

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**Contribuição para o estudo
morfológico e químico de
*Calycobolus heudelotii***

ANA SOFIA DINIZ MARTINS

MESTRADO EM MEDICAMENTOS À BASE DE PLANTAS

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**Contribuição para o estudo
morfológico e químico de
*Calycobolus heudelotii***

ANA SOFIA DINIZ MARTINS

MESTRADO EM MEDICAMENTOS À BASE DE PLANTAS

**Dissertação orientada pelas Professoras Doutoradas Olga Maria Duarte Silva
e Elsa Teixeira Gomes**

2010

A Natureza não faz nada em vão
(Aristóteles)

“In memorium”
Avô Diniz

Aos meus pais

Resumo

Calycobolus heudelotii (Baker ex Oliv.) Heine é uma liana pertencente à família *Convolvulaceae*, com utilização na medicina tradicional da Guiné-Bissau e outros países africanos.

Na Guiné-Bissau, o caule da liana é utilizado sob a forma de decocto, no tratamento de inflamações, alergias cutâneas e na desinfecção de feridas.

Neste trabalho apresentam-se os resultados de um estudo morfológico, químico, biológico e toxicológico efectuado de forma a contribuir para o melhor conhecimento desta planta medicinal africana.

A metodologia utilizada integrou a análise macroscópica e microscópica do caule de *C. heudelotii*, a avaliação da toxicidade aguda e a determinação da actividade antimicrobiana *in vitro* do seu extracto metanólico, assim como o rastreio dos principais constituintes químicos presentes neste extracto e sua actividade antioxidante.

Os estudos botânicos permitiram caracterizar a estrutura anómala desta liana, apresentando-se pormenorizadamente todos os caracteres necessários para a sua identificação.

Os estudos fitoquímicos incluíram a caracterização do extracto por LC/UV/ES-MS com o conseqüente conhecimento do seu perfil químico. Identificaram-se como constituintes maioritários: terpenos, ácidos fenólicos, linhanos e taninos gállicos.

Identificaram-se dois dos compostos fenólicos maioritários (ácido 3-cafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico), e o triterpeno β -sitosterol.

O extracto estudado mostrou ser activo contra estirpes de referência de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e ser inactivo contra *Staphylococcus aureus*, no intervalo de concentrações testado. Este extracto mostrou também possuir actividade antioxidante relacionável com os compostos fenólicos maioritários identificados.

Os resultados da avaliação da toxicidade aguda em murganho mostraram não ser, este extracto, tóxico à concentração máxima de 1500 mg/Kg.

Abstract

Calycobolus heudelotii (Baker ex Oliv.) Heine is a liana belonging to the *Convolvulaceae* family used in Guinea-Bissau and other African countries' traditional medicine.

In Guinea-Bissau, the stem of the liana is used as decoction in the treatment of skin allergies, inflammations and infected wounds.

This paper presents the results of morphological, chemical, biological and toxicological studies, in order to contribute to a better understanding of this African medicinal plant.

The methodology incorporated the macroscopic and microscopic analysis of stems of *C. heudelotii*, the evaluation of acute toxicity and antimicrobial activity determination of the methanolic extract, as well as the screening of the main chemical constituents and its antioxidant activity.

The botanical studies allowed characterizing the structure of this anomalous liana, showing in detail all the characters needed for its identification.

The phytochemical studies included the characterization of the extract by LC/UV/ES-MS with the resulting knowledge of its chemical screening. We have characterized as major constituents: terpenes, phenolic acids, lignans and gallic tannins.

We have identified two of the majority phenolic compounds (3-caffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid), and the triterpene β -sitosterol.

The extract proved activity against reference strains of *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Micrococcus luteus* but was inactive against *Staphylococcus aureus*, in the range of tested concentrations. This extract has also shown to possess antioxidant activity, relatable to the main phenolic compounds identified.

The results of the evaluation of acute toxicity in mice proved that, this extract, is nontoxic at maximum concentration of 1500 mg/Kg.

Palavras-chave

Calycobolus heudelotii, atividade antimicrobiana, planta medicinal, etnofarmacologia, Guiné-Bissau.

Keywords

Calycobolus heudelotii, antimicrobial activity, medicinal plant, ethnopharmacology, Guinea-Bissau.

Agradecimentos

À Prof. Doutora Elsa Teixeira Gomes, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, minha orientadora, expresso a minha gratidão pelos ensinamentos transmitidos e pelo incentivo, apoio e amizade que sempre me demonstrou.

À Prof. Doutora Olga Duarte Silva, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, também minha orientadora, agradeço todo o apoio demonstrado ao longo da realização do presente trabalho e os ensinamentos transmitidos. Agradeço ainda pela amizade e incentivo concedidos.

À Doutora Maria Adélia Diniz, do Instituto de Investigação Científica Tropical, agradeço a colheita inicial do material vegetal para os estudos químico e farmacológico e a ajuda prestada no respeitante aos aspectos botânicos do presente trabalho. Agradeço ainda a cedência de algum material fotográfico obtido directamente no campo e usado neste trabalho e todo o apoio e incentivo que sempre me deu.

Ao Doutor Eurico Sampaio Martins, do Instituto de Investigação Científica Tropical, expresso a minha gratidão pelo apoio demonstrado e disponibilidade para leitura do texto relativo à parte de botânica.

Ao Doutor Luís Catarino, do Instituto de Investigação Científica Tropical, agradeço a colheita, na Guiné-Bissau, do material para a realização dos estudos botânicos.

À Dra. Fátima Nunes, do Laboratório de Espectrometria de Massa do Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Coimbra, agradeço a realização dos ensaios de espectrometria de massa.

Ao Dr. Telmo Nunes do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, agradeço toda a assistência técnica na utilização do Microscópio Electrónico de Varrimento.

À Prof. Doutora Maria Aida Duarte, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço a colaboração prestada durante os ensaios de actividade antimicrobiana.

À Prof. Doutora Rita Serrano, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço o apoio e os ensinamentos transmitidos no respeitante aos estudos em microscopia óptica e electrónica.

Ao Prof. Doutor Bruno Sepodes, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço a colaboração prestada durante os ensaios de toxicidade aguda.

Ao Mestre João Rocha, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço a colaboração na realização dos ensaios de toxicidade aguda. Agradeço ainda a amizade que sempre me demonstrou.

Ao Mestre Gustavo da Silva e ao Doutor Joan Cirera, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço a ajuda na realização dos ensaios da actividade antimicrobiana, bem como a companhia e simpatia demonstradas durante o tempo que passamos juntos no laboratório.

À Sra. D. Fernanda Almeida, ex-funcionária do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço a colaboração, apoio e amizade que sempre me demonstrou.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Coimbra, agradeço a disponibilização do equipamento para a realização do ensaio LC/UV/ES-MS.

Trabalhos científicos efectuados

A presente tese integra os resultados dos seguintes trabalhos:

Martins, A.S., Gomes, E.T., Silva, O. (2008). Caracterização Botânica da Liana Medicinal da Guiné-Bissau *Calycobolus heudelotii*. In: *Workshop Plantas Mediciniais e Fitoterapêuticas nos Trópicos*, IICT/CCCM, Lisboa, 29 a 31 de Outubro de 2008. <http://www2.iict.pt/?idc=15&idi=14082>. 1-4.

Martins, A.S., Cirera, J., da Silva, G., Gomes, E.T., Silva, O. (2010). *Calycobolus heudelotii* stem: Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening. In: *58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research*, Berlim, 29 Agosto a 1 de Setembro de 2010.

Índice

| | Pág. |
|---|------|
| Objectivos..... | 1 |
| 1. Introdução..... | 3 |
| 1.1. Aspectos Botânicos..... | 5 |
| 1.1.1 Família <i>Convolvulaceae</i> | 10 |
| 1.1.2 Género <i>Calycobolus</i> Willd. ex Roem & Schult..... | 11 |
| 1.1.3 <i>Calycobolus heudelotii</i> (Baker ex Oliv.) Heine..... | 13 |
| 1.1.3.1 Descrição Botânica | 13 |
| 1.1.3.2 Sinonímias..... | 15 |
| 1.1.3.3 Distribuição geográfica | 15 |
| 1.1.3.4 Ecologia | 15 |
| 1.1.3.5 Nomes vernáculos | 15 |
| 1.1.3.7 Utilizações..... | 16 |
| 1.2 Aspectos Químicos | 16 |
| 1.3 Aspectos Biológicos | 17 |
| 2. Materiais e Métodos | 21 |
| 2.1 Solventes e padrões | 21 |
| 2.1.1 Solventes..... | 21 |
| 2.1.2 Padrões..... | 21 |
| 2.2 Material vegetal | 22 |
| 2.2.1 Material vegetal para a análise botânica..... | 22 |
| 2.2.2. Material vegetal para as análises química e biológica..... | 22 |
| 2.3 Preparação do material vegetal para a análise botânica | 23 |
| 2.3.1 Análise macroscópica | 23 |
| 2.3.2 Análise em microscopia óptica..... | 23 |
| 2.3.3 Análise em microscopia electrónica | 24 |
| 2.3.4 Análise estatística dos resultados | 24 |
| 2.4 Preparação dos extractos | 24 |
| 2.4.1 Extracção do etanol | 25 |
| 2.4.2 Extracção com metanol | 25 |
| 2.4.3 Extracção alcaloídica..... | 25 |
| 2.5 Métodos Biológicos | 26 |

| | |
|---|----|
| 2.5.1 Rastreo da actividade antimicrobiana..... | 26 |
| 2.5.1.1 Amostras | 26 |
| 2.5.1.2 Microorganismos testados | 26 |
| 2.5.1.3 Ensaios..... | 27 |
| 2.5.1.3.1 Determinação qualitativa | 27 |
| 2.5.1.3.2 Determinação qualitativa | 27 |
| 2.5.2 Toxicidade aguda..... | 27 |
| 2.5.2.1 Amostras | 28 |
| 2.5.2.2 Animais..... | 28 |
| 2.5.2.3 Ensaio | 28 |
| 2.5.2.4 Análises bioquímicas | 29 |
| 2.5.2.5 Análise estatística dos resultados | 29 |
| 2.6 Métodos cromatográficos analíticos..... | 29 |
| 2.6.1 Cromatografia em camada fina (TLC) | 29 |
| 2.6.2 Determinação da actividade antioxidante por bioautografia (TLC) | 32 |
| 2.6.3 Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detector de matriz de díodos (LC/UV) | 32 |
| 2.6.4 Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a espectrometria de massa por electro-atomização (<i>electrospray</i> , LC/UV/ES-MS) | 33 |
| 2.7 Preparação e Purificação da amostra | 34 |
| 2.7.1 Extracção em fase sólida em coluna Sep Pak C18 | 34 |
| 2.8 Rastreo de alcalóides | 34 |
| 2.8.1 Reacções gerais de precipitação de alcalóides | 34 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 35 |
| 3.1 Estudo Morfológico..... | 35 |
| 3.1.1 Caracterização Macroscópica | 35 |
| 3.1.2 Caracterização Microscópica..... | 38 |
| 3.2 Estudo Químico | 51 |
| 3.2.1 Caracterização química preliminar do extracto metanólico | 51 |
| 3.2.1.1 Extracção alcaloídica | 51 |
| 3.2.1.2 Detecção rápida de alcalóides no extracto alcaloídico | 51 |
| 3.2.1.3 Pesquisa de alcalóides por TLC..... | 52 |
| 3.2.2 Caracterização química do extracto metanólico por TLC | 51 |
| 3.2.3 Caracterização do extracto por LC/UV | 56 |

| | |
|---|----|
| 3.2.3.1 Fraccionamento do extracto metanólico..... | 58 |
| 3.2.3.2 Caracterização das fracções Cm1 e Cm2 | 58 |
| 3.2.4 Análise LC/UV/ES-MS | 64 |
| 3.2.4.1 Composto C3 | 65 |
| 3.2.4.2 Composto C4 | 67 |
| 3.2.4.3 Taninos gálhicos..... | 69 |
| 3.3 Estudos de Actividade Biológica..... | 72 |
| 3.3.1 Rastreo da actividade antimicrobiana..... | 72 |
| 3.3.2 Actividade antioxidante..... | 74 |
| 3.3.3 Toxicidade aguda..... | 76 |
| 4. Conclusões e perspectivas | 82 |
| Referências bibliográficas | 85 |

Índice de figuras

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1 - <i>Calycobolus heudelotii</i> no seu habitat natural | 13 |
| Figura 2 - Flor de <i>Calycobolus heudelotii</i> | 14 |
| Figura 3 - Fruto de <i>Calycobolus heudelotii</i> | 14 |
| Figura 4 - Caule de <i>Calycobolus heudelotii</i> | 14 |
| Figura 5 - Folha de herbário de <i>Calycobolus heudelotii</i> | 14 |
| Figura 6 - Aspecto geral do caule observado à lupa | 36 |
| Figura 7 - Secção transversal do caule observado à lupa | 36 |
| Figura 8 - Observação do caule ao microscópio óptico em secção transversal..... | 39 |
| Figura 9 - Observação de esclereídeos ao microscópio óptico | 40 |
| Figura 10 - Drusas observadas ao microscópio óptico..... | 42 |
| Figura 11 - Drusas captadas por microscopia electrónica | 43 |
| Figura 12 - Zona cortical do caule observada ao microscópio óptico | 44 |
| Figura 13 - Grãos de amido captados por microscopia electrónica | 44 |
| Figura 14 - Secção transversal do lenho..... | 45 |
| Figura 15 - Xilema observado em microscopia electrónica | 46 |
| Figura 16 - Tiloses presentes no lenho..... | 47 |
| Figura 17 - Traqueídeos presentes no lenho..... | 48 |
| Figura 18 - Raios medulares | 49 |
| Figura 19 - Câmbio vascular..... | 50 |
| Figura 20 - Caracterização do extracto por TLC..... | 53 |
| Figura 21 - Pesquisa de terpenos por TLC usando o sistema S11 | 54 |
| Figura 22 - Pesquisa de terpenos por TLC usando o sistema S12..... | 54 |
| Figura 23 - Pesquisa de compostos fenólicos por TLC usando o sistema S6 | 55 |
| Figura 24 - Análise LC/UV do extracto metanólico | 57 |
| Figura 25 - Análise LC/UV da fracção Cm1 | 59 |
| Figura 26 - Análise LC/UV da fracção Cm2 | 60 |
| Figura 27 - Caracterização por LC/UV da fracção Cm1 | 62 |
| Figura 28 - Análise LC/UV/ES-MS da fracção Cm1 ($t_R < 30,0$) | 64 |
| Figura 29 - Espectros UV/Visível dos compostos C3 e C4..... | 65 |
| Figura 30 - Espectros ES-MS ⁿ do composto C3 | 66 |
| Figura 31 - Espectros ES-MS ⁿ do composto C4 | 67 |

| | |
|---|----|
| Figura 32 - Análise LC/UV/ES-MS da fracção Cm1 ($t_R > 30$ min) | 69 |
| Figura 33 - Espectros ES-MS ⁿ do composto C5..... | 70 |
| Figura 34 - Espectros ES-MS ⁿ do composto C6 | 71 |
| Figura 35 - Espectro ES-MS do composto C7 | 71 |
| Figura 36 - Determinação da actividade antioxidante por bioautografia usando o sistema A2..... | 74 |
| Figura 37 - Níveis sanguíneos de ALT (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto | 78 |
| Figura 38 - Níveis sanguíneos de AST (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto | 78 |
| Figura 39 - Níveis sanguíneos de creatinina (mg/dl) 24 h após a administração da segunda dose de extracto..... | 79 |
| Figura 40 - Níveis sanguíneos de ureia (mg/dl) 24 h após a administração da segunda dose de extracto..... | 79 |
| Figura 41 - Níveis sanguíneos de CK-MB (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto..... | 79 |
| Figura 42 - Níveis sanguíneos de LDH (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto | 80 |

Índice de tabelas

| | Pág. |
|---|------|
| Tabela 1 - Padrões utilizados nos diferentes sistemas cromatográficos | 22 |
| Tabela 2 - Rastreamento da actividade antimicrobiana: estirpes utilizadas | 26 |
| Tabela 3 - Sistemas cromatográficos utilizados em TLC | 30 |
| Tabela 4 - Sistemas cromatográficos utilizados para detecção da actividade antioxidante por bioautografia | 32 |
| Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas em HPLC | 33 |
| Tabela 6 - Condições cromatográficas utilizados em LC/UV/ES-MS..... | 34 |
| Tabela 7 - Principais características dos vasos xilemáticos | 38 |
| Tabela 8 - Principais características dos traqueídeos presentes no lenho | 38 |
| Tabela 9 - Tamanho e organização das células pétreas | 38 |
| Tabela 10 - Tamanho e organização das drusas | 39 |
| Tabela 11 - Diâmetro tangencial dos grãos de amido | 39 |
| Tabela 12 - Reacções gerais de precipitação de alcalóides | 52 |
| Tabela 13 - Identificação de terpenos no extracto | 54 |
| Tabela 14 - Identificação de ácidos fenólicos no extracto | 56 |
| Tabela 15 - Características LC/UV dos derivados cafeoil-quinóicos presentes na fracção CM1 | 63 |
| Tabela 16 - Características LC/UV dos derivados galhotaninos detectados na fracção CM1 | 63 |
| Tabela 17 - Informação estrutural LC/UV/ES-MS dos compostos C3 e C4 | 65 |
| Tabela 18 - Informação estrutural LC/UV/ES-MS dos compostos C5, C6 e C7 | 70 |
| Tabela 19 - Actividade antimicrobiana do extracto metanólico | 72 |
| Tabela 20 - Determinação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> | 76 |
| Tabela 21 - Efeitos da administração intra-peritoneal do extracto nas concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), creatinofosfoquinase (CK-MB), creatinina e ureia | 77 |

Objectivos

O trabalho de investigação subjacente a esta tese teve como principal objectivo contribuir para o estudo e validação da utilização da liana *Calycobolus heudelotii* na medicina tradicional da Guiné-Bissau assim como estabelecer critérios de qualidade que permitam a utilização desta planta medicinal como droga vegetal.

Este trabalho além de relevante é inovador pois tanto quanto é do nosso conhecimento, sobre esta espécie não existiam estudos anteriores respeitantes aos diferentes aspectos estudados, e na pesquisa bibliográfica efectuada apenas se encontrou uma referência à composição química de uma espécie do género *Calycobolus* (Siani *et al.*, s/d).

O presente trabalho inclui os resultados do estudo botânico, químico, de actividade biológica e toxicológica efectuado com os caules de *C. heudelotii* e está organizado em quatro partes fundamentais:

1. Na primeira parte faz-se uma breve introdução ao tema em estudo e apresentam-se os dados botânicos, químicos e biológicos relativos à espécie em estudo assim como as principais características do género botânico e família a que esta pertence.
2. Na segunda parte são apresentados os materiais e métodos utilizados no presente estudo assim como as equipas envolvidas.
3. Na terceira parte apresentam-se e discutem-se os resultados dos estudos morfológicos, químicos, de actividade biológica e toxicológicos realizados.
 - O estudo morfológico teve como objectivo caracterizar detalhadamente a estrutura anatómica do caule da liana *C. heudelotii* e incluiu a observação das características macroscópicas (a olho nu e à lupa) e microscópicas (ao microscópio óptico e electrónico) do lenho da liana fragmentado.
 - Tendo em conta a diversidade química existente na família *Convolvulaceae*, no estudo químico procurou-se conhecer o perfil químico dos constituintes maioritários da fracção metanólica de um extracto do caule de *C. heudelotii*. Depois de identificadas as principais classes destes compostos, procurou-se caracterizá-los e relacioná-los com o uso tradicional da planta. Para esta caracterização recorreu-se a técnicas de TLC, LC/UV e LC/UV/ES-MS.

- Nos estudos de actividade biológica avaliou-se a actividade antimicrobiana *in vitro*, da fracção metanólica de um extracto do caule de *C. heudelotii*, assim como a sua actividade antioxidante por bioautografia. Efectuou-se ainda a avaliação da sua toxicidade aguda.
4. Na quarta parte são apresentadas as considerações finais sobre os diferentes resultados obtidos e perspectivas para linhas de continuação do trabalho.

Introdução

Desde tempos remotos Homem e animais recorrem às propriedades medicinais de algumas plantas. Os primeiros vestígios desta utilização remetem para a sepultura de um homem-de-neandertal (*Homo neanderthalensis*), 60.000 anos atrás, onde se encontrou pólen e fragmentos de flores de diferentes plantas medicinais (Hart, 2005).

Em 5000 A.C. plantas como a mandrágora e a efedra eram já referidas nas farmacopeias egípcia e mesopotâmica (Gonzalez, 2001).

Ao longo dos séculos estes conhecimentos foram sendo transmitidos e desenvolvidos por várias civilizações, persistindo até aos nossos dias. Estas práticas terapêuticas baseadas em conhecimentos ancestrais constituem a medicina tradicional, na qual as plantas medicinais são uma componente fundamental apesar de variações consoante as culturas ou hierarquias sociais dos diferentes países.

Após a revolução industrial, na segunda metade do século XIX, com o desenvolvimento da química analítica e o sucesso dos primeiros medicamentos de síntese, os derivados vegetais perderam importância na terapêutica, passando para segundo plano (Espírito-Santo, 1991).

Por várias razões, nas últimas décadas tem-se vindo a observar um crescente interesse nos países desenvolvidos pelo uso de plantas e seus derivados na terapêutica, constituindo, em certos casos, uma grande ajuda nos cuidados primários de saúde.

Uma das principais fontes de espécies medicinais é a floresta tropical, ecossistema rico em diversidade por excelência. Um em cada quatro medicamentos deve a sua origem a materiais de espécies vegetais. Uma grande parte destas espécies encontra-se em florestas, nomeadamente as florestas tropicais (Gurib-Fakim, 2006).

A crescente procura de plantas medicinais e aromáticas por parte dos países industrializados tem-se traduzido numa colheita indiscriminada da flora espontânea dos

países em desenvolvimento, donde estas plantas são maioritariamente importadas, principalmente do continente africano, característico por possuir uma flora de excepcional riqueza (Schippmann *et al.*, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial vive em países menos desenvolvidos onde depende quase em exclusivo da medicina tradicional para os seus cuidados de saúde primários (WHO, 1993).

A medicina tradicional africana é uma das mais antigas e das mais variadas. África é considerada o berço da humanidade. Apresenta uma grande diversidade biológica e cultural e diferenças marcantes entre diferentes regiões do continente no que concerne às práticas terapêuticas (Gurib-Fakim, 2006).

Em África, o recurso às plantas medicinais é bastante comum nas áreas rurais onde medicamentos de síntese não estão disponíveis ou são demasiado caros e existe dificuldade no acesso a hospitais ou clínicas. Esta dificuldade de acesso aos serviços de saúde da medicina ocidental também se verifica nos grandes centros urbanos onde os hospitais não são acessíveis à maioria da população, o seu pessoal médico tem pouca formação e está pouco motivado, os pacientes não costumam ser informados do que padecem e os tratamentos não têm em conta a sua cultura e religião, o que leva a que a maioria da população recorra em primeiro lugar à medicina tradicional (Elujoba *et al.*, 2005; Adamu *et al.*, 2005).

Os praticantes da medicina tradicional e os medicamentos tradicionais à base de plantas desempenham assim um papel fundamental na saúde destes povos, sendo muitas vezes, o único meio acessível a grande parte da população (Hostettmann *et al.*, 2000).

O conhecimento destes métodos terapêuticos é no entanto reservado a membros influentes da sociedade sendo transmitido por tradição oral, de geração em geração, não existindo ainda, na maior parte dos casos, qualquer documentação escrita disponível (Iwu, 1993).

Esta necessidade de recurso às plantas medicinais por parte dos países em desenvolvimento e o crescente interesse pelos países industrializados conferem grande importância ao estudo destas plantas, para validação da sua utilização tradicional, de forma a garantir não só a sua eficácia e segurança mas também a permitir o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas passíveis de utilização na terapêutica.

Este levantamento e registo das plantas medicinais africanas e seu uso tradicional tem vindo já a ser compilado por vários autores em artigos científicos (e.g. Inngjerdingen *et al.*, 2004; Adamu *et al.*, 2005), livros (e.g. Oliver-Bever, 1986; Iwu, 1993; Gomes *et al.*, 2003) e farmacopeias (e.g. Farmacopeia Senegalense Tradicional publicada em 1974).

A compilação destas informações é essencial para o isolamento e estudo de novos produtos dotados de actividade biológica. Com efeito, a grande maioria das actividades farmacológicas dos medicamentos que actualmente se usam no mundo ocidental foram descobertas após os usos etnomedicinais das plantas serem investigados (WHO, 2003).

Para o isolamento dos compostos activos são usados métodos de rastreio biológico e fraccionamento bioguiado dos extractos das plantas para localizar as actividades biológicas desejadas. Os produtos isolados podem vir a constituir novos princípios activos de medicamentos, compostos de partida para a hemi-síntese de novos compostos activos ou ainda actuar como modelos para a obtenção de novas moléculas por engenharia molecular (Hostettmann *et al.*, 1996).

A caracterização botânica, química e farmacológica de cada extracto passível de ser utilizado sob diferentes formas farmacêuticas é fundamental para garantir a validade da utilização tradicional da planta. Esta validação implica uma colaboração multidisciplinar entre diferentes áreas tais como botânica, farmacognosia, farmacologia, microbiologia, virologia e toxicologia, entre outras (Hostettmann *et al.*, 1996).

1.1. Aspectos Botânicos

As lianas são importantes componentes das florestas, especialmente nos trópicos, onde constituem normalmente mais de 25% da diversidade botânica. De grande importância ecológica, têm um papel significativo na dinâmica das comunidades florestais. Representam em média 21% das espécies de plantas utilizadas como alimento pelos primatas tropicais (Rezende & Ranga, 2005). As lianas interferem directamente com o desenvolvimento das árvores uma vez que as usam como suporte directo sendo deste modo determinantes na sua diversidade e abundância (Addo-Fordjour *et al.*, 2009a). Verifica-se que tendem a reduzir a taxa de crescimento das árvores, produção de folhas e reprodução sexual (Addo-Fordjour *et al.*, 2009b).

Aproximadamente metade das famílias de plantas vasculares possui espécies de lianas (Rezende & Ranga, 2005).

Apesar da sua importância ecológica, até finais da década de 1980, o estudo e o conhecimento da ecologia das lianas era pouco explorado, devido à dificuldade de se trabalhar em florestas densas e pela elevada altitude em que se encontram, nas copas das árvores (Rezende & Ranga, 2005).

As lianas apresentam uma particularidade na sua estrutura anatómica. É muito comum o seu caule apresentar um crescimento secundário anómalo. O xilema, originalmente regular, tende a dividir-se em várias unidades que podem apresentar diferentes aspectos, resultantes da diferente proliferação do parênquima vascular. O floema tende a estender-se entre estas unidades de xilema. (Bowes, 1997). Este tipo de massa xilemática dividida presente em algumas espécies é uma característica fundamental, ocorrendo em certos grupos taxonómicos e por isso o seu estudo revela-se fundamental para a identificação taxonómica.

Esta característica de variações cambiais em determinadas espécies de lianas torna possível o seu aproveitamento para artesanato, nomeadamente para adornar colares, brincos, caixas, molduras, etc. (Araújo & Costa, 2007).

O lenho das lianas, tal como acontece em todas as angiospérmicas, é constituído por elementos traqueais para condução de água, fibras de sustentação e células parenquimatosas cuja função é o armazenamento e translocação de substâncias ergásticas (Esau, 1974).

Os elementos traqueais consistem nos elementos de vaso e traqueídeos. Os elementos de vaso, encontram-se unidos ponta a ponta formando os vasos lenhosos, que podem atingir vários metros de comprimento. Este sistema de organização permite um eficiente percurso para o transporte de água (Taiz & Zeiger, 2006). Na zona de comunicação entre os elementos de vasos a parede encontra-se perfurada. Esta zona designa-se placa de perfuração e pode ser simples ou multiperfurada (Esau, 1974).

As paredes dos elementos de vaso também são perfuradas. Estes poros, designados normalmente por pontuações podem ser alternados ou opostos (Esau, 1974).

Os vasos podem ter diferentes calibres e a presença de uma grande diversidade de tamanhos apresenta vantagens e por isso é muito comum nas lianas (Carlquist, 1985).

Vasos de grande calibre possibilitam um maior fluxo de água pois a taxa de condução de um elemento condutor é directamente proporcional à quarta potência do seu raio (Carlquist, 1985). No entanto, estes vasos de maior calibre são mais susceptíveis ao embolismo e menos capazes de reparação quando comparados com os de menor calibre e traqueídeos (Carlquist, 1985; Ewers *et al.*, 1997).

A presença de vasos de menor calibre confere segurança ao sistema vascular pois permite que a condução de água continue mesmo que os vasos de maior calibre sofram embolismo (Araújo & Costa, 2007).

A presença de vasos de diferentes diâmetros combina a eficiência dos vasos largos com a segurança dos vasos estreitos.

Os traqueídeos podem-se encontrar dispersos pelo lenho ou adjacentes aos vasos. A presença de traqueídeos em torno dos vasos xilemáticos confere uma maior segurança na condução uma vez que estes elementos são menos vulneráveis ao embolismo devido ao seu pequeno calibre. De acordo com Carlquist (1985), os traqueídeos vasicêntricos oferecem um sistema condutor subsidiário ideal em caso de embolismo de vasos em dicotiledóneas lenhosas.

O tecido parênquimatoso também pode ter funções de regeneração compensando a perda de tecido condutor por lesão. Esta função, apesar de possível parece menos importante uma vez que a evolução tende a favorecer a prevenção em relação à recuperação do dano. Sendo o xilema de natureza vulnerável a embolismos, se fosse seriamente danificado, o hidrossistema falharia pelo que a regeneração dos tecidos teria pouco proveito (Carlquist, 1985).

O floema secundário das lianas tem sido ainda menos estudado do que o lenho pelo que nada se sabe sobre a origem, evolução e diversificação das suas características anatómicas (Pace, 2009).

Outro tecido importante na caracterização anatómica de um caule é o felogénio.

O felogénio é o meristema lateral que origina a periderme. A periderme é um tecido secundário protector que substitui a epiderme (tecido primário) no caule e raízes de plantas que apresentam crescimento secundário em espessura. Este tecido secundário é característico das plantas lenhosas. Tal como acontece com o câmbio vascular, em cones transversais o felogénio apresenta-se dentro de uma faixa estratificada, contínua na circunferência do caule (Ferri, 1999).

O estudo das diferentes células de esclerênquima que possam surgir no caule é também um factor importante para a sua caracterização. Estas células, que podem apresentar diferentes formas e tamanhos caracterizam-se por serem células mortas, com uma parede muito espessa. Esta parede secundária, característica destas células é constituída por celulose, hemicelulose, substâncias pépticas e 18-35% de lenhina (Gropper *et al.*, 2008).

A lenhina é formada pela polimerização de vários álcoois tais como o p-coumaril, trans-coniferil e trans-sinaptil. Esta polimerização permite a formação de uma rede tridimensional em torno das microfibrilhas de celulose. São estabelecidas ligações covalentes o que confere uma grande rigidez à parede. Sendo inerte, a lenhina confere um revestimento estável à célula, protegendo-a de ataques químicos, físicos e biológicos (Gropper *et al.*, 2008). São estas características da lenhina que conferem a este tecido as funções de sustentação e protecção.

