no Serviço Público Brasileiro. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, IV, Ribeirão Preto - SP, 12-15 / 10 /1999, **Conferência**.
- 106-SAFAYHI, H.& SAILER,E.R. Anti-Inflammatory Actions of Pentacyclic Triterpenes. **Planta Méd**, 63, p. 487 – 493, 1997.
- 107-SANTOS, T.C.; CABRAL, L.M.; ROCHA, J.F.; JORGE, M. Estudos Preliminares Visando à Obtenção de Cumarina a Partir de *Mikania glomerata* Sprengel. Desenvolvimento de Processos Extrativos e Economicamente Viáveis. In: CONGRESSO PAULISTA DE FARMACÊUTICOS, 10, SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE FARMACÊUTICOS II, São Paulo, 29/07 a 2/08/1997. **Anais**, Rev. Farm. Quím. v. 29, p.67, 1997.
- 108- SANTOS, T.C.; TOMASSINI, T.C.B.; CABRAL, L.M. Estudos Preliminares Sobre a Constituição Química e Atividade antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. **Rev. Bras Farm.**, 79 (3/4), p.54 – 55, 1998.
- 109- SCHUQUEL. I.T.A.; MALHEIROS, A.; VIDOTTI, J.G. 3- β - O - β - D – Glucopyranosyl sitosterol in Species of Labiatae, Verbenaceae and Apocynaceae. **Anais Assoc. Bras. Quim.** v. 45, n.3, 147 – 151, 1996.
- 110- SHU, Y.Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 8, p.1053 - 1071, 1998.
- 111 – SILVA JÚNIOR, A. A. & VIZZOTTO, V.J. Plantas Mediciniais, Aromáticas e Fitoprotetoras. **Agrop. Catarinense**, v.9, n.1, p. 5 – 8, marc. 1996.
- 112- SILVA, R.A.D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo, companhia Editora Nacional, 1929, p. 237.
- 113- SILVA, I; FRANCO, S.L.; MOLINARI, S.L.; CONEGERO, C.I.; MIRANDA NETO, M.H; CARDOSO, M.L.C.; SANT'ANALGÉSICO, D.M.G.; IWANKO, N.S. **Noções Sobre o Organismo Humano e Utilização de Plantas Mediciniais**. Cascavel: Assoeste Editora Editora Educativa, 1995, p.14.
- 114- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, ed.5, p.387, 1991.
- 115- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSDMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.;

- PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 1.ed., Porto Alegre / Florianópolis, Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. Da UFSC, 1999, p.821.
- 116- SINDUSFARM - Sindicato das Indústrias Químicas e Farmacêuticas do Estado do Paraná. **Análise técnica da portaria 6/95**. 1998.
- 117- SLIMESTAD, R.; MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Larvicidal Constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Méd.**, 61, p. 562 – 563, 1995.
- 118 – SOARES, J.L. **Biologia**. São Paulo, Editora Scipione, ed. atualizada, volume único, p. 157.
- 119- TECH, D.H. *Ginkgo biloba*: a Árvore que Combate o Envelhecimento. **Jornal O Globo**. São Paulo, 14 abr.1996. Jornal da Família.
- 120- TRESE & EVANS, W.C. **Farmacognosia**. 13. ed. Mexico: Interamericana. McGrawHill, 1989, p.901.
- 121- UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales**. Peru: Pontificia Universidad Catolica del Peru, Fondo Editorial, 2º ed, p. 299, 1994.
- 122- VELANDIA, J.R, CARVALHO, M.G., BRAZ FILHO, R. Ácido Ent 16 α , 17 - Diidroxicauran –19 - óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os Desafios Estereoquímicos dos Carbonos Quirais C - 4 e C - 16. **Quím. Nova**, v.21, n. 4, p.397 – 404, 1998.
- 123- VIANNI, R.& BRAZ – FILHO, R. Ácidos Graxos Naturais: Importância e Ocorrência em Alimentos. **Quím. Nova**, v.19, n. 4, p. 400 – 407, 1996.
- 124- VICHNEWSKI, W.; LEITÃO FILHO, H.F.; MURARI, R.; HERZ, W. Cinnamoylgrandifloric Acid from *Mikania oblongifolia*. **Phytochemistry**, Printed English, vol. 16, p. 2028 – 2029, 1977.
- 125 – VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; ANTONIOSI –FILHO,N.R. High Temperature Capillary GC Analysis of Phytopreparations of “Espinheira Santa” (*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium* M. – CELASTRACEA), a Brazilian Antiulcer Plant). **Chromatographia**, v.40, n.5/6, p.341-344, march 1995.
- 126 – VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; CERVI, A.C. High Resolution Gas Chromatography Analysis of “Espinheira santa” (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*); Analysis of Crude Drug Adulterations. **Phytother. Res.**, v.8, p.241- 244, 1994.
- 127- WAGNER, H. et al. Notiz über die Synthesen des Mikanins, eines Flavonols aus *Mikania cordata* (Burm.f.) B.L. Robinson. **Chemistry Ber.**, p.1768 – 1769, 1967.
- 128 – WILLARS, H.; MERRITT – JR.,L.; DEAN, J. **Análise Instrumental**. 2 ed. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian, 1974, p. 984.

- 129- YSRAEL, M.C.& CROFT, K.D. Inhibition of Leukotriene and Platelet Activating Factor Synthesis in Leukocytes by the Sesquiterpene Lactone Scandanolide. **Planta Méd.**, v 56 n.3, p. 268 – 270, jun, 1990.
- 130- ZAMORANO, G.; CATALÁN, C.A.N.; DÍAZ, J.G.; HERZ, W. Germacranolides and Sesquiterpene Dilactones from *Mikania dussenii*. **Phytochemistry**, v.37, n.1, p. 187 – 190, 1994.
- 131- ZAMORANO, G. et. al. Sesquiterpene Dilactones from *Mikania ypacarayensis*. **Phytochemistry**, v. 38, n.5, p. 1257 – 1260, 1995.