As células parenquimatosas são células vivas e como tal no seu interior contêm substâncias ergásticas. Estas substâncias não são mais do que produtos do metabolismo celular, podendo ser material de reserva ou produtos resultantes do metabolismo da célula. As mais conhecidas são o amido, celulose, lípidos, cristais de oxalato de cálcio (drusas, ráfides, etc.), cristais de carbonato de cálcio (cistólitos) e de sílica (estruturas rectangulares, cónicas, etc.) mas também podem ser substâncias fenólicas, resinas, gomas e alcalóides, sendo as mais comuns os cristais de oxalato de cálcio e o amido (Silva, 2006).

Os cristais de oxalato de cálcio no caule formam-se, segundo alguns autores, como um mecanismo de regulação do cálcio, devido à ausência de um sistema excretor especializado. Para outros a função dos cristais de oxalato de cálcio está relacionada com o equilíbrio iónico da planta e suporte estrutural (Kikuchi *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2007).

Sabe-se ainda que estes cristais também desempenham funções de protecção contra herbívoros já que vários estudos demonstraram que a ingestão de plantas ricas em cristais de oxalato de cálcio pode causar toxicidade aguda e até mesmo a morte. No entanto, para alguns autores esta toxicidade é um efeito secundário resultante da acumulação de cristais para balanço iónico (Khan, 1995).

Estes cristais também se podem localizar na região do lenho. Para alguns autores, nestes casos, devido à sua localização, estes cristais estarão envolvidos no transporte de cálcio através do xilema (Prychid & Rudall, 1999).

De acordo com Meyer *et al.* (1965) e Costa (1994), os grãos de amido embora possam variar em tamanho e número, apresentam forma praticamente constante numa determinada espécie, sendo por isso importantes para a identificação da mesma.

Por vezes, as células parenquimatosas podem atravessar as paredes dos vasos, através das suas pontuações, dando origem a tiloses. Estes vasos passam deste modo a desempenhar funções de armazenamento. Para além desta função, as tiloses apresentam uma importante função de protecção. Estas células de parênquima só se expandem através das cavidades das pontuações para o interior do lúmen dos vasos quando estes se tornam inactivos. Os vasos como apresentam um elevado calibre, quando ficam inactivos são convidativos ao desenvolvimento de fungos no seu interior. Assim, um mecanismo que os possa fechar torna-se vantajoso. Deste modo, as células das tiloses desenvolvem numerosas alterações metabólicas e produzem grandes quantidades de compostos fenólicos, linhina e outras substâncias aromáticas que inibem o crescimento de fungos e bactérias (Mauseth, 2008).

A descrição anatómica do caule das lianas é por isso de fundamental importância para a identificação do material vegetal, particularmente nos casos em que não se dispõe das suas partes reprodutivas (flores, frutos e/ou sementes).

Esta caracterização pode permitir não só a garantia da autenticidade de um fármaco quando se trata de plantas medicinais mas também a fiscalização e conservação desses recursos que podem ter diversas utilidades para a população.

1.1.1 Família *Convolvulaceae*

Segundo o sistema desenvolvido por Cronquist para a classificação das plantas com flor, a posição sistemática desta família é: (USDA, 2009)

Reino: *Plantae*
Subreino: *Tracheobionta*
Superdivisão: *Spermatophyta*
Divisão: *Magnoliophyta*
Classe: *Magnoliopsida*
Subclasse: *Asteridae*
Ordem: *Solanales*
Família: *Convolvulaceae*

Recentemente numerosos taxonomistas têm-se debruçado sobre a posição relativa das diversas ordens e, com base em estudos cladísticos suportados pela análise de seis regiões de DNA, o “The Angiosperm Phylogeny Group” coloca a ordem *Solanales*, conjuntamente com nove outras ordens próximas, na superordem *Asterids*, considerada como fortemente monofilética (APG, 1998; APG II, 2003).

A família *Convolvulaceae* é constituída por ervas ou arbustos ou, raramente, pequenas árvores ou lianas, com pêlos glandulares ou não, simples, 2-ramosos ou estrelados. Folhas alternas sem estípulas, geralmente simples, inteiras ou dentadas ou lobadas. Flores frequentemente grandes e vistosas, axilares ou terminais, solitárias ou agrupadas em inflorescências variadas, em regra bissexuadas, raramente unissexuadas. Cálice de 5 sépalas imbricadas, iguais ou diferentes, frequentemente acrescentes no fruto. Corola geralmente afunilada ou assalveada, inteira ou 4-5-lobada, os lobos valvados ou contorcidos. Estames inseridos no tubo da corola e em número igual ao dos lobos, frequentemente desiguais; anteras deiscentes por fendas longitudinais. Ovário súpero, inteiro ou 2-4-lobado, geralmente 2-carpelar e 4-locular, com 2 óvulos erectos por carpelo, raramente mais. Fruto geralmente uma cápsula deiscente, raramente um fruto carnudo indeiscente. Sementes em regra 1-4, muito raramente 6 ou 10, com endosperma duro frequentemente cartilágneo; embrião grande, direito ou curvo, com 2 cotilédones plicados (Hutchinson & Dalziel, 1931; Verdcourt, 1963).

As *Convolvulaceae* constituem uma família com uma distribuição quase cosmopolita mas os seus representantes são principalmente plantas tropicais, sendo muitos géneros endémicos de regiões tropicais dos diferentes continentes. Esta família engloba mais de 1600 espécies agrupadas em 55-60 géneros (Stefanovic *et al.*, 2003), exibindo uma grande diversidade de características morfológicas. Existem registos de microfósseis atribuídos a esta família com mais de 40 milhões de anos. Apesar da família ser melhor conhecida nas regiões temperadas, pelos seus representantes herbáceos, muitas espécies tropicais são valiosas pela sua utilização medicinal, ornamental e alimentar (Stefanovic *et al.*, 2002).

Segundo Austin, referido por Stefanovic *et al.* (2003), a família é dividida em nove tribos.

1.1.2 Género *Calycobolus* Willd. ex Roem. & Schult.

O género *Calycobolus* pertence à tribo *Dichondreae*. É constituído por lianas com indumento de pêlos simples ou em forma de T. Folhas alternas, pecioladas, simples, inteiras, cartáceas ou coriáceas, pubescentes ou glabras, com nervação penada. Inflorescências axilares ou terminais em ramos laterais, umbeliformes ou tirsiformes. Flores pequenas a medianas, frequentemente odoríferas; cálice de 5 sépalas desiguais, as 2 externas frequentemente maiores que as restantes, ovadas, cordiformes ou largamente reniformes, encostadas uma à outra, as 3 internas geralmente menores, envolvendo a base da corola, ovadas ou elípticas, por vezes as 5 sépalas de idêntico comprimento mas formas diferentes; corola afunilada, branca; estames ligeiramente desiguais; estiletos 2. Fruto indeiscente, oculto no cálice acrescente e cartáceo (Lejoly & Lisowski, 1985).

O género compreende cerca de 25 espécies em África e 3 na América do Sul, em regiões quentes e húmidas. É o único género da família que está confinado aos trópicos da América e África. Apesar de conhecido há mais de dois séculos, existem ainda poucas colecções de *Calycobolus* disponíveis nos herbários de todo o mundo (Staples & Austin, 2009).

Uma breve história das vicissitudes do nome *Calycobolus* foi publicada por Heine (1963). Segundo este autor, J.D. Choisy, no artigo “Note sur le genre *Prevostea*”

publicado em “Annales des Sciences Naturelles. Paris”, vol. 4: 496 (1825), criou o novo nome genérico *Prevostea* nas *Convolvulaceae* para substituição de *Dufourea* Kunt, publicado em 1818 por Kunt, nome que tinha já sido publicado em 1810 para um género de Líquens. Na sinonímia de *Prevostea* Choisy citou outro nome genérico, “*Calycobolus* Willd., mss” e, passando a enumerar as espécies, referiu *Calycobolus pulchellus* Willd. mss. na sinonímia de *Prevostea glabra* (Kunt) Choisy e *Calycobolus emarginatus* Willd. mss. como sinónimo de *Prevostea sericea* (Kunt) Choisy. No entanto, o nome genérico *Calycobolus*, manuscrito em herbário por Willdenow (mss), tinha sido validamente publicado por Roemer & Schultes em 1819 (*Systema Vegetabilium*, 5: II). Contudo, talvez pelo facto de Roemer & Schultes usarem sempre as iniciais MS associadas ao nome *Calycobolus* quando lhe fazem referência, este continuou a ser rejeitado em favor de *Prevostea*. Só em 1907 é que H.D. House terá verificado que o nome *Calycobolus* tinha prioridade de publicação sobre *Prevostea* e, como tal, devia ser utilizado. House fez as combinações necessárias dos nomes das espécies anteriormente sob o género *Prevostea*, as conhecidas do continente americano, agora sob o nome *Calycobolus*. No entanto, estas alterações foram ignoradas pelos botânicos da flora africana e, só aquando do estudo da família *Convolvulaceae* para publicação da edição revista da Flora of West Tropical Africa, Heine fez as combinações dos nomes das espécies africanas sob o género *Calycobolus*.

Heine (1963) verificou haver um número exagerado de nomes para as espécies existentes em África e reduziu numerosos deles a sinónimos das 19 espécies de *Calycobolus* que reconheceu ao nível do continente africano. Entre estas, *Calycobolus heudelotii* (Baker ex Oliv.) Heine.

O género tem sido geralmente considerado como monofilético, com distribuição de ambos os lados do Oceano Atlântico. Staples & Austin (2009) em recente artigo, fizeram a revisão das espécies americanas e verificaram a consistência de caracteres nas 25 espécies africanas actualmente consideradas e nas 3 espécies sul-americanas reconhecidas, apontando para o seu provável monofiletismo. Com base no estudo dos caracteres morfológicos e nos dados de biologia molecular da espécie sul-americana *Calycobolus glaber* (Kunt) House e da espécie mexicana *Calycobolus nutans* (Moç. & Sessé ex Choisy) D.F. Austin, únicas até ao momento sujeitas a este tipo de estudos, os autores verificaram a impossibilidade de estas pertencerem ao mesmo grupo filético e transferiram a espécie mexicana para o género *Porana*.

Existem dúvidas quanto à etimologia do género *Calycobolus*. Para alguns autores, Willdenow ter-se-ia enganado ao escrever o nome, pretendendo escrever “Calycolobus”, nome que descreve uma importante característica do género que são os dois grandes lobos do cálice (calyx-lobe). O nome “Calycobolus” só faria sentido se se referir ao facto do cálice auxiliar na distribuição do fruto pelo vento (calyx-throw) (Heine, 1963).

1.1.3 *Calycobolus heudelotii* (Baker ex Oliv.) Heine

1.1.3.1 Descrição Botânica

Liana lenhosa atingindo 10 m ou mais de comprimento, com ramos roliços, glabros. Folhas alternas, pecioladas, com limbo elíptico, inteiro, até 13 cm de comprimento e 8 cm de largura, acunhado ou arredondado na base e no ápice ou em ponta curta no ápice, glabro, com 6-8 pares de nervuras laterais que se unem próximo da margem, mais ou menos coriáceo, brilhante na página superior, frequentemente com acarodomácias crateriformes nas axilas das nervuras secundárias na página inferior; pecíolo com 1-1,5 cm de comprimento, canaliculado. Flores nas axilas das folhas, em fascículos de 5-10, pediceladas. Cálice com 5 sépalas ovadas de 5-6 mm de comprimento, as 2 externas profundamente cordadas na base, densamente



Figura 1 – *Calycobolus heudelotii* no seu habitat natural
Iemberém, Guiné-Bissau. Março de 1998.
Foto: M.A. Diniz

pubescentes externamente e esparsamente pubescentes internamente, as 3 internas pilosas externamente sobre a nervura mediana e glabras internamente. Corola branca, afunilada, com cerca de 2 cm de comprimento, pubescente externamente e glabra internamente, o limbo aberto em 5 lobos triangulares. Estames inclusos, de comprimento idêntico ao do tubo da corola, com anteras sagitadas. Ovário cónico, glabro e estilete bífido. Frutos com cerca de 1 cm de comprimento, escondidos entre duas asas resultantes do crescimento das 2 sépalas externas, uma suborbicular com 3-5

cm de comprimento e outra oval com cerca de 2 cm de comprimento e 1,5 cm de largura (Berhaut, 1975; Lejoly & Lisowski, 1985).



Figura 2 - Flor de *Calycobolus heudelotii*
Região de Cacheu, Guiné-Bissau. Abril de 1997.
Foto: M.A. Diniz



Figura 3 - Fruto de *Calycobolus heudelotii*
Região de Cacheu, Guiné-Bissau. Abril de 1997.
Foto: M.A. Diniz



Figura 4 - Caule de *Calycobolus heudelotii*
Exemplar depositado no Herbário LISC com o nº
2574 da colecção de Diniz, Gomes & Silva



Figura 5 - Folha de herbário de *Calycobolus heudelotii*
Exemplar depositado no Herbário LISC com o nº
1869 da colecção de Diniz & Gonçalves

1.1.3.2 Sinonímias

Calycobolus heudelotii tem como sinónimos (Lejoly & Lisowski, 1985; Heine, 1963):

- *Breweria heudelotii* Baker ex Oliver
- *Prevostea heudelotii* (Baker) Hall. f.

1.1.3.3 Distribuição geográfica

Calycobolus heudelotii ocorre naturalmente em florestas na África Tropical (Ocidental e Central), nomeadamente no Senegal, Guiné, Gâmbia, Guiné-Bissau, Serra Leoa, Libéria, Costa do Marfim, Gana, República do Benin, Nigéria, Camarões (Burkill, 1985; Berhaut, 1975).

1.1.3.4 Ecologia

Esta espécie tem como habitat as florestas densas, florestas abertas e galerias florestais das regiões tropicais africanas (Catarino *et al.*, 2006).

1.1.3.5 Nomes vernáculos

A espécie é conhecida por diferentes nomes, consoante os países onde ocorre e com as diferentes etnias características de determinadas regiões de cada país. Nos parágrafos seguintes indica-se, para cada país, os diferentes nomes vernáculos por que é conhecida esta espécie, de acordo com as suas diferentes etnias (em parêntesis):

Na Guiné-Bissau, *Calycobolus heudelotii* é conhecido sob a designação de **másfi**, **massemedam** (balanta); **landum** (tanda); **lak-sé** (sosso); **manar-fana** (nalu); **funhulumá** (felupe senegalês) (Catarino *et al.*, 2006; Burkill, 1985; Espírito Santo, 1963).

No Senegal é designado por **bu kunger**, **ukoken u mbir** (diola); **furkunger** (diola de Tentouck) (Burkill, 1985).

Na Gâmbia também é conhecido por **bu kunger**, **ukoken u mbir** (diola de Fogny) (Burkill, 1985).

Na Serra Leoa é designado por **koleiveiye** (mende) e na Costa do Marfim por **apumu** (abure) (Burkill, 1985).

1.1.3.6 Utilizações

No Senegal os caules da liana são usados como cordas para amarrar as coberturas de colmo das casas (Burkill, 1985).

1.2. Aspectos Químicos

A caracterização química de uma planta medicinal torna-se importante não só para a sua correcta identificação mas principalmente para compreender quais os constituintes químicos que podem revelar actividade biológica e assim correlacioná-los com a utilização tradicional da planta.

A família *Convolvulaceae* é uma das maiores e mais diversificadas no reino vegetal. A sua grande diversidade manifesta-se não só a nível morfológico mas também na composição química (McDonald, 1991).

Grupos químicos que são muito frequentes no Reino Plantae são constituintes da maior parte das Convolvuláceas: compostos fenólicos tais como os derivados do ácido cinâmico, hidroxycumarinas, conjugados de hidroxycinamato, flavonóides, linhanos, terpenos, esteróis, carotenóides, ácidos gordos e carboidratos, entre outros (Hegnauer, 1964 e 1989).

No entanto esta família apresenta a particularidade de apresentar classes de metabolitos que raramente ocorrem no reino vegetal tais como alcalóides derivados da ornitina e fitoalexinas sesquiterpenóides. A família caracteriza-se ainda pela ausência de iridóides, óleos essenciais, misturas complexas de mono-/sesquiterpenos lipofílicos e/ou fenilpropanoídes secretados por células glandulares (Eich, 2008).

Existem ainda metabolitos secundários específicos de apenas alguns géneros desta família tais como alcalóides indolizidínicos, alcalóides pirrolizidínicos, ergolínicos e glicorresinas (Eich, 2008).

Uma glicorresina é normalmente constituída por oligossacarídeos e ácidos gordos hidroxilados, podendo ainda conter ácidos orgânicos. Os oligossacarídeos estão ligados

aos ácidos gordos hidroxilados formando os ácidos glicosídicos. Estes por sua vez ao sofrerem uma ciclização específica formam as macrolactonas. Estas podem ser consideradas as estruturas finais que constituem as glicorrezinas ou, por vezes as unidades monossacarídeas podem ainda sofrer acilação por ácidos específicos (Eich, 2008).

Devido à similaridade das estruturas dos seus constituintes individuais, as glicorresinas tornam-se compostos muito complexos, o que associado à dificuldade no isolamento dos oligossacarídeos dificulta ainda mais a sua identificação e correcta caracterização (Bah & Pereda-Miranda, 1996).

Dentro do género *Calycobolus* até à data existe apenas um estudo sobre a composição química de uma espécie da região amazónica, *C. ferrugineus*, onde se verificou a presença de alcanos lineares e ramificados, terpenóides, compostos fenólicos e a ausência de alcalóides. Os compostos maioritários encontrados no extracto etanólico foram os derivados do ácido cinâmico (Siani *et al.*, s/d).

1.3. Aspectos Biológicos

Calycobolus heudelotii é utilizada na medicina tradicional da maior parte dos países da África Ocidental, onde foi identificado.

De acordo com a informação bibliográfica disponível, são usadas as folhas e caules da liana:

- Na Guiné-Bissau, na região de Tombali, o caule da liana é utilizado sob a forma de decocto, no tratamento de inflamações, alergias cutâneas e na desinfecção de feridas. Este decocto também pode ser ingerido para tratar a urticária (Catarino *et al.*, 2006).
- As folhas fervidas servem para desinfectar feridas e o seu macerado é usado como antipirético. **Massemedam**, um dos nomes como é conhecida na Guiné, significa “para a febre”. As folhas aquecidas também podem aplicar-se directamente sobre as pústulas. A infusão das folhas também é usada no tratamento de “ataques” (Catarino *et al.*, 2006).

- Em Casamance (Senegal) o decocto das folhas pode ser bebido ou usado em banhos de vapor para a fadiga (Burkill, 1985).
- Na Costa do Marfim a casca dos caules é macerada e friccionada sobre o estômago para aliviar as dores intestinais (Burkill, 1985).

As infecções que surgem na pele e/ou tecidos moles, são um grande problema de saúde com sintomas que podem variar desde a foliculite, furunculose ou dermatite atópica até fasciíte necrosante. O tratamento inadequado ou muito prolongado destas infecções pode originar endocardites, osteomielites, meningites e pneumonias, podendo nos casos mais complicados ser necessária a hospitalização, intervenção cirúrgica e o tratamento com antibióticos por via intravenosa (Kwaadsteniet *et al.*, 2009).

Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* são alguns dos principais microorganismos responsáveis pela infecção de feridas em qualquer parte do mundo (Isibor *et al.*, 2008). A infecção de feridas cutâneas é bastante comum nos países em desenvolvimento devido às reduzidas condições de higiene (WHO, 2004).

A cicatrização das feridas é um processo multifactorial que resulta não só da contracção e encerramento da ferida mas também da restauração da função de barreira da pele. A reparação dos tecidos lesados ocorre com a sequência de uma série de eventos, onde se incluem a inflamação, proliferação e migração de diferentes tipos de células (Chattopadhyay *et al.*, 2002). As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são partes vitais na cura e servem muitas vezes como mensageiros celulares que conduzem a numerosos aspectos da função celular (Singh *et al.*, 2006). As ROS podem contribuir para o processo de cicatrização das feridas pois em concentrações micromoleculares o peróxido de hidrogénio promove a expressão do factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) nos queratinócitos. No entanto o peróxido de hidrogénio rapidamente promove a formação de outras espécies oxidantes mais estáveis tais como ácido hipocloroso, cloraminas e aldeídos. Estas, em conjunto, tornam o local da ferida rico em espécies oxidantes. Em altas concentrações as ROS induzem danos graves a nível dos tecidos, podendo mesmo levar a transformações neoplásicas (Pattanayak & Sunita, 2008).

O papel dos compostos fenólicos na adsorção e neutralização de radicais livres, quelando singuletos e tripletos de oxigénio ou decompondo os peróxidos encontra-se já amplamente comprovada. Muitos destes compostos, com uma elevada capacidade antioxidante, estão associados a uma ocorrência diminuída de diversas patologias e consequentemente a uma menor taxa de mortalidade. Por isso a pesquisa destes compostos torna-se cada vez mais importante e relevante para a saúde pública tendo em conta os novos hábitos alimentares e doenças que daí resultam (Pattanayak & Sunita, 2008).

Os linhanos constituem outro grupo metabólico, que tal como os anteriores é dotado de características antioxidantes (Craig, 1999). Dentro da família *Convolvulaceae*, existem espécies próximas do género *Calycobolus*, onde já se comprovaram as propriedades terapêuticas dos seus linhanos na protecção contra a oxidação das LDL (Páska et al, 2002).

As propriedades antioxidantes destes compostos são já amplamente conhecidas, existindo mesmo estudos em espécies próximas do género *Calycobolus*, cuja actividade protectora da função hepática e renal se deve aos seus constituintes maioritários da classe dos linhanos e derivados do ácido quínico (Yen *et al.*, 2007).

Os terpenos constituem outra classe de compostos com representantes em quase todas as espécies vegetais, sendo as suas propriedades antioxidantes vastamente conhecidas (Grassman, 2005).

As glicorresinas encontram-se ainda pouco estudadas devido à sua complexidade estrutural e apesar de não haver qualquer dado sobre a possível actividade antioxidante, sabe-se que na sua composição podem conter ácidos ligados aos oligossacarídeos tais como o ácido *trans*-cinâmico (Eich, 2008). O ácido *trans*-cinâmico por sua vez já apresenta propriedades antioxidantes (Tung *et al.*, 2009).

A presença de diferentes classes de antioxidantes numa planta medicinal torna-se vantajosa, resultando um efeito cumulativo (Grassman, 2005).

A avaliação da toxicidade de uma planta medicinal é muito importante para garantir a segurança da sua utilização, sendo fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos.

Nesta avaliação são doseados os níveis séricos dos principais marcadores de lesão em diferentes órgãos.

Assim, a nível da toxicidade hepática doseiam-se as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Esta avaliação é fundamental pois a toxicidade hepática induzida pelos fármacos é um dos maiores problemas no desenvolvimento de novos fármacos e um dos principais motivos pelas recolhas do mercado de medicamentos já comercializados (Adler *et al.*, 2010).

Como marcador de lesões inespecíficas de órgão é doseado o nível sérico da enzima lactato desidrogenase (LDH). A enzima LDH desempenha um papel muito importante na produção de energia pelas células. Existe em diferentes tipos de células no nosso organismo, sendo os órgãos mais ricos em LDH o coração, fígado, rim e músculo. Qualquer dano que surja num tecido vai elevar os níveis séricos de LDH. Deste modo esta enzima apesar de importante marcador de lesão celular, sendo inespecífica não nos indica qual o dano ou órgão afectado, sendo necessário a avaliação de outros parâmetros (Washizu *et al.*, 2002).

Para avaliar o efeito a nível do músculo cardíaco e cérebro são doseados os níveis da enzima creatinofosfoquinase (CK-MB). Uma das principais causas para o aumento da concentração sérica de CK-MB é a isquémia ou qualquer outra lesão no músculo cardíaco (Nienhuis *et al.*, 2008).

As alterações a nível renal são avaliadas através do doseamento dos biomarcadores creatinina e ureia.

Materiais e Métodos

2.1 Solventes e padrões

2.1.1 Solventes

Foram utilizados solventes de diferentes graus de pureza, consoante as exigências inerentes à metodologia seguida. Assim, utilizaram-se solventes Merck:

- puros, para obtenção do extracto;
- pro-análise, na preparação das fases móveis e das amostras para TLC;
- de HPLC, na preparação dos eluentes e das amostras para HPLC e LC/MS e no fraccionamento do extracto.

Na preparação e fraccionamento do extracto foi utilizada água destilada, obtida num destilador Jencons AQ/B. Nas técnicas cromatográficas foi utilizada água de grau de pureza HPLC, obtida a partir do sistema de purificação UHQ MKII da Elga.

2.1.2 Padrões

Nas técnicas cromatográficas, para caracterização do extracto e identificação dos seus componentes foram utilizados padrões da marca Extrasynthese. Foram escolhidos como padrões alguns dos compostos mais representativos das classes químicas pesquisadas (Stahl, 1969; Wagner, 1984).

Todos os padrões foram utilizados sob a forma de soluções metanólicas, na concentração de 1 mg/ml.

Os padrões utilizados ao longo dos estudos encontram-se listados na tabela 1.

Tabela 1 – Padrões utilizados nos diferentes sistemas cromatográficos

| Padrões | | | | | |
|--|---|---|---|----------------------------|---|
| Alcalóides | Flavonóides | Compostos fenólicos | Taninos hidrolisáveis | Taninos condensados | Terpenos |
| Harmano Hiosciamina Escopolamina | Quempferol Hiperósido Quercetina Ramnetina Isoramnetina Rutósido Terflavina | Ácido cafeico Ácido cinâmico Ácido clorogénico Ácido ferrúlico | Ácido gálgico Ácido elágico Etilgalhato | Catequina Epicatequina | β -sitosterol Ácido arjunólico Ácido oleanólico Betulina |

2.2 Material vegetal

2.2.1 Material vegetal para a análise botânica

O material vegetal para o estudo botânico foi colhido em 2008, na região de Iemberém, na Guiné-Bissau, por Luís Catarino (Herbário LISC, Jardim Botânico Tropical, Lisboa). Foram colhidas cinco amostras do caule da liana, com cerca de 8 cm de comprimento e conservadas ao abrigo da luz, numa mistura de álcool, água e glicerina em partes iguais. A identificação preliminar do material botânico foi realizada em campo por Luís Catarino, sendo posteriormente complementada por Maria Adélia Diniz (Herbário LISC, Jardim Botânico Tropical, Lisboa). Os respectivos exemplares voucher encontram-se depositados no Herbário LISC, com o número de colheita 1713 da colecção de Luís Catarino.

2.2.2 Material vegetal para as análises química e biológica

O material vegetal para o estudo químico e biológico foi colhido em 1998, na região de Iemberém, por Maria Adélia Diniz (Herbário LISC, Jardim Botânico Tropical, Lisboa), Elsa Gomes e Olga Silva (Laboratório de Farmacognosia, FFUL), durante uma Missão integrada no projecto “Estudo e Aproveitamento de Plantas Medicinais da Guiné-Bissau”. A identificação do material botânico foi realizada por Maria Adélia Diniz. Os respectivos exemplares voucher encontram-se depositados no Herbário LISC, com o número 2574 da colecção de Diniz, Gomes & Silva.

2.3 Preparação do material vegetal para a análise botânica

Em laboratório usaram-se três amostras de cada um dos cinco exemplares do caule de *Calycobolus heudelotii*.

2.3.1 Análise macroscópica

Esta análise visou a observação do aspecto geral do caule quanto à cor, brilho, cheiro, sensibilidade ao tacto e desenho assim como outros aspectos que, embora relacionados com a estrutura, são facilmente observáveis, como sejam textura, grão, veio e diferenciação das camadas de crescimento.

As amostras foram observadas inteiras a olho nu e com uma lupa Olympus SZ61. O registo fotográfico foi efectuado com um sistema fotográfico Olympus ColorView IIIu, sendo as imagens processadas com o software cell[^]D (Olympus Soft Imaging Solutions).

2.3.2 Análise em microscopia óptica

As amostras do lenho foram preparadas para os estudos microscópicos, recorrendo a cortes histológicos dos corpos de prova (1,5x1,5x1,5cm), orientados nos planos transversal e longitudinal radial e tangencial.

Todas as preparações observadas foram extemporâneas, sendo o meio de montagem utilizado água destilada. O material a observar foi colocado entre uma lâmina e uma lamela, sob o meio de montagem.

Em algumas secções do material, a presença de amido foi evidenciada pelo teste do soluto de lugol (Harisha, 2006).

A análise em microscopia óptica foi efectuada com um microscópio Olympus CX40.

O registo fotográfico foi efectuado com um sistema fotográfico Olympus ColorView IIIu, sendo as imagens processadas com o software cell[^]D (Olympus Soft Imaging Solutions).

Efectuou-se a descrição anatómica, contagem e medição dos principais elementos característicos de um caule (vasos xilemáticos, traqueídeos, células pétreas, drusas e grãos de amido).

2.3.3 Análise em microscopia electrónica de varrimento

As amostras foram preparadas para a análise em microscopia electrónica, recorrendo a cortes orientados nos planos transversal e longitudinal. Posteriormente as amostras foram secas em estufa a 30°C. Após total desidratação as amostras para análise foram montadas num suporte metálico (pionés). Seguiu-se a sua metalização com ouro, num metalizador JEOL JSM-1200 Fine Coater.

A observação foi feita num microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-5200LV, com sistema de aquisição directa de imagem, na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

As imagens foram posteriormente processadas com o software cell[^]D (Olympus Soft Imaging Solutions).

Efectuou-se a descrição anatómica, contagem e medição dos principais elementos característicos de um caule (vasos xilemáticos, traqueídeos, células pétreas, drusas e grãos de amido).

2.3.4 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos com as contagens e medições dos diferentes parâmetros analisados foram processados com o software cell[^]D (Olympus Soft Imaging Solutions), tendo-se calculado a média e desvio padrão.

2.4 Preparação dos extractos

Após colheita e identificação, o material vegetal foi moído num moinho Christy & Norris.

Para a obtenção do extracto utilizou-se um reactor de vidro de 10 l de capacidade, munido de sistema de aquecimento e agitação.

A separação da solução extractiva foi efectuada por decantação, seguida de filtração sob vácuo, recorrendo a uma bomba de água Yamato WP-25, acoplada a um filtro G4 e a um quitasato de dimensões apropriadas ao volume de solução a filtrar.

A solução extractiva de maior volume foi concentrada a resíduo seco num evaporador Büchi modelo R152 de 20 l de capacidade, acoplado a uma bomba de membrana Vacuubrand a uma temperatura inferior a 30°C.

2.4.1 Extracção com etanol

Após moagem, procedeu-se à extracção com etanol a 70%. O solvente foi adicionado na proporção mínima de 10 L/Kg de planta seca, tendo a extracção sido efectuada até à exaustão e à temperatura ambiente (22°C). O extracto obtido foi concentrado a resíduo seco, sob pressão reduzida.

Esta extracção foi efectuada em 1999 tendo sido o extracto seco guardado num excicador, no escuro, até que o seu estudo fosse iniciado.

2.4.2 Fraccionamento do extracto com metanol

O extracto etanólico seco obtido em 1999 foi retomado em metanol. O solvente foi adicionado na quantidade mínima e suficiente para a total dissolução do extracto original, tendo a dissolução sido efectuada à temperatura ambiente (22°C). A porção residual do extracto inicial que não se dissolveu foi concentrada a resíduo seco, sob pressão reduzida e posta de lado.

A fracção metanólica obtida foi depois concentrada a resíduo seco, sob pressão reduzida.

Esta fracção foi utilizada nos estudos químicos, biológicos e toxicológicos apresentados, sendo por nós designada no decorrer dos ensaios realizados como extracto metanólico (Cm).

2.4.3 Extracção alcaloídica

Uma porção da fracção metanólica seca foi retomada em água acidificada ($H_2O+H_2SO_4$ 10%) em banho de água (40°C). Após alcalinização com amónia até pH 9, a solução foi

submetida a uma extracção líquido-líquido com éter dietílico. Após separação a fase aquosa foi alcalinizada com amónia (pH 9) e extraída com éter dietílico. As fases etéreas foram reunidas e o extracto alcaloídico (Ca) obtido foi posteriormente concentrado a resíduo seco.

2.5 Métodos biológicos

2.5.1 Rastreio da actividade antimicrobiana

O rastreio da actividade antimicrobiana foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL) com a colaboração dos Dr. Juan Cirera e Mestre Gustavo Silva, sob orientação da Prof. Doutora Aida Duarte.

2.5.1.1 Amostras

Para as determinações qualitativa e quantitativa *in vitro* da actividade antimicrobiana preparou-se uma solução em metanol à concentração de 10mg/ml, de uma porção do extracto seco obtido em 2.4.2.

2.5.1.2 Microorganismos testados

Os microorganismos testados encontram-se listados na tabela 2.

Tabela 2 – Rastreio da actividade antimicrobiana: estirpes utilizadas

| Microorganismos testados | |
|---|--|
| Tipo | Estirpes |
| Cocos Gram positivos | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 435628 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| | <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240 |
| Bacillus Gram negativos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27953 |
| Bacillus Gram negativos (Enterobactérias) | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 |
| Levedura | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |

2.5.1.3 Ensaio

2.5.1.3.1 Determinação qualitativa

A avaliação *in vitro* da actividade antimicrobiana do extracto em estudo efectuou-se pelo método de difusão em meio sólido.

As diferentes bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo um meio de agar Mueller-Hinton (Difco). *Candida albicans* foi cultivada sobre meio de agar casitone (Pasteur). Fizeram-se orifícios de 6 mm de diâmetro no agar e preencheram-se com 30 µl de suspensão, equivalente a 0,3 mg de extracto. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. As zonas de inibição de crescimento foram observadas à volta dos orifícios feitos no agar.

Todos os ensaios foram efectuados em triplicado e contra testemunhos do solvente (metanol).

2.5.1.3.2 Determinação quantitativa

A concentração inibitória mínima (CIM) do extracto foi determinada usando o método de diluição em meio líquido.

A amostra foi adicionada ao meio líquido Mueller-Hinton, inoculado com a suspensão bacteriana respectiva, ou ao meio líquido *Yeast Malt Agar* (YMA), inoculado com a suspensão da levedura.

O intervalo de concentrações testado foi de 5000 µg/ml a 48 µg/ml.

Os valores de CIM corresponderam à mais baixa concentração de amostra que inibiu o crescimento do microorganismo, após 24 h de incubação a 37 °C.

Todos os ensaios foram efectuados em triplicado e contra testemunhos do solvente (metanol).

2.5.2 Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada no Laboratório de Farmacologia da FFUL com a colaboração do Mestre João Rocha, sob supervisão do Prof. Doutor Bruno Sepodes.

2.5.2.1 Amostras

O extracto metanólico seco foi dissolvido em PEG 400 a 20% para a preparação das soluções de acordo com a dose a ser administrada. Para o ensaio de toxicidade aguda usaram-se três doses diferentes do extracto (500, 1000 e 1500 mg/Kg). Como controlo utilizou-se uma solução de PEG 400 a 20%.

Posteriormente, tendo em conta os resultados que se obtiveram com estas doses repetiram-se os ensaios com novas doses (300, 600 e 1200 mg/Kg), usando como controlo e como meio de dissolução o dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%.

2.5.2.2 Animais

Foram utilizados murganhos machos Wistar, com peso médio de 30-40g, provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia da FFUL. Os animais foram mantidos no biotério sob condições padrão de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) e humidade relativa do ar (40-60%), com controlo do ciclo claro/escuro (12h), conforme define o comité de ética em experimentação animal. Os animais tiveram acesso a ração comercial do tipo purina e água *ad libitum*.

2.5.2.3 Ensaio

Os animais foram divididos em 4 grupos (um controlo e 3 grupos experimentais) sendo cada grupo constituído por 8 animais. No primeiro e segundo dias de ensaio, foi administrado a cada animal dos grupos experimentais 0,3 ml da dose em estudo (500, 1000 e 1500 mg/Kg) por via intraperitoneal.

O grupo controlo recebeu uma solução de PEG 400 a 20% em volume equivalente ao administrado aos grupos experimentais, ou seja 0,3 ml.

Nas horas seguintes à administração da solução em estudo, os animais foram observados para detecção de qualquer alteração comportamental ou letalidade do extracto.

No terceiro dia do ensaio todos os animais foram sacrificados e procedeu-se à colheita do seu sangue para a avaliação laboratorial de diversos marcadores de toxicidade.

Os ensaios da avaliação da toxicidade aguda foram repetidos posteriormente usando as doses de 300, 600 e 1200 mg/Kg numa solução de DMSO a 10% e contra um controlo deste solvente, sendo neste segundo ensaio os grupos experimentais constituídos apenas por 4 animais e o grupo controlo por 6 animais.

2.5.2.4 Análises bioquímicas

A avaliação laboratorial incidiu sobre diversos parâmetros bioquímicos passíveis de indicar diferentes tipos de lesões sobre diversos tecidos.

Para a avaliação da toxicidade hepática dosearam-se as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Como indicadores de toxicidade renal foram-se dosear a creatinina e ureia. A enzima lactato desidrogenase (LDH) foi doseada para avaliação de possíveis lesões a nível de diversos tecidos e a creatinofosfoquinase (CK-MB) como marcador de lesão miocárdica e/ou cerebral.

2.5.2.5 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O tratamento estatístico foi feito através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni, usando software validado (GraphPad Prism4®). Considerou-se um nível de significância de 5%.

2.6 Métodos cromatográficos analíticos

2.6.1 Cromatografia em camada fina (TLC)

Para a caracterização preliminar do extracto foram efectuadas diversas cromatografias em camada fina (TLC) em celulose ou sílica, em diferentes sistemas e usando reveladores específicos para cada um dos grupos em análise.

As placas usadas foram sílica gel 60 F₂₅₄ Merck art. 1.5554 (SiG60) e celulose Merck art. 5552 (Cl).

Os sistemas cromatográficos utilizados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Sistemas cromatográficos utilizados em TLC

| Alcalóides | | | |
|--|--------------------------|--|---|
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S1 | SiG60 | Tolueno:acetato de etilo:dietilamina (70:20:10) | 1° R.D / visível 2° NaNO ₂ a 10% / visível |
| S2 | SiG60 | Acetato de etilo:ácido fórmico:água (60:10:10) | R.D / visível e R.I. / visível |
| S3 | SiG60 | Clorofórmio:Metanol (95:5) | R.D / visível e R.I. / visível |
| Flavonóides | | | |
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S4 | SiG60 | Acetato de etilo:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:27) | R. Neu / UV 254 e 366 nm |
| Flavonóides (heterósidos), Taninos hidrolisáveis, Compostos fenólicos | | | |
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S5 | Cl | Ácido acético:água (30:70) | R. Neu / UV 254 e 366 nm |
| S6 | Cl | Ácido acético:água (20:80) | R. Neu / UV 254 e 366 nm |
| S7 | Cl | Ácido acético:água (15:85) | R. Neu / UV 254 e 366 nm |
| S8 | Cl | Ácido acético:água (6:94) | R. Neu / UV 254 e 366 nm |
| Taninos hidrolisáveis | | | |
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S9 | Cl | Ácido acético:água (15:85) | Cloreto férrico 5% em HCL 0,5N /visível |
| Taninos condensados | | | |
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S10 | Cl | Acetato de etilo:ácido fórmico:água (60:10:10) | Vanilina clorídrica / Visível |
| Terpenóides, Esteróides | | | |
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S11 | SiG60 | Tolueno:acetato de etilo (80:20) | R. LB / UV 254 e 366 nm |
| S12 | SiG60 | Tolueno:acetato de etilo (70:30) | R. LB / UV 254 e 366 nm |
| S13 | SiG60 | Clorofórmio:metanol (4:1) | R. LB / UV 254 e 366 nm |
| Linhanos | | | |
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S14 | SiG60 | Clorofórmio:metanol (97:3) | H ₂ SO ₄ :AcOH:H ₂ O (1:20:4) UV 254 e 366 nm |
| Saponinas | | | |
| Sistema | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| S15 | SiG60 | n-butanol:ácido acético:água (4:1:5) | Anisaldeído sulfúrico / UV 254 e 366 nm |

Em simultâneo com a análise do extracto foram também usados, em alguns sistemas cromatográficos, padrões de compostos cuja presença se pretendia averiguar (tabela 1)

As amostras foram aplicadas com uma micropipeta graduada e cada placa foi eluída em tinas convencionais de 20 × 10 cm. Após eluição e secagem prosseguiu-se à observação das placas no visível e/ou ultravioleta (UV) a 254 e 366 nm. Posteriormente cada placa foi pulverizada com um reagente adequado: Reagente de Neü (R. Neü) para flavonóides e compostos fenólicos, Reagente de Iodoplatinato (R.I) e Reagente de Dragendorff (R.D) para alcalóides, Reagente de Lieberman-Bouchard (R.LB) para terpenos e terpenóides. Após secagem as placas foram observadas no visível e/ou UV a 254 e 366 nm, usando um filtro de UV adequado.

O registo fotográfico foi efectuado com uma máquina fotográfica Olympus C-5050 no visível e/ou UV a 254 e 366 nm.

2.6.2 Determinação da actividade antioxidante por bioautografia (TLC)

Para determinação da actividade antioxidante utilizou-se o radical hidróxido de difenilpicrazilo (DPPH, Sigma).

Preparou-se uma solução metanólica do extracto a 10 mg/ml e aplicou-se 10 µl em placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck. As placas foram divididas ao meio e em cada uma o ensaio foi efectuado em duplicado.

Utilizaram-se diferentes sistemas cromatográficos (tabela 4). Cada ensaio foi efectuado usando como anti-oxidante de referência uma mistura de 2 e 3-*terc*-butil-4-hidroxianizol (BHA, Sigma).

Numa metade das placas, pulverizou-se com DPPH na concentração de 0,2 % (m/v) em metanol. O aparecimento de manchas amarelas por contraste com o fundo roxo é característico da presença de substâncias com actividade antioxidante. Na outra metade as placas foram pulverizadas com um reagente adequado (tabela 4). Após secagem observou-se no visível e/ou UV a 254 e 366 nm.

O registo fotográfico foi efectuado com uma máquina fotográfica Olympus C-5050 no visível e/ou UV a 254 e 366 nm, usando um filtro de UV adequado.

Tabela 4 – Sistemas cromatográficos utilizados para detecção da actividade antioxidante por bioautografia

| Sistemas Cromatográficos | | | | |
|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|---|
| Sistema | Classe de compostos | Fase estacionária | Fase móvel (V/V) | Deteção |
| A1 | Compostos fenólicos | Cl | Ácido acético:água (15:85) | R. Neu / UV 254 e 366 nm |
| A2 | Alcalóides | SiG60 | Clorofórmio:metanol (95:5) | R.I. / visível |
| A3 | Terpenóides | SiG60 | Clorofórmio:metanol (4:1) | R. LB / UV 254 e 366 nm |
| A4 | Linhanos | SiG60 | Clorofórmio:metanol (97:3) | H ₂ SO ₄ :AcOH:H ₂ O (1:20:4) UV 254 e 366 nm |

2.6.3 Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detector de matriz de díodos (LC/UV)

Para obtenção do perfil cromatográfico do extracto, recorreu-se a um sistema Alliance (Waters) constituído por um cromatógrafo Waters 2690 acoplado a uma matriz de díodos 996. O sistema foi controlado por computador usando o programa Millennium 32.

Neste equipamento, os cromatogramas foram registados por detecção UV/Visível no máximo de absorvência de cada banda (*Maxplot*), no intervalo de comprimento de onda entre 210 e 450 nm. Registou-se ainda o cromatograma obtido a 280 nm. Os espectros de UV/VIS de cada banda foram registados entre 210 e 450 nm.

Utilizaram-se dois sistemas cromatográficos diferentes. No primeiro usou-se uma coluna Nova-Pak e analisou-se o extracto metanólico total e as suas duas fracções obtidas após separação na coluna Sep-Pak C18 (vide procedimento em 2.7.1). As amostras foram utilizadas numa solução de 10 mg/ml em MeOH:H₂O (80:20), sendo o volume de injeção de 15µl.

O segundo sistema utilizado foi já direccionado para a análise em LC/UV/ES-MS sendo analisada apenas a primeira fracção obtida na separação em coluna Sep-Pak C18 (vide procedimento em 2.7.1). Neste sistema as amostras foram analisadas em solução de 10 mg/ml em MeOH:H₂O (80:20) e os padrões em solução de 1 mg/ml em MeOH. O volume de injeção foi de 15µl.

As condições cromatográficas (colunas, fases móveis, gradientes, velocidade de fluxo e temperatura) utilizadas são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Condições cromatográficas utilizadas em HPLC

| Sistemas cromatográficos utilizados em HPLC | | | | |
|--|---|--|--------------|--------------------|
| Pré-coluna | Coluna | Gradiente | Fluxo | Temperatura |
| Nova-Pak Sentry C ₁₈ Waters | Nova-Pak C ₁₈ 4µm 150mm×3,9mm d.i., Waters | MeOH-H ₂ O (0,1% HCOOH) 5:95 a 30:70 em 35 min, 30:70 a 100:0 em 10 min, 100:0 em 6 min, 100:0 a 5:95 em 4 min | 1ml/min | 25°C |
| Pré-coluna | Coluna | Gradiente | Fluxo | Temperatura |
| Atlantis T3 Waters | Atlantis T3 2,1×100mm, Waters | MeOH-H ₂ O (0,1% HCOOH) 15:85 a 90:10 em 50 min, 90:10 a 100:0 em 3 min, 100:0 em 5 min, 100:0 a 15:85 em 2 min | 200µl/min | 25°C |

2.6.4 Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a espectrometria de massa por electro-atomização (*electrospray*, LC/UV/ES-MS)

A análise por LC/UV/ES-MS foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massa do Centro de Estudos Farmacêuticos, na Universidade de Coimbra pela Doutora Fátima Nunes.

Para esta técnica foi utilizado um espectrómetro de massa QIT-MS, modelo LCQ Advantage ion Max MS/MS com capacidade MSⁿ, equipado com fonte de ionização por electro-atomização (ESI). As condições cromatográficas (coluna, fases móveis, gradientes, velocidade de fluxo e temperatura) utilizadas encontram-se descritas na tabela 6. As condições do ensaio foram as seguintes: energia de colisão de 35%; voltagem de ionização - 3,5 KV; temperatura do capilar - 350 °C. A velocidade de fluxo foi mantida a 0,2 ml/min. Os espectros (*m/z* entre 100 e 1000) foram registados em modo negativo.

Apenas foi analisada a fracção MeOH:H₂O obtida na separação em coluna Sep-Pak C18 (vide procedimento em 2.7.1) pois foi nesta fracção que se obteve um melhor perfil cromatográfico em LC/UV dos compostos maioritários do extracto.

Tabela 6 – Condições cromatográficas utilizados em LC/UV/ES-MS

| Sistema cromatográfico utilizado em LC/UV/ES-MS | | | | |
|--|----------------------------------|---|--------------|--------------------|
| Pré-coluna | Coluna | Gradiente | Fluxo | Temperatura |
| Atlantis T3 Waters | Atlantis T3 2,1×100mm, Waters | MeOH-H ₂ O (0,1% HCOOH) 15:85 a 90:10 em 50min, 90:10 a 100:0 em 3 min, 100:0 em 5 min, 100:0 a 15:85 em 2 min | 200µl/min | 25°C |

2.7 Preparação e Purificação da amostra

2.7.1 Extracção em fase sólida em coluna Sep-Pak C18

Esta técnica foi utilizada no decurso do estudo fitoquímico, para separação dos constituintes maioritários do extracto metanólico, tendo em conta a sua polaridade.

Usou-se como fase estacionária uma coluna Sep-Pak C18 Waters com capacidade para 1 ml. O fraccionamento foi efectuado no vácuo usando como fases móveis MeOH:H₂O (80:20) para obtenção da primeira fracção (Cm1) e MeOH para a segunda fracção (Cm2).

2.8 Rastreio de Alcalóides

2.8.1 Reacções gerais de precipitação de alcalóides

Esta técnica foi usada para uma rápida detecção de alcalóides extracto.

Colocou-se 1 ml do extracto alcaloídico obtido em 3.3.3 em 3 tubos de ensaio, Adicionou-se 3 gotas dos reagentes de Dragendorff, Mayer e Bouchardat a cada tubo de ensaio, respectivamente.

Observaram-se as colorações e precipitados obtidos.

Resultados e Discussão

3.1 Estudo Morfológico

3.1.1 Caracterização Macroscópica

Examinada a olho nu ou à lupa, o caule apresenta-se grosseiramente estriado helicoidalmente. Apresenta um aroma bastante agradável e envolvente, ligeiramente adocicado. A sua superfície externa é lisa, ligeiramente brilhante, de cor castanha acinzentada. A casca é fina e destaca-se facilmente. Ocasionalmente são visíveis na casca algumas nervuras transversais e lentículas.

Os caules de maior diâmetro são ondulados, como se fossem constituídos por um conjunto de feixes entrelaçados entre si. Resistência ao corte dura e textura fibrosa. Tal como o seu odor deixa antever, apresenta um paladar bastante doce.

Observando o caule da liana em corte transversal é visível a segmentação do lenho em numerosos lóbulos de tamanhos e contornos irregulares organizados de forma concêntrica (figuras 6 e 7).

Os lóbulos apresentam uma cor amarela a castanho claro e a zona entre estes é castanha escura. Cada lóbulo desenvolve-se isoladamente e de forma irregular, conferindo ao caule um contorno irregular. O lenho exposto apresenta um leve brilho.

Em todas as amostras de caule estudadas verificou-se existir uma grande diversidade na geometria dos lóbulos, não se encontrando duas formações iguais (figuras 6 e 7).

Este tipo de massa xilemática dividido foi já encontrado noutras espécies mas com outras variações pelo que a sua caracterização se revela fundamental para a sua identificação taxonómica (Araújo & Costa, 2007; Carlquist, 1985).



Figura 6 - Aspecto geral do caule observado à lupa

A: Vista geral da superfície externa do caule, onde se observam nervuras transversais (1) e algumas lentículas (2). B: Superfície externa de um caule mais maduro onde é possível observar o contorno ondulado do caule. C: Secção transversal do caule onde se observa o contorno ondulado irregular do caule resultante da organização do lenho em numerosos lóbulos irregulares.

(Barras da figura: A - 10mm; B - 10mm, C - 10mm).

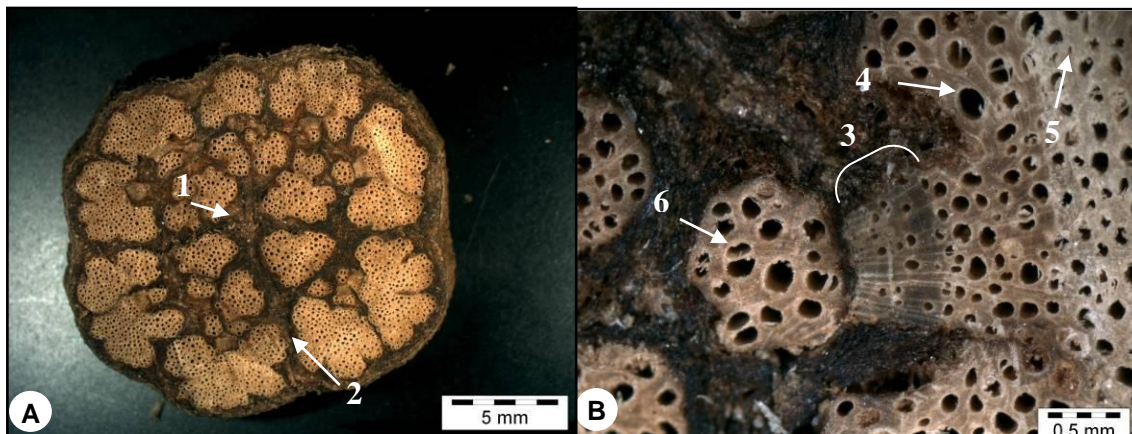


Figura 7 - Secção transversal do caule observado à lupa

A: Vista geral do caule, onde se observa o lenho dividido em lóbulos dispostos radialmente em torno da medula (1), separados por regiões intermediárias (2). B: Detalhe de um lóbulo onde é possível distinguir uma zona de xilema secundário recente (3), elementos de vaso largos (4) e estreitos (5), preferencialmente solitários mas também alguns múltiplos (6).

(Barras da figura: A - 5mm; B - 0,5mm).

Analisando os lóbulos conseguem observar-se, à vista desarmada ou com à lupa, os vasos xilémáticos, de contornos circulares a elípticos, na sua grande maioria isolados, alguns agrupados em conjuntos de dois ou três (figura 7). Estes vasos, bastante

numerosos, ocupam praticamente toda a zona do lenho, com uma frequência de 14 vasos por mm². Podem apresentar diferentes diâmetros, desde os 25,99 µm até aos 248,19 µm (tabela 7). São mais numerosos os vasos de grandes dimensões. São visíveis também vasos de tamanhos mais reduzidos dispersos pelos lóbulos mas em menor proporção.

Os lóbulos apresentam todos contornos irregulares e diferentes, sendo os mais externos mais desenvolvidos (figura 7). Nestes é possível distinguir duas regiões. Uma mais estreita e uniforme, voltada para o interior do caule, onde se verifica uma distribuição radial regular de xilema secundário mais recente, em contraste com a irregularidade da madeira mais antiga, presente na parte mais externa dos lóbulos. Na zona de xilema mais recente, onde a madeira ainda está em crescimento, predominam os vasos de menores dimensões, que se distribuem alinhados em cadeias radiais enquanto os vasos de grandes dimensões predominam no xilema mais antigo (figura 7).

Nesta organização em lóbulos, a presença do tecido mecânico é mínima em relação ao tecido condutor (figura 7). Esta característica verifica-se na maioria das dicotiledóneas trepadoras (Carlquist, 1985). Este parênquima, apesar de bastante reduzido tem uma importância fulcral. Uma das razões para a presença deste tecido é permitir o aumento da flexibilidade do caule, especialmente neste caso, em que o seu crescimento anómalo resulta na divisão de grupos de vasos (Carlquist, 1985).

A ocorrência de grupos de vasos separados resulta numa estrutura em cabo onde se alia a resistência à flexibilidade. É esta organização que confere o aspecto ondulado ao caule, característico desta liana, como se estivesse enrolado sobre si próprio, (figuras 6 e 7). Esta organização em lóbulos, com parênquima entre estes, permite que os vasos condutores se enrolem ou torçam sem se fracturarem. Deste modo o caule se lesado, sofre apenas quebras longitudinais ordenadas, seguindo o sentido das forças de torção e deixando o xilema praticamente intacto (Araújo & Costa, 2007).

Do mesmo ponto de vista, os danos provocados no floema também podem ser minimizados (Carlquist, 1985).

3.1.1 Caracterização Microscópica

O resultado das medições dos principais elementos característicos do caule encontra-se discriminado nas tabelas 7, 8, 9, 10 e 11.

Tabela 7 – Principais características dos vasos xilemáticos

| Vasos | |
|---|--------|
| Agrupamento dos vasos (%) | |
| Solitários | 78 |
| Múltiplos | 22 |
| Frequência (n°/mm ²) | 14 |
| Diâmetro tangencial (µm) | |
| Mínimo | 25,99 |
| Médio | 125,07 |
| Máximo | 248,19 |
| Desvio padrão | 44,14 |
| Comprimento dos elementos de vaso (µm) | |
| Mínimo | 220,74 |
| Médio | 295,23 |
| Máximo | 483,10 |
| Desvio padrão | 80,88 |
| Diâmetro das pontuações vasculares (µm) | |
| Mínimo | 6,7 |
| Médio | 10,44 |
| Máximo | 16,69 |
| Desvio padrão | 1,74 |

Tabela 8 – Principais características dos traqueídeos presentes no lenho

| Traqueídeos | |
|---|-------|
| Diâmetro tangencial (µm) | |
| Mínimo | 16,06 |
| Médio | 21,53 |
| Máximo | 25,34 |
| Desvio padrão | 2,15 |
| Diâmetro da abertura interna dos poros (µm) | |
| Mínimo | 5,26 |
| Médio | 7,76 |
| Máximo | 9,69 |
| Desvio padrão | 1,38 |
| Diâmetro da abertura externa dos poros (µm) | |
| Mínimo | 3,23 |
| Médio | 4,39 |
| Máximo | 5,52 |
| Desvio padrão | 0,66 |

Tabela 9 – Tamanho e organização das células pétreas

| Células pétreas | | |
|--------------------------|-------------------|--------------------|
| | Solitárias | Aglomerados |
| Diâmetro tangencial (µm) | | |
| Mínimo | 55,07 | 86,24 |
| Médio | 84,22 | 161,88 |
| Máximo | 142,53 | 285,51 |
| Desvio padrão | 27,83 | 63,02 |

Tabela 10 – Tamanho e organização das drusas

| Drusas | | |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------|
| | Isoladas/Aglomeradas | Alinhadas |
| Diâmetro tangencial (µm) | | |
| Mínimo | 4,18 | 4,36 |
| Médio | 15,32 | 6,44 |
| Máximo | 32,97 | 9,08 |
| Desvio padrão | 8,95 | 1,13 |

Tabela 11 – Diâmetro tangencial dos grãos de amido

| Grãos de amido | |
|---------------------------------|------|
| Diâmetro tangencial (µm) | |
| Mínimo | 1,59 |
| Médio | 4,18 |
| Máximo | 6,98 |
| Desvio padrão | 1,23 |

Analisando o caule ao microscópio óptico, em corte transversal, na zona mais externa do caule é visível uma camada de células retangulares, incolores e achatadas que constituem o felogénio (figura 8).

Para fora do felogénio é visível uma camada de 4-6 células compridas, retangulares e achatadas que constituem o súber ou felema (figura 8). Estas células apresentam a parede mais espessada e são na sua maioria pigmentadas. Também surgem algumas incolores. Esta coloração é devida à existência de substâncias no interior nas células do súber. Este tecido apresenta-se bastante compactado, não sendo visíveis quaisquer espaços intercelulares. Esta característica é justificável pela função protectora deste tecido (Ferri, 1999).

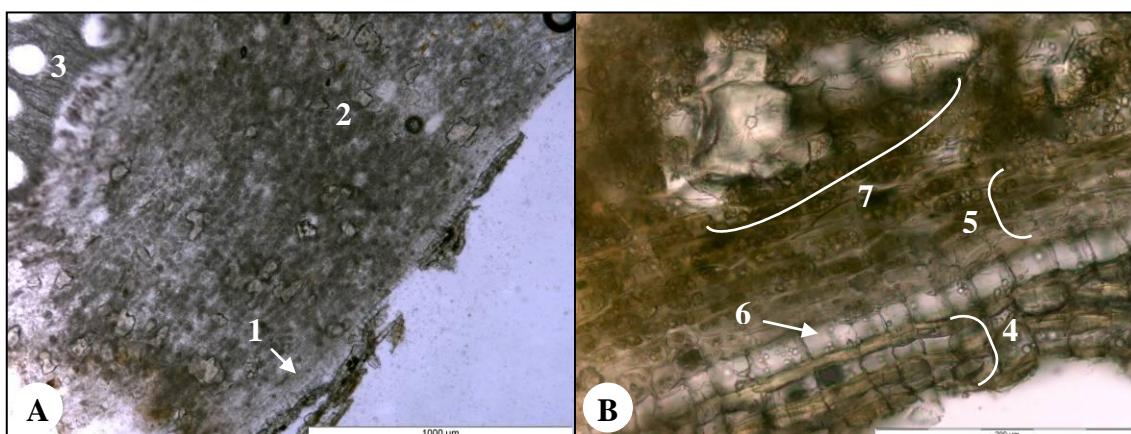


Figura 8 – Observação do caule ao microscópio óptico em secção transversal

A: Vista geral da zona mais externa do caule onde se distinguem três zonas: periderme (1), zona cortical (2) e xilema (3). B: Pormenor da periderme evidenciando o felema (4), o felogénio (5) e a feloderme (6). Na zona cortical é visível um aglomerado de células pétreas (7).

(Barras da figura: A - 1000µm; B - 200µm)

Para dentro do felogénio distinguem-se 2-8 fileiras de células vivas alongadas, com as extremidades arredondas que constituem a feloderme (figura 8). Estas células vão-se assemelhando às células parenquimatosas à medida que nos dirigimos para a zona mais interna. Tal como estas também contêm organitos citoplasmáticos (amido). Torna-se difícil em algumas zonas distinguir onde acabam umas e começam as outras.

Terminando a feloderme inicia-se o córtex, constituído por células parenquimatosas (figura 8). Estas células apresentam contornos arredondados ou poliédricos e paredes finas. São células vivas que desempenham funções de armazenamento e suporte. Formam um tecido pouco compacto sendo visíveis espaços entre as células.

Na zona do córtex são visíveis vários tipos de células de esclerênquima. As mais abundantes são os braquiesclerídeos ou células pétreas (figuras 8 e 9).

Estas células têm parede secundária muito espessa e numerosas pontuações ramificadas e podem apresentar formas e tamanhos bastante variáveis (figura 9).

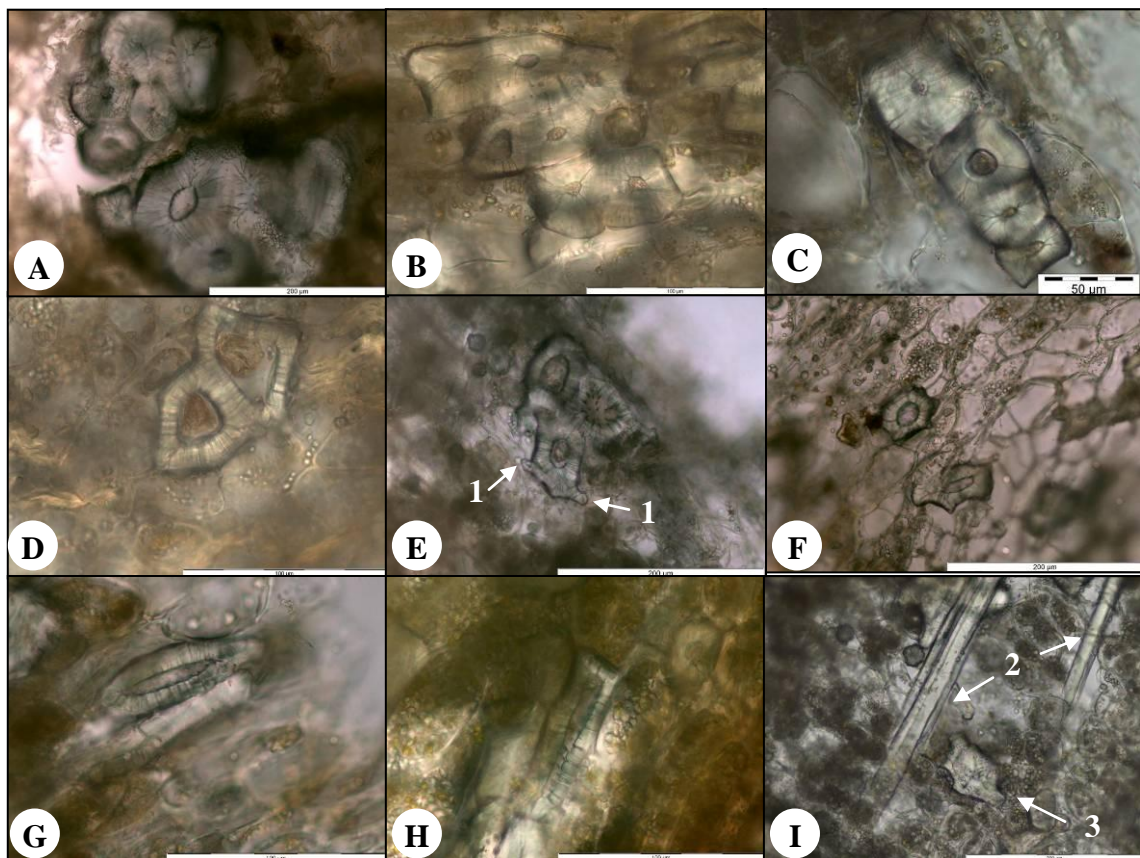


Figura 9 – Observação de esclerédeos ao microscópio óptico

A: Aglomerado de células pétreas arredondadas. B: Aglomerado de células pétreas isodiamétricas. C: Conjunto de células pétreas quadrangulares. D: Células pétreas de contornos poligonais, ainda em desenvolvimento, com a parede pouco espessada. E: Aglomerado de braquiesclerédeos onde é possível ver as suas ramificações (1). F: Células pétreas isoladas ramificadas. G: Macroesclerédeo alongado. H: Macroesclerédeo rectangular. I: Fibras (2) e braquiesclerédeo ramificado (3).
(Barras da figura: A - 200µm; B - 100µm; C - 50µm; D - 100µm; E - 200µm; F - 200µm; G - 100µm; H - 100µm; I - 200µm)

Podem surgir isoladas, apresentando formas arredondadas, alongadas ou poligonais, de dimensões entre os 55,07 μm e os 142,53 μm ou podem formar aglomerados de várias células. Nestes aglomerados cujos diâmetros tangenciais podem variar entre os 86,24 μm e 285,51 μm , as células podem ser todas isodiamétricas ou apresentar tamanhos e formas diferentes (figura 9 - A, B, C, D e E). Na sua maioria, os aglomerados identificados eram constituídos por células pétreas arredondadas ou alongadas, de diferentes dimensões (figura 9 - A), mas também se detectaram formações constituídas por células com contornos poligonais muito bem definidos, tais como quadrados (figura 9 - C) e pentágonos (figura 9 - D).

Encontraram-se células pétreas em diferentes fases de desenvolvimento. Assim, algumas, ainda em formação, apresentam a parede pouco espessa e ainda contêm o protoplasto (figura 9 - D).

Outras foram observadas já numa fase completa do seu desenvolvimento, apresentando uma parede muito espessa, que ocupa quase a totalidade da célula, revelando apenas um pequena pontuação central onde outrora existira o conteúdo citoplasmático (figura 9 - B e C).

Mais raramente surgem esclereídeos bastante irregulares e/ou ramificados (figura 9 - E, F e I).

A presença destas extremidades, bifurcações ou ramificações constitui uma evidência de que as células apresentam um crescimento intrusivo ou interposicional.

Quando estas células encontram impedimento físico para continuar com a sua progressão, forçam caminho entre as paredes das células vizinhas e se necessário penetram por entre estas, invadindo os seus espaços intercelulares (figura 9 - E). Desta forma podem atingir dimensões muito superiores ao das células vizinhas. Nestes esclereídeos o espessamento da parede secundária inicia-se primeiro na região central da célula, permanecendo as ramificações/extremidades com as suas paredes primárias delgadas, podendo assim continuar o seu crescimento intrusivo (Silva, 2006).

São também visíveis macroesclereídeos que podem atingir os 142,53 μm (figura 9 - G e H). Foram observados macroesclereídeos alongados (figura 9 - G) e colunares (figura 9 - H).

Um terceiro tipo de esclerênquima foi encontrado com menos frequência – as fibras (figura 9 - I). Estas distinguem-se dos macroesclereídeos por serem células muito

longas, com as extremidades afiladas, de lúmen muito reduzido, praticamente inexistente e parede secundária uniformemente espessada. Praticamente não têm pontuações.

Tendo em conta as funções de sustentação e protecção do esclerênquima, a presença deste tipo de células ao longo do córtex pode ser interpretada como um reforço para aumentar a resistência mecânica do caule, tendo em conta a sua grande extensão, corroborando assim observações feitas por outros autores noutras espécies (Silva, 2006).

Dispersos pelas células do parênquima cortical observam-se cristais de oxalato de cálcio em forma de drusas (figuras 10 e 11). Estas drusas apresentam tamanhos muito díspares, podendo variar entre os 4,18 μm e 32,97 μm de diâmetro.

As drusas de maiores dimensões foram sempre detectadas isoladas (figura 10 - C), enquanto as mais pequenas podem surgir isoladas (figura 10 - A) ou em aglomerados (figura 10 - A e B).

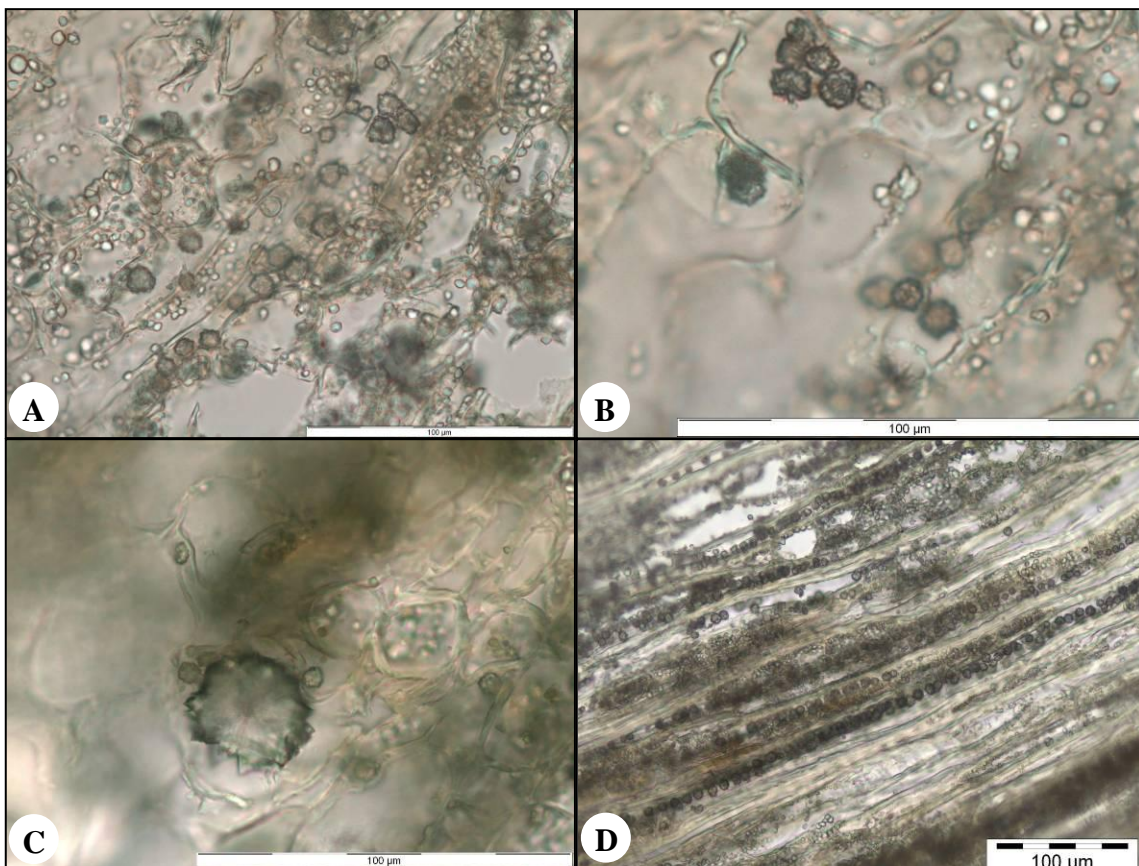


Figura 10 - Drusas observadas ao microscópio óptico

A: Pequenas drusas isoladas e aglomeradas na região do parênquima cortical (secção transversal) B: Drusas de pequenas dimensões aglomeradas na região do parênquima cortical (secção transversal). C: Drusa isolada de grandes dimensões, na zona cortical (secção transversal). D: Drusas alinhadas ao longo dos vasos condutores (secção longitudinal)

(Barras da figura: A - 100 μm ; B - 100 μm ; C - 100 μm ; D - 100 μm)

Em secção longitudinal, na região xilemática também se observam drusas (figuras 10 - D e 11 - C e D) . No entanto estas divergem das anteriores quanto à sua disposição e tamanho.

Nesta região as drusas dispõem-se alinhadas junto aos feixes vasculares formando extensas carreiras (figuras 10 - D e 11 - C).

Também se caracterizam pelas reduzidas dimensões que apresentam quando comparadas com as observadas na região mais externa do caule, podendo variar apenas entre os 4,36 μm e os 9,08 μm .

Não foram visualizadas outras formas de cristais.

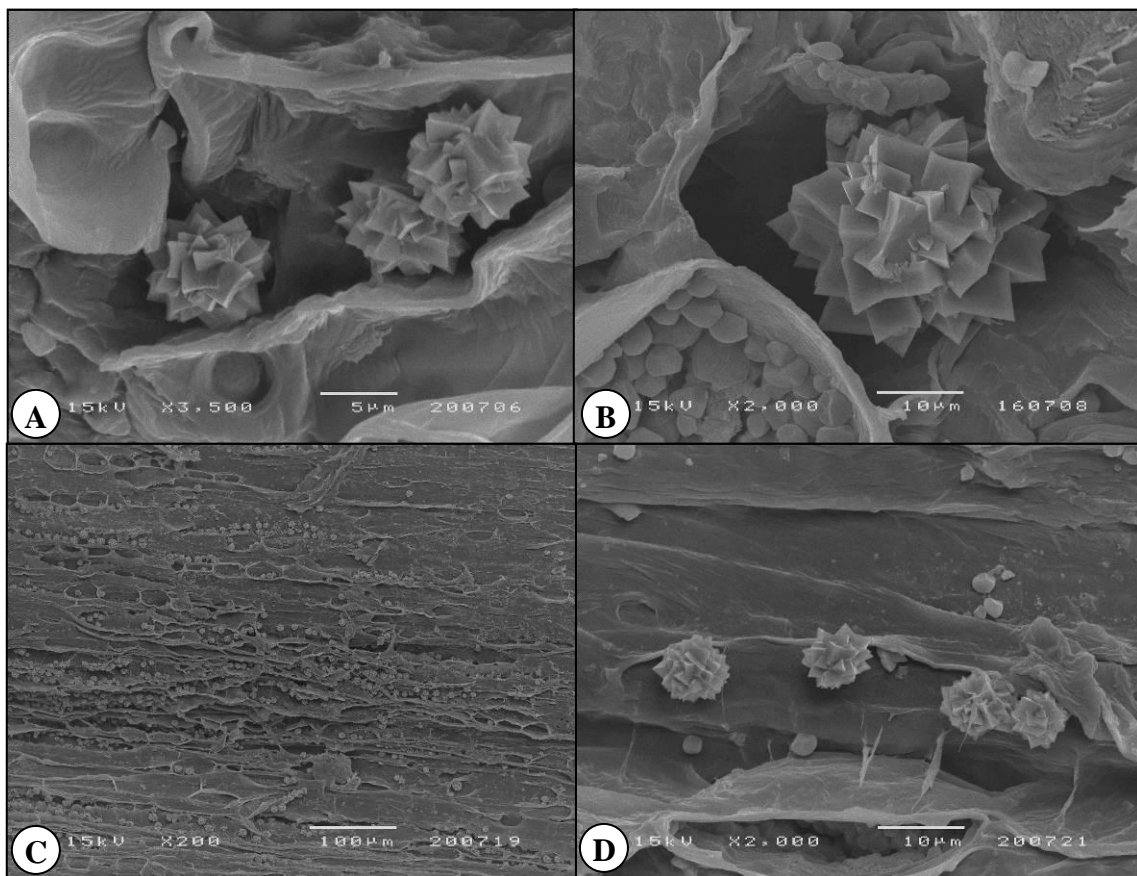


Figura 11 - Drusas captadas por microscopia electrónica

A: Pequenas drusas aglomeradas na região do parênquima cortical (secção transversal). B: Drusa isolada de grandes dimensões, na zona cortical (secção transversal). C e D: Drusas alinhadas ao longo dos vasos condutores (secção longitudinal)

(Barras da figura: A - 5 μm ; B - 10 μm ; C - 100 μm ; D - 10 μm)

Na zona cortical próximo da periderme detectaram-se, ocasionalmente, bolsas de mucilagem (figura 12).

Por meio das microscopias óptica e electrónica e, quando possível, com confirmação através do uso de iodo observaram-se, na região cortical, grãos de amido (figuras 12 e 13).

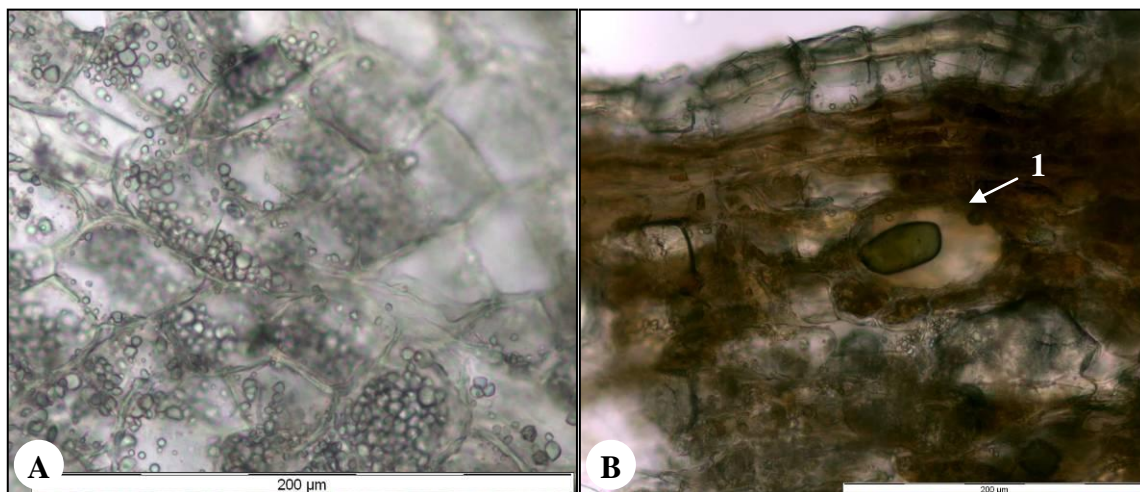


Figura 12 - Zona cortical do caule observada ao microscópio óptico

A: Células parenquimatosas com grãos de amido. B: Zona da feloderme onde é visível uma bolsa mucilaginosa (1).

(Barras da figura: A - 200µm; B - 200µm)

Os grãos de amido possuem contornos poliédricos, com algumas das faces ligeiramente côncavas e convexas, sem hilo aparente ou visível (figura 13). Também foram observados alguns grãos de amido arredondados (figura 13). Apresentam dimensões entre os 1,59 µm e 6,98 µm. Estes polissacarídeos foram visualizados na zona cortical e no parênquima medular, assim como no interior de alguns vasos (figura 16).

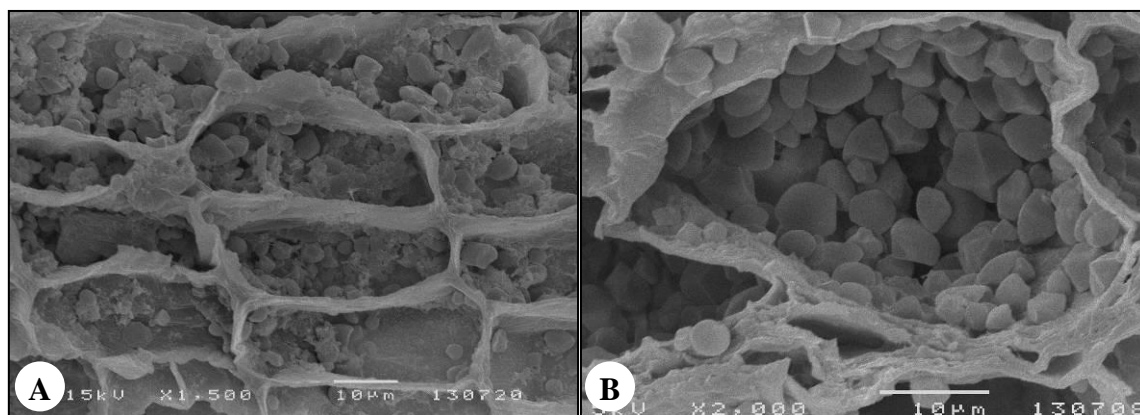


Figura 13 - Grãos de amido captados por microscopia electrónica

(Barras da figura: A - 200µm; B - 10µm; C - 10µm)

O lenho do caule, tal como facilmente se observou a nível macroscópico apresenta porosidade difusa e encontra-se dividido em unidades altamente lobuladas.

Foi possível distinguir todos os constituintes característicos do lenho das angiospérmicas (Esau, 1974): elementos traqueais para condução da água (figuras 14, 15 e 17), fibras de sustentação (figuras 18 e 19) e células parenquimatosas (figuras 18 e 19) para armazenamento e translocação de substâncias ergásticas.

Os elementos traqueais observados incluem os elementos de vaso e traqueídeos (figuras 14, 15 e 17).

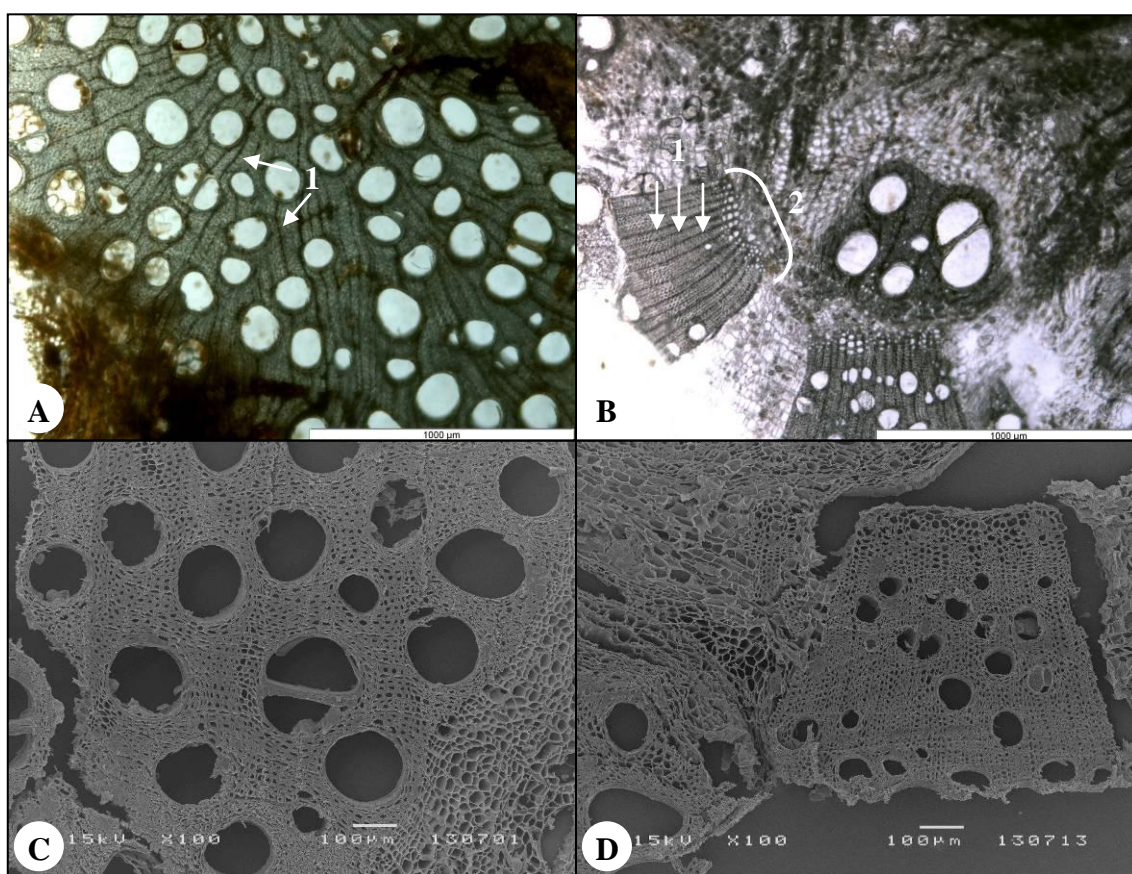


Figura 14 - Secção transversal do lenho

A: Vista geral de um lóbulo de xilema onde se observam vasos simples e múltiplos, de diferentes diâmetros e os raios medulares (1). B: Pormenor de um pequeno lóbulo e da região de xilema regular, mais jovem (2). Pormenor da distribuição regular dos raios medulares (1) nesta zona. C: Lóbulo observado a microscopia electrónica. D: Zona de xilema regular, observado em microscopia electrónica. (Barras da figura: A - 1000µm; B - 1000µm; C - 100µm; D - 100µm)

Os vasos são difusos e surgem na sua maioria solitários (78%) ocorrendo também alguns múltiplos (22%) de 2-3 células, organizados tangencialmente (figura 14).

Apresentam contorno circular a elíptico e diferentes calibres. O diâmetro dos elementos de vaso pode variar entre os 25,99 μm e os 248,19 μm .

Conforme observado a nível macroscópico (figura 7), os lóbulos mais desenvolvidos apresentam duas porções distintas (figura 14). Uma mais externa, de contornos irregulares, onde os vasos apresentam uma distribuição e porosidade difusa, revelando um desenvolvimento do xilema centrífugo. Nesta região, que é composta pela madeira mais antiga, os raios medulares também se distribuem de forma irregular, de acordo com a assimetria da zona em que se enquadram (figura 14 - A). A outra porção é bastante estreita quando em comparação com o resto do lóbulo e localiza-se na zona mais interna (figura 14 - B). Caracteriza-se por apresentar uma distribuição radial regular de xilema secundário. Nesta zona, os vasos apresentam diâmetros reduzidos e localizam-se de um modo regular por entre os raios medulares que se distribuem de um modo paralelo, perfeitamente alinhados (figura 14 - B e D).

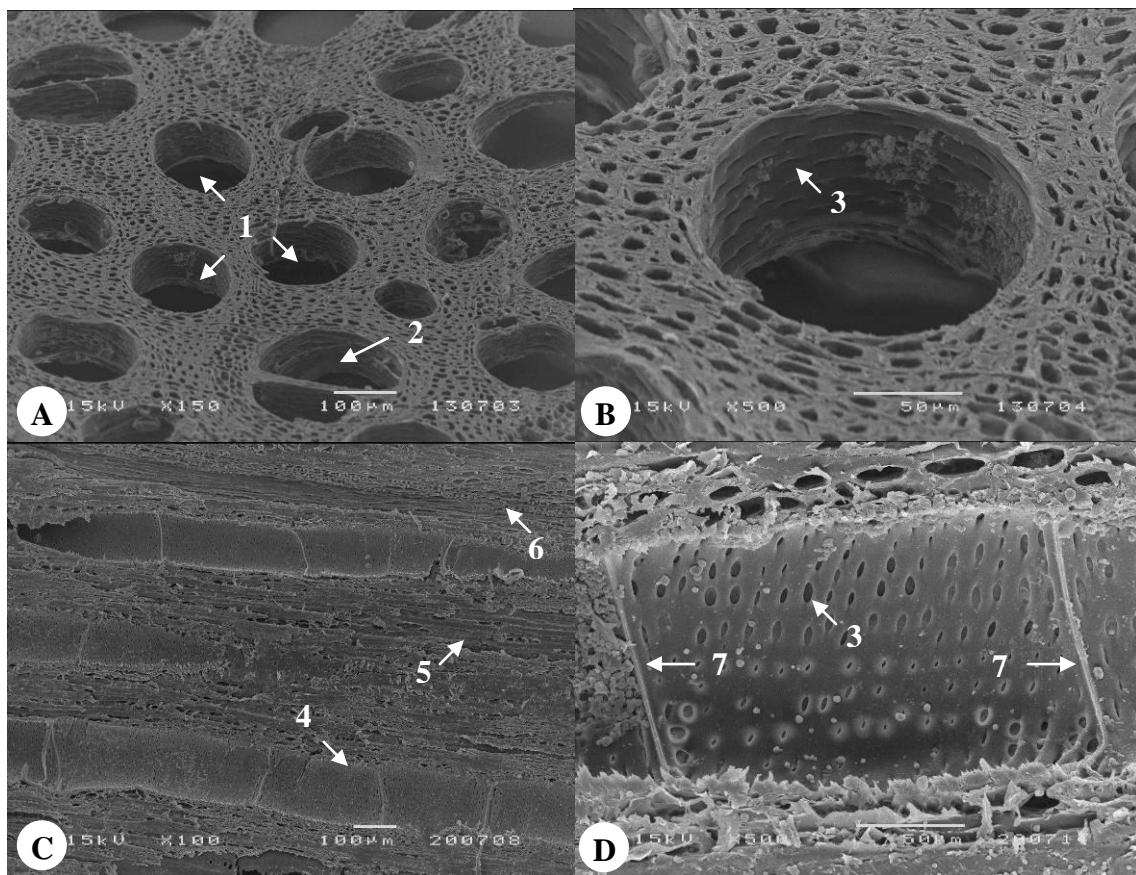


Figura 15 - Xilema observado em microscopia electrónica

A: Aspecto geral do xilema em secção transversal, onde se distinguem vasos de grande calibre, simples (1) e múltiplos (2). B: Pormenor de um vaso de grande calibre onde são visíveis as pontuações simples alternas (3). C: Aspecto geral do xilema em secção longitudinal onde se observam vários elementos de vaso (4), traqueídeos (5) e drusas alinhadas (6). D: Pormenor de um elemento de vaso onde se observam as pontuações da parede (3) e os tabiques (7).

(Barras da figura: A - 100 μm ; B - 50 μm ; C - 100 μm ; D - 50 μm)

O comprimento dos elementos de vaso pode variar entre os 220,74 μm e os 483,10 μm . Nas suas extremidades são delimitados por tabiques ou placas de perfurações simples horizontais a ligeiramente inclinadas (figura 15 - C e D). Este tipo de placa oferece pouca resistência ao fluxo de água, o que se traduz num aumento da eficiência de condução dos elementos de vaso (Araújo & Costa, 2007)

Nas paredes laterais dos elementos de vasos são visíveis pontuações simples alternas, cuja abertura pode variar entre os 6,7 μm e os 16,69 μm (figura 15).

Estes pequenos poros ajudam a prevenir que possíveis embolismos que ocorram num elemento de vaso se espalhem e danifiquem os restantes elementos condutores (Taiz & Zeiger, 2006).

As paredes dos vasos são relativamente espessas (figuras 16 e 17) o que confere uma protecção extra, contribuindo deste modo para minimizar a fractura dos vasos. Esta característica é muito comum nas plantas trepadoras (Carlquist, 1985).

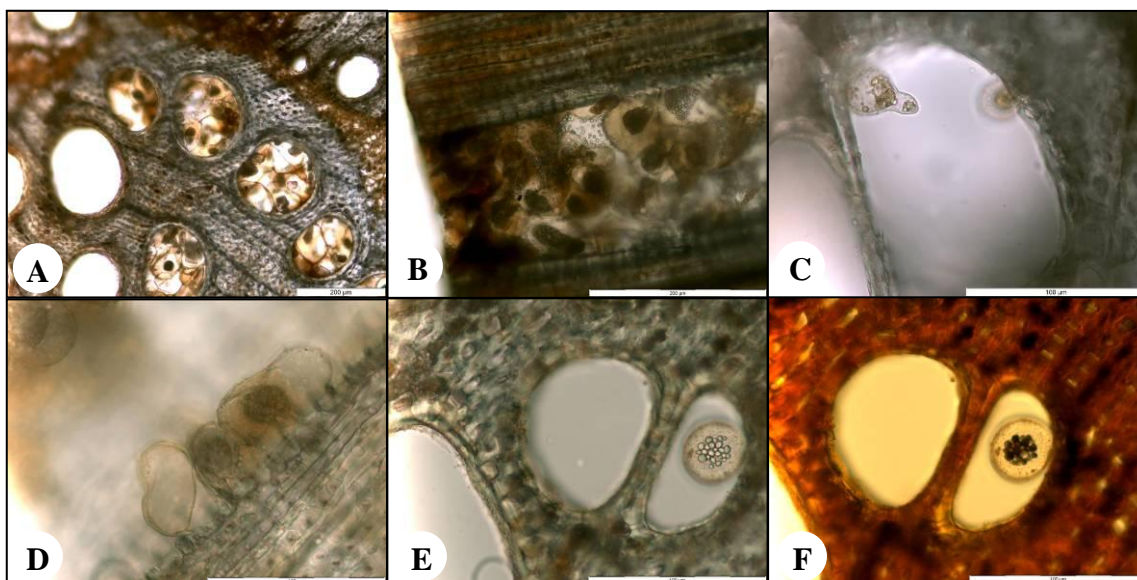


Figura 16 - Tiloses presentes no lenho

A: Secção transversal do caule, evidenciando tiloses em vários vasos xilémáticos. B: Secção longitudinal de um elemento de vaso completamente obstruído por células com grãos de amido. C: Secção transversal de um vaso onde se está a formar uma tilose. D: secção longitudinal de um vaso mostrando várias tiloses em formação. Algumas células ainda estão a atravessar os poros das paredes do elemento de vaso. E e F: Secção transversal do xilema, evidenciando um vaso múltiplo com uma célula contendo grãos de amido antes e após coloração com iodo.

(Barras da figura: A - 200 μm ; B - 200 μm ; C - 100 μm ; D - 100 μm ; E - 100 μm ; F - 100 μm)

No interior de alguns vasos são visíveis células contendo grãos de amido (figura 16). Um vaso pode conter apenas uma célula ou estar completamente obstruído por várias células. A presença do amido no interior destas células, foi confirmada por testes

histoquímicos (figura 16 - F). Este fenômeno, designado por tilose é comum em numerosas famílias de plantas (Mauseth, 2008).

Estas células só atravessam a parede dos vasos se as pontuações dos elementos de vaso apresentarem um diâmetro superior a 10 μm (tamanho médio de 10,44 μm neste caso) (Mauseth, 2008). Os vasos deixam assim de ter uma função de transporte passando a armazenar substâncias ergásticas.

São visíveis traqueídeos vasicêntricos com 1 série de pontuações por parede (figuras 15 e 17). Estes traqueídeos distribuem-se, como o nome indica, em redor dos vasos. São de pequeno calibre e apresentam um contorno circular cujo diâmetro pode variar entre os 16,06 μm e os 25,34 μm .

As pontuações presentes nas suas paredes são aureoladas e apresentam uma abertura externa entre os 3,23 μm e 5,52 μm . A abertura interna em fenda estende-se além do limite da auréola, atingindo dimensões entre os 5,26 μm e 9,69 μm (figura 17 - B e C).

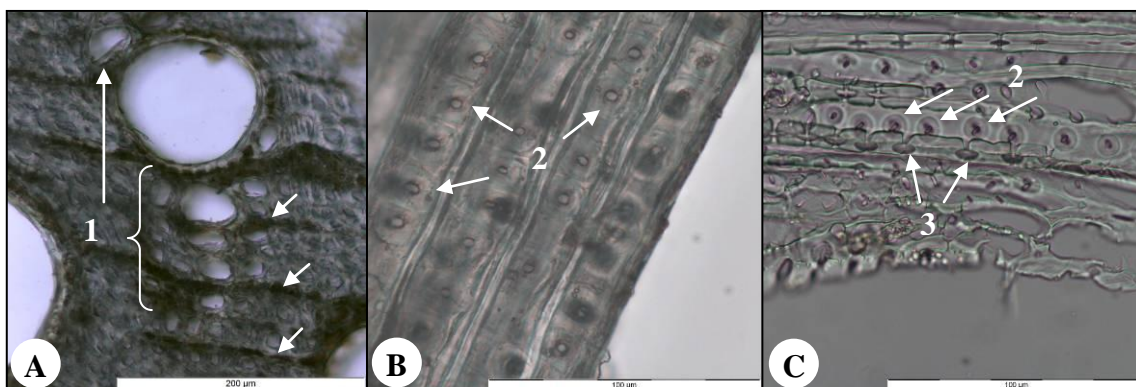


Figura 17 - Traqueídeos presentes no lenho

A: Secção transversal do xilema, evidenciando traqueídeos vasicêntricos (1) e raios medulares (setas pequenas) adjacentes a estes. B e C: Secção longitudinal dos traqueídeos onde são visíveis as suas paredes com pontuações areoladas de vista frontal (2) e lateral (3).

(Barras da figura: A - 200 μm ; B - 100 μm ; C - 100 μm)

O sistema radial do lenho é constituído por células parenquimáticas organizadas em fileiras chamadas raios medulares.

Os raios medulares observados no lenho são unisseriados e raramente bisseriados. Alguns raios unisseriados apresentam porções bisseriadas na zona central. A parte bisseriada e central dos raios, relativamente curta, apresenta células pequenas procumbentes ou achatadas. As margens unisseriadas, mais longas do que a parte bisseriada são formadas por células maiores, mais alongadas e rectangulares (figura 18).

As células radiais são pontuadas e algumas contêm cristais de oxalato de cálcio ou grãos de amido (figura 18).

Estas células são muito importantes porque armazenam nutrientes durante períodos de dormência da planta e conduzem substâncias através de curtas distâncias radiais. Estas células podem comunicar com o parênquima axial existente, ocorrendo neste caso plasmodesmos (figura 18).

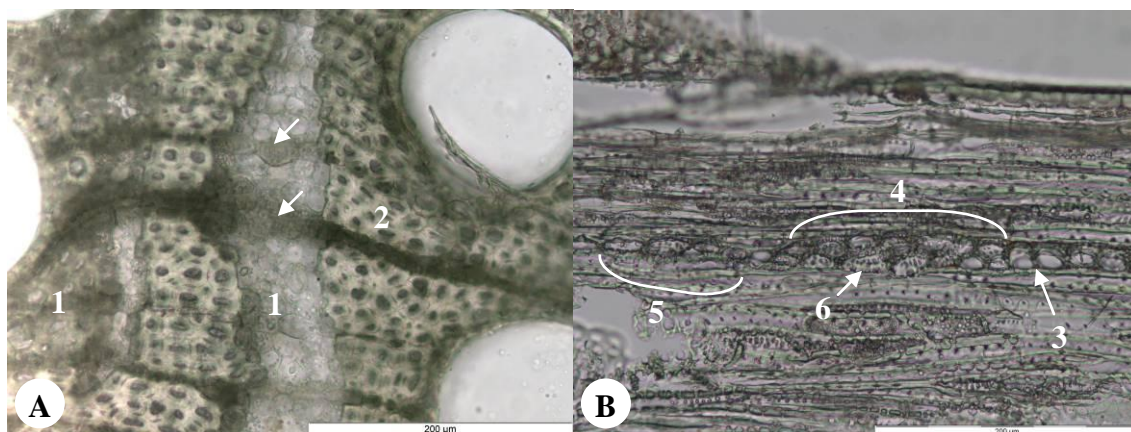


Figura 18 - Raios medulares

A: Secção transversal do xilema onde são visíveis os raios medulares e duas zonas de parênquima axial (1), uma das quais em torno de um elemento de vaso (zona mais à esquerda). Raios medulares a comunicarem com células axiais, ocorrendo plasmodesmos (setas). As restantes células presentes, de parede espessa são as fibras (2). B: Secção longitudinal do lenho onde se distingue um raio medular (3), constituído por uma porção central bisseriada (4), e extremidades unisseriadas (5), com células mais alongadas. Na região bisseriada distingue-se a pontuação das células (6). (Barra da figura: A: 200µm; B: 200µm)

Os raios também podem passar adjacentes a traqueídeos ou elementos de vaso (figuras 17 e 18). Como os elementos traqueais têm pontuações e as paredes das células radiais nestas zonas são muito finas é possível a comunicação entre ambas as células, permitindo assim as trocas (figura 17 - A). Esta comunicação entre as células radiais e os elementos traqueais é muito importante, principalmente no início da Primavera, quando a planta começa a necessitar das suas reservas de nutrientes, sendo o amido acumulado nestas células o primeiro a ser digerido e a glucose passa deste modo para os elementos traqueais para ser conduzida para os novos órgãos em crescimento (Mauseth, 2008).

Cada raio estende-se desde o xilema e passa o câmbio vascular, atravessando por entre o floema (figura 19). Deste modo, o tamanho, forma e número de raios no floema coincide sempre com o de raios xilemáticos, pois os primeiros são o prolongamento dos segundos. Tal como acontece no xilema, também no floema os raios são constituídos

unicamente por células vivas, de parênquima, com função de armazenamento (figura 19) (Mauseth, 2008).

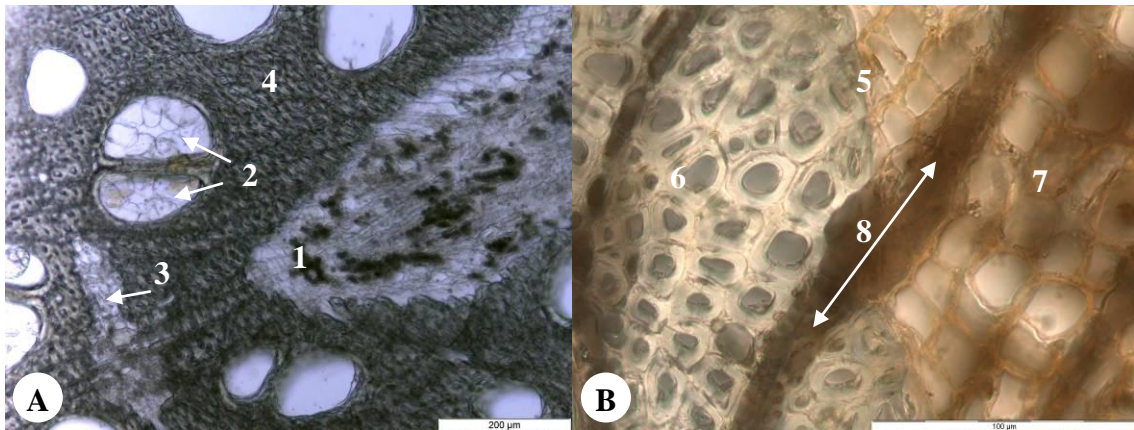


Figura 19 - Câmbio vascular

A: Porção de um lóbulo de lenho interrompido por uma cunha de floema (1). São visíveis tiloses (2) e uma banda de parênquima axial (3) no meio das fibras (4).

B: Pormenor do câmbio vascular (5) onde é visível do lado esquerdo as fibras do xilema (6) e do lado direito as células do floema (7). No meio um raio medular (8) que atravessa os dois tecidos condutores. (Barra da figura: A: 200μm; B: 100μm)

As restantes células de parede bastante espessa, que se observam no lenho e que ocupam quase a sua totalidade, em torno dos vasos, são as fibras de sustentação do lenho (figuras 18 e 19). O facto destas fibras serem muito abundantes e de possuírem parede muito espessa confere à madeira uma elevada resistência. Por outro lado, o facto dos elementos de vaso estarem na sua maioria rodeados por fibras (figuras 18 e 19) permite um aumento da sua resistência ao colapso pois a parede secundária das fibras constitui um reforço para a própria parede dos vasos (Mauseth, 2008).

Por entre as fibras de sustentação surgem por vezes massas de parênquima axial (figuras 18 e 19). Estas células são vivas, apresentam paredes muito finas e contornos arredondados. No seu interior são visíveis grãos de amido (figura 18). Por vezes alguns vasos encontram-se inseridos nestas bandas estando por isso totalmente rodeados por células de parênquima axial (figura 18). Nesta situação o parênquima axial pode funcionar como um revestimento de água à volta dos vasos, absorvendo o excesso de água, quando a água perdida pelas folhas é reduzida (noites frias) e libertando água quando a perda desta é muito rápida (dias quentes) (Mauseth, 2008).

Como resultado da variação cambial característica do caule desta liana, formam-se cunhas de floema que interrompem o xilema (figura 19). Este desenvolvimento anómalo resulta na formação dos diferentes lóbulos observados no caule.

3.2 Estudo Químico

3.2.1 Caracterização química preliminar do extracto metanólico

O extracto metanólico foi submetido a um controlo cromatográfico por cromatografia em camada fina (TLC). Uma vez que não existia qualquer estudo preliminar desta espécie e dentro do género apenas uma espécie americana já se encontra a ser estudada, pesquisaram-se os principais grupos químicos referidos por Hegnaüer (1964 e 1989) como característicos da família *Convolvulaceae*: alcalóides, flavonóides, taninos, linhanos, terpenóides e compostos fenólicos. Para o efeito foram utilizados sistemas cromatográficos constantes na tabela 3.

Os resultados obtidos por TLC, tendo em conta os sistemas utilizados (tabela 3) e as características das principais bandas observadas, revelaram a presença de terpenos (sistema S11 – fluorescências azul, verde e acastanhada após revelação química com R. LB) (Stahl, 1969), de linhanos (sistema S13 – fluorescências roxa, violeta, vermelho e azul após revelação química com um reagente de ácido sulfúrico) (Opletal & Sovová, 2008), de ácidos fenólicos (sistemas S5 a S9 – fluorescência verde ou azul esverdeada após revelação com R. Neu) (Wagner & Bladt, 1995), de taninos hidrolisáveis (sistemas S5 a S8 – fluorescência azul após revelação com R. Neu; sistema S9 – azul escuro após revelação com R. FeCl₃) (Jork *et al.*, 1990).

Não foram detectados alcalóides, flavonóides ou taninos condensados neste estudo.


3.2.1.1 Extracção alcaloídica

A não detecção de alcalóides no estudo preliminar do extracto metanólico efectuado por TLC justificou a execução de uma extracção direccionada para esta classe de compostos pois os alcalóides encontram-se presentes na grande maioria dos géneros mais próximos de *Calycobolus* (Jennet-Siems *et al.*, 2005; Hueza *et al.*, 2005).

3.2.1.2 Detecção rápida de alcalóides no extracto alcaloídico

Para uma prévia e rápida detecção de alcalóides no extracto alcaloídico efectuaram-se as reações gerais de precipitação de alcalóides. Utilizaram-se para o efeito os reagentes de Mayer, Bouchardat e Dragendorff (Wagner, 1984). Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 12.

Tabela 12 – Reacções gerais de precipitação de alcalóides

| Reacções gerais de precipitação de alcalóides | | | |
|--|--|------------|--|
| Reagente | Detecção | Resultados | |
| Mayer | Solução amarela com formação de precipitado amarelo-acastanhado | positiva |  |
| Bouchardat | Solução acastanhada com formação de precipitado roxo | positiva | |
| Dragendorff | Solução castanha-avermelhada com formação de precipitado acastanhado | positiva | |

Foi possível verificar que com os três reagentes se obtiveram resultados positivos para a presença de alcalóides tendo-se confirmado a coloração característica em cada ensaio e a formação do respectivo precipitado, apesar de reduzido.

Tendo em conta os resultados obtidos nos testes rápidos foi-se fazer a caracterização do extracto alcaloídico por TLC.

3.2.1.3 Pesquisa de alcalóides por TLC

O extracto alcaloídico foi analisado por TLC utilizando os sistemas descritos na tabela 3.

Este estudo foi efectuado em paralelo com o do extracto metanólico, sendo cada um dos cromatogramas obtidos, observado à luz visível e UV antes e após revelação com reagentes apropriados – Reagente de Iodoplatinato e Reagente de Dragendorff (Wagner, 1984). Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 20.

Verificou-se que nos diferentes sistemas utilizados após pulverização com os reagentes referidos, à luz visível não foi observada qualquer banda nem no extracto alcaloídico nem no extracto metanólico, sendo apenas detectadas as bandas características dos padrões usados como controlo.

No entanto, quando sujeitas à radiação UV, detectaram-se no extracto alcaloídico (Ca) três bandas com R_f 0,52; 0,71 e 0,82 de fluorescência azul vivo intenso (figura 20).

Estas bandas não apareceram no extracto metanólico, só sendo observadas após a extracção alcaloídica (vide procedimento em 2.4.3) o que significa que no caule estes compostos se encontravam sob a forma de combinações com ácidos, taninos ou outros constituintes (Wagner & Blatt, 1995).

Tendo em conta que se obtiveram resultados positivos nos testes rápidos mas nos ensaios cromatográficos não se conseguiu comprovar a presença de alcalóides, devido à ausência de coloração característica no visível, após a pulverização com os reagentes referidos, não se pode garantir que as bandas observadas à luz UV eram referentes a alcalóides. Assim, tendo em conta as características destas três bandas, desconfiamos poder tratar-se de glicorrezinas, metabolitos que existem unicamente na família *Convolvulaceae* (Eich, 2008).



Figura 20 - Caracterização do extracto por TLC Sistema S3, observação a 366 nm
Cm - extracto metanólico; **1** - harmano; **Ca** - extracto alcaloídico

3.2.2 Caracterização química do extracto metanólico por TLC

Tendo em conta os resultados obtidos na análise preliminar do extracto, onde se verificou que as principais classes de compostos presentes seriam terpenos, linhanos, ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, efectuaram-se novos ensaios, recorrendo aos mesmos sistemas cromatográficos utilizados anteriormente (tabela 3) com o intuito de caracterizar e identificar as bandas maioritárias.

Sempre que possível usaram-se padrões adequados (tabela 1) para auxiliar à identificação das bandas detectadas.

Para a caracterização e identificação de terpenos no extracto usaram-se os diferentes sistemas cromatográficos apropriados (tabela 3) com alguns padrões representativos desta classe (tabela 1). Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 13 e figuras 21 e 22.

Tabela 13 – Identificação de terpenos no extracto

| Características dos compostos após revelação química com R.LB | | | | |
|---|----------------|---------------|----------------------|------------------------------------|
| Compostos | R _f | | Visível | UV a 366 nm |
| | (sistema S11) | (sistema S12) | | |
| C1 | 0,55 | 0,46 | Castanha-avermelhada | azul c/ centro ligeiramente rosado |
| β-sitosterol (padrão) | 0,55 | 0,46 | Castanha-avermelhada | azul c/ centro ligeiramente rosado |

Nos diferentes sistemas cromatográficos utilizados, após pulverização com o Reagente de Lieberman e observação à luz visível e radiação UV, foi possível a detecção de várias bandas maioritárias de R_f entre 0,23 e 0,77 cujas características cromatográficas são compatíveis com as esperadas para esta classe química (figuras 21 e 22).

Tendo em conta as características cromatográficas (tabela 13) de uma destas bandas (Composto C1), foi possível a sua identificação como β-sitosterol (figuras 21 e 22).

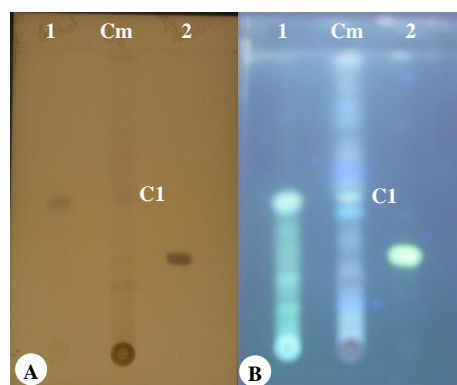


Figura 21 - Pesquisa de terpenos por TLC usando o sistema S11
 A – Observação à luz visível;
 B – Observação à luz UV a 366nm
1 - β-sitosterol; **Cm** - extracto metanólico; **2** - ácido olenólico; **C1** - composto 1.

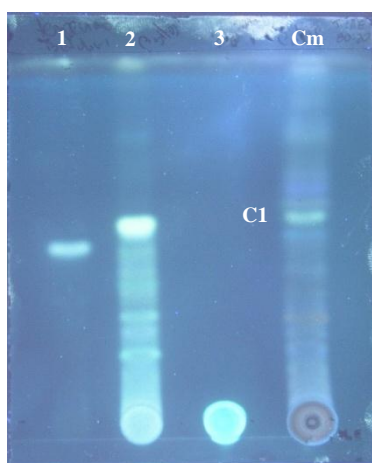


Figura 22 - Pesquisa de terpenos por TLC usando o sistema S12
 Observação à luz UV a 366nm
1 - betulina; **2** - β-sitosterol; **3** - ácido arjunólico; **Cm** - extracto metanólico; **C1**- composto 1.

A presença deste composto C1 (β-sitosterol) no extracto não é de estranhar pois ele apresenta uma ampla distribuição na natureza. Com efeito, o β-sitosterol é o esterol mais comum nas plantas superiores (Crellin *et al.*, 1990).

Nos dois sistemas analisados verificou-se que no ponto de aplicação ficaram retidos diversos compostos (figuras 21 e 22), devido provavelmente à sua elevada polaridade.

Para verificar se se tratariam de saponósidos efectuou-se um sistema cromatográfico direccionado para estes compostos. Utilizou-se para o efeito o sistema S15 (tabela 13) e após revelação com anisaldeído sulfúrico,

observando à luz UV verificou-se a existência de numerosas bandas com fluorescências

que variavam desde o azul, violeta, roxo ao vermelho. Comprovou-se assim a presença de saponinas no extracto metanólico (Wagner & Bladt, 1995).

Para identificação e caracterização dos ácidos fenólicos previamente detectados na análise preliminar do extracto, efectuaram-se diversas cromatografias usando diferentes sistemas (tabela 3) e alguns padrões representativos desta classe (tabela 1).

Os resultados obtidos, utilizando o sistema S6, encontram-se representados na figura 23. A observação destes cromatogramas permitiu a identificação de numerosas bandas com R_f entre 0,23 e 0,80 e fluorescência azul clara sob radiação UV a 254 nm e azul clara intensa sob radiação UV a 366 nm antes de revelação química com o Reagente de Neü e fluorescência azul esverdeada sob radiação UV a 254 nm e azul esverdeada muita intensa a 366 nm após revelação com este reagente (figura 23). Estas características cromatográficas são compatíveis com a inclusão destes compostos no grupo dos ácidos fenólicos (Wagner & Bladt, 1995).

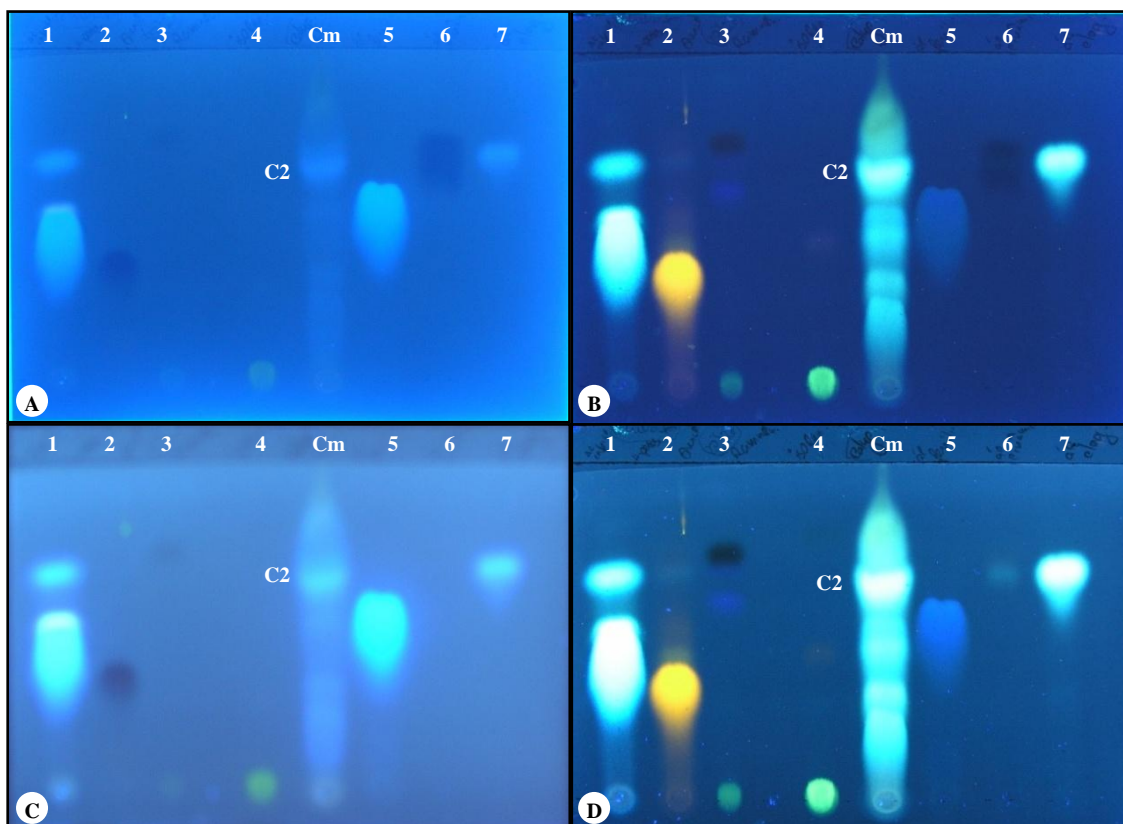


Figura 23 - Pesquisa de compostos fenólicos por TLC usando o sistema S6

A: antes de revelação com R. Neu , observação a UV a 254 nm; B: após revelação com R. Neu sob radiação UV a 254 nm; C: antes de revelação com R. Neu, observação a 366 nm; D: após revelação com R. Neu sob radiação UV a 366 nm;

1 – ácido cafeico; 2 – quercetina; 3 - ramnetina; 4 – isoramnetina; Cm – extracto metanólico; 5 – ácido ferrúlico 6 – ácido cinâmico; 7 – ácido clorogénico; C2 – Composto 2

Por comparação com os padrões utilizados foi possível a identificação de uma destas bandas como ácido clorogénico (tabela 14).

Tabela 14 – Identificação de ácidos fenólicos no extracto

| Características dos compostos | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------------|-----------------|-------------------------------|
| Compostos | R _f (sistema S6) | UV a 254 nm | | UV a 366nm | |
| | | Antes R. Neu | Após R. Neu | Antes R. Neu | Após R. Neu |
| C3 | 0,66 | Azul claro | Azul claro intenso | Azul esverdeado | Azul esverdeado muito intenso |
| Ácido clorogénico | 0,66 | Azul claro | Azul claro intenso | Azul esverdado | Azul esverdeado muito intenso |

Utilizando o sistema S6 detectou-se uma banda escura com R_f 0,56 que não apresentava qualquer fluorescência antes da revelação com R. Neu a 366 nm. Após pulverização com este reagente, a banda revelou uma fluorescência azulada quando observada a 366 nm. As características cromatográficas apresentadas por este composto são compatíveis com as de um tanino hidrolisável.

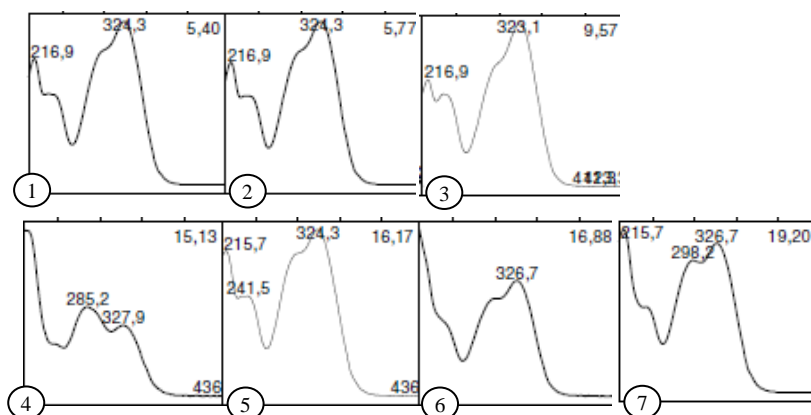
Em sequência, foi efectuada nova cromatografia, usando um sistema direccionado para esta classe de compostos (sistema S9), e como revelador uma solução de cloreto férrico a 5%, sendo este ensaio realizado contra substâncias de referência (padrões) desta classe química, nomeadamente ácido gálico, ácido elágico e etilgalato.

Os resultados obtidos mostraram que, este composto, que apresentava um R_f 0,58 e coloração azul escura acinzentada, apesar de não ter características cromatográficas semelhantes a qualquer um dos padrões utilizados, era da mesma classe química (Jork *et al.*, 1990).

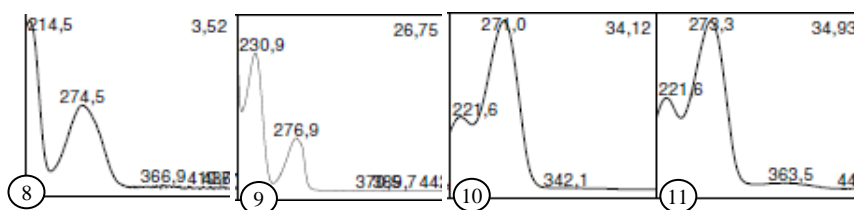
3.2.3 Caracterização do extracto por LC/UV

Para uma melhor caracterização do extracto metanólico, este foi analisado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), utilizando um detector de matriz de díodos (LC/UV) (*vide* procedimento descrito em 2.6.3), sendo as condições utilizadas e os respectivos resultados apresentados na figura 24.

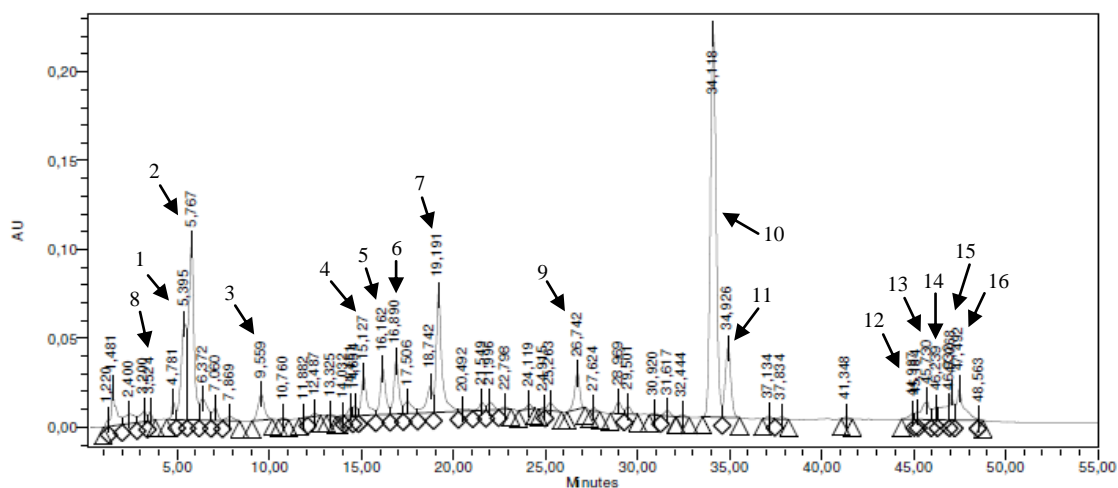
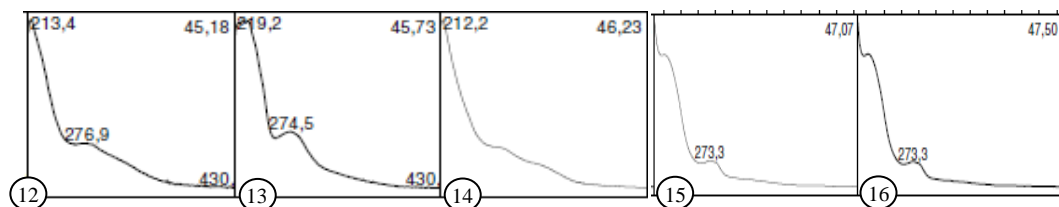
Ácidos fenólicos e ésteres de ácidos fenólicos



Taninos gálicos



Terpenos



Condições cromatográficas:

Coluna: Nova-Pak C₁₈ 4µm 150mm×3,9mm d.i., Waters com pré-coluna Nova-Pak Sentry C₁₈ Waters

Gradiente: MeOH-H₂O (0,1% HCOOH) 5:95 a 30:70 em 35 min, 30:70 a 100:0 em 10 min, 100:0 em 6 min, 100:0 a 5:95 em 4 min; 1ml/min

Deteção: UV/Vis: Cromatograma a 280nm, Software Millennium 32 Waters; Espectros – registo de absorvência entre 210 e 450 nm

Figura 24 – Análise LC/UV do extracto metanólico

Na figura 24 mostra-se o cromatograma obtido a 280 nm por análise LC/UV do extracto metanólico e o espectro UV/Visível (210-450 nm) das suas principais bandas. Por este método foi possível confirmar a presença, neste extracto, de ácidos fenólicos, taninos gálicos e terpenos, sendo os ácidos fenólicos os compostos maioritários.

Durante o procedimento experimental, verificou-se que com este sistema uma grande quantidade de compostos ficava retida na coluna e por isso decidiu-se fraccionar o extracto e direccionar a sua análise apenas para a análise dos compostos maioritários – os ácidos fenólicos.

3.2.3.1 Fraccionamento do extracto metanólico

Uma porção do extracto metanólico seco (5 mg) foi retomada numa mistura de MeOH:H₂O (80:20) e submetida a um fraccionamento em cartucho C18 Sep Pak (*vide* procedimento em 2.7.1), tendo-se obtido duas fracções (Cm1 e Cm2) que foram concentradas a resíduo seco. Obtiveram-se 3,1 mg da fracção Cm1 e 1,2 mg da fracção Cm2.

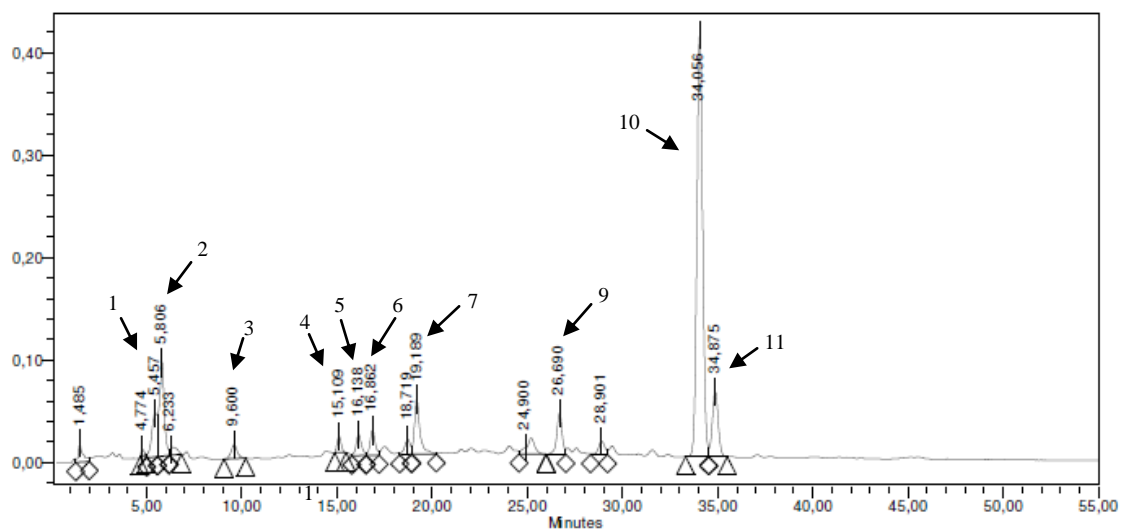
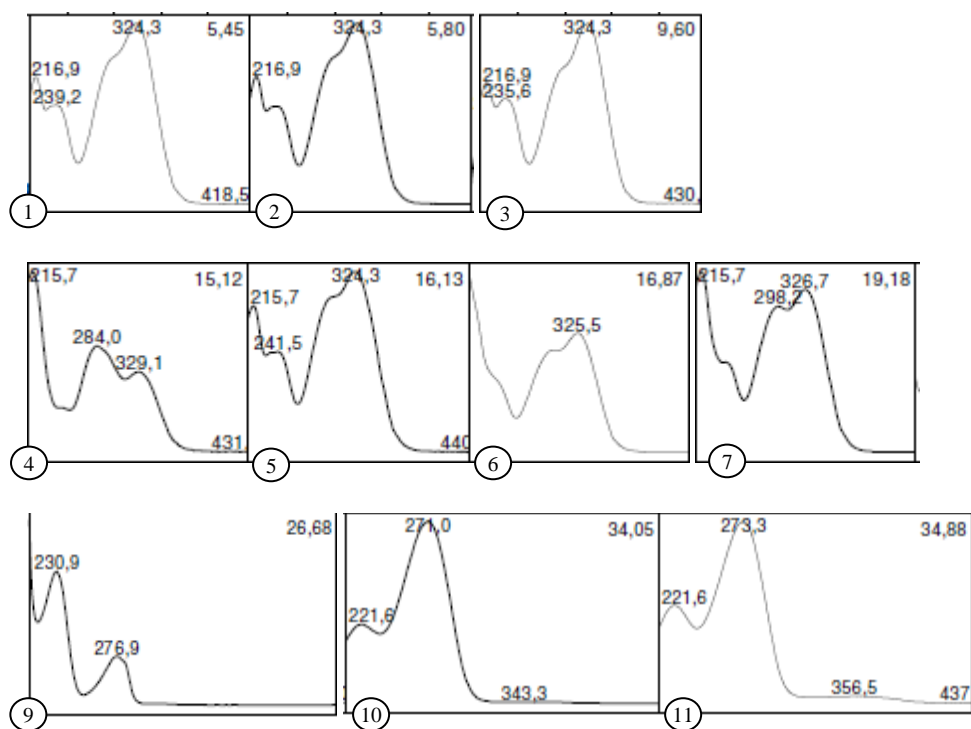
Analisaram-se as duas fracções (Cm1 e Cm2) por LC/UV para comprovar se a separação pretendida fora alcançada.

3.2.3.2 Caracterização das fracções Cm1 e Cm2

Nas figuras 25 e 26 apresentam-se os cromatogramas obtidos a 280 nm por análise das fracções Cm1 e Cm2 e os espectros UV/Visível (210-450 nm) das suas principais bandas. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas que se usaram previamente para a análise do extracto metanólico.

Na identificação dos principais compostos e respectivos espectros utilizou-se a mesma codificação usada previamente na análise do extracto metanólico, evidenciando-se deste modo a reprodutividade do método.

Os resultados mostram que com o fraccionamento do extracto metanólico foi possível separar os principais compostos, sendo que, na fracção Cm1 predominam os compostos fenólicos, mais polares, maioritários no extracto.



Condições cromatográficas:

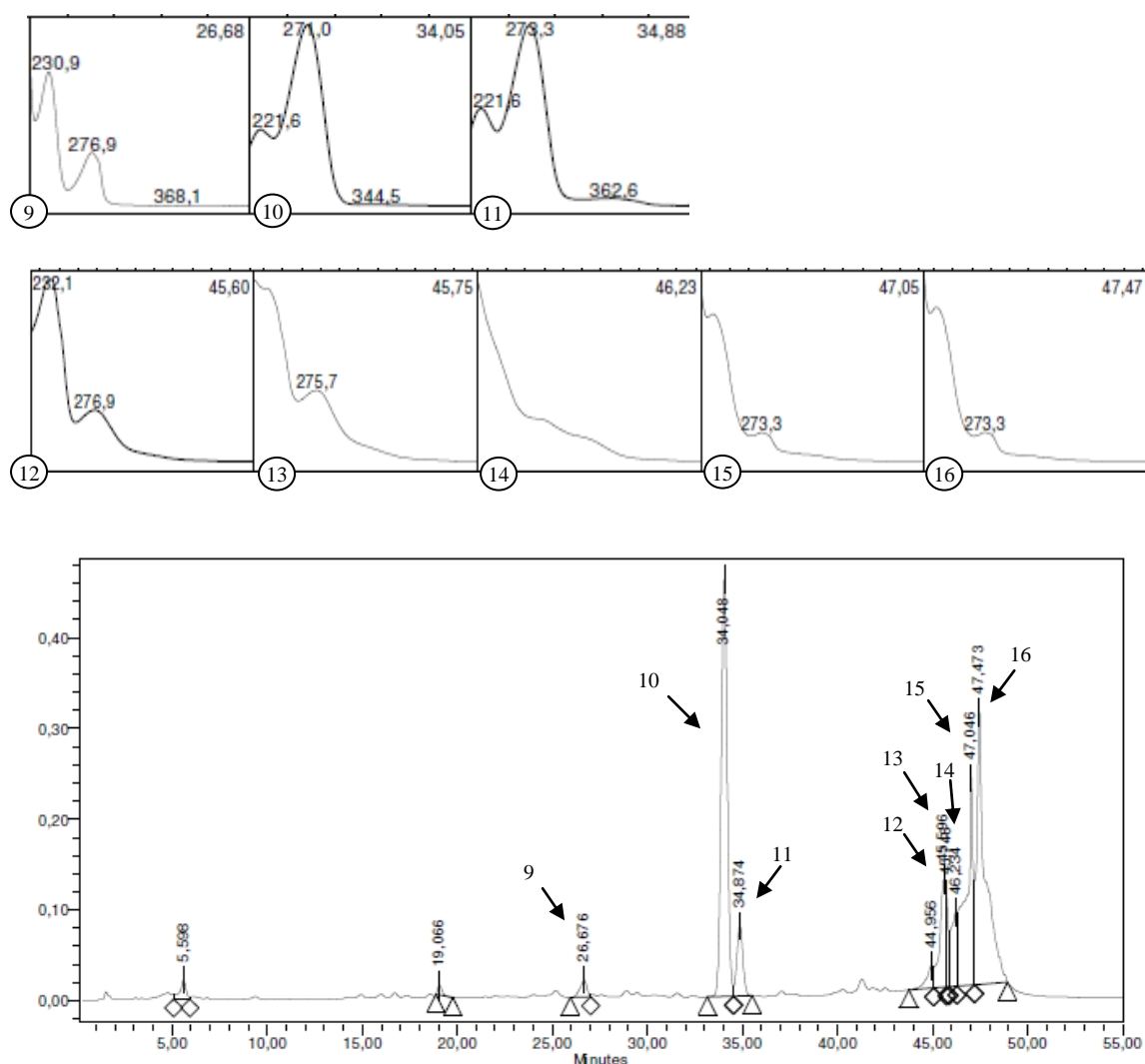
Coluna: Nova-Pak C₁₈ 4µm 150mm×3,9mm d.i., Waters com pré-coluna Nova-Pak Sentry C₁₈ Waters

Gradiente: MeOH-H₂O (0,1% HCOOH) 5:95 a 30:70 em 35 min, 30:70 a 100:0 em 10 min, 100:0 em 6 min, 100:0 a 5:95 em 4 min; 1ml/min

Deteção: UV/Vis: Cromatograma a 280nm, Software Millenium 32 Waters

Espectros – registo de absorvência entre 210 e 450 nm

Figura 25 – Análise LC/UV da fracção Cm1



Condições cromatográficas:

Coluna: Nova-Pak C₁₈ 4μm 150mm×3,9mm d.i., Waters com pré-coluna Nova-Pak Sentry C₁₈ Waters

Gradiente: MeOH-H₂O (0,1% HCOOH) 5:95 a 30:70 em 35 min, 30:70 a 100:0 em 10 min, 100:0 em 6 min, 100:0 a 5:95 em 4 min; 1ml/min

Deteção: UV/Vis: Cromatograma a 280nm, Software Millennium 32 Waters

Spectros – registo de absorvência entre 210 e 450 nm

Figura 26 – Análise LC/UV da fracção Cm2

Os compostos 9, 10 e 11, com t_R 26,7 min, t_R 34,0 min e t_R 34,9 min, respectivamente, aparecem em ambas as fracções, sendo estes dois últimos maioritários nas duas fracções. Pela análise dos seus espectros estes dois compostos parecem tratar-se de isómeros de um tanino gálico (Cai *et al*, 2005).

Os terpenos, que não se conseguiram caracterizar de forma satisfatória no extracto metanólico inicial, ficaram maioritariamente na fracção Cm2, não sendo no entanto também possível a sua caracterização nesta fracção, através do método LC/UV utilizado.

Tendo-se verificado que com este fraccionamento se conseguiram manter os principais constituintes do extracto na mesma fracção e com uma boa separação dos seus picos foi-se analisar a fracção Cm1 pormenorizadamente, usando padrões quando necessário, de modo a identificar os compostos maioritários do extracto.

O sistema cromatográfico utilizado para esta caracterização foi adaptado para a posterior análise em LC/UV/ES-MS de modo a obter maior informação sobre as massas moleculares dos constituintes maioritários.

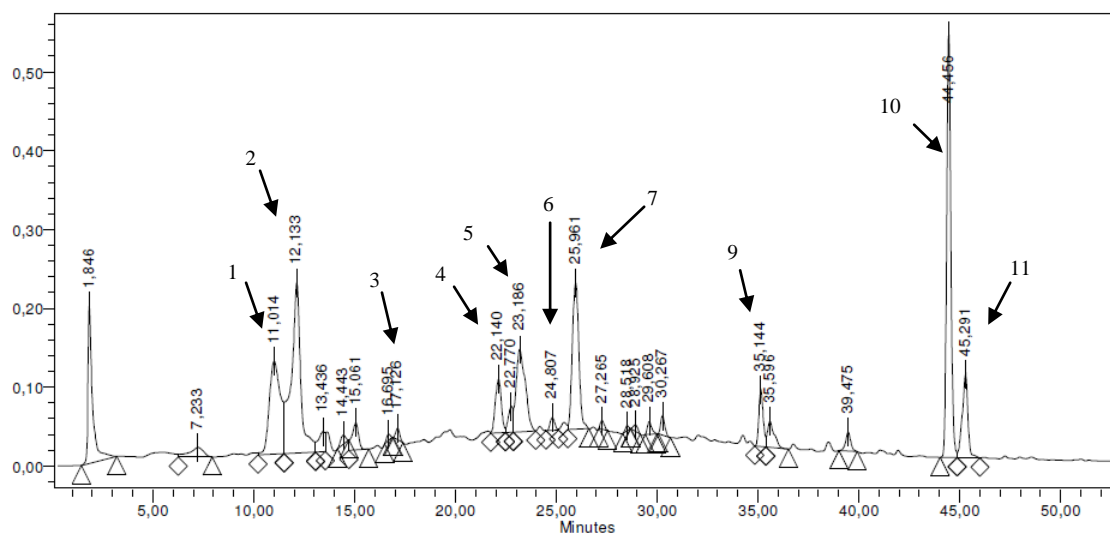
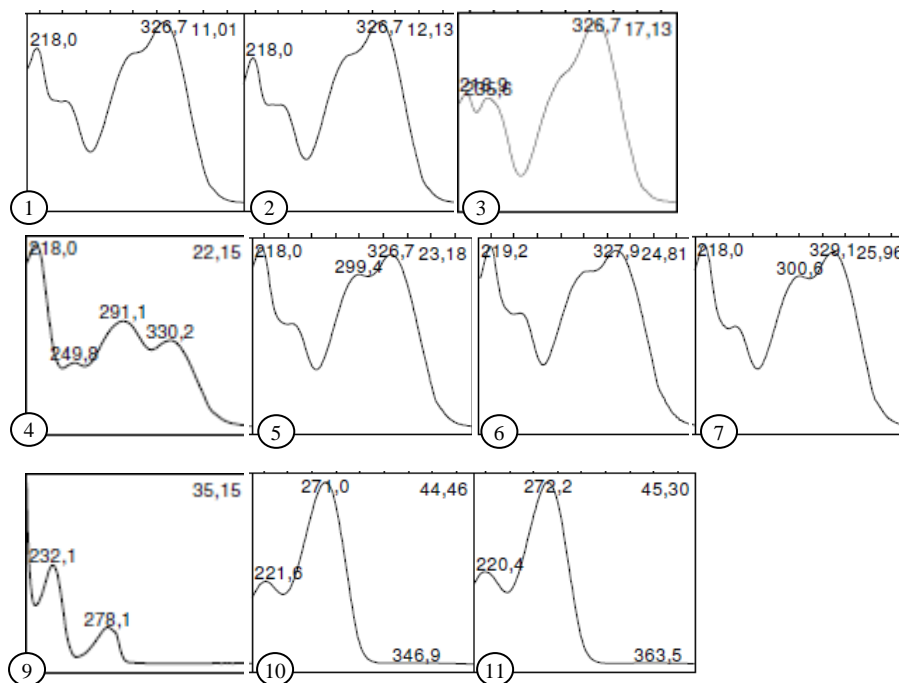
Sabendo que os compostos maioritários eram os compostos fenólicos e que estes facilmente isomerizam, o que se verificou nos cromatogramas obtidos de ambas as fracções, utilizaram-se as condições cromatográficas estudadas por Clifford para a análise estrutural de compostos fenólicos (Clifford et al, 2003).

Na figura 27 apresentam-se o cromatograma obtido a 280 nm, por análise da fracção Cm1 e os espectros UV/Visível (210-450 nm) das suas principais bandas, tendo sido as condições cromatográficas utilizadas as mesmas que se iriam usar posteriormente na análise em LC/UV/ES-MS.

A codificação usada na identificação dos principais compostos e respectivos espectros foi a mesma que se usou nas análises anteriores, permitindo deste modo uma correcta identificação de cada composto, tendo em conta os diferentes tempos de retenção resultantes das diferentes condições cromatográficas utilizadas.

A análise do cromatograma obtido e dos espectros UV/Visível (210-450 nm) das principais bandas da fracção Cm1 confirmou que os compostos maioritários eram efectivamente derivados polifenólicos (figura 27).

Nas tabelas 15 e 16 são apresentadas as características cromatográficas dos compostos maioritários.



Condições cromatográficas:

Coluna: Atlantis T3 100mm×2,1mm d.i., Waters com pré-coluna Atlantis T3, Waters **Gradiente:** MeOH-H₂O (0,1% HCOOH) 15:85 a 90:10 em 50 min, 90:10 a 100:0 em 3 min, 100:0 em 5 min, 100:0 a 15:85 em 2 min; 0,2ml/min

Deteção: UV/Vis: Cromatograma a 280nm, Software Millenium 32 Waters

Espectros – registo de absorvência entre 210 e 450 nm

Figura 27 – Caracterização por LC/UV da fracção Cm1

Os espectros dos compostos 1, 2, 5, 6 e 7 mostraram perfis cromatográficos muito semelhantes, compatíveis com a sua inclusão no grupo dos derivados cafeoil-quínicos (figura 27 e tabela 15) (Clifford *et al*, 2003).

Tabela 15 - Características LC/UV dos derivados cafeoil-quínicos presentes na fracção CM1

| Características cromatográficas dos compostos | | |
|--|-------------------------------|--|
| Compostos | t_R (min) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) |
| 1 | 11,0 | 221,6; 326,7 |
| 2 | 12,1 | 218; 326,7 |
| 5 | 23,2 | 218; 299,4; 326,7 |
| 6 | 24,8 | 219,2; 327,9 |
| 7 | 26,0 | 218; 300,6; 329,1 |
| ácido clorogénico (padrão) | 9,5 | 218; 241,5; 326,7 |
| | 11,7 | 220,4; 241,5; 298,2 |

Por injeção de uma solução metanólica de padrão de ácido clorogénico, foi também verificada a existência de duas formas isoméricas, com t_R 9,5 e 11,7 min, correspondentes ao esperado para a mistura de isómeros ácido clorogénico / ácido isoclorogénico, espectável em meio ácido, tal como o utilizado (Clifford *et al*, 2003).

A presença do ácido clorogénico no extracto metanólico tinha sido já verificada no decurso da análise por TLC.

No entanto, o termo ácido clorogénico (ACG) é actualmente usado para designar não só um composto mas uma família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico (De Maria & Moreira, 2004).

Para além dos derivados cafeoil-quínicos, são detectados ainda 3 compostos (9, 10 e 11) com t_R 35,2, 44,5 e 45,3 min, cujas características espectrais os enquadram no grupo dos galhotaninos (figura 27 e tabela 16).

Tabela 16 - Características LC/UV dos derivados galhotaninos detectados na fracção CM1

| Características cromatográficas dos compostos | | |
|--|-------------------------------|--|
| Compostos | t_R (min) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) |
| 9 | 35,2 | 232,1; 278,2 |
| 10 | 44,5 | 221,6; 271,0 |
| 11 | 45,3 | 220,4; 272,2 |

3.2.4 Análise LC/UV/ES-MS

Para a identificação inequívoca dos isômeros do ácido clorogénico recorreu-se à análise dos resultados obtidos em LC/UV/ES-MS, em modo negativo. A metodologia utilizada encontra-se descrita em 2.6.4.

De acordo com os estudos desenvolvidos por Clifford é possível definir os ácidos clorogénicos pelos seus iões moleculares e distinguir isômeros posicionais de acordo com o seu padrão de fragmentação (Clifford *et al.*, 2003; Zheng & Clifford, 2008).

Os resultados da análise LC/UV/ES-MS efectuada com a fracção CM1 são apresentados na figura 28.

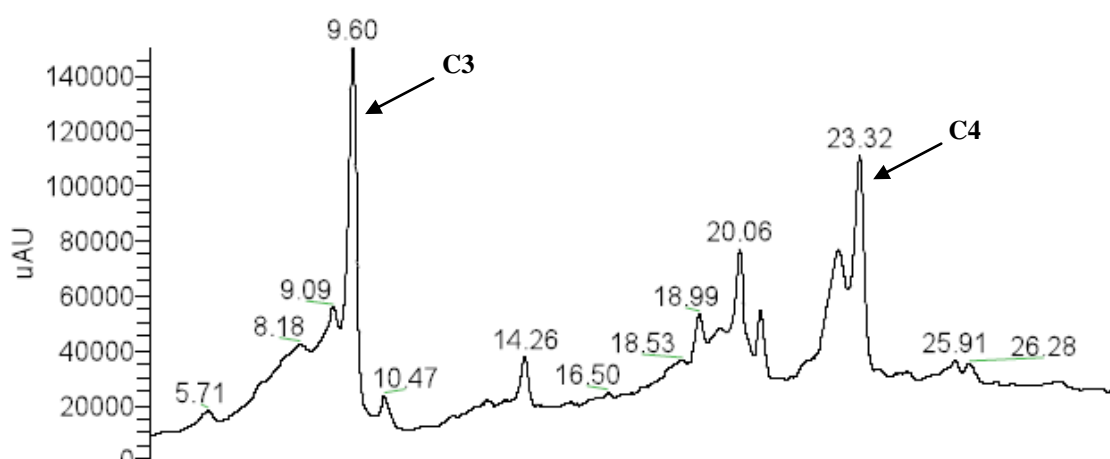


Figura 28 – Análise LC/UV/ES-MS da fracção Cm1 ($t_R < 30,0$)

Comparando este cromatograma com o obtido em LC/UV verificou-se uma ligeira diminuição nos tempos de retenção e a ausência de um número elevado de picos relativos a isômeros do ácido clorogénico. No entanto, comparando os cromatogramas obtidos podemos associar os compostos 1 e 2 ao composto C3, com t_R 9,60 min e os compostos 6 e 7 ao composto C4 com t_R 23,32 min. Consideramos deste modo que o composto C3 é constituído pela mistura dos isômeros 1 e 2 e o composto C4 é constituído pela mistura dos isômeros 6 e 7.

Comparando os espectros de absorvância no UV/Visível (210-450 nm) destes dois compostos (C3 e C4) verifica-se que apresentam bandas de absorvância distintas (figura 29).

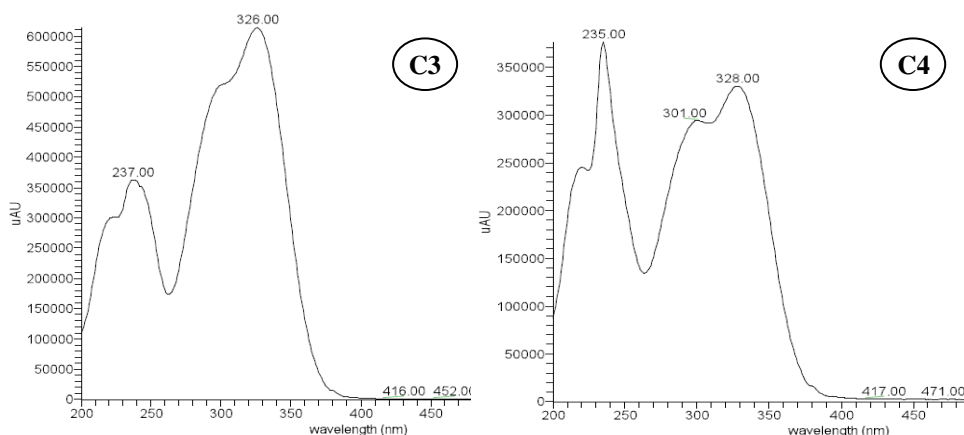


Figura 29 – Espectros UV/Visível dos compostos C3 e C4

O composto C3 apresenta um espectro de absorvância no UV/Vis com $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH: 237, 326 nm enquanto o composto C4 apresenta um espectro de absorvância no UV/Vis com $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH: 235, 301, 328 nm.

Os dados relativos às características do espectro de massa que permitem a identificação destes dois compostos encontram-se resumidos na tabela 17.

Tabela 17 – Informação estrutural LC/UV/ES-MS dos compostos C3 e C4

| Características dos compostos | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|--------|
| Compostos | t_R (min) | EM ¹ | EM ² | | EM ³ | | |
| | | Ião molecular | Ião base | Fragmentos secundários | Ião base | Fragmentos secundários | |
| C3 | 9,60 | 352,84 | 191,08 | 178,83 | 84,79 | 126,75 | 170,73 |
| C4 | 23,32 | 514,84 | 352,94 | | 173,01 | 178,91 | 191,10 |

3.2.4.1 Composto C3

O composto C3 apresentou um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 352,84 (figura 30 e tabela 17). Este composto, correspondente a uma massa molecular de 354 u.m.a é concordante com a presença de um éster do ácido cafeoilquínico (ACQ). Esta identidade é confirmada pela presença do fragmento m/z 191,08 $[M-161-H]^-$ correspondente à perda de um resíduo do ácido cafeico e o fragmento m/z 178,83 $[M-$

174-H]⁻ correspondente à perda de um resíduo do ácido quínico (De Maria & Moreira, 2004).

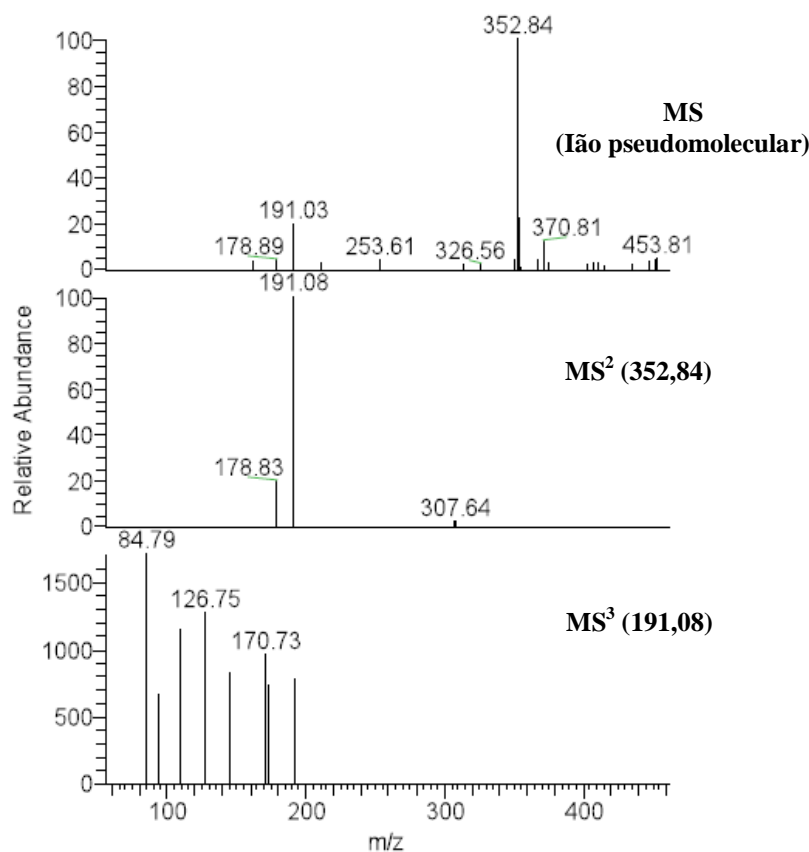


Figura 30 – Espectros ES-MSⁿ do composto C3

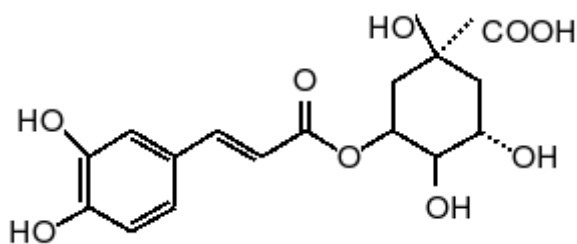
Sabendo que na natureza existem três isómeros (3- cafeoilquínico, 4- cafeoilquínico e 5- cafeoilquínico) analisaram-se os fragmentos obtidos e compararam-se com os valores da literatura (Clifford *et al.*, 2003).

Segundo Clifford os isómeros 3-ACQ e 5-ACQ apresentam padrões de fragmentação similares. Ambos apresentam o mesmo ião molecular de m/z 191,08. A sua diferenciação torna-se possível porque apenas o isómero 5-ACQ apresenta um fragmento secundário (ES-MS²) a m/z 161,4.

O isómero 4-ACQ distingue-se facilmente dos outros por apresentar um ião molecular a m/z 173,5 resultante da perda de um grupo cafeóilico e de uma molécula de água.

Analisando os fragmentos iónicos obtidos por análise LC/ES-MS² da nossa amostra, não é visível nenhum fragmento a m/z 161,4. Este facto, adicionado do facto de se ter observado o fragmento a m/z 178,83, o qual raramente aparece no isómero 5-ACQ

(Clifford *et al*, 2003), permite que se conclua serem os resultados obtidos compatíveis com a identificação do composto C3 como ácido 3-cafeoilquínico (3-ACQ):



Composto C3: ácido 3-cafeoilquínico

3.2.4.2 Composto C4

Os dados ES-MS do pico referente ao composto C4, mostraram a existência de um pico 100% a 514,84 (m/z), correspondente a uma massa molecular de 516 u.m.a (figura 31 e tabela 17). Estes resultados são concordantes com a presença de um éster de duas moléculas de ácido cafeico com uma de ácido quínico (ácido dicafeoilquínico – diACQ) (Clifford *et al*, 2003).

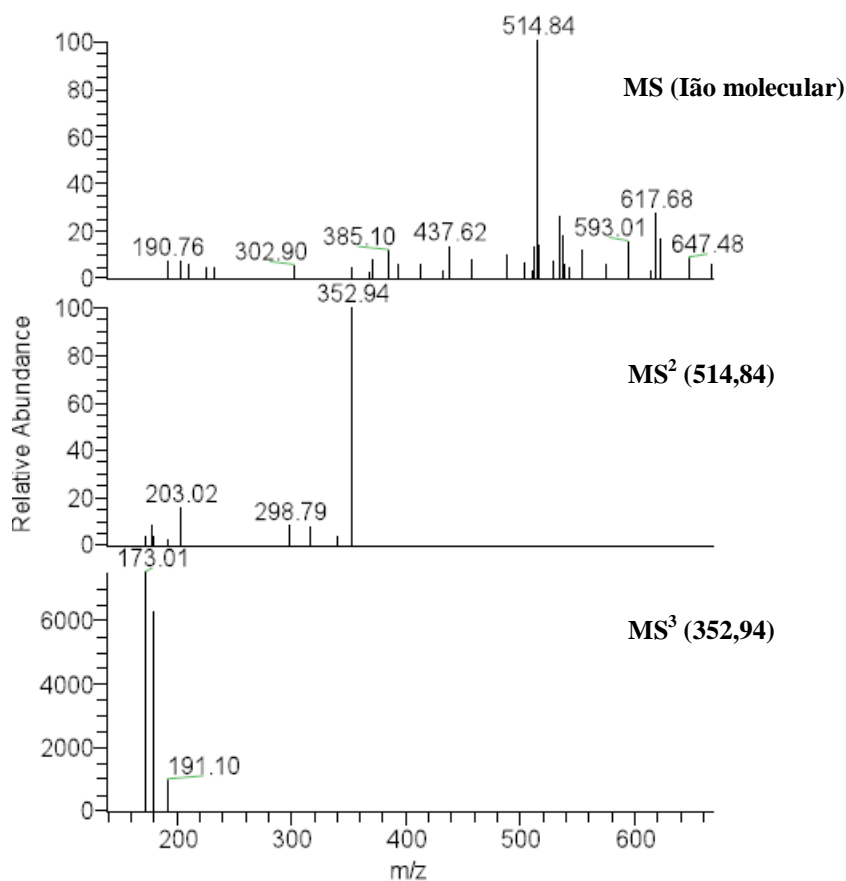


Figura 31 – Espectros ES-MSⁿ do composto C4

Esta estrutura é compatível com a presença do fragmento m/z 352,94 [M-161-H]⁻ verificado por análise ES-MS² do pico principal, correspondente à perda de um resíduo de ácido cafeico (-161 u.m.a) e pelo fragmento minoritário m/z 191,10 [M-161-161-H]⁻ correspondente a um resíduo de ácido quínico, resultante da perda combinada de dois resíduos de ácido cafeico (Clifford *et al.*, 2003).

Na natureza existem três isómeros desta estrutura básica (3,4-diACQ, 3,5-diACQ e 4,5-diACQ). Para elucidar qual o isómero presente no extracto analisaram-se os fragmentos obtidos e compararam-se os valores de m/z destes com os valores constantes na literatura (Clifford *et al.*, 2003).

Segundo Clifford (2003) os isómeros 3,5-diACQ e 4,5-diACQ apresentam padrões de fragmentação similares. O isómero 3,4-diACQ apresenta por seu lado fragmentos únicos, sendo por isso facilmente distinguido dos outros dois (De Maria & Moreira, 2004). A diferença está na análise ES-MS² do pico principal dos três isómeros, onde os fragmentos m/z 173,5 e m/z 335,6 são encontrados exclusivamente no espectro de massas do isómero 3,4-diACQ (De Maria & Moreira, 2004).

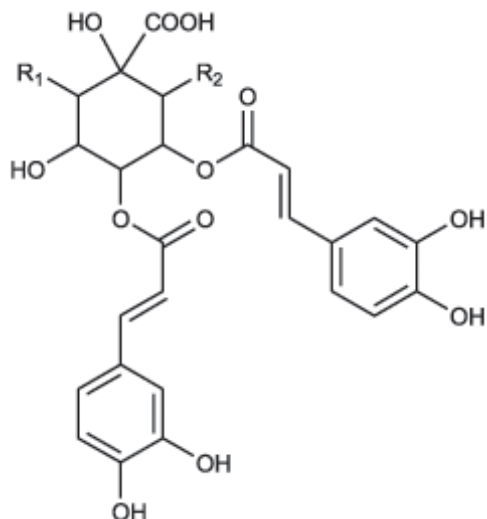
Analisando os fragmentos iónicos obtidos por ES-MS² não se encontrou nenhum fragmento a m/z 335,6, pelo que a possibilidade de estarmos na presença do isómero 3,4-diACQ fica afastada.

De modo a distinguir entre os isómeros 3,5-diACQ e 4,5-diACQ analisou-se a abundância relativa de cada fragmento obtido:

A presença do ião base m/z 173,01 e a existência do fragmento minoritário a m/z 191,10 leva-nos a concluir que estamos perante a presença do isómero 4,5-diACQ uma vez que, caso se tratasse do isómero 3,5-diACQ estes fragmentos apareciam trocados, sendo maioritário o fragmento m/z 191,10 e o fragmento m/z 173,01 minoritário (De Maria & Moreira, 2004).

Esta diferença pode ser explicada porque a remoção de um resíduo cafeoílico se faz muito mais facilmente se este se encontrar na posição C3 ou C5. Na posição C4 a estabilidade do resíduo é muito elevada devido à conformação do isómero (Clifford *et al.*, 2003)

Os dados de espectrometria de massa apresentados levam assim a que se proponha a identidade do composto C4 como ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diACQ):



Composto C4: ácido 4,5-dicafeoilquínico

3.2.4.3 Taninos gállicos

Analisando a parte final do cromatograma ($t_R > 30$ min) da fracção Cm1 obtido por LC/UV/ES-MS detectaram-se três compostos cujas características espectrais permitiram a sua inclusão no grupo dos taninos gállicos (figura 32 e tabela 18) (Cai et al, 2005).

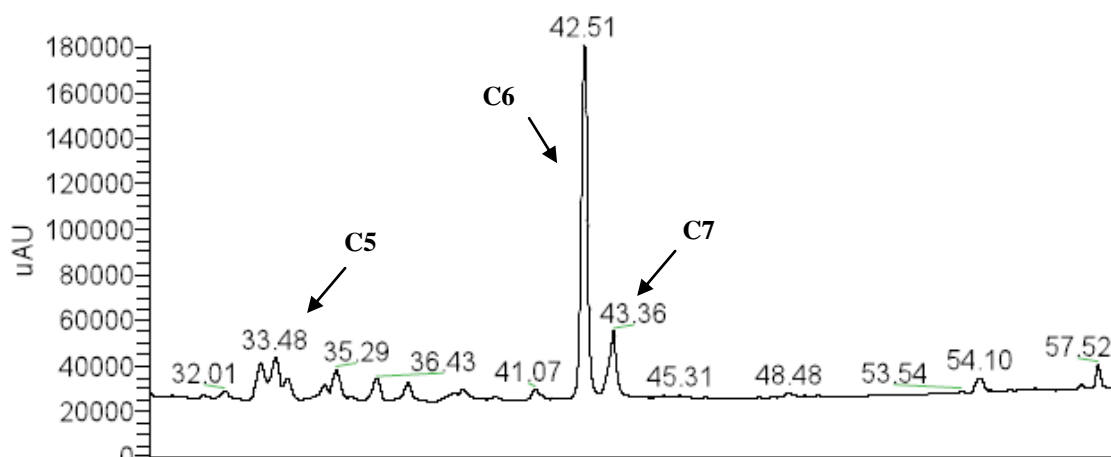


Figura 32 – Análise LC/UV/ES-MS da fracção Cm1 ($t_R > 30$ min)

Tabela 18 – Informação estrutural LC/UV/ES-MS dos compostos C5, C6 e C7

| Características dos compostos | | | |
|--------------------------------------|-------------|--------------------|--|
| Compostos | t_R (min) | [M-H] ⁻ | Espectro UV/Vis $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) |
| C5 | 33,48 | 1175,33 | 236; 270 |
| C6 | 42,51 | 723,11 | 235; 268 |
| C7 | 43,36 | 723,11 | 235; 271 |

Os espectros de massa destes três compostos encontram-se representados nas figuras 33, 34 e 35.

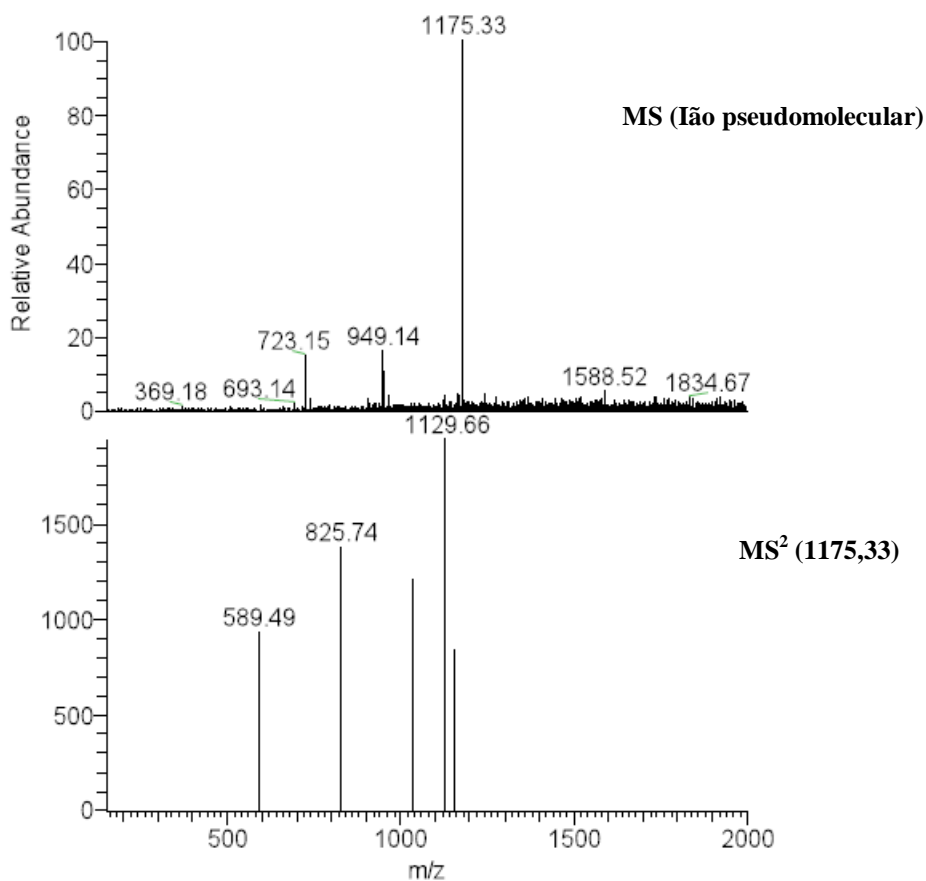


Figura 33 – Espectros ES-MSⁿ do composto C5

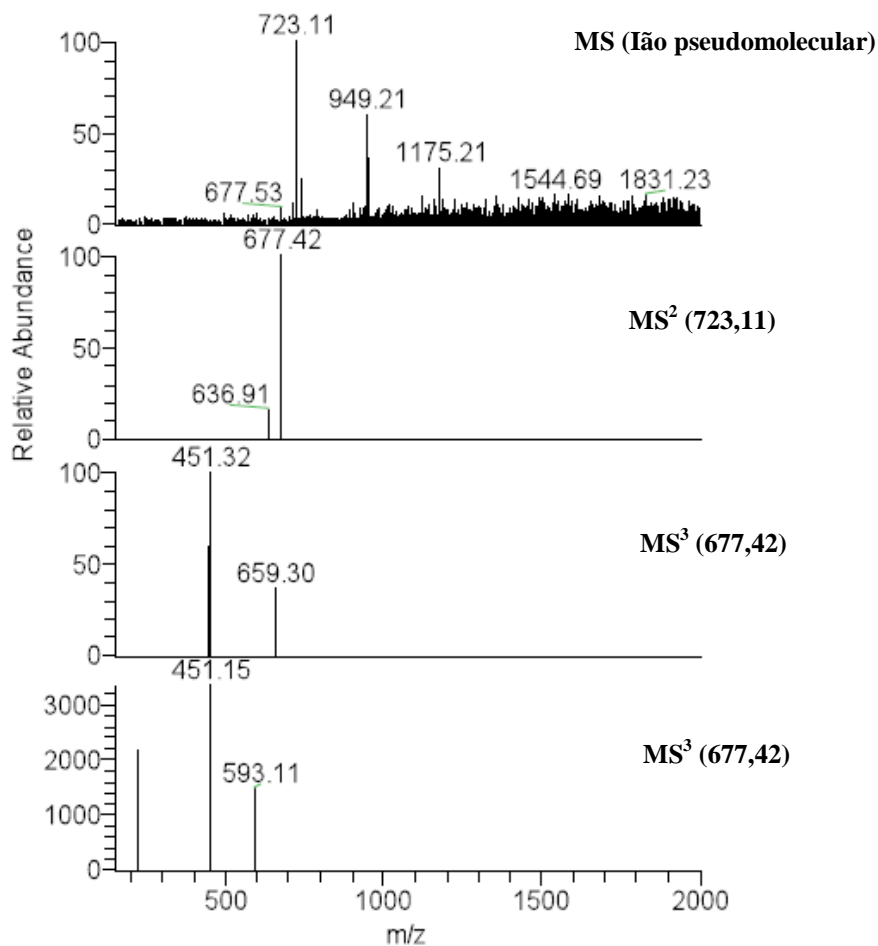


Figura 34 – Espectros ES-MSⁿ do composto C6

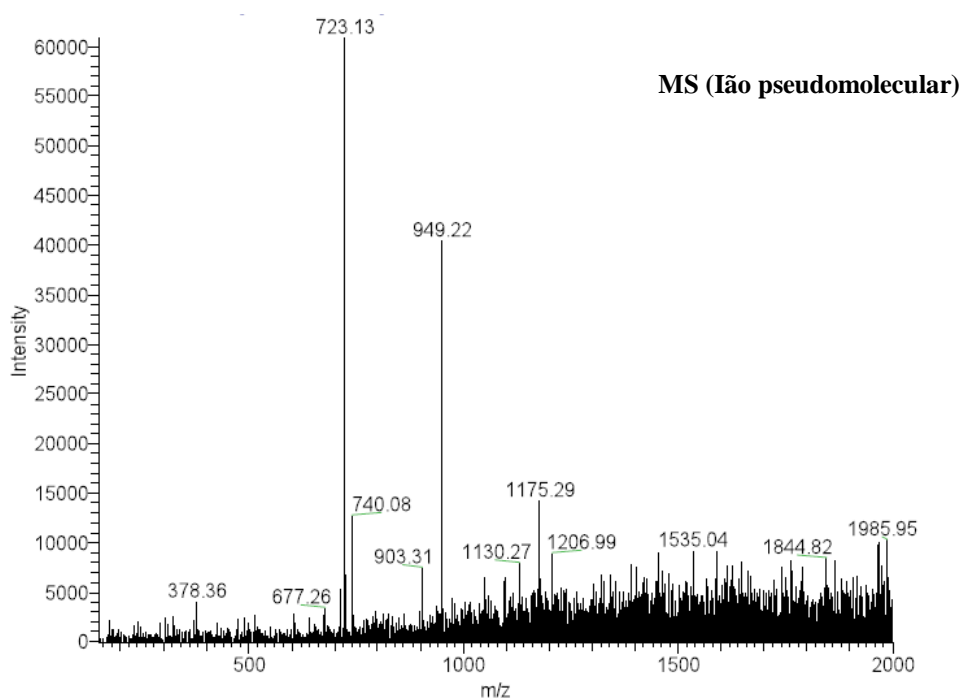


Figura 35 – Espectro ES-MS do composto C7

O composto C7 mostrou um íão pseudomolecular a m/z 723,13, não sendo possível a sua posterior fragmentação, nas condições de ensaio utilizadas (figura 35).

Contrariamente, os compostos C5 e C6 originaram uma resposta mássica espectral discernível, distinguindo-se facilmente os seus íões moleculares e fragmentos (figuras 33 e 34).

No entanto, devido à sua complexidade e na ausência de outros dados que pudessem elucidar a sua estrutura (espectrometria de ressonância magnética nuclear – NMR) ou de dados bibliográficos para comparação com os fragmentos obtidos não foi possível a sua identificação no decorrer deste estudo.

3.3 Estudos de Actividade Biológica

3.3.1 Rastreio da actividade antimicrobiana

Os resultados dos testes de rastreio de actividade antimicrobiana (*vide* procedimento descrito em 2.5.1) realizados com o extracto metanólico do caule de *C. heudelotii* contra as estirpes de referência de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, são apresentados na tabela 19.

Tabela 19 – Actividade antimicrobiana do extracto metanólico

| Actividade antimicrobiana | |
|----------------------------------|--|
| Microorganismos testados | Concentração inibitória mínima – CIM ($\mu\text{g/ml}$) |
| <i>Candida albicans</i> | 312,5 |
| <i>Escherichia coli</i> | 312,5 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 625 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 312,5/625 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | – |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 156,25 |

(–) - não activo

A análise dos resultados obtidos mostrou que, no intervalo de concentrações testado (5000 e 48 µg/ml), o extracto possui ligeira actividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados à excepção de *S. aureus*.

Entre os microrganismos testados, *M. luteus* foi o que mostrou maior sensibilidade, sendo necessária uma concentração de 156,25 µg/ml para inibir o seu crescimento.

Para a inibição do crescimento das estirpes de *C. albicans* e *E. coli* foi necessária uma concentração de 312,5 µg/ml. Apesar de se ter verificado actividade contra *P. aeruginosa*, os resultados obtidos não foram muito conclusivos quanto ao valor exacto da CIM uma vez que se obtiveram algumas variações nos diferentes ensaios. O microrganismo que exibiu menor sensibilidade ao extracto foi *E. faecalis*, com uma CIM de 625 µg/ml.

Os resultados obtidos contra o *M. luteus* revelam-se bastante importantes pois esta bactéria além de comensal da pele e mucosa nasal pode ainda ser encontrada em qualquer ambiente onde a temperatura ronde os 37 °C. Deste modo pode estar presente em solos contaminados ou produtos alimentícios sendo por isso a sua transmissão muito fácil. Tendo em conta estas características facilmente se compreende que nos trópicos africanos, qualquer lesão externa fácil e rapidamente será contaminada por esta bactéria (Kocur *et al.*, 2006). Tendo em conta estes dados, a actividade demonstrada contra este microrganismo é um indicador relevante que pode explicar a sua utilização nos países em desenvolvimento. A actividade demonstrada contra *C. albicans*, *E. coli* e *E. faecalis* vem reforçar também o uso tradicional do caule no tratamento de feridas.

Os resultados obtidos contra a *P. aeruginosa*, revelam-se importantes porque esta é uma bactéria oportunista que facilmente coloniza os doentes bastante debilitados. É a principal responsável pelas infecções nos centros hospitalares, trazendo consigo uma taxa de mortalidade entre os 40 e 60% (Fick, 1993).

Assim, a actividade verificada para o extracto de *C. heudelotii* contra este microrganismo pode, após confirmação, justificar a utilização desta planta medicinal não só nas regiões remotas dos países africanos, onde a planta é usada pelos curandeiros mas também nos centros hospitalares destes países, onde os recursos e o acesso a antibióticos é muito escasso ou na maioria dos casos inexistente.

3.3.2 Actividade Antioxidante

Tendo em conta a utilização tradicional do caule no tratamento de lesões na pele e os resultados obtidos no screening dos principais grupos metabólicos onde se identificou como maioritária a presença de ácidos fenólicos e terpenos e também linhanos, apesar da pesquisa destes últimos não ter sido aprofundada, resolveu-se verificar se o extracto seria dotado de actividade antioxidante e quais as classes de compostos químicos possuidores dessa actividade.

Utilizou-se o método bioautográfico directo (*vide* procedimento descrito em 2.6.2) com os sistemas cromatográficos constantes na tabela 4.

Os resultados obtidos, sumariados nos parágrafos seguintes e na figura 36, mostraram:

- A existência de bandas com R_f entre 0,23 e 0,80 que apresentavam actividade antioxidante, apresentando estas bandas fluorescência azul esverdeada intensa ($\lambda=366$ nm), o que é compatível com a sua identidade fenólica (sistema A1).
- Este extracto mostrou ainda ter também na sua composição compostos fenólicos de elevada polaridade (sistema A2), possuidores de actividade antioxidante, sendo o seu comportamento cromatográfico também compatível com a sua identidade fenólica (figura 36).

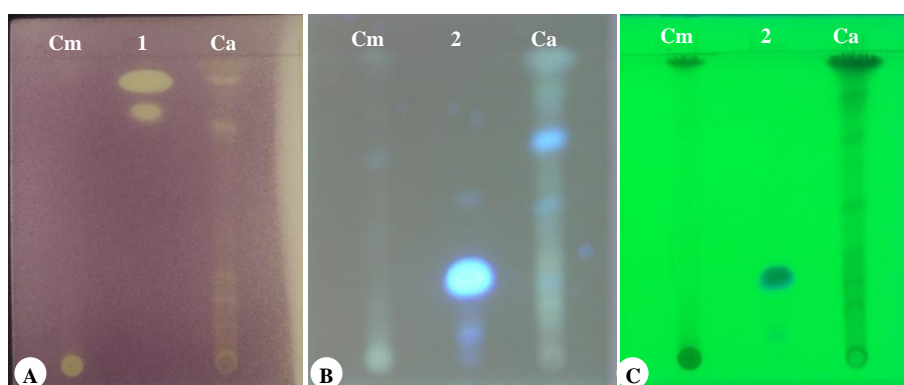


Figura 36 - Determinação da actividade antioxidante por bioautografia usando o sistema A2

A – Observação no visível após pulverização com DPPH; B – Observação a 366nm após pulverização com R.I.; C – Observação a 254 nm após pulverização com R.I.

Cm – extracto metanólico; **1 - 2** e **3-*terc*-butil-4-hidroxianizol**; **1** – Harmano; **Ca** – extracto alcaloídico

- No extracto alcaloídico (Ca) distinguiram-se várias bandas com actividade antioxidante de R_f entre 0,29 e 0,88 (Sistema A2) (figura 36). Na parte da placa revelada com R.I, a 366 nm são visíveis três bandas com R_f 0,52, 0,71 e 0,88 que

apresentam fluorescência azul intensa. As bandas com R_f 0,71 e 0,88 apresentam actividade antioxidante. Sob radiação UV a 254 nm as várias bandas que apresentam actividade antioxidante não apresentam qualquer fluorescência ao contrário do padrão utilizado (Figura 36-C). Este comprimento de onda permite distinguir 9 bandas de R_f entre 0,29 e 0,88, sendo as três mais intensas aquelas que apresentaram fluorescência azul a 366 nm e que, devido às suas características cromatográficas desconfiamos poderem ser glicorresinas (Eich, 2008). As restantes bandas não se distinguem muito bem a 366 nm, ficando a dúvida se pertencerão todas à mesma classe de compostos.

- Detectaram-se ainda diversas bandas com R_f entre 0,23 e 0,77 com actividade antioxidante que apresentavam coloração castanha-avermelhada quando observadas à luz visível e fluorescência desde o amarelo, azul, violeta ao vermelho sob radiação UV a 366 nm (sistema A3) o que é compatível com a presença de terpenos. Esta classe tem representantes em quase todos as espécies vegetais e por isso as suas propriedades antioxidantes encontram-se vastamente estudadas (Grassman, 2005).

- O extracto metanólico apresentou ainda diversas bandas com actividade antioxidante que manifestaram fluorescência de diferentes tonalidades de vermelho, violeta, roxo e azul sob radiação UV a 366 nm (sistema A4) compatível com a presença de linhanos (Opletal & Sovová, 2008).

O facto de o extracto possuir actividade antioxidante torna-se muito importante para o processo de cicatrização da ferida já que vai suprimir os radicais livres e outras espécies oxidantes existentes nesse local.

Tendo em conta os resultados obtidos, a actividade antioxidante do extracto foi comprovada e deve-se principalmente à presença dos compostos fenólicos, terpenos e linhanos. Os compostos fenólicos, devido às suas propriedades redutoras, desempenham assim um papel muito importante na adsorção e neutralização de radicais livres (Pattanayak & Sunita, 2008). Existem já diversos estudos que comprovam o grande potencial sequestrador de espécies reactivas de oxigénio dos derivados do ácido clorogénico identificados no extracto (Terpinc & Abramovic, 2010).

Dentro da classe dos terpenos, foi identificado no extracto o β -sitosterol, para o qual foi já reportada actividade anti-inflamatória, antipirética, antiulcerosa, antidiabética e anticancerígena assim como alguma relação no controlo da artrite reumatóide. Recentemente, verificou-se que o β -sitosterol estimula a proliferação de leucócitos a

nível periférico e aumenta significativamente a actividade de citoquinas, interleucina 2 e interferão γ , desempenhando assim um papel importante na defesa imunitária (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Tendo em conta estas propriedades, torna-se evidente que a presença deste composto no extracto também contribui para o processo de cicatrização de feridas.

A presença de diferentes classes de compostos com propriedades antioxidantes no extracto torna-se numa mais-valia pois a sua interacção é muito importante, resultando na maioria dos casos efeitos cumulativos (Grassman, 2005).

Por outro lado, o efeito sinérgico entre a actividade antimicrobiana e antioxidante acelera o processo de cicatrização de feridas.

3.3.3. Toxicidade aguda

Os resultados da avaliação da toxicidade aguda *in vivo* são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 - Determinação da toxicidade aguda *in vivo*

| Toxicidade aguda | | | |
|-------------------------|--------------------------------|----|----|
| Grupos | Sobrevivência às 24 e 48 horas | | |
| | n | 24 | 48 |
| Controlo 1 | 8 | 8 | 8 |
| Cm 500 mg/Kg | 8 | 8 | 8 |
| Cm 1000 mg/Kg | 8 | 8 | 8 |
| Cm 1500 mg/Kg | 8 | 8 | 8 |
| Controlo 2 | 6 | 6 | 6 |
| Cm 300 mg/Kg | 4 | 4 | 4 |
| Cm 600 mg/Kg | 4 | 4 | 4 |
| Cm 1200 mg/Kg | 4 | 4 | 4 |

No estudo de toxicidade aguda efectuado não foi observada qualquer alteração comportamental ou qualquer outro sinal visível de toxicidade, nos diferentes grupos de animais.

O extracto revelou assim apresentar uma baixa toxicidade aguda sendo a sua DL50 superior a 1500 mg/Kg (tabela 20).

Para testar os possíveis efeitos tóxicos do extracto foram doseados os principais marcadores de lesão em diferentes tecidos:

- A nível da toxicidade hepática dosearam-se as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).
- A enzima lactato desidrogenase (LDH) foi utilizada como marcador de lesões inespecíficas de órgão.
- Para avaliar o efeito do extracto a nível do músculo cardíaco e cérebro doseou-se a enzima creatinofosfoquinase (CK-MB).
- As alterações a nível renal foram-se avaliadas através do doseamento dos marcadores creatinina e ureia.

Os resultados obtidos, após tratamento estatístico apropriado (vide procedimento em 2.5.2.5) encontram-se resumidos na tabela 21.

Tabela 21 - Efeitos da administração intra-peritoneal do extracto nas concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), creatinofosfoquinase (CK-MB), creatinina e ureia ^a

| Efeitos do extracto nos principais marcadores de lesão | | | | | | |
|---|------------|--------------|----------------|--------------|--------------------|---------------|
| Grupos | ALT (U/L) | AST (U/L) | LDH (U/L) | CK-MB (U/L) | Creatinina (mg/dl) | Ureia (mg/dl) |
| Controlo 1 | 30,9 ± 2,9 | 88,6 ± 7,9 | 423,4 ± 55,2 | 164,6 ± 18,3 | 0,3 ± 0,1 | 30,9 ± 2,9 |
| Cm 500 mg/Kg | 25,5 ± 2,1 | 100,1 ± 4,5 | 1455,4 ± 125,8 | 400,6 ± 24,7 | 0,2 ± 0,0 | 41,0 ± 2,9 |
| Cm 1000 mg/Kg | 25,4 ± 2,9 | 97,2 ± 4,3 | 1115,0 ± 119,1 | 304,5 ± 26,5 | 0,2 ± 0,0 | 33,9 ± 0,8 |
| Cm 1500 mg/Kg | 21,5 ± 3,4 | 108,1 ± 20,1 | 647,4 ± 57,7 | 274,2 ± 30,9 | 0,1 ± 0,0 | 29,4 ± 0,6 |
| Controlo 2 | 21,0 ± 2,6 | 151,5 ± 33,3 | 1285,2 ± 266,3 | – | 0,2 ± 0,0 | 44,3 ± 2,2 |
| Cm 300 mg/Kg | 14,3 ± 1,4 | 134,4 ± 25,3 | 1533,5 ± 440,7 | – | 0,2 ± 0,0 | 46,5 ± 2,3 |
| Cm 600 mg/Kg | 13,6 ± 1,8 | 102,6 ± 17,4 | 1510,3 ± 495,7 | – | 0,2 ± 0,0 | 46,8 ± 4,3 |
| Cm 1200 mg/Kg | 20,2 ± 2,1 | 150,7 ± 5,7 | 1312,3 ± 264,3 | – | 0,2 ± 0,0 | 41,7 ± 3,0 |

^a os valores são expressos em média ± desvio padrão após análise estatística ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Considerou-se um nível de significância de 5%.

Analisando os níveis das enzimas hepáticas (AST e ALT) pode constatar-se que o extracto não causou nenhum aumento sérico significativo (tabela 21 e figura 37).

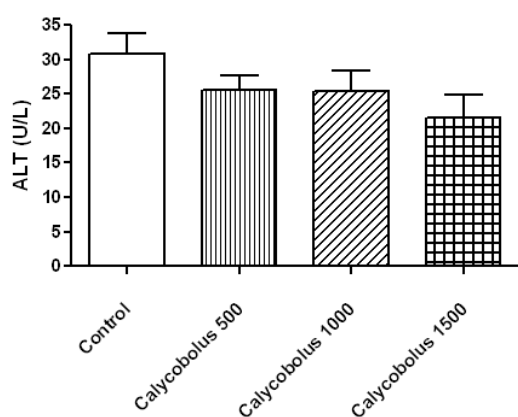


Figura 37 - Níveis sanguíneos de ALT (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto

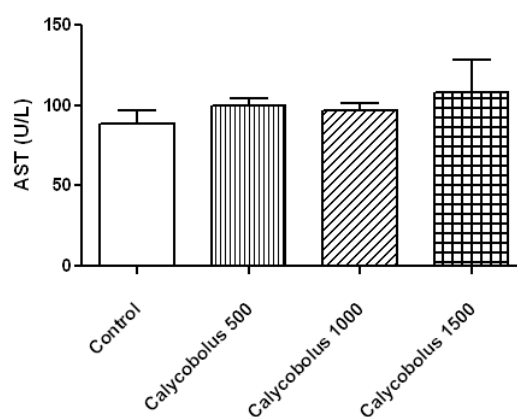


Figura 38 - Níveis sanguíneos de AST (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto

Os níveis de AST aumentaram ligeiramente mas não o suficiente para se considerar a toxicidade do extracto pois mesmo para a dose mais alta (1500 mg/Kg), onde se verificou o maior aumento de AST (108,1 U/L), os valores pouco se afastaram do obtido no grupo controlo (88,6 U/L). Este ligeiro aumento verificado nos níveis de AST pode ser devido a outra causa pois estudos recentes revelam que o aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas pode ser devido a outras condições patológicas que não a lesão hepática, tais como lesões musculares (Nathwani *et al.*, 2005).

Verificou-se que em todas as doses em estudo, os níveis séricos de ALT foram inferiores aos do grupo controlo (tabela 21 e figura 37), o que revela não um efeito de lesão hepática mas pelo contrário um efeito protector. Esta diminuição deve-se provavelmente à elevada quantidade de compostos antioxidantes encontrados no extracto – compostos fenólicos, terpenos e ainda linhanos.

As propriedades antioxidantes destes compostos são já amplamente conhecidas, existindo mesmo estudos em espécies próximas do género *Calycobolus*, cuja actividade protectora da função hepática e renal se deve aos seus constituintes maioritários da classe dos linhanos e derivados do ácido quínico (Yen *et al.*, 2007).

As figuras 39 e 40 representam os resultados obtidos no doseamento da creatinina e ureia.

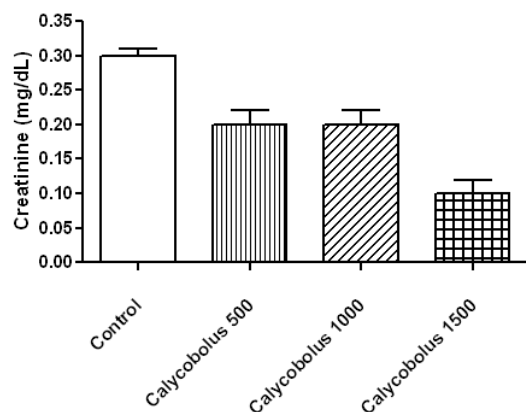


Figura 39 - Níveis sanguíneos de creatinina (mg/dl) 24 h após a administração da segunda dose de extracto

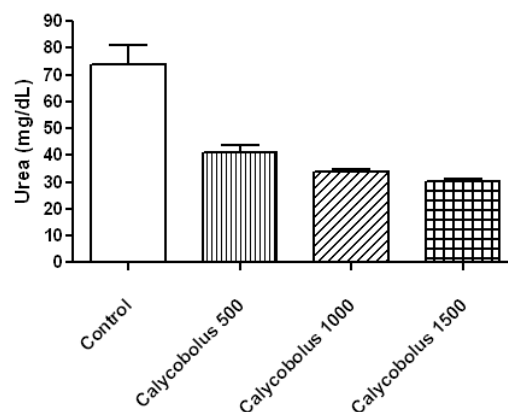


Figura 40 - Níveis sanguíneos de ureia (mg/dl) 24 h após a administração da segunda dose de extracto

Analisando os resultados obtidos verifica-se que em todos os grupos experimentais ocorreu em decréscimo dos níveis sanguíneos de creatinina e ureia em comparação com o grupo controlo. Esta diminuição foi mais acentuada no grupo que recebeu a dose mais forte (1500 mg/Kg), onde a concentração de creatinina foi de 0,1 mg/dl e a concentração de ureia de 29,4 mg/dl. Estes resultados permitem-nos deduzir que o extracto testado apresenta um efeito protector a nível renal. Tendo em conta os resultados obtidos no estudo fitoquímico podemos associar este efeito protector provavelmente à presença de compostos com propriedades antioxidantes no extracto. O potencial terapêutico da utilização de antioxidantes e outras espécies redutoras na protecção da função renal e na redução de cálculos renais encontra-se já amplamente estudado (Khan, 2005).

Analisando os resultados obtidos no doseamento da enzima CK-MB (tabela 21 e figura 41) verifica-se que houve um aumento significativo dos níveis séricos desta enzima em todos os grupos experimentais.

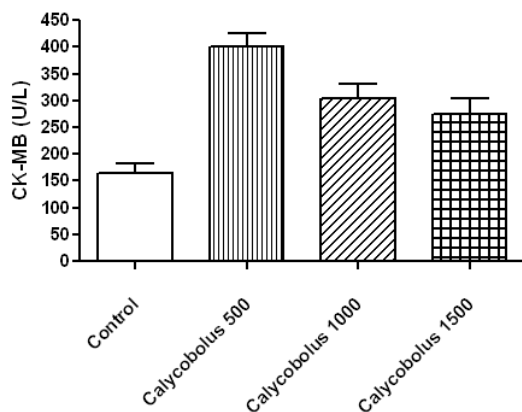


Figura 41 - Níveis sanguíneos de CK-MB (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto

No grupo controlo o nível sérico de CK-MB foi de 164,6 U/L e na dose mais baixa (500 mg/Kg) verificou-se que o valor subiu para os 400,6 U/L.

Analisando os grupos experimentais onde se usaram doses mais altas (1000 e 1500 mg/Kg) verificou-se que com o aumento da dose de extracto testada, a concentração do biomarcador diminuiu (304,5 U/L para a

dose 1000 mg/Kg e 274,2 U/L para a dose 1500 mg/Kg) o que pode ser devido ao aumento dos níveis de compostos antioxidantes que desempenham assim um papel protector, inibindo possíveis espécies oxidantes presentes. Isto porque um dos factores responsáveis pela depressão da função cardíaca e contractilidade são os radicais livres de oxigénio (Kapoor *et al.*, 1997).

Outra razão para este decréscimo pode ser pelo facto de o extracto apresentar uma solubilidade difícil para concentrações mais elevadas. Assim, pode eventualmente existir algum composto com alguma toxicidade que tenha sido dissolvido na solução com a dose mais baixa mas à medida que se aumentou a concentração, devido à saturação a sua dissolução já não se efectuou completamente e por isso esse composto não terá sido absorvido. Apesar do estudo químico não ter sido direccionado para a pesquisa de glicorresinas, sabemos que estas são características da família *Convolvulaceae*. Estes compostos apresentam estruturas altamente complexas, elevados pesos moleculares e a sua separação e identificação torna-se por isso muito difícil. A sua presença no nosso extracto pode justificar os resultados obtidos já que muitos destes compostos apresentam propriedades citotóxicas. Assim, no grupo experimental tratado com a dose mais baixa do extracto (500 mg/Kg) estes compostos poderiam estar presentes manifestando-se a sua toxicidade. Nas doses mais altas, a sua completa dissolução não se terá efectuado prevalecendo a actividade protectora dos constituintes maioritários.

Os resultados obtidos no doseamento da LDH encontram-se representados na figura 42.

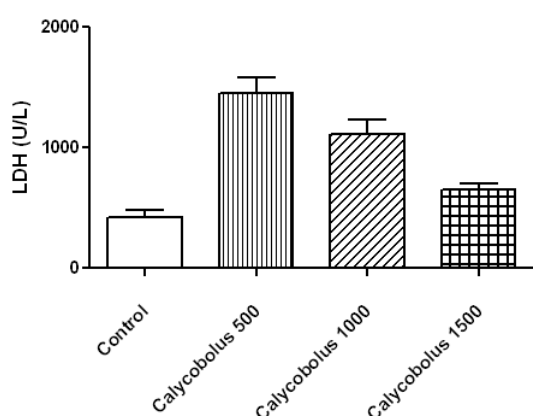


Figura 42 - Níveis sanguíneos de LDH (U/L) 24 h após a administração da segunda dose de extracto

Verifica-se que houve um aumento dos níveis séricos de LDH em todos os grupos experimentais (tabela 21).

Os grupos experimentais que apresentaram maiores níveis séricos de LDH foram os sujeitos às doses mais baixas. No ensaio em que a dose mais baixa foi a de 500 mg/Kg, o doseamento de LDH foi de 1455,4 U/L. No segundo ensaio realizado, no qual foi usada como dose mais fraca a de 300 mg/Kg, o

doseamento de LDH foi de 1533,5 U/L. Com o aumento da dose em estudo, verificou-se que houve um decréscimo dos níveis séricos de LDH, sendo o valor mais baixo

(647,4 U/L) observado no grupo experimental sujeito à dose mais alta (1500 mg/Kg) (tabela 21).

O aumento dos níveis séricos de LDH verificado em todos os grupos experimentais significa que ocorreu lesão celular a nível de um ou mais órgãos. No entanto, com o aumento da dose testada, o efeito tóxico foi menor o que poderá ser justificado pela presença no extracto de algum composto que apresente toxicidade mas devido à sua fraca solubilidade, esteja presente apenas em doses mais baixas, tornando-se insolúvel à medida que se concentra o extracto. Tal como referimos anteriormente suspeitamos poder tratar-se de uma glicorresina. Assim, no grupo que recebeu a dose mais alta (1500 mg/Kg) não se terão manifestado os efeitos nefastos deste ou destes compostos devido à sua baixa solubilidade, sobrepondo-se antes as características antioxidantes protectoras dos compostos maioritários do extracto. Tendo em conta os restantes biomarcadores avaliados, o aumento dos níveis séricos de LDH parece coincidir com o aumento dos níveis de CK-MB (tabela 21). Assim, a lesão celular manifestada pelos níveis de LDH pode ser , provavelmente associado a uma lesão cerebral e/ou cardíaca.

Conclusões e perspectivas

O estudo etnofarmacológico por nós realizado envolveu a determinação da actividade antimicrobiana do extracto metanólico do caule de *Calycobolus heudelotii*, usado tradicionalmente na Guiné-Bissau para o tratamento de lesões, feridas ou inflamações na pele. Sendo este o primeiro estudo que envolve esta planta, para além da actividade biológica e toxicidade, entendeu-se ser importante fazer a sua caracterização morfológica e estudo fitoquímico, contribuindo assim para o conhecimento geral desta planta medicinal.

Os resultados morfológicos, químicos e biológicos dos estudos realizados foram apresentados e discutidos ao longo da presente tese, sendo as respectivas conclusões sumariadas nos parágrafos seguintes.

A análise morfológica por nós efectuada permitiu estabelecer os principais elementos de diagnose botânica necessários para a correcta caracterização e identificação do caule de *C. heudelotii*.

Da análise morfológica macroscópica do caule verificou-se que este se caracteriza por apresentar uma estrutura ondulada e não cilíndrica, como se fosse constituído por um conjunto de feixes entrelaçados entre si. Em corte transversal a sua principal característica é a segmentação do lenho em numerosos lóbulos de tamanhos e contornos irregulares, organizados de forma concêntrica.

A nível microscópico o caule caracteriza-se pela presença de diferentes tipos de esclereídeos no parênquima cortical, que podem surgir isolados, de tamanhos compreendidos entre os 55,07 μm e os 142,53 μm ou em aglomerados cujas dimensões variam entre os 86,24 μm e 285,51 μm . Podem apresentar contornos regulares ou ramificações revelando um crescimento interposicional. Os grãos de amido possuem contornos poliédricos, sem hilo aparente ou visível de dimensões entre os 1,59 μm e 6,98 μm . Nesta zona existem ainda drusas de dimensões entre os 4,18 μm e 32,97 μm , sendo que as mais pequenas podem estar isoladas ou em grandes aglomerados.

A presença de drusas de pequenas dimensões (entre os 4,36 µm e os 9,08 µm) alinhadas ao longo dos feixes vasculares é também característica.

Os vasos xilemáticos são difusos, na sua maioria solitários (78%) e podem atingir os 248,19 µm de diâmetro. O seu comprimento varia entre os 220,74 µm e os 483,10 µm e nas extremidades são delimitados por tabiques ou placas de perfuração simples horizontal a ligeiramente inclinadas. Nas paredes laterais apresentam pontuações simples alternas, cuja abertura pode variar entre os 6,7 µm e os 16,69 µm.

A existência de parênquima axial, traqueídeos vasicêntricos de pequeno calibre com 1 série de pontuações aureoladas por parede e de tiloses é também característica.

O floema distribui-se em cunhas que interrompem o xilema, conferindo-lhe o seu aspecto característico. Os raios medulares são unisseriados, raramente bisseriados.

Os estudos fitoquímicos incluíram a caracterização do extracto por TLC, LC/UV e LC/UV/ES-MS, com o conseqüente conhecimento do seu perfil químico. Identificaram-se como constituintes maioritários: terpenos, ácidos fenólicos, linhanos e taninos gálhicos.

Identificaram-se dois dos ácidos fenólicos maioritários (ácido 3-cafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e o triterpeno β-sitosterol.

Detectou-se a presença de pelo menos três taninos gálhicos mas devido à ausência de estudos de espectrometria de ressonância magnética nuclear não foi possível a sua identificação.

Na análise em TLC detectou-se a presença de três compostos cuja identidade não foi elucidada mas que julgamos tratar-se de glicorresinas, características unicamente desta família. No entanto, devido à sua complexidade estrutural e à ausência de estudos mais aprofundados, não se conseguiu elucidar a sua estrutura.

Os resultados da avaliação da actividade antimicrobiana *in vitro* do extracto metanólico do caule de *C. heudelotii* permitiram conhecer o seu perfil de actividade biológica. O extracto mostrou ser activo contra estirpes de referência de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*, e ser inactivo contra *Staphylococcus aureus*, no intervalo de concentrações testado.

Por bioautografia o extracto mostrou ainda possuir actividade antioxidante relacionável com os compostos fenólicos maioritários, terpenos e ainda linhanos.

Esta propriedade do extracto, juntamente com a actividade antimicrobiana, pode explicar o uso tradicional da planta no tratamento de lesões cutâneas.

Nos estudos de toxicidade aguda não foi observada qualquer alteração comportamental ou sinal visível de toxicidade, nos diferentes grupos experimentais. Os resultados mostraram não ser, este extracto, tóxico à concentração máxima de 1500 mg/Kg.

O extracto mostrou ainda possuir propriedades protectoras a nível hepático e renal que podem ser relacionáveis, possivelmente com as suas propriedades antioxidantes.

O trabalho científico inerente à realização desta tese, é uma importante e inovadora contribuição para o estudo botânico e químico de espécies deste género, podendo deste modo ser adaptado e utilizado para um futuro conhecimento mais aprofundado do género *Calycobolus*.

O estudo por nós realizado permitiu estabelecer os elementos de diagnose necessários para a identificação botânica do caule de *C. heudelotii* e adaptar os métodos analíticos de TLC, LC/UV e LC/UV/ES-MS, por nós desenvolvidos, à sua caracterização química. Comparativamente à única espécie deste género que se encontra já estudada, podemos salientar que tal como acontece com o *C. ferrugineus*, o *C. heudelotii* também não apresenta alcalóides, sendo os compostos maioritários de ambos os compostos fenólicos. Ambas as espécies possuem terpenos. Como principais diferenças químicas podemos salientar a presença de linhanos e galhotaninos no *C. heudelotii* que não foram encontrados no *C. ferrugineus*. Por outro lado não foram detectados flavonóides na nossa espécie ao contrário do *C. ferrugineus*, onde se verificou a existência de flavonóides glicosilados, embora minoritários.

Tendo em conta o uso tradicional desta planta no tratamentos das lesões cutâneas, entendemos ser importante a determinação da actividade anti-inflamatória e anti-alérgica como linhas de continuação do presente trabalho.

A continuação do estudo fitoquímico do extracto, incluindo espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H NMR e ^{13}C NMR e experiências bidimensionais de correlação ^1H ^1H COSY, ^1H ^{13}C HMBC, ^1H ^{13}C HMQC, e ainda espectrofotometria de Infravermelho (IR) é outra das perspectivas para a identificação correcta de compostos maioritários detectados, nomeadamente terpenos, linhanos e taninos gálhicos.

Propomos ainda direccionar a análise do extracto para o isolamento e identificação de glicorresinas.

Referências Bibliográficas

- ADAMU, H.M., ABAYEH, O.J., AGHO, M.O., ABDULLAHI, A.L., UBA, A., DUKKU, H.U., WUFEM, B.M. (2005). An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 1-4.
- ADDO-FORDJOUR, P., ANNING, A.K., LARBI, J.A., AKYEAMPONG, S. (2009a). Liana species richness, abundance and relationship with trees in the Bobiri forest reserve, Ghana: Impact of management systems. *Forest Ecology and Management*, 257: 1822-1828.
- ADDO-FORDJOUR, P., OBENG, S., ADDO, M.G., AKYEAMPONG, S. (2009b). Effects of human disturbances and a plant invasion on liana community structure and relationship with trees in the Tinte Bepo forest reserve, Ghana. *Forest Ecology and Management*, 258: 728-734.
- ADLER, M., HOFFMANN, D., ELLINGER-ZIEGELBAUER, H., HEWITT, P., MATHESIS, K., MULRANE, L., GALLAGHER, W.M., CALLANAN, J.J. SUTER, L., FOUNTOULAKIS, M.M, DEKANT, W., MALLY, A. (2010). Assessment of candidate biomarkers of drug-induced hepatobiliary injury in preclinical toxicity studies. *Toxicology Letters*, 196: 1-11.
- APG (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85(4): 531-553.
- APG II. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the order and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399-436.
- ARAÚJO, G.U.C. & COSTA, C.G. (2007). Anatomia do caule de *Serjania corrugata* Radlk (Sapindaceae). *Acta Botânica Brasileira*, 21(2): 489-497.
- AUSTIN, D.F. (1997). Parallel and Convergent Evolution in the Convolvulaceae. In: MATHEWS, P. and SIVADASAN, M. (eds.), *Diversity and Taxonomy of Tropical Flowering Plants*. Published on WWW at <http://www.fau.edu/divdept/biology/people/daustin/evolutionary.html>

- BAH, M. & PEREDA-MIRANDA, R. (1996). Detailed FAB-Mass Spectrometry and High Resolution NMR Investigations of Tricolorins A-E, Individual Oligosaccharides from the Resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*, 52(41): 13063-13080.
- BERHAUT, J. (1975). *Flore Illustrée du Sénégal*, 3. Gouvernement du Sénégal, Dakar. 633 p.
- BOWES, B.G. (1997). *A Colour Atlas of Plant Structure*. Manson Publishing, London. 192 p.
- BURKILL, H.M. (1985). *The Useful Plants of West Tropical Africa*, ed. 2, vol. 1. Royal Botanic Gardens, Kew. 528 p.
- CAI, Y.Z., XING, J., SUN, M., ZHAN, Z.Q., CORKE, H. (2005). Phenolic antioxidants (Hydrolysable Tannins, Flavonols, and Anthocyanins) Identified by LC-ESI-MS and MALDI-TOF MS from *Rosa chinensis* Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26): 9940-9948.
- CARLQUIST, S. (1985). Observations on functional wood histology of vines and lianas: vessel dimorphism, tracheids, vasicentric tracheids, narrow vessels, and parenchyma. *Aliso*, 11(2): 139-157.
- CATARINO, L., MARTINS, E.S., PINTO-BASTO, M.F. & DINIZ, M.A. (2006). *Plantas Vasculares e Briófitos da Guiné-Bissau*. IICT e IPAD, Lisboa. 54.
- CHATTOPADHYAY, D., ARUNACHALAM, G., MANDAL, A.B., SUR, T.K., MANDAL, S.C., BHATTACHARYA, S.K. (2002). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 82: 229-237.
- CLIFFORD, M.N., JOHNSTON, K.L., KNIGHT, S., KUHNERT, N. (2003). Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10): 2900-2911.
- COSTA, A.F. (1994). *Farmacognosia*. 4^a ed., Vol. 2. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 1-91.
- CRAIG, W.J. (1999). Health-promotion properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 491-499.

- CRELLIN, J.K., PHILPOTT, J., TOMMIE BASS, A.L. (1990). *Herbal Medicine Past and Present: A reference guide to medicinal plants*, Duke University Press, 31-40.
- DE MARIA, C.A.B., MOREIRA, R.F.A. (2004). Métodos para Análise de Ácido Clorogênico, *Química Nova*, 27(4): 586-592.
- EICH, E. (2008). *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)*. Springer. 1-31, 525-582.
- ELUJOBA, A.A., ODELEYE, O.M., OGUNYEMI, C.M. (2005). Traditional Medicine Development for Medical and Dental Primary Health care Delivery System in Africa. *African Journal of Traditional CAM*, 2(1): 46-61.
- ESAU, K. (1974). *Anatomia das Plantas com Sementes*. Editora Edgard Blücher, Ltda, São Paulo. 293 p.
- ESPÍRITO SANTO, J. do. (1963). *Nomes Vernáculos de Algumas Plantas da Guiné Portuguesa. Estudos, Ensaios e Documentos n° 104*. Junta de Investigações do Ultramar, Lisboa. 108.
- ESPÍRITO-SANTO, M.D. (1991). As plantas medicinais e suas aplicações. In: Círculo de Leitores (ed.). *Botânica*, Vol I. 184-203.
- EWERS, F.W., CARLTON, M.R., FISHER, J.B., KOLB K.J., TYREE, M.T. (1997). Vessel diameters in roots versus stems of tropical lianas and other growth forms. *Botanical Gazette*, 150: 251-265.
- FERRI, M.G., (1999). *Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)*, 9ª ed. Nobel, São Paulo. 113 p.
- FICK, R.B. (1993). *Pseudomonas aeruginosa, the opportunist: pathogenesis and disease*. CRC Press, Florida. 1-5.
- GOMES, E.T., SILVA, O., DINIZ, M.A., MARTINS, E.S. (2003). *Plantas Mediciniais da Guiné-Bissau – Manual Prático*. Acção para o Desenvolvimento (AD), Guiné-Bissau. 74 p.
- GONZALEZ, J.M. (2001). El Farmacéutico y la Fitoterapia: Breves Apuntes Históricos. In: Infusiones La Leonesa / Manasul Internacional (ed.). *Plantas Medicinales (Fitoterapia Práctica)*, León. 31-32.

- GRASSMAN, J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamines and Hormones*, 72: 505-535.
- GROPPER, S.S., SMITH, J.L., GROFF, J.L. (2008). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 5th ed. Cengage Learning. 600 p.
- GURIB-FAKIM, A. (2006). Medicinal Plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1): 1-93.
- HARISHA, S. (2006). *An Introduction to Practical Biotechnology*, Laxmi Publications, 42-60.
- HART, B.L. (2005). The evolution of herbal medicine: behavioural perspectives. *Animal Behaviour*, 70: 975-989.
- HEGNAUER, R. (1964). *Chemotaxonomie der Pflanzen*, vol. III. Birkhäuser Verlag, Basel. 547-674.
- HEGNAUER, R. (1989). *Chemotaxonomie der Pflanzen*, vol. VIII. Birkhäuser Verlag, Berlin. 321-709.
- HEINE, H. (1963). The genus *Calycobolus* Willd. ex Roem. & Schult. (Convolvulaceae) in Africa. *Kew Bulletin*, 16: 387-391.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, A., NDJOKO, K., WOLFENDER, J.L. (2000). The Potential of African Plants as a Source of Drugs. *Current Organic Chemistry*, 4(10): 973-1010.
- HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J.-L., RODRIGUEZ, S., MARSTON, A. (1996). Strategy in the search for bioactive plant constituents. In: K. Hostettmann, F. Chinyanganya, M. Maillard, J.-L. Wolfender (eds.), *Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of African Medicinal Plants*. Harare, University of Zimbabwe. 21-42.
- HUEZA, I.M., GUERRA, J.L., HARAGUCHI, M., ASANO, N., GÓRNIK, S.L. (2005) The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: A study in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 53-58.
- HUTCHINSON, J. & DALZIEL, J.M. (1931). *Flora of West Tropical Africa* 2(1). Crown Agents for the Colonies, London. 208-219.

- INNGJERDINGEN, K.; NERGÅRD, C.S., DIALLO, D., MOUNKORO, P.P., PAULSEN, B.S. (2004). An ethnopharmacological survey of plants for wound healing in Dogoland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92: 233-244.
- ISIBOR, J.O., OSENI, A., EYAUFE, A., OSAGIE, R., TURAY, A. (2008). Incidence of aerobic bacteria and *Candida albicans* in post-operative wound infections. *African Journal of Microbiology Research*, 2: 288-291.
- IWU, M.M. (1993). *Handbook of African Medicinal Plants*. CRC Press, Boca Raton. 309-342.
- JENETT-SIEMS, K., WEIGL, R., BÖHM, A., MANN, P., TOFERN-REBLIN, B., OTT, S.C., GHOMIAN, A., KALOGA, M., SIEMS, K., WITTE, L., HILKER, M., MÜLLER, F., EICH, E. (2005). Chemotaxonomy of the pantropical genus *Merremia* (Convolvulaceae) based on the distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, 66: 1448-1464.
- JORK, H., FUNK, W., FISCHER, W., WIMMER, H. (1990). *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods. Vol 1a – Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents*. VCH, Verlagsgesellschaft. 408-411.
- KAPOOR, R., KALRA, J., PRASAD, K. (1997). Cardiac depression and cellular injury in hemorrhagic shock and reinfusion: Role of free radicals. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 176: 291-301.
- KERHARO, J. ADAM, J.G. (1974). *La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle – Plantes Médicinales et Toxiques*. Vigot Frères, Paris. 1011 p.
- KHAN, S.R. (1995) *Calcium Oxalate in Biological Systems*. CRC Press. 375 p.
- KHAN, S.R. (2005). Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. *Urological Research*, 33: 349-357.
- KIKUCHI, T.Y.P., POTIGUARA, R.C.V., SANTOS, P.P. (2007). Caracterização histoquímica e ultra-estrutural do estipe de *Socratea exorrhiza* (Mart.) H.Wendl. (Arecaceae). *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, 2(2): 61-68.

- KOCUR, M., KLOOS, W.E., SCHLEIFER, K.H. (2006). The Genus *Micrococcus*. In DWORKIN, M. (ed), *Prokaryotes*, Volume 3- Springer. 961-971.
- KWAADSTENIET, M., VAN REENEN, C.A., DICKS, L.M.T. (2009). Evaluation of Nisin F in the Treatment of Subcutaneous Skin Infections, as Monitored by Using a Bioluminescent Strain of *Staphylococcus aureus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, online: 13 August 2009.
- LEJOLY, J. & LISOWSKI, S. (1985). Le genre *Calycobolus* Willd. (Convolvulaceae) en Afrique tropicale. *Buletin du Jardin Botanique Nationale de Belgique*, 55: 27-60.
- MAUSETH, J.D. (2008). *Botany: An Introduction to Plant Biology*. Jones & Bartlett Publishers. 624 p.
- MCDONALD, A. (1991). Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botânica*, 62 (1): 65-82.
- MEYER, B. S., ANDERSON, D.B. & BÖHNING. (1965). *Introdução à fisiologia vegetal*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. p. 257.
- NATHWANI, R.A., PAIS, S., REYNOLDS, T.B., KAPLOWITZ, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41: 380-382.
- NAVARRO, L.A., KLEIN, R.C., HEUSER, E.D. (2007). Caracterização dos Cristais de Cálcio nas Partes Reprodutivas e Vegetativas Aéreas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(1): 762-764.
- NIENHUIS, M.B., OTTERVANGER, J.P., BOER, M.J., DAMBRINK, J.H.E., HOORNTJE, J.C.A., GOSSELINK, A.T.M., SURYAPRANATA, H., HOF, A.W.J. (2008). Prognostic importance of creatine kinase and creatine-MB after primary percutaneous coronary interventions for ST-elevation myocardial infarction. *American Heart Journal*, 155(4): 673-679.
- OLIVER-BEVER, BEP. (1986). *Medicinal Plants in Tropical West Africa*. Cambridge University Press, Cambridge. 375 p.
- OPLETAL, L. & SOVOVÁ, H. (2008). TLC of Lignans. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., SHERMA, J., KOWALSKA, T. (eds.). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, Vol 99. CRC Press. 425-450.

- PACE, M.R. (2009). Evolução da Variação Cambial e do Floema Secundário em Bignoniaceae (Bignoniaceae). Dissertação de Mestrado em Botânica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 123 p.
- PÁSKA, C., INNOCENTI, G., FERLIN, M., KUNVÁRI, M., LÁSZLÓ, M. (2002) Pinoresinol from *Ipomoea cairica* Cell Cultures. *Natural Product Letters*, 16(5): 359-363.
- PATTANAYAK, S.P, SUNITA, P. (2008). Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcate* (L.f) Ettingsh. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 241-247.
- PRYCHID, C.J. & RUDALL, P.J. (1999). Calcium oxalate crystal in monocotyledons: a revision of their structure and systematics. *Annals of Botany*, 84: 725-739.
- REZENDE, A.A. & RANGA, N.T. (2005). Lianas da Estação Ecológica do Noroeste Paulista, São José do Rio Preto/Mirassol, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasileira*, 19(2): 273-279.
- SCHIPPMANN, U., LEAMAN, D.J., CUNNINGHAM, A.B. (2002). Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues. In: FAO, *Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries*. Satellite event on the occasion of the Ninth Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Rome, Inter-Departmental Working Group on Biological Diversity for Food and Agriculture. 21 p.
- SIANI, A.C., SILVA, A.M.P., ROCHA, L.M. (s/d) *Estudo Químico do Calycobolus ferrugineus (Cipó-tuíra)*. Farmaguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, (<http://www.genamaz.org.br>, 10/08/2008).
- SILVA, R.J.F. da (2006). *Anatomia foliar comparada em espécies de Oenocarpus Mart. (Arecaceae) de Belém, Pará, Brasil: uma contribuição taxonômica*. Dissertação de Mestrado em Botânica Tropical. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. 112 p.
- SINGH, M., GOVINDARAJAN, R., NATH, V., RAWAT, A.K.S., MEHROTRA, S. (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 67-72.

- STAHL, E. (1969). *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag. 245-709.
- STAPLES, G.W. & AUSTIN, D.F. (2009). Revision of Neotropical *Calycobolus* and *Porana* (Convolvulaceae). *Edinburgh Journal of Botany*, 66(1): 133-153.
- STEFANOVIĆ, S., AUSTIN, D.F., OLMSTEAD, R.G. (2003). Classification of Convolvulaceae: A Phylogenetic Approach. *Systematic Botany*, 28(4): 791-806.
- STEFANOVIC, S., KRUEGER, L., OLMSTEAD, R.G. (2002). Monophyly of the Convolvulaceae and circumscription of their major lineages based on DNA sequences of multiple chloroplast loci. *American Journal of Botany*, 89(9): 1510-1522.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2006). *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, USA. 764 p.
- TERPINC, P., ABRAMOVIC, H. (2010). A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121: 366-371.
- TUNG, Y.T., WU, J.H., HUANG, C.Y., CHANG, S.T. (2009). Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confuse* bark. *Bioresource Technology*, 100: 509-514.
- USDA, NRCS. (2009). The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 6 November 2009). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- VERDCOURT, B. (1963). Convolvulaceae. In: C.E. Hubbard & E. Milne-Redhead (eds., *Flora of Tropical East Africa*. Crown Agents for Oversea Governments and Administrations, London. 161 p.
- WAGNER, H. & BLADT, S. (1995). *Plant Drug Analysis: A Thin Chromatography Atlas*, 2^a ed. Springer-Verlag, Berlin. 359-364.
- WAGNER, H. (1984). *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag, Heidelberg. 299-304.
- WASHIZU, T., NAKAMURA, M., IZAWA, N., SUZUKI, E., TSURUNO, S., WASHIZU, M., NAKAJO, S., ARAI, T. (2002). The Activity of the Cytosolic MDH/LDH and the Isoenzyme Pattern of LDH in the Peripheral Leukocytes of Dogs, Cats and Rabbits. *Veterinary Research Communications*, 26: 341-346.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (1993). Summar 9 WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram*, 28: 13-14.
- WHO (2003). *Traditional medicine*. Fact sheet n° 134. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print.html>, 21/10/2006).
- WHO. (2004). *Guidelines for Drinking-water Quality: Recommendations*. World Health Organization.
- YEN, F.L., WU, T.H., LIN, L.T., LIN., C.C. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen.induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 123-128.
- ZHENG, W. & CLIFFORD, M.N. (2008). Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chemistry*, 106: 147-152.